

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΓΡΟΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

των συνεργαζόμενων τμημάτων:

Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων
Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων
Ιατρικής

Παπαδόπουλος Βασίλειος
MSc. Χημικός

Ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογίας ελέγχου οργανικών τοξικών ενώσεων σε ψάρια

Διδακτορική Διατριβή

Αγρίνιο 2010

**Στους γονείς μου
για την πολυετή βοήθειά τους για όλες τις σπουδές μου**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή υλοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Πιστοποίηση Αγροτικών Προϊόντων Ποιότητας» των συνεργαζόμενων τμημάτων Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων, Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων και Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επιβλέπουσα καθηγήτρια είναι η Επίκουρος Καθηγήτρια του τμήματος Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, κα. **Δήμητρα Χελά**. Η κα. Χελά με καθοδήγησε με υπομονή σε όλα τα βήματα της διατριβής, παρέχοντας μου κάθε δυνατότητα συνεργασίας, συζήτησης, ανταλλαγής απόψεων και διευκολύνσεων ώστε να ολοκληρωθεί η διατριβή με τον καλύτερο δυνατό τρόπο.

Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται την εφαρμογή μεθόδων βελτιστοποίησης για την ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας ελέγχου τοξικών ενώσεων σε ψάρια. Από το σύνολο των συνθετικών οργανικών ενώσεων που απαντώνται σε ψάρια προσδιορίζονται τα επίπεδα επιλεγμένων οργανοχλωριωμένων ενώσεων (δραστικές ουσίες φυτοφαρμάκων και πολυχλωριωμένα διφαινύλια). Χρησιμοποιούνται χημειομετρικές μέθοδοι τόσο για τη βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου (κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί, προσομοίωση πειραματικών δεδομένων με τεχνητά νευρωνικά δίκτυα) όσο και για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας που προέρχεται από την ορθότητα της μεθόδου (ιεραρχικό πειραματικό σχέδιο). Η βελτιστοποιημένη μέθοδος ανάλυσης εφαρμόζεται σε είδη ψαριών υδάτινων φυσικών αποδεκτών ώστε να προσδιοριστούν τα επίπεδα τιμών των υπολειμμάτων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων της μελέτης. Τέλος, προσδιορίζεται η εκτεταμένη αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων ανάλυσης των πραγματικών δειγμάτων ψαριών και συμπεριλαμβάνεται στην έκφραση των αποτελεσμάτων μέτρησης.

Τα άλλα δυο μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, ο κ. **Ιωάννης Δεληγιαννάκης**, Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας και ο κ. **Αθανάσιος Λάνταβος**, Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, μου παρείχαν εύστοχες υποδείξεις και επικριτική κριτική και τους ευχαριστώ θερμά.

Στην εξεταστική επιτροπή της διδακτορικής διατριβής συμμετείχαν, εκτός των ανωτέρω, τα παρακάτω μέλη ΔΕΠ με αλφαβητική σειρά:

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Λαμπροπούλου Δήμητρα, Λέκτορας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Μπεληγιάννης Γρηγόριος, Λέκτορας, Τμήμα Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας

Παπαδάκη Μαρία, Καθηγήτρια, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας,

τους οποίους θέλω να ευχαριστήσω για τη μελέτη της παρούσας διατριβής και τις συμβουλευτικές υποδείξεις τους.

Καθοριστικής σημασίας ήταν η συνεργασία του Επίκουρου Καθηγητή του τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, κ. Ιωάννη Κωνσταντίνου. Ο κ. Κωνσταντίνου διαθέτοντας αμεσότητα επικοινωνίας και διάθεση προσφοράς μου παρείχε σημαντικές συμβουλές για την αντιμετώπιση προβλημάτων κατά την πορεία υλοποίησης της διατριβής. Για την κατανόηση του πεδίου των Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων, υπήρξε ουσιαστική η συνεργασία του Λέκτορα του τμήματος Διοίκησης Επιχειρήσεων Αγροτικών Προϊόντων και Τροφίμων, κ. Γρηγόρη Μπεληγιάννη, ο οποίος μου περείχε κάθε δυνατή διευκόλυνση για την εκμάθηση αυτών των στατιστικών πακέτων. Ο Αναπληρωτής Καθηγητής, του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ιωάννης Λεονάρδος, μου περείχε σημαντικές πληροφορίες για τα ιχθυρά των περιοχών εφαρμογής της διατριβής.

Καθόλη τη διάρκεια της υλοποίησης της διατριβής υπήρχε συνεργασία και ανταλλαγή απόψεων με την υποψήφια διδάκτορα κα. Αναστασία Καρακίτσου και την κα. Εύα-Μαρία Σαρηγιαννίδου, MSc Χημικό. Θέλω να ευχαριστήσω, την κα. Χάιδω Μαχά, MSc Μηχανικό Η/Υ και Πληροφορικής, για τη συνεργασία της κατά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ο επαγγελματίας ψαράς της λίμνης Τριχωνίδας, κ. Ιωάννης Δεματάς, μου πρόσφερε τα δείγματα ιχθυρών της λίμνης και μου παρείχε τις εμπειρικές του γνώσεις κατά τις συζητήσεις που είχαμε για τα ψάρια της λίμνης αυτής.

Η σημαντική βοήθεια των γονιών και των μελών της οικογένειάς μου, άμεση και έμμεση, ήταν ευεργετική για την ολοκλήρωση τόσο της εργασίας αυτής όσο και όλων των προηγούμενων ετών των σπουδών μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

POPs: Persistent Organic Pollutants

PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

PCBs: Polychlorinated Biphenyls

BCF: Bioconcentration factor

BAF: Bioaccumulation factor

LD₅₀: Half Lethal Dose

SOX: Soxhlet

SPE: Solid Phase Extraction

SPME: Solid Phase MicroExtraction

MSPD: Matrix Solid Phase Dispersion

GC: Gas Chromatography

GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometry

LOD: Limit of Detection

LOQ: Limit of Quantification

SD: Standard Deviation

RSD: Relative Standard Deviation

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ 1

Εισαγωγή 1

1.1 Πηγές των οργανοχλωριωμένων ενώσεων 3

- 1.1.1 Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα 3
- 1.1.2 Πολυχλωριομένα διφαινύλια (PCBs) 4

1.2 Τύχη και συμπεριφορά των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον 6

- 1.2.1 Έδαφος 7
 - 1.2.1.1 Διεργασίες διάσπασης – αποσύνθεσης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων 7
 - 1.2.1.1.1 Βιολογική αποσύνθεση 7
 - 1.2.1.1.2 Χημική αποσύνθεση 8
 - 1.2.1.1.3 Φωτοαποσύνθεση 8
 - 1.2.1.2 Διεργασίες μετακίνησης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων 8
 - 1.2.1.2.1 Προσρόφηση 8
 - 1.2.1.2.2 Κύκλος νερού στο περιβάλλον 9
 - 1.2.1.2.3 Πτητικότητα 10
 - 1.2.1.2.4 Πρόσληψη από τα φυτά 10
- 1.2.2 Ατμόσφαιρα 10
- 1.2.3 Υπόγεια και επιφανειακά νερά 11
- 1.2.4 Παγκόσμια μεταφορά των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον 13
- 1.2.5 Συσσώρευση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο υδάτινο περιβάλλον και πρόσληψη από τους υδρόβιους οργανισμούς 14

1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες που καθορίζουν την κατανομή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον 16

- 1.3.1 Διαλυτότητα στο νερό 17
- 1.3.2 Λιποφιλία 18
- 1.3.3 Προσρόφηση 18
- 1.3.4 Αλληλεπίδραση με τα συστατικά του περιβάλλοντος 19
- 1.3.5 Βιοσυσσώρευση – Βιοσυγκέντρωση 19
- 1.3.6 Ιονισμός 21
- 1.3.7 Πτητικότητα 22

1.4 Αρχές τοξικολογίας 22

1.5 Χημεία, τοξικότητα και περιβαλλοντική σημασία των οργανοχλωριωμένων ενώσεων 24

- 1.5.1 Εισαγωγή 24
- 1.5.2 Χημικές και φυσικές ιδιότητες 25
 - 1.5.2.1 Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα 25
 - 1.5.2.2 Πολυχλωριομένα διφαινύλια 33
- 1.5.3 Τοξικότητα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων 37
 - 1.5.3.1 Τοξικότητα των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων 37
 - 1.5.3.2 Τοξικότητα των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs) 40
- 1.5.4 Περιβαλλοντική συμπεριφορά 41
 - 1.5.4.1 Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα 41
 - 1.5.4.2 Πολυχλωριωμένα διφαινύλια 48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 51

2.1	Εισαγωγή	51
2.2	Δειγματοληψία – Προκατεργασία δείγματος	52
2.3	Εκχύλιση των υπολειμμάτων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων	53
2.3.1	Γενικά	53
2.3.2	Εκχύλιση Soxhlet (SOX)	53
2.3.3	Υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-liquid extraction)	54
2.3.4	Υγρή-στερεή εκχύλιση (Solid phase extraction, SPE)	55
2.3.5	Υγρή-στερεή μικροεκχύλιση (solid phase microextraction, SPME)	57
2.3.6	Εκχύλιση προσρόφησης σε αναδεύσιμη ράβδο (SBSE)	59
2.3.7	Εκχύλιση διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση (Matrix solid phase dispersion, MSPD)	59
2.3.7.1	Βασική διαδικασία της εκχύλισης	59
2.3.7.2	Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση	61
2.3.8	Εκχύλιση με υπερήχους (USE)	63
2.3.9	Εκχύλιση στο υπερκρίσιμο σημείο (SFE)	64
2.3.10	Εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (PFE)	64
2.3.11	Εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE)	65
2.4	Καθαρισμός εκχυλισμάτων	65
2.4.1	Μέθοδοι απομάκρυνσης των λιπιδίων χωρίς διάλυση τους	66
2.4.1.1	Χρωματογραφία διείσδυσης σε πηκτή (gel permeation chromatography)	66
2.4.1.2	Υγρή-στερεή χρωματογραφία στήλης με χρήση προσροφητικών υλικών (Adsorption column)	66
2.4.1.3	Παθητική διάχυση (Διάλυση)	67
2.4.2	Μέθοδοι απομάκρυνσης λιπιδίων με διάλυσή τους (Destructive lipid removal)	67
2.5	Προσδιορισμός των οργανοχλωριωμένων ενώσεων	67
2.5.1	Αέρια χρωματογραφία (gas chromatography – GC)	69
2.5.1.1	Τροφοδοσία φέροντος αερίου	70
2.5.1.2	Σύστημα εισαγωγής δείγματος	70
2.5.1.3	Χρωματογραφικές στήλες	71
2.5.1.4	Ανιχνευτές	74
2.5.2	Αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών (GC-MS)	75

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ 77

3.1	Εισαγωγή	77
3.2	Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων	79
3.2.1	Προσεγγίσεις υπολογισμού επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων	81
3.2.2	Χαρακτηριστικά επίδοσης για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων	82
3.2.2.1	Ακρίβεια (Accuracy)	84
3.2.2.1.1	Πιστότητα (Precision)	84
3.2.2.1.2	Ορθότητα (trueness)	85
3.2.2.1.3	Σχέση Πιστότητας και Ορθότητας μεθόδου	86
3.2.2.2	Ανάκτηση (Recovery)	88
3.2.2.3	Εκλεκτικότητα (Selectivity) και Ειδικότητα (Specificity)	88
3.2.2.4	Ανιχνευσιμότητα (Detectability)	89
3.2.2.5	Γραμμικότητα (Linearity)	92
3.2.2.6	Ευαισθησία (Sensitivity)	93

3.2.2.7 Αντοχή (Ruggedness) και Ανθεκτικότητα (Robustness)	93
3.2 Αβεβαιότητα μέτρησης	93
3.2.1 Εκτίμηση της αβεβαιότητας	97
3.2.2 Συστατικά (κύριες πηγές) αβεβαιότητας αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούν χρωματογραφικές αναλύσεις	101
3.2.2.1 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με την ποσότητα δείγματος	101
3.2.2.2 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με την ανάκτηση μεθόδου (ορθότητα)	101
3.2.2.3 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με την επαναληψιμότητα	101
3.2.2.4 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με το όριο ανίχνευσης του αναλύτη	102
3.2.2.5 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με τη βαθμονόμηση του οργάνου	102
3.2.3 Εκτίμηση της αβεβαιότητας με εσωτερική (in-house) μελέτη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας μεθόδου	102
3.2.4 Αβεβαιότητα μέτρησης προερχόμενη από την ορθότητα (trueness) μιας αναλυτικής μεθόδου	103
3.2.5 Υπολογισμός της αβεβαιότητας από την ανάκτηση μεθόδου	106
3.2.6 Πρακτική διακύμανση των συστατικών της αβεβαιότητας	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ _____ 111

Εισαγωγή _____ 111

4.1 Βασικές στατιστικές έννοιες _____ 113

4.1.1 Μέση τιμή, τυπική απόκλιση, διακύμανση	113
4.1.2 Κανονική κατανομή ή κατανομή Gauss δείγματος	114
4.1.3 Δοκιμές σημαντικότητας (Σύγκριση σειράς πειραματικών δεδομένων)	117
4.1.4 Δοκιμασία student (t-test)	117
4.1.5 Δοκιμασία F (F – test)	120
4.1.6 Ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA)	120

4.2 Βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων _____ 123

Εισαγωγή	123
4.2.1 Πειραματικό σχέδιο (experimental design)	123
4.2.2 Χρήση παραγοντικών σχεδιασμών στη διαδικασία βελτιστοποίησης πειραματικών συνθηκών	125
4.2.2.1 Χρήση των πειραματικών σχεδίων στην αναλυτική χημεία	125
4.2.2.2 Πλήρως παραγοντικό σχέδιο	126
4.2.2.3 Κλασματικό παραγοντικό σχέδιο	128
4.2.2.4 Πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο ή ιεραρχικό	129

4.3 Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks, ANNs) _____ 130

4.3.1 Γενικά στοιχεία	130
4.3.2 Από τα βιολογικά στα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα	131
4.3.3 Βασικά χαρακτηριστικά των τεχνητών νευρωνικών δικτύων	133
4.3.4 Θεωρία της μάθησης (εκπαίδευση)	135
4.3.5 Είδη νευρωνικών δικτύων – Είδη αλγορίθμων μάθησης	136
4.3.6 Πλεονεκτήματα των ΤΝΔ	138

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ _____ 139

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ _____ 141

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	141
5.1 Πρότυπες ενώσεις της μελέτης	141
5.2 Διαλύτες και αντιδραστήρια	142
5.3 Προσροφητικά υλικά	142
5.4 Δειγματοληψία ιχθυρών	142
5.4.1 Περιοχές δειγματοληψίας και είδη δειγμάτων	142
5.4.2 Διαδικασία δειγματοληψίας	146
5.5 Μέθοδος εκχύλισης και προσδιορισμός λίπους	148
5.5.1 Εμβολιασμός δειγμάτων	148
5.5.2 Μέθοδος εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση, MSPD.	149
5.5.3 Προσδιορισμός λίπους ιχθυρών	150
5.6 Χρωματογραφική ανάλυση δειγμάτων	151
5.6.1 Αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC)	151
5.6.2 Αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (Gas chromatography-Mass spectrometry, GC-MS)	154
5.7 Στατιστικά πακέτα επεξεργασίας	155

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΦΑΣΗ (MSPD). ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	157
6.1 Μέθοδος αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά (One factor at a time)	158
6.1.1 Βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας εκχύλισης	158
6.1.2 Επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας	167
6.2 Μέθοδος εφαρμογής παραγοντικών σχεδιασμών	171
6.2.1 Βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας εκχύλισης	171
6.2.2 Επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας	186
6.2.3 Εκτίμηση της αβεβαιότητας της μεθόδου εκχύλισης MSPD προερχόμενης από την ορθότητα αυτής	193
6.3 Εφαρμογές της μεθοδολογίας MSPD για την εκχύλιση οργανοχλωριωμένων ενώσεων από ιχθυρά	204
6.4 Συμπεράσματα	206

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	211
7.1 Προσδιορισμός των τιμών συγκέντρωσης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα δείγματα ιχθυρών της μελέτης	211
7.2 Υπολογισμός της αβεβαιότητας των αποτελεσμάτων προσδιορισμού οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα δείγματα ιχθυρών της μελέτης	229

7.3 Σύγκριση επιπέδων τιμών των οργανοχλωριωμένων ενώσεων των δειγμάτων ιχθυρών της μελέτης με επίπεδα τιμών ενώσεων σε δείγματα ιχθυρών άλλων μελετών	242
7.4 Συμπεράσματα	246
Ε. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	248
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	250
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	v
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	vii
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ	x

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Εισαγωγή

Οι ανθεκτικοί οργανικοί ρυπαντές (Persistent Organic Pollutants, POPs) είναι οργανικές ενώσεις που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε διαδικασίες αποδόμησης οι οποίες περιλαμβάνουν φυσικές, χημικές και βιολογικές μετατροπές. Οι POPs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες σημαντικών ενώσεων: τους κυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) και τους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις οι οποίες έχουν τη μεγαλύτερη παραγωγή και είναι οι πιο ανθεκτικές στην αποδόμηση.

Η ανακάλυψη του DDT και τα πλεονεκτήματά του υπέρ της καταπολέμησης των εντόμων οδήγησαν στην αναγνώριση και αποδοχή του ως εντομοκτόνο αλλά και στην προστασία των ανθρώπων από ασθένειες όπως η ελονοσία και ο τύφος. Η παρασκευή οργανοχλωριωμένων ενώσεων οδήγησε στην ευρεία ανάπτυξη παραγωγής νέων φυτοφαρμάκων, αλλά με ελάχιστες δικλείδες προστασίας από τους ελεγκτικούς μηχανισμούς, έχοντας ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των οργανισμών στα φυτοφάρμακα και την επακόλουθη πρόκληση επιπτώσεων στον άνθρωπο και το περιβάλλον.

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις που δρουν ως ρυπαντές στο περιβάλλον διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

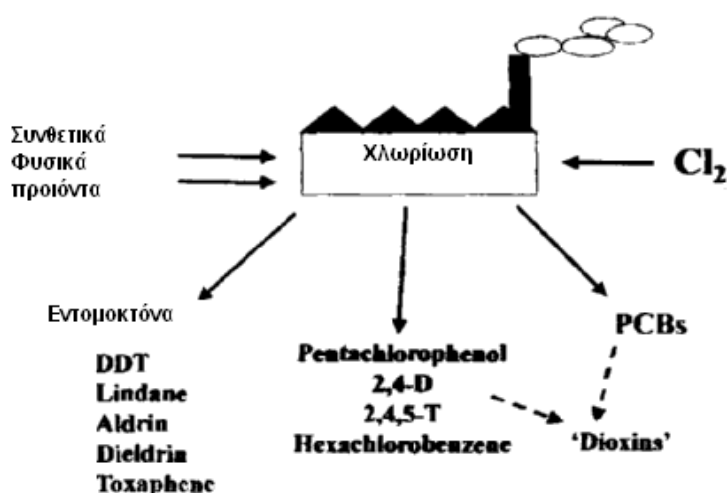
- i) Τα εντομοκτόνα και τα αγροχημικά, πχ DDT.
- ii) Τους μονωτές ηλεκτρικών συσκευών, πχ. PCBs (πολυχλωριωμένα διφαινύλια).
- iii) Τα προϊόντα χημικών διεργασιών των οργανοχλωριωμένων ενώσεων, πχ PCDDs, PCDFs

Χρονολογικά, η πρώτη κατηγορία οργανοχλωριωμένων ενώσεων ήταν τα PCBs που παρασκευάστηκαν στο τέλος του 19^{ου} αιώνα. Πρόκειται για ομάδα 209 συγγενών ενώσεων,

γνωστών ως συμπαράγωγα, που διαφέρουν ως προς τον αριθμό των ατόμων χλωρίου προσδεμένων στο μόριο του διφαινυλίου. Το DDT συντέθηκε το 1875 αλλά χρησιμοποιήθηκε ως εντομοκτόνο για πρώτη φορά το 1939 στην Ελβετία και απέκτησε ευρεία χρήση κατά το 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο και μαζική παραγωγή για την γεωργία (εντομοκτόνο) και την ανθρώπινη υγεία τη δεκαετία του 1950. Η παραγωγή και η χρήση του DDT οδήγησε στην εμπορική παραγωγή νέων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων όπως HCHs (Lindane), dieldrin, chlordane, heptachlor, toxaphen, mirex, chlordecone.

Η παρουσία αυτών των ενώσεων στο περιβάλλον ευνοείται κατά γενικό τρόπο πρώτα από την πληθώρα οργανοχλωριωμένων ενώσεων που παρασκευάστηκαν βιομηχανικά χρησιμοποιώντας ως κύριο συστατικό το φθινό και εύκολα διαθέσιμο αέριο χλωρίου. Δεύτερον, επειδή οι ενώσεις αυτές διαθέτουν κυκλική χημική δομή μορίου, δηλαδή θερμοανθεκτικότητα και ανθεκτικότητα στην βιοαποδόμηση και τρίτον διότι η ανεξέλεγκτη χρήση και απόθεσή τους στο περιβάλλον οδήγησε στη συσσώρευσή τους. Η επίδραση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον και τον άνθρωπο εξαρτάται από το βαθμό της έκθεσής τους (διασπορά, συγκέντρωση), το χρόνο ημιζωής, τις χημικές και φυσικές ιδιότητες καθώς και τη φύση του περιβάλλοντος εφαρμογής τους (έδαφος, νερό, αέρας) και περιγράφεται από τον όρο «**τύχη και συμπεριφορά των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον**» (Smith A. G. et al, 2002).

Είναι αναγκαίο να κατανοηθεί ο τρόπος της συμπεριφοράς των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον καθώς και τα χαρακτηριστικά της ένωσης ή του περιβάλλοντος που ευνοούν και αναπτύσσουν τη διαδικασία της τύχης τους.



Σχήμα 1.1 Κύριες κατηγορίες προϊόντων χλωρίωσης (τροποποίηση από Smith A. G. et al, 2002).

1.1 Πηγές των οργανοχλωριωμένων ενώσεων

Η συνθήκη των Ηνωμένων Εθνών για τους ανθεκτικούς οργανικούς ρυπαντές που υπογράφηκε στη Στοκχόλμη (UNEP, 2001) όρισε δώδεκα χημικές ουσίες/κατηγορίες χημικών ουσιών για τις οποίες θα πρέπει να μετρηθούν τα τωρινά επίπεδα τιμών τους και να παρακολουθηθεί η τύχη τους στο περιβάλλον ή η χρήση τους. Πρόκειται για τις ενώσεις: DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Chlordane, Heptachlor, Hexachlorobenzene, Mirex, Toxaphene, PCBs, Dioxins, Furans. Έτσι, σύμφωνα με το άρθρο 7 της συνθήκης θα πρέπει οι χώρες που την υπέγραψαν, να σχεδιάσουν και να αναπτύξουν Εθνικά Σχέδια Εφαρμογής (National Implementation Plans, NIPs). Ιδιαίτερα οι χώρες που χρησιμοποιούν ακόμη ή δεν ελέγχουν την εφαρμογή αυτών των ενώσεων πρόκειται να οδηγηθούν σε δραστική μείωση της χρήσης στη γεωργία και της χρήσης για την καταπολέμηση ασθενειών. Όμως, αναπτύσσοντας τα NIPs, πολλές χώρες θα αναγκαστούν επίσης να αποδεχτούν την κληρονομιά των υψηλών επιπέδων τιμών των POPs από την παλιότερη ανεξέλεγκτη χρήση και να αντιμετωπίσουν με πράξεις, τον κίνδυνο της ρύπανσης του εδάφους, του υπεδάφους και των ζωντανών οργανισμών. Χρειάζεται να αναζητηθούν λύσεις για τη διαχείριση των αποθηκευμένων και μετακινούμενων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων και των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (συστατικών των POPs) στο περιβάλλον. Είναι λοιπόν αναγκαίος ο έλεγχος και η παρακολούθηση των επιπέδων τιμών συγκέντρωσης των POPs (Papadopoulos A., 2004) τώρα αλλά και μελλοντικά, ώστε κάθε χώρα να συμμορφωθεί με τη συνθήκη της Στοκχόλμης (Muir D. et al, 2006). Στην παρούσα διατριβή λοιπόν, επιλέξαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα τιμών συγκέντρωσης κάποιων από τους παραπάνω POPs σε ιχθυρά επιλεγόμενων περιοχών. Από το σύνολο των 209 συμπαράγωγα, μόνο τα 132 έχουν μετρηθεί σε βιομηχανικά προϊόντα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 0,05%. Μεταξύ αυτών, η Community Bureau of Reference της Ευρωπαϊκής ένωσης (1982), επέλεξε τα συμπαράγωγα PCBs: 28, 52, 101, 118, 138, 153 και 180, βασιζόμενη στην ανθεκτικότητα, στην σχετική παρουσία, στην τοξικότητα και στο διαχωρισμό τους κατά τις μετρήσεις δειγμάτων για τα προγράμματα ελέγχου παρουσίας των PCBs σε τρόφιμα, υδρόβιους και γενικά ζωικούς οργανισμούς (Barcelo D., 2000).

1.1.1 Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα της μελέτης (aldrin, endrin, dieldrin, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, α -chlordane, γ -chlordane, 4,4-DDE, 4,4- DDD, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulfate, endrin aldehyde, heptachlor, heptachlor epoxide, endrin

ketone and methoxychlor) χρησιμοποιήθηκαν ως φυτοφάρμακα (εντομοκτόνα) πρώτη φορά το 1939 (DDT), εντατικοποιήθηκε η παραγωγή τους έως τη δεκαετία του 1980, απαγορεύτηκε εν συνεχεία η χρήση των περισσότερων υπό τον κίνδυνο της περιβαλλοντικής ρύπανσης και τοξικότητας, ενώ κάποια (όπως endosulfan, endosulfan sulfate) εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα.

Τα εντομοκτόνα εφαρμόζονται στο γεωργικό περιβάλλον με διάφορους τρόπους όπως με ψεκασμούς των υπέργειων τμημάτων των φυτών, με επένδυση και προστασία των σπόρων ή άλλων πολλαπλασιαστικών οργάνων και με επεμβάσεις στο έδαφος.

Η ποσότητα ενός φυτοφαρμάκου που φτάνει το στόχο από την εφαρμογή του είναι μόλις 0,3% που σημαίνει ότι το 99,7% της ποσότητας διαχέεται στο περιβάλλον. Τα φυτοφάρμακα φτάνοντας στο έδαφος ή στο πεδίο εφαρμογής τους διαχέονται αφού υπόκεινται σε διαδικασίες αποδόμησης ή διασποράς που περιλαμβάνουν εξάτμιση, διάχυση στα υπόγεια ύδατα, απορροή στα επιφανειακά ύδατα, βιολογική αποδόμηση από τα φυτά ή μικροοργανισμούς του εδάφους, παραμονή στα έδαφος. Σύμφωνα με τον Hayo M.G. Van der Werf (1996), η εξάτμιση των φυτοφαρμάκων αποτελεί το 80-90% της διάχυσης τους στο περιβάλλον.

1.1.2 Πολυχλωριομένα διφαινύλια (PCBs)

Τα PCBs παράχθηκαν εμπορικά από το 1929 ως ψυκτικά και μονωτικά υλικά μετασχηματιστών και πυκνωτών υψηλής τάσης, βερνίκια, πρόσθετα για την ευκαμψία μονωτικών υλικών, κ.α. λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους όπως θερμική και χημική σταθερότητα και πολύ μικρή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Επιστημάνθηκαν με διάφορες εμπορικές ονομασίες ανάλογα με τη χώρα στην οποία χρησιμοποιήθηκαν: Aroclor (ΗΠΑ), Kaneclor (Ιαπωνία), Fenclor (Ιταλία), Pyralene (Γαλλία), Clophen (Δ. Γερμανία). Η μέγιστη παραγωγή τους καταγράφηκε τη δεκαετία 1970.

Τα PCBs εισέρχονται στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της παραγωγής, χρήσης και αποθήκευσής τους, ενώ δεν είναι γνωστή μέχρι σήμερα η φυσική τους παρουσία. Η είσοδος τους στον αέρα προέρχεται από κομποστοποίηση αποβλήτων (παραπροϊόν), επικίνδυνα ή ιατρικά απόβλητα, εξάτμιση από χώρους απόθεσης επικίνδυνων αποβλήτων, από τη βιομηχανία χάλυβα και σιδήρου, από τυχαίες διαρροές (απόχυση ή διαρροή, φωτιά) και από παλιότερες εστίες ρύπανσης και διαχέονται στο περιβάλλον.

Η κύρια πηγή PCBs στο νερό είναι ο κύκλος μεταφοράς τους στο περιβάλλον (ίζημα αέρας, έδαφος). Γενικά η συγκέντρωση PCBs αυξάνει κοντά στους τόπους ανθρώπινης

δραστηριότητας. Ο βυθός των υδάτινων επιφανειών αποτελεί μεγάλη αποθήκη των PCBs από την οποία εξέρχονται σε μικρές ποσότητες προς το νερό, με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή τους στα ψάρια να είναι χιλιάδες φορές υψηλότερη από το νερό (βιοσυσσώρευση).

Η παραμονή των PCBs στο έδαφος διαρκεί αρκετά χρόνια. Μεταφέρονται και παραμένουν στα εδάφη κυρίως με τον κύκλο μεταφοράς τους στο περιβάλλον και την έκθεση σε χώρους εργασίας (αντικατάσταση και συντήρηση μετασχηματιστών, ατυχήματα, πυρκαγιά, απόχυση ή αποθήκευση υλικών που περιέχουν PCBs). Επιπρόσθετα, πηγή ρύπανσης με PCBs αποτελεί ο παλιός ηλεκτρικός εξοπλισμός που ευθύνεται και για την υψηλότερη συγκέντρωσή τους σε εσωτερικούς παρά εξωτερικούς χώρους (Bojja J. et al, 2005, Barcelo D., 2000)

Η χρήση και παραγωγή τους περιορίστηκε ή απαγορεύτηκε σε πολλές χώρες (Σουηδία 1972, ΗΠΑ 1977, Νορβηγία 1980, Φιλανδία 1985, Δανία 1986) ενώ πρόσφατα η συνθήκη της Στοκχόλμης για τους POPs κατέταξε τα PCBs ως κατηγορία χημικών ενώσεων απόλυτης προτεραιότητας οριστικής εξάλειψης έως το 2025. Σύμφωνα με τη συνθήκη αυτή του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών διαχωρίστηκε μια ομάδα δώδεκα χημικών ενώσεων, ονομαζόμενη «**βρώμικη δωδεκάδα (dirty dozen)**», που περιλαμβάνει ανθεκτικούς οργανικούς ρυπαντές που απαγορεύτηκε ή πρόκειται να απαγορευτεί ή να περιοριστεί σταδιακά η χρήση τους στα πλαίσια διεθνής συμφωνίας (Muir D., et al, 2006).

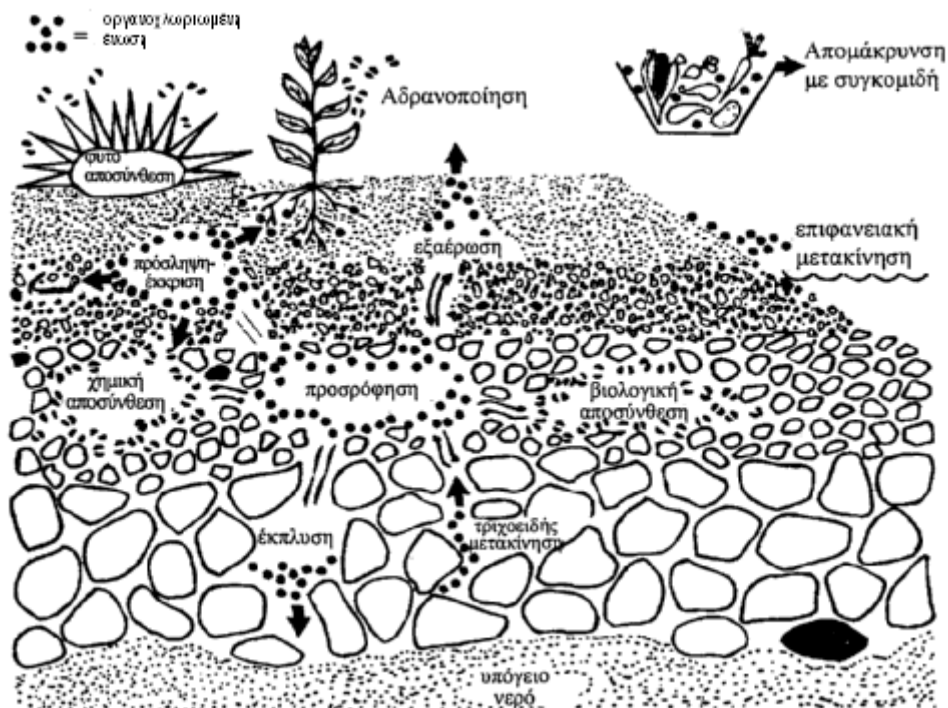
Πίνακας 1.1 Οι POPs που αποτελούν τη βρώμικη δωδεκάδα και η κατάσταση χρήσης τους σε κάποιες χώρες του κόσμου (Colin Baird and Michael Cann, 2005).

POP	U.S.A.	Canada	U.K.	Mexico	China	India
<i>DDT</i>	X	X	X	R	R	R
<i>Aldrin</i>	X	X	X	X	OK	OK
<i>Dieldrin</i>	X	X	X	X	OK	R
<i>Endrin</i>	X	X	X	X	OK	X
<i>Chlordane</i>	R	X	X	OK	R	OK
<i>Heptachlor</i>	R	X	X	X	OK	OK
<i>Hexachlorobenzene</i>	X	X	X	-	-	-
<i>Mirex</i>	X	X	-	R	R	-
<i>Toxaphene</i>	X	X	X	X	OK	X
<i>PCBs</i>	X	R	R	OK	-	-
<i>Dioxins</i>	BP	BP	BP	BP	BP	BP
<i>Furans</i>	BP	BP	BP	BP	BP	BP

X=απαγορευμένη ή μη εγγεγραμμένη χρήση, R=μόνο περιορισμένες χρήσεις, OK= μη περιοριστική χρήση, BP= παραπροϊόν

1.2 Τύχη και συμπεριφορά των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις μετά την είσοδό τους στο περιβάλλον (PCBs) ή την εφαρμογή τους στα φυτά ή το έδαφος (εντομοκτόνα) υφίστανται μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών αποδόμησης και μετακίνησης (υδρόλυση, φωτόλυση, οξείδωση, διάσπαση, μεταφορά, εξάτμιση, ριζική πρόσληψη από τα φυτά, κ.α.) και αρχίζουν να ρυπαίνουν το έδαφος, τα νερά των ποταμών, των λιμνών και των θαλασσών, εμφανίζονται σε επικίνδυνες συγκεντρώσεις στα τρόφιμα και τα λιπαρά μέρη του ανθρώπινου σώματος.



Σχήμα 1.2 Διεργασίες αποδόμησης και μετακίνησης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον.

Οι διεργασίες αποδόμησης (διάσπασης και αποσύνθεσης) διακρίνονται στις:

(1) Βιολογική αποσύνθεση

Περιλαμβάνει διάσπαση, αποσύνθεση ή αδρανοποίηση της οργανοχλωριωμένης ένωσης και οφείλεται σε ζώντες οργανισμούς.

(2) Χημική αποσύνθεση

Πρόκειται για καθαρά χημική διάσπαση, χωρίς καμία επίδραση από ζώντες οργανισμούς.

(3) Φωτοαποσύνθεση

Είναι χημική διάσπαση που οφείλεται στη δράση του φωτός.

Οι διεργασίες μετακίνησης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων διακρίνονται σε:

1. Προσρόφηση στα εδαφικά κολλοειδή (Absorption).
2. Έκπλυση στα βαθύτερα στρώματα του εδάφους (Leaching).
3. Εξάτμιση ή εξάχνωση (πητικότητα) και διαφυγή στην ατμόσφαιρα με μορφή ατμών (Volatilization).
4. Πρόσληψη και/ή έκκριση από τα φυτά (Absorption, Exudation).
5. Συγκράτηση και/ή πρόσληψη από τη βλάστηση και στη συνέχεια απομάκρυνση με τη συγκομιδή (Crop removal).
6. Επιφανειακή μετακίνηση με διάβρωση (από τον άνεμο ή το νερό) (Runoff).

Ο ρυθμός αποδόμησης γενικά εξαρτάται και αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και της υγρασίας του εδάφους και χαρακτηρίζεται από το χρόνο ημιζωής (DT_{50}). Τα προϊόντα της αποδόμησης (μεταβολίτες) μπορεί να έχουν ανεπιθύμητα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά όπως την ίδια επιβαρυντική συμπεριφορά, μεγαλύτερη κινητικότητα, κ.α. (Χελά Δ. Γ., (1999), Hayo M.G. van der Werf (1996)).

1.2.1 Έδαφος

1.2.1.1 Διεργασίες διάσπασης – αποσύνθεσης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων

1.2.1.1.1 Βιολογική αποσύνθεση

Η βιολογική αποσύνθεση συντελείται κατά το μεγαλύτερο μέρος από τα βακτήρια, τους μύκητες και τους ακτινομύκητες μέσα στο έδαφος. Το εάν μια οργανοχλωριωμένη ένωση είναι ενεργή ή ανενεργή, έχει μικρή ή μεγάλη διάρκεια ζωής, μετακινείται εύκολα ή όχι, προσροφάται στο έδαφος ή προσλαμβάνεται από τα φυτά ή αφήνει επιβλαβή υπολείμματα στο έδαφος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μεταβολισμό της από τους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί άλλοτε δεν μεταβολίζουν τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις, άλλοτε τις μεταβολίζουν εύκολα ή υπό συνθήκες και έμμεσα (συμμεταβολισμός). Οι κυριότερες βιοχημικές αντιδράσεις που εξηγούν πως γίνεται η μικροβιακή αποσύνθεση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο έδαφος είναι:

- i) Απαλογόνωση
- ii) Οξείδωση – Αναγωγή
- iii) Υδρόλυση
- iv) Υδροξυλίωση
- v) Ρήξη αρωματικού δακτυλίου

1.2.1.1.2 Χημική αποσύνθεση

Η χημική αποσύνθεση είναι η διάσπαση ή αποσύνθεση μιας ένωσης με καθαρά χημικές αντιδράσεις και χωρίς τη συμβολή των μικροοργανισμών στο έδαφος. Μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα και την ενεργοποίηση της ένωσης, σε αντίθεση με τη φωτοχημική διάσπαση. Οι τρεις κύριες αντιδράσεις χημικής αποσύνθεσης είναι η οξείδωση, η αναγωγή και η υδρόλυση. Μικρότερη σημασία έχει ο σχηματισμός αδιάλυτων αλάτων, χημικών συμπλόκων ή ελεύθερων ριζών.

Οξείδωση. Με την οξείδωση μια ένωση χάνει ηλεκτρόνια, αλλάζει έτσι η ενεργειακή της κατάσταση, γίνεται πολύ ασταθής και μπορεί να πάρει μέρος σε διάφορες χημικές αντιδράσεις στο έδαφος.

Αναγωγή. Είναι το αντίθετο της οξείδωσης, δηλαδή το μόριο της ένωσης παίρνει ηλεκτρόνια και στη συνέχεια συμμετέχει σε διάφορες χημικές αντιδράσεις που οδηγούν στην αποδόμησή του.

Υδρόλυση. Κατά την υδρόλυση, η ένωση αντιδρά με το νερό, χημικοί δεσμοί σπάνε και το νερό (H^+ ή OH^-) ενώνεται με τα μόρια της ένωσης μέσω αντικατάστασης ενός ή περισσοτέρων ατόμων ή ομάδων ατόμων. Η υδρόλυση είναι εντονότερη σε όξινα ή αλκαλικά εδάφη καθώς επίσης όταν τα μόρια των ενώσεων είναι προσροφημένα στα εδαφικά κolloειδή. Ο ρυθμός υδρόλυσης γενικά εξαρτάται από την θερμοκρασία, το pH, την ιοντική ισχύ, την παρουσία μεταλλικών ιόντων (καταλυτική δράση). Για παράδειγμα, εάν η αντίδραση υδρόλυσης καταλύεται από οξύ ή βάση ο χρόνος ημιζωής θα επηρεάζεται από το pH του εδάφους. Ακόμα η ισχυρή ιοντική ισχύς του δεσμού C-Cl θα επιβραδύνει τις διαδικασίες υδρόλυσης.

1.2.1.1.3 Φωτοαποσύνθεση

Περιλαμβάνει τις φωτοχημικές αντιδράσεις κατά τις οποίες οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις απορροφούν ηλιακή ενέργεια (υπεριώδη ακτινοβολία) με αποτέλεσμα τη μερική ή ολική απενεργοποίησή τους.

1.2.1.2 Διεργασίες μετακίνησης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων

1.2.1.2.1 Προσρόφηση

Προσρόφηση είναι η προσέλκυση και συγκράτηση ιόντων ή/και μορίων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων πάνω στην επιφάνεια των ανόργανων και οργανικών κolloειδών του εδάφους. Πρόκειται για ένα φυσικό – χημικό φαινόμενο που επηρεάζει την

ποσότητά τους στο εδαφικό διάλυμα και καθορίζει τη βιολογική της δράση, τη μετακίνησή της στο έδαφος, την εξάτμιση – εξάχνωση στην ατμόσφαιρα καθώς και τη μικροβιακή αποσύνθεση. Η προσρόφηση στα κolloειδή του εδάφους διακρίνεται, με βάση τις υπεύθυνες γι' αυτήν δυνάμεις, σε:

α) φυσική προσρόφηση β) χημική προσρόφηση

Η προσρόφηση μιας οργανοχλωριωμένης ένωσης στο έδαφος μειώνει την κινητικότητά της και εξαρτάται από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους (ανόργανα κolloειδή, οργανική ουσία, pH, υγρασία) και τη μοριακή δομή της. Η οργανική ύλη του εδάφους προσροφά τα μόρια των μη ιονικών οργανοχλωριωμένων ενώσεων και η έκταση της προσρόφησης υπολογίζεται με τον συντελεστή προσρόφησης k_{oc} από την περιεχόμενη οργανική ύλη, $k_{oc} = \frac{k}{oc\%} \cdot 100$ (εξίσωση Freundlich). Συμβαίνει επίσης ημαντικό ποσοστό 20 έως 70 % ενός φυτοφαρμάκου ή των μεταβολιτών του παραμένει στο έδαφος ως υπόλειμμα συνδεδεμένο ισχυρά με τα οργανικά και ανόργανα κolloειδή συστατικά του εδάφους. Έτσι, σ' αυτή την κατάσταση η εξαγωγή τους είναι δύσκολη και τελικά χάνουν την βιολογική τους δραστηριότητά.

1.2.1.2.2 Κύκλος νερού στο περιβάλλον

Ο κύκλος του νερού στο περιβάλλον συνεισφέρει σημαντικά στην τύχη των οργανοχλωριωμένων ενώσεων μέσω της εκπλύσης από το βρόχινο νερό και της επιφανειακής απορροής.

Έκπλυση είναι η μετακίνηση της ένωσης προς τα υπόγεια στρώματα του νερού. Η έκπλυση επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες:

- α) την υδατοδιαλυτότητα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Όσο περισσότερο ευδιάλυτη είναι μια ένωση, τόσο περισσότερο εκπλύνεται, εφόσον δεν δρουν άλλοι παράγοντες.
- β) την ποσότητα νερού που διέρχεται μέσα από το έδαφος.
- γ) την υφή – δομή του εδάφους.
- δ) τον ιονισμό της ένωσης, αφού επηρεάζει το βαθμό της προσρόφησης.

Ως **απορροή** ορίζεται το ποσό νερού και κάθε διαλυμένου ή αιωρούμενου υλικού σε αυτό, που απομακρύνεται από τις επιφανειακές εκτάσεις διαμέσου της επιφανειακής αποστράγγισης. Το υλικό απορροής μπορεί να περιέχει διαλυμένες, αιωρούμενες ή απορροφημένες από το έδαφος οργανοχλωριωμένες ενώσεις. Η απορροή προκαλεί ρύπανση των επιφανειακών υδάτων, εν αντιθέσει με την έκπλυση που προκαλεί ρύπανση των υδάτων του υπεδάφους. Η έκταση της ρύπανσης αυτής εξαρτάται από τις ιδιότητες της ένωσης, τα

εδαφικά χαρακτηριστικά, το ρυθμό αποστράγγισης και το βάθος της δεξαμενής του νερού. Επί παραδείγματι, ο ρυθμός έκπλυσης μειώνεται με την αύξηση της ποσότητας του οργανικού υλικού και το βάθος της δεξαμενής νερού με υψηλή βιολογική δραστηριότητα, ενώ η παρουσία μεγάλων ανοιγμάτων του εδάφους (ρήγματα, ρωγμές, ανοίγματα) αυξάνει την πιθανότητα έκπλυσης.

1.2.1.2.3 Πτητικότητα

Η πτητικότητα των φυτοφαρμάκων οφείλεται για την απώλεια ποσοστού 80-90% αυτού από την εφαρμογή του ή διάχυσή του στο περιβάλλον (Hayo M.G. van der Werf, 1996). Ο ρυθμός πτητικότητας αυξάνει με την αύξηση της υγρασίας του μέσου εναπόθεσης του φυτοφαρμάκου και μειώνεται κατά την ανάμιξη με το έδαφος, αφού τότε η πτητικότητα εξαρτάται από τη μετακίνηση στην επιφάνεια του εδάφους ή την μεταφορά διαμέσου της υγρασίας του εδάφους.

Κριτήρια πτητικότητας μιας οργανοχλωριωμένης ένωσης αποτελούν η τάση ατμών αλλά πιο εκτεταμένα ο συντελεστής Henry, K_H . Έτσι, οργανοχλωριωμένες ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος όπως DDT, PCBs, οι οποίες έχουν πολύ χαμηλή τάση ατμών και άρα χαμηλή ατμοσφαιρική συγκέντρωση και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, δεν συνεισφέρουν σημαντικά στο ποσό των οργανοχλωριωμένων ενώσεων της ατμόσφαιρας. Εξαιτίας της πτητικότητας τους στο περιβάλλον επέρχεται γρήγορη και σημαντική έκθεση στο περιβάλλον η οποία όμως δεν οδηγεί σε άμεσο περιβαλλοντικό κίνδυνο εξαιτίας της ακαριαίας διάλυσης στην ατμόσφαιρα και την πρόκληση διαδικασιών αποδόμησης (φωτόλυση, οξείδωση).

1.2.1.2.4 Πρόσληψη από τα φυτά

Η ριζική και φυλλική πρόσληψη οργανοχλωριωμένων ενώσεων από τα φυτά είναι η σημαντικότερη οδός έκθεσης του ανθρώπου και των ζώων σε αυτό και αποτελεί ίσως την κυριότερη πηγή βιοσυσώρευσης.

1.2.2 Ατμόσφαιρα

Στην ατμόσφαιρα, η φωτοχημική διάσπαση είναι ο κύριος τρόπος υποβάθμισης και καταστροφής των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Ένας άλλος τρόπος απομάκρυνσης από την ατμόσφαιρα είναι η επιστροφή τους στη επιφάνεια του εδάφους ή των φυτών από τη βροχή, την ομίχλη, το χιόνι και το χαλάζι. Μ' αυτό τον τρόπο προκαλείται ρύπανση οικοσυστημάτων μακριά από τον τρόπο εφαρμογής ή παρουσίας των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Με την

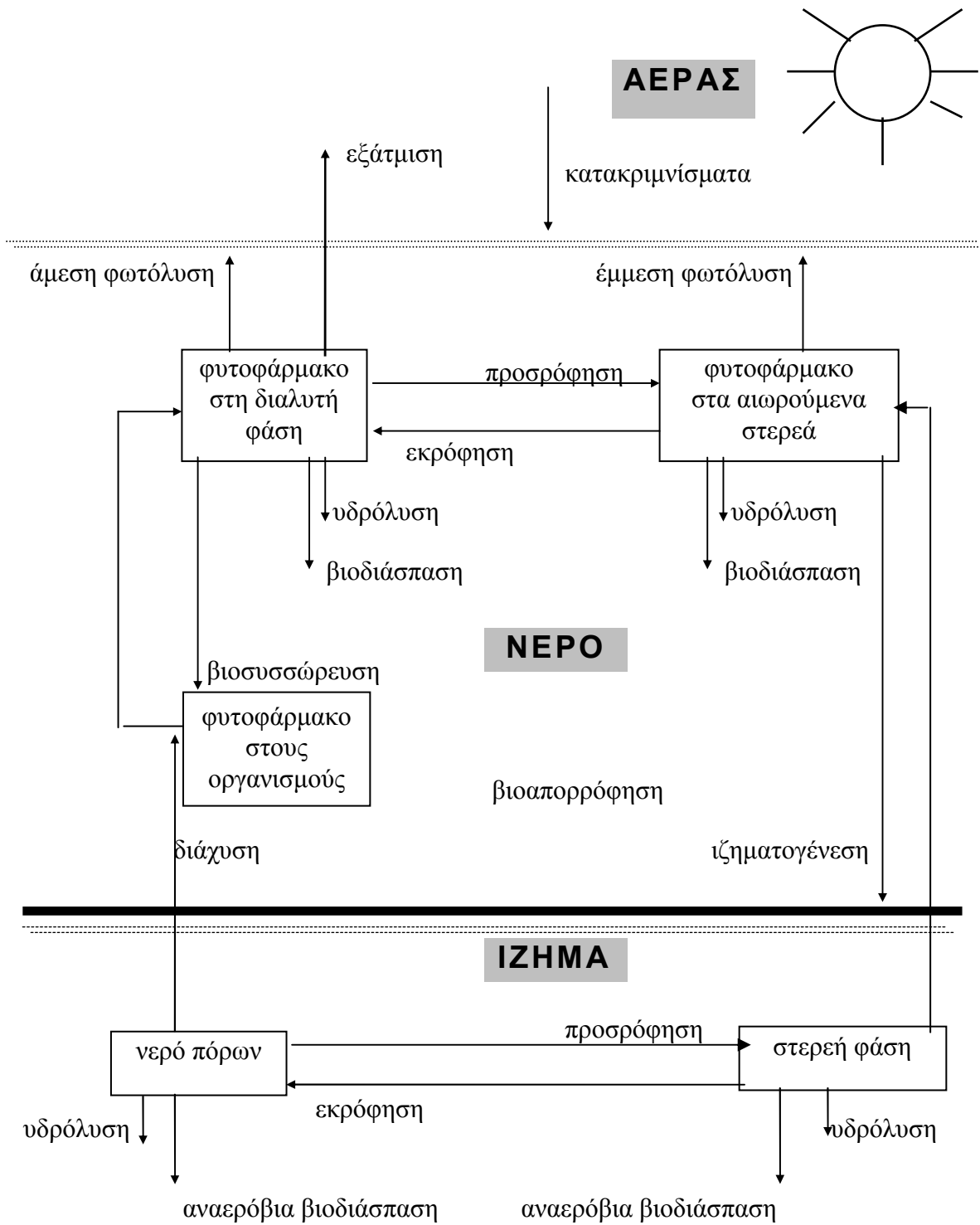
επιστροφή τους στο έδαφος, η τύχη τους είναι όμοια με εκείνη των ενώσεων που βρίσκονται στο έδαφος.

1.2.3 Υπόγεια και επιφανειακά νερά

Τα επιφανειακά νερά επιβαρύνονται με οργανοχλωριωμένες ενώσεις μέσω: απορροής από τη δράση του νερού, διάβρωσης του εδάφους, απευθείας εφαρμογή στο νερό, ατμοσφαιρικές κατακρημνίσεις, έκπλυση παράπλευρων επιφανειών, τυχαία ή μη απόρριψη σε νερά, ενώ τα υπόγεια νερά επιβαρύνονται κυρίως μέσω έκλυσης.

Σε ένα υδάτινο σύστημα οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις κατανέμονται μεταξύ νερού, τυχόν αιωρούμενων σωματιδίων και του πυθμένα – ιζήματος. Η βιοδιαθεσιμότητα και συνεπώς η επικινδυνότητα τους στα νερά εξαρτάται και επηρεάζεται από τη φάση στην οποία βρίσκονται, π.χ. ενώσεις προσροφημένες σε εδαφικά κολλοειδή, αιωρούμενα σωματίδια ή σε ιζήματα είναι λιγότερο βιοδιαθέσιμες και άρα περισσότερο τοξικές από ότι οι ενώσεις στην υγρή φάση.

Έτσι, οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις βρισκόμενες σε ένα υδάτινο σύστημα υφίσταται διάφορες διεργασίες, όπως: αραίωση κυρίως στα επιφανειακά αλλά και στα υπόγεια νερά, εξάτμιση στα επιφανειακά υγρά, φωτόλυση στα επιφανειακά υγρά, αποδόμηση χημική ή βιολογική, πρόσληψη από μικροοργανισμούς κυρίως στα επιφανειακά νερά, προσρόφηση σε αιωρούμενα σωματίδια ή στο έδαφος, ίζημα στον πυθμένα, βιομεγέθυνση.



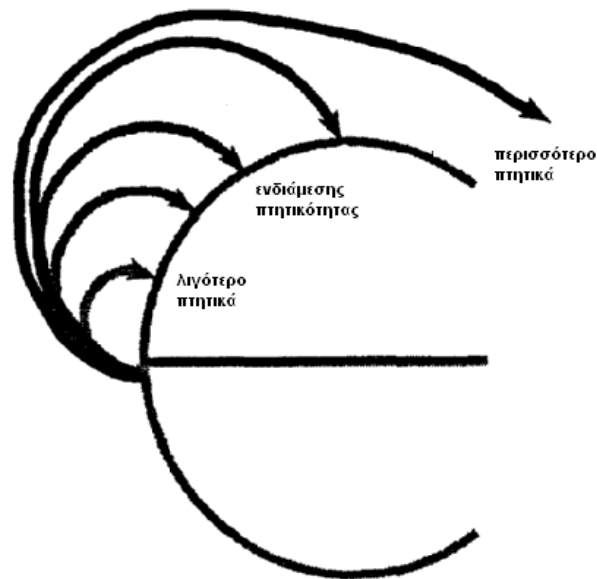
Σχήμα 1.3 Τύχη και μεταφορά των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο υδάτινο σύστημα (Χελά Δ. Γ., 1999)

1.2.4 Παγκόσμια μεταφορά των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας 1980, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις οργανοχλωριωμένων ενώσεων παρατηρούνταν στους ωκεανούς του Βόρειου Ημισφαιρίου εξαιτίας της μεγαλύτερης χρήσης τους στις αναπτυγμένες χώρες: Ιαπωνία, Ευρώπη, Βόρεια Αμερική αλλά με την πάροδο των ετών και δεδομένης της κλιματικής αλλαγής και της αυξημένης χρήσης σε αναπτυσσόμενες χώρες του νότιου Ημισφαιρίου οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις στην ατμόσφαιρα ακολουθούν μια μακράς πορείας παγκόσμια μεταφορά συσσωρευόμενες κυρίως στις πολικές περιοχές της γης. Πολλές μελέτες φανερώνουν ατμοσφαιρική μεταφορά και συγκέντρωση PCBs, DDTs, HCHs και chlordanes στην Αρκτική και στις νότιες πολικές περιοχές (IPCS, 1995).

Δεδομένου ότι η θερμοκρασία ατμόσφαιρας, εδάφους και νερού των τροπικών χωρών είναι υψηλότερη από τη θερμοκρασία χωρών με ήπιο ή πολικό κλίμα, κατανοούμε ότι η διάχυση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στην ατμόσφαιρα και το νερό χωρών τροπικού περιβάλλοντος θα είναι ταχύτερη. Εξαιτίας αυτού, στις χώρες με τροπικό κλίμα η διεργασία της απορροής ρυπασμένων με οργανοχλωριωμένες ενώσεις νερών στους ωκεανούς είναι πιο σημαντική από ότι στους ωκεανούς με κανονικό κλίμα. Επιπρόσθετα, ο χρόνος παραμονής των ενώσεων στο νερό τροπικού κλίματος είναι σύντομος και η μεταφορά στην ατμόσφαιρα μεγαλύτερη. Επιβεβαίωση αυτού προήλθε από τη μελέτη μέτρησης υπολειμμάτων οργανοχλωριωμένων ενώσεων στον αέρα και σε επιφανειακά ύδατα (Iwata, H., 1993) κατά την οποία η συγκέντρωση των HCHs είχε τη μεγαλύτερη αναλογία από όλα τα POPs. Η συγκέντρωσή τους ήταν μεγαλύτερη στο βόρειο ημισφαίριο, σε περιοχές με χαμηλή θερμοκρασία κοντά στην Αρκτική αλλά και στις περιοχές αρχικής εφαρμογής του (με τροπικό κλίμα). Από την άλλη, η συγκέντρωση DDT ήταν μεγαλύτερη μόνο στις θάλασσες της τροπικής Ασίας, ενώ τα PCBs και Chlordanes εμφανίζουν περισσότερο ομοιόμορφη παγκόσμια κατανομή.

Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην εξάτμιση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στις τροπικές περιοχές ακολουθούμενη από συμπύκνωση καθώς μειώνεται η ατμοσφαιρική θερμοκρασία προς τους πόλους που εξαρτάται από την πτητικότητα κάθε ένωσης. Ενώσεις με υψηλότερη πτητικότητα μεταφέρονται σε πιο μακρινές περιοχές,



Σχήμα 1.4 Η επίδραση της πτητικότητας των POPs στην απόσταση μεταφοράς τους από τον ισημερινό προς τους πόλους της γης.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας της συγκέντρωσης των ενώσεων αυτών στους πόλους είναι η περιορισμένη βιολογική δραστηριότητα αποδόμησης τους καθώς και ο περιορισμός των χημικών διεργασιών αποδόμησης λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας και της μικρής διάρκειας της ημέρας (λιγότερο ηλιακό φως).

Η μέτρηση σημαντικών συγκεντρώσεων οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε ψάρια και θηλαστικά στην Αρκτική υποδηλώνει την έκθεση των οργανισμών στις ενώσεις στις πολικές περιοχές ως αποτέλεσμα της μακράς πορείας ατμοσφαιρικής μεταφοράς τους στο γήινο περιβάλλον (IPCS, 1995).

1.2.5 Συσσώρευση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο υδάτινο περιβάλλον και πρόσληψη από τους υδρόβιους οργανισμούς

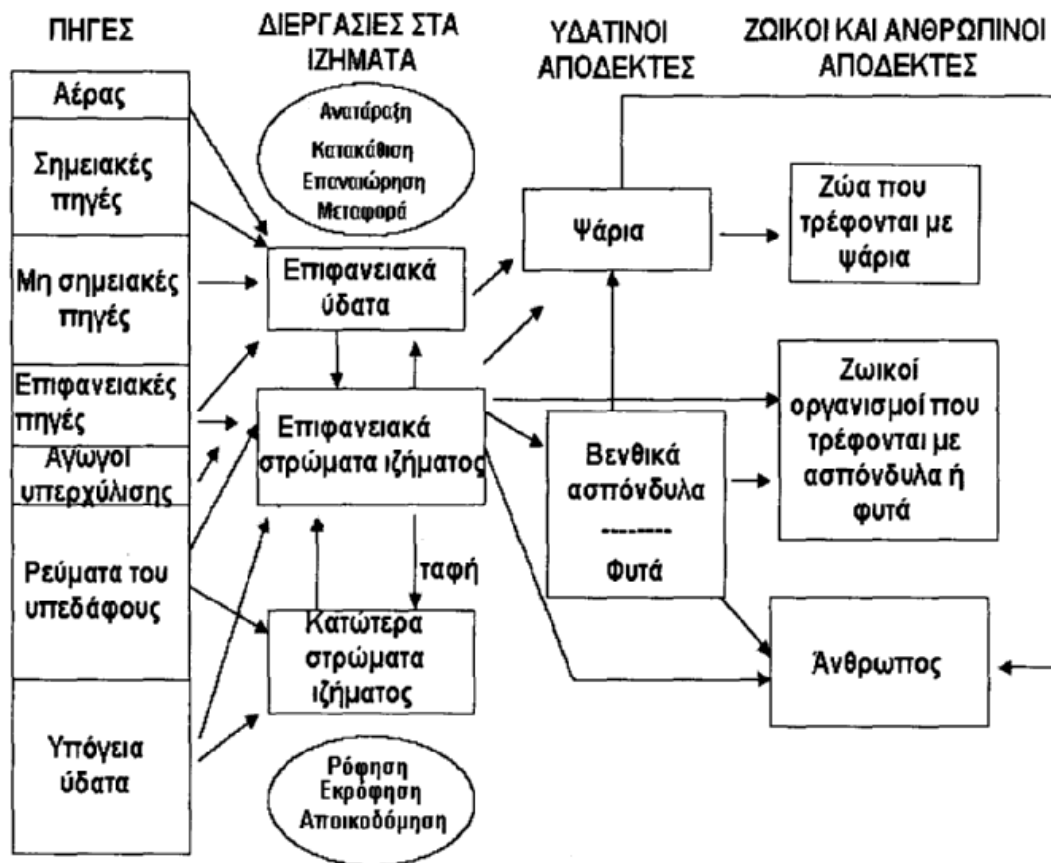
Οι υδρόβιοι οργανισμοί απορροφούν, δεσμεύουν και συγκεντρώνουν τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις στον λιπώδη ιστό τους μέσω της τροφής και του νερού διότι αυτές οι ενώσεις παρόλο που έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό, ιδιαίτερα στο θαλασσινό νερό, έχουν υψηλούς συντελεστές λιποφιλίας (K_{ow}), δηλαδή μεγάλη λιποφιλία. Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις από το νερό διαχέονται (και βιοσυγκεντρώνονται) στο λιπώδη ιστό των ιχθυρών καθώς το νερό περνάει ανάμεσα στα βράγχια τους.

Στο νερό, οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις απορροφούνται στο ίζημα του βυθού και στα αιωρούμενα σωματίδια παρά διαλύονται σ'αυτό. Έτσι, οι οργανισμοί που τρέφονται από το βυθό λαμβάνουν μαζί με την τροφή και οργανοχλωριωμένες ενώσεις. Η πρόσληψη και ο συντελεστής συγκέντρωσης του DDT σε μύδια υπολογίστηκε σε 690000 (Lisebrough et.al, 1976b). Επίσης, έχουν αναφερθεί συντελεστές βιοσυσσώρευσης του DDT στα ψάρια: *Pimephales promelas* και *Salmo gairdneri*, που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις DDT για διαφορετικό χρονικό διάστημα ίσοι με 69100, 154100 και 51335 αντίστοιχα (IPCS 1995). Γενικά, η πρόσληψη και κατανομή οργανοχλωριωμένων ενώσεων από το υδάτινο περιβάλλον είναι δυναμική, σύνθετη και επηρεάζεται από την εποχή και τις τοπικές συνθήκες (Vassilopoulou V. et al, 1993). Σε περιοχές που χαρακτηρίζονται κλειστές (Μεσόγειος, Νορβηγικά φιόρδ, Βόρεια Θάλασσα) και για μη μεταναστευτικούς οργανισμούς, ο κίνδυνος ρύπανσης από οργανοχλωριωμένες ενώσεις είναι ιδιαίτερα υψηλός.



Σχήμα 1.5 Συσσώρευση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στην θάλασσα τροφική αλυσίδα (οστρακοειδή, ψάρια, θηλαστικά) (τροποποίηση από Smith A. G. et al, 2002).

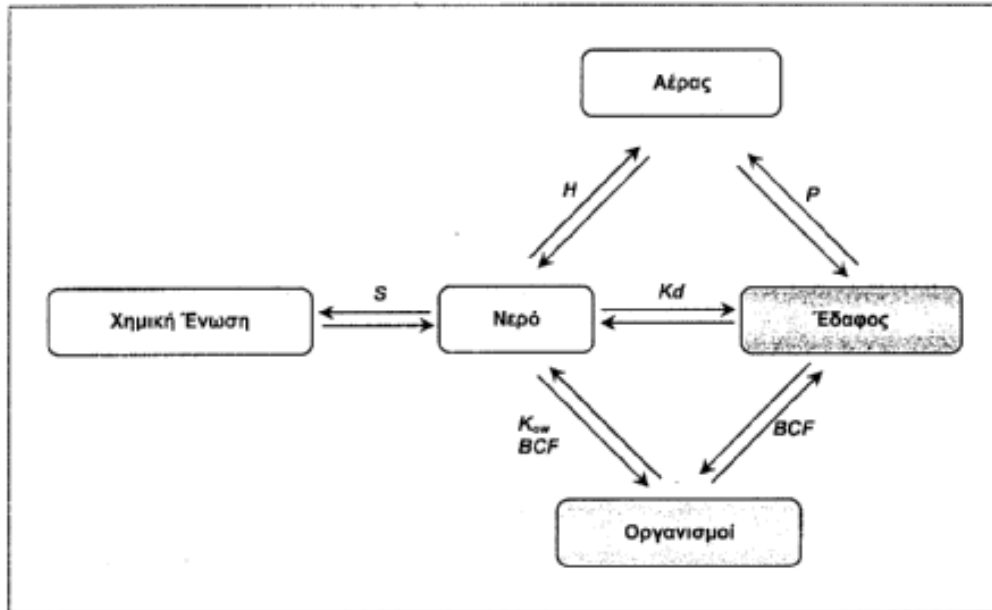
Αξίζει να σημειωθεί ότι στον άνθρωπο, η κατανάλωση ενός μόνο ψαριού λίμνης προσδίδει μεγαλύτερη ποσότητα οργανοχλωριωμένων ενώσεων από τη συνολική ποσότητα που αποθηκεύεται μέσω του πόσιμου νερού της ίδιας λίμνης καθόλη τη διάρκεια της ζωής του (Colin Baird and Michael Cann, 2005).



Σχήμα 1.6 Μοντέλο εκτίμησης της πιθανότητας ρύπανσης του υδάτινου οικοσυστήματος (Menzie 2003)

1.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες που καθορίζουν την κατανομή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον

Ορισμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες των οργανοχλωριωμένων ενώσεων καθορίζουν σημαντικά την τύχη και συμπεριφορά τους στο περιβάλλον στο οποίο εφαρμόζονται ή διαχέονται. Αυτές που έχουν τη μεγαλύτερη σημασία είναι η διαλυτότητα στο νερό, η λιποφιλία, η προσρόφηση στο έδαφος ή στο ίζημα, η αλληλεπίδραση με τα συστατικά του περιβάλλοντος, η πτητικότητα (τάση ατμών), ο ιονισμός, ο παράγοντας βιοσυσσώρευσης (BCF) (Αλμπάνης Τ., 1999).



Σχήμα 1.7 Οι ιδιότητες των ενώσεων που καθορίζουν την κατανομή τους στα περιβαλλοντικά συστήματα (Αλμπάνης Γ., 1999).

1.3.1 Διαλυτότητα στο νερό

Διαλυτότητα (S) είναι η μέγιστη ποσότητα μιας χημικής ένωσης που διαλύεται σε καθαρό νερό σε ορισμένη θερμοκρασία. Η διαλυτότητα μιας οργανοχλωριωμένης ένωσης στο νερό σχετίζεται με την ενυδάτωσή του, η οποία οφείλεται στην παρουσία υδρόφιλων χημικών ομάδων στο μόριό της που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια νερού του εδαφικού διαλύματος. Η υδατοδιαλυτότητα επηρεάζει τη δραστηριότητα και την εκλεκτικότητα, τον ιονισμό, το βαθμό προσρόφησης στο έδαφος, την έκπλυση και την πτητικότητα μιας ένωσης. Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις που έχουν μεγάλη διαλυτότητα στο νερό έχουν μικρούς συντελεστές προσρόφησης και βιοσυσώρευσης ενώ αποδομούνται εύκολα από τους μικροοργανισμούς. Η διαλυτότητα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα φυσικά νερά επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία και την αλατότητα αυτών. Συνήθως η άνοδος της θερμοκρασίας αυξάνει τη διαλυτότητά τους αλλά υπάρχουν και εξαιρέσεις. Επίσης η παρουσία διαλυμένων αλάτων στο νερό οδηγεί γενικά σε μείωση της διαλυτότητας και η σχέση αλατότητας (A) και διαλυτότητας (S) εκφράζεται από τη σχέση:

$$\log S^o/S^o' = k_s \cdot C_s = k_s \cdot A$$

όπου S^o =διαλυτότητα στο απεσταγμένο νερό

S^o' =μοριακή διαλυτότητα στο διάλυμα του άλατος

K_s =εμπειρική παράμετρος της αλατότητας

$A=C_s$ =μοριακή συγκέντρωση άλατος

1.3.2 Λιποφιλία

Η λιποφιλία των οργανοχλωριωμένων ενώσεων εκτιμάται από το δείκτη κατανομής αυτών (K_{ow}) μεταξύ κανονικής οκτανόλης και νερού. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης / νερού μιας ένωσης A, ορίζεται ως:

$$K_{ow} = \frac{[A_o]}{[A_w]}$$

$[A_o]$, $[A_w]$: εκφράσεις συγκέντρωσης της ένωσης στις φάσεις οκτανόλης και νερού αντίστοιχα. Ο δείκτης κατανομής K_{ow} εκφράζεται σχεδόν πάντοτε ως δεκαδικός λογάριθμος επειδή λαμβάνει πολύ μεγάλες τιμές. Για παράδειγμα, η τιμή K_{ow} του DDT είναι περίπου 1,000,000 ή $\log K_{ow} = 6$.

1.3.3 Προσρόφηση

Η προσρόφηση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων ενώ στα αιωρούμενα σωματίδια συμβάλλει στην απομάκρυνσή τους, στο έδαφος και τα ιζήματα συμβάλλει στην παρατεταμένη παρουσία υπολειμμάτων των ενώσεων αλλά και στην προστασία των μορίων τους από τις διεργασίες αποδόμησης.

Η κατανομή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων μεταξύ διαλύματος και στερεής φάσης χαρακτηρίζεται από μια σταθερά ισορροπίας $[A_{ads}] \approx K_p * [A_{aq}]$. Πρόκειται για μια δυναμική κατάσταση (ισορροπία):

$$\text{προσροφημένη ποσότητα} \xrightleftharpoons[K_{des}]{K_{ads}} \text{μη προσροφημένη ποσότητα}$$

Η δυναμική αυτή ισορροπία εξαρτάται από:

1. Τη θερμοκρασία του συστήματος (διάλυμα-στερεό).
2. Το pH
3. Την επιφάνεια και την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων
4. Την αλατότητα
5. Την παρουσία άλλου διαλυμένου οργανικού υλικού.

Ο ρυθμός της διαδικασίας προσρόφησης και η ισχύς της καθορίζεται από το χημικό χαρακτήρα και το σχήμα του μορίου, την οξύτητα ή βασικότητα των μορίων, τη διαλυτότητα στο νερό, την κατανομή φορτίου στο οργανικά κατιόν, την πολικότητα και το μέγεθος των μορίων. Η προσροφητική ικανότητα του προσροφητικού που οφείλεται στην παρουσία

οργανικής ύλης ως του σημαντικότερου περιεχομένου προσροφητικού συστατικού εκφράζεται με το συντελεστή προσρόφησης K_{OC}

$$K_{OC} = \frac{K}{\%OC} \cdot 100, \quad \%OC = \text{ποσοστό περιεχόμενης οργανικής ύλης στο έδαφος ή ίζημα}$$

1.3.4 Αλληλεπίδραση με τα συστατικά του περιβάλλοντος

Η μεταφορά μιας ένωσης από το νερό στην ατμόσφαιρα εξαρτάται από την ισορροπία κατανομής της μεταξύ της ατμόσφαιρας και του νερού και εκφράζεται από την σταθερά Henry:

$$H = \frac{[A_{(g)}]}{[A_{(aq)}]} = \frac{P_A/R \cdot T}{[A_{(aq)}]} = \frac{P_A^O/R \cdot T}{[A_{(aq)}^O]}$$

όπου $A_{(g)}$, $A_{(aq)}$ = συγκέντρωση της ένωσης στην αέρια ή υγρή φάση, αντίστοιχα.

P_A = μερική πίεση

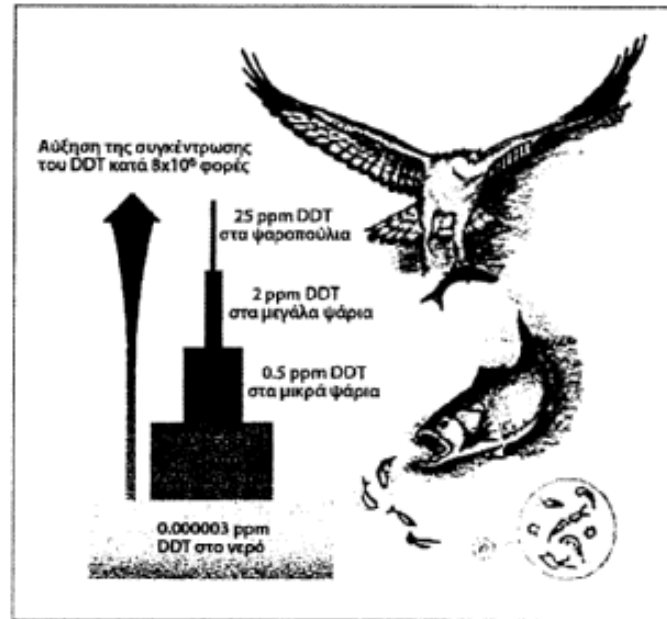
P_A^O = μερική πίεση κεκορεσμένου διαλύματος (διαλυτότητα)

R = σταθερά των αερίων

T = θερμοκρασία

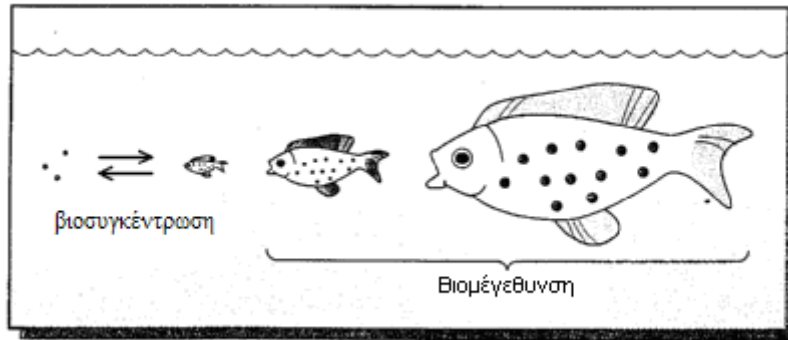
1.3.5 Βιοσυσσώρευση – Βιοσυγκέντρωση

Βιοσυσσώρευση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων ονομάζεται η συνεχής αύξηση της συγκέντρωσης τους στα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας. Η συσσώρευση αυτή οφείλεται κυρίως στην κατανομή των ουσιών μεταξύ νερού και οργανικών διαλυτών. Οι ουσίες που είναι διαλυτές στους οργανικούς διαλύτες και σχεδόν αδιάλυτες στο νερό, παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συσσώρευση στους ιστούς των οργανισμών. Το φαινόμενο της βιοσυσσώρευσης πραγματοποιείται κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας και καθώς ανεβαίνουμε την τροφική αλυσίδα αυξάνεται η συγκέντρωσή των ενώσεων στους ιστούς λόγω έλλειψης κατάλληλων μηχανισμών αποβολής ή αποδόμησης τους και λόγω των χημικών ιδιοτήτων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ουσίας στον οργανισμό προς τη συγκέντρωσή της ουσίας σε κάποιο περιβαλλοντικό υπόστρωμα (νερό, στερεή ή υγρή τροφή ή άλλο φυτικό ή ζωικό οργανισμό) ονομάζεται **συντελεστής βιοσυσσώρευσης (bioaccumulation factor –BAF)**.

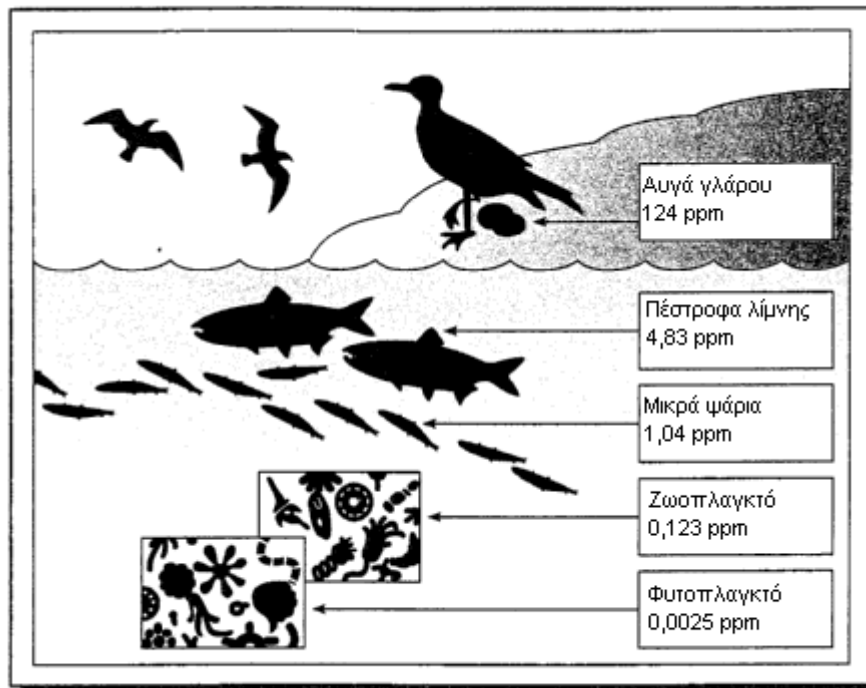


Σχήμα 1.8 Βιοσυσώρευση του DDT στην τροφική αλυσίδα (Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν., 2010)

Όταν η πρόσληψη των οργανοχλωριωμένων ενώσεων είναι άμεση από το νερό η διαδικασία ονομάζεται **βιοσυγκέντρωση** και ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (BCF) ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ουσίας στον οργανισμό προς τη συγκέντρωση της ουσίας στο νερό. Οι τιμές του δείκτη λιποφιλίας μιας ένωσης αντιστοιχούν με τις τιμές του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης στα ιχθυρά εκτός εάν το μέγεθος των μορίων μιας ένωσης εμποδίζει τη διάχυσή τους. Γενικά ισχύει ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής λιποφιλίας, τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα να δεσμευτεί μια ένωση στο έδαφος ή στο ίζημα και να μεταναστεύσει στο λιπώδη ιστό των ζωικών οργανισμών. Ενώσεις που κατέχουν τιμές $\log K_{ow}$ μεταξύ 4-7 βιοσυγκεντρώνονται σε μεγαλύτερο βαθμό από άλλες ενώσεις. Όταν, τέλος, οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις μεταφερθούν μέσω της τροφικής αλυσίδας και συσσωρευτούν στους ανώτερους οργανισμούς (πουλιά, άνθρωποι) η διεργασία ονομάζεται **βιομεγέθυνση** και χρησιμοποιείται όταν η συγκέντρωση μιας ένωσης σε έναν οργανισμό είναι υψηλότερη από αυτή της τροφής που καταναλώνει.



Σχήμα 1.9 Η βιοσυγκέντρωση και η βιομεγέθυνση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα ψάρια (Colin Baird, Cann Michael, 2005).



Σχήμα 1.10 Βιοσυσσώρευση PCBs στην τροφική αλυσίδα των Μεγάλων Λιμνών του Καναδά (Colin Baird, Cann Michael, 2005).

1.3.6 Ιονισμός

Ο ιονισμός των ενώσεων προκαλεί το σχηματισμό κατιόντων, ανιόντων και μορίων τα οποία δεσμεύονται ή προσροφούνται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις και ασθενείς δεσμούς (υδρόφιλοι, υδρόφοβοι) αντίστοιχα στο περιβάλλον (Αλμπάνης Τ., 1999).

1.3.7 Πτητικότητα

Πτητικότητα είναι η διαφυγή των μορίων μιας ουσίας από τη στερεά ή υγρή φάση στην αέρια κατάσταση (εξάτμιση νερού, εξάχνωση ναφθαλίνης). Κριτήριο πτητικότητας αποτελεί η τάση ατμών της ένωσης υπό κανονικές συνθήκες. Με βάση την τάση ατμών στους 25 °C, οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: Μη πτητικές: τάση ατμών 10^{-7} mmHg, Λίγο πτητικές: τάση ατμών 10^{-4} έως 10^{-6} mmHg, Πολύ πτητικές: τάση ατμών 10^{-1} έως 10^{-3} mmHg (Μπότη Β. Ι., 2009).

1.4 Αρχές τοξικολογίας

Όλες οι χημικές ενώσεις, φυσικές ή συνθετικές, εμπεριέχουν τον κίνδυνο της τοξικότητας, ο οποίος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της χημικής ένωσης. Ο Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim – Paracelsus (1443 – 1541), ο οποίος αναγνωρίζεται ως πατέρας της τοξικολογίας, δήλωσε ότι «όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια. Η σωστή δόση είναι αυτή που διαχωρίζει το δηλητήριο από το φάρμακο». Ως **τοξικότητα** ορίζεται η ενδογενής ιδιότητα μιας χημικής ένωσης να προκαλεί βλάβες στον άνθρωπο και στους άλλους οργανισμούς-μη στόχους, αλλά και στη λειτουργία των οικοσυστημάτων σε συγκεκριμένες συνθήκες. Κίνδυνος τοξικότητας είναι η πιθανότητα να προκληθεί βλάβη από ένα χημικό παράγοντα κατά τη χρήση ή την εφαρμογή του (Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν., 2010)

Για να υπάρξει τοξική δράση θα πρέπει οι χημικές ουσίες να εισχωρήσουν σε ένα στόχο (άνθρωπος, ψάρι, κλπ) σε κατάλληλα υψηλή συγκέντρωση και για κατάλληλα αρκετό χρονικό διάστημα.

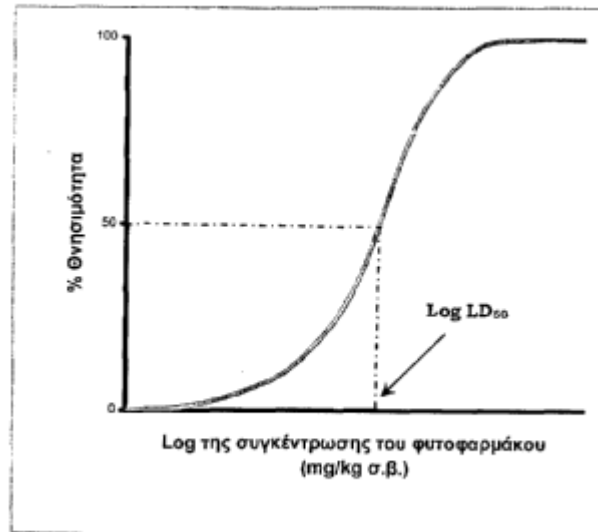
Η τοξική δράση λοιπόν εξαρτάται από:

- (1) τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της ουσίας
- (2) τη διάρκεια και την κατάλληλη χρονική στιγμή της έκθεσης.

Το τοξικό αποτέλεσμα μιας μόνο δόσης ή μιας μόνο επαφής αναφέρεται ως οξεία τοξικότητα, ενώ χρόνια τοξικότητα είναι το τοξικό αποτέλεσμα μακροχρόνιας επαφής με μικρές, μη θανατηφόρες δόσεις. Για παράδειγμα, όταν η επίδραση μιας χημικής ουσίας γίνεται αισθητή σε χρονικό διάστημα μικρότερο ή ίσο των 24 ωρών πρόκειται για οξεία τοξικότητα, για χρονικό διάστημα μικρότερο ή ίσο με ένα μήνα πρόκειται για υποξεία τοξικότητα, για 1 έως 3 μήνες για υποχρόνια τοξικότητα και για περισσότερο από 3 μήνες για χρόνια τοξικότητα. Μέτρο της οξείας τοξικότητας είναι η μέση θανατηφόρα δόση (LD_{50}), δηλαδή η δόση στην οποία θανατώνεται το 50% των πειραματόζωων και εκφράζεται σε mg δραστικής ουσίας ανά

kg σωματικού βάρους. Ανάλογα με την τιμή LD_{50} , οι ενώσεις χαρακτηρίζονται ως άκρως τοξικές ($LD_{50} < 1 \text{ mg/kg}$), πολύ τοξικές ($LD_{50} = 1-5 \text{ mg/kg}$), τοξικές ($LD_{50} = 5-50 \text{ mg/kg}$), μέσης τοξικότητας ($LD_{50} = 50-500 \text{ mg/kg}$) και ελαφρώς τοξικές ($LD_{50} > 500 \text{ mg/kg}$).

Σχετικά με τη χρονική στιγμή έκθεσης, τα έμβρυα και ο οργανισμός στα πρώτα στάδια της ζωής έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε τοξικές ενώσεις.



Σχήμα 1.11 Συσχέτιση της θνησιμότητας πειραματοζώων και της συγκέντρωσης ενός φυτοφαρμάκου (Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν., 2010)

Η ίδια χημική ουσία μπορεί να προκαλέσει χρόνια και οξεία τοξικότητα στον ίδιο οργανισμό με διαφορετικούς μηχανισμούς. Για παράδειγμα, η άμεση έκθεση σε μια οργανοχλωριωμένη ένωση προκαλεί ως σύμπτωμα οξείας τοξικότητας ερεθισμό του δέρματος που οδηγεί σε chlorance (ανθεκτικό και οξύπινο ανάλογο του ance) ενώ χρόνια έκθεση σε χαμηλότερες δόσεις απ' αυτές που προκαλούν δερματική ασθένεια, μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο.

(3) τη συγκέντρωση στην οποία εκτίθεται ο οργανισμός - στόχος.

Η συγκέντρωση ενός οργανικού ρυπαντή μπορεί ή από μόνη της να οδηγήσει στην πρόκληση τοξικότητας ή να δράσει μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες υπάρχουσες τοξικές ουσίες (προσθετικά, συνεργατικά, ανταγωνιστικά). Είναι ακόμη δυνατό, μια τοξική ένωση να αποκτήσει τοξική δράση όταν βρεθεί με μια άλλη ένωση, σε έναν οργανισμό - στόχο, χωρίς προηγουμένως να είναι τοξική (συνεργιστική δράση)

(4) την ευστάθεια του βιολογικού συστήματος.

Οι κυριότεροι οδοί έκθεσης σε μια χημική ουσία είναι η κατάποση, η εισπνοή και η δερματική επαφή. Οι χημικές ουσίες διαπερνώντας τους φυσικούς φραγμούς του σώματος

καταλήγουν στους ιστούς ή στους αποθηκευτικούς χώρους του οργανισμού. Η επικινδυνότητα των τοξικών ουσιών εκφράζεται με δύο δείκτες: τον NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) και τον LOAEL (Lowest Observable Adverse Effect Level). Ο NOAEL εκφράζει το επίπεδο δόσης κάτω από το οποίο δεν παρατηρείται αρνητική επίδραση και ουσιαστικά φανερώνει την υψηλότερη έκθεση χωρίς αρνητική επίδραση και ο LOAEL εκφράζει το χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης που σχετίζεται με κάποια αρνητική επίδραση. Και οι δυο δείκτες σχετίζονται με τη χρόνια τοξικότητα. Ο δείκτης NOAEL χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ημερήσιας αποδεκτής λήψης μιας ουσίας από τον άνθρωπο (ADI) δηλαδή της υψηλότερης δόσης δραστικής ουσίας η οποία χορηγούμενη καθημερινά για όλη τη διάρκεια ζωής ενός ενήλικα δεν ενέχει κίνδυνο για την υγεία του. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία καθορίζονται τα μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (MRLs) (Μπότη, Β. Ι., 2009).

1.5 Χημεία, τοξικότητα και περιβαλλοντική σημασία των οργανοχλωριωμένων ενώσεων

1.5.1 Εισαγωγή

Τα κύρια χαρακτηριστικά των οργανοχλωριωμένων ενώσεων είναι η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, η υψηλή λιποφιλία, ο μεγάλος χρόνος ημιζωής, η μεγάλη ανθεκτικότητα και άρα η βιοσυσσώρευση και η βιομεγέθυνση στους οργανισμούς και το περιβάλλον. Η κύρια αιτία απόδοσης αυτών των χαρακτηριστικών είναι η παρουσία των ατόμων χλωρίου στον βενζολικό δακτύλιο.

Ο δεσμός άνθρακα – χλωρίου είναι πολύ σταθερός στην υδρόλυση και όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός ατόμων χλωρίου (υποκαταστάτες) στο μόριο της ένωσης, τόσο μεγαλύτερη αντοχή προσδίδει στο μόριο έναντι βιολογικών, χημικών και φωτολυτικών αποδομήσεων. Επιπρόσθετα, ο δεσμός βενζολικού άνθρακα – χλωρίου προσδίδει υψηλότερη ανθεκτικότητα σε σχέση με το δεσμό αλειφατικού άνθρακα – χλωρίου. Ως συνέπεια των παραπάνω, ο βαθμός χλωρίωσης των μορίων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων είναι αντιστρόφως ανάλογος με τον ρυθμό μεταβολισμού τους και ευθέως ανάλογος της συσσώρευσης στο λιπώδη ιστό φυτικών και ζωικών οργανισμών. Μια ένωση που συσσωρεύεται στο περιβάλλον είναι πιθανόν πιο επικίνδυνη από μια άλλη που είναι το ίδιο τοξική αλλά δεν συσσωρεύεται.

Στο περιβάλλον, οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις μετατρέπονται σε μεταβολίτες με βιολογικές, χημικές και φυσικές διαδικασίες, ενώ η αποτελεσματικότητά των διαδικασιών

μετατροπής τους εξαρτάται από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος στο οποίο εφαρμόζονται ή διαχέονται. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα προϊόντα μετατροπής των οργανοχλωριωμένων ενώσεων μπορεί να είναι πιο ανθεκτικά από την αρχική ένωση όπως παρατηρείται π.χ. με το DDE και το dieldrin που προέρχονται από το μεταβολισμό των DDT και aldrin αντίστοιχα.

Η συσχέτιση της τοξικής δράσης μιας συγκεκριμένης ένωσης ή κατηγορίας ενώσεων με την πρόκληση μιας ασθένειας ή επίδρασης είναι δύσκολη, διότι το περιβάλλον υπόκειται στην επίδραση ευρείας και συνεχούς έκθεσης σε μίγματα χημικών ουσιών. Γι' αυτόν το λόγο, η ανθεκτικότητα και η βιοσυσσώρευση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης τοξικών ουσιών στο περιβάλλον καθιστώντας τη χρόνια τοξικότητα πιο σημαντική από την οξεία. Η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανοχλωριωμένων ενώσεων (ατύχημα, διαδικασία παραγωγής) έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί ασθένεια και θάνατο, ενώ η έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις (περιβάλλον, τροφική αλυσίδα) προκαλεί επιδράσεις όπως δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, αναπαραγωγικές ανωμαλίες, νευρολογικές βλάβες, ανωμαλίες συμπεριφοράς και καρκινογένεση. Βέβαια, η επιστημονική απόδειξη της σύνδεσης μεταξύ της χρόνιας έκθεσης σε συγκεντρώσεις οργανοχλωριωμένων ενώσεων και της επίδρασης στην υγεία του ανθρώπου είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί αλλά είναι δυνατό διερευνηθεί μέσω εργαστηριακών πειραμάτων.

1.5.2 Χημικές και φυσικές ιδιότητες

1.5.2.1 Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ευρέως μετά το 1950 ενώ σήμερα αυτά που κυκλοφορούν στις ανεπτυγμένες χώρες είναι το endosulfan και endosulfan sulfate. Πρόκειται για παράγωγα οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων, μεγάλης εντομοτοξικής δράσης και διάρκειας που προσλαμβάνονται ταχύτατα από την επιδερμίδα των οργανισμών-στόχων (που είναι φωσφολιπιδικής συστάσης) λόγω της μεγάλης λιποφιλίας τους.

Με βάση τη χημική δομή τους, τα εντομοκτόνα αυτά κατατάσσονται σε τρεις υποομάδες: α) την υποομάδα του DDT και των παραγώγων του, β) την υποομάδα των παραγώγων του εξαχλωροκυκλοεξανίου, γ) την υποομάδα των κυκλοδιενίων (Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν., 2010).

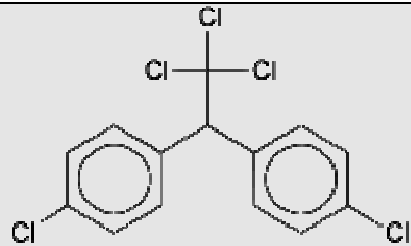
α) Στην υποομάδα αυτή υπάγονται οι ενώσεις DDT, DDD, DDE, Methoxychlor

Κατά την αντίδραση παρασκευής του DDT παράγονται κυρίως 3 ισομερή, με βάση τη θέση των ατόμων χλωρίου στους φαινολικούς δακτυλίους του μορίου: το p,p (παρα – παρα) ισομερές, το o,p (όρθο – παρά) ισομερές και το o,o (όρθο – όρθο) ισομερές.

Το p,p-ισομερές παράγεται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό (60-80%) και είναι κατά πολύ δραστικότερο των δύο άλλων.

DDT (διχλωρο-διφαινυλο-τριχλωροαιθάνιο)**Χημική ονομασία:**

1, 1-(2,2,2-τριχλωροαιθυλιδένιο) δις-(4-χλωροβενζόλιο).



CAS number: 50-29-3, μοριακός τύπος: $C_{14}H_9Cl_5$, μοριακό βάρος: 354,49

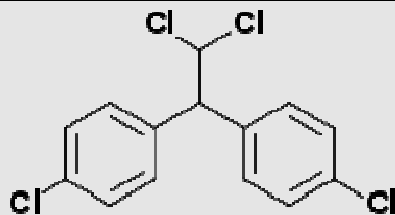
Εμφάνιση: Άοσμοι, άχρωμοι κρύσταλλοι ή άσπρη σκόνη.

Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 108,5°C, σημείο βρασμού: 185°C, K_H : $1,29 \times 10^{-5}$ atm m³/mol at 25°C, log K_{OC} : 5,146-6,26, log K_{OW} : 4,89-6,914, διαλυτότητα στο νερό: 1,2-5 μg/L στους 25°C, τάση ατμών: $1,60 \times 10^{-7}$ torr στους 20°C (πηγή: IPCS 1995).

Το DDT μεταβολίζεται σε μεγάλο αριθμό μεταβολιτών, οι σπουδαιότεροι είναι το DDE, το dicofol και το DDD.

DDD (διμέθοξυ – διφαινυλο – διχλωροαιθάνιο)

Το DDD ανακαλύφθηκε από τον Lauger (1944). Πρόκειται για συγγενή ένωση του DDT (προκύπτει από αναγωγική αποχλωρίωση του p,p - DDT) και είναι σταθερότερο αυτού.

Χημική ονομασία:

CAS number: 72-54-8, μοριακός τύπος: $C_{14}H_{10}Cl_4$, μοριακό βάρος: 320,05

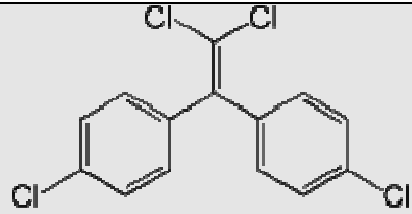
Εμφάνιση:-

Ιδιότητες: Σημείο τήξης: -°C, σημείο βρασμού: -°C, K_H : $4,0 \times 10^{-6}$ atm m³/mol at 25°C, log K_{OC} : 5,18, log K_{OW} : 6,02, διαλυτότητα στο νερό: 0,090mg/L στους 25°C, τάση ατμών: $1,35 \times 10^{-6}$ torr στους 25°C (πηγή: WHO 2003b).

DDE (διχλωρο – διφαινυλο – διχλωροαιθυλένιο)

Το DDE προκύπτει από αφυδροχλωρίωση του DDT και είναι μη δραστικό μόριο.

Χημική ονομασία:



CAS number: 72-55-9 , μοριακός τύπος: C₁₄H₈Cl₄ , μοριακό βάρος: 318,03

Εμφάνιση: -

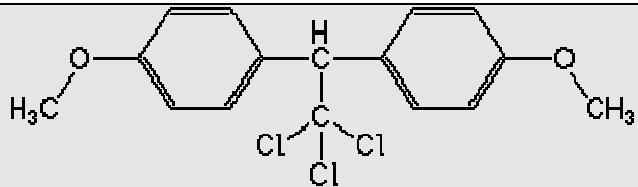
Ιδιότητες: Σημείο τήξης: -°C, σημείο βρασμού: -°C, K_H: 2,1 x10⁻⁵ atm m³/mol at 25°C, logK_{OC}: 4,70, logK_{OW}: 6,51 , διαλυτότητα στο νερό: 0,12 mg/L στους 25°C, τάση ατμών: 6,0 x10⁻⁶ torr στους 25°C (πηγή: WHO 2003b).

Methoxychlor

Το methoxychlor προέκυψε από το DDT με αντικατάσταση των ατόμων χλωρίου των βενζολικών δακτυλίων από μεθοξυ-ομάδες (- OCH₃). Οι μέθοξυ ομάδες παρόλο που έχουν ίδιο περίπου μέγεθος με τα άτομα χλωρίου αντιδρούν σε υψηλότερο βαθμό παράγοντας υδατοδιαλυτές ενώσεις που αποδομούνται στο περιβάλλον και δεν συσσωρεύονται στους οργανισμούς. Γι'αυτό χρησιμοποιείται ακόμη ως εντομοκτόνο σε κάποιες περιπτώσεις.

Χημική ονομασία:

1,1,1-τρίχλωρο-2,2-δις
(4-μεθοξυφαινύλιο)αιθάνιο



CAS number: 72-43-5 , μοριακός τύπος: C₁₆H₁₅Cl₃O₂ , μοριακό βάρος: 345,64

Εμφάνιση: Κίτρινο κρυσταλλικό.

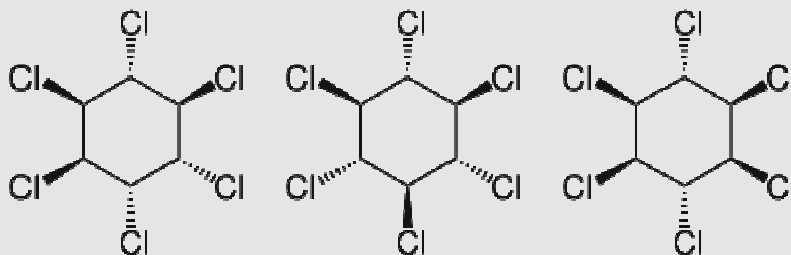
Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 86-88°C, σημείο βρασμού: decomposes °C, K_H: atm m³/mol at 25°C, logK_{OC}: , logK_{OW}: , διαλυτότητα στο νερό: μg/L at 25°C, τάση ατμών: torr στους 25°C (πηγή: WHO 2003b)

β) Υποομάδα του εξαχλωροκυκλοεξανίου

Τα ισομερή εξαχλωροκυκλοεξανίου προέρχονται από την αντικατάσταση ενός ατόμου υδρογόνου καθενός ατόμου άνθρακα του κυκλοεξανίου με ένα άτομο χλωρίου. Παράγονται έτσι οκτώ (8) ισομερή που διαφέρουν ως προς την σχετική διευθέτηση των ατόμων χλωρίου στο μόριο του εξαχλωροκυκλοεξανίου.

Χημική ονομασία:

1,2,3,4,5,6-εξαχλωροκυκλοεξάνιο



CAS number: 319-84-6 (α-ισομερές)/319-85-9 (β-ισομερές)/ 58-89-9 (γ-ισομερές)/ 319-86-8 (δ-ισομερές), μοριακός τύπος: $C_6H_6Cl_6$, μοριακό βάρος: 290,83

Εμφάνιση: -

Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 159-160/314-315/112,5/141-142°C, σημείο βρασμού: 288(760mmHg)/60(0,5mmHg)/323,4(760mmHg)/60(0,5mmHg) °C, K_H : 4,8-6,0 $\times 10^{-6}$ /4,5 $\times 10^{-7}$ /3,2-7,8 $\times 10^{-6}$ /2,1 $\times 10^{-7}$ atm m³/mol at 23°C, log K_{OC} : 3,57/3,57/3,0-3,57/3,8, log K_{OW} : 3,46-3,85/4,50-3,78-3,98/3,3-3,61/4,14, διαλυτότητα στο νερό: 10/5/17/10 ppm, τάση ατμών: 0,02/0,005/9,4/0,35 $\times 10^{-6}$ mmHg στους 20/20/20/25°C (πηγή: WHO 2003).

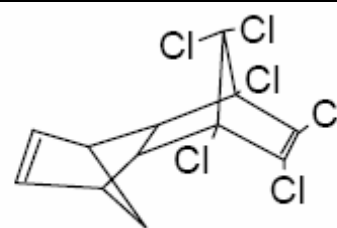
γ) Υποομάδα των κυκλοδιενίων.

Οι πιο σημαντικές ενώσεις της υποομάδας αυτής είναι οι: aldrin, chlordane, dieldrin, endrin, endosulfan, heptachlor, endrin ketone, endrin aldehyde, heptachlor epoxide, endosulfan sulfate.

Τα εντομοκτόνα αυτά ανακαλύφθηκαν από τον Kearns στα τέλη της δεκαετίας '40.

Aldrin

Χημική ονομασία: 1, 2, 3, 4, 10, 10 – εξαχλωρο – 1, 4, 4α, 5, 8, 8α – εξαυδρο – εξω – 1, 4 – εσω – 5,8, διμεθανοφθαλένιο



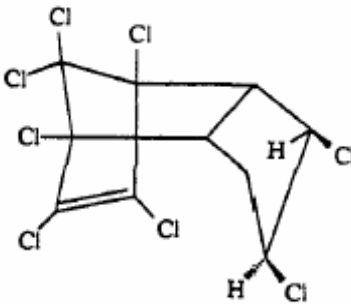
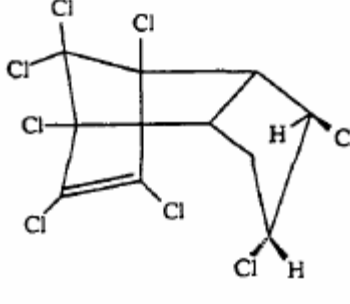
CAS number: 309-00-2, μοριακός τύπος: $C_{12}H_8Cl_6$, μοριακό βάρος: 364,92

Εμφάνιση: Άσπροι, άοσμοι κρύσταλλοι σε καθαρή μορφή.

Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 104°C, σημείο βρασμού: 145°C στα 2mmHg, K_H : 4,96 $\times 10^{-4}$ atm m³/mol at 25°C, log K_{OC} : 2,61/4,69, log K_{OW} : 5,17-7,4, διαλυτότητα στο νερό: 17-180 μ g/L στους 25°C, τάση ατμών: 2,31 $\times 10^{-5}$ mmHg στους 20°C (πηγή: IPCS 1995).

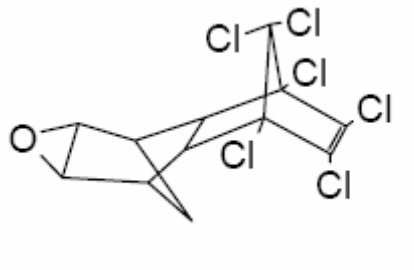
Chlordane

Το chlordane ήταν το πρώτο μέλος της σειράς των κυκλοδιενίων που ανακαλύφθηκε το 1945. Το τεχνικώς καθαρό προϊόν είναι μίγμα ισομερών από τα οποία τα σπουδαιότερα είναι τα *cis* (α) και *trans* (γ) ισομερή.

<p>Χημική ονομασία: 1,2,3,4,5,6,7,8,8-οκτάχλωρο-2,3,3^a,4,7,7α-εξάυδρο-4,7-μέθανο-1^H-ινδένιο.</p>	<p><i>cis</i></p> 	<p><i>trans</i></p> 
<p>CAS number: 57-74-9 , μοριακός τύπος: C₁₀H₆Cl₈, μοριακό βάρος: 409,78</p> <p>Εμφάνιση: Άχρωμο έως καφεκίτρινο διάφανο υγρό με αρωματική οσμή παρόμοια του χλωρίου.</p> <p>Ιδιότητες: Σημείο τήξης: <25°C, σημείο βρασμού: 165°C στα 2mmHg, K_H:4,8 x10⁻⁵ atm m³/mol at 25°C, logK_{OC}: 4,58-5,57, logK_{OW}:6,00 , διαλυτότητα στο νερό: 56 ppb στους 25°C, τάση ατμών: 10⁻⁶ mmHg στους 20°C (πηγή: IPCS 1995).</p>		

Dieldrin

Τα dieldrin είναι το εποξειδίο του aldrin και αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα και μεγάλης διάρκειας δράσης εντομοκτόνα επαφής και στομάχου.

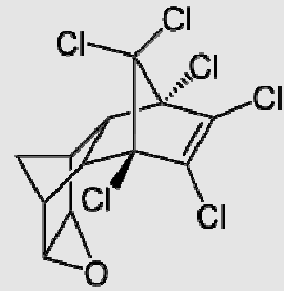
<p>Χημική ονομασία: 3,4,5,6,9,9-εξάχλωροδιμετανοναφθ-[2,3-β] οξυρένιο.</p>	
<p>CAS number: 60-57-1, μοριακός τύπος: C₁₂H₈Cl₆O , μοριακό βάρος: 380,91</p> <p>Εμφάνιση: Άσπροι κρύσταλλοι, άοσμο έως ήπια χημική οσμή.</p> <p>Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 175-176°C, σημείο βρασμού: decomposes °C, K_H: 5,8 x10⁻⁵ atm m³/mol at 25°C, logK_{OC}: 4,08-4,55, logK_{OW}:3,692-6,2, διαλυτότητα στο νερό: 140μg/L at 20°C, τάση ατμών: 1,78 x 10⁻⁷ mmHg στους 20°C (πηγή: IPCS 1995).</p>	

Endrin

Το endrin είναι το ενδο-ενδό-ισομερές του dieldrin και χρησιμοποιήθηκε ως εντομοκτόνο επαφής και στομάχου.

Χημική ονομασία:

3,4,5,6,9,9-εξάχλωροδιμεθανοναφθ
[2,3-β]οξιρένιο.



CAS number: 72-20-8 , μοριακός τύπος: $C_{12}H_8Cl_6O$, μοριακό βάρος: 380,92

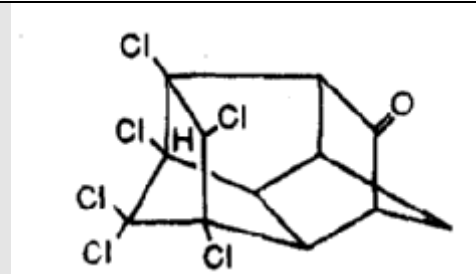
Εμφάνιση: Άσπρο, άοσμο, κρυσταλλικό στερεό (καθαρή μορφή).

Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 200°C, σημείο βρασμού: 245°C, K_H : $5,0 \times 10^{-7}$ atm m³/mol, $\log K_{OC}$: , $\log K_{OW}$: 3,209-5,339 , διαλυτότητα στο νερό: 220-260μg/L at 25°C, τάση ατμών: 7×10^{-7} mmHg στους 25°C (πηγή: IPCS 1995).

Endrin ketone

Χημική ονομασία:

2,5,7-μέθανο-3H-
κυκλοπέντα(α)πενταλεν-3-ιο.



CAS number: 53494-70-5 , μοριακός τύπος: $C_{12}H_8Cl_6O$, μοριακό βάρος: 380,9

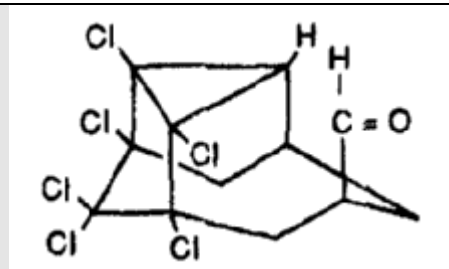
Εμφάνιση: στερεό

Ιδιότητες: Σημείο τήξης: -°C, σημείο βρασμού:- °C, K_H : $2,2 \times 10^{-8}$ atm m³/mol at 23°C, $\log K_{OC}$: -, $\log K_{OW}$: 4,99, διαλυτότητα στο νερό: -, τάση ατμών:- (πηγή: WHO 1992).

Endrin aldehyde

Χημική ονομασία:

1,2,4-μέθενοκύκλοπέντα(cd)-πενταλένιο-5-
κάρβοξυαλδεύδη



CAS number: 7421-93-4 , μοριακός τύπος: $C_{12}H_8Cl_6O$, μοριακό βάρος: 381,9

Εμφάνιση:στερεό

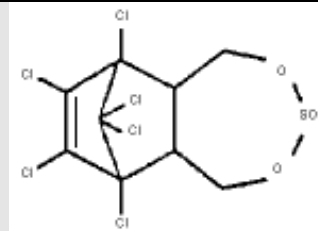
Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 145-149°C, σημείο βρασμού: decomposes στους 245°C, K_H : $2,9 \times 10^{-9}$ atm m³/mol στους 25°C, $\log K_{OC}$: 3,929-4,653 , $\log K_{OW}$: 4,80 , διαλυτότητα στο νερό: 50mg/L at 25°C, τάση ατμών: $2,0 \times 10^{-7}$ mmHg στους 25°C (πηγή: WHO 1992).

Endosulfan

Το endosulfan είναι μη διασυστηματικό εντοκτόνο και ακαρεοκτόνο επαφής και στομάχου (εμπορική ονομασία: Thiodan). Το τεχνικώς καθαρό προϊόν συνίσταται από δύο στερεϊσομερή, το α και το β-ισομερές.

Χημική ονομασία: α-ισομερές/β-ισομερές

6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,
9,-9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,
3-benzodioxathiepin-3-oxide.



CAS number: 959-98-8/33213-65-9 , μοριακός τύπος: C₉H₆Cl₆O₃S, μοριακό βάρος: 406,93

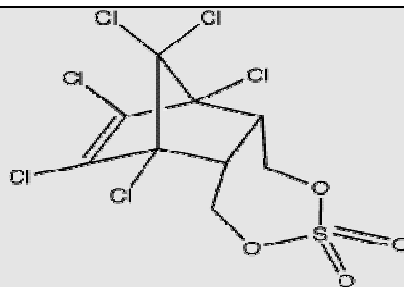
Εμφάνιση: άχρωμοι / υποκίτρινοι κρύσταλλοι

Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 108-110 / 208-210 °C, σημείο βρασμού: -°C, K_H: 1,01 x10⁻⁴/1,91 x10⁻⁵atm m³/mol at 25°C, logK_{OC}: 3,55/-, logK_{OW}: 3,83/3,52 , διαλυτότητα στο νερό: 0,53/0,28 mg/L at 25°C, τάση ατμών: 1x10⁻⁵ mmHg στους 25°C (πηγή: U.S. Department of Health and Human Services, 2000).

Endosulfan sulfate

Προέρχεται από μεταβολισμό του endosulfan. Δεν χαρακτηρίζεται από αρνητικές ιδιότητες των οργανοχλωριωμένων ενώσεων και η χρήση του επιτρέπεται μέχρι και σήμερα.

Χημική ονομασία:



CAS number: 1031-07-8 , μοριακός τύπος: C₉H₆Cl₆O₄S, μοριακό βάρος: 422.9

Εμφάνιση: κρύσταλλοι καφέ χρώματος

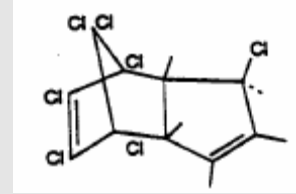
Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 181/198-201°C, σημείο βρασμού: -°C, K_H: 2,61 x10⁻⁵atm m³/mol at 25°C, logK_{OC}: -, logK_{OW}: 3,66, διαλυτότητα στο νερό: 0,117/0,22μg/L at 25°C, τάση ατμών: 1x10⁻⁵ mmHg στους 25°C (πηγή: U.S. Department of Health and Human Services, 2000).

Heptachlor

Το heptachlor χρησιμοποιήθηκε ως εντομοκτόνο το 1952 και η σύνθεσή του είναι παρόμοια με αυτή του chlordane.

Χημική ονομασία:

1,4,5,6,7,8,8-επτάχλωρο-3α,4,7,7α-τετραύδρο-4,7
μέθανολ-1H-ινδένιο.



CAS number: 76-44-8, μοριακός τύπος: $C_{10}H_5Cl_7$, μοριακό βάρος: 373,32

Εμφάνιση:

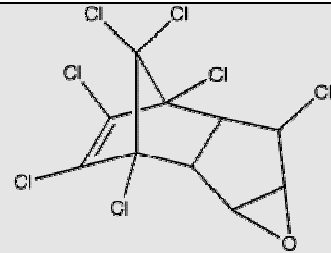
Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 95-96°C, σημείο βρασμού: 135-145 στα 1-1,5/decomposes στα 760mmHg °C, K_H : $2,3 \times 10^{-3} \text{ atm m}^3/\text{mol}$ at 25°C, $\log K_{OC}$: 4,38, $\log K_{OW}$: 4,40-5,50, διαλυτότητα στο νερό: 180 ppb στους 25°C, τάση ατμών: $3 \times 10^{-4} \text{ mmHg}$ στους 20°C (πηγή: IPCS 1995).

Heptachlor epoxide

Προέρχεται από τη μετατροπή του heptachlor στους ζωικούς οργανισμούς.

Χημική ονομασία:

1,4,5,6,7,8,8-Επτάχλωρο-2,3-έποξυ-3α,4,7,7α-
τετραύδρο-4,-7-μέθανοινδένιο.



CAS number: 1024-57-3, μοριακός τύπος: $C_{10}H_5Cl_7O$, μοριακό βάρος: 389,32

Εμφάνιση:-

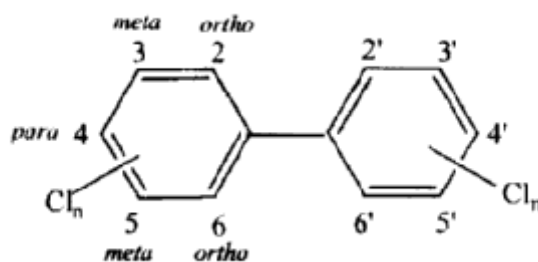
Ιδιότητες: Σημείο τήξης: 160-161,5 °C, σημείο βρασμού: °C, K_H : $3,2 \times 10^{-5} \text{ atm m}^3/\text{mol}$ at 25°C, $\log K_{OC}$: 4,32, $\log K_{OW}$: 3,65/5,40, διαλυτότητα στο νερό: 0,35mg/L at 25°C, τάση ατμών: $2,6 \times 10^{-6} \text{ mmHg}$ στους 20°C (πηγή: WHO 2003b).

Πίνακας 1.2 Χημικές και φυσικές ιδιότητες οργανοχλωριωμένων ενώσεων

Οργανοχλωριωμένη ένωση	Μοριακό βάρος	Τάση ατμών (mmHg, 25 ⁰ C)	Διαλυτότητα στο νερό (mg/L)	Log Kow	Log KOC
α-HCH	290,83	0,02 x 10 ⁻⁶ (20 ⁰ C)	10	3,46-3,85	3,57
β-HCH	290,83	0,005 x 10 ⁻⁶ (20 ⁰ C)	5	3,78-4,50	3,57
γ-HCH	290,83	9,4 x 10 ⁻⁶ (20 ⁰ C)	17	3,3-3,6	3,0-3,57
Heptachlor	373,32	3 x 10 ⁻⁴ (20 ⁰ C)	0,18	4,5-5,5	4,38
δ-HCH	290,83	0,35 x 10 ⁻⁶	10	4,14	3,8
Aldrin	364,92	2,31 x 10 ⁻⁵ (20 ⁰ C)	0,017-0,18	5,17-7,4	2,61/4,69
Heptachlor epoxide	389,32	2,6 x 10 ⁻⁶ (20 ⁰ C)	0,35	3,65/5,40	4,32
γ-chlordane	409,78	1,0 x 10 ⁻⁶	0,056	6,0	4,58-5,57
α-chlordane	409,78	1,0 x 10 ⁻⁶	0,056	6,0	4,58-5,57
Endosulfan I	406,93	1,0 x 10 ⁻⁵	0,53	3,83	3,55
4,4 –DDE	318,03	6,0 x 10 ⁻⁶	0,12	6,51	4,70
Dieldrin	380,91	1,78 x 10 ⁻⁷ (20 ⁰ C)	0,14	3,7-6,2	4,08-4,55
Endrin	380,92	7 x 10 ⁻⁷	0,22-0,26	3,209-5,339	-
4,4 –DDD	320,05	1,35 x 10 ⁻⁶	0,090	6,02	5,18
Endosulfan II	406,93	1,0 x 10 ⁻⁵	0,28	3,52	-
Endrin aldehyde	381,9	2 x 10 ⁻⁷	50	4,80	3,929-4,653
Endosulfan sulphate	422,9	1,0 x 10 ⁻⁵	117-220 µg/L	3,66	-
Methoxychlor	345,64	-	-	-	-
Endrin ketone	380,90	-	-	4,99	-

1.5.2.2 Πολυχλωριωμένα διφαινύλια

Τα PCBs είναι χημικές ουσίες (χημικός τύπος C₁₂H_{10-n}Cl_n) που αποτελούνται από ένα μόριο διφαινυλίου στο οποίο άτομα υδρογόνου αντικαθίστανται με άτομα χλωρίου. Η βασική δομή τους αναπαρίσταται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 1.12 Συντακτικός τύπος των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων.

Υπάρχουν δύο διαφορετικά αλλά σχετικά συστήματα για την ονοματολογία τους. Το σύστημα IUPAC αριθμεί τα άτομα άνθρακα του διφαινυλίου στα οποία δεσμεύονται τα άτομα χλωρίου και καταγράφονται διαδοχικά για το πρώτο και το δεύτερο φαινολικό δακτύλιο. Για παράδειγμα, το συμπαράγωγο PCB με άτομα χλωρίου στις θέσεις άνθρακα 2, 3, 4 του πρώτου και 3' του δεύτερου δακτυλίου φαινυλίου, καταγράφεται ως 233'4 ή ξεχωρίζοντας ταυτόχρονα τους δύο δακτυλίους ως 234-3' ή 234-3.

Το δεύτερο σύστημα ονοματολογίας αναπτύχθηκε από τους Ballschmiter και Zell (1980) και καταγράφει τα συμπαράγωγα με έναν αριθμό από PCB 1 έως PCB 209.

Έτσι, για τον προσδιορισμό του ονόματος του PCB 156 κατά IUPAC:

- 1) προσδιορίζουμε τη θέση του PCB 156 στον πίνακα
- 2) ταυτοποιούμε τους αριθμούς στην άκρη της στήλης (2345) και της γραμμής (34) του πίνακα
- 3) το όνομα του PCB 156 είναι 2,3,4,5,3',4'-έξαχλωροδιφαινύλιο (πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.3 Μετατροπή ονοματολογίας των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων μεταξύ των προαναφερόμενων συστημάτων ονοματολογίας (WHO 2003).

Θέσεις ατόμων χλωρίου σε κάθε φαινύλιο	κινένο	2	3	4	23	24	25	26	34	35	234	235	236	245	246	345	2345	2346	2356	23456		
23456																					209	
2356																					202	208
2346																			197	201	207	
2345																	194	196	199		206	
345																169	189	191	193		205	
246															155	168	182	184	188		204	
245														153	154	167	180	183	187		203	
236													136	149	150	164	174	176	179		200	
235												133	135	146	148	162	172	175	178		198	
234											128	130	132	138	140	157	170	171	177		195	
35										80	107	111	113	120	121	127	159	161	165		192	
34									77	79	105	109	110	118	119	126	158	158	163		190	
26								54	71	73	89	94	96	102	104	125	143	145	152		186	
25							52	53	70	72	87	92	95	101	103	124	141	144	151		185	
24					47	49	51	66	68	68	85	90	91	99	100	123	137	139	147		181	
23				40	42	44	46	56	58	62	83	84	97	98	122	129	131	134		173		
4			15	22	28	31	32	37	39	60	63	64	74	75	81	114	115	117		166		
3			11	13	20	25	26	27	35	36	55	57	59	67	69	78	106	108	112		160	
2		4	8	8	16	17	18	19	33	34	41	43	45	48	50	76	86	88	93		142	
κινένο	0	1	2	3	5	7	9	10	12	14	21	23	24	29	30	38	81	82	85		116	

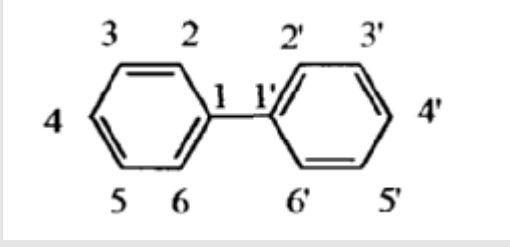
Τα συμπαράγωγα PCBs που έχουν τον ίδιο αριθμό ατόμων χλωρίου ονομάζονται ομόλογα και τα ομόλογα με διαφορετικές θέσεις υποκατάστασης από άτομα χλωρίου ονομάζονται ισομερή. Για παράδειγμα, τα συμπαράγωγα με 3 άτομα χλωρίου ονομάζονται τριχλωρο

διφαινύλια, ενώ τα ομόλογα διχλωδιφαινύλια διαθέτουν 12 ισομερή. Ανάλογα με την διευθέτηση των δακτυλίων φαινυλίου στο μόριο του PCB, τα συμπαράγωγα διακρίνονται σε επίπεδα (planar ή coplanar) και μη επίπεδα (non-planar). Κριτήριο αυτής της διάκρισης αποτελεί η χωροδιάταξη των δύο δακτυλίων φαινυλίου κατά την περιστροφή τους γύρω από το μεταξύ τους δεσμό άνθρακα-άνθρακα. Όταν οι δακτύλιοι περιστρεφόμενοι εξαιτίας των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των ηλεκτραρνητικών χλωρίων, βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο, τα συμπαράγωγα ονομάζονται planar ενώ όταν βρίσκονται σε κάθετα επίπεδα ονομάζονται non-planar. Έτσι υποκαταστάσεις από άτομα χλωρίου σε ορθο-θέσεις στους φαινολικούς δακτυλίους είναι non-planar συμπαράγωγα, ενώ τα μόνο όρθο και μη όρθο συμπαράγωγα θεωρούνται αποκλειστικά planar συμπαράγωγα. Η ιδιότητα αυτή έχει ως αποτέλεσμα τα όρθο (-o) διευθετημένα συμπαράγωγα στο ένα ή και στους δύο δακτυλίους να εμφανίζονται πολικά έχοντας τη δυνατότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και άρα να είναι περισσότερο διαλυτά στο νερό. Τα μέτα (-m) και πάρα (-p) διευθετημένα συμπαράγωγα θα είναι μη πολικά και έτσι περισσότερο λιπόφιλα. Τα επίπεδα ή μέτα και πάρα καθώς και τα μόνο ορθό διευθετημένα συμπαράγωγα είναι έτσι περισσότερο τοξικά με τα 3 -όρθο και 4 -όρθο διευθετημένα PCBs τα πλέον τοξικά συμπαράγωγα.

Πίνακας 1.4 Τα περισσότερο διαδεδομένα συμπαράγωγα (mol %) των κοινών εμπορικών προϊόντων PCBs (WHO 2003b).

Congener No. (PCB No.)	Διευθέτηση ατόμων χλωρίου (IUPAC No.)	Aroclor 1016	Aroclor 1242	Aroclor 1248	Aroclor 1254	Aroclor 1260
4	2,2'	4.36	3.99			
8	2,4'	10.30	8.97			
18	2,5,2'	10.87	9.36	9.95		
28	2,4,4'	14.48	13.30			
31	2,5,4'	4.72	4.53	9.31		
42	2,3,2,4'			7.05		
52	2,5,2,5'	4.35	4.08	8.36		
53	2,5,2,6'			6.30		
70	2,5,3,4'			6.38	4.75	
91	2,3,6,2,4'				5.00	
99	2,5,2,3,4'				6.10	
101	2,4,5,2,5'				6.98	5.04
110	2,3,6,3,4'				8.51	
118	2,4,5,3,4'				8.09	
138	2,3,4,2,4,5'					5.01
149	2,3,6,2,4,5'					9.52
153	2,4,5,2,4,5'					8.22
180	2,3,4,5,2,4,5'					7.20
185	2,3,4,5,6,2,5'					5.65

Άλλη μια σημαντική ιδιότητα των PCBs αποτελεί η ανθεκτικότητά τους. Έτσι, είναι ανθεκτικά στην επίδραση οξέων και βάσεων και έχουν θερμική σταθερότητα προσδίδοντάς τους πλεονεκτήματα που δικαιολογούν την ευρεία χρήση τους ως μονωτικά υλικά. Σε υψηλές θερμοκρασίες όμως, αποσυνθέτονται παράγοντας ως παραπροϊόντα υδροχλωρικό οξύ και PCBFs.

Χημική ονομασία: χλωροδιφαινύλια				
CAS number: 1336-36-3				
Ομάδα συμπαράγωγων	Μοριακό βάρος	Τάση ατμών (P _a)	Διαλυτότητα στο νερό (g/m ³)	Log K _{ow}
Μονοχλωροδιφαινύλιο	188,7	0,9-2,5	1,21-5,5	4,3-4,6
Διχλωροδιφαινύλιο	223,1	0,008-0,60	0,06-2,0	4,9-5,3
Τριχλωροδιφαινύλιο	257,5	0,003-0,22	0,015-0,4	5,5-5,9
Τετραχλωροδιφαινύλιο	292,0	0,002	0,0043-0,010	5,6-6,5
Πενταχλωροδιφαινύλιο	326,4	0,0023-0,051	0,004-0,02	6,2-6,5
Έξαχλωροδιφαινύλιο	360,9	0,0007-0,012	0,0004-0,0007	6,7-7,3
Έπταχλωροδιφαινύλιο	395,3	0,00025	0,000045-0,0002	6,7-7
Όκταχλωροδιφαινύλιο	429,8	0,0006	0,0002-0,0003	7,1
Εννέαχλωροδιφαινύλιο	464,2	-	0,00018-0,0012	7,2-8,16
Δέκαχλωροδιφαινύλιο	498,7	0,00003	0,000001-0,0000761	8,26

Πηγή: IPCS 1995

Γενικά, τα PCBs είναι δυσδιάλυτα στο νερό (εξάριση αποτελούν τα ορθο-υποκατεστημένα συμπαράγωγα) ενώ είναι ευδιάλυτα σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες και στα βιολογικά υγρά. Η διαλυτότητα στο νερό μειώνεται με την αύξηση του βαθμού χλωρίωσης. Έτσι, η διαλυτότητα του μονοχλωροδιφαινυλίου είναι 6ppm ενώ του οκταχλωροδιφαινυλίου 0,007ppm. Η διαλυτότητα ποικίλει μεταξύ των ομόλογων συμπαράγωγα.

Τέλος, η πτητικότητα των PCBs μειώνεται με αύξηση της χλωρίωσης και ιδιαίτερα για τα μέτα και πάρα συμπαράγωγα. Τα πιο χλωριωμένα συμπαράγωγα είναι σχεδόν μη πτητικά.

1.5.3 Τοξικότητα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων

1.5.3.1 Τοξικότητα των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων

Τα περισσότερα από τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα της μελέτης δεν εμφάνισαν γενετοξική δράση κατά την παρατεταμένη χορήγηση δόσεων σε τρωκτικά ενώ ορισμένα από αυτά (DDTs, lindane, dieldrin) είναι νευροτοξικά σε υψηλές δόσεις. Ωστόσο, δε μπορεί να εκτιμηθεί η συσχέτιση αυτών των επιδράσεων με τα επίπεδα συγκέντρωσης στα οποία εκτίθεται ο ανθρώπινος οργανισμός στο περιβάλλον. Για παράδειγμα, κάποια εντομοκτόνα επηρεάζουν το αναπαραγωγικό σύστημα των πειραματοζώων ή των ανθρώπων όταν εκτίθενται κατά περίπτωση αλλά δεν είναι δυνατή η συσχέτιση των επιδράσεων με τα μετρούμενα περιβαλλοντικά τους επίπεδα. Επίσης, ο μεταβολισμός τους στο περιβάλλον είναι γενικά αργός, γεγονός που ευνοεί την ανθεκτικότητα και την παραμονή τους στους ιστούς των ζωικών οργανισμών (Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν., 2010).

Aldrin

Το aldrin είναι τοξικό για τους ανθρώπους. Η θανατηφόρος δόση για τους ενήλικες εκτιμάται ότι είναι 5g ή 83mg/kg σωματικού βάρους. Οι παρενέργειες και τα συμπτώματα της οξείας τοξικότητας του aldrin περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, ναυτία, ζαλάδα, δυσφορία, εμετό, ακολουθούμενα από μυϊκές συσπάσεις και σπασμούς.

Μελέτες σε εργάτες παραγωγής των aldrin, dieldrin, endrin φανέρωσαν στατιστικά σημαντική αύξηση του μεγέθους συκωτιού και καρκίνο του αναπνευστικού. Το aldrin σε αντίθεση με άλλες οργανοχλωριωμένες ενώσεις δεν συνδέεται άμεσα με ενδοκρινικές διαταραχές και επιδράσεις στο αναπαραγωγικό και ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου.

Η τοξικότητα του aldrin στους υδρόβιους οργανισμούς ποικίλει από τα ασπόνδυλα στα οποία η μέση θανατηφόρος δόση (LD₅₀), κατά την έκθεση για 96 ώρες, υπολογίζεται σε 1-20μg/L έως τα ψάρια σε 9,5-53μg/L. Το aldrin μεταβολίζεται γρήγορα σε dieldrin από φυτά, μικρόβια και ζωικούς οργανισμούς (IPCS 1995).

Dieldrin

Το dieldrin αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα εντομοκτόνα και μαζί με το aldrin είναι από τα σταθερότερα και τοξικότερα χλωριωμένα εντομοκτόνα για τον άνθρωπο, τα θηλαστικά και τις μέλισσες. Η θανατηφόρος δόση του dieldrin για τον άνθρωπο είναι 10mg/kg σωματικού βάρους. Οι παρενέργειες και τα συμπτώματα οξείας τοξικότητας είναι τα ίδια όπως για το aldrin. Η φυτοτοξικότητά του είναι χαμηλή. Η τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς ποικίλει, ενώ είναι πολύ μεγάλη στα περισσότερα είδη ψαριών (1,1 – 41 μg/L) (IPCS 1995).

Chlordane

Το trans ισομερές (γ-ισομερές) είναι δέκα φορές εντομοτοξικότερο του cis ισομερούς.

Τα συμπτώματα της έκθεσης του ανθρώπου στο chlordane περιλαμβάνουν θολή όψη, σύγχυση, αταξία, βήχα, κοιλιακούς πόνους, ναυτία, εμετό, διάρροια, ερεθιστικότητα, τρεμούλα, σπασμούς. Οι μελέτες σε εργάτες παραγωγής chlordane που εκτέθηκαν για 2 έως 15 χρόνια δεν φανέρωσαν τοξικές επιδράσεις, ενώ δεν φαίνεται ότι προκαλούνται διαταραχές στο ανοσοποιητικό και αναπαραγωγικό σύστημα. Στους υδρόβιους οργανισμούς η LD₅₀ ποικίλει από 1200mg/kg σωματικού βάρους (έκθεση για 4-5 μήνες) έως 10mg/kg (έκθεση για 10 εβδομάδες) (IPCS 1995). Το chlordane είναι επίσης τοξικό στα σκουλήκια. Δεν έχουν διαπιστωθεί επιδράσεις στο ανοσοποιητικό και αναπαραγωγικό σύστημα των ζωικών οργανισμών. Είναι εξαιρετικά τοξικό στις μέλισσες, ενώ δεν είναι φυτοτοξικό, με εξαίρεση τα κολοκυνθοειδή (Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν., 2010).

Endrin

Το endrin είναι τοξικό για τον άνθρωπο. Η εκτιμώμενη θανατηφόρος δόση είναι 6g ή 100mg/kg σωματικού βάρους. Συμπτώματα ήπιας τοξικότητας από το endrin αποτελούν: αδυναμία στα πόδια, κοιλιακή δυσανεξία και ναυτία, αλλά όχι εμετό.

Το endrin είναι εξαιρετικά τοξικό για τα ψάρια και η θανατηφόρος δόση είναι μικρότερη του 1.0μg/L σε έκθεση πάνω από 20 ημέρες. Τα υπάρχοντα δεδομένα δεν μπορούν να καταστήσουν ανησυχία για κίνδυνο καρκινογένεσης για τον άνθρωπο, αλλά η κύρια δράση του endrin είναι εναντίον του κεντρικού νευρικού συστήματος (WHO 1992).

Endosulfan

Τα δύο στερεοϊσομερή (α, β) έχουν περίπου την ίδια εντομοτοξική δράση. Το endosulfan είναι πολύ τοξικό για όλους σχεδόν τους οργανισμούς. Μεταβολίζεται γρήγορα, αλλά η οξειδωμένη του μορφή, το endosulfan sulfate, έχει την ίδια περίπου τοξικότητα με το endosulfan και τους μεταβολίτες του, κυρίως στα σπονδυλωτά. Έχει δειχθεί ότι προκαλεί ενδοκρινική διαταραχή τόσο σε υδρόβιους όσο και χερσαίους οργανισμούς επιφέροντας επιδράσεις όπως καθυστερημένη ανάπτυξη αμφιβίων, μειωμένη έκκριση κορτιζόνης στα μύρια, καθυστερημένη ανάπτυξη γεννητικών οργάνων και μειωμένα επίπεδα ορμονών στα πουλιά, ατροφία όρχεων και μειωμένη παραγωγή σπέρματος στα θηλαστικά. Προκαλεί επίσης νευροτοξικές και αιματολογικές επιδράσεις και νεφροτοξικότητα. Όμως, έρευνες χρόνιας τοξικότητας στον άνθρωπο δεν φανέρωσαν καρκινογένεση, αναπαραγωγικές διαταραχές ή τερατογένεση ενώ εκτεταμένη ή μη κατάλληλη εφαρμογή του έχει συνδεθεί με

εκ' γενετής φυσικές διαταραχές, διανοητική καθυστέρηση και θάνατο (U.S. Department of Health and Human Services, 2000).

Endosulfan sulfate

Αποτελεί μεταβολίτη του endosulfan. Σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα γνώσεις μας δεν χαρακτηρίζεται από τις αρνητικές ιδιότητες των υπολοίπων οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων και η χρήση του επιτρέπεται μέχρι και σήμερα. Δεν συσσωρεύεται στο λιπώδη ιστό και δεν περνάει στο γάλα των θηλαστικών. Αποβάλλεται από τους οργανισμούς με τη μορφή αλκοολών (Ζιώγας Β.Ν. και Μαρκόγλου Α.Ν.,2010).

Heptachlor and heptachlor epoxide

Το heptachlor epoxide είναι εντομοτοξικότερο του μητρικού μορίου. Η παρατεταμένη έκθεση σε heptachlor προκαλεί βλάβες στο συκώτι και στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Σύμφωνα με την IARC, (IPCS 1995) , το heptachlor συνδέεται με την καρκινογένεση στα ζώα αλλά όχι στον άνθρωπο. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα συγκέντρωσής του στο περιβάλλον και τους οργανισμούς είναι χαμηλότερα από αυτά που επιφέρουν τοξικές επιδράσεις.

DDTs (DDT, DDE,DDD)

Η δερματική επαφή με DDT δεν συνδέεται άμεσα με ασθένεια ή ερεθισμούς. Η επίδραση άμεσης πρόσληψης DDT και DDE διερευνήθηκε σε μελέτη όπου εθελοντές προσέλαβαν με την τροφή δόσεις αυτών. Έτσι, δόση ίση με 6-10mg/kg σωματικού βάρους DDTs προκάλεσε πονοκέφαλο, ναυτία, ενώ δόση 16mg/kg σωματικού βάρους οδήγησε convulsoy. Τα DDTs δεν προσβάλλουν το αναπαραγωγικό σύστημα του ανθρώπου ενώ η χρόνια έκθεση προκαλεί τάση εμφάνισης νευροψυχολογικών συμπτωμάτων. Παρατηρήθηκε ότι προκαλεί καρκινογένεση στα πειραματόζωα και θεωρείται πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Στον ανθρώπινο λιπώδη ιστό, το DDT αποθηκεύεται ως DDE. Δηλαδή, το DDT μετατρέπόμενο στο περιβάλλον σε DDE περνάει στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της τροφής. Είναι λιποδιαλυτό και δεν βιοαποδομείται παραμένοντας για μεγάλο χρονικό διάστημα στο ανθρώπινο σώμα.

Το DDT είναι πολύ τοξικό για τα ψάρια και επηρεάζει τη συμπεριφορά τους. Για παράδειγμα, έκθεση του brook trout (είδος πέστροφας) σε δόση DDT ίση με 8mg/L οδήγησε σε μετανάστευσή του σε υψηλότερες θερμοκρασίες ενώ έκθεση σε δόσεις 0-50μg/L δεν είχε επιδράσεις. Στα πτηνά, το DDT δεν είναι πολύ τοξικό. Εντούτοις, το DDE προκαλεί ανεπιστρεπτές επιδράσεις στο αναπαραγωγικό τους σύστημα, όπου παρατηρήθηκε η μείωση του πάχους των κελύφων των αυγών πουλιών (IPCS 1995)

Methoxychlor

Γενικά, η τοξικότητα του methoxychlor στα θερμόαιμα είναι πολύ μικρότερη του DDT. Δεν είναι γενετοξικό ενώ τα δεδομένα μελετών βραχείας, μακράς και αναπαραγωγικής τοξικότητας δεν είναι επαρκή. Μια μελέτη σε κουνέλια επέφερε τιμή NOAEL 5mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα η οποία είναι η χαμηλότερη από τιμές LOAELs και NOAELs άλλων μελετών.

HCHs

Από τα ισομερή της παρασκευής των HCHs, το γ-ισομερές (lindane) είναι το πιο εντομοτοξικό αλλά λιγότερο τοξικό και ανθεκτικό από τα υπόλοιπα εντομοκτόνα, γι' αυτό και χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα σε ορισμένες χώρες. Τα περισσότερα δεδομένα για τις τοξικές επιδράσεις των HCHs αφορούν το lindane.

Μελέτη βραχείας και μακράς διάρκειας τοξικότητας σε ποντικούς έδειξε ότι το lindane είναι τοξικό για το συκώτι και τους νεφρούς. Ηπατοκυτταρική υπερτροφία παρατηρήθηκε σε άλλες μελέτες σε ποντικούς. Εντούτοις, δεν είχε καρκινογόνο επίδραση αλλά ευθύνεται για την παρουσία αδενωμάτων και καρκινωμάτων ενώ δεν προκαλεί γενετοξικότητα (IPCS 1995).

1.5.3.2 Τοξικότητα των πολυχλωριομένων διφαινυλίων (PCBs)

Τα PCBs έχουν μέτρια τοξικότητα η οποία εξαρτάται από τον αριθμό και τη θέση των ατόμων χλωρίου στο μόριο βάσει της οποίας διακρίνονται σε PCBs με όρθο, μόνο όρθο και μη όρθο διευθέτηση ατόμων χλωρίου. Οι επιδράσεις τοξικότητας προέρχονται κυρίως από εκτεταμένη ή χρόνια έκθεση. Η θανατηφόρος δόση σε ζωικούς οργανισμούς ποικίλλει από 0,5g/kg έως 11,3g/kg σωματικού βάρους.

Τα PCBs απορροφούνται από τον οργανισμό μέσω του δέρματος, του αναπνευστικού και του γαστροεντερικού συστήματος και μεταβολίζονται στο αίμα, στο συκώτι και στους μύες. Οι παρενέργειες στην υγεία εξαρτώνται από τον τρόπο έκθεσης, την ηλικία, το φύλο και την περιοχή συσσώρευσης στον οργανισμό. Μελέτη Σουηδού επιστήμονα (WHO 2003), φανέρωνε συσχέτιση της βιοσυσσώρευσης PCBs με την λέπτυνση κελύφων των αβγών θαλασσινών πουλιών, προκαλώντας ταυτόχρονα μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην έκφραση των αντιοιστρογονικών ιδιοτήτων των PCBs που μπορούν να εμποδίσουν την αποθήκευση ασβεστίου στα κελύφη κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους.

Η παρατεταμένη ή χρόνια έκθεση ανθρώπων σε PCBs είναι πιθανό να προκαλεί καρκινογένεση, αφού παρατηρήθηκε η παρουσία σπάνιων μορφών ηπατικών καρκίνων και κακοήθους μελανώματος. Άλλες μελέτες έδειξαν ότι έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις PCBs προκαλούν οξείες παρενέργειες όπως η δερματική ασθένεια γνωστή ως chlorance, ηπατίτιδα, απώλεια βάρους, περιορισμό ηπατικής λειτουργίας, βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, πονοκέφαλο, νευρικότητα, ζαλάδα, κούραση. Μελέτες σε ζωικούς οργανισμούς στους οποίους χορηγήθηκαν μεγάλες δόσεις PCBs με την τροφή, εμφάνισαν ήπια ηπατική βλάβη και σε κάποιες περιπτώσεις θάνατο. Παρενέργειες έκθεσης αποτελούν επίσης οι βλάβες στο συκώτι, το στομάχι και τον θυρεοειδή, αλλαγές συμπεριφοράς, προβλήματα στην αναπαραγωγή.

Κοινός μηχανισμός προέλευσης όλων αυτών των επιδράσεων αποτελεί η πρόσδεση των μη όρθο PCBs στους Ah (aryl hydrocarbon) υποδοχείς των κυττάρων η οποία προκαλεί την δράση γονιδίων που προκαλούν τις προαναφερόμενες παρενέργειες. Η δράση των PCBs ως ενδοκρινικών διαταρακτών προκαλεί ομοιόσταση της θυρεοειδούς ορμόνης και ανάπτυξη βροχοκύλης γιατί τα PCBs εμποδίζουν το σχηματισμό του πρωτεϊνικού συμπλόκου της trans θυρεΐνης. Τα PCBs, πιθανόν να επηρεάζουν το αναπαραγωγικό σύστημα αντρών και γυναικών προκαλώντας τη δραστηριότητα οιστρογόνων ενώ προκαλούν ανοσοτοξικότητα.

Τέλος, μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγικότητα του φυτοπλαγκτού που αποτελεί την κύρια πηγή τροφής των υδροβίων οργανισμών (WHO 2003b).

1.5.4 Περιβαλλοντική συμπεριφορά

1.5.4.1 Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα

Aldrin και dieldrin

Τα aldrin και dieldrin δεσμεύονται ισχυρά στο έδαφος και εμφανίζουν μεγάλη αντοχή στην έκπλυση στα υπόγεια στρώματα νερού. Ο σημαντικότερος μηχανισμός απωλειών από το έδαφος είναι η εξάτμιση. Επιπρόσθετα, το aldrin και τα προϊόντα αποδόμησής του βιοσυγκεντρώνονται εξαιτίας της υδροφοβικότητας και της ανθεκτικότητάς τους.

Με την είσοδό του στο περιβάλλον, το aldrin μετατρέπεται γρήγορα στο dieldrin. Ο χρόνος ημιζωής του dieldrin σε κανονικό έδαφος είναι περίπου 5 χρόνια. Η υψηλή αυτή ανθεκτικότητα και η μεγάλη λιποφιλία οδηγούν στην βιοσυγκέντρωση και βιομεγέθυνσή του στους ζωικούς οργανισμούς.

Μελέτες έκθεσης ζωικών οργανισμών σε συγκεντρώσεις dieldrin 0.8 έως 4,2 µg/L και 0,017 έως 0,86 µg/L για 32 ημέρες οδήγησαν σε συντελεστές βιοσυσσώρευσης 12,500 και

13,300 αντίστοιχα. Μια άλλη μελέτη συσσώρευσης του dieldrin σε ζωικούς οργανισμούς, κατά την οποία τους χορηγήθηκαν δίαιτες εμπλουτισμένες με dieldrin (ή aldrin) με ταυτόχρονη έκθεση τους με εμπλουτισμένο με αυτό νερό, δεν επέφερε επιπλέον αύξηση συγκέντρωσης που σημαίνει ότι πρωταρχική πηγή συσσώρευσης του dieldrin στους ζωικούς οργανισμούς αποτελεί το νερό. Δηλαδή οι ζωικοί οργανισμοί λαμβάνουν τα dieldrin και aldrin κατευθείαν από το νερό. Οι χημικές ιδιότητες του aldrin όπως η χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, η υψηλή σταθερότητα και ημιπτητικότητα ευνοούν την μεταφορά του σε μακρινές αποστάσεις. Υπολείμματα dieldrin έχουν ανιχνευτεί στον αέρα, το νερό και τους οργανισμούς του αρκτικού περιβάλλοντος (IPCS 1995).

Chlordane

Το chlordane είναι αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό στους οργανικούς διαλύτες. Έχει μέτρια πτητικότητα ενώ δεσμεύεται εύκολα στα υδάτινα ιζήματα. Η υψηλή λιποφιλία του ($\log K_{ow}=6$) είναι η αιτία της βιοσυγκέντρωσης στο λίπος των οργανισμών. Για παράδειγμα, ψάρια (fathead minnows) που εκτέθηκαν σε συγκέντρωση chlordane ίση με 5.0 $\mu\text{g/L}$ για 32 ημέρες είχε συντελεστή βιοσυσσώρευσης 37800 ενώ άλλα ψάρια (sheepshead minnow) που εκτέθηκαν για 189 ημέρες είχαν 16000. Όπως συμβαίνει με τα aldrin και dieldrin, το chlordane λαμβάνεται από τους οργανισμούς κυρίως από το νερό και δευτερευόντως από την διατροφή τους. Οι χημικές του ιδιότητες ευνοούν την εύκολη και μακρά μεταφορά του (IPCS 1995).

DDTs (DDT, DDE,DDD)

Κατά τη διάρκεια της εκτεταμένης χρήσης του DDT ως εντομοκτόνο και φάρμακο ενάντια σε ιούς (1940-1970), ελευθερώθηκαν μεγάλες ποσότητες στην ατμόσφαιρα, ενώ σημαντικές εκπομπές DDT προέρχονται από τους χώρους παραγωγής, από τη μεταφορά και την κίνηση στο περιβάλλον. Εντούτοις, ενώ απαγορεύθηκε η χρήση του από το 1972 στην Ευρώπη και τις Ην. Πολιτείες, συνεχίζει να ανιχνεύεται αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης από αυτά του 1960. Ως συμπέρασμα προκύπτει ότι είτε ελευθερώνεται στον αέρα από τη σημερινή παραγωγή του σε κάποιες χώρες είτε προέρχεται από εξάτμιση των υπαρχόντων υπολειμμάτων από τις προηγούμενες χρήσεις του. Το DDT και οι μεταβολίτες του μεταφέρονται από το ένα μέσο στο άλλο με διαδικασίες διαλυτοποίησης, προσρόφησης, βιοσυσσώρευσης και εξάτμισης και μεταξύ του ίδιου μέσου μέσω ρευμάτων, αέρα, διάχυσης.

Το DDT και οι κύριοι μεταβολίτες του (pp DDD, pp DDE) προσροφούνται ισχυρά στο έδαφος και είναι ελάχιστα διαλυτοί στο νερό. Ποσό ίσο με 50% της αρχικής ποσότητας

εφαρμογής του, παραμένει στο έδαφος για 10-15 χρόνια. Στο έδαφος τα DDTs υφίστανται μια διαδικασία «ωρίμανσης» όπου απομονώνονται με αποτέλεσμα να περιορίζεται η διαθεσιμότητά τους στους μικροοργανισμούς (βιοαποδόμηση), η εκχύλιση τους από διαλύτες άρα και η τοξικότητα του στους οργανισμούς. Η «ωρίμανση» αυτή οφείλεται στη συνεχή διάχυση των DDTs στους μικροπόρους των συστατικών του εδάφους με αποτέλεσμα να δεσμεύονται ισχυρά και να απομονώνονται. Πλέον, τα μόρια των DDTs δεν είναι διαθέσιμα, ως υποστρώματα, στους μικροοργανισμούς, στα φυτά και τα ζώα.

Η κύρια πηγή των απωλειών των DDTs από το έδαφος είναι η εξάτμιση και η έκπλυση στα υπόγεια ύδατα. Η διαδικασία της εξάτμισης των DDTs από το έδαφος και το νερό μπορεί να είναι συνεχώς επαναλαμβανόμενη και γι' αυτό μεταφέρονται σε μακρινές αποστάσεις μέσω της διαδικασίας που χαρακτηρίζεται ως «παγκόσμια απόσταξη» από τις θερμές στις ψυχρότερες περιοχές της γης.

Ο ρυθμός εξάτμισης από το έδαφος εξαρτάται και αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και της έντασης του ηλιακού φωτός. Αντίστροφα, μεταφορά του από την ατμόσφαιρα στις υδάτινες επιφάνειες και το έδαφος γίνεται μέσω υγρής ή ξηρής εναπόθεσης. Στην αέρια φάση, τα DDTs αντιδρούν με τις ρίζες υδροξυλίου (OH^\cdot) που παράγονται φωτοχημικά και θεωρώντας τη μέση συγκέντρωση OH^\cdot ως $1,5 \cdot 10/\text{cm}^3$ ο χρόνος ημιζωής του DDT θα είναι 37 ώρες στον αέρα. Οι εκτιμώμενοι χρόνοι ημιζωής των μεταβολιτών DDE και DDD είναι 17 και 30 ώρες αντίστοιχα αφού αυτοί έχουν υψηλότερες τάσεις ατμών (παραμένουν περισσότερο στην ατμόσφαιρα). Έτσι μικρότερες ποσότητες των DDE, DDD προσροφούνται στο έδαφος σε σχέση με το DDT. Η φωτοοξειδωση, τέλος, των DDTs, όπως αναφέρθηκε, δεν πραγματοποιείται γρήγορα λόγω της «ωρίμανσης» και απομόνωσης των μορίων τους στο έδαφος.

Η ανθεκτικότητα των DDTs σε συνδυασμό με την υψηλή λιποφιλία τους, οδηγεί στην βιοσυσσώρευση στους οργανισμούς. Έχουν αναφερθεί συντελεστές βιοσυσσώρευσης σε ψάρια που εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις DDT για διαφορετικό χρονικό διάστημα ίσοι με 69100, 154100 και 51335 (IPCS 1995). Σύμφωνα με τον WHO (2003), η υψηλή συσσωρευση DDT στους υδρόβιους οργανισμούς που εντάσσονται στα υψηλά επίπεδα της τροφικής αλυσίδας οφείλεται περισσότερο στην απευθείας δέσμευσή του από το νερό παρά στη διατροφή, δηλαδή η βιομεγέθυνση υπολείπεται της βιοσυσσώρευσης.

α , β – endosulfan / endosulfan sulfate

Οι δύο κύριες πηγές παρουσίας του endosulfan στο περιβάλλον είναι οι απώλειες από την αέρια εφαρμογή του και η εξάτμιση από το έδαφος και τις υδάτινες επιφάνειες. Στην ατμόσφαιρα μπορεί να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις πριν την εναπόθεσή του.

Η κατανομή του στο περιβάλλον είναι αποτέλεσμα της ανθεκτικότητας και της μεταφοράς του. Συγκεκριμένα, η κατανομή του στις φάσεις αέρας/νερό επηρεάζει σημαντικά την τύχη του στην ατμόσφαιρα. Σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα και γενικότερα σε υδατικά διαλύματα το endosulfan υπόκειται σε διαδικασίες υδρόλυσης, οξειδωσης, βιοαποδόμησης.

Ο βαθμός της υδρόλυσης εξαρτάται από το PH της υδάτινης επιφάνειας και με μείωση του PH αυξάνεται ο χρόνος ημιζωής του. Η χημική του αποδόμηση μελετήθηκε κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και βρέθηκε ότι σε αερόβιες συνθήκες υφίσταται υδρόλυση και οξειδωση ενώ σε αναερόβιες συνθήκες μόνο υδρόλυση. Ο χρόνος ημιζωής από την εξάτμισή του από υδάτινες επιφάνειες είναι μεγαλύτερος από 1 χρόνο ενώ το α -ισομερές εξατμίζεται πολύ περισσότερο από το β -ισομερές.

Στο έδαφος φθάνει από την εφαρμογή του σε καλλιέργειες και απόθεση αχρησιμοποίητων συσκευασιών και απορροφάται ισχυρά και έχει ελάχιστη κινητικότητα η οποία εξαρτάται από τη σχέση $k_{ow}=k_{ac}k_{oc}$. Οι κύριες διαδικασίες αποδόμησης του endosulfan στο έδαφος περιλαμβάνουν φωτόλυση (στην επιφάνεια του εδάφους), υδρόλυση (υπό αλκαλικές συνθήκες) ή βιοαποδόμηση. Η βιοαποδόμηση υπό αερόβιες συνθήκες αποδίδει endosulfan sulfate (σε ποσοστό 30-60%) αλλά και υπό αναερόβιες (σε ποσοστό 3-8%). Μικρόβια της οικογένειας των ψευδομονάδων μετατρέπουν το β -ισομερές σε α -ισομερές και βιοαποδομούν και τα δύο σε endosulfan alcohol και endosulfan ether. Ο χρόνος ημιζωής του «συνολικού» endosulfan κυμαίνεται από 288 έως 2241 ημέρες (UNEP 2007).

Τα υπολείμματα των ισομερών endosulfan μετά την εφαρμογή τους σε επιφάνειες φυτών μειώνονται σε λιγότερο του 20% μια εβδομάδα μετά την εφαρμογή και δεν ανιχνεύονται μετά 2-3 εβδομάδες.

Σε εργαστηριακά πειράματα μελέτης της φωτόλυσης των α και β ισομερών (αέρια φάση) κατά την έκθεση φύλλων φυτού στο ηλιακό φως παρατηρήθηκε μετατροπή του α -ισομερούς στο β -ισομερές το οποίο είναι και πιο σταθερό, ενώ ο χρόνος ημιζωής του εκτιμήθηκε στις 7 ημέρες. Το endosulfan sulfate είναι σταθερό στην απευθείας φωτόλυση με φως μήκους κύματος $> 300\text{nm}$, αντιδρά όμως με OH^\cdot και έχει χρόνο ημιζωής στην ατμόσφαιρα 1,23 ώρες.

Μελέτη των επιπέδων υπολειμμάτων του σε ψάρια, κατά τη συνεχή έκθεση υδάτινων οικοσυστημάτων σε endosulfan, φανέρωσε ότι η συγκέντρωσή του μεγιστοποιείται μετά μια

περίοδο 7 ημερών έως 2 εβδομάδων. Ο μέγιστος συντελεστής βιοσυσσώρευσης μετρήθηκε περίπου σε 3000, ενώ σύμφωνα με τη IUPAC μετρήθηκε 2755 σε ψάρια. Μια άλλη μελέτη μέτρησης υπολειμμάτων σε ψάρια έδειξε ότι η συγκέντρωση endosulfan μειώθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις 3 μήνες μετά τον αεροψεκασμό του για τον έλεγχο της μύγας τσε-τσε στην Αφρική (3μηνη περίοδος ψεκασμού). Όμως, η ένωση ανιχνευόταν ακόμη στα ψάρια, μετά από 12 μήνες από τον τελευταίο ψεκασμό. Η συγκέντρωση υπολειμμάτων του κυμάνθηκε σε παρόμοια επίπεδα σε πουλιά που τρέφονται με ψάρια και σε κροκοδείλους φανερόνοντας ότι δεν βιομεγενθύνεται στην τροφική αλυσίδα (HSDB, 1999). Η μελέτη των Rajendran, N., et al (1991) υπολόγισε συντελεστή βιοσυσσώρευσης <100 σε οστρακοειδή αλλά οι Schimmel, S.C et al. (1977) υπολόγισαν συντελεστές βιοσυσσώρευσης από 2400 έως 11000 σε θαλασσινά ψάρια. Παρόλα αυτά, κατά την αξιολόγηση της ενεργού αυτής ουσίας από την IUPAC εντοπίστηκαν μια σειρά από τομείς που γεννούν ανησυχίες. Αυτό συμβαίνει όσον αφορά την τύχη και τη συμπεριφορά της στο περιβάλλον, καθώς η πορεία αποικοδόμησης της δραστικής ουσίας δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και σε μελέτες σχετικά με την αποικοδόμηση της στο έδαφος, στο νερό/ίζημα καθώς και σε μελέτες του μεσοκόσμου, βρέθηκαν άγνωστοι μεταβολίτες. Όσον αφορά την οικοτοξικολογία παραμένουν πολλές ανησυχίες, καθώς με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία δεν μπορούν να αξιολογηθούν ικανοποιητικά οι μακροπρόθεσμοι κίνδυνοι και ειδικότερα η παρουσία των προαναφερθέντων μεταβολιτών. Επίσης, τα διαθέσιμα στοιχεία δεν επιτρέπουν να εξεταστεί επαρκώς η έκθεση των χειριστών σε συνθήκες κλειστού χώρου. Επιπλέον, η ουσία endosulfan είναι πτητική, ο κύριος μεταβολίτης της είναι ανθεκτικός και εντοπίστηκε στα αποτελέσματα παρακολούθησης περιοχών στις οποίες δεν χρησιμοποιείται η εν λόγω ουσία. Κατά συνέπεια, καθώς παραμένουν οι ανησυχίες αυτές, οι διενεργηθείσες αξιολογήσεις με βάση τα υποβληθέντα στοιχεία δεν απέδειξαν ότι είναι δυνατόν, υπό τις προτεινόμενες συνθήκες χρήσης, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν την ουσία endosulfan να πληρούν γενικά τις απαιτήσεις που καθορίζονται στο άρθρο 5 παράγραφος 1 στοιχεία α) και β) της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ (Εγκύκλιος ΥΠΑΑΤ, 2006). Το α-ισομερές είναι λιγότερο ανθεκτικό από το β-ισομερές ενώ το endosulfan sulfate εμφανίζεται ιδιαίτερα ανθεκτικό (U.S. Department of Health and Human Services, 2000).

Endrin, endrin ketone, endrin aldehyde

Το endrin εισάγεται στην ατμόσφαιρα μέσω της εφαρμογής του, της εξάτμισης αλλά και ως αέριο κατά τη διάρκεια παραγωγής. Από τις περισσότερες μελέτες διαφαίνεται ότι μετά την εφαρμογή του σε καλλιέργειες και εδάφη εξατμίζεται τάχιστα ενώ ο ρυθμός

εξάτμισης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το οργανικό υλικό και η υγρασία του εδάφους, η υγρασία της ατμόσφαιρας, ο άνεμος και η επιφάνεια των φυτών. Μετά την εφαρμογή του, το endrin οδηγείται στα επιφανειακά ύδατα κυρίως μέσω της επιφανειακής απορροής από το έδαφος και τις καλλιέργειες. Τα υγρά απόβλητα των περιοχών παραγωγής αλλά και η λανθασμένη αέρια εφαρμογή του συνεισφέρουν στην παρουσία του στο νερό αλλά τα υπολείμματα του περιορίζονται σε τοπικό επίπεδο.

Η ανίχνευση του endrin στο έδαφος είναι αποτέλεσμα της απευθείας εφαρμογής του στο έδαφος και στις καλλιέργειες. Στο έδαφος μπορεί να παραμείνει, να μεταφερθεί και να αποδομηθεί. Προσροφάται ισχυρά, απορροφάται γρήγορα και μετακινείται δύσκολα ιδιαίτερα όταν το οργανικό φορτίο είναι υψηλό. Εκτός από τον τύπο του εδάφους, ο βαθμός παραμονής του στο έδαφος εξαρτάται από την εξάτμιση, την έκπλυση, την διάβρωση από τον αέρα, την επιφανειακή απορροή και την πρόσληψη από την καλλιέργεια. Ο χρόνος ημιζωής στο έδαφος μπορεί να είναι 12 χρόνια. Γενικά, τα κύρια προϊόντα αβιοτικής και έμβιας αποδόμησης είναι τα: endrin ketone, endrin aldehyde, ισομερή αλκοόλη.

Αβιοτικά, το endrin μετατρέπεται από την υπεριώδη ακτινοβολία σε κετόνη και πολύ λιγότερο σε αλδεϋδή. Τα κύρια προϊόντα φωτόλυσης του endrin είναι η endrin ketone, η περαιτέρω αποδόμηση της οποίας αποδίδει endrin aldehyde, ισομερή αλκοόλη και άλλα προϊόντα. Το endrin τόσο υπό την επίδραση ηλιακού φωτός όσο και κατά τη διάρκεια παραμονής του 5 χρόνια σε σκοτάδι υπό κανονική θερμοκρασία μετατράπηκε σε endrin-ketone.

Ο βιομετασχηματισμός του endrin στο περιβάλλον πραγματοποιείται κυρίως με δύο μηχανισμούς: με φωτοαποσύνθεση και με βακτηριακή αποδόμηση. Κατάλληλα είδη μικροβίων σε κατάλληλες εδαφικές συνθήκες βιοαποδομούν το endrin υπό αναερόβιες συνθήκες μετατρέποντάς το κυρίως σε endrin ketone. Κύρια είδη βακτηρίων αποτελούν τα τριχόδερμα, οι ψευδομονάδες, οι βάκιλλοι (WHO ,1992)

HCHs

Τα HCHs δεν αποτελούν φυσικές ουσίες. Το τεχνικώς παραγόμενο προϊόν HCH αποτελείται από α- HCH, β- HCH, γ- HCH, δ- HCH, ε- HCH και άλλα ισομερή, τα κυριότερα από τα οποία είναι τα γ και β ισομερή. Το γ- HCH κατά την παρουσία του στο έδαφος μπορεί να απορροφηθεί από τα συστατικά του εδάφους και να αποδομηθεί, να εκπλυθεί (καταλήγοντας στα υπόγεια ύδατα) και να εξατμιστεί στην ατμόσφαιρα. Εντούτοις, μελέτες έχουν καταλήξει ότι παραμένει στο έδαφος και αποδομείται παρά υπόκειται σε έκπλυση.

Προσδεδεμένο στο έδαφος κατανέμεται στην ατμόσφαιρα ως αποτέλεσμα των αερίων ρευμάτων που δρουν στην επιφάνεια του εδάφους και της πτητικότητάς του.

Για τον προσδιορισμό του χρόνου ημιζωής κατά την διαδικασία της εξάτμισης του πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές μελέτες σε εδάφη και φυτά (βρώμη) και προσδιορίστηκε ότι ο χρόνος ημιζωής του γ -HCH είναι 2,3 -24,8 ημέρες και 0,29 – 0,73 ημέρες όταν η θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι 10°C και 20°C αντίστοιχα.

Γενικά, ο χρόνος ημιζωής κατά την εξάτμιση μειώθηκε με αύξηση της θερμοκρασίας και αυξήθηκε με αύξηση της υγρασίας του υποστρώματος εφαρμογής του.

Άλλα πειράματα φανέρωσαν ότι ο ρυθμός εξάτμισης του γ -HCH από το έδαφος είναι >20% από εδάφη και περίπου 55% από επιφάνειες φυτών κατά τη διάρκεια 24 ωρών.

Στην ατμόσφαιρα οι κύριες διαδικασίες μετατροπής των ισομερών HCHs είναι η βιοαποδόμηση και η αβιοτική αποδόμηση (αποχλωρίωση) από την υπεριώδη ακτινοβολία, παράγοντας πενταχλωροκυκλοεξάνιο. Ο ρυθμός αποδόμησης του β -HCH στην ατμόσφαιρα είναι πολύ λιγότερο αργός σε σχέση με το γ -ισομερές καθιστώντας το β -ισομερές το πιο ανθεκτικό από όλα τα ισομερή. Έτσι το β -HCH βιοσυγκεντρώνεται στα ασπώνδυλα (BCF=195 σε 3 ημέρες), στα ψάρια (BCF=950 – 1500 και 500000 στο λιπώδη ιστό σε 3-10 ημέρες), στα πουλιά και τον άνθρωπο (BCF = 595). Σύμφωνα με τον WHO, το β -HCH χαρακτηρίζεται από την υψηλότερη βιοσυγκέντρωση και τη μικρότερη εξαφάνιση από όλα τα ισομερή HCH (WHO, 2003).

Heptachlor / Heptachlor epoxide

Το heptachlor εμφανίζει ανθεκτικότητα στο έδαφος όπου μετατρέπεται κυρίως στο heptachlor epoxide. Ο χρόνος ημιζωής του είναι περίπου 2 χρόνια σε κανονικό έδαφος ενώ το heptachlor epoxide είναι πολύ ανθεκτικό σε περαιτέρω αποδόμηση. Γενικά και οι δύο ενώσεις δεσμεύονται ισχυρά στο έδαφος και μετακινούνται πολύ αργά. Η έκπλυσή τους προς τα υπόγεια ύδατα είναι περιορισμένη όπως προέκυψε κατά την πραγματοποίηση μελέτης κατά την οποία βρέθηκε ότι το δυναμικό έκπλυσης του heptachlor στα 15cm εδάφους (παράγοντας που εκφράζει τη συγκέντρωση στην αέρια φάση πάνω από το έδαφος/συγκέντρωση στο έδαφος) είναι $5,5 \times 10^{-3}$ (πολύ χαμηλή τιμή). Το heptachlor epoxide δεν υφίσταται έκπλυση στα υπόγεια ύδατα, αλλά προσροφάται ισχυρά στο νερό (στα αιωρούμενα στερεά σωματίδια) και στο ίζημα του βυθού.

Ωστόσο, η κύρια διαδικασία μεταφοράς του heptachlor από το έδαφος είναι η εξάτμισή του. Η θερμοκρασία και η υγρασία επηρεάζουν σημαντικά την ανθεκτικότητα των heptachlor και heptachlor epoxide κατά την εξάτμισή τους από το έδαφος. Η αύξηση τη θερμοκρασίας

μειώνει τους χρόνους ημιζωής (εξατμίζεται περισσότερο) ενώ η ανθεκτικότητά τους είναι μεγαλύτερη σε εδάφη με υγρασία. Επίσης, σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την μετακίνησή τους στο έδαφος αποτελεί το περιεχόμενο οργανικό υλικό του εδάφους.

Εξαιτίας της μεγάλης ανθεκτικότητάς τους και των υψηλών τιμών δεικτών λιποφιλίας (K_{ow}) οι ενώσεις αυτές βιοσυσσωρεύονται στους ζωικούς οργανισμούς ενώ μετρήθηκαν τιμές BCF 9500 και 14400 για το heptachlor και heptachlor epoxide αντίστοιχα (WHO, 2003).

1.5.4.2 Πολυχλωριωμένα διφαινόλια

Η παραγωγή των PCBs ξεκίνησε τη δεκαετία 1920. Η συνολική εμπορική παραγωγή ανέρχεται σε 2×10^9 kg από τα οποία τα 2×10^8 kg παραμένουν στο περιβάλλον και υπόκεινται σε διαδικασίες μεταφοράς, κατανομής στις φάσεις έδαφος/αέρας/νερό και μετατροπής σε μεταβολίτες.

Η κύρια διαδικασία μεταφοράς των PCBs στο περιβάλλον είναι η εξάτμιση από επιφανειακά ύδατα και από το έδαφος. Όπως φανέρωσε μελέτη στη λίμνη Μίσιγκαν της Βορείου Αμερικής η εξάτμιση είναι η κυριότερη διαδικασία μετακίνησης των PCBs από τις λίμνες. Παρόλα αυτά, ο ρυθμός εξάτμισης από τις υδάτινες επιφάνειες μειώνεται σημαντικά εξαιτίας της κατανομής των PCBs μεταξύ νερού και ιζήματος (προσρόφηση). Γενικά, η προσρόφηση αυξάνεται με αύξηση του οργανικού υλικού του ιζήματος και των μικροσωματιδίων του νερού.

Τα PCBs προσροφούνται και ιζηματοποιούνται με αποτέλεσμα να ακινητοποιούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στα υδάτινα συστήματα. Στη συνέχεια μπορούν να επαναδιαλυτοποιηθούν στο νερό και να εξατμιστούν στην ατμόσφαιρα. Ο ρυθμός της επαναδιαλυτοποίησης και της εξάτμισης είναι μεγαλύτερος το καλοκαίρι σε σχέση με το χειμώνα. Γίνεται, λοιπόν, φανερό πως τα PCBs δρουν ως αποθήκη στο περιβάλλον στο οποίο απελευθερώνονται αργά.

Τα PCBs που βρίσκονται ή μεταφέρονται φυσικά στη ατμόσφαιρα μετακινούνται μέσω υγρής ή ξηρής εναπόθεσης. Η ξηρή εναπόθεση πραγματοποιείται με την επίδραση της βαρύτητας προς το έδαφος και το νερό, ενώ η υγρή εναπόθεση πραγματοποιείται μέσω της βροχής, της ομίχλης, του χιονιού. Βρίσκονται σε κάθε φυσικό υπόστρωμα στο περιβάλλον και βιοσυγκεντρώνεται και βιοσυσσωρεύονται στους οργανισμούς. Η βιοσυσσώρευση τους στους υδρόβιους οργανισμούς εξαρτάται εκτός από τη συγκέντρωσή τους στο νερό και στο ίζημα και από το επίπεδο της υδάτινης επιφάνειας στο οποίο οι οργανισμοί διαβιούν και τρέφονται. Έτσι, επειδή κατά τη διαδικασία μεταφοράς των PCBs από την ατμόσφαιρα στο

νερό η συγκέντρωσή τους εμφανίζεται 500 υψηλότερη στην επιφάνεια του νερού η βιοσυγκέντρωση θα είναι δεκάδες φορές υψηλότερη στους οργανισμούς που διαβιούν σ' αυτό το στρώμα νερού.

Όμως, στο ίζημα η συγκέντρωση PCBs είναι γενικά υψηλότερη από ότι στο νερό με αποτέλεσμα η βιοσυγκέντρωσή τους στα ψάρια βυθού να είναι μεγαλύτερη. Στα ψάρια βιοσυσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό (από τον οποίο απομακρύνονται αργά) και κυρίως στο λιπώδη ιστό των οργάνων αφού περιέχουν υψηλότερο ποσό πολικών λιπιδίων (π.χ. φωσφολιπίδια). Εν τέλει, μέσω της τροφικής αλυσίδας βιομεγεθύνονται στους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς. Παρολ' αυτά τα επίπεδα τιμών τους στα ψάρια της λίμνης Οντάριο που βρίσκονται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας μειώνονται από το 1970 και μετά αλλά με μικρότερο βαθμό μείωσης σήμερα. Γενικά, τα περισσότερα χλωριωμένα συμπαράγωγα αυξάνονται με το χρόνο σε σχέση με τα λιγότερο χλωριωμένα αφού τα πρώτα αποδομούνται πιο αργά. Για παράδειγμα, η αναλογία των μορίων PCBs με 4 ή 5 άτομα χλωρίου μειώθηκε κατά 6% σε πέστροφες της λίμνης Οντάριο ενώ η μείωση των μορίων με 7 ή 8 άτομα χλωρίου αυξήθηκε κατά 7% και 4% αντίστοιχα κατά τη διάρκεια των ετών 1977-1993.

Στο περιβάλλον, τα PCBs μπορούν να μετασχηματιστούν και να αποδομηθούν με διαδικασίες που εξαρτώνται από το βαθμό χλωρίωσης του διφαινυλίου και τη μορφή της χλωρίωσης. Αύξηση του βαθμού χλωρίωσης και της ομοιομορφίας της δομής του μορίου αυξάνει την ανθεκτικότητα των συμπαράγωγα PCBs. Για παράδειγμα, μη χλωριωμένα άτομα άνθρακα του διφαινυλίου ευνοούν το μεταβολισμό τους μέσω σχηματισμού ενδιάμεσων προϊόντων (a gene oxide). Μελέτη των Kubatova et. al ,1998 (IPCS 1995) της αποδόμησης του PCB 11 (coplanar συμπαράγωγο) φανέρωσε ότι τα coplanar αποδομούνται μέσω αναγωγικής αποχλωρίωσης από αναερόβια βακτήρια.

Στην ατμόσφαιρα, οι δύο κύριες οδοί αποδόμησης είναι η αντίδραση με ρίζες OH^\ominus και η φωτόλυση.

Κατά την αντίδραση των PCBs με ρίζες OH^\ominus οι χρόνοι ημιζωής τους αυξάνονται με αύξηση του βαθμού χλωρίωσης έτσι ώστε στην τροπόσφαιρα οι χρόνοι να είναι 3,5 – 7,6 ημέρες για τα μονοχλώρο- PCBs, 5,5 -11,8 ημέρες για τα δίχλωρο- PCBs, 9,7 – 20,8 για τα τρίχλωρο- PCBs και 41,6 – 83,2 ημέρες για τα πενταχλώρο- PCBs. Η φωτόλυση των PCBs περιλαμβάνει αποχλωρίωση, πολυμερισμό και υδροξυ – κάρβοξυ αντιδράσεις.

Στο νερό, η φωτόλυση αποτελεί την κύρια διαδικασία αποδόμησης. Οι χρόνοι ημιζωής των μόνο - χλώρο έως τέτρα - χλώρο PCBs που φωτολύονται με το ηλιακό φως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, σε βάθος 0,5cm στο νερό, εκτιμώνται από 17 έως 210 ημέρες.

Κατά τη διάρκεια του χειμώνα ο ρυθμός φωτόλυσης είναι πολύ αργός και μειώνεται με αύξηση του βαθμού χλωρίωσης. Η βιοαποδόμηση των PCBs αναμένεται να είναι πιο εκτεταμένη εν σχέσει με την αβιοτική στο νερό αλλά πολύ περισσότερο στο έδαφος και τα ιζήματα λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης πληθυσμών μικροοργανισμών και δύναται να πραγματοποιηθεί από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Η βιοαποδόμηση εξαρτάται από το βαθμό και τη διευθέτηση της χλωρίωσης στο διφαινύλιο, την συγκέντρωση του PCB, τον τύπο των μικροβιακών πληθυσμών, τη θερμοκρασία και το υπόστρωμα. Γενικά, υπό αερόβιες συνθήκες πραγματοποιείται σε δύο στάδια: κατά το πρώτο, τα PCBs μετατρέπονται σε χλωριωμένα βενζοϊκά οξέα και κατά το δεύτερο αποδομούνται σε CO₂ και ανόργανα χλωριούχα άλατα. Η φωτόλυση των PCBs στο έδαφος πραγματοποιείται σε μικρό βαθμό (IPCS 1995).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις της μελέτης) έχουν ανθρώπινη προέλευση και προκαλούν περιβαλλοντική ρύπανση. Εξαιτίας της λιπιδικής φύσης και της αντοχής τους, βιοσυσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα και παρόλο που έχει απαγορευτεί ή έχει περιοριστεί η εφαρμογή τους από τη δεκαετία 1970, προκαλούν την ιδιαίτερη ανησυχία των ανθρώπων αφού λαμβάνουν τέτοιες ενώσεις μέσω της τροφής. Έτσι είναι αναγκαιότητα, για τη διασφάλιση της περιβαλλοντικής προστασίας και άρα της ανθρώπινης υγείας, η χρήση αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων αυτών των ενώσεων στα περιβαλλοντικά δείγματα και στα τρόφιμα. Κάθε αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων απαιτείται να κατέχει ικανότητα ελάχιστης ανιχνεύσιμης τιμής ώστε οι ενώσεις να ανιχνεύονται και να προσδιορίζονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης (ppb ή ppt). Επιπρόσθετα, ο αναλυτικός προσδιορισμός απαιτείται να γίνεται με τη χρήση εκλεκτικών μεθόδων που να επιτρέπουν δηλαδή τον προσδιορισμό παρά την ταυτόχρονη παρουσία και άλλων ουσιών (οργανικών ή ανόργανων) στο υπόστρωμα. Οι συνυπάρχουσες ουσίες είναι δυνατόν να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό της επιθυμητής ένωσης, ιδιαίτερα όταν αυτή βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση στο υπόστρωμα. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω προϋποθέσεις, διακρίνουμε τις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού υπολειμμάτων σε δύο κατηγορίες: τις **ειδικές (specific)**, όταν προσδιορίζεται μια ένωση και τις

πολυπολειμματικές (multiresidue) όταν προσδιορίζονται ταυτόχρονα πολλές ενώσεις της ίδιας ή διαφορετικών κατηγοριών. Η βασική διαδικασία ανάλυσης και ελέγχου των δειγμάτων τροφίμων για τον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων ενώσεων περιλαμβάνει τέσσερα κύρια στάδια:

- i. Δειγματοληψία – Προκατεργασία δείγματος
- ii. Εκχύλιση των υπολειμμάτων
- iii. Καθαρισμός δειγμάτων εκχύλισης
- iv. Προσδιορισμός των αναλυόμενων ενώσεων

2.2 Δειγματοληψία – Προκατεργασία δείγματος

Για τον έλεγχο υπολειμμάτων οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα τρόφιμα απαιτείται η λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος από το υπό ανάλυση τρόφιμο, δηλαδή κατάλληλη ποσότητα και κατάλληλος τρόπος δειγματοληψίας και αποθήκευσης. Η ανάγκη για τη λήψη της μικρότερης δυνατής ποσότητας δείγματος θα πρέπει να εξισορροπείται με την ανάγκη για τη χρήση όσο το δυνατόν περισσότερο αντιπροσωπευτικού δείγματος προς ανάλυση. Γι' αυτό, στα στερεά κυρίως δείγματα π.χ. ζωικοί ιστοί, λαχανικά, φρούτα για την ορθή δειγματοληψία απαιτείται κατάλληλη προκατεργασία του δείγματος, η οποία συνίσταται στη διάρρηξη της κυτταρικής δομής. Δηλαδή, το αναλυόμενο δείγμα τροφίμου, διαχωρίζεται σε όσο το δυνατόν μικρότερα κομμάτια δημιουργώντας έτσι μεγαλύτερη επιφανειακή περιοχή για την πληρέστερη εκχύλιση των ενώσεων. Αυτός ο διαχωρισμός μπορεί να περιλαμβάνει τεμαχισμό ή/και άλεσμα (mincing) του δείγματος ακολουθούμενο από ομογενοποίηση με ή χωρίς την παρουσία νερού ή οργανικού διαλύτη και από τη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος. Κατά διαφορετικό τρόπο για την πλήρη διάρρηξη της κυτταρικής δομής του δείγματος μπορούν να προστεθούν κατά το άλεσμα απορρυπαντικές ή λειαντικές ουσίες. Οι απορρυπαντικές ουσίες π.χ. δωδεκασουλφονικό νάτριο, συνεισφέρουν στη διάλυση των λιπαρών συστατικών αλλά και στην εκχύλιση και καθαρισμό του δείγματος. Οι λειαντικές ουσίες π.χ. άμμος συμβάλλουν στην καταστροφή της κυτταρικής δομής δρώντας ταυτόχρονα ως αφυδατικό μέσο (θειικό νάτριο, σίλικα) διευκολύνοντας τη διαδικασία της εκχύλισης (Barker S. A., 2000). Γενικά, θα πρέπει η δειγματοληψία και προκατεργασία του δείγματος να διεξάγεται σύμφωνα με αντίστοιχα πρωτόκολλα διεθνών ή εθνικών οργανισμών π.χ. FAO/WHO, EPA.

2.3 Εκχύλιση των υπολειμμάτων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων

2.3.1 Γενικά

Η εκχύλιση υπολειμμάτων οργανοχλωριωμένων ενώσεων αποσκοπεί στο διαχωρισμό τους από το μητρικό υλικό είτε απομονώνοντας την προσδιοριζόμενη ένωση είτε απομακρύνοντας τις παρεμποδίζουσες ουσίες. Οι μεθοδολογίες εκχύλισης βασίζονται στην κατανομή των ενώσεων μεταξύ ενός διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το νερό και της υδατικής φάσης ή στην απομόνωση των ενώσεων σε μια στήλη ή σε στερεάς φάση υπόστρωμα. Είναι μια επιθυμητή κατανομή των ενώσεων από το δείγμα υλικού προς το εκχυλιζόμενο δείγμα κατά την οποία μεγάλη σημασία έχει η πολικότητα και η διαλυτότητα των ενώσεων στο νερό. Για παράδειγμα, σε προϊόντα ζωικής προέλευσης όπου στις περισσότερες περιπτώσεις οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις συσσωρεύονται στο λίπος, τα πρωταρχικά στάδια εκχύλισης περιλαμβάνουν απομόνωση του λίπους από το υλικό είτε με εκχύλιση (π.χ. γάλα, αυγά) είτε με διαχωρισμό (π.χ. κρέας) ενώ στη συνέχεια το λίπος επαναδιαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη. Η απόδοση μιας μεθόδου εκχύλισης εξακριβώνεται με πειράματα ανάκτησης κατά τα οποία το δείγμα εμπλουτίζεται με πρότυπα γνωστών συγκεντρώσεων και στη συνέχεια προσδιορίζεται η τιμή της συγκέντρωσης αυτών. Είναι όμως απαραίτητο να διαφυλαχθεί ότι η δέσμευση των ενώσεων με το δείγμα, στα πειράματα ανάκτησης, είναι της ίδιας φύσης με τη δέσμευσή τους στη φυσική κατάσταση του δείγματος.

2.3.2 Εκχύλιση Soxhlet (SOX)

Η εκχύλιση Soxhlet αναπτύχθηκε στο τέλος του 19^{ου} αιώνα και αποτελεί τη συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο υγρής-στερεής εκχύλισης οργανοχλωριωμένων ενώσεων από στερεά υποστρώματα. Κατ'αυτήν τη μέθοδο, το δείγμα τοποθετείται σε ένα γυάλινο σκεύος (σχήματος δαχτυλήθρας) εντός της συσκευής Soxhlet και διαπερνάται συνεχώς με συμπυκνωμένους ατμούς διαλύτη. Οι συνθήκες αυτής της τεχνικής εκχύλισης ποικίλουν αλλά συνήθως περιλαμβάνουν: χρήση περίπου 100 ml διαλύτη, 5-50 g στερεού δείγματος και χρόνο εκχύλισης 4-18 ώρες. Η μέθοδος έχει αρκετά μειονεκτήματα τα οποία συνοψίζονται στα εξής:

- Απαιτείται μεγάλος όγκος διαλύτη
- Γίνεται χρήση υπερκαθαρών και μη-πολικών διαλυτών (διχλωρομεθάνιο, μίγμα εξανίου-ακετόνης, μίγμα διχλωρομεθανίου-εξανίου)

- Πραγματοποιείται εκρόφηση στερεού υλικού στο εκχυλιζόμενο δείγμα και άρα παραγωγή βρώμικων εκχυλισμάτων που απαιτούν εκτεταμένο καθαρισμό
- Δεν υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης (Ahmed E. F., 2001).

2.3.3 Υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-liquid extraction)

Πρόκειται για τη συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης ενώσεων από υδατικό υπόστρωμα. Βασίζεται στην κατανομή μιας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών τα οποία δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο διαλυτών (φάσεις) σε ορισμένη αναλογία που περιγράφεται από τη σχέση $K_D=C_2/C_1$, όπου K_D ο συντελεστής κατανομής που συνδέεται με τις σχετικές διαλυτότητες της ουσίας στους δύο διαλύτες και C_1, C_2 οι συγκεντρώσεις αυτής στους δύο διαλύτες. Στην περίπτωση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων γίνεται κατανομή μεταξύ του υδατικού δείγματος και ενός οργανικού διαλύτη μη αναμίξιμου με το νερό. Έτσι ώστε τα ανόργανα ιόντα και οι πολικές οργανικές ενώσεις να βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην υδατική φάση ενώ οι μη πολικές οργανικές ενώσεις να βρίσκονται κατά κύριο λόγο στην οργανική φάση (Δεληγιαννάκης Ι. και Χελά Δ., 2003).

Κατά την υγρή-υγρή εκχύλιση, συγκεκριμένος όγκος του προς εκχύλιση δείγματος φέρεται σε επαφή με συγκεκριμένο όγκο του εκχυλιστικού μέσου μέσα σε διαχωριστική χοάνη και αναταράσσεται μέχρις ότου αποκατασταθεί ισορροπία οπότε και διαχωρίζονται οι δύο φάσεις. Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής κατανομής και όσο περισσότερες οι διαδοχικές εκχυλίσεις τόσο περισσότερο μετακινείται μια ένωση από τη μια φάση στην άλλη. Γι' αυτό είναι απαραίτητος ο συνδυασμός της πολικότητας διαλύτη με τη διαλυτότητα της αναλυόμενης ένωσης. Συνήθως χρησιμοποιείται μίγμα διαλυτών ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή δύναμη διάχυσης και διάλυσης των ενώσεων. Έτσι, μη πολικοί διαλύτες (εξάνιο) χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση από λιπαρά υποστρώματα και μέτριας πολικότητας διαλύτες (ακετόνη, διχλωρομεθάνιο) για την εκχύλιση ενώσεων από υποστρώματα με υψηλό ποσό υγρασίας. Η τεχνική αυτή είναι αργή και επίπονη ενώ συγκεντρώνει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως: σχηματισμός σταθερών γαλακτωμάτων, κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, επιβάρυνση με τοξικά απόβλητα, επιπρόσθετα στάδια καθαρισμού του εκχυλιζόμενου δείγματος. Εναλλακτικά, αναπτύχθηκε η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση (Micro liquid-liquid extraction, MLLE) η οποία βασίζεται στην εκχύλιση από έναν μεγάλο όγκο νερού (400ml) σε έναν πολύ μικρό όγκο οργανικού διαλύτη (500μl) και

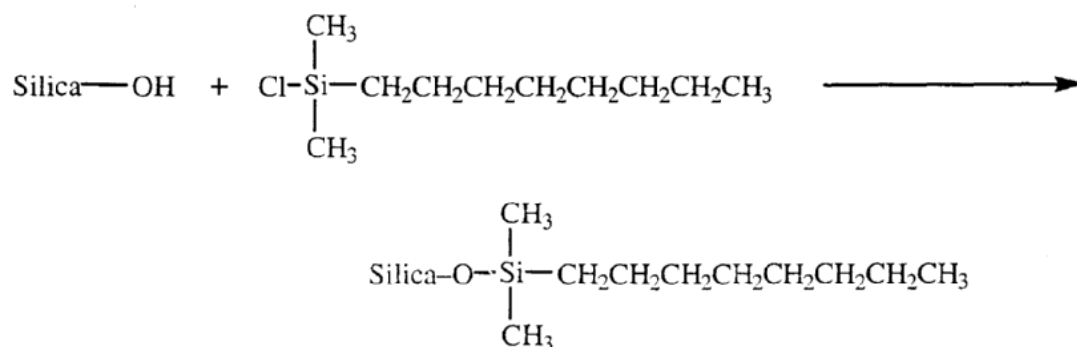
την απευθείας ανάλυση σε χρωματογράφο παραλείποντας το στάδιο της συμπύκνωσης (Balinova, A., 1996).

2.3.4 Υγρή-στερεή εκχύλιση (Solid phase extraction, SPE)

Η υγρή-στερεή εκχύλιση ή εκχύλιση δια της στερεάς φάσης αναπτύχθηκε ως εναλλακτική τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, καθαρισμό, συγκέντρωση ενώσεων από υδατικά αλλά και στερεά (μετά από κατεργασία) υποστρώματα. Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια: i) προετοιμασία του προσροφητικού υλικού, ii) διήθηση του δείγματος, iii) έκπλυση για την απομάκρυνση παρεμποδιζουσών ουσιών, iv) εκρόφηση και ανάκτηση των προς ανάλυση ενώσεων. Πραγματοποιείται είτε σε μικροστήλες που περιέχουν κατάλληλο προσροφητικό υλικό είτε σε δίσκους εκχύλισης όπου το προσροφητικό υλικό έχει ενσωματωθεί σε πολυμερή μεμβράνη. Αρχικά, το υδατικό δείγμα διέρχεται από το στερεό υλικό της στήλης ή του δίσκου όπου και συγκρατούνται οι προς ανάλυση ενώσεις. Στη συνέχεια οι ενώσεις αυτές εκλύονται με τη βοήθεια κατάλληλης ποσότητας οργανικού διαλύτη.

Η τεχνική βασίζεται στους μηχανισμούς της προσρόφησης και της κατανομής μιας ουσίας. Έτσι, οι οργανικές ενώσεις που είναι διαλυμένες στην υδατική φάση προσροφούνται πάνω σε στερεά υποστρώματα κατανεμημένες μεταξύ της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού και της υδατικής φάσης. Η εκχύλιση είναι τότε αποτέλεσμα των ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων των ιοντικών δυνάμεων που συγκρατούν τις διαλυμένες ενώσεις στην υδατική φάση και των δυνάμεων διάχυσης που προκαλούν τη μεταφορά των ενώσεων από το υδατικό μέσο στα προσδεμένα οργανικά μόρια που βρίσκονται στην προσροφητική επιφάνεια. Μετά, οι ενώσεις μπορούν να μεταφερθούν σε κάποιο οργανικό διαλύτη με μεγαλύτερο συντελεστή διάχυσης. Οι ισχυρές, αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προς ανάλυση ενώσεων και του προσροφητικού υλικού διακρίνονται σε υδρόφοβες δυνάμεις (δεσμοί van de Waals), πολικές δυνάμεις (δεσμοί υδρογόνου, διπόλου-διπόλου) και επιδράσεις ιονανταλλαγής.

Τα επιφανειακά τροποποιημένα υλικά παρασκευάζονται με την επίδραση κατάλληλου μόνο, δι, τριχλωρο σιλανίου σε σίλικα πηκτής (στατική φάση) δημιουργώντας μια επιφανειακή επίστρωση οργανικού υλικού το οποίο αντικαθιστά τις υδροξυλομάδες που αποτελούσαν τις δραστικές ομάδες της στατικής φάσης.



Τα υλικά σύμφωνα με τις δραστικές οργανικές ομάδες που δεσμεύονται σ' αυτά, διακρίνονται σε:

i) Ανάστροφης φάσης (Reversed phase)

Χρησιμοποιούνται για την απομόνωση σχετικά μη-πολικών ενώσεων από πολικό δείγμα π.χ. νερά. Οι οργανικές δραστικές ομάδες είναι σχετικά υδρόφοβες όπως οκταδεκυλσυλ-σιλάνια, ή οργανικά πολυμερή με βενζολικούς δακτυλίους (C-18 ή ODS, C-8 προσδεμένη σίλικα, πορώδη πολυμερή, γραφίτικός άνθρακας, συμπολυμερή στυρολιού-διβίνυλβενζόλιο (PS-DVB). Η εκρόφιση πραγματοποιείται με οργανικό διαλύτη.

ii) Κανονικής φάσης (Normal phase)

Χρησιμοποιούνται για την απομόνωση πολικών ενώσεων από μη-πολικά υποστρώματα (Alumina, florisil, silica gel). Οι οργανικές ομάδες είναι πολικές και για την εκρόφιση χρησιμοποιείται πολικός διαλύτης.

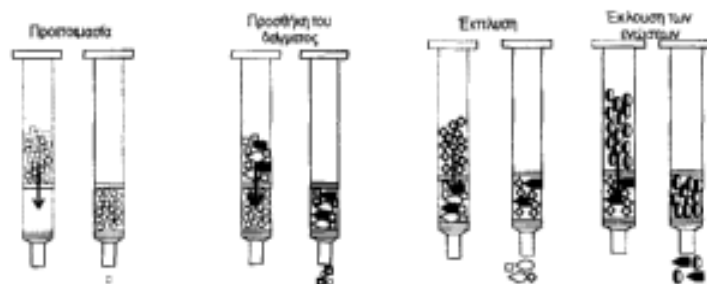
iii) Ιονανταλλαγής (Ion – exchange)

Χρησιμοποιούνται για την απομόνωση ιοντικών ενώσεων ή ενώσεων που μπορούν να μετατραπούν σε ιοντικές με χρήση οργανικού διαλύτη π.χ. ιονταλλακτικές ρητίνες (Δεληγιαννάκης Ι. και Χελά Δ. (2003), Lambropoulou D. A. & Albanis T. A. (2007), A.L.Capriotti et.al., (2010)).

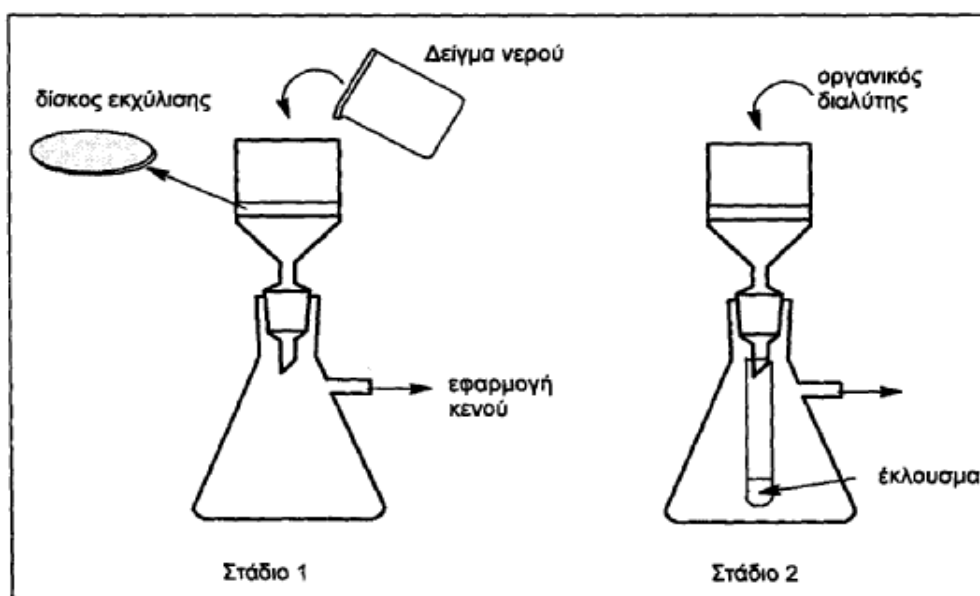
Τα υλικά προσδεμένης φάσης είναι σταθερά κατά την επίδραση οργανικών διαλυτών. Το μέσο μέγεθος των πόρων τους είναι περίπου 60 Å ώστε να μπορούν να εκχλίσουν οργανικές ενώσεις μοριακού βάρους έως περίπου 15.000. Υψηλές τιμές pH (>8) διαλυμάτων δείγματος μπορούν να προκαλέσουν μερική υδρόλυση.

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής έναντι υγρών-υγρών διεργασιών είναι α) υψηλότερες ανακτήσεις, β) αποτελεσματικότερη προσυγκέντρωση, γ) περιορισμένη χρήση οργανικού διαλύτη, δ) όχι προβλήματα σχηματισμού γαλακτωμάτων ή φυσαλίδων, ε) συντομότερος χρόνος προετοιμασίας του δείγματος, στ) ευκολία χειρισμού, ζ) ευκολότερη προσαρμογή σε αυτοματοποιημένη διαδικασία. (Kataoka, H., 2003).

Στα σχήματα 1 και 2, φαίνεται η διαδικασία εκχύλισης δια της στερεάς φάσης σε μικροστήλες και με δίσκους αντίστοιχα.



Σχήμα 2.1 Διαδικασία εκχύλισης δια της στερεάς φάσης με μικροστήλες (cartridges) (Bulletin 910, Supelco, Sigma-Aldrich Co., 1998)

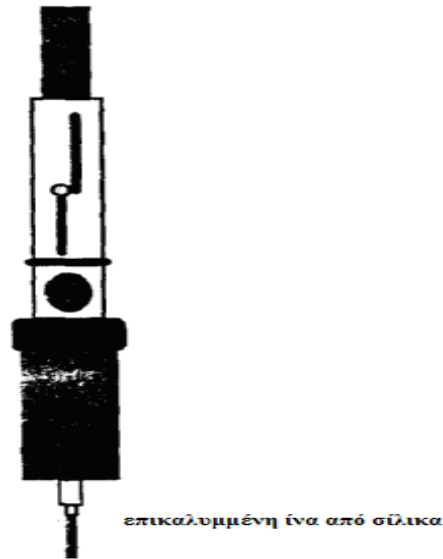


Σχήμα 2.2 Σύστημα υγρής-στερεής εκχύλισης με δίσκους εκχύλισης

2.3.5 Υγρή-στερεή μικροεκχύλιση (solid phase microextraction, SPME)

Η τεχνική της υγρής-στερεής μικροεκχύλισης εισήχθη στην αναλυτική χημεία στις αρχές της δεκαετίας 1990. Πρόκειται για μια εύκολη, απλή, γρήγορη, αυτοματοποιημένη τεχνική που πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση διαλυτών και αποτελείται από δύο ξεχωριστά στάδια:

- την εκχύλιση (δέσμευση των αναλυτών ενώσεων σε μια στατική οργανική φάση)
- την εκρόφιση



Σχήμα 2.3 Οργανολογία της τεχνικής της υγρής-στερεής μικροεκχύλισης.

Μια ίνα από σίλικα μήκους περίπου 1 cm επικαλύπτεται με μια στατική φάση συνήθως πολυσιλοξάνιο ή άλλο πολυμερές. Η ίνα προσαρμόζεται κατάλληλα σε μια τροποποιημένη σύριγγα και βυθίζεται στο υπό ανάλυση διάλυμα για καθορισμένο χρόνο (2-15 λεπτά για υγρά δείγματα) όπου οι αναλυτές ενώσεις προσροφούνται. Στη συνέχεια η σύριγγα προσαρμόζεται σε ένα αέριο χρωματογράφο όπου οι ενώσεις εκροφούνται θερμικά και ακολούθως προσδιορίζονται. Η μέθοδος βασίζεται στην κατανομή των αναλυτών μεταξύ της υδατικής φάσης και της οργανικής στατικής φάσης (άμεση εκχύλιση) ή μεταξύ της αέριας φάσης πάνω από το υπό ανάλυση δείγμα και της οργανικής στατικής φάσης (headspace εκχύλιση). Το πρώτο είδος εκχύλισης χρησιμοποιείται για καθαρά υγρά δείγματα ενώ το δεύτερο είδος για δείγματα με ακαθαρσίες ή ευαίσθητα στη φωτοαποδόμηση όπως π.χ. κάποια PCBs. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση είναι: ο τύπος της ίνας, ο χρόνος εκχύλισης, η ιονική ισχύς του δείγματος, το pH, η θερμοκρασία εκχύλισης και η ανάδευση του δείγματος. Κάποια υλικά που χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη είναι το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), πολυακρυλικά υλικά, Carbowax – PDMS, PDMS – διβινυλιβενζόλιο, Carboxen – PDMS. Το στάδιο εκρόφησης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το χρόνο εκρόφησης, κ.α (Lambropoulou D. A. & Albanis T. A. (2007), Lambropoulou D. A. et al (2007), Lambropoulou D. A. et al (2002)).

2.3.6 Εκχύλιση προσρόφησης σε αναδευόμενη ράβδο (SBSE)

Κατά αυτή την τεχνική, το υπό ανάλυση διάλυμα αναδύεται χρησιμοποιώντας μια γυάλινη μαγνητική ράβδο η οποία είναι καλυμμένη με ένα λεπτό στρώμα πολυδιμέθυλοσιλοξανίου. Τότε, οι ενώσεις του δείγματος προσκολλούνται στη φάση του πολυδιμέθυλοσιλοξανίου και στη συνέχεια εκροφούνται θερμικά σε έναν αέριο χρωματογράφο – φασματογράφο μάζας. Κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν: η ευκολία χρήσης, η αυξημένη ευαισθησία, η υψηλή αναλυτική ακρίβεια, και ο περιορισμένος κίνδυνος επιμολύνσεων (Lambropoulou D. A. & Albanis T. A. (2007)

2.3.7 Εκχύλιση διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση (Matrix solid phase dispersion, MSPD)

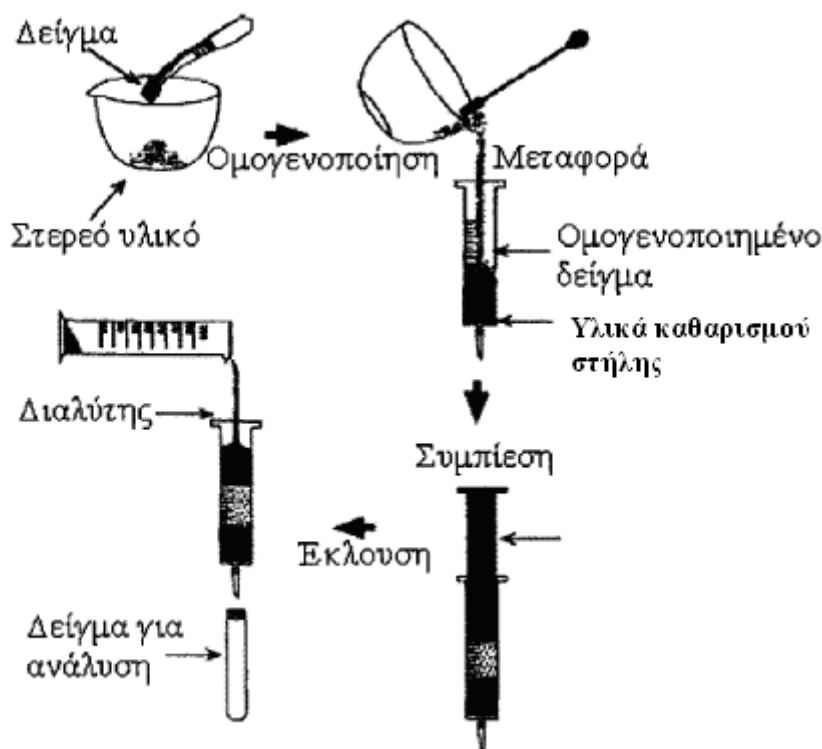
Η μέθοδος διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση εισήχθη από τους Barker, Long et.al. (1989) ως μέθοδος εκχύλισης ενώσεων από στερεά και ημιστερεά υποστρώματα. Συνδυάζει βασικές αρχές φυσικής και χημείας καθώς και τη μεθοδολογία αρκετών αναλυτικών τεχνικών (SPE,LLE) ώστε να επιτευχθεί διάρρηξη των κυττάρων του υποστρώματος (δυνάμεις λόγω μηχανικής ανάμειξης) και διασπορά των συστατικών του μέσα και πάνω σε ένα στερεό υποστηρικτικό υλικό προσδεμένης φάσης (αλληλεπιδράσεις υλικών-χημεία επιφανειών υλικών). Δημιουργείται έτσι ένα ιδιαίτερου χαρακτήρα χρωματογραφικό υλικό για την εκχύλιση των αναλυόμενων ενώσεων από το διασπειρόμενο δείγμα.

2.3.7.1 Βασική διαδικασία της εκχύλισης

Σύμφωνα με την πρώτη εφαρμογή της MSPD, ένα στερεό ή ημιστερεό ή παχύρευστο ή υγρό υπόστρωμα αναμιγνύεται με ένα στερεό υποστηρικτικό υλικό όπως π.χ. σίλικα το οποίο έχει παραγωγοποιηθεί ώστε να παραχθεί υλικό με προσδεμένη οργανική φάση όπως C-18 (οκταδέκυλισιλάνιο) στην επιφάνειά του. Τα υλικά αυτά είναι τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην υγρή-στερεή εκχύλιση. Το στερεό υποστηρικτικό υλικό λειτουργεί ως λειαντικό (π.χ. άμμος) και επιτελεί τη διάρρηξη της κυτταρικής δομής του υποστρώματος, σπάζοντας το σε μικρά κομμάτια. Ταυτόχρονα, η προσδεμένη οργανική φάση επιτελεί τη διάλυση και διασπορά των συστατικών του κομματιασμένου υποστρώματος στην επιφάνεια του υποστηρικτικού υλικού δρώντας ως διαλύτης των συστατικών αυτών. Κατ'αυτόν τον τρόπο, το μείγμα διασπείρεται μέσα και πάνω στο υποστηρικτικό υλικό προσδεμένης φάσης παράγοντας, μέσω υδρόφιλων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών, μια

ιδιαίτερη μεικτού χαρακτήρα φάση για την απομόνωση των αναλυόμενων ενώσεων. Η κατανομή των συστατικών του υποστρώματος στην επιφάνεια του υλικού βασίζεται στην σχετική τους πολικότητα. Τα μη-πολικά συστατικά διασπείρονται στις μη-πολικές προσδεμένες οργανικές φάσεις. Τα μικρού μεγέθους, υψηλής πολικότητας μόρια συστατικών (π.χ. νερό) ενώνονται με δεσμούς υδρογόνου με τις σιλανικές ομάδες που βρίσκονται ελεύθερες στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του υποστηρικτικού υλικού ενώ τα μεγαλύτερου μεγέθους, λιγότερο πολικά μόρια συστατικών κατανέμονται κατά μήκος της επιφάνειας της δημιουργούμενης διφασικής περιοχής (προσδεμένη φάση/διασπειρόμενο δείγμα/λιπιδικό περιεχόμενο).

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, το δείγμα τοποθετείται σε ένα γυάλινο γουδί το οποίο περιέχει το υποστηρικτικό υλικό προσδεμένης φάσης και αναμιγνύονται με γυάλινο γουδοχέρι για κατάλληλο χρονικό διάστημα ώστε να επέλθει πλήρης διάρρηξη και διασπορά του δείγματος. Ο χρόνος της ανάμιξης εξαρτάται από το ποσοστό του συνεκτικού ιστού ή άλλου άκαμπτου βιοπολυμερούς περιεχομένου του δείγματος. Όταν ολοκληρωθεί η ανάμιξη, το μίγμα τοποθετείται (πακτώνεται) σε μια άδεια στήλη (όταν δεν απαιτείται καθαρισμός) ή στην κορυφή μιας στήλης όπου στη βάση της έχει τοποθετηθεί προσροφητικό υλικό (όταν πραγματοποιείται ταυτόχρονος-ενός σταδίου- καθαρισμός). Η στήλη είναι μια άδεια σύριγγα όπου στη βάση της και στην κορυφή της, μετά την τοποθέτηση των υλικών, τοποθετείται φίλτρο (frit) που μπορεί να είναι ανοξειδωτο ατσάλι, πολυπροπυλένιο, σελουλόζη ή σιλανοποιημένος υαλοβάμβακας. Μετά την τοποθέτηση των υλικών, ακολουθεί συμπίεση του μίγματος με ένα τροποποιημένο έμβολο ώστε να αποφευχθούν κανάλια (κενός χώρος) εντός της στήλης. Κατά το τελευταίο στάδιο, προστίθεται κατάλληλος διαλύτης ή μίγμα διαλυτών ώστε να εκλουστούν οι υπό ανάλυση ενώσεις. Η έκλυση γίνεται είτε υπό ατμοσφαιρική πίεση είτε με την εφαρμογή ήπιου κενού. Διακρίνονται δύο περιπτώσεις κατά το στάδιο της έκλυσης: α) οι υπό ανάλυση ενώσεις παραμένουν στη στήλη ώστε να εκλουστούν πρώτα οι παρεμποδίζουσες ουσίες (στάδιο πλυσίματος) και μετά εκλούνται με διαφορετικό διαλύτη β) οι παρεμποδίζουσες ουσίες παραμένουν στη στήλη (στάδιο ταυτόχρονου καθαρισμού) και εκλούνται οι υπό ανάλυση ενώσεις.



Σχήμα 2.4 Τα κυριότερα στάδια της διαδικασίας εκχύλισης με τη μέθοδο της διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση.

2.3.7.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση

Στη μέθοδο εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση, το δείγμα βρίσκεται διεσπαρμένο σε όλη τη στήλη αποτελώντας μέρος του συνόλου της χρωματογραφικής διαδικασίας. Έτσι, κατά τη διάρκεια της εκχύλισης πραγματοποιούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ: της στατικής φάσης (στερεό υποστηρικτικό υλικό), της κινητής φάσης και των συστατικών του υποστρώματος. Οι παράγοντες που προέρχονται απ' αυτές τις αλληλεπιδράσεις και επηρεάζουν τη διαδικασία αναλύονται ακολούθως (Barker S. A., 2000).

- Η φύση του υποστηρικτικού υλικού.

Τα στερεά υποστηρικτικά υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί έως σήμερα στις αναλυτικές τεχνικές είναι: παραγωγισμένη σίλικα, άμμος, διατομική γη, πολυμερή μοριακά ομοιώματα και νανουλικά.

Η χρήση παραγωγισμένης σίλικας έχει σημαντικό ρόλο στην αποφυγή προβλημάτων της υγρασίας του δείγματος αφού τα ελεύθερα σιλάνια (non-encapped) δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού διευκολύνοντας την έκλουση με οργανικούς διαλύτες. Η άμμος και η διατομική γη είναι οικονομικά υλικά αλλά παρέχουν μειωμένη διαλυτότητα των υπο ανάλυση ενώσεων. Ωστόσο, διατηρούν την ίδια ικανότητα

διάρρηξης της κυτταρικής δομής όπως η παραγωγοποιημένη σίλικα. Επιπλέον, διάρρηξη και διασπορά των συστατικών του δείγματος πραγματοποιούνται μόνο στο βαθμό που επιτρέπουν οι αλληλεπιδράσεις που οφείλονται στις χημικές ομάδες των συστατικών του στερεού υλικού.

Πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν κάποια πολυμερή μοριακά ομοιώματα (Carpio *et al.*, 2010) ως προσροφητικά υλικά. Πρόκειται για πολυμερή υλικά που κατασκευάζονται για να αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη ένωση ή κατηγορία ενώσεων με υψηλή εκλεκτικότητα. Ουσιαστικά είναι συνθετικά υλικά που μιμούνται τη δράση των αντιβιοτικών και των ενζύμων. Ένα άλλο νέο είδος υλικού αποτελούν τα ανθρακικά νανουλικά. Η μεγάλη τους επιφάνεια και τα δομικά χαρακτηριστικά τους προσδίδουν εξαιρετική προσροφητική ικανότητα σε υδρόφοβες ενώσεις.

Το μέγεθος των πόρων του στερεού υλικού δεν παρουσιάζει κάποια ευκρινή διαφορά στην απόδοση της εκχύλισης σε αντίθεση με το μέγεθος των σωματιδίων. Η χρήση υλικών με μέγεθος σωματιδίων 3-10 μm οδηγεί σε εκτεταμένο χρόνο έκλουσης ενώ απαιτεί εκτεταμένη πίεση ή κενό ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητική ροή του διαλύτη έκλουσης. Το σύνηθες μέγεθος σωματιδίων υλικού είναι 40-100 μm .

- Η φύση της προσδεμένης φάσης.

Ως υλικά προσδεμένης φάσης στην MSPD χρησιμοποιούνται ομοίως με την υγρή-στερεή εκχύλιση τα υλικά ανάστροφης και κανονικής φάσης.

Τα υλικά ανάστροφης φάσης, συνήθως C-18 και C-8, χρησιμοποιούνται για την απομόνωση υδρόφωβων ή λιπόφιλων ενώσεων. Η λιπόφιλη προσδεμένη φάση θεωρείται απαραίτητη για τη διάρρηξη της κυτταρικής δομής και τη διασπορά των συστατικών του δείγματος αφού διαλύει τα συστατικά και δημιουργεί μια νέα φάση που προσομοιάζει την κυτταρική μεμβράνη. Τα υλικά κανονικής φάσης είναι ανόργανης φύσης και τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα είναι τα: florisol, alumina, γραφτιτικός άνθρακας, σίλικα πηκτής, σίλικα με προσδεμένες αμινομάδες, δεξτρίνες. Δεν διαλύουν τα συστατικά του δείγματος παρά μόνο προσροφούν τα οργανικά συστατικά διατηρώντας όμως την ικανότητα διάρρηξης της κυτταρικής δομής. Επιφέρουν γενικά ελλιπή διάρρηξη αφού μειώνονται οι χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του δείγματος και των υλικών της επιφάνειά τους.

- Η φύση του υποστρώματος.

Τα συστατικά του υποστρώματος (παρεμποδίζουσες ουσίες της εκχύλισης) μετά τη διασπορά τους μπορούν να μετακινηθούν κατά την έκλουση σε αντίθεση με τα υλικά της προσδεμένης φάσης. Έτσι, ανάλογα με το διαλύτη έκλουσης και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών υποστρώματος και στερεού υλικού, τα συστατικά του υποστρώματος εκλύονται ανά κατηγορία σε κλάσματα (fractionation). Δημιουργούνται έτσι μη καθαρά

εκχυλίσματα ενώ παράλληλα καλύπτουν θέσεις στην επιφάνεια της προσδεμένης φάσης δημιουργώντας μια νέα φάση και διαφοροποιήσεις κατά την εκχύλιση δειγμάτων μεταξύ του ίδιου υποστρώματος. Μερικές φορές είναι αναγκαία μια μεταβολή της κατάστασης ιόντων στην επιφάνεια του στερεού υποστηρικτικού υλικού ώστε να εξασφαλιστούν οι αλληλεπιδράσεις αυτού με τα υπό ανάλυση συστατικά. Αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση οξέων, βάσεων, αλάτων, αντιοξειδωτικών, συμπλοκοποιητικών, ή άντι- συμπλοκοποιητικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της αρχικής ανάμειξης των υλικών.

- Η φύση του διαλύτη έκλουσης.

Κατά τη διαδικασία της εκχύλισης MSPD, η κατάλληλη επιλογή διαλύτη/των έκλουσης καθώς και η σειρά εφαρμογής τους επιτυγχάνει απομόνωση και διαχωρισμό των υπό ανάλυση ενώσεων καθώς και καθαρισμό του εκχυλίσματος. Κάνοντας χρήση ενός διαλύτη ή μίγματος διαλυτών με διαφορετικές πολικότητες είναι επιτρεπτός ο διαχωρισμός ενώσεων ή κατηγοριών ενώσεων διαφορετικών πολικότητων. Δηλαδή, επιλέγουμε διαλύτη έκλουσης που μπορεί να διαχωρίσει τις ενώσεις που επιθυμούμε με βάση την πολικότητα. Η προετοιμασία των υποστηρικτικών υλικών με τους διαλύτες έκλουσης μπορεί να αυξήσει την ανάκτηση των υπό ανάλυση ενώσεων και να επιταχύνει τη διασπορά του δείγματος διότι εξομαλύνονται οι πιθανές διαφορές στην επιφανειακή τάση μεταξύ υποστρώματος και στερεού υλικού.

Η τεχνική της MSPD εκχύλισης έχει βρει πολυάριθμες εφαρμογές αφού απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος υποστρώματος προς ανάλυση, μικρές ποσότητες προσροφητικού υλικού και διαλύτη έκλουσης, επιτυγχάνει ταυτόχρονα εκχύλιση και καθαρισμό εκχυλίσματος σε ένα στάδιο και πραγματοποιείται σε μικρό χρόνο παρέχοντας εν τέλει τη δυνατότητα χρήσης της ως μέθοδο ρουτίνας.

2.3.8 Εκχύλιση με υπερήχους (USE)

Είναι μια απλή τεχνική εκχύλισης, κατά την οποία το υπό ανάλυση δείγμα αναμιγνύεται με κατάλληλο διαλύτη και το μείγμα τοποθετείται σε ένα λουτρό υπερήχων. Στη συνέχεια το μείγμα διαχωρίζεται με φιλτράρισμα και καθαρίζεται με διαλύτη. Η απόδοση αυτής της τεχνικής εκχύλισης επηρεάζεται από την πολικότητα του διαλύτη, την ομογενοποίηση του μίγματος και το χρόνο λειτουργίας των υπερήχων (Ahmed E. F., 2003). Ο χρόνος εκχύλισης είναι συνήθως >60 λεπτών, δεν απαιτείται ακριβή οργανολογία αλλά απαιτείται μεγάλος όγκος διαλύτη (50-200 ml) και επαναλαμβανόμενες εκχυλίσεις.

2.3.9 Εκχύλιση στο υπερκρίσιμο σημείο (SFE)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για την εκχύλιση ενώσεων από στερεά υποστρώματα διότι απαιτεί περιορισμένη ποσότητα οργανικών διαλυτών και μικρή διάρκεια εκχύλισης. Το δείγμα τοποθετείται σε έναν υψηλής πίεσης θάλαμο και εκχυλίζεται από ένα υπερκρίσιμο υγρό. Ως υπερκρίσιμο υγρό ορίζεται ένα στοιχείο ή συστατικό το οποίο συμπεριφέρεται ως τέτοιο υγρό που όταν υποστεί υψηλότερη πίεση και θερμοκρασία από μια ανώτατη (κρίσιμη) τιμή γίνεται περισσότερο διεισδυτικό και έχει μεγαλύτερη διαλυτική ικανότητα. Οι αναλυτές ενώσεις συγκεντρώνονται σε ένα μικρό όγκο διαλύτη ή σε μια υποδοχή (παγίδα) στερεής φάσης. Συνήθως χρησιμοποιείται το CO₂ ως υπερκρίσιμο υγρό διότι έχει χαμηλό κόστος, είναι ευκόλως διαθέσιμο και ασφαλές ενώ οι κρίσιμες συνθήκες του επιτυγχάνονται εύκολα (θερμοκρασία; 31,2 °C, πίεση:72,8 atm). Αυτή η τεχνική παρέχει υψηλότερη εκλεκτικότητα κατά την εκχύλιση εν συγκρίσει με άλλες τεχνικές ενώ τα εκχυλιζόμενα δείγματα είναι πολύ καθαρά και έτσι απαιτείται μόνο κατά περίπτωση καθαρισμός. Η τεχνική της εκχύλισης στο υπερκρίσιμο σημείο έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό PCBs σε ψάρια (Lambropoulou D. A. & Albanis T. A. (2007)).

2.3.10 Εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (PFE)

Χρησιμοποιείται για την εκχύλιση ενώσεων από στερεά υποστρώματα. Σε αντίθεση με την εκχύλιση στο υπερκρίσιμο σημείο, αντί του CO₂, χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης ή μίγμα διαλυτών υπό αυξημένη πίεση και θερμοκρασία προκειμένου να επιτευχθούν αύξηση της διαλυτότητας και διάχυσης των ενώσεων και καλύτερη εκρόφηση. Η οργανολογία της τεχνικής αυτής περιλαμβάνει ένα ανοξείδωτο ατσάλινο δοχείο (cell) στο οποίο παρέχεται η δυνατότητα ελεγχόμενης εφαρμογής θερμοκρασίας και πίεσης. Η εφαρμογή πίεσης εξασφαλίζει τη διατήρηση του διαλύτη σε υγρή μορφή.

Τα στάδια της εκχύλισης περιλαμβάνουν τα εξής: εισαγωγή του δείγματος στο δοχείο εκχύλισης, παροχή οργανικού διαλύτη στο δοχείο εκχύλισης, εφαρμογή πίεσης και θερμοκρασίας στις προκαθορισμένες τιμές, μεταφορά του διαλύτη σε δοχείο συλλογής, καθαρισμό του εκχυλιζόμενου δείγματος.

Η μέθοδος αυτή απαιτεί υψηλό κόστος εξοπλισμού, υποχρεωτικό στάδιο καθαρισμού του εκχυλιζόμενου δείγματος και μπορεί να προκαλέσει θερμική αποδόμηση κάποιων θερμοευαίσθητων ενώσεων. Έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση PCBs από οστρακοειδή και ζωικούς ιστούς (Ahmed E. F., 2003), αλλά και ημιπτητικών οργανοχλωριωμένων ενώσεων (HCH ισομερή, DDTs) από φρούτα (Ahmed E. F., 2001).

2.3.11 Εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (MAE)

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για την εκχύλιση ενώσεων τόσο από στερεά όσο και από υγρά υποστρώματα. Το δείγμα αναμιγνύεται με διαλύτη και ακτινοβολείται με μικροκύματα συχνότητας 2.450Hz (συχνότητα οικιακών συσκευών) για κατάλληλο χρονικό διάστημα χωρίς να επέλθει βρασμός. Τα μικροκύματα ως πηγή θερμότητας θερμαίνουν ταυτόχρονα ολόκληρο το δείγμα επιφέροντας πολύ μικρό χρόνο εκχύλισης. Η κατανομή της εκχυλιζόμενης ένωσης από το δείγμα στο εκχύλισμα εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τη φύση της ένωσης. Η διαδικασία της ακτινοβολήσης επαναλαμβάνεται αρκετές φορές ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητική απόδοση, ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος και προσδιορισμός των ενώσεων. Για την εκχύλιση με μικροκύματα χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές τεχνικές:

- α) εκχύλιση με μικροκύματα με την εφαρμογή πίεσης και θερμοκρασίας-PMAE
- β) εκχύλιση με μικροκύματα υπό ατμοσφαιρική πίεση -FMAE

Η τεχνική προσφέρει μειωμένο χρόνο εκχύλισης και μειωμένη κατανάλωση διαλύτη αλλά περιορίζει την εκλεκτικότητα ενώ απαιτεί απαραίτητο στάδιο καθαρισμού του εκχυλίσματος (Lambropoulou D. A. & Albanis T. A. 2007).

2.4 Καθαρισμός εκχυλισμάτων

Ανεξαρτήτως της χρησιμοποιούμενης μεθόδου εκχύλισης, τα εκχυλίσματα μπορεί να περιέχουν πλήθος ουσιών που να παρεμποδίζουν την ανάλυση των επιθυμητών ενώσεων. Πρόκειται για ουσίες υψηλού μοριακού βάρους όπως λιπίδια, χρωστικές, κ.α., που πρέπει να περιοριστεί η συγκέντρωσή τους στο εκχύλισμα ώστε να διασφαλιστούν χαμηλά όρια ανίχνευσης των ενώσεων και να αποφευχθούν προβλήματα στα όργανα ανίχνευσης. Οι διάφορες μέθοδοι καθαρισμού των εκχυλισμάτων βασίζονται:

- στην πολικότητα (υγρή-υγρή κατανομή, χρωματογραφία στήλης)
- στην προσρόφηση (υγρή-στερεή χρωματογραφία στήλης)
- στην καταβύθιση με χαμηλή θερμοκρασία

Συγκεκριμένα στις εκχυλίσεις ενώσεων από ζωικούς ιστούς ή ιστούς που περιέχουν λιπίδια στη σύστασή τους, οι μέθοδοι καθαρισμού των εκχυλισμάτων αποσκοπούν κυρίως στον καθαρισμό (απομόνωση) των λιπιδίων που παρεμποδίζουν την ανάλυση και διακρίνονται σε δύο γενικές κατηγορίες: στις μεθόδους απομάκρυνσης με διάλυση (destructive) και απομάκρυνσης χωρίς διάλυση (non-destructive) των λιπιδίων (Ahmed E. F. (2003), Hong J. et al (2004)).

2.4.1 Μέθοδοι απομάκρυνσης των λιπιδίων χωρίς διάλυση τους.

2.4.1.1 Χρωματογραφία διείσδυσης σε πηκτή (gel permeation chromatography)

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο διαχωρισμό ουσιών με βάση το μέγεθός τους, την κατανομή και προσρόφηση τους σε πηκτή το οποίο διαπερνά κατάλληλος διαλύτης έκλουσης. Τα λιπίδια μεγέθους > 500Da εκλούνται πρώτα, κατά το πέρασμα του εκχυλίσματος από τη στήλη που περιέχει την πηκτή και στη συνέχεια εκλούνται τα μικρού μεγέθους μόρια που περιλαμβάνουν τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις που συσσωρεύονται στα βιολογικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για εφαρμογή στην ανάλυση ψαριών, διότι οι οργανικές ενώσεις που συσσωρεύονται στο λίπος τους δεν μπορεί να έχουν μέγεθος > 500Da αφού η πρόσληψη τους γίνεται κυρίως μέσα από τα βράγχια τους από τα οποία δεν επιτρέπεται η είσοδος σωματιδίων μεγαλύτερου μεγέθους. Ως προσροφητικό υλικό πλήρωσης της στήλης χρησιμοποιούνται κυρίως διβινυλβενζολικό-πολυστυρένιο πηκτή (Bio-Beads SX-3) και διάφορα συμπολυμερή (P1 gel, envirogel). Η μέθοδος μπορεί να αυτοματοποιηθεί πλήρως και διαθέτει μεγάλη ικανότητα κατακράτησης λίπους π.χ. μια στήλη 500x25 mm μπορεί να δεσμεύσει περίπου 500 mg λίπους.

2.4.1.2 Υγρή-στερεή χρωματογραφία στήλης με χρήση προσροφητικών υλικών (Adsorption column)

Η μέθοδος βασίζεται στην προσρόφηση λιπιδίων κατά τη διαβίβαση τους μέσα από στήλες που περιέχουν προσροφητικά υλικά. Για παράδειγμα, στην MSPD εκχύλιση κατάλληλη ποσότητα τέτοιων υλικών τοποθετείται (πακτώνεται) στο κατω μέρος της στήλης πριν την έναρξη της διαδικασίας εκχύλισης. Κατά την εκχύλιση, οι υπό ανάλυση ενώσεις διέρχονται των προσροφητικών υλικών ενώ τα λιπίδια και άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες κατακρατούνται (εφόσον έχει προηγηθεί κατάλληλη επιλογή των υλικών). Για παράδειγμα ένα προσροφητικό υλικό κανονικής φάσης, florisil, χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό εκχυλισμάτων που περιέχουν μη-πολικά φυτοφάρμακα και PCBs (Kristenson M. E., et.al. 2006) από λιπαρά υποστρώματα αφού το florisil επιτρέπει τη διέλευση μη-πολικών ενώσεων ενώ κατακρατούνται τα λιπίδια. Τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι: florisil, αλούμινα, σίλικα, γραφίτικός άνθρακας, οξινισμένη σίλικα, κ.α.)

2.4.1.3 Παθητική διάχυση (Διάλυση)

Το εκχύλισμα διαχέεται μέσω μιας μεμβράνης πολυμερούς με διάμετρο πόρων περίπου 50μm. Οι ενώσεις διαλύονται στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη ενώ οι παρεμποδίζουσες ουσίες και τα λιπίδια παραμένουν μέσα στη μεμβράνη. Μ' αυτή τη μέθοδο, μπορεί να συγκρατηθεί ποσότητα λιπιδίων >20g αλλά απαιτείται μεγάλη ποσότητα διαλύτη.

2.4.2 Μέθοδοι απομάκρυνσης λιπιδίων με διάλυσή τους (Destructive lipid removal)

Η διάλυση των λιπιδίων επιτυγχάνεται είτε υπό την επίδραση αλκαλίων (σαπωνοποίηση) είτε με οξειδωτική αφυδρογόνωση με χρήση θειικού οξέος.

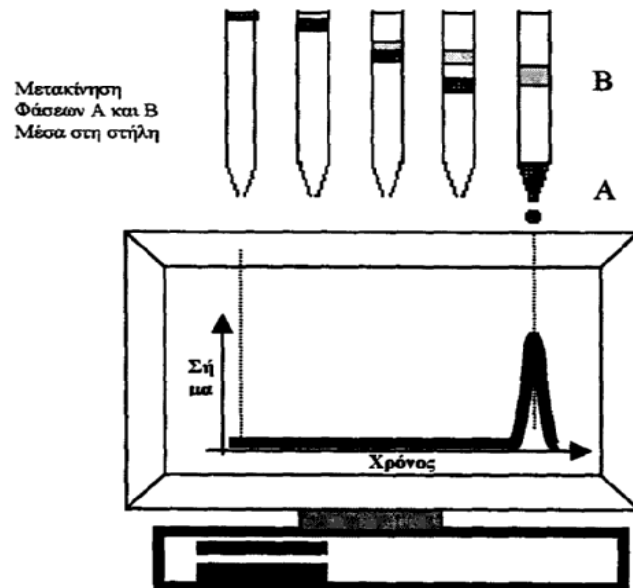
Κατά τη σαπωνοποίηση, το εκχύλισμα που περιέχει λιπίδια θερμαίνεται στους 70 °C για 30 min αφού αναμιχθεί με αιθανολικό διάλυμα 20% υδροξειδίου του καλίου. Κατά τη χρήση θειικού οξέος, το εκχύλισμα αναμιγνύεται και αναδεύεται με ποσότητα αυτού του διαλύματος αρκετές φορές. Στη συνέχεια συγκεντρώνεται η οργανική φάση, απομακρύνεται ο διαλύτης με επίδραση αερίου αζώτου (10-20°C) και το εκχύλισμα επαναδιαλύεται σε άλλο οργανικό διαλύτη. Εναλλακτικά, το θειικό οξύ μπορεί να προστεθεί σε ποσότητα σίλικα και να τοποθετηθεί στο κάτω μέρος μιας στήλης από την οποία θα διαβιβαστεί το εκχύλισμα.

2.5 Προσδιορισμός των οργανοχλωριωμένων ενώσεων

Για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των οργανοχλωριωμένων ενώσεων χρησιμοποιούνται διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι. Αυτές περιλαμβάνουν: την αέρια χρωματογραφία (gas chromatography - GC), την υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography - LC) την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high pressure liquid chromatography - HPLC), την αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC/mass spectrometry - MS), την HPLC/MS, τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography - TLC), και την τριχοειδή ηλεκτρόνιοχρωματογραφία (capillary electrochromatography - CEL). Άλλες μη χρωματογραφικές τεχνικές είναι: οι ανοσοπροσδιορισμοί (immunoassays - IA), πολαρογραφικές μέθοδοι, φωτοκινητικές μέθοδοι, σπεκτροφωτομετρικές μέθοδοι, κ.α.

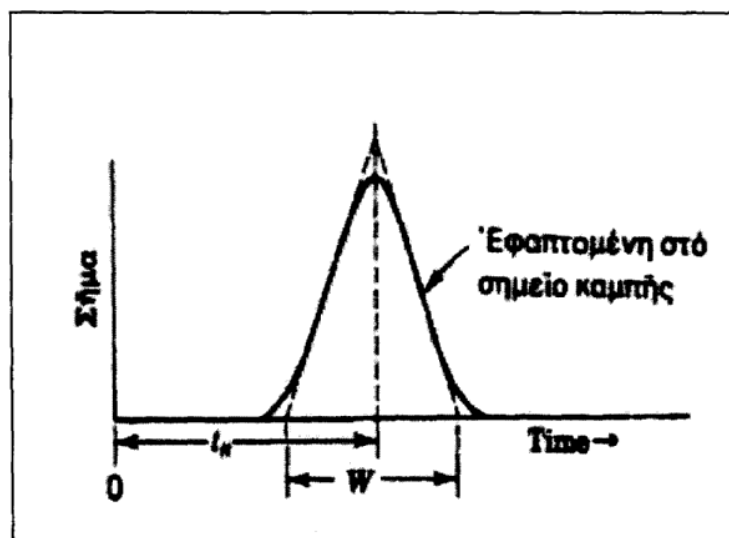
Απώτερος στόχος μιας χρωματογραφικής ανάλυσης είναι ο διαχωρισμός ενός μίγματος ανόργανων ή οργανικών ενώσεων στα συστατικά του. Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται με την κατανομή των συστατικών του μίγματος μεταξύ δύο φάσεων, μιας κινητής και μιας στατικής. Το προς διαχωρισμό μίγμα, εισάγεται με τη βοήθεια μιας ρευστής φάσης (κινητή

φάση) σε μια προσροφητική φάση (στατική φάση) με μεγάλη ειδική επιφάνεια και τα συστατικά του διαχωρίζονται διαπερνώντας με διαφορετική ταχύτητα την προσροφητική φάση λόγω της διαφορετικής κατανομής τους μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Το σήμα καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου από την έναρξη της ροής του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη.



Σχήμα 2.5 Βασική αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας. Το προς διαχωρισμό μίγμα A και B εισάγεται σε μια στήλη. Τα συστατικά A και B μετατοπίζονται με διαφορετική ταχύτητα εξαιτίας διαφορών στην κατανομή τους

Η γραφική παράσταση της απόκρισης (του ανιχνευτή) σε σχέση με το χρόνο ονομάζεται **χρωματογράφημα**.



Σχήμα 2.6 Ένα τυπικό χρωματογράφημα.

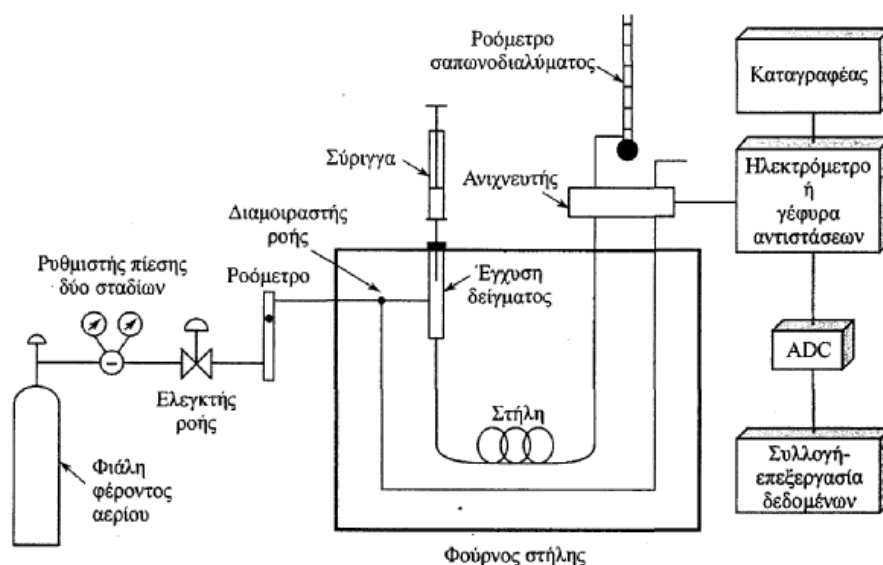
Τα σήματα των συστατικών του μίγματος απεικονίζονται με τη μορφή κορυφών (peaks). Χαρακτηριστικές παράμετροι που απορρέουν από ένα χρωματογράφημα αποτελούν: ο χρόνος συγκράτησης ή κατακράτησης (retention time, t_R) που είναι ο χρόνος που η ουσία παραμένει μέσα στη διαχωριστική στήλη και η διαχωριστική ικανότητα (resolution, R) δηλαδή η ικανότητα της στήλης να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος. Για δύο κορυφές που έχουν χρόνους κατακράτησης t_A , t_B και πλάτη w_A , w_B , η διαχωριστική ικανότητα προσδιορίζεται ως εξής:

$$R = \frac{\Delta t_R}{4\sigma} = \frac{t_B - t_A}{0,5(w_A + w_B)} = \frac{2(t_B - t_A)}{w_A + w_B}$$

όπου σ : η τυπική απόκλιση των κορυφών

2.5.1 Αέρια χρωματογραφία (gas chromatography – GC)

Τα βασικά τμήματα ενός αέριου χρωματογράφου απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.7 Διάγραμμα ενός αέριου χρωματογράφου.

Το φέρον αέριο περιέχεται σε χαλύβδινους κυλίνδρους με μεγάλη πίεση και παρέχεται στη συσκευή με έναν ή περισσότερους ρυθμιστές πίεσης, που ρυθμίζουν την ταχύτητα ροής. Το δείγμα εισάγεται σε έναν θερμαινόμενο θάλαμο (εισαγωγέας) που βρίσκεται στην αρχή της στήλης είτε με μια σύριγγα που τρυπάει ένα λεπτό ελαστικό δίσκο, είτε με μια ειδική βαλβίδα εισαγωγής. Το φέρον αέριο μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος μέσα στη στήλη όπου διαχωρίζονται και το ένα μετά το άλλο διέρχονται από τον ανιχνευτή, ο οποίος στέλνει ένα σήμα στον καταγραφέα για κάθε ένωση που ανιχνεύει. Η στήλη, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος και ο ανιχνευτής βρίσκονται μέσα σε ένα θερμοστατούμενο φούρνο, αν και τα

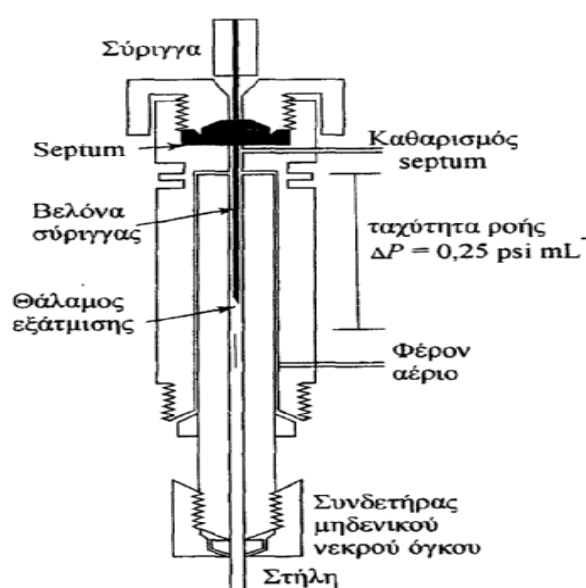
δύο τελευταία μπορούν να θερμανθούν ξεχωριστά (Δεληγιαννάκης Ι. και Χελά Δ. (2003), Lehotay J. S., (2002), Santos F. et al (2002)).

2.5.1.1 Τροφοδοσία φέροντος αερίου

Η επιλογή του φέροντος αερίου (κινητή φάση) καθορίζεται από τις απαιτήσεις του ανιχνευτή που πρέπει να ανιχνεύει τα συστατικά που μεταφέρονται με το φέρον αέριο σε πολύ μεγάλη αραιώση. Τα αέρια πρέπει να είναι χημικώς αδρανή και αυτά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το ήλιο, το άζωτο, το υδρογόνο. Εκτός από τη χρήση τους ως φέροντα αέρια είναι απαραίτητα για τη λειτουργία κάποιων ανιχνευτών (βοηθητικά ή make-up αέρια).

2.5.1.2 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό απαιτείται κατάλληλη ποσότητα δείγματος να εισαχθεί σαν βύσμα (plug ατμού) ώστε να αποφευχθεί διεύρυνση κορυφών και κακός διαχωρισμός. Ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) καθορίζεται από πολλούς παράγοντες όπως η διαθέσιμη ποσότητα δείγματος, η χωρητικότητα της στήλης και η ευαισθησία του ανιχνευτή. Στους συνηθέστερους εργαστηριακούς χρωματογράφους χρησιμοποιούνται 0,1 έως 10μl για υγρά δείγματα και 1 έως 10ml για αέρια δείγματα. Η συνηθέστερη τεχνική έγχυσης είναι η ένεση του υγρού ή αερίου δείγματος με μικροσύριγγα, μέσω αυτοσφραγιζόμενου ελαστικού διαφράγματος σιλικόνης (septum). Το δείγμα εισέρχεται από το στόμιο εισόδου στο χώρο ταχείας εξάτμισης που βρίσκεται στην κορυφή της στήλης.

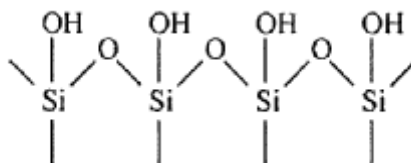


Σχήμα 2.8 Διατομή στομίου άμεσης έγχυσης δείγματος με σύστημα ταχέως μικροεξατμιστή.

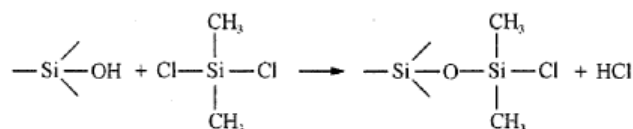
2.5.1.3 Χρωματογραφικές στήλες

Στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιούνται δύο γενικοί τύποι στηλών: οι πληρωμένες στήλες (packed columns) και οι στήλες ανοικτού σωλήνα ή τριχοειδείς (capillary columns). Οι πληρωμένες στήλες περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα (υλικό στήριξης) που μπορεί να είναι γη διατόμων ή κονιοποιημένο πυρίμαχο υλικό ή οργανικό πορώδες πολυμερές, το οποίο είναι διαποτισμένο με την υγρή στατική φάση. Έχουν μήκος από 1 έως 20 m και διάμετρο από 3 έως 10 mm. Στις τριχοειδείς στήλες δεν υπάρχει στερεό υπόστρωμα και η υγρή στατική φάση συγκρατείται απευθείας στα τοιχώματα της στήλης με τη μορφή λεπτού υμενίου. Έχουν μήκος από 10 έως 50 m και διάμετρο από 0,2 έως 1,2 mm. Οι στήλες έχουν γενικό σχήμα U ή W ή σπειροειδή μορφή. Οι μικρές στήλες παρασκευάζονται συνήθως από γυαλί ενώ οι μεγαλύτερες από χαλκό, αργίλιο ή ανοξείδωτο χάλυβα.

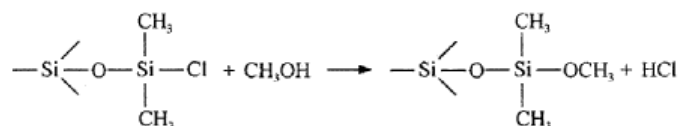
Οι πυριτικές επιφάνειες των υλικών πλήρωσης ή των τοιχωμάτων των τριχοειδών στηλών αντιδρούν με την υγρασία και παρέχουν υδρολυμένες επιφάνειες πυριτικών που έχουν δομή:



Οι ομάδες SiOH παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με πολικά οργανικά μόρια (αλκοόλες, αρωματικοί υδρογονάνθρακες) και παρουσιάζουν μια τάση κατακράτησης τους με προσρόφηση. Για την παρεμπόδιση της προσρόφησης απενεργοποιούνται με σιλιανοποίηση με διμέθυλο-δίχλωρο-σιλάνιο ως εξής:



Με έκλυση με μεθανόλη το δεύτερο χλώριο αντικαθίσταται από τη μεθοξομάδα, σύμφωνα με την αντίδραση



Για την υγρή στατική φάση χρησιμοποιούνται ουσίες που διαφέρουν κυρίως ως προς το βαθμό πολικότητας και την περιοχή θερμοκρασίας που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν. Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά μιας υγρής φάσης είναι:

- α) χαμηλή πτητικότητα (σημείο βρασμού τουλάχιστον 100°C μεγαλύτερο από τη μέγιστη θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης)
- β) χημική αδράνεια
- γ) χαρακτηριστικά διαλύτη (κατάλληλες τιμές συντελεστή κατανομής)
- δ) να βρίσκεται εύκολα σε αναπαραγώγιμη μορφή

Οι τρόποι αλληλεπίδρασης της στατικής φάσης με τα μόρια των ενώσεων που αναλύονται διακρίνονται σε:

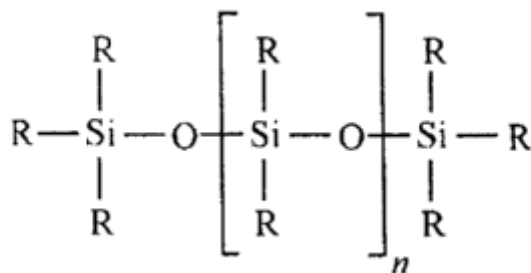
- αλληλεπιδράσεις διπόλου/διπόλου
- δεσμούς υδρογόνου
- αλληλεπιδράσεις διασποράς
- δυνάμεις επαγωγής (McNair H. M. and Miller J. M., 1997)

Οι κυριότερες εμπορικά διαθέσιμες στατικές φάσεις φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

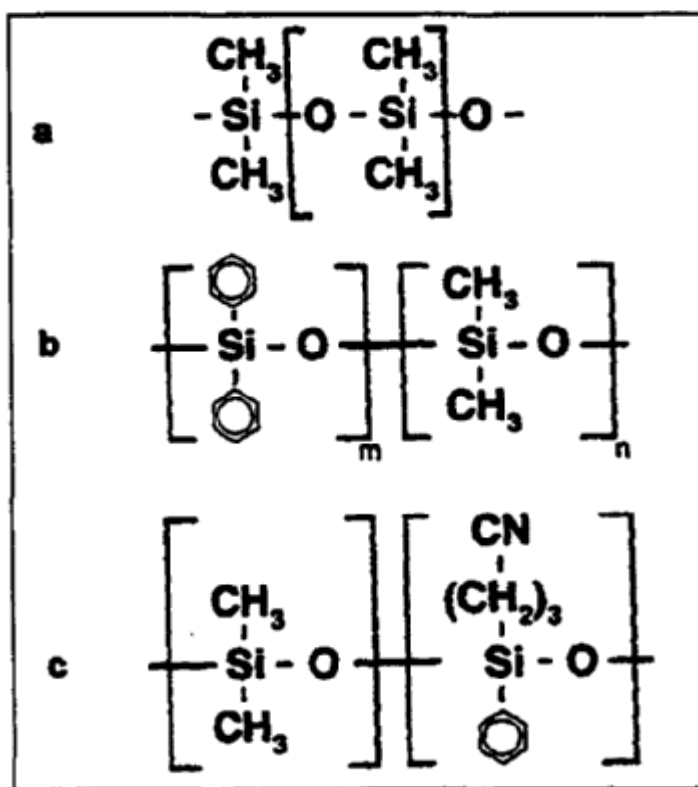
Πίνακας 2.1 Μερικές στατικές φάσεις για τη χρωματογραφία αερίου-υγρού.

Στατική φάση	Κοινό εμπορικό όνομα	Μέγιστη θερμοκρασία, °C	Κύριες εφαρμογές
Πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο	OV-1, SE-20	350	Μη πολική φάση γενικής χρήσης, υδρογονάνθρακες, πολυαρωματικά, φάρμακα, στεροειδή, PCB's
Πολυ(φαινυλομεθυλοδιμεθυλο)σιλοξάνιο (10% σε φαινύλια)	OV-3, SE-52	350	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, αλκαλοειδή, φάρμακα, αλογονούχες ενώσεις
Πολυ(φαινυλομεθυλο)σιλοξάνιο (50% σε φαινύλια)	OV-17	250	Φάρμακα, στεροειδή, φυτοφάρμακα, γλυκόλες
Πολυ(τριφθοροπροπυλοδιμεθυλο)σιλοξάνιο	OV-210	200	Χλωριωμένες αρωματικές ενώσεις, νιτροαρωματικές ενώσεις, αλκυλοπαράγωγα βενζολίου
Πολυ(αιθυλενογλυκόλη)	Carbowax 20M	250	Ελεύθερα οξέα, αλκοόλες, αιθέρες, αιθέρια έλαια, γλυκόλες
Πολυ(διακυανοαλλυλοδιμεθυλο)σιλοξάνιο	OV-275	240	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ρητινικά οξέα, ελεύθερα οξέα, αλκοόλες

Για την επιλογή μιας στατικής φάσης συγκρίνεται η πολικότητα της υπό ανάλυση ένωσης με την πολικότητα της στατικής φάσης. Η πολικότητα αποδίδει το βαθμό επίδρασης ηλεκτρικού πεδίου στην άμεση περιοχή ενός μορίου και μέτρο της αποτελεί η διπολική ροπή του. Σε γενικές γραμμές η πολικότητα της στατικής φάσης θα πρέπει να ταιριάζει με αυτή των υπό ανάλυση (διαχωρισμό) ενώσεων. Τότε η σειρά έκλουσης καθορίζεται από το σημείο βρασμού τους. Πολικές στατικές φάσεις περιέχουν δραστικές ομάδες όπως -CN, -CO, -OH. Οι στατικές φάσεις που αποτελούνται από υδρογονάνθρακες και διάλυτοσιλοξάνια είναι απολικές ενώ από πολυεστέρες είναι ισχυρά πολικές. Τα διάφορα είδη στατικών φάσεων είναι: σιλικόνες, πολυαιθυλενική γλυκόλη, τροποποιημένα πολυμερή σιλοξανίων, χηλικές φάσεις. Στον παραπάνω πίνακα, τα πόλυσιλοξάνια έχουν γενικό τύπο:



Τα πολυδιμεθυλοσιλοξάνια είναι σχετικά α-πολικά και όλες οι ομάδες αλκυλίων (-R) είναι μεθύλια (-CH₃). Σε άλλα πολυσιλοξάνια, ένα κλάσμα των μεθυλομάδων αντικαθίσταται από δραστικές ομάδες όπως φαινύλιο (-C₆H₅), κυανοπροπύλιο (-C₃H₆CN), τριφθοροπροπύλιο (-C₂H₄CF₃). Η % αναγραφή δηλώνει τα ποσοστά αντικατάστασης των μεθυλομάδων από την αναφερόμενη ομάδα στο σκελετό του πολυσιλοξανίου, π.χ. 5% φαινυλοδιμεθυλοσιλοξάνιο σημαίνει ότι το 5% των ατόμων πυριτίου του πολυμερούς είναι συνδεδεμένο με το δακτύλιο του φαινυλίου. Ορισμένες δομές στατικών φάσεων φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.9 Δομές ορισμένων στατικών φάσεων. α) διμεθυλοσιλοξάνιο, β) διφαινυλοδιμεθυλοσιλοξάνιο, γ) κυανοπρόπυλφαινυλοσιλοξάνιο (Δεληγιαννάκης Ι. και Χελά Δ., 2003).

2.5.1.4 Ανιχνευτές

Στην έξοδο της στήλης του αέριου χρωματογράφου βρίσκεται ένας ανιχνευτής όπου ανιχνεύει τις ενώσεις που εκλύονται και καταγράφονται ως σήμα με κάποιο σύστημα καταγραφής. Οι ανιχνευτές διακρίνονται σε κατηγορίες:

- Ανάλογα με το βαθμό απόκρισής τους στις ενώσεις: εκλεκτικούς, μη εκλεκτικούς και ειδικούς
- Ανάλογα με τον τρόπο απόκρισης: σε όσους αποκρίνονται στη συγκέντρωση και όσους αποκρίνονται στη μάζα

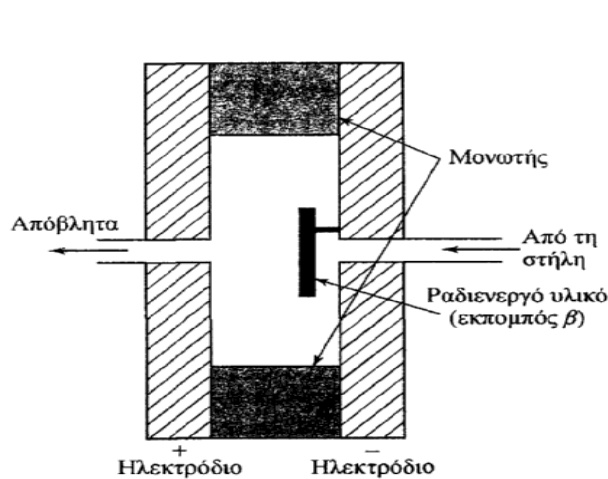
Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ποιότητας ενός ανιχνευτή είναι:

- 1) ικανοποιητική ευαισθησία
- 2) σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα
- 3) γραμμική απόκριση σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους
- 4) ευρεία περιοχή θερμοκρασιών λειτουργίας
- 5) σύντομοι χρόνοι απόκρισης
- 6) αξιοπιστία και ευκολία χρήσης (McNair H. M. and Miller J. M., (1997), Lehotay J. Steven, (2002)).

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία περιλαμβάνουν τα είδη: ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας, ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας, ανιχνευτής χημειοφωταύγειας θείου, ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων, ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου, ανιχνευτής ατομικής εκπομπής, θερμοιοντικός ανιχνευτής, φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής και ανιχνευτής φωτοιοντισμού.

Ιδιαίτερα για την ανάλυση οργανοχλωριωμένων ενώσεων, που περιέχουν δηλαδή άτομα χλωρίου, ιδανικός ανιχνευτής είναι ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων. Ο ανιχνευτής αυτός είναι εκλεκτικός και πολύ ευαίσθητος για ενώσεις που περιέχουν αλογόνα, φωσφόρο, θείο, μόλυβδο, νιτροομάδες και πολυπυρηνικά συστήματα αρωματικών δακτυλίων, π.χ. φυτοφάρμακα και πολυχλωριομένα διφαινύλια. Η λειτουργία του στηρίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας του αερίου που διέρχεται από τον ανιχνευτή λόγω των δημιουργούμενων ιόντων από ραδιενεργή πηγή που βρίσκεται στον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής αυτός αποκρίνεται στη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων αποτελείται από ένα θάλαμο ιονισμού όπου υπάρχει μια ραδιενεργή πηγή (συνηθέστερα ^{63}Ni) η οποία εκπέμπει σωματίδια β. Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του, ένα σταθερό ρεύμα αζώτου το οποίο διέρχεται από το θάλαμο, ιονίζεται από την εκπομπή των σωματιδίων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ελεύθερων ηλεκτρονίων. Ένα θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο

συλλέγει αυτά τα ηλεκτρόνια και έτσι δημιουργείται μια σταθερή πηγή ηλεκτρικού ρεύματος (σταθερό ρεύμα). Αν ένα ηλεκτρονιόφιλο χημικό είδος εισέλθει στο θάλαμο θα δεσμεύσει ελεύθερα ηλεκτρόνια και έτσι θα δημιουργηθεί μια μείωση στο σταθερό ρεύμα. Το σήμα εξόδου παράγεται με τον πολλαπλασιασμό και την ανόρθωση του σταθερού ρεύματος (Ιωάννης Δεληγιαννάκης-Δήμητρα Χελά, 2003). Οι ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων δεν καταστρέφουν το δείγμα σε σημαντικό βαθμό αλλά η γραμμική περιοχή τους περιορίζεται σε δύο τάξεις μεγέθους.



Σχήμα 2.10 Σχηματικό διάγραμμα ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων.

2.5.2 Αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών (GC-MS)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των συστατικών οργανικών δειγμάτων χωρίς να χρειάζεται άλλη επιβεβαιωτική τεχνική. Η μέθοδος στηρίζεται στην παραγωγή ιόντων σε αέρια φάση, από ένα δείγμα, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/e). Η οργανολογία της τεχνικής περιλαμβάνει έναν αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας που παράγει τα ιόντα. Οι πιο συνηθισμένοι μέθοδοι παραγωγής ιόντων είναι ο ιονισμός με ηλεκτρόνια (EI, electron impact) και ο χημικός ιονισμός (CI, chemical ionization).

Ο ιονισμός με ηλεκτρόνια δημιουργείται από επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια που παράγονται από ένα ηλεκτρικά θερμαινόμενο νήμα. Τα ηλεκτρόνια διασταυρώνονται με τα μόρια του δείγματος και διασπώνται σε θράυσματα οπότε ταυτοποιούνται από τον αναλυτή. Ο χημικός ιονισμός παράγει φάσματα μάζας μέσω ιονικών αντιδράσεων τα οποία δίνουν

πληροφορίες για το μοριακό βάρος των ενώσεων χωρίς ή με πολύ μικρή παραγωγή θραυσμάτων.

Ο διαχωρισμός των ιόντων πραγματοποιείται από το φασματογράφο μάζας ή αναλυτή σύμφωνα με τις μάζες των ιόντων. Οι συνηθέστεροι αναλυτές είναι: οι φασματογράφοι μαγνητικής απόκλισης, τα τετραπολικά φίλτρα (Quadrpole), ο διαχωριστής παγίδευσης ιόντων (Ion trap), ο δίδυμος φασματογράφος μάζας (tandem mass spectrometer). Όλοι οι φασματογράφοι μάζας, λειτουργούν σε συνθήκες μειωμένης πίεσης ($<10^{-6}$ torr) προκειμένου να ανιχνεύονται πολύ μικρές ποσότητες ουσιών (Δεληγιαννάκης Ι. και Χελά Δ., 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Η έννοια της λέξης ποιότητα είναι σχετική. Κάποιες φορές μπορεί να μας ενδιαφέρει η υψηλή ή χαμηλή ποιότητα ενός προϊόντος, διαδικασίας, υπηρεσίας αλλά κυρίως ενδιαφερόμαστε εάν η ποιότητα είναι επαρκής ή ανεπαρκής ως προς τις ζητούμενες απαιτήσεις του σκοπού του πελάτη που την αναζητά.

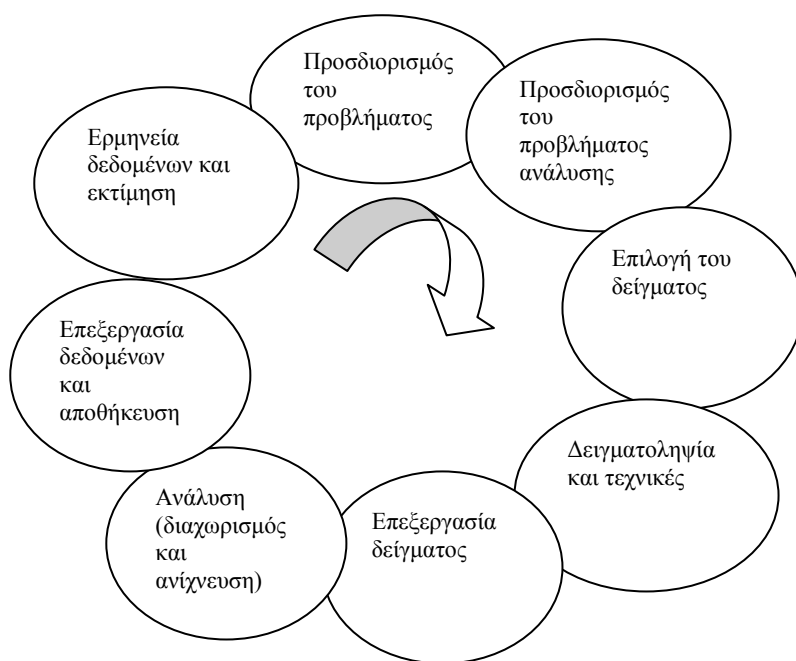
Η ποιότητα του βασικού προϊόντος ενός αναλυτικού χημικού εργαστηρίου, δηλαδή η ποιότητα της πληροφορίας για την ταυτότητα και/ή την ποσότητα των συστατικών ενός αναλυόμενου δείγματος, εκτιμάται μέσω διεθνών αποδεκτών προτύπων αντικειμενικότητας, ορθότητας, αναπαραγωγικότητας και ιχνηλασιμότητας και περιλαμβάνει τα ουσιώδη κριτήρια της χρησιμότητας και της αξιοπιστίας των μετρήσεων (Zoonen P. et.al., 1999).

Η χρησιμότητα των μετρήσεων επιτρέπει τη λήψη αξιόπιστων αποφάσεων και η αξιοπιστία των μετρήσεων επιτρέπει τη σύγκριση αποτελεσμάτων διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων η οποία εξασφαλίζεται από την ιχνηλασιμότητα σε κατάλληλα πρότυπα. Πρόκειται για μια ιδιότητα όπου το αποτέλεσμα μιας μέτρησης ή η τιμή ενός προτύπου μπορεί να σχετιστεί με καθορισμένες τιμές (συνήθως εθνικά ή διεθνή πρότυπα) διαμέσου μιας συνεχούς σειράς συγκρίσεων των βημάτων ανάλυσης τα οποία διαθέτουν καθορισμένες αβεβαιότητες (Taverniers I., et.al, part I, 2004). Πρακτικά, σημαίνει ότι η αναλυτική διαδικασία περιγράφεται ως μια αλυσίδα ή με ένα διάγραμμα ροής που καταλήγει στο μετρήσιμο αποτέλεσμα χωρίς να χάνονται πληροφορίες κατά τα διαφορετικά αναλυτικά στάδια. Τελικά,

όλα τα στάδια ανάλυσης συνδέονται με μια μέθοδο αναφοράς ή ένα υλικό ή μια μονάδα του διεθνούς συστήματος μετρήσεων (International system, S.I.).

Έτσι, η ιχνηλασιμότητα αποτελεί τη βάση για την δυνατότητα σύγκρισης διαφορετικών αποτελεσμάτων. Εάν απαιτείται η ποσοτική σύγκριση αποτελεσμάτων (ποσότητες ή επίπεδα αναλυτή) τότε η αξιοπιστία των μετρήσεων εξασφαλίζεται από την αβεβαιότητα της μέτρησης η οποία αποτελεί συνδυασμό των αβεβαιοτήτων των μετρήσεων όλων των σταδίων της αναλυτικής πορείας. Εν τέλει, η αβεβαιότητα μέτρησης και η ιχνηλασιμότητα καθορίζουν από κοινού την ποιότητα των αναλυτικών δεδομένων (Taverniers I., et.al, part I, 2004).

Τα αναλυτικά δεδομένα θα πρέπει να είναι αξιόπιστα αφού μπορεί να χρησιμοποιηθούν ή/και να αποτελέσουν βασικό στοιχείο στη λήψη αποφάσεων αποτελώντας το τελικό στάδιο του κύκλου μιας χημικής ανάλυσης. Γενικά, μια ανάλυση είναι μια σύνθετη, πολυεπίπεδη έρευνα τιμών των ιδιοτήτων των υλικών π.χ. η ταυτοποίηση και η συγκέντρωση ενός συστατικού ενός δείγματος υλικού. Η χημική ανάλυση ειδικότερα είναι μια κυκλική διαδικασία που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή μιας χημικής πληροφορίας. Ξεκινά ορίζοντας το βασικό αναλυτικό πρόβλημα και τελειώνει υπολογίζοντας και παρουσιάζοντας την αναλυτική μέτρηση που αποτελεί την απάντηση στο αρχικό πρόβλημα.



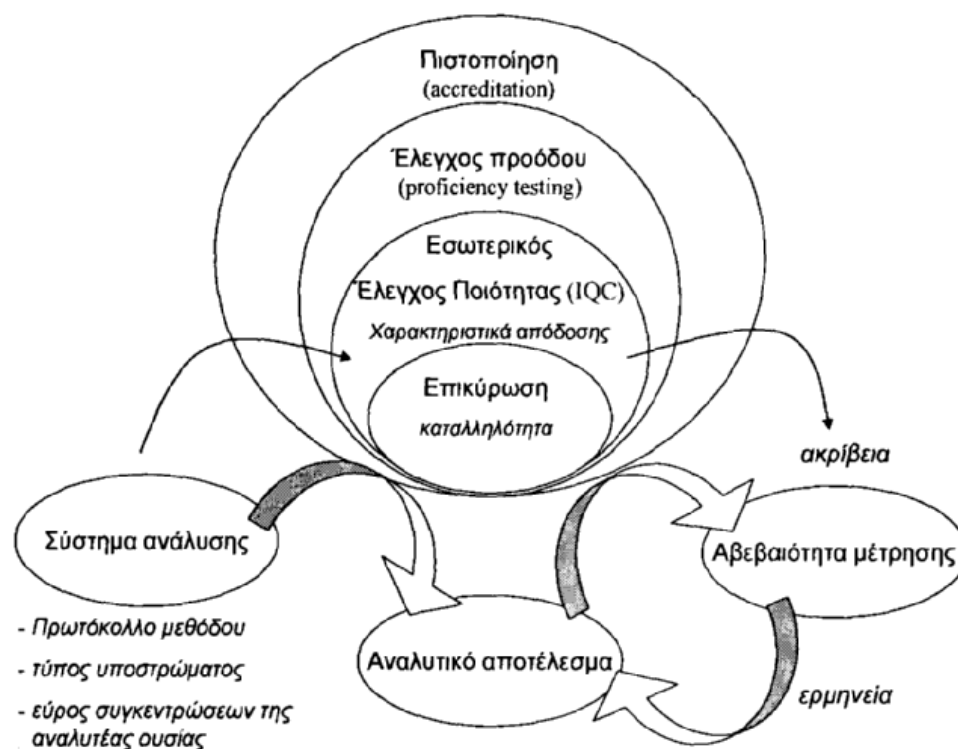
Σχήμα 3.1 Η χημική ανάλυση ως μια κυκλική διαδικασία (Zoonen P. et.al., 1999)

Ως αναλυτικό σύστημα ορίζεται ένα καθορισμένο πρωτόκολλο της μεθόδου που εφαρμόζεται σε ένα συγκεκριμένο τύπο υλικού και σε ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης αναλυτέας ένωσης. Έτσι, κάθε αναλυτικό σύστημα είναι κατάλληλο για συγκεκριμένο αναλυτικό σκοπό και επιτυγχάνει αναλυτικά αποτελέσματα που εκφράζονται με μια αποδεκτή εκτεταμένη αβεβαιότητα (fitness for purpose) η οποία προσδιορίζει την ερμηνεία του αποτελέσματος.

3.2 Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων

Η διαδικασία που επιβεβαιώνει την καταλληλότητα (ικανότητα) μιας συγκεκριμένης αναλυτικής μεθόδου (ή αναλυτικού συστήματος) να επιτύχει το σκοπό της, ονομάζεται επικύρωση μεθόδου (validation). Ο ISO ορίζει ως επικύρωση «την επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων (τεκμηρίων) ότι εκπληρώνονται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για συγκεκριμένη, σκοπούμενη χρήση».

Η Eurachem συμπεριλαμβάνει στον ορισμό της επικύρωσης μεθόδου ελέγχους ώστε να διασφαλίζεται ότι τα χαρακτηριστικά που καθορίζουν τις επιδόσεις της μεθόδου είναι κατανοητά και αποδεικνύουν ότι η μέθοδος είναι επιστημονική υπό τις συνθήκες ανάλυσης για τις οποίες εφαρμόζεται. Δηλαδή, η επικύρωση χρησιμοποιείται για να αποδειχθεί ότι μια συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος μετράει αυτό που έχει σχεδιαστεί να μετρήσει και είναι επομένως κατάλληλη για τον σχεδιασμένο σκοπό. Ξεκαθαρίζει έτσι η σύγχυση των εννοιών επικύρωση μεθόδου και διασφάλιση ποιότητας σε ένα εργαστήριο μιας και η τελευταία αναφέρεται σε πλήρεις μετρήσεις που ένα εργαστήριο οφείλει να υπολογίζει ώστε να παρέχει υψηλής ποιότητας αποτελέσματα. Οι μετρήσεις αυτές περιλαμβάνουν την επικύρωση μεθόδου (1^ο στάδιο), τον αποτελεσματικό εσωτερικό ποιοτικό έλεγχο (IQC) (2^ο στάδιο), την συμμετοχή σε δοκιμές ικανότητας (PT schemes) (3^ο στάδιο) και την πιστοποίηση από ένα διεθνή πρότυπο οργανισμό (4^ο στάδιο).



Σχήμα 3.2 Τα επίπεδα μετρήσεων για τη διασφάλιση ποιότητας των εργαστηρίων αναλυτικής χημείας και χημείας τροφίμων (προσαρμογή από Taverniers I. et.al, part II, 2004).

Προτού ξεκινήσει η διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου είναι αναγκαίο να καθοριστεί ο σκοπός της περιλαμβάνοντας το αναλυτικό σύστημα και τις αναλυτικές απαιτήσεις ταυτόχρονα. Το αναλυτικό σύστημα περιλαμβάνει σε γενικές γραμμές, τον σκοπό και το είδος της μεθόδου, την κατηγορία και το εύρος συγκεντρώσεων των αναλυτέων ενώσεων, την κατηγορία των αναλυόμενων υλικών και το πρωτόκολλο της μεθόδου. Τα αποτελέσματα του αναλυτικού συστήματος ελέγχονται από κριτήρια επίδοσης ώστε αυτό να είναι κατάλληλο (ικανό) για τον πρωταρχικό σκοπό, τα οποία αποτελούν τη βάση για την αποδοχή των δεδομένων των επικυρωμένων αναλυτικών μεθόδων. Έτσι, η επικύρωση διερευνά και περιλαμβάνει τις επιδράσεις όλων των παραμέτρων του αναλυτικού συστήματος στο τελικό αναλυτικό αποτέλεσμα.

Τα κριτήρια επίδοσης μιας αναλυτικής μεθόδου περιλαμβάνουν: μελέτη πιστότητας, έλεγχο ειδικότητας και εκλεκτικότητας, έλεγχο γραμμικότητας, μελέτη ρωμαλεότητας και αυθεντικότητας, προσδιορισμό ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, έλεγχο ορθότητας και ανάκτησης μεθόδου (Κωνσταντίνου Ι., 2005). Επί παραδείγματι, ο έλεγχος ειδικότητας της μεθόδου εξασφαλίζει ότι η μέθοδος ανταποκρίνεται σε μια συγκεκριμένη ένωση αλλά όχι σε αλληλεπιδράσεις ή επιμολύνσεις αυτής. Ο έλεγχος γραμμικότητας επιβεβαιώνει ότι η

υποτιθέμενη αρχικά σχέση αναλυτή και απόκρισης της μεθόδου είναι πραγματική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό των αναλυτικών αποτελεσμάτων. Ο έλεγχος ορθότητας (ή υπολογισμού σφάλματος) ελέγχει αν το σφάλμα της μεθόδου είναι στατιστικά σημαντικό. Η μελέτη πιστότητας και αυθεντικότητας εξετάζει τις διακυμάνσεις του αποτελέσματος της μεθόδου που πηγάζουν από τις συνθήκες ανάλυσης, τον εξοπλισμό, το χρόνο, τον αναλυτή κ.α. (Wood Roger (1999), Hibbert D. B. (1999)).

Συμπερασματικά, η επικύρωση μεθόδου προκειμένου να επιβεβαιώσει την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, οφείλει:

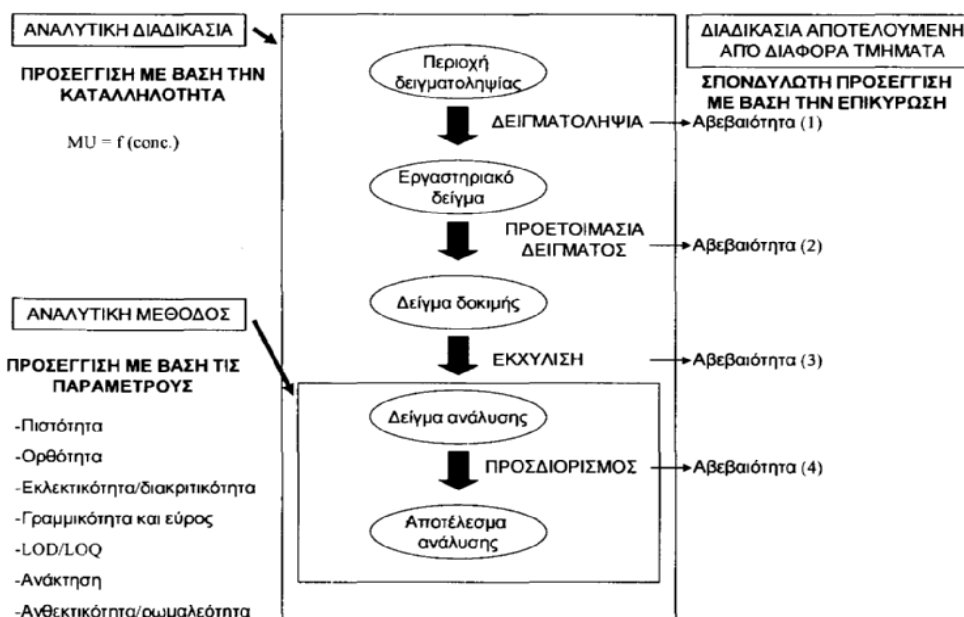
1. να συμπεριλάβει όλες τις πιθανές αιτίες ή παραμέτρους που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα.
2. να εξασφαλίσει την ιχνηλασιμότητα της μεθόδου.
3. να εκτιμήσει τις αβεβαιότητες όλων των παραμέτρων της μεθόδου.

Η επικύρωση μιας νέας αναλυτικής μεθόδου πραγματοποιείται σε δύο στάδια: στην **βασική επικύρωση** που καθορίζει το σκοπό της επικύρωσης και την **πλήρη επικύρωση** που πραγματοποιείται με διεργαστηριακή μελέτη και αποδεικνύει την ορθότητα της βασικής επικύρωσης (Miller J.N., Miller J.C., 2005).

3.2.1 Προσεγγίσεις υπολογισμού επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων

Η επικύρωση μεθόδου πραγματοποιείται πρακτικά με τον υπολογισμό των κριτηρίων επίδοσης. Σ' αυτά τα κριτήρια, που αναφέρθηκαν προηγούμενα, μπορεί να προστεθούν η βαθμονόμηση, η ιχνηλασιμότητα και η αβεβαιότητα μέτρησης της μεθόδου σύμφωνα με οδηγό της Eurachem (CITAC/Eurachem Guide 2002). Η έννοια της αβεβαιότητας μέτρησης συμπεριλαμβάνει όλες τις επιδράσεις των παραμέτρων μιας μεθόδου και επομένως επιτελεί περισσότερες λειτουργίες από το γεγονός ότι απλά αποτελεί κριτήριο επίδοσης της μεθόδου. Αποτελεί δε την αιτία ώστε να διαμορφωθούν εδώ και μερικά χρόνια τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις για τον υπολογισμό της επικύρωσης μεθόδου. Η πρώτη προσέγγιση (προσέγγιση των κριτηρίων επίδοσης) θέτει συγκεκριμένα κριτήρια επίδοσης της μεθόδου και καθορίζει γι' αυτά αριθμητικές τιμές. Για να εξαγάγει αποδεκτά αποτελέσματα, μια μέθοδος θα πρέπει να μην υπερβαίνει τα όρια των ανωτέρω αριθμητικών τιμών. Για παράδειγμα, μπορεί να απαιτείται ελάχιστη ακρίβεια 5% (RSD) ή όριο ανίχνευσης μιας ουσίας 0,1% (w/w). Οι δύο εναλλακτικές προσεγγίσεις κάνουν χρήση της αβεβαιότητας μέτρησης της μεθόδου. Η προσέγγιση «καταλληλότητα για το σκοπό της μεθόδου» (fitness – for – purpose) υπολογίζει την αβεβαιότητα μέτρησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης αναλυτή που μετρά

η αναλυτική μέθοδος. Η τρίτη προσέγγιση ή «modular validation approach», διαιρεί την αναλυτική διαδικασία σε συνεχόμενα στάδια ώστε το καθένα να αποτελεί ξεχωριστό αναλυτικό σύστημα, επικυρώνει κάθε ένα σύστημα ξεχωριστά και τελικά προχωρεί στο συνδυασμό μεταξύ τους. Σε μια αναλυτική μέθοδο τα στάδια αυτά μπορεί να είναι: η δειγματοληψία, η εκχύλιση των αναλυτέων ενώσεων και ο υπολογισμός των ενώσεων. Πρόκειται λοιπόν, για μια βήμα – βήμα διαδικασία επικύρωσης μιας μεθόδου που λαμβάνει υπόψη την αβεβαιότητα μέτρησης κάθε σταδίου.



Σχήμα 3.3 Σχηματική αναπαράσταση μιας αναλυτικής μεθόδου που εμπεριέχεται σε μια αναλυτική διαδικασία και περιλαμβάνει τις διαφορετικές προσεγγίσεις επικύρωσης (MU: αβεβαιότητα μέτρησης, f: συνάρτηση, conc.: συγκέντρωση, LOD: όριο ανίχνευσης, LOQ: όριο ποσοτικοποίησης) (προσαρμογή από Taverniers I. et.al, part II, 2004).

3.2.2 Χαρακτηριστικά επίδοσης για την επικύρωση αναλυτικών μεθόδων

Οι απαιτήσεις της μεθόδου καθορίζουν κάθε φορά την επιλογή της προσέγγισης επικύρωσης της αλλά και την έκταση που θα λάβει ορίζοντας διαφορετικό είδος και αριθμό κριτηρίων επίδοσης. Επιπρόσθετα, ο σκοπός της μεθόδου συνυπολογίζεται στην επιλογή των κριτηρίων της επίδοσης. Κατά την αξιολόγηση για επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου απαιτούνται δύο στάδια:

A) Ταξινόμηση της μεθόδου.

Η συγκεκριμένη μέθοδος κατατάσσεται σε μια από τις εξής 4 κατηγορίες:

- Έλεγχοι ταυτοποίησης (identification tests)
- Ποσοτικοί προσδιορισμοί για την περιεκτικότητα προσμειξέων (quantitative measurements impurities content).

iii. Έλεγχοι ορίων για προσμείξεις (limit tests for impurities)

iv. Ποσοτικοί προσδιορισμοί δραστικών ουσιών (assays of active moieties)

B) Εξέταση των χαρακτηριστικών (κριτηρίων) επίδοσης της αναλυτικής μεθόδου.

Ως χαρακτηριστικά επίδοσης θεωρούνται εκείνες οι λειτουργικές ιδιότητες, παράμετροι, ιδιότητες, κριτήρια ή συμπεριφορές που εμφανίζει μια αναλυτική μέθοδος κατά την εφαρμογή της στην ανάλυση ενός δείγματος και επιτρέπουν να αξιολογηθεί για την καταλληλότητα (ποιότητα) της για το σκοπό που έχει αναπτυχθεί. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας κατά κανόνα ποσοτικοποιούν την ποιότητα της μεθόδου (Κωνσταντίνου Ι., 2005)

Οι Ευρωπαϊκοί και διεθνείς οργανισμοί που καθορίζουν, με την έκδοση κανονισμών και οδηγιών, τη διασφάλιση ποιότητας των αναλυτικών μεθόδων διαθέτουν διάφορους όρους, τρόπους μελέτης και αξιολόγησης και κριτήρια αποδοχής των χαρακτηριστικών ποιότητας επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου.

Πίνακας 3.1 Σύνοψη Ευρωπαϊκών και Διεθνών οργανισμών που εκδίδουν οδηγίες για τη διασφάλιση ποιότητας αναλυτικών μεθόδων (προσαρμογή από Taverniers I. et.al, part II, 2004).

Οργανισμός	Πλήρες όνομα οργανισμού	Οδηγίες για
Eurachem	A focus for analytical chemistry in Europe	• Επικύρωση μεθόδου
CITAC	Cooperation of international traceability in analytical chemistry	• Δοκιμή ικανότητας • Διασφάλιση ποιότητας
EA	European Cooperation for accreditation	• Πιστοποίηση
CEN	European committee for normalization	• Πρότυπα
IUPAC	International union of pure and applied chemistry	• Επικύρωση μεθόδου
ISO	International standardization organization	• Πρότυπα
AOAC International	Association of official analytical chemists	• Εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος • Δοκιμή ικανότητας • Πιστοποίηση
FDA	United states food and drugs administration	• Επικύρωση μεθόδου
USP	United states pharmacopeia	
ICH	International conference on harmonization	
FAO/WHO	Food and agricultural organization/World health	• Επικύρωση μεθόδου
Codex/CCMAS	Organization: Codex committee on methods of analysis and sampling	
ILAC	International laboratory accreditation cooperation	• Δοκιμή ικανότητας • Πιστοποίηση

3.2.2.1 Ακρίβεια (Accuracy)

Η δύσκολη ερμηνεία της έννοιας «ακρίβεια» καθιστά τον προσδιορισμό της ασαφή και γενικά όχι αποδεκτό. Γενικά, ως ακρίβεια αναφέρεται η διαφορά (σφάλμα, error ή bias) μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής (μ) η οποία γίνεται αποδεκτή ως αληθής (true) ή ορθή (correct) τιμή της μετρούμενης ποσότητας. Ακόμα, χρησιμοποιείται για τη διαφορά μεταξύ μιας τιμής (x_i) και της τιμής (μ).

Ακρίβεια, είναι δηλαδή ο βαθμός με τον οποίο ένα αποτέλεσμα δοκιμής που επιτεύχθηκε με μια συγκεκριμένη μέθοδο προσεγγίζει την αληθή τιμή. Δεν καθορίζει μια ποσότητα αλλά το βαθμό της πραγματοποίησης της θεωρητικής έννοιας του ακριβούς. Η επιτροπή Αναλυτικής Ορολογίας της IUPAC χρησιμοποιεί τον όρο “bias” ή “στατιστική μεροληψία” για να εκφράσει την ακρίβεια, όπου bias είναι ο μέσος όρος των διαφορών, λαμβάνοντας υπόψη το πρόσημο, των αποτελεσμάτων από την αληθή τιμή.

3.2.2.1.1 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα είναι το πλέον χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό επίδοσης μιας αναλυτικής μεθόδου και συχνά συσχετίζεται λανθασμένα με την ορθότητα μιας μέτρησης. Πρακτικά, αποτελεί κυρίως χαρακτηριστικό ενός οργάνου ή μιας μεθόδου μέτρησης και όχι του ίδιου του αποτελέσματος. Σύμφωνα με την IUPAC η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας (εγγύτητας) μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό ρητά καθορισμένες συνθήκες. Μετρά τη διασπορά (μη πιστότητα) των αποτελεσμάτων, όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Περιγράφει δηλαδή τους βαθμούς ελευθερίας της διαδικασίας μέτρησης από τα τυχαία σφάλματα ή το βαθμό επηρεασμού των σφαλμάτων αυτών στο τελικό αποτέλεσμα. Ο προσδιορισμός της πιστότητας γίνεται με υπολογισμό της τυπικής απόκλισης (sd) ή των συντελεστών διακύμανσης (% CV) ή της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) ή των ορίων επαναληψιμότητας/αναπαραγωγιμότητας (r,R) ή του εύρους εμπιστοσύνης CI μιας σειράς αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από ένα δείγμα υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες.

Οι μετρήσεις της πιστότητας διακρίνονται σε:

- α) μετρήσεις επαναληψιμότητας
- β) μετρήσεις ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (ίδιο εργαστήριο)
- γ) μετρήσεις διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (διαφορετικά εργαστήρια)

Επαναληψιμότητα (repeatability ή intra-run precision) είναι η πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, δηλαδή το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων (η εγγύτητα ή ο

βαθμός συμφωνίας) διαδοχικών ανεξάρτητων μετρήσεων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και τον ίδιο χρόνο ή με μικρή χρονική διαφορά. Η τιμή της θα πρέπει να είναι μικρότερη από 20% RSD ανά είδος και επίπεδο συγκέντρωσης ενώσεων (Lee W. P., 2003, European commission, Directive 96/46/EC).

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (Intermediate precision ή inter-run precision) είναι η πιστότητα υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας, δηλαδή το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα στο ίδιο εργαστήριο αλλά από διαφορετικούς αναλυτές που χρησιμοποιούν διαφορετικό εξοπλισμό κατά μια εκτεταμένη χρονική διάρκεια. Σύμφωνα με την οδηγία 96/46/EC ορίζεται ως επικύρωση της επαναληπτικότητας της ανάκτησης (Lee W. P., 2003, European commission, Directive 96/46/EC).

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility ή Inter-laboratory precision) είναι η πιστότητα υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας, δηλαδή το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα από διαφορετικά εργαστήρια με διαφορετικούς αναλυτές που χρησιμοποιούν διαφορετικό εξοπλισμό.

3.2.2.1.2 Ορθότητα (trueness)

Η ορθότητα μιας αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται ως % ποσοστό σφάλματος ή ως bias. Εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ του μέσου όρου των τιμών σειράς μεγάλου αριθμού μετρήσεων από την αληθή ή αποδεκτή τιμή και εκφράζεται από το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου.

Το συστηματικό σφάλμα διακρίνεται στο μόνιμο σφάλμα (persistent bias) και στο σφάλμα ανάλυσης (run effect). Το μόνιμο σφάλμα αναφέρεται σε διακυμάνσεις που επηρεάζουν όλο το αναλυτικό σύστημα κατά μια χρονική περίοδο, είναι σχετικά μικρό και προέρχεται από σφάλματα του εργαστηρίου, της μεθόδου και του διαφορετικού είδους δείγματος προς ανάλυση. Το σφάλμα ανάλυσης είναι μεγαλύτερο και προέρχεται από κάθε (συγκεκριμένη) ανάλυση.

Η ορθότητα μιας αναλυτικής μεθόδου προσδιορίζεται με τρεις κυρίως τρόπους:

- i. Με την ανάλυση υλικών αναφοράς (reference materials)
- ii. Με την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων υλικού (spike or surrogate) με τις αναλυτές ενώσεις.

iii. Με σύγκριση της μεθόδου με μια δεύτερη μέθοδο αναφοράς, γνωστής πιστότητας.

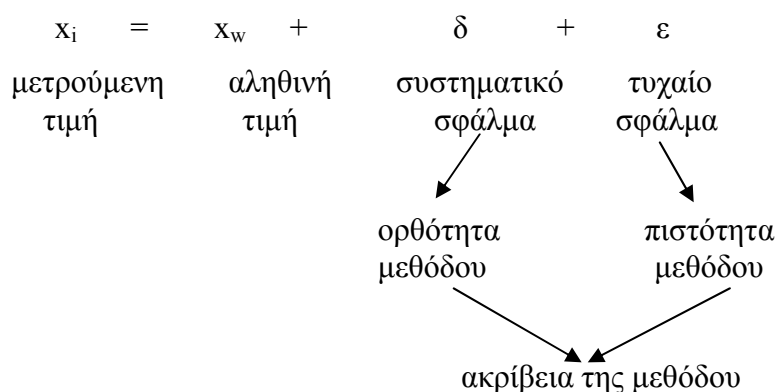
Και με τους τρεις τρόπους η ορθότητα μετρείται με μέτρηση του bias ή της % ανάκτησης των αναλυτέων ενώσεων. Εξαρτάται επομένως από την συγκέντρωση ενώ για την εκτίμησή της γίνεται ανάλυση σε τουλάχιστον τρία διαφορετικά επίπεδα αυτής. Η % ανάκτηση συγκρίνεται εν συνεχεία με αποδεκτές τιμές, π.χ. με τιμές του προγράμματος Peer Verified Methods του AOAC. Σύμφωνα με την οδηγία SANCO/825/00 (European commission, 2000) μέθοδος που αποδίδει μέση ανάκτηση ενώσεων μεταξύ 70-110%, έχει αποδεκτή ορθότητα.

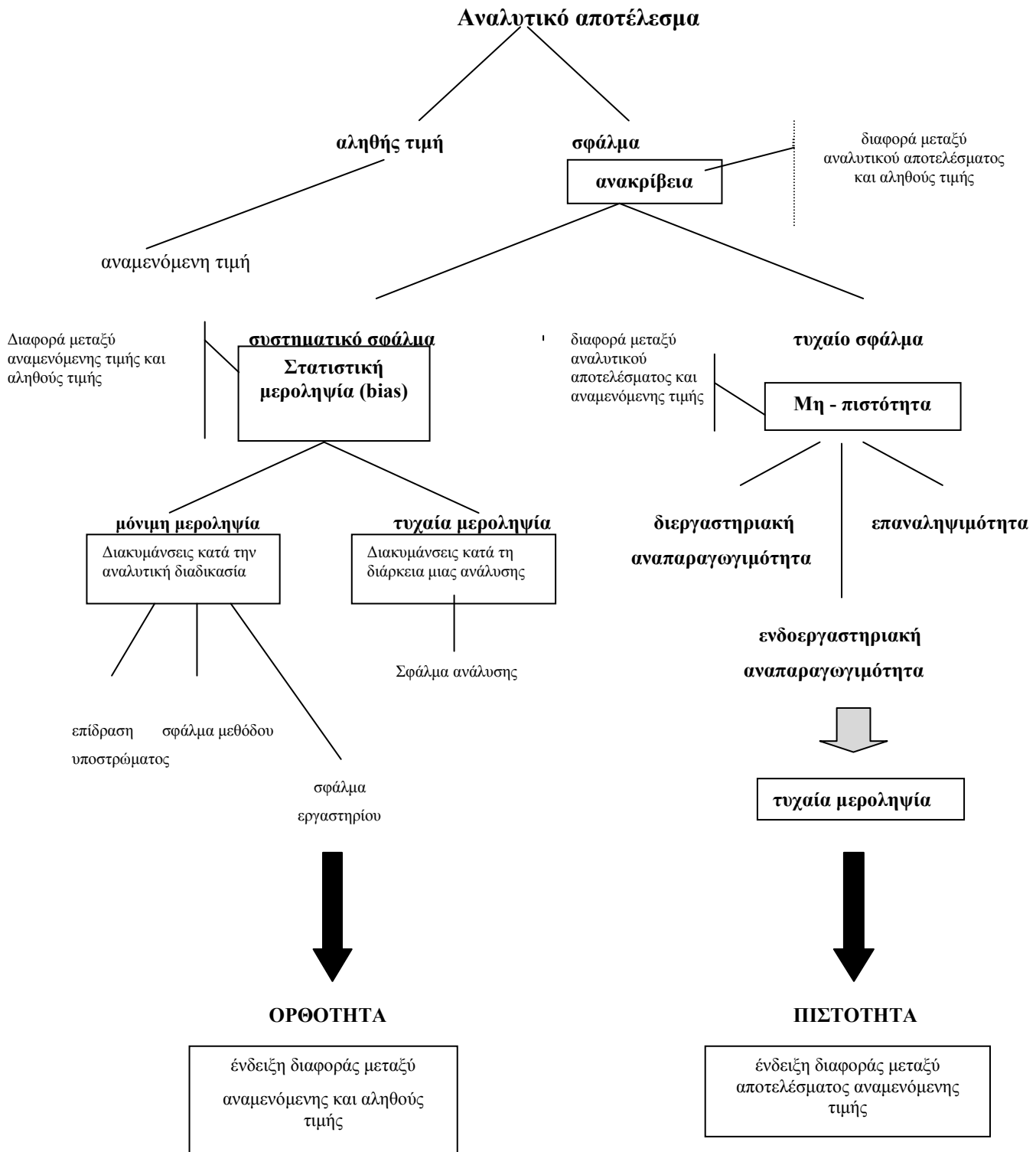


Σχήμα 3.4 Διαφοροποίηση των εννοιών ορθότητας και πιστότητας κατά τις πειραματικές μετρήσεις (Κωνσταντίνου Ι., 2005).

3.2.2.1.3 Σχέση Πιστότητας και Ορθότητας μεθόδου

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι κάθε αποτέλεσμα μιας αναλυτικής μεθόδου είναι το άθροισμα δύο όρων: ο πρώτος αναφέρεται στην αληθινή τιμή του μετρούμενου παράγοντα και ο δεύτερος στην ακρίβεια της μεθόδου η οποία προκύπτει από τον υπολογισμό των σφαλμάτων των μετρήσεων. Ισχύει η σχέση:





Σχήμα 3.5 Προέλευση των σφαλμάτων ενός αναλυτικού αποτελέσματος σε σχέση με την ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου (προσαρμογή από Taverniers I. et.al, part II, 2004).

3.2.2.2 Ανάκτηση (Recovery)

Στόχος των αναλυτικών μεθόδων είναι η εκτίμηση της αληθούς τιμής της συγκέντρωσης μιας αναλυτέας ένωσης σε ένα δείγμα. Η μεταφορά της ένωσης από το σύνθετο δείγμα στο εκχυλιζόμενο διάλυμα επιφέρει απώλεια της συγκέντρωσής του με αποτέλεσμα η προσδιοριζόμενη τιμή να είναι μικρότερη από την αληθή τιμή. Προκειμένου λοιπόν να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μιας ένωσης χρησιμοποιείται η παράμετρος ανάκτηση της μεθόδου (recovery). Υπολογίζεται με τη χρήση εμβολιασμένων με την αναλυτέα ένωση θετικών ή λευκών δειγμάτων της μεθόδου ως :το % κλάσμα $[\Delta\text{Cευρεθέν} / \Delta\text{C προστιθέμενη}]$. Η ανάκτηση της μεθόδου θα πρέπει να υπολογίζεται σε διαφορετικούς τύπους δειγμάτων, σε διαφορετικό αριθμό περιπτώσεων για κάθε δείγμα και για διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης της αναλυτέας ένωσης (σύμφωνα με Eurachem, ISO, IUPAC, AOAC International State). Συγκεκριμένα, απαιτείται ο προσδιορισμός τουλάχιστον 6 επαναλήψεων εμβολιασμένων δειγμάτων με την αναλυτέα ένωση σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης αυτής.

3.2.2.3 Εκλεκτικότητα (Selectivity) και Ειδικότητα (Specificity)

Οι όροι εκλεκτικότητα και ειδικότητα μεθόδου χρησιμοποιούνται από κάποιους ως διαφορετικοί και από άλλους ως ταυτόσημοι. Σύμφωνα με την οδηγία 96/46/EC (European commission, 2000) η ειδικότητα ορίζεται ως η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει έναν αναλύτη από άλλες ουσίες. Γενικά, ο όρος “ειδική” αναφέρεται σε μια μέθοδο η οποία προσδιορίζει μια μόνο αναλυτέα ένωση ενώ ο όρος “εκλεκτική” αναφέρεται στη μέθοδο η οποία προσδιορίζει διαφορετικές ενώσεις ταυτόχρονα διαχωρίζοντας τη μια από την άλλη. Δηλαδή η απόκριση της μεθόδου σε μια ένωση είναι ξεχωριστή από όλες τις αποκρίσεις όλων των άλλων ενώσεων.

Επομένως, με τη χρήση μια πλήρως ειδικής μεθόδου για μια αναλυτέα ένωση, η συγκέντρωσή της μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια, ασχέτως της παρουσίας άλλων ουσιών στο δείγμα (η μέθοδος δεν δίνει απόκριση για άλλο χαρακτηριστικό, εκτός του αναλυόμενου στοιχείου). Μια μέθοδος ονομάζεται πλήρως εκλεκτική, εάν παρέχει ακριβή αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μίγματος χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Σύμφωνα με την Eurachem, ειδικότητα σημαίνει πλήρη εκλεκτικότητα, δηλαδή μια μέθοδος μπορεί να είναι ειδική εάν είναι πλήρως εκλεκτική.

Ο προσδιορισμός της ειδικότητας μεθόδου, μπορεί να γίνει:

α) υπολογίζοντας την % ανάκτηση ενός αναλύτη σε εμβολιασμένα δείγματα με συγκέντρωση του αναλύτη και ενώσεων που πιθανώς να παρεμποδίζουν κατάλληλα τον προσδιορισμό (δηλαδή ουσίες με παραπλήσιες φυσικοχημικές με τον αναλύτη ιδιότητες που βρίσκονται στο δείγμα) – IUPAC

β) αναλύοντας τυφλά δείγματα αντιπροσωπευτικών δειγμάτων και οι τυχόν αποκρίσεις δεν θα πρέπει να είναι μεγαλύτερες από το 30% της απόκρισης του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

3.2.2.4 Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

Κατά τον προσδιορισμό ενός αναλύτη με μια μέθοδο, που περιέχεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση σε ένα δείγμα, το αναλυτικό σήμα θα είναι πολύ μικρό. Είναι λοιπόν δύσκολο να αποφασιστεί εάν αυτό το σήμα προέρχεται από τον αναλύτη ή από τον θόρυβο (σήμα υποβάθρου) που προκαλείται από τη μέθοδο ή το όργανο. Έτσι, σε ελέγχους προσδιορισμού του ρίσκου για την ανθρώπινη υγεία από την κατανάλωση τροφίμων που μπορεί να περιέχουν φυτοφάρμακα είναι κρίσιμη η ερώτηση εάν το τρόφιμο χαρακτηρίζεται ως μη ανιχνεύσιμο (not detectable) φυτοφάρμακων. Ή εάν ο αναλύτης δεν ανιχνεύεται από το όργανο ανάλυσης σημαίνει ότι δεν περιέχεται στο αναλυόμενο δείγμα τροφίμου; Ή μήπως σημαίνει ότι περιέχεται στο δείγμα αλλά σε συγκέντρωση χαμηλότερη από την ικανότητα προσδιορισμού του οργάνου; Ή περιέχεται σε συγκέντρωση μεταξύ των ανωτέρω ορίων; Όλοι αυτοί οι προβληματισμοί έθεσαν την ανάγκη θέσπισης σαφών ορισμών των ορίων ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) ενός αναλύτη με μια μέθοδο.

Έχουν διατυπωθεί αρκετοί διαφορετικοί όροι και ορισμοί για τον προσδιορισμό της ανιχνευσιμότητας μιας μεθόδου. Η Eurachem χρησιμοποιεί τον όρο “όριο ανίχνευσης”, ο ISO τον όρο “ελάχιστη ανιχνεύσιμη καθαρή συγκέντρωση”, ενώ η IUPAC “ελάχιστη ανιχνεύσιμη τιμή (ορθή)”. Γενικά, ως **όριο ανίχνευσης** ορίζεται η χαμηλότερη ποσότητα ενός αναλύτη σε ένα δείγμα που μπορεί να ανιχνευτεί με ακρίβεια αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί. Ο προσδιορισμός των διάφορων ορισμών της ανιχνευσιμότητας πρέπει να λαμβάνει υπόψη ορισμένους παραμέτρους, όπως:

- το σήμα υποβάθρου ή θόρυβο
- την επίδραση της μήτρας του δείγματος και των προσμίξεων
- τη μεταβλητότητα των διαδικασιών εκχύλισης των ενώσεων

Στις σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους, το όριο ανίχνευσης μπορεί να διακριθεί στο **όριο ανίχνευσης οργάνου** (IDL: instrument detection limit) και στο **όριο ανίχνευσης μεθόδου** (MDL: method detection limit).

Τα αναλυτικά όργανα (αέριος χρωματογράφος, υγρός χρωματογράφος, φασματογράφος μάζας, κλπ) έχουν ορισμένη ικανότητα προσδιορισμού της ποσότητας ενός αναλύτη, που ορίζεται από το όριο ανίχνευσης οργάνου ως η χαμηλότερη ποσότητα ενός αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί με αξιοπιστία ή να διαχωριστεί από το σήμα υποβάθρου του οργάνου. Ανάλογα ορίζεται το όριο ποσοτικοποίησης οργάνου ως η χαμηλότερη ποσότητα ενός αναλύτη που μπορεί να μετρηθεί με αξιοπιστία από το όργανο.

Κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων (φυτικών ή ζωικών ιστών, εδάφους, νερού, κλπ) για τον ορισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης πρέπει να ληφθεί υπόψη η επίδραση της μήτρας του δείγματος μιας και αυτό αποτελείται από εκατοντάδες ή χιλιάδες συστατικά που αλληλεπιδρούν με τον αναλύτη και επηρεάζουν την ανίχνευση και ποσοτικοποίησή του. Τα συστατικά του δείγματος μπορεί:

- i. να εκτελούνται στον ίδιο χρόνο με τον αναλύτη (GC, HPLC) ή να απορροφούν ή να εκπέμπουν στο ίδιο μήκος κύματος
- ii. να αυξάνουν ή να εξαφανίζουν το σήμα του αναλύτη
- iii. να καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει ο αναλύτης, κ.α.

Παρόλο που οι μέθοδοι εκχύλισης συμπεριλαμβάνουν στάδια καθαρισμού του εκχυλιζόμενου δείγματος από τις προσμίξεις δεν είναι δυνατός ο πλήρης περιορισμός τους. Έτσι, αυτές οι επιδράσεις του δείγματος λαμβάνονται υπόψη στον καθορισμό της ανιχνευσιμότητας θεσπίζοντας όρους ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου.

Όριο ανίχνευσης μεθόδου είναι η μικρότερη ποσότητα αναλύτη που μπορεί να ανιχνευτεί ή να διαχωριστεί με αξιοπιστία από το υπόβαθρο (θόρυβο) ενός συγκεκριμένου δείγματος με μια ειδική μέθοδο, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις επιδράσεις. Ως όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίζεται η μικρότερη ποσότητα του αναλύτη που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ορισμένο βαθμό αξιοπιστίας σε συγκεκριμένο δείγμα με μια ειδική μέθοδο. Σύμφωνα με τον ορισμό (οδηγία 96/46/EC) ως όριο προσδιορισμού ή ποσοτικοποίησης ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αναλύτη που υπολογίζεται με αποδεκτή μέση τιμή ανάκτησης (70-110%) και αποδεκτή σχετική τυπική απόκλιση (<20%).

Η ποικιλία των ορισμών και των κριτηρίων αποδοχής ανιχνευσιμότητας καθώς και η αναγκαιότητα εξαγωγής αξιόπιστων αναλυτικών αποτελεσμάτων θέτει σημαίνουσα την αναφορά ομοιόμορφων ορισμών ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση τιμών δεδομένων μεταξύ δειγμάτων, μεθόδων και εργαστηρίων.

Οι μέθοδοι καθορισμού των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που ισχύουν εως σήμερα, συνοψίζονται ως εξής:

- (1) Μέθοδος της IUPAC
- (2) Μέθοδος πολλαπλασιασμού σφαλμάτων
- (3) Μέθοδος των Hubaux – Vos
- (4) Μέθοδος δύο σταδίων (US EPA)
- (5) Μέθοδος RMSE
- (6) Μέθοδος $t_{99} S_{LLMV}$

(Lee W. P., 2003).

Η μέθοδος δύο σταδίων (US EPA) εμπεριέχει τα εξής στάδια για τον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου:

- i. Προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου και χρήση αυτών για την εκτίμηση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.
 - ii. Υπολογισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για την εκχύλιση/ανάλυση πραγματικού δείγματος.
- Ο προσδιορισμός των IDL και IQL πραγματοποιείται κυρίως με τους εξής δύο τρόπους:
 - α) Μέτρηση του θορύβου γύρω από το χρόνο κατακράτησης του αναλύτη (N_p-p : peak-to-peak noise) και εκτίμηση της συγκέντρωσής του στο δείγμα η οποία να εμφανίσει σήμα ίσο με $3*N_p-p$. Η συγκέντρωση αυτή θα είναι το εκτιμώμενο MDL.
 - β) Ένας περισσότερο αξιόπιστος τρόπος εκτίμησης του MDL περιλαμβάνει τα εξής βήματα:
 - Ανάλυση 5 τουλάχιστον εκχυλισμάτων τυφλών δειγμάτων.
 - Υπολογισμός του N_p-p για κάθενα εκχύλισμα.
 - Υπολογισμός του μέσου όρου των τιμών N_p-p .
 - Υπολογισμός της συγκέντρωσης αναλύτη σε διάλυμα που θα παρείχε σήμα εμβαδού ίσου με $3*N_p-p$ (λαμβάνοντας υπόψη τις απώλειες συγκέντρωσης κατά την εκχύλιση).
 - Εκτίμηση της τελικής τιμής του MDL υπολογίζοντας το ποσό του αναλύτη στο δείγμα που απαιτείται για να δώσει σήμα ίσο με $3*N_p-p$.
 - Κατά το δεύτερο στάδιο της μεθόδου πραγματοποιείται ο υπολογισμός των τιμών των MDL και MQL, σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα:
 - Ζυγίζονται τουλάχιστον 7 δείγματα του προς ανάλυση υλικού σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου.
 - Πραγματοποιείται εκτίμηση του LOQ σύμφωνα με το πρώτο στάδιο της μεθόδου.

- Τα δείγματα εμβολιάζονται με τον αναλύτη με κατάλληλη ποσότητα ώστε η συγκέντρωσή του στο υλικό να είναι ίση με το εκτιμώμενο LOQ (ELOQ).
- Ακολουθεί εκχύλιση των εμβολιασμένων δειγμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της μεθόδου.
- Τα εκχυλιζόμενα δείγματα αναλύονται σύμφωνα με τη μέθοδο.
- Προσδιορίζεται η ποσότητα του αναλύτη σε κάθε εμβολιασμένο δείγμα.
- Υπολογίζεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων (S_{ELOQ})
- Προσδιορίζεται η τιμή της παραμέτρου t για $n-1$ βαθμούς ελευθερίας και σε επίπεδο εμπιστοσύνης 99% ($t_{99(n-1)}$)
- Η τιμή MDL ορίζεται ως:

$$MDL = t_{99(n-1)} \cdot S_{ELOQ} \quad (t_{99(n-1)} = 3.143, \text{ για } 7 \text{ επαναλήψεις εμβολιασμένων δειγμάτων})$$

Αντίστοιχα, ορίζεται $MQL = 3 * MDL$

Στο τέλος προκειμένου να επικυρωθεί ο υπολογισμός του MDL, πραγματοποιείται εκχύλιση και ανάλυση 3 τουλάχιστον εμβολιασμένων δειγμάτων σε συγκέντρωση αναλύτη ίση με την τιμή MDL (Lee W. P., 2003).

3.2.2.5 Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα αναφέρεται στο εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων στο οποίο χρησιμοποιείται η αναλυτική μέθοδος. Μπορεί να προσδιοριστεί ως εξής:

- a) Με αραιώσεις ενός πρότυπου διαλύματος παρακαταθήκης απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία.
- b) Με διαδοχικές αυξανόμενες ενισχύσεις (spiking) λευκού δείγματος και εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου.

Τα αποτελέσματα ελέγχου της γραμμικότητας αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους κυρίως με υπολογισμό της ευθείας παλινδρόμησης ή συμμεταβολής (linear regression), με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (least squares). Δημιουργούνται επίσης διαγράμματα των αναλυτικών σημάτων ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του αναλύτη.

Οι παράμετροι ελέγχου γραμμικότητας περιλαμβάνουν: το συντελεστή συσχέτισης r (correlation coefficient), το τετράγωνο αυτού r^2 , την τομή στον άξονα των y ($y - \text{intercept}$), την κλίση της ευθείας συμμεταβολής (slope), το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων (residual sum of squares) ή την τυπική απόκλιση των υπολοίπων. Πρακτικά, δείγματα υλικού εμβολιάζονται με κατάλληλη ποσότητα του αναλύτη ώστε να προκύψουν εκχυλιζόμενα

δείγματα πέντε επιπέδων συγκέντρωσης. Τα δείγματα αναλύονται τουλάχιστον σε τρεις επαναλήψεις για κάθε συγκέντρωση (Κωνσταντίνου Ι., 2005).

3.2.2.6 Ευαισθησία (Sensitivity)

Ευαισθησία μεθόδου είναι η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει μικρές διαφορές συγκέντρωσης μάζας του αναλύτη. Πρακτικά είναι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης. Μια μέθοδος χαρακτηρίζεται ευαίσθητη όταν μικρές αλλαγές συγκέντρωσης ποσότητας αναλύτη προκαλούν μεγάλες αλλαγές μετρούμενης απόκρισης (signal). Αρκετές φορές γίνεται σύγκριση μεταξύ των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και της ευαισθησίας της μεθόδου. Όταν μια μέθοδος είναι ικανή να ανιχνεύει (προσδιορίζει) χαμηλές συγκεντρώσεις (ποσότητες) ενός αναλύτη δεν σημαίνει ότι είναι ευαίσθητη αλλά ότι η μέθοδος έχει υψηλή ανιχνευσιμότητα ή ότι το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι πολύ χαμηλό.

3.2.2.7 Αντοχή (Ruggedness) και Ανθεκτικότητα (Robustness)

Αντοχή μεθόδου είναι η πιστότητα της μεθόδου όταν τα δείγματα αναλύονται μεν κάτω από κανονικές συνθήκες αλλά με την πραγματοποίηση μικρών αλλαγών στις συνθήκες περιβάλλοντος ή/και χειρισμών (διαφορετικά εργαστήρια, όργανα, αντιδραστήρια, θερμοκρασία, χρόνος, κ.α.).

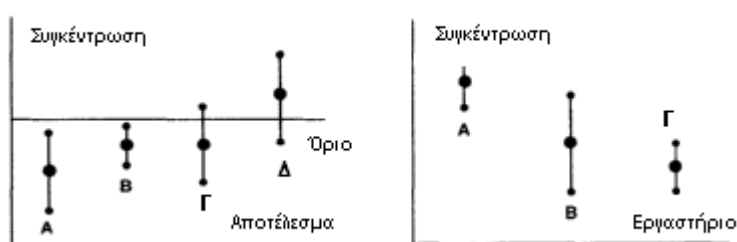
Από την άλλη, η ανθεκτικότητα μεθόδου εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα ή να παραμένει ανεπηρέαστη κάτω από προσχεδιασμένες μικρές μεταβολές των πειραματικών συνθηκών. Αποτελεί δηλαδή, έναν δείκτη αξιοπιστίας της μεθόδου όταν αυτή χρησιμοποιείται σε αναλύσεις ρουτίνας. Αυτό το κριτήριο επίδοσης χρησιμοποιείται μόνο από τους οργανισμούς USP και ICH (Lee W. P., 2003).

3.2 Αβεβαιότητα μέτρησης

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής μιας αναλυτικής μεθοδολογίας συχνά αποτελούν πληροφορία που χρησιμοποιείται στη λήψη σημαντικών αποφάσεων. Όπως αναφέραμε στην ενότητα 2, για να είναι τα αποτελέσματα αξιόπιστα και συγκρίσιμα θα πρέπει να αναπτυχθεί η επικύρωση της μεθόδου. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό (κριτήριο επίδοσης) της επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου αποτελεί η αβεβαιότητα μέτρησης. Σύμφωνα με τον ορισμό έκφρασης της αβεβαιότητας στη μέτρηση (Guide to the expression of uncertainty in measurement, GUM – 1993) η **αβεβαιότητα** ορίζεται ως: “μια παράμετρος που συσχετίζεται άμεσα με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης, η οποία χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που

λογικά μπορούν να αποδοθούν στο είδος προς μέτρηση”. Ένας παρόμοιος οδηγός για εφαρμογή στην αναλυτική χημεία (GUAM) εκδόθηκε το 1995. Η παράμετρος αυτή μπορεί να είναι η τυπική απόκλιση ή το εύρος του ορίου εμπιστοσύνης. Το όριο εμπιστοσύνης αντιπροσωπεύει ένα διάστημα τιμών στο οποίο βρίσκεται η αληθή τιμή μιας μέτρησης με μια συγκεκριμένη πιθανότητα λαμβάνοντας υπόψη όλες τις τιμές σφάλματος (Taverniers I. et.al, part I, 2004).

Στο σχήμα 3.6 (Meyer V. R, 2007) αναπαρίσταται η σημασία της χρήσης της αβεβαιότητας μέτρησης κατά την εξέταση της καταλληλότητας ενός τροφίμου σχετικά με την συγκέντρωσή του σε ένα φυτοφάρμακο. Τα αποτελέσματα A και B βρίσκονται κάτω από το όριο της μέγιστης επιτρεπόμενης συγκέντρωσης του φυτοφαρμάκου. Η μέση τιμή του αποτελέσματος Γ βρίσκεται επίσης κάτω από του ορίου αλλά υπάρχει σοβαρή πιθανότητα υπέρβασης του εξαιτίας της αβεβαιότητας της μέτρησης. Επομένως το δείγμα τροφίμου Γ θα πρέπει να απορριφθεί. Σύμφωνα με τη μέτρηση Δ, το δείγμα το δείγμα τροφίμου στο οποίο αντιστοιχεί θα πρέπει επίσης να απορριφθεί ακόμα και αν υπάρχει μικρή πιθανότητα το όριο απόρριψης να μην ξεπεραστεί.



Σχήμα 3.6 Η σημασία της αβεβαιότητας στις πειραματικές μετρήσεις.

Η γνώση της αβεβαιότητας, λοιπόν, υποδηλώνει αυξημένη εμπιστοσύνη για την εγκυρότητα ενός μετρούμενου αποτελέσματος.

Είναι αναγκαίο όμως να αναφερθούμε στη σχέση και τη διάκριση των εννοιών σφάλμα και αβεβαιότητα μέτρησης. Το **σφάλμα** αναφέρεται σε μεμονωμένο αναλυτικό αποτέλεσμα, είναι πάντοτε μια αριθμητική τιμή και ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ του αποτελέσματος και της πραγματικής τιμής του είδους προς μέτρηση. Το σφάλμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διόρθωση του αποτελέσματος (συστηματικό σφάλμα). Η **αβεβαιότητα μέτρησης** αναφέρεται στην αναλυτική μεθοδολογία και σε συγκεκριμένο είδος δείγματος αλλά και σε διαφορετικά αποτελέσματα μέτρησης, ενώ δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διόρθωση των αποτελεσμάτων. Ορίζεται ως το εύρος τιμών γύρω από το τελικό αποτέλεσμα μέσα στο

οποίο πιστεύεται ότι βρίσκεται η αληθινή τιμή του είδους προς μέτρηση. Καλύπτει όλες τις πηγές σφαλμάτων που σχετίζονται με τα επίπεδα συγκέντρωσης του αναλύτη καλύπτοντας όλο το σύστημα της διασφάλισης ποιότητας (καταλληλότητα μεθόδου, ποιοτικός έλεγχος). Η αβεβαιότητα μέτρησης μιας αναλυτικής διαδικασίας να μεν προέρχεται από το σφάλμα ενός αναλυτικού αποτελέσματος, αλλά είναι διαφορετική από αυτό. Η απόκλιση ενός μετρούμενου αποτελέσματος από την πραγματική τιμή αποδίδεται σε έναν αριθμό συστηματικών και τυχαίων σφαλμάτων. Κάθε ένα συστατικό του συνολικού σφάλματος προσθέτει τη δική του αβεβαιότητα στη συνολική αβεβαιότητα της αναλυτικής διαδικασίας. Έτσι, αυτά τα διαφορετικά συστατικά σφάλματος αναφέρονται ως πηγές της αβεβαιότητας οι οποίες ποικίλουν προερχόμενες από τον ανθρώπινο παράγοντα και τον εξοπλισμό που χρησιμοποιείται για την ανάλυση.

Πίνακας 3.2 Πιθανές πηγές αβεβαιότητας μέτρησης ενός αναλυτικού αποτελέσματος.

Πηγές αβεβαιότητας	
Ανθρώπινοι παράγοντες	Παράγοντες που προέρχονται από τον εξοπλισμό
Λανθασμένος ή μη ακριβής καθορισμός μετρούμενης τιμής	Εγγενής αβεβαιότητα των προτύπων και/ή των υλικών αναφοράς
Μη αντιπροσωπευτικό δείγμα	Αβεβαιότητα παραμέτρων υπολογισμού του τελικού αποτελέσματος, π.χ. φυσικοχημικών σταθερών
Λανθασμένη εφαρμογή της αναλυτικής διαδικασίας	Προσεγγίσεις και υποθέσεις κατά τη διάρκεια της ανάλυσης σχετικά με τη χρήση ενός συγκεκριμένου οργάνου
Συστηματικό σφάλμα ανάγνωσης εξαγωγίμων αποτελεσμάτων	Παλινδρομήσεις μεταξύ επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ταυτόσημων εξωτερικών συνθηκών
Άγνοια όλων των εξωτερικών παραγόντων που επηρεάζουν το αναλυτικό αποτέλεσμα	
Αβεβαιότητα προερχόμενη από την βαθμονόμηση των οργάνων μέτρησης	

Για την εκτίμηση της συνολικής αβεβαιότητας μέτρησης γίνεται εκτίμηση της αβεβαιότητας κάθε πηγής συνυπολογίζοντας τη συνεισφορά κάθε συστατικού σφάλματος σ' αυτήν.

Είναι φανερό λοιπόν ότι η έννοια της αβεβαιότητας μέτρησης δεν υπόκειται σε ορισμούς αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες μέτρησης και το σημείο αναφοράς

στο οποίο ένα αποτέλεσμα είναι ιχνηλάσιμο. Παρόλα αυτά για την έκφραση της αβεβαιότητας αναλυτικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται κοινοί όροι οι οποίοι αναφέρονται στον πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3 Όροι που χρησιμοποιούνται κατά την εκτίμηση της αβεβαιότητας αναλυτικών μετρήσεων.

Όρος	Σύντομη ερμηνεία	Σύμβολο
Αβεβαιότητα μέτρησης	Μια μη αρνητική παράμετρος που χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών μιας ποσότητας και σχετίζεται με το είδος προς μέτρηση.	u
Οριζόμενη αβεβαιότητα	Συστατικό της αβεβαιότητας μέτρησης που προέρχεται από το σύνολο των λεπτομερειών που ορίζουν το μετρούμενο είδος.	-
Τυπική αβεβαιότητα	Η αβεβαιότητα του αποτελέσματος x_i μιας μέτρησης εκφραζόμενη ως τυπική απόκλιση.	$u_{(x_i)}$
Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα	Το σύνολο των ξεχωριστών τυπικών αβεβαιοτήτων που προέρχονται από κάθε μετρούμενη ποσότητα του συνολικού πειραματικού σχεδιασμού.	$u_{C(y)}$
Εκτεταμένη αβεβαιότητα	Πολλαπλάσιο μέγεθος της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας κατά έναν παράγοντα μεγαλύτερο της μονάδας.	U
Παράγοντας κάλυψης	Ένας αριθμός μεγαλύτερος της μονάδας. Συνήθως είναι 2 ή 3 π.χ. στο επίπεδο εμπιστοσύνης 95% έχει την τιμή 2.	k
Σχετική αβεβαιότητα	Η τυπική αβεβαιότητα διηρημένη με την απόλυτη τιμή της μετρούμενης ποσότητας.	$u_{r(x_i)}$
Πλαίσιο αβεβαιότητας	Το πλαίσιο που περιλαμβάνει την αβεβαιότητα μέτρησης, τα συστατικά της αβεβαιότητας μέτρησης και το συνδυασμό τους καθώς και τον υπολογισμό της.	-

Κάθε αναλυτικό αποτέλεσμα σχετίζεται με μια αβεβαιότητα και θα πρέπει να εκφράζεται μαζί με αυτή. Για παράδειγμα, η ορθή παρουσίαση ενός αναλυτικού αποτελέσματος είναι:

$$C_{PCB-28} \pm U_{(k=2)} = 31.3 \pm 2.7 \text{ ng/g}$$

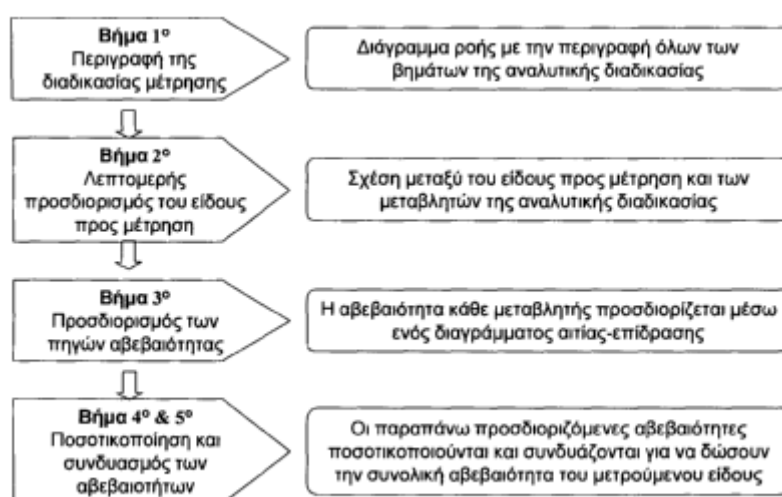
όπου C_{PCB-28} είναι η συγκέντρωση αναλύτη υπολογιζόμενη ως η μέση τιμή μιας σειράς παράλληλων προσδιορισμών, U είναι η εκτεταμένη αβεβαιότητα μέτρησης και κ ο παράγοντας κάλυψης (κ=2, για p=95%) (Konieczka P., 2009).

3.2.1 Εκτίμηση της αβεβαιότητας

Η γενική διαδικασία προσέγγισης της αβεβαιότητας μέτρησης θα πρέπει να ακολουθεί τις ακόλουθες συνθήκες σύμφωνα με τον οδηγό GUM:

- (1) Προσδιορισμός της διαδικασίας και του είδους προς μέτρηση.
- (2) Προσομοίωση (συνήθως με μαθηματικό μοντέλο) του υπολογισμού των αναλυτικών αποτελεσμάτων με βάση τις παραμέτρους της μέτρησης.
- (3) Προσδιορισμός της τυπικής αβεβαιότητας όλων των πιθανών πηγών σφάλματος της μέτρησης.
- (4) Υπολογισμός της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας των αναλυτικών αποτελεσμάτων (χρήση πολ/σμού αβεβαιοτήτων).
- (5) Παρουσίαση των αποτελεσμάτων υπό τη μορφή αποτέλεσμα \pm εκτεταμένη αβεβαιότητα.

Οι ενέργειες της εκτίμησης της αβεβαιότητας μέτρησης που διενεργούνται αναπαρίστανται κατά γενικό τρόπο στο γράφημα.



Σχήμα 3.7 Γενική προσέγγιση της αβεβαιότητας μέτρησης (Spack L., 2002).

Ανάλογα με τις διαθέσιμες πληροφορίες αλλά και το σκοπό εκτίμησης της αβεβαιότητας μέτρησης επιλέγεται ο κατάλληλος τρόπος προσέγγισής της.

Οι βασικές προσεγγίσεις (Taverniers I. et.al, part I, 2004, Konieczka P., 2009) περιλαμβάνουν:

A. Προσέγγιση «από κάτω προς τα πάνω» (bottom – up approach)

Ο προσδιορισμός της αβεβαιότητας μέτρησης βασίζεται στην αναγνώριση, εκτίμηση και συνδυασμό όλων των πιθανών πηγών αβεβαιότητας που σχετίζονται με τη μέτρηση. Η

συνολική αβεβαιότητα προέρχεται από αβεβαιότητες των επιμέρους συστατικών της, γεγονός στο οποίο οφείλεται το όνομα της προσέγγισης αυτής. Τα βασικά βήματα υπολογισμού της αβεβαιότητας περιλαμβάνουν:

- i. Προσδιορισμό, όπου γίνεται η προσομοίωση της διαδικασίας μέτρησης.
- ii. Αναγνώριση, όπου πραγματοποιείται η αναγνώριση των πηγών αβεβαιότητας.
- iii. Ποσοτικοποίηση, όπου γίνεται ο υπολογισμός της αβεβαιότητας .
- iv. Συνδυασμός, όπου γίνεται υπολογισμός της εκτεταμένης αβεβαιότητας.

Αυτό το είδος της βήμα – προς – βήμα προσέγγισης της αβεβαιότητας αναπτύχθηκε αρχικά για φυσικές μετρήσεις και προσαρμόστηκε στην αναλυτική χημεία από την Eurachem ενώ θεωρείται ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία απαιτώντας χρόνο και εργασία.

B. Προσέγγιση «καταλληλότητας» (Fitness – For – Purpose)

Βασίζεται στον προσδιορισμό μιας παραμέτρου που ονομάζεται “συνάρτηση καταλληλότητας”. Αυτή η συνάρτηση έχει τη μορφή μιας αλγεβρικής έκφρασης, $u=f(c)$, η οποία περιγράφει τη σχέση μεταξύ της μέτρησης αβεβαιότητας και της συγκέντρωσης ενός αναλύτη. Έτσι, ο υπολογισμός της αβεβαιότητας μέτρησης προκύπτει από υπολογισμό κριτηρίων ποιότητας της μεθόδου π.χ. επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα, σφάλμα. Πρόκειται κατ' ουσία για μια απλοποιημένη προσέγγιση εν σχέση με την προσέγγιση “από κάτω προς τα πάνω”.

Γ. Προσέγγιση «από πάνω προς τα κάτω» (top – down approach)

Ο υπολογισμός της αβεβαιότητας μέτρησης γίνεται με τη χρήση πληροφοριών από διαφορετικά εργαστήρια τα οποία ελέγχουν και εφαρμόζουν την ίδια μέθοδο. Επομένως, τα σφάλματα που οφείλονται στο εργαστήριο και στη σειρά μετρήσεων (συστηματικό σφάλμα) θα αποτελούν τώρα τυχαίες μεταβλητές και η διακύμανσή τους θα συνεισφέρει στην εκτιμώμενη αβεβαιότητα. Η προσέγγιση αυτή υιοθετείται από την επιτροπή αναλυτικών μεθόδων (Analytical Methods Committee).

Δ. Προσέγγιση βασιζόμενη στη διαδικασία επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου.

Γίνεται εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης από τις μελέτες ενδό ή/και διεργαστηριακής επικύρωσης της μεθόδου, δηλαδή από δεδομένα προσδιορισμού κριτηρίων ποιότητας, ελέγχου προόδου ή διασφάλισης ποιότητας. Μ' αυτόν τον τρόπο εκτιμάται επίσης η αβεβαιότητα μελλοντικών αποτελεσμάτων μετρήσεων. Βασικό πλεονέκτημα της προσέγγισης αποτελεί ο ταυτόχρονος προσδιορισμός της αβεβαιότητας κατά την υποχρεωτική μελέτη επικύρωσης της μεθόδου, αποτελώντας έτσι φυσική προέκταση των μελετών αυτών.

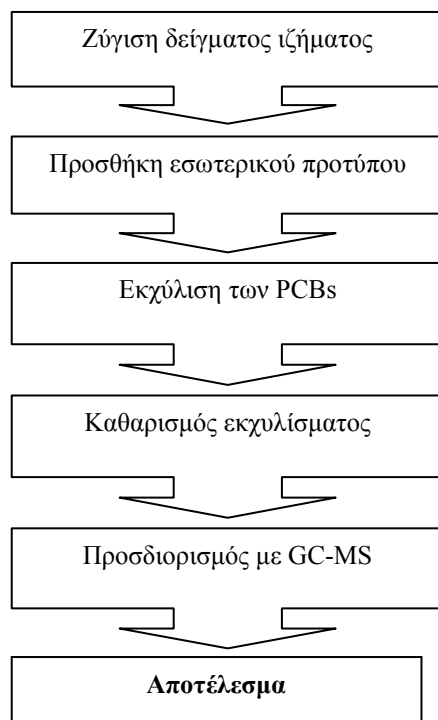
Ε. Προσέγγιση βασιζόμενη στην ανθεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου

Βασίζεται στη μελέτη ανθεκτικότητας και προέρχεται από ενδοεργαστηριακή προσομοίωση των διεργαστηριακών μελετών.

Οποιαδήποτε προσέγγιση εκτίμησης της αβεβαιότητας μέτρησης και να χρησιμοποιηθεί είναι αναγκαία προηγουμένως η κατανόηση της ακριβούς αναλυτικής διαδικασίας (Standard Operation Procedure, SOP). Κατάλληλα εργαλεία της αβεβαιότητας μέτρησης εξαγάγουν τα συστατικά της αβεβαιότητας από την αναλυτική διαδικασία. Αυτά περιλαμβάνουν:

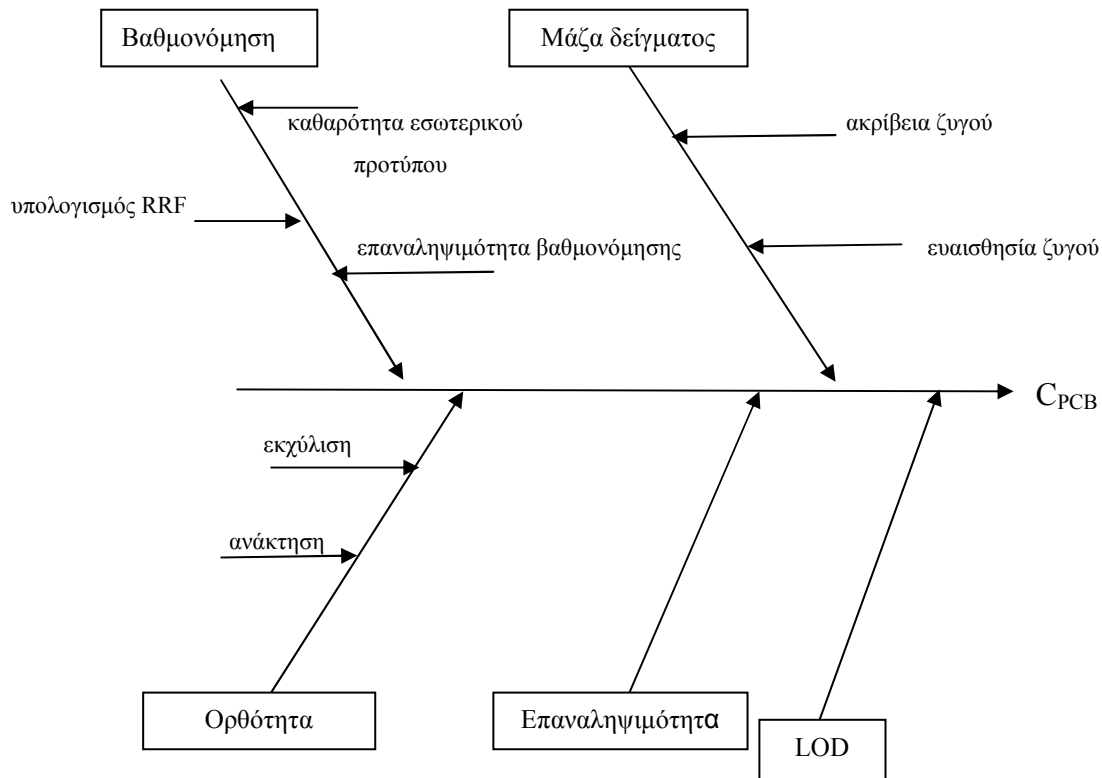
i. Διάγραμμα ροής (Flow diagram)

Σ' αυτό αναγράφονται όλα τα στάδια της αναλυτικής μεθόδου. Στο γράφημα 3.8 αναπαρίσταται το διάγραμμα ροής της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό PCB' s σε δείγματα ιζημάτων (Konieczka P., 2009).



Σχήμα 3.8 Διάγραμμα ροής της διαδικασίας προσδιορισμού PCBs σε ιζήματα

ii. Διάγραμμα Ishikawa ή διάγραμμα «αιτία και αποτέλεσμα» ή διάγραμμα «ψαροκόκαλο»
 Αναγνωρίζει τις παραμέτρους (πηγές αβεβαιότητας) που επηρεάζουν ολόκληρη την αναλυτική διαδικασία της μεθόδου.



Σχήμα 3.9 Διάγραμμα Ishikawa για τον προσδιορισμό PCBs σε ιζήματα (Konieczka P., 2009).

iii. Τυπική απόκλιση

$$S_{(x)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{εξ. 3.1})$$

iv. Υπολογισμός συνδυασμένης αβεβαιότητας

$$u_c(M) = \sqrt{\sum_{i=1}^n u^2(x_i)} \quad (\text{εξ. 3.2})$$

v. Εκτεταμένη αβεβαιότητα

$$U(M) = u_c(M) * k \quad (\text{εξ. 3.3})$$

Ο παράγοντας κάλυψης, k, εξαρτάται από τον αριθμό των πειραμάτων για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας.

3.2.2 Συστατικά (κύριες πηγές) αβεβαιότητας αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούν χρωματογραφικές αναλύσεις.

Τα κύρια συστατικά που συνεισφέρουν στην αβεβαιότητα μέτρησης μιας αναλυτικής μεθόδου, στην οποία γίνεται χρήση χρωματογραφικής ανάλυσης (Konieczka P., 2009), είναι:

- i. Η ποσότητα δείγματος για τον προσδιορισμό.
- ii. Η τιμή ανάκτησης της αναλυτικής διαδικασίας.
- iii. Η επαναληψιμότητα των προσδιορισμών των πραγματικών δειγμάτων ανάλυσης (επαναληψιμότητα των σημάτων).
- iv. Η σχέση συγκέντρωσης αναλύτη και ανωτάτου ορίου ανίχνευσης.
- v. Η βαθμονόμηση των χρωματογραφικών οργάνων.

3.2.2.1 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με την ποσότητα δείγματος

Η συνεισφορά της αβεβαιότητας που προέρχεται από τη μέτρηση του βάρους ή του όγκου ενός δείγματος είναι μικρή και συνήθως δεν λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό της διαδικασίας συνολικής αβεβαιότητας.

3.2.2.2 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με την ανάκτηση μεθόδου (ορθότητα)

Η ανάκτηση μεθόδου, δηλαδή ο λόγος της προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης αναλύτη ως προς μια τιμή αναφοράς, συχνά χρησιμοποιείται για τη διόρθωση της προσδιοριζόμενης τιμής. Έτσι, οι αβεβαιότητες όλων των συστατικών που λαμβάνουν μέρος στον υπολογισμό της ανάκτησης θα συνεισφέρουν στη διακύμανση του τελικού αποτελέσματος. Εκτενής αναφορά αυτού του είδους αβεβαιότητας θα πραγματοποιηθεί στις επόμενες ενότητες.

3.2.2.3 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με την επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων πραγματικών δειγμάτων αποτελεί συχνά σημαντικό συστατικό της συνολικής αβεβαιότητας μιας μέτρησης και η εκτεταμένη αβεβαιότητα της μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση

$$u_{(\text{επαν})} = k \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (\text{εξ. 3.4})$$

όπου SD η τυπική απόκλιση n μετρήσεων πραγματικού δείγματος.

3.2.2.4 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με το όριο ανίχνευσης του αναλύτη

Σύμφωνα με τον ορισμό του ορίου ανίχνευσης, όταν η συγκέντρωση ενός αναλύτη είναι ίση με αυτό, τότε η αβεβαιότητα μέτρησης είναι 100% και όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση από το όριο ανίχνευσης τόσο μικρότερη η αβεβαιότητα. Γενικά, η σχετική αβεβαιότητα που οφείλεται στο όριο ανίχνευσης δίνεται από τη σχέση:

$$u_{r(LOD)} = \frac{LOD}{C_{μετρ.}} \quad (\text{εξ. 3.5})$$

όπου: LOD: το όριο ανίχνευσης της μεθόδου και C_{μετρ.}: η μετρούμενη τιμή συγκέντρωσης του πραγματικού δείγματος.

3.2.2.5 Αβεβαιότητα που σχετίζεται με τη βαθμονόμηση του οργάνου

Σε κάθε αναλυτική μέθοδο προσδιορίζεται η καμπύλη βαθμονόμησης, μέσω ανάλυσης συμμεταβολής, ώστε να εκτιμηθεί η συσχέτιση μεταξύ των μετρήσεων, αφού επιδρά τόσο στο αποτέλεσμα προσδιορισμού ενός μετρούμενου είδους σε ένα πραγματικό δείγμα όσο και στη συνδυασμένη αβεβαιότητά του. Όταν για τον υπολογισμό της καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται εσωτερικά πρότυπα, η αβεβαιότητα προέρχεται από τον υπολογισμό του συντελεστή σχετικής απόκρισης (relative response coefficient). Ο συντελεστής απόκρισης υπολογίζεται από κατάλληλα πρότυπα διαλύματα που περιέχουν γνωστές ποσότητες αναλύτη και εσωτερικού προτύπου. Η τυπική αβεβαιότητα ορίζεται τότε από τη σχέση

$$u_{(βαθμ)} = \frac{SD_{RRF}}{\sqrt{n}} \quad (\text{εξ. 3.6})$$

Συνεπώς, η συνδυασμένη αβεβαιότητα μιας χρωματογραφικής ανάλυσης θα περιλαμβάνει τα προαναφερόμενα συστατικά. Έτσι, η σχετική συνδυασμένη αβεβαιότητα ενός αποτελέσματος θα περιγράφεται από τη σχέση:

$$u_r = \sqrt{(u_{r(\deltaείγμα)})^2 + (u_{r(\text{ανάκτ})})^2 + (u_{r(\text{βαθμ})})^2 + (u_{r(\text{επαν})})^2 + (u_{r(LOD)})^2} \quad (\text{εξ. 3.7})$$

3.2.3 Εκτίμηση της αβεβαιότητας με εσωτερική (in-house) μελέτη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας μεθόδου

Μέχρι σήμερα οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στην αναλυτική χημεία, προκειμένου να πραγματοποιηθεί εκτίμηση της αβεβαιότητας, κάνουν χρήση των χαρακτηριστικών επίδοσης της μεθόδου (πιστότητα, ορθότητα/ανάκτηση) οι οποίες προκύπτουν από την εσωτερική μελέτη της επικύρωσης μιας μεθόδου ή από την ανάπτυξη και διεργαστηριακή μελέτη της

(ISO 1994, Barwick V. et al., 2000). Κατά την εσωτερική μελέτη για ανάπτυξη και επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου γίνεται προσδιορισμός των παραμέτρων που σχετίζονται με την απόδοση της μεθόδου. Η εκτίμηση της αβεβαιότητας από αυτές τις παραμέτρους απαιτεί:

- Την καλύτερη δυνατή εκτίμηση της συνολικής πιστότητας
- Την καλύτερη δυνατή εκτίμηση του ολικού συστηματικού σφάλματος και της αβεβαιότητάς του
- Την ποσοτικοποίηση όποιας αβεβαιότητας συσχετίζεται με επιδράσεις που δεν συνυπολογίστηκαν στις παραπάνω μελέτες συνολικής απόδοσης της μεθόδου.

3.2.4 Αβεβαιότητα μέτρησης προερχόμενη από την ορθότητα (trueness) μιας αναλυτικής μεθόδου

Ο έλεγχος της ορθότητας μιας αναλυτικής μεθόδου εμπεριέχει την εκτίμηση του συστηματικού σφάλματος αυτής και διενεργείται με τον υπολογισμό της ανάκτησης της μεθόδου όπως αναλύθηκε στην ενότητα 3.2.2.1.2. Η συνεισφορά λοιπόν της διακύμανσης που προέρχεται από την ορθότητα της μεθόδου, δηλαδή από το συστηματικό σφάλμα είναι πολύ σημαντική για την εκτίμηση της συνολικής αβεβαιότητας. Στην ενότητα 3.2.2.2, αναφέρθηκε ότι η ανάκτηση ορίζεται ως ο λόγος της παρατηρούμενης συγκέντρωσης (ή ποσότητας γενικά) C_{obs} ή $\Delta C_{ευρεθεν}$ μετά την εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθοδολογίας σε ένα υλικό που περιέχει τον αναλύτη ως προς ένα επίπεδο αναφοράς C_{ref} ή $\Delta C_{προστ}$, δηλαδή

$$R = C_{obs} / C_{ref} = \Delta C_{ευρεθ} / \Delta C_{προστ}$$

Συμπεραίνουμε, ότι η τιμή της ανάκτησης έχει άμεση σχέση με την παρατηρούμενη συγκέντρωση και λαμβάνει την τιμή $R=1$ όταν η εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου είναι ιδανική. Όμως οι πραγματικές πειραματικές συνθήκες (μη πλήρης εκχύλιση, προσμίξεις, παρεμποδίσσεις στον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη, κ.α.) οδηγούν στην απόκλιση της τιμής της ανάκτησης από τη μονάδα. Γι' αυτό είναι απαραίτητος ο έλεγχος της σημαντικότητας της απόκλισής της από τη μονάδα. Ένας τυπικός έλεγχος σημαντικότητας εκφράζεται ως εξής:

- $\text{Av} \frac{|R_m - 1|}{u_{Rm}} > t$: η ανάκτηση διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα
- $\text{Av} \frac{|R_m - 1|}{u_{Rm}} \leq t$: η ανάκτηση δεν διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα

όπου R : η ανάκτηση, u_R : η αβεβαιότητα της ανάκτησης, t : η κρίσιμη τιμή βασιζόμενη σε έναν παράγοντα κάλυψης ή όταν ο έλεγχος είναι ολοκληρωτικά στατιστικός, $t(a/2, n-1)$ είναι η σχετική τιμή του ελέγχου του Student' s t – test για επίπεδο εμπιστοσύνης $1 - a$ και $n-1$ βαθμούς ελευθερίας.

Ο έλεγχος αυτός περιλαμβάνει το ερώτημα «εάν η ποσότητα $R-1$ είναι μεγαλύτερη από την αβεβαιότητα του προσδιορισμού της ανάκτησης, u_R , σε κάποιο επίπεδο εμπιστοσύνης a ». (Maroto A., et.al. 2001).

Πίνακας 3.4 Πηγές αβεβαιότητας που σχετίζονται με την ανάκτηση μιας μεθόδου.

1	Επαναληψιμότητα του πειράματος ανάκτησης
2	Αβεβαιότητα σχετικά με τις τιμές των υλικών αναφοράς
3	Αβεβαιότητα σχετικά με τη προτιθέμενη ποσότητα εμβολιασμού
4	Κακή αντιπροσώπευση της υπάρχουσας ουσίας από τον προστιθέμενο εμβολιασμό
5	Λανθασμένη ή περιορισμένη αντιστοιχία μεταξύ του πειραματικού υποστρώματος και του εύρους των υποστρωμάτων προς ανάλυση
6	Επίδραση του επιπέδου εμβολιασμού στην ανάκτηση και ατελής αντιστοιχία του με τα πραγματικά επίπεδα της αναλυτέας ουσίας στο δείγμα

Από τον παραπάνω έλεγχο σημαντικότητας μπορούμε να συμπεράνουμε εάν η ανάκτηση διαφέρει στατιστικά από τη μονάδα. Έτσι, εάν η ανάκτηση δεν διαφέρει από τη μονάδα τότε συμπεραίνουμε ότι η μέθοδος δεν έχει κάποιο σημαντικό συστηματικό σφάλμα. Εάν όμως η ανάκτηση διαφέρει στατιστικά από τη μονάδα, τότε η μέθοδος έχει σημαντικό συστηματικό σφάλμα και θα πρέπει να εφαρμοστεί διόρθωση στην τελική τιμή της. Παρόλα αυτά εξαιτίας της σύνθετης φύσης των υποστρωμάτων ανάλυσης (τρόφιμα, ιζήματα) και της έλλειψης κοινής προσέγγισης ή νομοθεσίας δεν έχουν καθοριστεί συγκεκριμένες διαδικασίες για την διόρθωση ή μη της τιμής της ανάκτησης μιας μεθόδου όταν αυτή έχει σημαντικό συστηματικό σφάλμα. Σύμφωνα με τους Thompson M., et. al. (1999), διακρίνονται 4 περιπτώσεις ανάλογα με τη χρήση της ανάκτησης, R , και η αβεβαιότητα μπορεί να διαχειριστεί ως εξής:

α) Η ανάκτηση, R , δε διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα (1)

Σ' αυτή την περίπτωση δεν είναι απαραίτητη η διόρθωση του αποτελέσματος. Παρόλο που θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει ότι η αβεβαιότητα που σχετίζεται με την ανάκτηση

είναι αμελητέα θα πρέπει να συμπεριληφθεί στη συνολική αβεβαιότητα ενός αναλυτικού αποτελέσματος.

β) Η ανάκτηση, R , διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα (1) και εφαρμόζεται διόρθωση

Σε αυτή την περίπτωση γίνεται διόρθωση του αποτελέσματος (π.χ. $c_{\text{διορθ}} = c/R$, όπου c είναι το αρχικό αποτέλεσμα σε μια αβεβαιότητα, u_c). Είναι φανερό ότι η αβεβαιότητα, u_R , που σχετίζεται με την ανάκτηση θα πρέπει να συμπεριληφθεί στη συνολική εκτίμηση της αβεβαιότητας. Οδηγούμαστε έτσι στη συνδυασμένη αβεβαιότητα, $u_{\text{διορθ}}$, που δίνεται από τον

$$\text{τύπο: } u_{(\text{διορθ})} = C_{(\text{διορθ})} * \sqrt{\left(\frac{u_c}{C}\right)^2 + \left(\frac{u_R}{R}\right)^2} \quad (\text{εξ. 3.8})$$

Η συνδυασμένη αβεβαιότητα προκύπτει πολλαπλασιάζοντας το μέγεθος $u_{\text{διορθ}}$ με έναν παράγοντα k (συνήθως 2) οπότε υπολογίζεται η εκτεταμένη αβεβαιότητα, U .

γ) Η ανάκτηση, R , διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα (1) και δεν εφαρμόζεται διόρθωση

Αν η ανάκτηση διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα, τότε η διασπορά των τιμών που περιέχουν τη μετρούμενη ποσότητα δεν αντιπροσωπεύεται σωστά, εκτός και αν η αβεβαιότητα u_R αυξηθεί σημαντικά, αφού ο συνυπολογισμός της ανάκτησης στη συνολική αβεβαιότητα είναι λιγότερο ακριβής. Η μη εφαρμογή διόρθωσης για μια γνωστή συστηματική επίδραση σε μια μέθοδο αντιτίθεται στη βέλτιστη εκτίμηση μιας ποσότητας προς μέτρηση. Γι' αυτό μερικές φορές υιοθετείται μια απλή προσέγγιση διόρθωσης της τιμής της ανάκτησης προσθέτοντας στην εκτεταμένη αβεβαιότητα έναν διορθωτικό παράγοντα, δηλαδή $u_{\text{διορθ}} = u_c + b = u_c + (c/R - c)$. Σύμφωνα με τους Barwick J., et. al 2000, η αβεβαιότητα θα πρέπει να αυξηθεί ώστε να συμπεριληφθεί το αδιόρθωτο συστηματικό σφάλμα στην εκτίμησή της. Η σχετική εξίσωση που διορθώνει την αβεβαιότητα έχει ως εξής:

$$u_{(R)\text{διορθ}} = \sqrt{\left(\frac{1-R}{k}\right)^2 + u^2(R)} \quad (\text{εξ. 3.9})$$

$k=2$ και εξαρτάται από τον αριθμό πειραμάτων για τον υπολογισμό της ανάκτησης.

Εναλλακτικά, αν η διόρθωση δεν εφαρμόζεται επειδή η διαφορά από τη μονάδα έχει πρακτική ερμηνεία στην αναλυτική χημεία, τότε η περίπτωση (γ) αντιμετωπίζεται όπως η περίπτωση (α). Τελικά, δεν επιτυγχάνεται διόρθωση του αποτελέσματος και η αβεβαιότητα υπερεκτιμάται.

Σε κάθε περίπτωση, είτε γίνει διόρθωση της τιμής της ανάκτησης είτε όχι, η αβεβαιότητα που προέρχεται από την εκτίμηση της ανάκτησης θα πρέπει να συνυπολογίζεται στη συνολική αβεβαιότητα (Maroto A. (2002), Haesselbarth W. (2004)).

δ) Η ανάκτηση, R , λαμβάνεται αυθαίρετα ίση με τη μονάδα (1) και η αβεβαιότητα, u_R , ως μηδενική

3.2.5 Υπολογισμός της αβεβαιότητας από την ανάκτηση μεθόδου

Κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων ανάκτησης για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας που σχετίζεται με την ορθότητα μιας μεθόδου, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

- α) Η ανάκτηση και επομένως η αβεβαιότητά της μπορεί να εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της αναλυτέας ουσίας.
- β) Η μελέτη ανάκτησης θα πρέπει να περιλαμβάνει όλο το εύρος των πιθανών υποστρωμάτων στα οποία δύναται να εφαρμοστεί η μέθοδος και για την οποία γίνεται επικύρωση.
- γ) Αν υπάρχει υπόνοια ότι ένα μέρος της ένωσης προς ανάλυση, δεν εκχυλίζεται, τότε η ανάκτηση που εκτιμάται με υποκατεστημένη ουσία (surrogate) θα παρουσιάζει συστηματικό τυπικό σφάλμα. Αυτό θα πρέπει να εκτιμηθεί και να συνυπολογιστεί στη συνολική αβεβαιότητα.
- δ) Αν κατά την εφαρμογή μιας μεθόδου υπάρχει αναντιστοιχία μεταξύ των υποστρωμάτων κατά τη μελέτη ανάκτησης (επικύρωση) και στο υλικό υπό έλεγχο κατά την ανάλυση, τότε προστίθεται επιπλέον αβεβαιότητα στην τιμή της ανάκτησης.

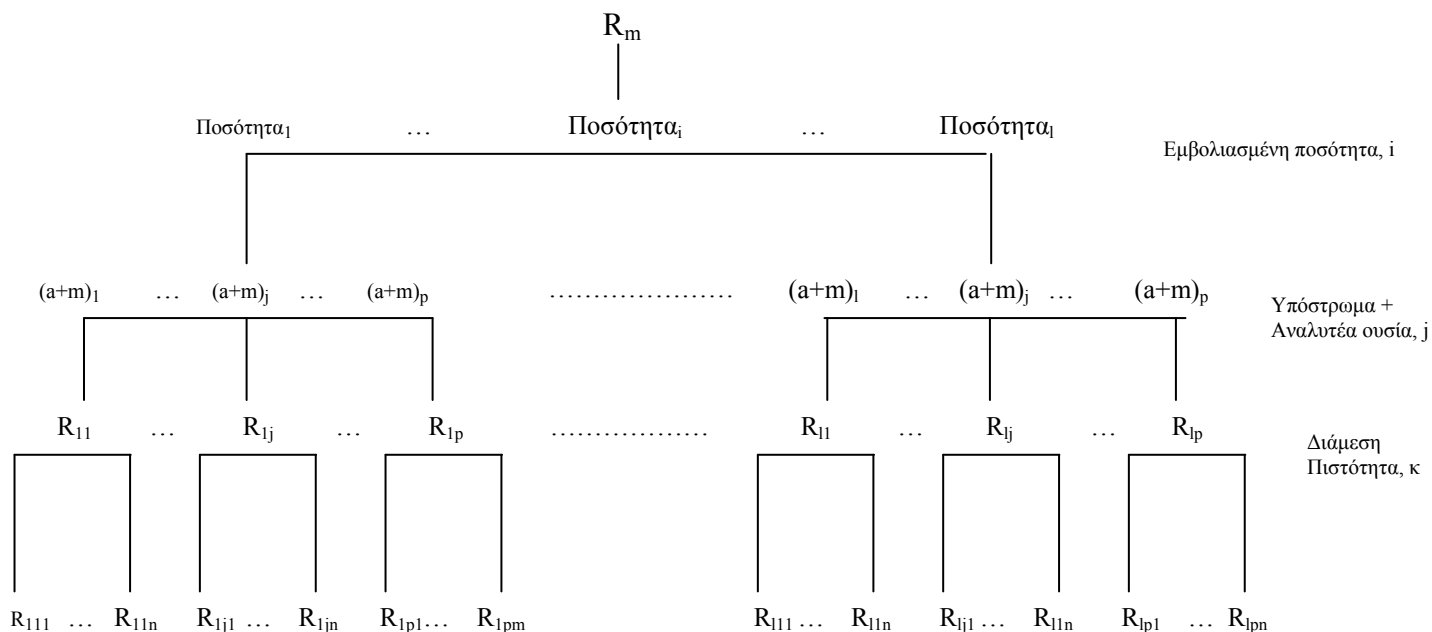
Σε γενικές γραμμές, η πρακτική εφαρμογή μιας μελέτης ανάκτησης περιλαμβάνει:

- εκτίμηση των βασικών πηγών της αβεβαιότητας ανάκτησης
- καθορισμός του αριθμού των αντιπροσωπευτικών παραμέτρων οι οποίοι θα μελετηθούν
- καθορισμός του απαιτούμενου αριθμού αναλύσεων.

Τελευταία, για την εφαρμογή μιας τέτοιας μελέτης, προτείνεται η χρήση πειραματικού σχεδίου (experimental design) ώστε να λαμβάνονται υπόψη όλοι οι παράγοντες διακύμανσης καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους που συνεισφέρουν στην αβεβαιότητα. Προτεινόμενο είδος πειραματικού σχεδίου είναι το πλήρως ένθετο σχέδιο ή ιεραρχικό (fully – nested design).

Η εκτίμηση της τιμής της μέσης ανάκτησης, \overline{R}_m (μέθοδος της μέσης ανάκτησης), προκύπτει από την εκτίμηση της ανάκτησης για κάθε ποσότητα της αναλυτέας ένωσης που έχει προστεθεί σε μια σειρά διαφορετικών υποστρωμάτων, αντιπροσωπευτικών των μελλοντικών δειγμάτων ρουτίνας. Αυτή η ανάκτηση υπολογίζεται τουλάχιστον εις διπλούν, ώστε τόσο η διάμεση πιστότητα της μεθόδου όσο και η μεταβολή της ανάκτησης λόγω του

υποστρώματος, του είδους της αναλυτέας ένωσης και του επιπέδου συγκέντρωσης να μπορούν να εκτιμηθούν. Η ολική ανάκτηση, $\overline{\overline{R_m}}$, και η τυπική απόκλιση της $s(\overline{\overline{R_m}})$ υπολογίζονται από τις προαναφερθείσες μετρήσεις. Ένα πιθανό πειραματικό σχέδιο αναπαρίσταται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 3.10 Πειραματικό σχέδιο για την εκτίμηση της ανάκτησης όταν l διαφορετικές ποσότητες αναλυτέας ουσίας προστίθεται σε αντιπροσωπευτικά δείγματα. Μελετούνται τρεις παράγοντες διακύμανσης: η προστιθέμενη ποσότητα, το υπόστρωμα και η διάμεση πιστότητα. Για κάθε επίπεδο p , η ανάκτηση μελετάται σε δείγματα στα οποία το υπόστρωμα ποικίλει αντιπροσωπευτικά. Σε καθένα από τα p δείγματα, η ανάκτηση υπολογίζεται n φορές υπό συνθήκες ενδιάμεσης πιστότητας. R_{ijk} είναι η k_{th} ανάκτηση, που έχει παρατηρηθεί υπό συνθήκες ενδιάμεσης πιστότητας για μια ποσότητα i προστιθέμενη στο j_{th} δείγμα. R_{ij} είναι η μέση τιμή των ανακτήσεων R_{ijk} . R_i είναι η μέση τιμή των R_j και τελικά R_m είναι ο γενικός μέσος όρος των ανακτήσεων που επιτεύχθηκαν κατά το πειραματικό σχέδιο (Maroto A. et al, 2001).

Πρόκειται για ένα πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο τριών παραγόντων. Οι παράγοντες που μεταβάλλονται περιλαμβάνουν την ποσότητα της ένωσης προς ανάλυση, το υπόστρωμα και τη διάμεση πιστότητα. Το παραπάνω πειραματικό σχέδιο μπορεί να απλοποιηθεί ή να γίνει πιο πολύπλοκο ανάλογα με την αφαίρεση ή προσθήκη άλλων πηγών διακύμανσης (Maroto A. et al, 2001)

3.2.6 Πρακτική διακύμανση των συστατικών της αβεβαιότητας

Η πραγματική ανάκτηση, R , ενός εμβολιασμένου δείγματος μπορεί να αποδοθεί ως το άθροισμα τριών συστατικών:

$$R = \overline{R}_m + \Delta R_C + \Delta R_M \quad (\text{εξ. 3.10})$$

όπου, \overline{R}_m είναι η ολική ανάκτηση ή ανάκτηση μεθόδου και τα δύο τελευταία συστατικά σχετίζονται με τη διακύμανση της ανάκτησης που οφείλεται στο είδος του δείγματος προς ανάλυση. Έτσι, το συστατικό ΔR_C είναι η διακύμανση της ανάκτησης που εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας προς ανάλυση με την οποία εμβολιάζονται τα δείγματα και το συστατικό ΔR_M είναι η διακύμανση της ανάκτησης που οφείλεται στα διαφορετικά είδη υποστρωμάτων των δειγμάτων προς ανάλυση.

Η τιμή της μέσης ανάκτησης, \overline{R}_m , υπολογίζεται από τον υπολογισμό της ορθότητας μιας μεθόδου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διόρθωση μελλοντικών αποτελεσμάτων (εάν κριθεί απαραίτητο) και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\overline{R}_m = \frac{\sum_{i=1}^l \overline{R}_i}{l} \quad (\text{εξ. 3.11})$$

Στην εξίσωση 3.11 ο όρος \overline{R}_i εκφράζει τη μέση ανάκτηση για κάθε υπόστρωμα, όταν l υποστρώματα αναλύονται με τη μέθοδο (Maroto A. et al, 2001).

Προκειμένου, λοιπόν, να προσδιοριστεί η πραγματική ανάκτηση, R , χρειάζεται να υπολογιστούν οι τιμές των συστατικών ΔR_C και ΔR_M της εξίσωσης 3.10. Όμως αυτά τα συστατικά αποτελούν άγνωστες ποσότητες για τα μελλοντικά δείγματα ρουτίνας. Ωστόσο, αυτό που μπορεί να υπολογιστεί εκ των προτέρων είναι η διακύμανση που σχετίζεται με τη μεταβολή της ανάκτησης εν σχέσει με το υπόστρωμα προς ανάλυση, $u^2(\Delta R_M)$, καθώς και εν σχέσει με τη συγκέντρωση $u^2(\Delta R_C)$. Αυτές οι διακυμάνσεις σχετίζονται αντίστοιχα με την

κατανομή των τιμών που οι ποσότητες ΔR_M και ΔR_C μπορούν να πάρουν ανάλογα με τον τύπο δείγματος υπό ανάλυση. Επομένως, οι διακυμάνσεις αυτές, $u^2(\Delta R_M)$ και $u^2(\Delta R_C)$ απαιτούν συστατικά της αβεβαιότητας και συνυπολογίζονται για τον προσδιορισμό μεταβολών στην ανάκτηση ενός συγκεκριμένου δείγματος προς ανάλυση.

Η αβεβαιότητα της πραγματικής ανάκτησης, R , μπορεί τότε να υπολογιστεί ως εξής:

$$u_R = \sqrt{u^2(\overline{R_m}) + u^2(\Delta R_C) + u^2(\Delta R_M)} \quad (\text{εξ. 3.12})$$

όπου $u^2(\overline{R_m})$ είναι η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης και υπολογίζεται με την εφαρμογή ενός πλήρους ένθετου πειραματικού σχεδίου. Οι διακυμάνσεις (ή αβεβαιότητες) $u^2(\Delta R_C)$ και $u^2(\Delta R_M)$ υπολογίζονται από την ανάλυση διακύμανσης (ANOVA, analysis of variances) των ανακτήσεων που προκύπτουν από την εφαρμογή του πλήρους ένθετου πειραματικού σχεδίου.

Πίνακας 3.5 Υπολογισμός των διακυμάνσεων για το προτεινόμενο πειραματικό σχέδιο με τη χρήση ANOVA.

Πηγές Αβεβαιότητας	Επίπεδα	Μέσο τετράγωνο	Βαθμοί ελευθερίας	Αβεβαιότητα
Υποστρώματα	$l=2$	MS_M	$l-1$	$u(\Delta R_M)^2 = \frac{MS_M - MS_C}{pr}$
Συγκεντρώσεις	$p=3$	MS_C	$l(p-1)$	$u(\Delta R_C)^2 = \frac{MS_C - MS_r}{r}$
Επαναλήψεις Σύνολο	$r=3$	MS_r	$lp(r-1)$ $lpr-1$	$u(\Delta R_r)^2 = MS_r$

Από τη σχέση 3.11 προκύπτει ότι η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης $u(\overline{R}_m)$ θα είναι:

$$u(\overline{R}_m) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l u^2(R_i)}{l^2}} \quad (\text{εξ. 3.13})$$

Η αβεβαιότητα, $u(\overline{R}_i)$ των μέσων ανακτήσεων υπολογίζεται από την τυπική απόκλιση αυτών:

$$u(\overline{R}_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (\overline{R}_{ij} - \overline{R}_i)^2}{p \cdot (p-1)}} \quad (\text{εξ. 3.14})$$

όπου R_{ij} είναι η μέση ανάκτηση για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα και για ένα συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης εν σχέσει με την αναλυόμενη ουσία ενός εμβολιασμένου δείγματος και p είναι ο αριθμός των διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης (Maroto A. et al (2001), Boti V. I. et al (2009)).

Είναι σημαντικό τέλος να σημειωθεί ότι η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης υπολογίζεται υποθέτοντας ότι οι αβεβαιότητες που σχετίζονται με τον εμβολιασμό δείγματος (καθαρότητα υλικού, συσκευές μάζας και όγκου) είναι αμελητέες, διαφορετικά θα πρέπει να συμπεριληφθούν στην εξίσωση 3.12.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ****Εισαγωγή**

Η χημειομετρία αναγνωρίζεται ως ένας κλάδος της αναλυτικής χημείας από τα μέσα του 1970 αν και η προέλευση και ανάπτυξη των μεθόδων της βρίσκεται στους τομείς της οικονομίας και ψυχολογίας. Σύμφωνα με τη διεθνή κοινότητα χημειομετρίας (International Chemometrics Society), **χημειομετρία** είναι η επιστήμη που συνδέει τις μετρήσεις που γίνονται σε ένα χημικό σύστημα ή μια χημική διεργασία με την κατάσταση του συστήματος μέσω της εφαρμογής μαθηματικών ή στατιστικών μεθόδων (Wikipedia). Με άλλα λόγια είναι η εφαρμογή των μαθηματικών μεθόδων για την επίλυση όλων των τύπων χημικών προβλημάτων. Το εύρος του πεδίου εφαρμογής της χημειομετρίας είναι τεράστιο λαμβάνοντας χώρα από τη φυσικοχημεία (μελέτες κινητικής και ισορροπίας) έως την οργανική χημεία (μελέτες βελτιστοποίησης αντιδράσεων), τη θεωρητική χημεία, τη χρωματογραφία και τη φασματοσκοπία, τις περιβαλλοντικές μελέτες, την επιστημονική αρχαιολογία, τη βιολογία, την ιατροδικαστική επιστήμη, την παρακολούθηση διαδικασιών στη βιομηχανία, τη γεωχημεία κ.α. Όμως κάθε επιστημονικός κλάδος της χημείας διαθέτει ξεχωριστό πλαίσιο προσέγγισης για την εφαρμογή της χημειομετρίας αφού δεν υπάρχουν ενιαίοι κανόνες. Η χημειομετρία συσχετίζεται με άλλους επιστημονικούς κλάδους όπως αναπαρίσταται στο σχήμα 4.1.



Σχήμα 4.1 Συσχέτιση της χημειομετρίας με τις άλλες επιστήμες (Brereton)

Γενικά, οι χημειομετρικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη συλλογή σωστών δεδομένων ή για την εξαγωγή πληροφοριών από τα υπάρχοντα δεδομένα με τη χρήση στατιστικών μεθόδων.

Πίνακας 4.1. Βασικές χημειομετρικές μέθοδοι

Βασική στατιστική	Επεξεργασία σήματος
Βελτιστοποίηση μεθόδου	Παραγοντική ανάλυση
Πειραματικό σχέδιο	Διαχωρισμός
Βαθμονόμηση	Ανίχνευση
Προσαρμογή καμπύλης	Αναγνώριση μοτίβου
Εύρεση σε βιβλιοθήκες	Νευρωνικά δίκτυα

Ωστόσο, αποτελούν εργαλεία που συνεισφέρουν στην ποιότητα των μετρήσεων μαζί με τις υπόλοιπες προσεγγίσεις διασφάλισης ποιότητας (καθορισμός βασικών στόχων, συνυπολογισμός υποθέσεων και αδυναμιών της χρησιμοποιούμενης μεθόδου, χαρακτηριστικά επίδοσης ή ποιότητας). Στην παρούσα μελέτη, οι χημειομετρικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων και την εκτίμηση της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στην εκτίμηση της αβεβαιότητας μεθόδου.

4.1 Βασικές στατιστικές έννοιες

4.1.1 Μέση τιμή, τυπική απόκλιση, διακύμανση

Για τη στατιστική αξιολόγηση μιας σειράς επαναλήψεων της ίδιας πειραματικής μέτρησης αλλά και τη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών σειρών επαναλήψεων χρησιμοποιούνται διάφορες βασικές έννοιες στατιστικής.

Μέσος όρος ή μέση τιμή (Average ή mean value)

Ο αριθμητικός μέσος όρος είναι το άθροισμα όλων των τιμών του δείγματος διαιρεμένο με τον αριθμό των τιμών. Συμβολίζεται με το σύμβολο \bar{x} και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{εξ. 4.1})$$

Ο μέσος όρος \bar{x} μερικών τιμών ενός πληθυσμού αντιπροσωπεύει την εκτίμηση της αληθούς τιμής της μέτρησης.

Τυπική απόκλιση (Standard deviation)

Μπορούμε να ορίσουμε την τυπική απόκλιση σ μιας κανονικής κατανομής σαν την απόκλιση από την αληθή τιμή (θετική ή αρνητική) μέσα στην οποία βρίσκονται 68,26% των τιμών του πληθυσμού. Η τυπική απόκλιση λοιπόν αποτελεί μέτρο του βαθμού συγκέντρωσης των τυχαίων τιμών της μεταβλητής x γύρω από τη μέση τιμή μ . Για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης του δείγματος χρησιμοποιείται η σχέση:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{εξ. 4.2})$$

Συντελεστής διακύμανσης (coefficient of variation, CV) ή σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD)

Αποτελεί μέτρο της διασποράς των τιμών γύρω από τη μέση τιμή και υπολογίζεται από τη σχέση:

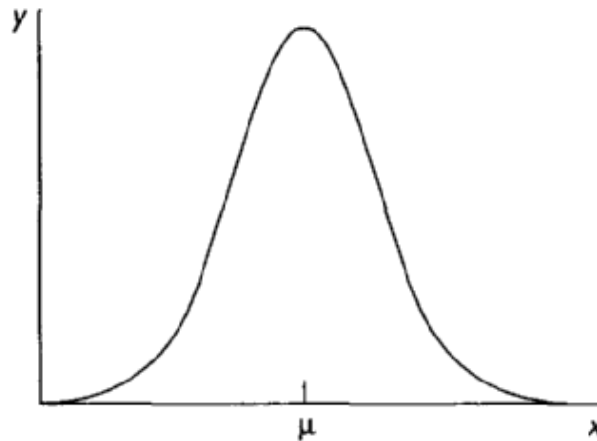
$$CV = RSD = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{εξ. 4.3})$$

Διακύμανση (Variance)

Πρόκειται για στατιστική έννοια που χρησιμοποιείται στη διάδοση των σφαλμάτων και ορίζεται ως το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης, s^2 (Καραγιάννης Μ.Ι., 1987).

4.1.2 Κανονική κατανομή ή κατανομή Gauss δείγματος

Η διασπορά των τιμών x_i γύρω από την αληθή τιμή, μ , (μετά την απομάκρυνση των συστηματικών σφαλμάτων) ακολουθεί μια χαρακτηριστική κατανομή όπως φαίνεται στο σχήμα 4.2.



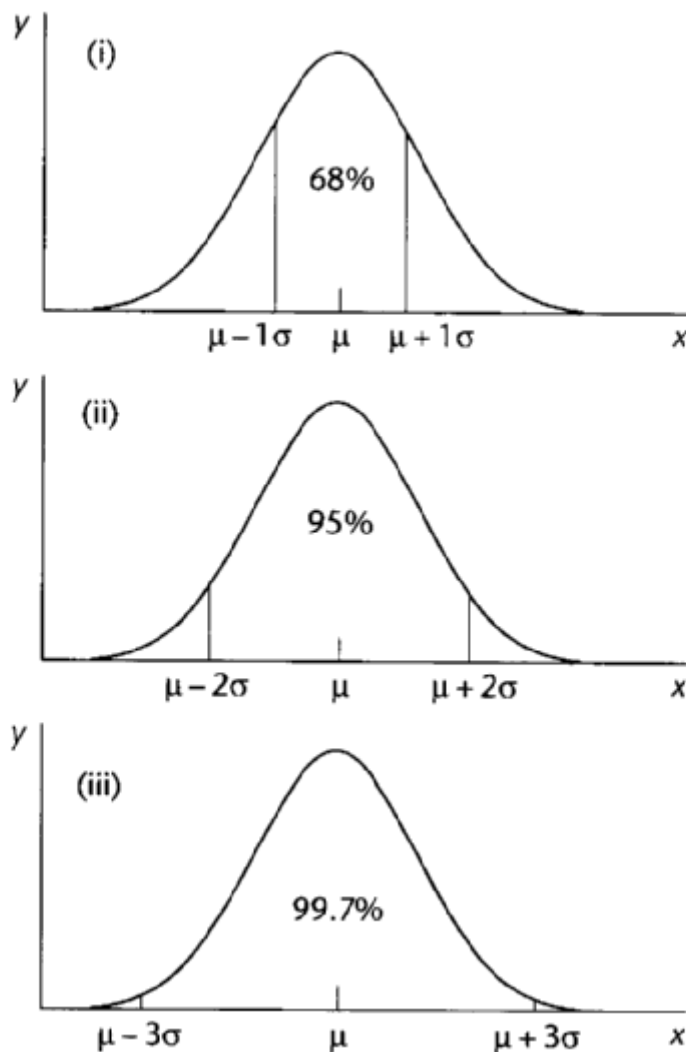
Σχήμα 4.2 Γραφική αναπαράσταση μιας κανονικής κατανομής (μέση τιμή συμβολίζεται ως «μ»).

Αυτή είναι γνωστή ως κανονική κατανομή ή κατανομή Gauss. Η κατανομή Gauss περιγράφεται από την εξίσωση:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{εξ. 4.4})$$

όπου x είναι η πειραματική τιμή, μ είναι η μέση τιμή, σ είναι η τυπική απόκλιση από τη μέση τιμή (εύρος της καμπύλης).

Η αξία της κατανομής Gauss έγκειται στο ότι για ένα πολύ μεγάλο πλήθος (θεωρητικά άπειρο) επαναλήψεων της ίδιας πειραματικής μέτρησης, η κατανομή αυτή μπορεί να προβλέψει τη συχνότητα εμφάνισης μιας δεδομένης τιμής. Από την εξίσωση 4.4 προκύπτει ότι το 68,3% των αναμενόμενων τιμών θα βρίσκεται στο διάστημα $\mu + \sigma$ έως $\mu - \sigma$, το 95,4% των τιμών θα βρίσκονται στο διάστημα $\mu + 2\sigma$ έως $\mu - 2\sigma$ και το 99,7% των τιμών θα βρίσκονται στο $\mu + 3\sigma$ έως $\mu - 3\sigma$ (σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3 Βασικές αρχές της κανονικής κατανομής

Μπορούμε πλέον να ορίσουμε μια περιοχή τιμών για την οποία μπορούμε δικαιολογημένα να υποθέσουμε ότι περιέχει την αληθινή τιμή. Αυτή η περιοχή ονομάζεται **διάστημα εμπιστοσύνης** και τα όριά της, **όρια εμπιστοσύνης** (confidence limits). Ο όρος «εμπιστοσύνη» σημαίνει ότι μπορεί να βεβαιωθεί για δοσμένο βαθμό εμπιστοσύνης π.χ. πιθανότητα ότι το διάστημα εμπιστοσύνης περιλαμβάνει όντως την αληθινή τιμή (δηλαδή τη μέση τιμή που θα προσδιορίζαμε για άπειρο πλήθος επαναλήψεων). Ο υπολογισμός των ορίων εμπιστοσύνης βασίζεται στο συσχετισμό της τυπικής απόκλισης σ_i , μιας συγκεκριμένης μέτρησης i , με την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής σ_{μ} (Miller J.N., 2005).

Για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης διακρίνουμε δύο περιπτώσεις:

α) Όταν το τυπικό σφάλμα σ είναι γνωστό

Τότε, για N μετρήσεις, το όριο εμπιστοσύνης δίνεται από τη σχέση:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{z\sigma}{\sqrt{N}} \quad (\text{εξ. 4.5})$$

Η παράμετρος z προσδιορίζει το εύρος των ορίων εμπιστοσύνης και οι τιμές της σε σχέση με το επίπεδο εμπιστοσύνης πηγάζουν από τις ιδιότητες της κατανομής Gauss. Από τους πίνακες των τιμών της παραμέτρου z για διάφορα επίπεδα εμπιστοσύνης μπορούμε να δούμε ότι:

Επίπεδο εμπιστοσύνης	z
95%	1.96
96%	2.00

Μπορούμε, λοιπόν, να θεωρήσουμε ότι 96 στις 100 φορές η πραγματική μέση τιμή απέχει το πολύ $\pm 2\sigma$ από οποιαδήποτε πειραματική μας τιμή. Αυτό είναι το επίπεδο εμπιστοσύνης 96%, όπου τα όρια εμπιστοσύνης είναι $\pm 2\sigma$. Σε άλλη περίπτωση στο επίπεδο εμπιστοσύνης 95% μπορούμε να θεωρήσουμε ότι 95 στις 100 φορές η πραγματική μέση τιμή, μ , απέχει το πολύ $\pm 1,96\sigma$ από οποιαδήποτε πειραματική τιμή ή

$$\mu - 1,96(\sigma/\sqrt{n}) < \bar{x} < \mu + 1,96(\sigma/\sqrt{n})$$

β) Όταν το τυπικό σφάλμα σ δεν είναι γνωστό

Όταν δεν γνωρίζουμε το τυπικό σφάλμα σ και το σφάλμα μέσου όρου, αλλά την τυπική απόκλιση S του δείγματος, για τον υπολογισμό των ορίων εμπιστοσύνης αντί της παραμέτρου z χρησιμοποιούμε την παράμετρο t , σύμφωνα με τη σχέση:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{n-1} \cdot s}{\sqrt{n}} \quad (\text{εξ. 4.6})$$

Σ' αυτή την περίπτωση τα όρια εμπιστοσύνης θα είναι μεγαλύτερα αφού οι μετρήσεις δείγματος είναι λιγότερες του πληθυσμού.

Ο όρος $(n-1)$ υποδεικνύει ότι η παράμετρος t εξαρτάται από αυτή την ποσότητα η οποία είναι γνωστή ως αριθμός των **βαθμών ελευθερίας** (degree of freedom, df) και συμβολίζεται με ν . Οι βαθμοί ελευθερίας μιας στατιστικής κατανομής ορίζονται με τον αριθμό των ανεξάρτητων παρατηρήσεων, n , ελαττωμένο τόσο, όσος είναι ο αριθμός των παραμέτρων της κατανομής, που υπολογίζονται από τις παρατηρήσεις. Στη συγκεκριμένη περίπτωση για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης, s , ο αριθμός των ανεξάρτητων παρατηρήσεων είναι 1 και χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του $(x_i - \bar{x})$, δηλαδή για τον υπολογισμό του \bar{x} από τις πειραματικές μετρήσεις (Καραγιάννης Μ.Ι., 1987).

4.1.3 Δοκιμές σημαντικότητας (Σύγκριση σειράς πειραματικών δεδομένων)

Προκειμένου να εξεταστεί εάν η διαφορά μεταξύ μιας μετρούμενης και μιας πρότυπης ποσότητας οφείλεται σε τυχαία σφάλματα, χρησιμοποιείται ένας στατιστικός έλεγχος που ονομάζεται δοκιμή σημαντικότητας. Αυτή η δοκιμή εξετάζει εάν η διαφορά μεταξύ δύο αποτελεσμάτων είναι σημαντική ή διαφορετικά εάν μπορεί να αποδοθεί σε τυχαίες διακυμάνσεις. Κατά την εφαρμογή δοκιμών σημαντικότητας διατυπώνουμε δύο υποθέσεις:

- **τη μηδενική υπόθεση (null hypothesis, H_0)** στην οποία υποθέτουμε ότι υπάρχει ισοδυναμία μεταξύ π.χ. δύο σειρών πειραματικών δεδομένων όταν συγκρίνονται ως προς ορισμένη ιδιότητά τους και
- **την εναλλακτική υπόθεση (H_a)** κατά την οποία εξετάζουμε εάν η διαφορά μεταξύ των σειρών δεδομένων είναι στατιστικά σημαντική.

Εξετάζουμε, λοιπόν, εάν η διαφορά μεταξύ των δύο σειρών δεδομένων είναι στατιστικά σημαντική, δηλαδή αν οφείλεται σε στατιστική ανεπάρκεια λόγω του μικρού αριθμού πειραμάτων και όχι γιατί η μέθοδος είναι ανακριβής. Η βέβαιη απόρριψη μιας μηδενικής υπόθεσης και η παραδοχή μιας εναλλακτικής μπορεί να γίνει μόνο όταν η εμφανιζόμενη διαφορά δεν είναι τυχαίας φύσης. Όταν η διαφορά βρίσκεται μέσα στην περιοχή που προβλέπεται από την στατιστική, λόγω της τυχαίας κατανομής των διαφόρων μετρήσεων, η απόρριψη της μηδενικής ή η παραδοχή της εναλλακτικής υπόθεσης μπορεί να γίνει μόνο με τον καθορισμό ορίων στατιστικής βεβαιότητας. Με άλλα λόγια, όταν η διαφορά οφείλεται σε συστηματικό σφάλμα μπορεί η απόρριψη μιας μηδενικής υπόθεσης να γίνει με βεβαιότητα 100%. Μπορεί λοιπόν, να υπολογιστεί η πιθανότητα με την οποία η παρατηρούμενη διαφορά αποδίδεται σε τυχαία σφάλματα. Συνήθως η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται εάν η πιθανότητα που κάνει τη διαφορά να οφείλεται σε τυχαία σφάλματα είναι μικρότερη από 0.05 ή 5%. Τότε λέμε ότι η διαφορά είναι σημαντική στο 0.05 ή 5% επίπεδο (Καραγιάννης Μ.Ι., 1987).

4.1.4 Δοκιμασία student (t-test)

Το 1908 ο Ιρλανδός χημικός W. S. Gosset δημοσίευσε με το ψευδώνυμο “student” μια εργασία στην οποία περιγράφει την κατανομή των μέσων όρων μικρού αριθμού μετρήσεων. Ο Gosset απέδειξε ότι η κατανομή του λόγου της απόκλισης του μέσου όρου \bar{x} από την αληθή τιμή μ προς την τυπική απόκλιση του μέσου όρου σ_x ακολουθεί κανονική κατανομή, μόνο όταν η τυπική απόκλιση της μιας μέτρησης σ είναι δυνατό να υπολογιστεί με βάση τις

αποκλίσεις όλων των τιμών x από την αληθή τιμή, μ . Όταν οι δύο παράμετροι μ και σ είναι άγνωστες, τότε ο λόγος

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s_x} = \frac{\bar{x} - \mu}{s} \cdot \sqrt{n} \quad (\text{εξ. 4.7})$$

ακολουθεί μια κατανομή που λέγεται κατανομή student ή κατανομή t . Οι τιμές της παραμέτρου t δίνονται σε πίνακες και απαντούν στο ερώτημα: Ποια είναι η πιθανότητα p , η τιμή t να είναι μεγαλύτερη από μια τιμή του πίνακα $t_{p,v}$ για ορισμένους βαθμούς ελευθερίας v από εντελώς τυχαίες διακυμάνσεις;

Έτσι από ένα τέτοιο πίνακα (παραρτήματα) βλέπουμε ότι για $v=7$, η πιθανότητα να υπερβαίνει το t την τιμή 3.499 είναι $p=1\%$. Γενικά η κατανομή συχνότητα t ισχύει όταν ο πληθυσμός είναι κανονικός. Δεδομένου ότι οι πληθυσμοί με τους οποίους ασχολούμαστε στη Χημεία είναι κανονικοί ή πλησιάζουν την κανονικότητα, οι μέσοι όροι αποκτούν γρήγορα την κανονική κατανομή (για μικρό αριθμό μετρήσεων).

Πολλές φορές καλούμαστε να αποφασίσουμε αν η διαφορά δύο τιμών είναι στατιστικά σημαντική όπως για παράδειγμα στις περιπτώσεις:

- 1) σύγκριση μεταξύ της μετρηθείσας μέσης τιμής \bar{x} ενός δείγματος και της πραγματικής τιμής ή μέσης τιμής του πληθυσμού μ .
- 2) σύγκριση μεταξύ των μέσων όρων δύο δειγμάτων \bar{x}_A και \bar{x}_B
- 3) σύγκριση μεταξύ των μέσων όρων που μετρήθηκαν με διαφορετικές μεθόδους ή σε διαφορετικά εργαστήρια.

Σ' αυτές τις περιπτώσεις εφαρμόζεται η δοκιμή t και διατυπώνεται μια μηδενική υπόθεση H_0 την οποία πρέπει να αποδεχτούμε ή να απορρίψουμε.

(1) Σύγκριση μέσου όρου \bar{x} με την αληθή τιμή μ

Η δοκιμή αυτή εφαρμόζεται όταν θέλουμε να ελέγξουμε αν μια αναλυτική μέθοδος είναι ακριβής οπότε πρέπει να αποφασίσουμε αν η διαφορά $|\mu - \bar{x}|$ είναι στατιστικά σημαντική ή οφείλεται σε στατιστική ανεπάρκεια επειδή έχουμε περιορισμένο αριθμό μετρήσεων. Ακολουθούμε τα εξής βήματα:

i) Αποφασίζουμε σε ποιο επίπεδο αξιοπιστίας θα γίνει αξιολόγηση π.χ. 96%.

ii) Υπολογίζουμε την παράμετρο $t = \frac{|\mu - \bar{x}|}{s} \cdot \sqrt{n}$

iii) Βρίσκουμε την τιμή της παραμέτρου t για το επιλεγόμενο επίπεδο αξιοπιστίας και για δεδομένο πλήθος μετρήσεων $t_{(p,n)}$.

iv) Συγκρίνουμε την τιμή $t_{(0.05,n)}$ με την τιμή $t_{\text{πειραμ.}}$.

Εάν $t_{\text{πειραμ.}} < t_{(0.05,n)}$ τότε η διαφορά $|\mu - \bar{x}|$ δεν είναι στατιστικά σημαντική και η μέθοδος είναι ακριβής. Αντίθετα εάν $t_{\text{πειραμ.}} > t_{(0.05,n)}$, τότε η διαφορά $|\mu - \bar{x}|$ είναι στατιστικά σημαντική.

(2) Σύγκριση δύο μέσων όρων \bar{x}_A και \bar{x}_B

Για τον έλεγχο της ύπαρξης ή μη συστηματικού σφάλματος, ένας μέσος όρος σειράς μετρήσεων \bar{x}_A συγκρίνεται με ένα δεύτερο μέσο όρο σειράς μετρήσεων \bar{x}_B που προσδιορίστηκε σε διαφορετικό χρόνο ή με διαφορετικό πείραμα ή από διαφορετικό ερευνητή ή με χρήση διαφορετικής τροποποιημένης μεθόδου. Αφού και οι δύο μέσοι όροι είναι δείγματα πληθυσμών θα διαφέρουν ως προς κάποιο βαθμό ακόμα και αν η μέθοδος προσδιορισμού τους δεν έχει συστηματικό σφάλμα. Το κριτήριο της δοκιμής- t γι' αυτή την περίπτωση είναι:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{S} \cdot \sqrt{\frac{n_A \cdot n_B}{n_A + n_B}} \quad (\text{εξ. 4.8})$$

Όπου n_A, n_B ο αριθμός των μετρήσεων για κάθε σειρά και S η τυπική απόκλιση που παριστάνει το τυχαίο σφάλμα που συνδέεται με τη διαφορά.

Η τυπική απόκλιση δίνεται από τη σχέση:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x}_A - x_{iA})^2 + \sum (\bar{x}_B - x_{iB})^2}{n_A + n_B - 2}} \quad \text{ή} \quad s = \sqrt{\frac{(n_A - 1) \cdot s_A^2 + (n_B - 1) \cdot s_B^2}{n_A + n_B - 2}} \quad (\text{εξ. 4.9})$$

Στη συνέχεια ο έλεγχος σημαντικότητας πραγματοποιείται όπως στην περίπτωση (1) για βαθμούς ελευθερίας $\nu = n_A + n_B - 2$.

(3) Σύγκριση δύο σειρών μετρήσεων από διαφορετικές μεθόδους (paired t – test)

Αν n ο αριθμός των ζευγών των δειγμάτων που αναλύονται με τις δύο μεθόδους A και B, D_i η θετική ή αρνητική τιμή των διαφορών $\bar{x}_{iA} - \bar{x}_{iB}$ και \bar{D} ο μέσος όρος όλων των διαφορών D_i , η παράμετρος t υπολογίζεται ως εξής:

$$t = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{S} \cdot \sqrt{\frac{n \cdot (n - 1)}{\sum (D_i - \bar{D})^2}} \quad (\text{εξ. 4.10})$$

Ο έλεγχος σημαντικότητας υπολογίζεται όπως στην περίπτωση (1) για $v = n - 1$ βαθμούς ελευθερίας (Καραγιάννης Μ.Ι., 1987, Δεληγιαννάκης Ι. και Χελά Δ., 2003).

4.1.5 Δοκιμασία F (F – test)

Όταν θέλουμε να ελέγξουμε αν μια μέθοδος A είναι πιο ακριβής από μια μέθοδο B ή αν δύο μέθοδοι A και B διαφέρουν ως προς την ακρίβειά τους χρησιμοποιούμε τη δοκιμή F. Το F – test δίδεται από τη σχέση:

$$F = \frac{s_A^2}{s_B^2} \quad (\text{εξ. 4.11})$$

όπου s_A, s_B οι τυπικές αποκλίσεις των δύο μεθόδων. Στη σχέση αυτή θέτουμε στον αριθμητή την μεγαλύτερη διακύμανση ($s_A^2 > s_B^2$). Η εφαρμογή της δοκιμής F γίνεται ως εξής:

Σχηματίζουμε το λόγο $F = \frac{s_A^2}{s_B^2}$. Αν ο λόγος αυτός είναι ίσος ή μεγαλύτερος από τη θεωρητική τιμή του λόγου $F_{p,(v_A,v_B)}$ που δίνεται από πίνακες (παραρτήματα) για βαθμούς ελευθερίας $v_A = n_A - 1$ και $v_B = n_B - 1$ (για δεδομένο επίπεδο αξιοπιστίας), τότε οι δύο τυπικές αποκλίσεις διαφέρουν σημαντικά. Αν ο λόγος είναι μικρότερος από την κρίσιμη τιμή $F_{p,(v_A,v_B)}$ τότε δεν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά των αποκλίσεων s_A, s_B (Καραγιάννης Μ.Ι., 1987).

4.1.6 Ανάλυση διακύμανσης (Analysis of Variance, ANOVA)

Όταν θέλουμε να συγκρίνουμε τους μέσους όρους δύο σειρών πειραματικών μετρήσεων για να ελέγξουμε αν διαφέρουν σημαντικά, χρησιμοποιούμε τη δοκιμή t ή τη δοκιμή F. Αρκετές φορές όμως χρειάζεται να συγκρίνουμε περισσότερους από δύο μέσους όρους σειρών αποτελεσμάτων υπολογισμού συγκέντρωσης ενός αναλύτη με διαφορετικές μεθόδους. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η διακύμανση των σειρών αποτελεσμάτων οφείλεται σε δύο κύριους παράγοντες: στο τυχαίο σφάλμα και στον ελεγχόμενο παράγοντα.

Σ' αυτές τις περιπτώσεις όπου θέλουμε να γνωρίζουμε:

- ποια διακύμανση οφείλεται στην μεταβολή του ελεγχόμενου παράγοντα και ποια στο τυχαίο σφάλμα
- αν μεταβάλλοντας τον ελεγχόμενο παράγοντα, οι μέσοι όροι των σειρών μετρήσεων διαφέρουν σημαντικά,

εφαρμόζουμε την ανάλυση διακύμανσης.

Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) είναι μια υπερβολικά δυναμική στατιστική τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και την εκτίμηση των διαφορετικών αιτιών διακύμανσης. Χρησιμοποιείται ακόμα και όταν έχουμε περισσότερες της μιας πηγές τυχαίας διακύμανσης. Όταν όμως περιλαμβάνονται πολλοί παράγοντες, η ανάλυση διακύμανσης γίνεται πολύπλοκη. Η πιο απλή εφαρμογή είναι η ταξινόμηση μονής κατεύθυνσης (one-way ANOVA).

Η γενική διεύθυνση των αποτελεσμάτων για (k) τάξεις (treatments) ή δείγματα ή κατηγορίες για καθένα από τα οποία υπάρχουν (n) παρατηρήσεις αναπαρίστανται στο παρακάτω σχήμα.

							Μέση τιμή
Δείγμα 1	X ₁₁	X ₁₂	...	X _{1j}	...	X _{1n}	\bar{x}_1
Δείγμα 2	X ₂₁	X ₂₂	...	X _{2j}	...	X _{2n}	\bar{x}_2

Δείγμα i	X _{i1}	X _{i2}	...	X _{ij}	...	X _{in}	\bar{x}_i

Δείγμα n	X _{n1}	X _{n2}	...	X _{nj}	...	X _{nn}	\bar{x}_n
Συνολική μέση τιμή = \bar{x}							

Σχήμα 4.4. Διεύθυνση αποτελεσμάτων για ανάλυση διακύμανσης

Κατά την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης γίνεται μέτρηση δύο πηγών διακύμανσης στα δεδομένα: της διακύμανσης «μεταξύ των τάξεων (between treatments)» και της διακύμανσης «μέσα στις τάξεις (within treatments)».

(i) Διακύμανση μέσα στις τάξεις

Η διακύμανση για κάθε τάξη (δείγμα) υπολογίζεται από την παράσταση:

$$\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Η συνολική διακύμανση μέσα στις τάξεις για όλα τα δείγματα ονομάζεται $MS_{\text{μέσα}}$: μέσο τετράγωνο μέσα στις τάξεις και υπολογίζεται ως εξής:

$$MS_{\text{μέσα}} = \frac{\sum_i \sum_j (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{k \cdot (n - 1)} \quad (\text{εξ. 4.12})$$

(ii) Διακύμανση μεταξύ των τάξεων

Η μέση διακύμανση των τάξεων (δείγματα), ονομάζεται $MS_{\text{μεταξύ}}$: μέσο τετράγωνο μεταξύ των τάξεων και υπολογίζεται από την παράσταση:

$$MS_{\text{μεταξύ}} = n \cdot \frac{\sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{k-1} \quad (\text{εξ. 4.13})$$

έτσι η σημαντικότητα μιας πηγής διακύμανσης έναντι μιας άλλης μπορεί να προσδιοριστεί με την εφαρμογή της διακύμανσης F ως εξής:

$$F = \frac{MS_{\text{μεταξύ}}}{MS_{\text{μέσα}}} \quad (\text{εξ. 4.14})$$

Τότε η πειραματική τιμή F συγκρίνεται με την τιμή F που προκύπτει από πίνακες στην επιθυμητή στάθμη εμπιστοσύνης (Miller, J.N., 2005).

Πίνακας 4.2 Πίνακας ανάλυσης διακύμανσης για k τάξεις και n παρατηρήσεις

Πηγή διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	F	p ^a
Μεταξύ τάξεων	SS _{μεταξύ}	k-1	MS _{μεταξύ}	$\frac{MS_{\text{μεταξύ}}}{MS_{\text{μέσα}}}$	
Μέσα στις τάξεις	SS _{μέσα}	k (n-1)	MS _{μέσα}		
Σύνολο	SS _{συνολικό}	kn-1	MS _{συνολικό}		

^a επίπεδο σημαντικότητας για τη δοκιμασία F, αντιπροσωπεύει την πιθανότητα του σφάλματος κατά την αποδοχή ενός αποτελέσματος ως έγκυρο (γενικά, επίπεδο p<0,05 θεωρείται ως αποδεκτό επίπεδο σφάλματος)

Για τον υπολογισμό των βαθμών ελευθερίας του πίνακα, ισχύει:

$$dF_{\text{μεταξύ}} = \text{αριθμός τάξεων} - 1 = k - 1$$

$$dF_{\text{μέσα}} = [\text{αριθμός τάξεων} \cdot (\text{αριθμός παρατηρήσεων} - 1)] = k \cdot (n - 1)$$

$$dF_{\text{ολικό}} = k \cdot n - 1$$

4.2 Βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων

Εισαγωγή

Η απόκριση ενός συστήματος μέτρησης (δηλαδή το αποτέλεσμα ή η τιμή που εξάγεται από ένα πείραμα) σε πολλές αναλυτικές τεχνικές εξαρτάται από ελεγχόμενους πειραματικούς παράγοντες ή παραμέτρους (factors), δηλαδή από κατηγοριοποιημένες μεταβλητές οι οποίες μελετώνται σε ένα πείραμα. Για παράδειγμα, η άμεση ή έμμεση μέτρηση του ρυθμού μιας αντίδρασης επηρεάζει τον προσδιορισμό ενός ενζύμου. Τότε για ένα συγκεκριμένο πείραμα, ο ρυθμός αντίδρασης εξαρτάται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η ιονική ισχύς, η χημική σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος, η συγκέντρωση του ενζύμου, κ.α. Είναι απαραίτητο να καθοριστούν επίπεδα (levels), δηλαδή διαφορετικές τιμές στους ανωτέρω παράγοντες ώστε να εξασφαλιστεί ότι ο ρυθμός αντίδρασης θα είναι όσο το δυνατόν κοντά στον επιθυμητό βαθμό. Η διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων επιπέδων των πειραματικών παραγόντων, ονομάζεται **βελτιστοποίηση της μεθόδου** (optimization). Οι κύριοι στόχοι της βελτιστοποίησης μιας μεθόδου περιλαμβάνουν:

- (i) την εύρεση όλων των πειραματικών παραγόντων που επηρεάζουν την απόκριση του συστήματος μέτρησης
- (ii) τον προσδιορισμό και την κατηγοριοποίηση των παραγόντων που έχουν κύρια (main effect) και μερική (little effect) επίδραση στην απόκριση.
- (iii) τον συνυπολογισμό των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων στον προσδιορισμό της βέλτιστης απόκρισης.

Η διαδικασία βελτιστοποίησης μιας μεθόδου προσδιορίζει κατάλληλες πειραματικές συνθήκες που επιφέρουν τη βέλτιστη απόκριση ή τουλάχιστον απόκριση κοντά στη βέλτιστη περιοχή και επιθυμείται αυτή να επιτυγχάνεται με το μικρότερο δυνατό αριθμό πειραματικών σταδίων (Brereton).

Γενικά, ακολουθούνται δύο προσεγγίσεις για την βελτιστοποίηση μεθόδου: η προσέγγιση της μεταβολής ενός παράγοντα κάθε φορά και η προσέγγιση της χρήσης παραγοντικών σχεδιασμών. Θα αναφερθούμε αναλυτικά στη δεύτερη προσέγγιση.

4.2.1 Πειραματικό σχέδιο (experimental design)

Ο όρος «πειραματικό σχέδιο» ή «παραγοντικός σχεδιασμός» χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει μια διαδικασία που γίνεται για να:

- i) προσδιοριστούν οι παράμετροι που επηρεάζουν το αποτέλεσμα ενός πειράματος

- ii) σχεδιαστεί ένα πείραμα που δεν θα υφίσταται την επίδραση μη – ελεγχόμενων παραγόντων
- iii) διακριθούν και προσδιοριστούν οι επιδράσεις των μελετώμενων παραγόντων με τη χρήση στατιστικής ανάλυσης στο αποτέλεσμα.

Πρακτικά, προσδιορίζονται οι παράγοντες (ποσοτικοί ή ποιοτικοί) και τα επίπεδά τους (με βάση προϋπάρχουσες μελέτες) και στη συνέχεια μελετάται ο κατάλληλος συνδυασμός των επιπέδων και ο αριθμός των πειραμάτων. Λεπτομερειακή περιγραφή ανάπτυξης ενός πειραματικού σχεδίου θα δοθεί παρακάτω.

Κάθε πειραματικό σχέδιο διέπεται από τις εξής βασικές αρχές:

1. Λήψη πλήρως τυχαιοποιημένων δεδομένων (Randomization)

Πρόκειται για τον τυχαίο προσδιορισμό πειραματικών συνδυασμών των επιπέδων των παραγόντων πριν την έναρξη του πειράματος. Έτσι αποφεύγεται η πιθανότητα για αποτελέσματα με συστηματικά σφάλματα και επιτυγχάνεται έγκυρη ερμηνεία της απόκρισης ώστε να χρησιμοποιηθεί για στατιστικές δοκιμές σημαντικότητας.

2. Επανάληψη (Replication)

Για δεδομένο πειραματικό συνδυασμό χρησιμοποιείται:

- για να υπολογιστεί η τυχαία διακύμανση των πειραματικών αποτελεσμάτων (επαναλήψιμο αποτέλεσμα).
- για τη διασφάλιση των αποτελεσμάτων από απρόβλεπτα σφάλματα.
- για την εκτίμηση του πειραματικού σφάλματος

3. Πειράματα σε μπλοκ (Blocking)

Όταν οι επαναλήψεις των μετρήσεων δεν μπορούν να διεξαχθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, για παράδειγμα όταν γίνονται σε διαφορετικές ημέρες ή το υλικό δεν επαρκεί για όλες τις επαναλήψεις, τότε δημιουργούνται ομάδες με ομοειδή δεδομένα (blocks). Αναπτύσσεται έτσι το πλήρες τυχαιοποιημένο σχέδιο σε μπλοκ (randomized block design).

Η σχέση μεταξύ των παραγόντων και της απόκρισης μέσα σε ένα δεδομένο σύστημα, εκφράζεται μαθηματικά ως εξής:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (\text{εξ. 4.15})$$

όπου y είναι η απόκριση στο σύστημα και $x_1 \dots x_k$ είναι οι παράγοντες που επιδρούν στην απόκριση όταν οι τιμές τους μεταβάλλονται.

Η επιλογή ενός πειραματικού σχεδιασμού εξαρτάται από τους στόχους του πειραματιστή και τον αριθμό των υπό έλεγχο παραγόντων. Διακρίνονται τρεις βασικές κατηγορίες πειραματικών σχεδιασμών:

- το πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο
- το τυχαιοποιημένο σχέδιο σε μπλοκ
- το ιεραρχικό σχέδιο

Στις δύο πρώτες περιπτώσεις οι παράγοντες διασταυρώνονται, δηλαδή κάθε επίπεδο ενός παράγοντα συνδέεται με όλα τα επίπεδα του άλλου παράγοντα. Στην τρίτη περίπτωση, ο ένας παράγοντας είναι ένθετος του άλλου, δηλαδή όλα τα επίπεδα του ενός παράγοντα συνδέονται με ένα επίπεδο του άλλου παράγοντα.

Οι κυριότεροι πειραματικοί σχεδιασμοί είναι:

- (i) το πλήρως παραγοντικό σχέδιο (full factorial design)
- (ii) το κλασματικό παραγοντικό σχέδιο (fractional factorial design)
- (iii) το σχέδιο Plackett – Burman
- (iv) τα Λατινικά και Έλληνο – Λατινικά τετράγωνα (Latin – Latin/Grec squares)
- (v) τα σχέδια επιφανειών απόκρισης
 - central composite design
 - Box – Behnken design
- (vi) τα ειδικά σχέδια
 - D – optimal design
 - μικτά σχέδια
- (vii) τα πλήρως ένθετα ή ιεραρχικά σχέδια (fully nested / hierarchical designs) (Hanrahan G. et al (2005), Araujo P. W. (1)/(2)/(3) (1996)).

4.2.2 Χρήση παραγοντικών σχεδιασμών στη διαδικασία βελτιστοποίησης πειραματικών συνθηκών

4.2.2.1 Χρήση των πειραματικών σχεδίων στην αναλυτική χημεία

Στην αναλυτική χημεία τα πειραματικά σχέδια χρησιμοποιούνται για τη διαλογή παραγόντων που επηρεάζουν τα αναλυτικά αποτελέσματα, για τη βελτιστοποίηση μιας αναλυτικής μεθόδου και για την ποσοτικοποίηση (συσχέτιση) αναλυτικών αποτελεσμάτων.

Το στάδιο της διαλογής παραγόντων αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο στον αποτελεσματικό προσδιορισμό των παραγόντων που επιδρούν στην απόκριση ενός πειράματος. Κατά τη διάρκειά του προσδιορίζονται και ταυτοποιούνται οι παράγοντες που έχουν κύρια επίδραση στην απόκριση. Γι' αυτό το σκοπό, εφαρμόζονται τα πλήρως και μερικώς παραγοντικά σχέδια. Ακολούθως, κάνοντας χρήση διαφορετικών πειραματικών σχεδίων (σχέδια

επιφανειών απόκρισης, ειδικά σχέδια) η απόκριση των πειραμάτων μιας αναλυτικής μεθόδου μπορεί να βελτιωθεί (βελτιστοποίηση) ως συνάρτηση μερικών πειραματικών παραγόντων που επιλέχθηκαν κατά το προηγούμενο στάδιο της διαλογής.

Έτσι, καθορίζονται βέλτιστες τιμές παραγόντων ή οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Τελικά, τα ποσοτικά δεδομένα μπορούν να επεξεργαστούν και να συσχετιστούν με χρήση πειραματικών σχεδίων όπως μερικό ελάχιστο τετράγωνο (PLS), βασική συσχέτιση συστατικών (PCR), βασική ανάλυση συστατικών (PCA), τα Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα, κ.α. (Feinberg M. H. et al (1991), Trepate-Pere E. et al (2006), Sotelo M. F. et al (2008)).

4.2.2.2 Πλήρως παραγοντικό σχέδιο

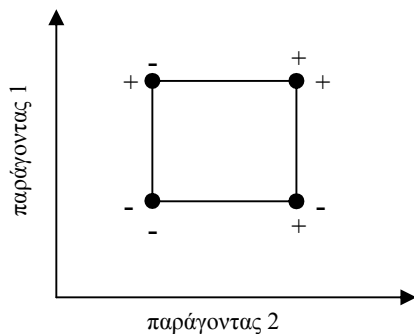
Το πλήρως παραγοντικό σχέδιο αποτελείται από έναν αριθμό πειραμάτων όπου όλα τα επίπεδα ενός παράγοντα συνδυάζονται με όλα τα επίπεδα όλων των άλλων παραγόντων. Ένα τέτοιο σχέδιο περιγράφεται ως K^N όπου K είναι ο αριθμός των επιπέδων των παραγόντων και N ο αριθμός των παραγόντων που μελετώνται σε αριθμό πειραμάτων ίσο με K^N . Ως παράδειγμα, για το πιο απλό πειραματικό σχέδιο 2^2 , διεξάγονται $2^2=4$ πειράματα όπου 2 παράγοντες μεταβάλλονται σε δύο επίπεδά τους. Γι' αυτό το σχεδιασμό (σχεδιασμός δύο επιπέδων), αλλά και για κάθε άλλο, το χαμηλό επίπεδο συμβολίζεται με το πρόσημο “-” ή “-1”, ενώ το υψηλό με το πρόσημο “+” ή “+1”.

Οπότε οι 4 πειραματικές δοκιμές έχουν ως εξής:

Αριθμός πειράματος	Παράγοντας 1	Παράγοντας 2	Απόκριση
1	+1	+1	y_1
2	+1	-1	y_2
3	-1	+1	y_3
4	-1	-1	y_4

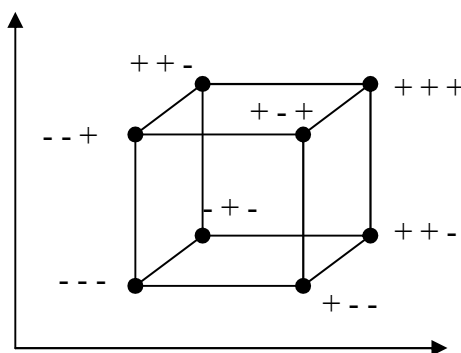
Το χαμηλό και υψηλό επίπεδο των παραγόντων αποτελούν το κατώτατο και ανώτατο όριο της περιοχής μελέτης της μεταβολής του κάθε παράγοντα.

Εάν ο σχεδιασμός του σχεδίου προβλέπει τη μελέτη τριών επιπέδων των παραγόντων, τότε το κεντρικό επίπεδο συμβολίζεται ως “0”. Η γραφική αναπαράσταση στο χώρο του ανωτέρω 2^2 σχεδίου, είναι ένα τετράγωνο.



Σχήμα 4.5 Πλήρως παραγοντικό σχέδιο δύο παραγόντων σε δύο επίπεδα, $2^2 = 4$ πειράματα.

Για ένα σχέδιο με τρεις παράγοντες (2^3) ορίζεται ένας κύβος στο χώρο.



Σχήμα 4.6 Πλήρως παραγοντικό σχέδιο τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα, $2^3 = 8$ πειράματα.

Το πλήρως παραγοντικό σχέδιο είναι ένα ισορροπημένο σχέδιο, δηλαδή επιτρέπει την εκτίμηση της επίδρασης ενός παράγοντα ανεξάρτητα από όλες τις άλλες επιδράσεις.

Η επίδραση (effect) ενός παράγοντα είναι η μεταβολή στην απόκριση, η οποία επέρχεται λόγω της μεταβολής στο επίπεδο του παράγοντα. Όταν ένας παράγοντας εξετάζεται μόνο σε δύο επίπεδα, η επίδραση είναι απλώς η διαφορά μεταξύ της μέσης απόκρισης όλων των δοκιμών που γίνονται με τον παράγοντα στο χαμηλό επίπεδο (-1) και εκείνης όλων των δοκιμών με τον παράγοντα στο υψηλό επίπεδο (+1). Αυτή είναι και η κύρια επίδραση (main effect) του παράγοντα. Αν η επίδραση ενός παράγοντα είναι διαφορετική σε διαφορετικά επίπεδα ενός άλλου παράγοντα, τότε υπάρχει αλληλεπίδραση (interaction) μεταξύ των δύο παραγόντων (Hanrahan G. et al (2005), Araujo P. W. et al (1) (1996), Αγατζίνη-Λεονάρδου, 1983).

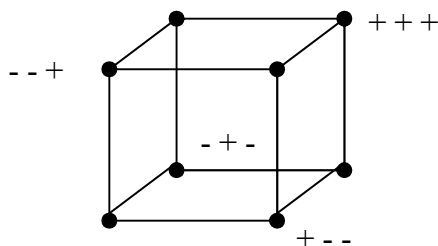
Η ανάλυση του σχεδίου γίνεται με κατάλληλη εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Pena A., et al 2006).

Πίνακας 4.3 Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για πειραματικό σχέδιο δύο παραγόντων.

Πηγή διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο
Παράγοντας A	SS_A	a-1	$MS_A = \frac{SS_A}{a-1}$
Παράγοντας B	SS_B	b-1	$MS_B = \frac{SS_B}{b-1}$
Αλληλεπίδραση AxB	SS_{AB}	(a-1)(b-1)	$MS_{AB} = \frac{SS_{AB}}{(a-1)(b-1)}$
Σφάλμα $\epsilon_{k(ij)}$	SS_E	ab(n-1)	$MS_E = \frac{SS_E}{ab(n-1)}$
Σύνολο	SS_T	abn-1	

4.2.2.3 Κλασματικό παραγοντικό σχέδιο

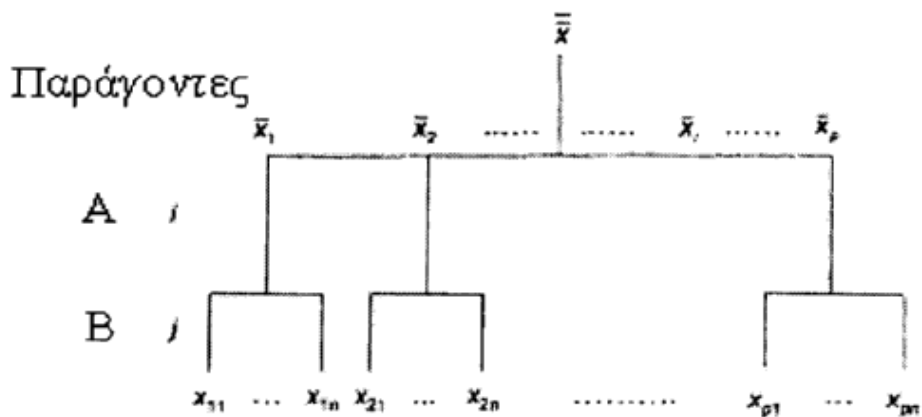
Όταν ο αριθμός των υπό έλεγχο παραγόντων είναι μεγαλύτερος από τρεις, αυξάνεται αισθητά ο αριθμός των πειραματικών δοκιμών. Σ' αυτές τις περιπτώσεις θεωρούμε ότι οι αλληλεπιδράσεις παραγόντων τριών (μεταξύ 3 παραγόντων) ή παραπάνω κατευθύνσεων είναι πολύ μικρότερες ή πολύ λιγότερο σημαντικές σε σχέση με τις κύριες επιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις δύο κατευθύνσεων (μεταξύ δύο παραγόντων). Προκειμένου τότε να εκτιμηθούν οι κύριες επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις δύο παραγόντων, επιλέγεται κατάλληλο κλάσμα από όλους τους πιθανούς συνδυασμούς αλληλεπιδράσεων των τριών παραγόντων και γίνεται ανάλυση του σχεδίου. Αυτό το «νέο» σχέδιο ονομάζεται κλασματικό παραγοντικό σχέδιο και αποτελεί ένα προσεκτικά καθορισμένο και αντιπροσωπευτικό υποσύνολο ενός πλήρους παραγοντικού σχεδίου. Σ' αυτό το σχέδιο, ο αριθμός των πειραμάτων μειώνεται κατά ένα αριθμό p , δηλαδή αριθμούνται σε K^{N-p} , ενώ συνήθως χρησιμοποιείται το κλασματικό σχέδιο στο οποίο τα πειράματα μειώνονται ακριβώς στο μισό ($p=1$).

**Σχήμα 4.7** Κλασματικό παραγοντικό σχέδιο τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα, $2^{3-1} = 4$ πειράματα.

Μειονέκτημα αυτού του τύπου σχεδίου αποτελεί το γεγονός ότι δεν μπορεί να εκτιμηθεί η ανεξάρτητη επίδραση ορισμένων παραγόντων (Araujo P. W. et al (1) 1996).

4.2.2.4 Πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο ή ιεραρχικό

Σ' αυτό το είδος σχεδίου τα επίπεδα ενός παράγοντα είναι ένθετα ή υποσύνολα των επιπέδων των άλλων παραγόντων. Ο αριθμός των επιπέδων του ένθετου παράγοντα δεν είναι απαραίτητο να είναι ίδιος με τον αριθμό επιπέδων των άλλων παραγόντων, ενώ δεν υπάρχουν πια αλληλεπιδράσεις διότι τα επίπεδα των παραγόντων δεν διασταυρώνονται. Ένα τέτοιο σχέδιο αναπαρίσταται στο σχήμα:



Σχήμα 4.8 Πλήρως ένθετο σχέδιο δύο παραγόντων

Σ' ένα τέτοιο σχέδιο οι παράγοντες που επηρεάζονται από συστηματικές μεταβολές πρέπει να τοποθετούνται σε υψηλότερο επίπεδο από τους παράγοντες που επηρεάζονται από τυχαίες μεταβολές (Maroto A. et al, 1999). Η ανάλυση του σχεδίου αυτού γίνεται με τη χρήση ανάλυσης διακυμάνσεων (ANOVA).

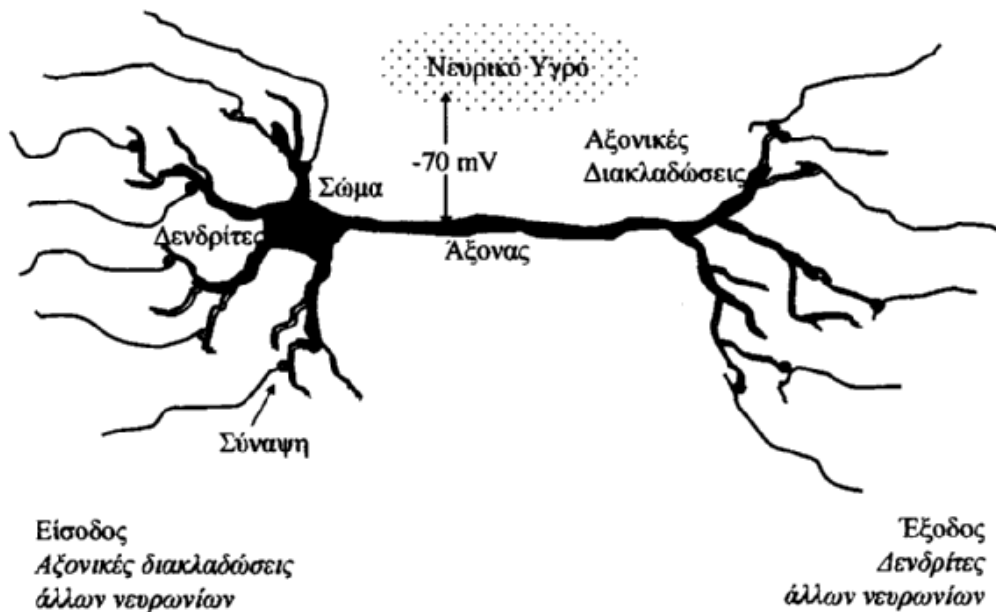
Πίνακας 4.4 Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για ένα ένθετο πειραματικό σχέδιο.

Πηγή διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσα τετράγωνα
Παράγοντας A_i	SS_A	$a-1$	$MS_A = \frac{SS_A}{a-1}$
Παράγοντας $B_{j(i)}$	SS_B	$a(b-1)$	$MS_B = \frac{SS_B}{a(b-1)}$
Σφάλμα $\epsilon_{k(ij)}$	SS_E	$ab(n-1)$	$MS_E = \frac{SS_E}{ab(n-1)}$
Σύνολο	SS_T	$abn-1$	

4.3 Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks, ANNs)

4.3.1 Γενικά στοιχεία

Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα είναι εμπνευσμένα από τη βιολογία και αποτελούνται από στοιχεία (τεχνητοί νευρώνες) τα οποία συμπεριφέρονται κατά τρόπο ανάλογο των πιο στοιχειωδών λειτουργιών των βιολογικών κυττάρων. Πρόκειται για μια αρχιτεκτονική δομή (δίκτυο) αποτελούμενη από πλήθος διασυνδεδεμένων μονάδων (τεχνητοί νευρώνες).



Σχήμα 4.9 Βασική δομή νευρικού κυττάρου

Η ενασχόληση με τα νευρωνικά δίκτυα ξεκίνησε με την πρωτοποριακή δουλειά των McCulloch και Pitts, 1943 η οποία περιέγραφε το «λογικό λογισμό των νευρωνικών δικτύων». Στη συνέχεια (1949) ο Hebb, με το βιβλίο του «The organization of Behavior» πρότεινε ότι η συνδετικότητα του εγκεφάλου συνεχώς αλλάζει καθώς ο οργανισμός μαθαίνει διάφορες εργασίες και ότι οι νευρωνικοί συγκεντρωτές δημιουργούνται από τέτοιες αλλαγές. Επίσης πρότεινε το αίτημα μάθησης σύμφωνα με το οποίο η αποτελεσματικότητα μιας σύναψης μεταβλητής ανάμεσα σε δύο νευρώνες αυξάνεται με την επανάληψη του ενός νευρώνα από τον άλλο κατά μήκος της σύναψης. Οι Rochester, Holland, Habit, Duda (1956) έκαναν την πρώτη προσπάθεια χρήσης υπολογιστή που χρησιμοποιεί την εξομοίωση για να ελεγχθεί μια καλά σχηματισμένη νευρωνική θεωρία (Λυκοθανάσης Σ., 2003).

Τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (ΤΝΔ) αποτελούν μια προσπάθεια προσέγγισης της λειτουργίας του ανθρώπινου εγκεφάλου από μια μηχανή. Στο δίκτυο των ΤΝΔ, κάθε

νευρώνας έχει πολλές εισόδους αλλά μια μόνο έξοδο, η οποία με τη σειρά της μπορεί να αποτελέσει είσοδο για άλλους νευρώνες. Οι συνδέσεις μεταξύ νευρώνων διαφέρουν ως προς τη σημαντικότητά τους η οποία προσδιορίζεται από το συντελεστή βάρους (σύναψη). Η επεξεργασία κάθε νευρώνα καθορίζεται από τη συνάρτηση μεταφοράς, η οποία καθορίζει την κάθε έξοδο σε σχέση με τις εισόδους και τους συντελεστές βάρους.

Για να χρησιμοποιηθεί ένα ΤΝΔ πρέπει πρώτα να εκπαιδευτεί για να μάθει. Με τη διαδικασία της μάθησης προσδιορίζονται οι κατάλληλοι συντελεστές βάρους ώστε το ΤΝΔ να εκτελεί τους επιθυμητούς υπολογισμούς με τη βοήθεια αλγορίθμων που ονομάζονται κανόνες μάθησης ή αλγόριθμοι εκπαίδευσης. Οι τιμές των βαρών των συνδέσεων αποτελούν τη γνώση που είναι αποθηκευμένη στο δίκτυο και καθορίζουν τη λειτουργικότητά του. Έτσι, τα ΤΝΔ μαθαίνουν το περιβάλλον τους, δηλαδή το φυσικό μοντέλο που παρέχει τα δεδομένα.

4.3.2 Από τα βιολογικά στα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα

Ο εγκέφαλος είναι ένας πολύπλοκος, μη γραμμικός και παράλληλος υπολογιστής, έχοντας τη δυνατότητα να οργανώνει τους νευρώνες έτσι ώστε να εκτελεί συγκεκριμένους υπολογισμούς πολύ πιο γρήγορα από τους πιο γρήγορους ψηφιακούς υπολογιστές. Οι ιδιότητες του αυτές οφείλονται στην ικανότητά του να κατασκευάζει κανόνες (εμπειρία) η οποία μεγαλώνει με την πάροδο του χρόνου. Κατά τα δύο πρώτα χρόνια ζωής μας έχουμε τη μέγιστη ανάπτυξη όπου δημιουργούνται περίπου ένα εκατομμύριο συνάψεις το δευτερόλεπτο (Λυκοθανάσης Σ., 2003). Στον ανθρώπινο εγκέφαλο υπάρχουν περίπου 3×10^{10} νευρώνες, ενώ κάθε νευρώνας διαθέτει κατά μέσο όρο 10000 συνάψεις (εισόδους) και 500 συναπτικές απολήξεις (εξόδους). Το ανθρώπινο κεντρικό νευρικό σύστημα αποτελείται από 10^{15} συναπτικές συνδέσεις περίπου.

Οι βασικές ιδιότητες των βιολογικών νευρώνων είναι (Σπύρου 1997):

- είναι απλές δομικές μονάδες
- παρουσιάζουν ομοιόμορφη αρχιτεκτονική
- πραγματοποιούν παράλληλα κατανεμημένη επεξεργασία
- εμφανίζουν ταχύτητα επεξεργασίας και απόκρισης της τάξης των msec
- επιδεικνύουν αξιόπιστη λειτουργία ακόμη και για θορυβώδη, ασαφή ή ημιτελή δεδομένα
- εμφανίζουν ικανότητα λειτουργίας και σε συνθήκες βλάβης
- έχουν τη δυνατότητα της αποθήκευσης και της ανάκλησης των πληροφοριών βάσει συσχετισμών

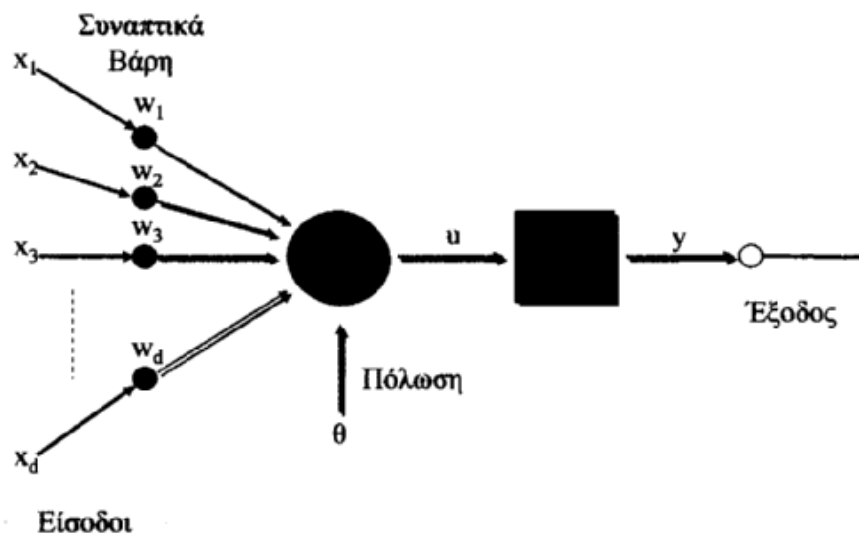
- επιδεικνύουν προσαρμογή (ένα σύστημα για κάθε χρήση)

Οι τεχνητοί νευρώνες είναι οργανωμένοι κατά τέτοιο τρόπο ώστε να προσομοιώνουν την ανατομία του ανθρώπινου εγκεφάλου, επιτυγχάνοντας να προσεγγίσουν μεγάλο αριθμό χαρακτηριστικών της δομής και της λειτουργίας του. Για παράδειγμα, μαθαίνουν χρησιμοποιώντας την εμπειρία που έχουν συσσωρεύσει, έχουν την ικανότητα γενίκευσης από προηγούμενα παραδείγματα σε νέα, μπορούν να επεξεργαστούν μια ομάδα δεδομένων και να ξεχωρίσουν απ' αυτά τα πιο ουσιώδη χαρακτηριστικά (Λυκοθανάσης Σ., 2003). Έτσι:

Ένα ΝΔ είναι ένας συμπαγής παράλληλος κατανεμημένος επεξεργαστής, που έχει τη φυσική κλίση να αποθηκεύει εμπειριστατωμένη γνώση και να την κάνει διαθέσιμη για χρήση. Οι δύο κύριες ομοιότητες του εγκεφάλου με ένα ΤΝΔ συνοψίζεται ως εξής:

- Η γνώση αποκτάται από το δίκτυο μέσα από διαδικασία μάθησης.
- Οι δυνάμεις σύνδεσης των νευρώνων (συναπτικά βάρη) χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση της γνώσης.

Σε πλήρη αντιστοιχία με το απλοποιημένο μοντέλο βιολογικού νευρώνα του σχήματος 4.9 αναπτύχθηκε το μοντέλο του τεχνητού νευρώνα.



Σχήμα 4.10 Βασική δομή τεχνητού νευρώνα

Ένας τεχνητός νευρώνας είναι μια μονάδα επεξεργασίας πληροφορίας. Τα τρία βασικά στοιχεία του είναι:

- Ένα σύνολο από συνάψεις, καθεμιά από τις οποίες χαρακτηρίζεται από ένα «βάρος» ή «δύναμη». Συγκεκριμένα, ένα σήμα x_j στην είσοδο της σύναψης j που συνδέεται στον νευρώνα k , πολλαπλασιάζεται με το συναπτικό βάρος w_{kj} .

ii) Έναν αθροιστή για την πρόσθεση των σημάτων εισόδου που παίρνουν βάρος από την αντίστοιχη σύναψη.

iii) Μια συνάρτηση ενεργοποίησης για τη μείωση του εύρους της εξόδου του νευρώνα.

Το μοντέλο του τεχνητού νευρώνα περιλαμβάνει ακόμα ένα εξωτερικό εφαρμοζόμενο κατώφλι θ_k που έχει επίδραση στην ελάττωση της εισόδου στην εφαρμοζόμενη συνάρτηση ενεργοποίησης και αναφέρεται συχνά ως πόλωση (bias). Με μαθηματικούς όρους, ένας νευρώνας περιγράφεται με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$u_k = \sum_{j=1}^p w_{kj} * x_j \quad (\text{εξ. 4.16}) \quad \text{και} \quad y_k = \phi(u_k - \theta_k) \quad (\text{εξ. 4.17})$$

Το u_k είναι η γραμμική συνδυαστική έξοδος του νευρώνα, το $\phi(u_k - \theta_k)$ είναι η συνάρτηση ενεργοποίησης και το y_k είναι το σήμα εξόδου του νευρώνα (πραγματική έξοδος). Η συνάρτηση ενεργοποίησης $\phi(u_k - \theta_k)$ ορίζει την έξοδο ενός νευρώνα συναρτήσει του επιπέδου ενεργοποίησης της εισόδου. Υπάρχουν 3 βασικοί τύποι συναρτήσεων ενεργοποίησης:

- i) Συνάρτηση κατωφλιού
- ii) Τμηματικά γραμμική συνάρτηση
- iii) Σιγμοειδής

Η σιγμοειδής είναι η πιο συνηθισμένη μορφή με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη λογιστική συνάρτηση:

$$\phi(u) = \frac{1}{1 + \exp(-au)} \quad (\text{εξ. 4.18})$$

Αυτή η μορφή συνάρτησης ενεργοποίησης είναι μη γραμμική και χρησιμοποιείται για να μπορεί να μοντελοποιεί μη γραμμικά φαινόμενα.

4.3.3 Βασικά χαρακτηριστικά των τεχνητών νευρωνικών δικτύων

Τα βασικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν τη δομή ενός ΤΝΔ είναι:

i) Οι υπολογιστικές μονάδες

Διακρίνονται στις μονάδες εισόδου, στις κρυμμένες (hidden) μονάδες και στις μονάδες εξόδου, οι οποίες ομαδοποιούνται ανά κατηγορία σε επίπεδα ή στρώματα (layers). Οι κρυμμένες μονάδες δεν έχουν συνδέσεις με τον εξωτερικό κόσμο. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη πειράματος βαθμονόμησης, οι μονάδες εισόδου θα μπορούσαν να είναι οι τιμές απορρόφησης ενός αναλύτη σε ένα μήκος κύματος και οι μονάδες εξόδου η συγκέντρωση του αναλύτη. Η σημειογραφία ενός ΤΝΔ έχει ως εξής: (είσοδοι: κρυμμένα επίπεδα: έξοδοι) π.χ.

3:5:1 για ένα ΤΝΔ με 3 εισόδους, 5 κρυμμένα επίπεδα, 1 έξοδο (Huitao L. et al (2002), Garcia S. F. et al (2004)).

ii) Οι συνάψεις – βάρη

Ο καθορισμός των παραμέτρων του δικτύου (τιμών βαρών) για να επιτελεστεί η συγκεκριμένη λειτουργία που επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας της μάθησης.

iii) Η μάθηση

Πρόκειται για την ικανότητα του ΤΝΔ να μαθαίνει από το περιβάλλον του και έτσι να βελτιώνει την απόδοσή του μέσω της μάθησης. Η βελτίωση αυτή γίνεται σταδιακά με το χρόνο και με καθορισμένο μέτρο. Η μάθηση επιτυγχάνεται μέσω μιας επαναληπτικής διαδικασίας ρυθμίσεων της τιμής των συναπτικών βαρών και των κατωφλίων. Ο αντικειμενικός στόχος της διαδικασίας μάθησης είναι να αναπτύξει ένα ΤΝΔ κατάλληλη εσωτερική δομή ώστε να αναγνωρίζει πρότυπα που θα μοιάζουν με αυτά τα οποία εκπαιδεύτηκε.

iv) Η αρχιτεκτονική

Ο τρόπος δόμησης των νευρώνων ενός ΤΝΔ συνδέεται με τον αλγόριθμο εκμάθησης που χρησιμοποιείται για την εκπαίδευση του δικτύου. Διακρίνονται στα δίκτυα εμπρός τροφοδότησης, στα οποία τα σήματα κατευθύνονται από την είσοδο στην έξοδο και ανάδρασης όταν οι έξοδοι κάποιων νευρώνων γίνονται εισοδοί νευρώνων προηγούμενων επιπέδων.

Υπάρχουν 4 κλάσεις αρχιτεκτονικών δομών:

- Ενός επιπέδου – εμπρός τροφοδότησης δίκτυα

Οι νευρώνες είναι οργανωμένοι σε μορφή επιπέδων και πάντοτε δείχνουν στους νευρώνες του επόμενου επιπέδου.

- Πολλαπλών επιπέδων – εμπρός τροφοδότησης δίκτυο

Υπάρχουν περισσότερα του ενός κρυφά επίπεδα με κρυφούς νευρώνες. Οι νευρώνες σε κάθε επίπεδο έχουν ως εισόδους τα σήματα εξόδου του προηγούμενου μόνο επιπέδου.

- Αναδρομικά δίκτυα (π.χ. δίκτυο Hopfield)
- Δικτυωτές δομές

4.3.4 Θεωρία της μάθησης (εκπαίδευση)

Σύμφωνα με τον ορισμό των Mendel και McClaren (Λυκοθανάσης Σ., 2003): μάθηση είναι μια διαδικασία με την οποία προσαρμόζονται οι ελεύθερες παράμετροι ενός ΤΝΔ μέσω μιας συνεχούς διαδικασίας διέγερσης από το περιβάλλον, στο οποίο βρίσκεται το δίκτυο. Το είδος της μάθησης καθορίζεται από τον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιούνται οι αλλαγές των παραμέτρων. Με άλλα λόγια πρόκειται για την τροποποίηση των βαρών του ΤΝΔ ώστε χρησιμοποιώντας ένα σύνολο δεδομένων να πλησιάσουμε σταδιακά την επιθυμητή συμπεριφορά συγκρίνοντας την τρέχουσα απόκριση του δικτύου με την επιθυμητή απόκριση.

Σύμφωνα με τον πρώτο ορισμό, για τη μάθηση ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- Το νευρωνικό δίκτυο «διεγείρεται» από ένα περιβάλλον.
- Υφίσταται αλλαγές σαν συνέπεια αυτής της διέγερσης.
- «Απαντά» με έναν καινούριο τρόπο στο περιβάλλον, λόγω των αλλαγών που συνέβησαν στην εσωτερική του δομή.

Έτσι, αν $w_{kj}(n)$ η τιμή του βάρους σύνδεσης w_{kj} τη χρονική στιγμή n , και $w_{kj}(n+1)$ η τιμή του βάρους σύνδεσης w_{kj} τη χρονική στιγμή $(n+1)$, προκύπτει:

$$w_{kj(n+1)} = w_{kj(n)} + \Delta w_{kj(n)} \quad (\text{εξ. 4.19})$$

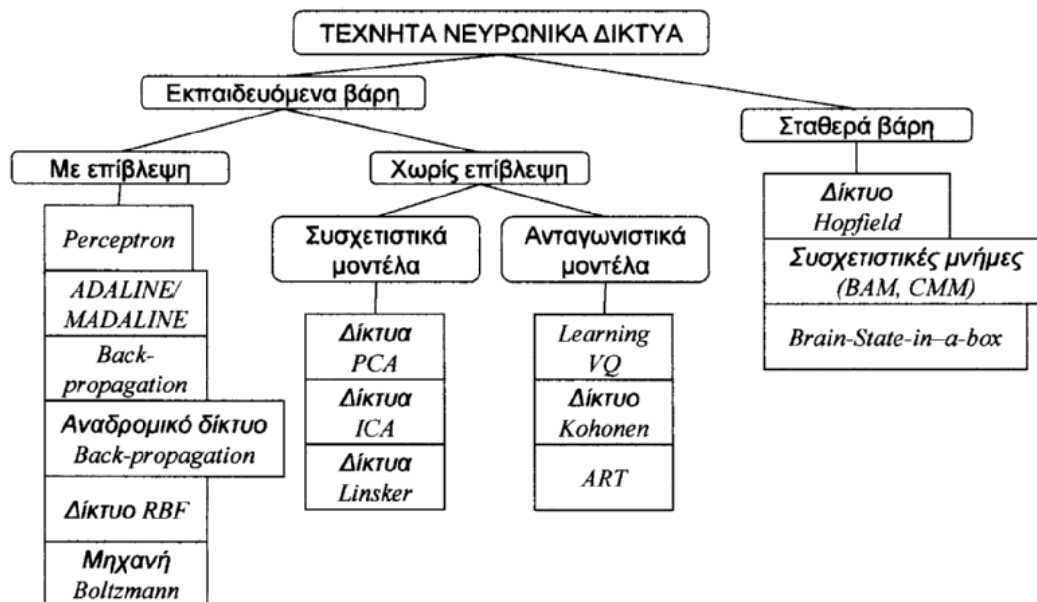
όπου $\Delta w_{kj}(n)$ μια ρύθμιση στο βάρος w_{kj} (διόρθωση).

Για τη λύση ενός προβλήματος μάθησης χρησιμοποιείται ένα καθορισμένο σύνολο από καλά ορισμένους κανόνες που καλείται αλγόριθμος μάθησης (learning algorithm). Υπάρχουν αρκετά είδη αλγορίθμων μάθησης που διαφέρουν ως προς τον τρόπο έκφρασης της ρύθμισης Δw_{kj} . Ο τερματισμός της διαδικασίας μάθησης ελέγχεται από κριτήρια ελέγχου της ποιότητας του δικτύου, δηλαδή το μέσο σφάλμα του συνόλου εκπαίδευσης και τη μεταβολή του. Για να τερματιστεί η φάση της εκπαίδευσης, θα πρέπει η συνάρτηση σφάλματος που μετράει τη διαφορά μεταξύ τρεχουσών και επιθυμητών αποκρίσεων, να ελαχιστοποιηθεί.

Η αξιολόγηση του σφάλματος πραγματοποιείται από ένα ανεξάρτητο σύνολο προτύπων, το σύνολο επικύρωσης (validation set) και με βάση τον αριθμό των σφαλμάτων στο σύνολο αυτό υπολογίζουμε το σφάλμα ενός μοντέλου. Γενικά, όσο προχωράει η εκπαίδευση, τόσο μειώνεται το σφάλμα εκπαίδευσης αλλά και το σφάλμα επικύρωσης. Πέρα όμως από ένα όριο, φτάνοντάς το θεωρούμε ότι φθάσαμε στο βέλτιστο μοντέλο. Περαιτέρω μείωση του σφάλματος εκπαίδευσης προκαλεί αύξηση του σφάλματος επικύρωσης, οπότε εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερ-εκπαίδευσης (overtraining). Μετά το τέλος της εκπαίδευσης, για κάθε είσοδο το ΤΝΔ θα πρέπει να παρέχει την αντίστοιχη αποδεκτή έξοδο.

4.3.5 Είδη νευρωνικών δικτύων – Είδη αλγορίθμων μάθησης

Τα διάφορα είδη νευρωνικών δικτύων ταξινομούνται σε κατηγορίες ανάλογα κυρίως με τον τύπο διασύνδεσης των νευρώνων, τον κανόνα εκμάθησης και τη συνάρτηση ενεργοποίησης. Στο σχήμα 4.11 φαίνεται η ταξινόμηση και τα είδη των ΤΝΔ.



Σχήμα 4.11 Ταξινόμηση τεχνητών νευρωνικών δικτύων

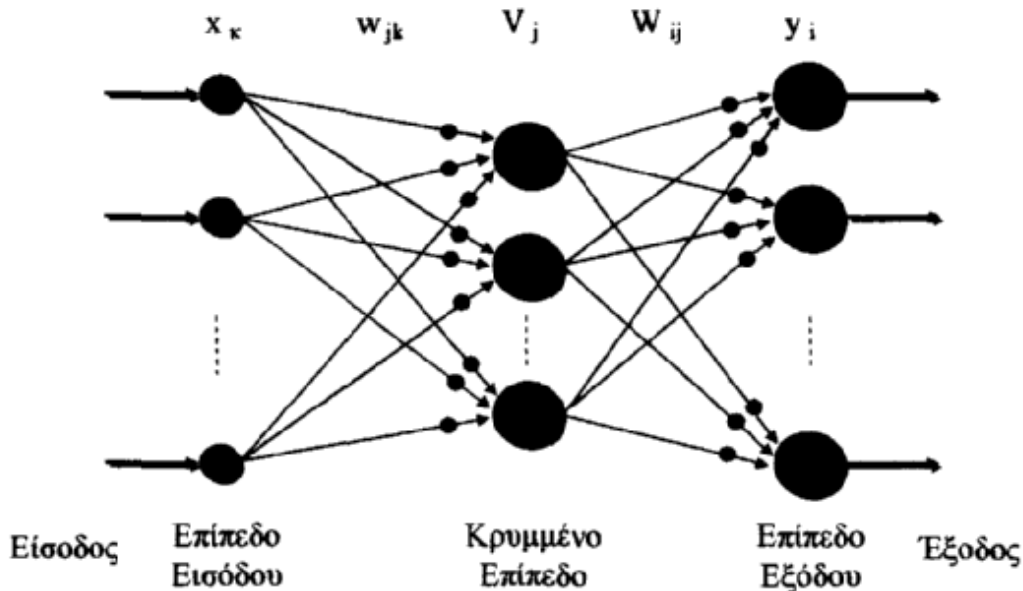
Το είδος Πολυεπίπεδο Perceptron (Multilayer Perceptron, MLP) αποτελεί δίκτυο εμπρόσθιας τροφοδότησης και περιλαμβάνει ένα επίπεδο εισόδου, ένα ή περισσότερα κρυμμένα επίπεδα και ένα επίπεδο εξόδου.

Ένα δίκτυο MLP έχει τρία διακριτικά χαρακτηριστικά:

1. Το μοντέλο κάθε νευρώνα στο δίκτυο περιλαμβάνει μια μη - γραμμικότητα στην έξοδο, δηλαδή μια μη γραμμική συνάρτηση ενεργοποίησης που έχει σιγμοειδή μορφή (λογιστική συνάρτηση). Η χρήση μιας τέτοιας συνάρτησης έχει βιολογικά κίνητρα μιας και προσπαθεί να δικαιολογήσει την επίμονη φάση των πραγματικών νευρώνων, χαρακτηριστικό των οποίων είναι ότι δεν έχουν δυαδικές εξόδους αλλά η έξοδός τους έχει συνεχώς κάποια τιμή.
2. Τα ένα ή περισσότερα κρυφά επίπεδα νευρώνων παρέχουν τη δυνατότητα στο δίκτυο να μάθει πολύπλοκες εργασίες με το να εξάγουν προοδευτικά τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά από τα διανύσματα εισόδου.
3. Το δίκτυο επιδεικνύει ένα υψηλό βαθμό διασύνδεσης που καθορίζεται από τις συνάψεις του.

Τα χαρακτηριστικά αυτά μαζί με την εκπαίδευσή του προσδίδουν ιδιαίτερη υπολογιστική ισχύ στα MLPs.

Τα δίκτυα MLP χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μοντέλων από δεδομένα (data fitting), τον έλεγχο συστημάτων, τα προβλήματα ταξινόμησης (classification), για την επίλυση μερικών διαφορικών εξισώσεων.



Σχήμα 4.12 Αρχιτεκτονική δομή ενός MLP δικτύου

Όπως έχει ειπωθεί, οι αλγόριθμοι εκπαίδευσης χρησιμοποιούνται για την εκπαίδευση του ΤΝΔ, δηλαδή την ελαχιστοποίηση του σφάλματος γενίκευσης. Η εκπαίδευση πραγματοποιείται μέσω ενός συνόλου δεδομένων π.χ. ένα σύνολο ζευγών τιμών εισόδου – εξόδου. Η εκπαίδευση του αλγορίθμου με αυτό το σύνολο εκπαίδευσης μια φορά (επανάληψη), ονομάζεται **εποχή** (epoch). Οι επαναλήψεις των εποχών ολοκληρώνονται όταν τα συναπτικά βάρη σταθεροποιηθούν σε συγκεκριμένες τιμές για τις οποίες η μέση τιμή σφάλματος (για το σύνολο εκπαίδευσης) συγκλίνει στην ελάχιστη τιμή του.

Ο αλγόριθμος εκπαίδευσης «**back – propagation**» ή αλγόριθμος «πίσω διάδοσης» του λάθους ή αλγόριθμος «πίσω διάδοσης» βασίζεται στον κανόνα μάθησης διόρθωσης του λάθους (error correction learning rule) και αποτελεί έναν πολύ δημοφιλή αλγόριθμο εκπαίδευσης.

Μια βελτιωμένη έκδοση αυτού του αλγορίθμου προκύπτει από τη χρήση του αλγορίθμου μάθησης «**conjugated gradient descent**». Η βελτίωση έγκειται στο ότι ο νέος αλγόριθμος υπολογίζει το μέσο σφάλμα από όλα τα ζεύγη τιμών του συνόλου εκπαίδευσης – πριν την ενημέρωση των συναπτικών βαρών – μια φορά στο τέλος κάθε εποχής, σε αντίθεση

με τον back – propagation όπου το μέσο σφάλμα υπολογίζεται σε κάθε ζεύγος τιμών, διορθώνεται πριν το πέρασμα από το επόμενο ζεύγος τιμών, υπολογίζεται ξανά, κ.ο.κ. μέσα σε μια εποχή, ώστε να βρεθεί το ελάχιστο. Με τον βελτιωμένο αλγόριθμο το σφάλμα μειώνεται πιο γρήγορα και οδηγείται σε μικρότερες τιμές.

Άλλοι αλγόριθμοι μάθησης που χρησιμοποιούνται από τον back – propagation είναι οι: gradient descent, Levenberg – Marquardt, κ.α.

4.3.6 Πλεονεκτήματα των ΤΝΔ

Ένα σωστά εκπαιδευμένο ΤΝΔ μπορεί να παράγει αποδεκτά, από πλευράς ακρίβειας, αποτελέσματα σε σύντομο υπολογιστικό χρόνο. Ιδιαίτερα σε περιπτώσεις χρονοβόρων αναλύσεων η προσέγγιση της λύσης των ΤΝΔ παρέχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

(i) Μη – γραμμικότητα

Πρόκειται για μια σημαντική ιδιότητα ιδιαίτερα αν ο φυσικός μηχανισμός παραγωγής των σημάτων εισόδου είναι μη – γραμμικός. Οφείλεται στο ότι οι νευρώνες που δομούν ένα ΤΝΔ είναι μη – γραμμικές συσκευές.

(ii) Σχεδιασμός Εισόδου – Εξόδου

Η εκπαίδευση ενός δικτύου επαναλαμβάνεται για πολλά παραδείγματα (είσοδος – επιθυμητή απόκριση) μέχρι το δίκτυο να φτάσει σε μια σταθερή κατάσταση όπου δεν μεταβάλλονται πλέον τα συναπτικά βάρη. Έτσι, το δίκτυο μαθαίνει από τα παραδείγματα, κατασκευάζοντας ένα συνδυασμό εισόδου – εξόδου για το πρόβλημα.

(iii) Προσαρμοστικότητα

Τα ΤΝΔ έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόζουν τα συναπτικά βάρη στις διεργασίες του περιβάλλοντός τους.

(iv) Αντοχή σε σφάλματα

Έχει την ιδιότητα να είναι ανεκτικό σε σφάλματα, δηλαδή η απόδοσή του μειώνεται μόνο κάτω από αντίξοες συνθήκες.

(v) Αυτοοργάνωση – συναφής πληροφορία

Η γνώση αναπαριστάται από την πολύ δομημένη και ενεργή κατάσταση του ΤΝΔ.

B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη και η εφαρμογή μιας πολύ-υπολειμματικής μεθοδολογίας εκχύλισης για τον έλεγχο της παρουσίας επιλεγμένων οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε ιχθυρά με τη χρήση σύγχρονων χημειομετρικών μεθόδων. Η παρούσα μελέτη έχει στόχο να προβάλλει με απλό και συγκριτικό τρόπο τις δυνατότητες εφαρμογής χημειομετρικών μεθόδων στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογιών εκχύλισης σε σχέση με τις κλασσικές διαδικασίες βελτιστοποίησης αναλυτικών μεθοδολογιών. Κριτήρια αυτής της σύγκρισης αποτελούν τα χαρακτηριστικά ποιότητας των αναλυτικών μεθόδων (ανάκτηση, ανιχνευσιμότητα, πιστότητα) που προσδιορίζονται από τις μελέτες επικύρωσης. Επιπλέον οι χημειομετρικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της αβεβαιότητας που προέρχεται από την ορθότητα της βελτιστοποιημένης μεθόδου εκχύλισης που αναπτύχθηκε ώστε να προσδοθεί αξιοπιστία στα αποτελέσματα των μετρήσεων της.

Οργανοχλωριωμένες ενώσεις που συγκροτούν τη «βρώμικη δωδεκάδα» όπως ορίστηκε στη συνθήκη της Στοκχόλμης (πίνακας 1.1) και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία συσσωρεύονται στα ιχθυρά ή ακόμα αποτελούν δείκτες βιοσυσώρευσης των ιχθυρών αποτελούν το στόχο της μεθοδολογίας εκχύλισης. Μεταξύ των PCBs, τα συμπαράγωγα: 28, 52, 101, 118, 138, 153 και 180, χρησιμοποιούνται κατά τις μετρήσεις δειγμάτων για τα προγράμματα ελέγχου παρουσίας των PCBs σε τρόφιμα, υδρόβιους και γενικά ζωικούς οργανισμούς – σύμφωνα με την Community Bureau of Reference της Ευρωπαϊκής ένωσης (1982) - λόγω της ανθεκτικότητας, της σχετικής παρουσίας, της τοξικότητας και της διαχωριστικής ικανότητας τους από τα άλλα συμπαράγωγα (Barcelo D., 2000). Πρόκειται για ενώσεις που αν και έχει απαγορευτεί (από τις δεκαετίες 1970 ή 1980) ή έχει περιοριστεί η χρήση τους, ανιχνεύονται ακόμη σήμερα στα τρόφιμα. Οι χαμηλές τιμές συγκέντρωσης αυτών στα φυσικά υποστρώματα απαιτούν ακριβέστερες, εκλεκτικότερες και χαμηλής ανιχνεύσιμης ικανότητας μεθόδους χωρίς να υποτιμάται η ανάγκη για απλές, γρήγορες και μικρού κόστους μεθόδους εκχύλισης. Επιπρόσθετα, η υπό ανάπτυξη μεθοδολογία επιθυμείται να είναι πολυυπολειμματική δηλαδή να εξασφαλίζει ακριβή και ταυτόχρονο προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη που πραγματεύεται τον ταυτόχρονο χρωματογραφικό προσδιορισμό επιλεγμένων οργανοχλωριωμένων ενώσεων και πολυχλωριωμένων διφαινυλίων σε δείγματα ιχθυρών στην Ελλάδα. Η ικανοποίηση των παραπάνω απαιτήσεων και η φύση του υποστρώματος ανάλυσης οδήγησε στην επιλογή της

μεθόδου εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (matrix solid phase dispersion, MSPD), ως μέθοδο προς ανάπτυξη και εφαρμογή της διατριβής.

Αντικείμενο της μελέτης αποτελεί ο προσδιορισμός και έλεγχος της επίδρασης των κυριότερων παραγόντων (παραμέτρων) που επηρεάζουν την απόδοση της MSPD ώστε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες εκχύλισης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των επιλεχθέντων οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Διερευνούνται δύο μέθοδοι για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών: η μέθοδος της αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά και η μέθοδος της εφαρμογής παραγοντικών σχεδιασμών. Για τη δεύτερη μέθοδο, έγινε χρήση χημειομετρικών μεθόδων. Πρόκειται για μεθόδους που επωφελούνται των δυνατοτήτων της στατιστικής για την επίλυση προβλημάτων όπως, π.χ. στην παρούσα μελέτη, βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων και η εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης προερχόμενης από την ανάκτηση της μεθόδου. Έτσι, γίνεται χρήση παραγοντικών σχεδιασμών και συνδυασμός αυτών με υπολογιστικά μοντέλα από το πεδίο της Τεχνητής Νοημοσύνης, τα Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (ΤΝΔ). Τα ΤΝΔ χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια στη χημεία για την προσομοίωση δεδομένων.

Για την εκτίμηση της αβεβαιότητας που προέρχεται από την ορθότητα της βελτιστοποιημένης μεθόδου εκχύλισης που αναπτύχθηκε εφαρμόζονται χημειομετρικές μέθοδοι (ιεραρχικό πειραματικό σχέδιο) ενώ πραγματοποιείται δοκιμασία για τον έλεγχο ύπαρξης συστηματικού μεθοδολογικού σφάλματος ώστε να προσδοθεί αξιοπιστία στα αποτελέσματα των μετρήσεων της. Η αβεβαιότητα που προέρχεται από την ορθότητα μιας μεθόδου ή η αβεβαιότητα ανάκτησης, συνεισφέρει σημαντικά στην αβεβαιότητα των αναλυτικών αποτελεσμάτων των πραγματικών δειγμάτων από την εφαρμογή της μεθόδου και συνυπολογίζεται στον υπολογισμό της τελικής αβεβαιότητας αυτών.

Η βελτιστοποιημένη και επικυρωμένη μεθοδολογία εκχύλισης εφαρμόζεται σε δύο περιοχές, του νομού Αιτωλοακαρνανίας, Ελλάδα: τη λίμνη Τριχωνίδα και τη λιμνοθάλασσα Αιτωλικού για τον προσδιορισμό των επιπέδων τιμών συγκέντρωσης των επιλεγμένων ενώσεων σε αντιπροσωπευτικά είδη ψαριών. Αποτελεί την πρώτη μελέτη προσδιορισμού των επιλεγμένων ενώσεων σε ιχθυρά από τις προαναφερόμενες περιοχές.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή πραγματεύεται την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθοδολογίας εκχύλισης οργανοχλωριωμένων ενώσεων από ιχθυρά κάνοντας χρήση χημειομετρικών μεθόδων. Μ'αυτές τις μεθόδους γίνεται ακόμα εκτίμηση της αβεβαιότητας που προέρχεται από την ορθότητα μεθόδου και τέλος υπολογίζεται η αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων ανάλυσης των πραγματικών δειγμάτων ιχθυρών ως απαραίτητο στοιχείο της ποιότητας ενός αναλυτικού αποτελέσματος.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Πρότυπες ενώσεις της μελέτης

Οι πρότυπες ενώσεις των πολυχλωριομένων διφαινυλίων, PCBs (συμπαράγωγα: 28, 52, 101, 138, 153, 180, 209) προμηθεύτηκαν από τη Sigma-Aldrich (Γερμανία) και το πρότυπο διάλυμα εργασίας αυτού του μίγματος παρασκευάστηκε σε επίπεδο συγκέντρωσης 2 mg/L σε διαλύτη ισοοκτάνιο. Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις της μελέτης: aldrin, endrin, dieldrin, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, α -chlordane, γ -chlordane, 4,4-DDE, 4,4- DDD, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulfate, endrin aldehyde, heptachlor, heptachlor epoxide, endrin ketone, methoxychlor προμηθεύτηκαν από τη Supelco (Bellefonte, PA, USA). Παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 40 mg/L μίγματος των ενώσεων το οποίο φυλάχθηκε σε γυάλινα αεροστεγώς κλεισμένα φιαλίδια των 10 mL στους -20°C . Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων αναφοράς σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διαλύτη εξάνιο. Ως εσωτερικό πρότυπο (IS) χρησιμοποιήθηκε το 2,4,5,6

Tetrachloro-m-xylene (10 mg/L σε διαλύτη εξάνιο), το οποίο προμηθεύτηκε από τη Sigma-Aldrich (Γερμανία). Όλα τα διαλύματα εργασίας φυλασσόταν στους 4 °C.

5.2 Διαλύτες και αντιδραστήρια

Κατά την πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες υψηλής καθαρότητας (Pesticide grade): εξάνιο, διχλωρομεθάνιο, ακετόνη, χλωροφόρμιο και μεθανόλη (Rotisolve^R, Pestilyse, Roth). Το αντιδραστήριο χλωριούχου νατρίου, καθαρότητας > 99,5% που χρησιμοποιήθηκε τόσο κατά τη διαδικασία εκχύλισης όσο και κατά τον προσδιορισμό λίπους ιχθυρών προμηθεύτηκε από τη Merck (Darmstadt, Germany).

5.3 Προσροφητικά υλικά

Για την παρασκευή των στηλών της εκχύλισης MSPD που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης της μεθόδου καθώς και την ανάλυση των δειγμάτων ιχθυρών χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά: Florisil (60–100 mesh) που προμηθεύτηκε από τη Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA), LiChroprep RP-18 (40–63μm) που προμηθεύτηκε από τη Merck (Darmstadt, Germany), Bondesil-PSA και Bondesil –NH₂ (40 μm) που προμηθεύτηκε από την εταιρία Varian. Το Florisil πριν τη χρήση του ενεργοποιήθηκε με θέρμανση σε φούρνο στους 150 °C για 12 ώρες και απενεργοποιήθηκε στη συνέχεια με 1% απιονισμένο νερό. Εν συνεχεία, φυλασσόταν σε θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντήρα και χρησιμοποιούταν εντός διαστήματος 10 ημερών.

Οι σύριγγες που χρησιμοποιήθηκαν για τη εκχύλιση ήταν σύριγγες πολυπροπυλενίου χωρητικότητας 20 mL ενώ για το τάπωμα τους (στην κορυφή και στον πάτο) χρησιμοποιήθηκε υαλοβάμβακας αναλυτικού βαθμού.

5.4 Δειγματοληψία ιχθυρών

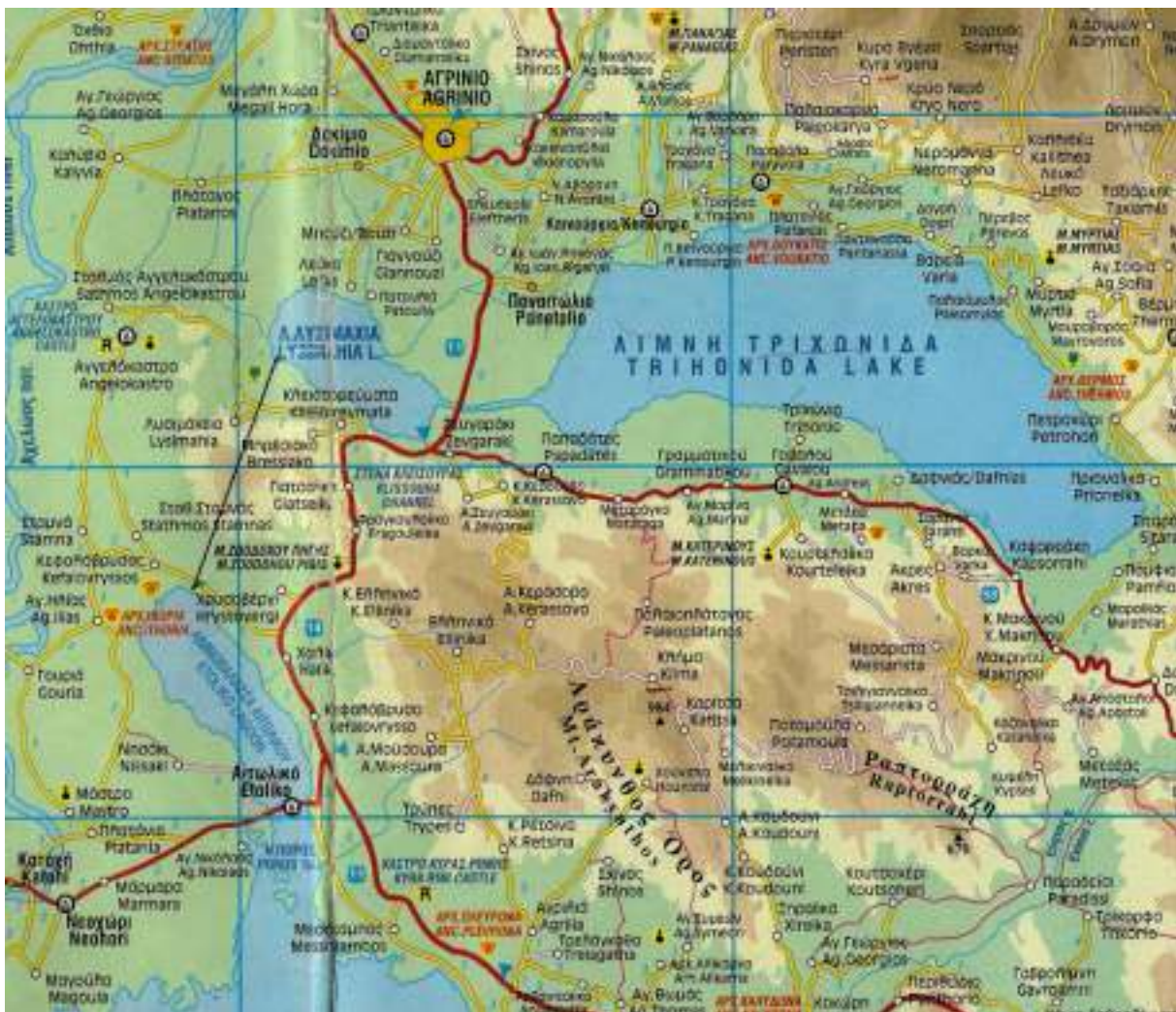
5.4.1 Περιοχές δειγματοληψίας και είδη δειγμάτων

Επιλέχθηκαν δύο περιοχές για δειγματοληψία των ιχθυρών της μελέτης: η λίμνη Τριγωνίδα και η λιμνοθάλασσα Αιτωλικού.

Η λίμνη Τριγωνίδα βρίσκεται στο νομό Αιτωλοακαρνανίας (βόρειο πλάτος: 21°28', μήκος: 38°34') και περιβάλλεται βόρεια από το Παναιτωλικό όρος, ανατολικά από τα όρη της Ναυπακτίας και νότια από το όρος Αράκυνθος ή Ζυγός. Η περίμετρός της είναι 51 χλμ και η επιφάνειά της καλύπτει 99 τετραγωνικά χλμ. Είναι μια μεσοτροφική λίμνη με μεγάλη ποικιλία υδρόβιων οργανισμών. Έχει μέγιστο βάθος 58 μέτρα και μέσο βάθος 29 μέτρα. Στο δυτικό τμήμα της λίμνης που ενώνεται μέσω αύλακα με τη λίμνη Λυσιμαχεία, υπάρχουν

ανεξέλεγκτες χωματερές όπου γίνεται συχνά καύση απορριμμάτων. Επίσης, η λίμνη υπόκειται στην απορροή αγροχημικών των παράκτιων φυτοκαλλιεργειών.

Η λιμνοθάλασσα Αιτωλικού (βόρειο πλάτος: $38^{\circ}30'$, μήκος: $21^{\circ}35'$) βρίσκεται στα βόρεια της λιμνοθάλασσας Μεσολογγίου με την οποία συνδέεται με αβαθή (0,30 μέτρα) ανοίγματα γέφυρας γεγονός που κάνει προβληματική την επικοινωνία των δύο αυτών λιμνοθαλασσών. Έχει έκταση 15.000 στρέμματα, μέσο βάθος 12 μέτρα και μέγιστο βάθος 33 μέτρα. Στην έξοδο της λιμνοθάλασσας βρίσκονται οι εγκαταστάσεις του βιολογικού καθαρισμού του δήμου Αιτωλικού ενώ επιπρόσθετα υπόκειται στην απορροή αγροχημικών των παράκτιων φυτοκαλλιεργειών.

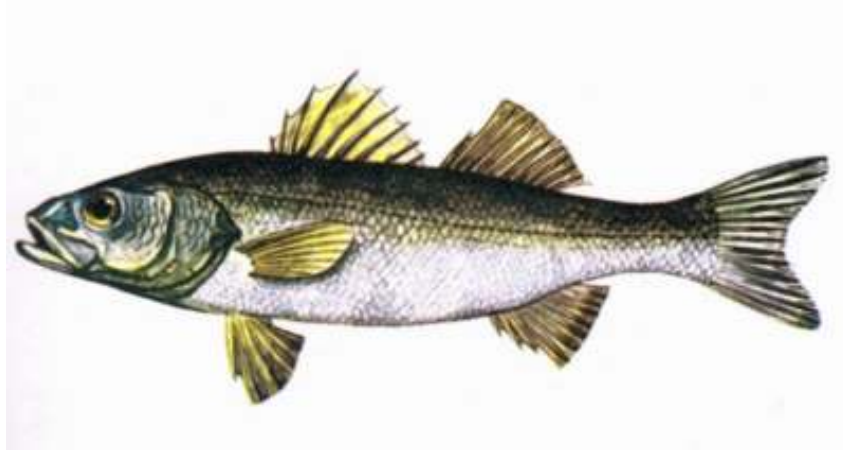


Σχήμα 5.1 Χάρτης των περιοχών λίμνης Τριχωνίδας και λιμνοθάλασσας Αιτωλικού.

Για λόγους που αναφέρονται στην επόμενη ενότητα (ενότητα 5.4.2), επιλέχθηκαν ως δείγματα ιχθυρών, τα είδη κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) και γλανίδι (*Silurus aristotelis*) από

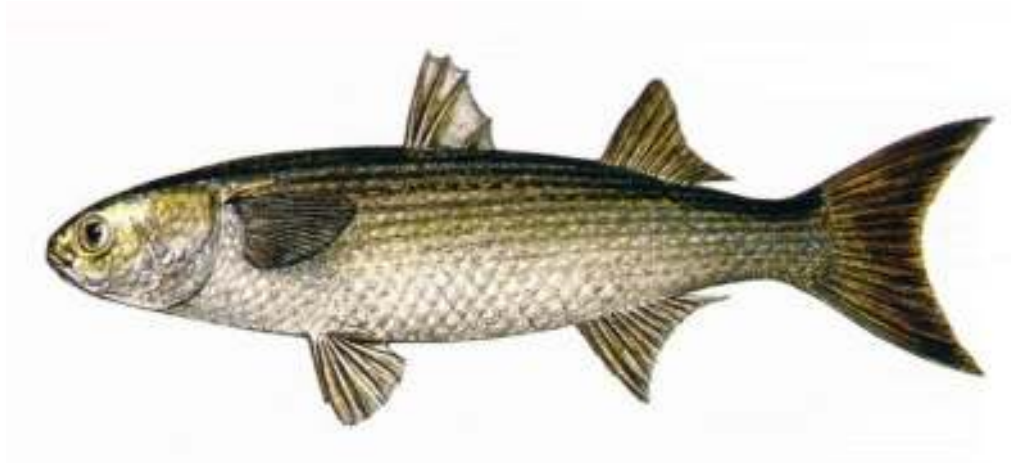
τη λίμνη Τριγωνίδα και τα είδη κέφαλος (*Mugil cephalus*) και λαβράκι (*Dicentranchus labrax*) από τη λιμνοθάλασσα Αιτωλικού.

Το λαβράκι μπορεί να φτάσει σε μήκος το 1 m και ζει σε ποικίλα βάθη, σε βυθούς αμμώδεις, λασπώδεις και πετρώδεις. Η διατροφή του περιλαμβάνει ψάρια, καρκινοειδή, κεφαλόποδα, σκώληκες. Αναπαράγεται τους μήνες Ιανουάριο έως Μάρτιο.



Σχήμα 5.2 Λαβράκι (*Dicentranchus labrax*)

Ο κέφαλος φτάνει έως 70 cm μήκος ζώντας σε βάθη έως 365 m. Είναι ψάρι ευρύθερμο και ευρύαλο που τρέφεται με οργανικές ουσίες που υπάρχουν στη λάσπη, με φύκη και μικρά ασπόνδυλα και αναπαράγεται την περίοδο Ιούλιος έως Σεπτέμβριος. Ο κέφαλος συμπεριλαμβάνεται στα ψάρια που χρησιμοποιούνται συχνά σε προγράμματα ελέγχου ρύπανσης στην Ευρώπη και την Αμερική (Pastor D., 1996) αφού έχει την τάση να συσσωρεύει ρύπους σε υψηλότερο βαθμό από άλλα ιχθυρά.



Σχήμα 5.3 Κέφαλος (*Mugil cephalus*)

Το γλανίδι οφείλει το επιστημονικό του όνομα στον φιλόσοφο Αριστοτέλη, ο οποίος πρώτος περιέγραψε τη διαδικασία αναπαραγωγής. Ζει σε αμμώδεις και χορταριασμένους βυθούς λιμνών, ποταμών, καναλιών και τρέφεται πρωτευτόντως με ζωντανά ή νεκρά ψάρια και δευτεροτόντως με καρκινοειδή, υδρόβια έντομα, μικρούς βατράχους και φίδια. Η αναπαραγωγική του περίοδος ξεκινά όταν φτάσει την ηλικία των 2-3 ετών και εκτείνεται από Απρίλιο έως Ιούλιο.



Σχήμα 5.4 Γλανίδι (*Silurus arctus*)

Ο Κυπρίνος είναι ψάρι της οικογένειας των κυπρινιδών, πολύ παλιάς Ασιατικής καταγωγής, (κοινώς γριβάδι, σαζάνι, τσουκάνι). Στην Ευρώπη μεταφέρθηκε τον 13^ο αιώνα. Στην Βόρεια Αμερική έφθασε το 1872 από την Γερμανία, ενώ εξακολουθεί να απουσιάζει από την Νότια Αμερική και την Αφρική. Το μήκος του φθάνει τα 40-50 εκατοστά και το βάρος του τα 2 κιλά, σε ηλικία 5 ετών. Σε ηλικία 10 ετών μπορεί να φθάσει τα 8-9 κιλά, ενώ έχουν αναφερθεί περιπτώσεις κυπρίνων που σε ηλικία 40 ετών έφθασαν τα 30 κιλά και μήκος περίπου 1,5 μέτρο. Ο κυπρίνος είναι παμφάγο ψάρι και τρέφεται τόσο με υδρόβια βλάστηση, όσο και με προνύμφες εντόμων, μικρά καρκινοειδή, σκόληκες και άλλα μικροσκοπικά υδρόβια ζώα. Η αναπαραγωγή του συνήθως πραγματοποιείται Μάιο με Ιούλιο, όταν η θερμοκρασία ξεπερνάει τους 19° - 20° C.



Σχήμα 5.5 Κυπρίνος (*Cyprinus carpio*)

5.4.2 Διαδικασία δειγματοληψίας

Η δειγματοληψία των ιχθυρών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον «Οδηγό για τον προσδιορισμό χημικής ρύπανσης» της Αμερικανικής Υπηρεσίας για την Προστασία του Περιβάλλοντος, (EPA, 2000). Το αντικείμενο του οδηγού είναι η περιγραφή της διαδικασίας που προτείνεται από την EPA ώστε να εφαρμόζεται σε προγράμματα ελέγχου χημικής ρύπανσης περιοχών, χρησιμοποιώντας ως δείγματα ελέγχου ιχθυρά και οστρακοειδή. Σύμφωνα με τον οδηγό, τα προγράμματα ελέγχου διακρίνονται σε δύο στάδια: στις προκαταρκτικές μελέτες (screening studies) και στις εκτεταμένες μελέτες δύο φάσεων (two-phase intensive studies) ενώ η διαδικασία δειγματοληψίας είναι κοινή για τα δύο στάδια.

Σύμφωνα με τον οδηγό, επιλέχθηκαν δύο είδη ιχθυρών από κάθε περιοχή δειγματοληψίας: ένα είδος αρπακτικού (predator) και ένα είδος που τρέφεται από το βυθό (bottom feeder). Ταυτόχρονα φροντίσαμε τα είδη αυτά να έχουν μεγάλη κατανάλωση και μεγάλη παραγωγή στις περιοχές δειγματοληψίας. Έτσι, επιλέχθηκαν το γλανίδι και το λαβράκι ως αρπακτικά είδη από τις περιοχές της λίμνης Τριγωνίδας και της λιμνοθάλασσας Αιτωλικού αντίστοιχα, ενώ ως είδη που τρέφονται από το βυθό επιλέχθηκαν ο κυπρίνος και ο κέφαλος από τις αντίστοιχες περιοχές. Η δειγματοληψία διήρκεσε έξι (6) μήνες για κάθε περιοχή και τρία (3) δείγματα κάθε είδους συλλέγονταν μια φορά κάθε μήνα, από Ιούλιο έως Δεκέμβριο της ίδιας χρονιάς.

Για την επιλογή της διάρκειας δειγματοληψίας λάβαμε υπόψη τα εξής:

- Σύμφωνα με τον οδηγό της EPA, η περισσότερο επιθυμητή περίοδος δειγματοληψίας ιχθυρών είναι η περίοδος μεταξύ του τέλους καλοκαιριού έως αρχές φθινοπώρου. Αυτή

την περίοδο το λίπος των ιχθυρών κατέχει γενικά το υψηλότερο ποσοστό αποτελώντας σημαντική αποθήκη οργανικών ρύπων.

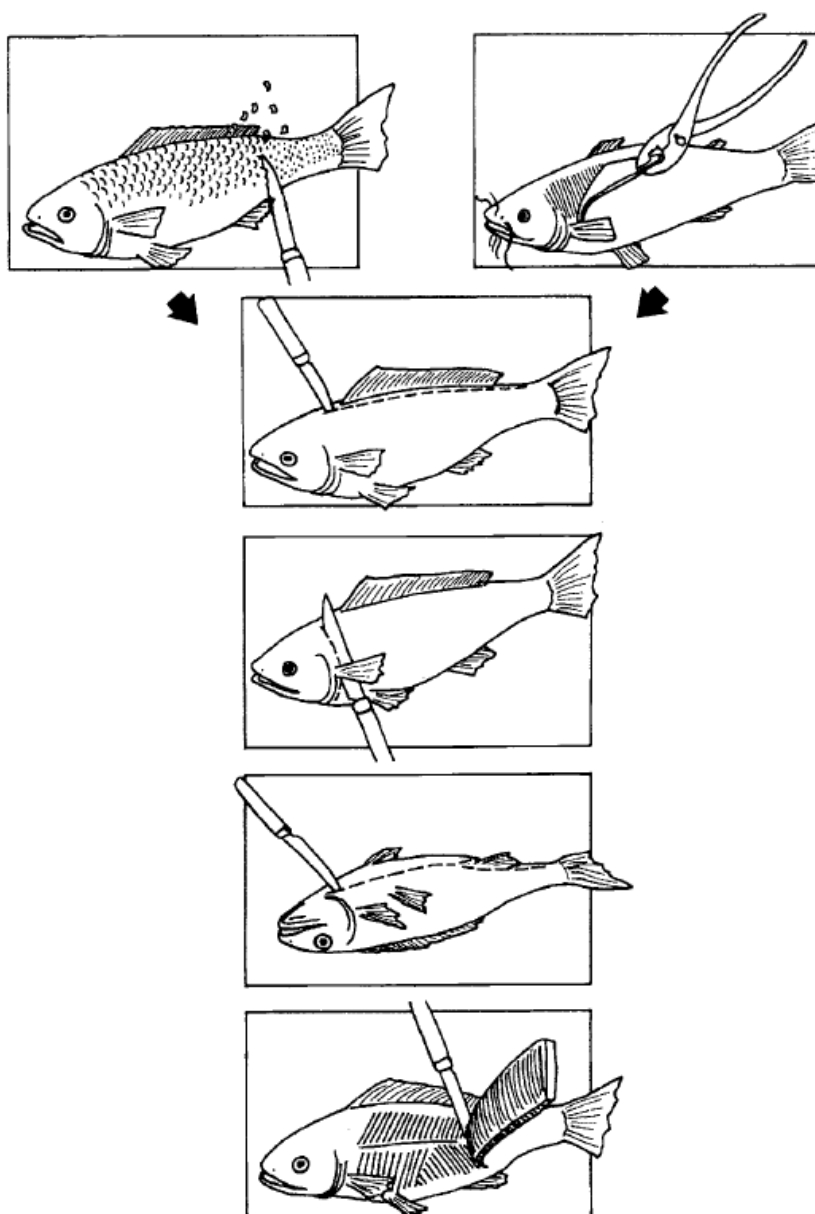
- Η παραπάνω περίοδος δειγματοληψίας ταυτίζεται με την περίοδο της μεγαλύτερης παραγωγής αυτών των ειδών
- Όλα τα είδη, με εξαίρεση τον κέφαλο, βρισκόταν εκτός της περιόδου αναπαραγωγής τους όπου είναι αυξημένος ο ρυθμός πρόσληψης τροφής ενώ ταυτόχρονα, προστατεύθηκε η αναπαραγωγή τους

Τα ξεχωριστά δείγματα (individual samples) ιχθυρών παραλαμβάνονταν την ημέρα συλλογής τους (χρόνος <24 ώρες) και πραγματοποιούταν τα εξής βήματα στο εργαστήριο:

- Έλεγχος για ύπαρξη ξένων υλικών στην επιφάνειά τους και πλύσιμο με νερό.
- Ζύγιση και μέτρηση μήκους των δειγμάτων
- Απομάκρυνση λεπιών
- Φιλετοποίηση
- Προετοιμασία σύνθετου δείγματος (composite sample) ανά είδος ιχθυρού

Σύνθετο δείγμα είναι ένα ομογενές μίγμα δειγμάτων που προέρχεται από δυο ή περισσότερα ξεχωριστά δείγματα ιχθυρών του ίδιου είδους που συλλέχθηκαν σε μια συγκεκριμένη περιοχή και αναλύεται ως μοναδικό δείγμα. Στη μελέτη μας, τα σύνθετα δείγματα προήλθαν από ανάμιξη ίσης ποσότητας τριών ξεχωριστών δειγμάτων.

Τα ξεχωριστά δείγματα κάθε είδους φιλετοποιήθηκαν και τα φιλέτα (κάθε δείγματος ξεχωριστά) τεμαχίστηκαν σε κομμάτια μήκους 2,5 cm περίπου. Με τη χρήση μηχανής άλεσης κάθε δείγμα τεμαχίστηκε επιπλέον και το αλεσμένο δείγμα ομογενοποιήθηκε ως εξής: χωρίστηκε σε τέταρτα, κάθε τέταρτο αναμίχθηκε με το απέναντι του και τα μισά που προέκυψαν αναμίχθηκαν μαζί. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια, ίσες ποσότητες από κάθε ξεχωριστό δείγμα αναμίχθηκαν, ομογενοποιήθηκαν όπως τα ξεχωριστά δείγματα και αποτέλεσαν το σύνθετο δείγμα κάθε είδους του κάθε μήνα δειγματοληψίας. Το δείγμα αυτό αποτέλεσε το αναλυόμενο δείγμα και φυλάχθηκε στους -20°C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης.



Σχήμα 5.6 Η διαδικασία φιλετοποίησης ιχθυρών.

5.5 Μέθοδος εκχύλισης και προσδιορισμός λίπους

5.5.1 Εμβολιασμός δειγμάτων

Ο εμβολιασμός δειγμάτων ιχθυρών με πρότυπα διαλύματα των αναλυτέων ενώσεων πραγματοποιήθηκε προκειμένου τα κατάλληλα εμβολιασμένα δείγματα να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθοδολογίας, την επικύρωση των δύο επιλεχθέντων μεθοδολογιών και την εκτίμηση των παραγόντων που επιδρούν σημαντικά στην απόδοση αυτών. Ως αντιπροσωπευτικά δείγματα ιχθυρών χρησιμοποιήθηκαν τα είδη: Κέφαλος (*mugil cephalus*) (λίπος ιστού=4,5%) και Κυπρίνος (*cyprinus carpio*), (λίπος ιστού=0,7%) και χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση.

Τα εμβολιασμένα δείγματα ιχθυρών προετοιμάστηκαν με προσθήκη κατάλληλου όγκου προτύπου διαλύματος του μίγματος των αναλυτέων ενώσεων σε ζυγισμένες με ακρίβεια ποσότητες δείγματος, ώστε να προκύψουν δείγματα σε συγκέντρωση 10,25,50,100,200 ng/g ιστού. Στη συνέχεια τα εμβολιασμένα δείγματα υποβλήθηκαν σε εκχύλιση με τη μέθοδο MSPD, όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Ο σκοπός της ανάλυσης εμβολιασμένων δειγμάτων είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτέων ενώσεων, ο οποίος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εσωτερικής βαθμονόμησης με χρήση εσωτερικού προτύπου, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα αναφοράς προσομοίωσης του υποστρώματος (matrix matched standards). Η παρασκευή αυτών των προτύπων πραγματοποιήθηκε με εμβολιασμό προτύπου μίγματος των αναλυτέων ενώσεων σε εκχυλίσματα τυφλών δειγμάτων (blank) ιχθυρών, δηλαδή δειγμάτων που δεν περιείχαν υπολείμματα των υπό προσδιορισμό ενώσεων και υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία εκχύλισης με τα δείγματα. Η συγκέντρωση των ενώσεων στα εμβολιασμένα δείγματα ιχθυρών προσδιορίστηκε υπολογίζοντας το εμβαδό των κορυφών των ενώσεων που προέκυψαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση των εμβολιασμένων δειγμάτων, σε σχέση με αυτό του εσωτερικού προτύπου που χρησιμοποιήθηκε και συγκρίνοντας το εμβαδό των κορυφών των ενώσεων που προέκυψαν κατά τη χρωματογραφική ανάλυση προτύπου διαλύματος μίγματος των ενώσεων, συγκρίνοντας το με αυτό του ίδιου εσωτερικού προτύπου. Έτσι, προσδιορίστηκαν οι συντελεστές σχετικής απόκρισης (Relative Response Factors, RRFs) των ενώσεων ως προς το εσωτερικό πρότυπο από τη σχέση:

$$RRF_A = \frac{Area_{(IS)} * C_{(A)}}{Area_{(A)} * C_{(IS)}}$$

Όπου $RRF_{(A)}$ ο συντελεστής σχετικής απόκρισης, $C_{(A)}$ η συγκέντρωση της ένωσης A στο πρότυπο διάλυμα ή στο εξεταζόμενο δείγμα όταν γνωρίζουμε τον $RRF_{(A)}$ και θέλουμε να προσδιορίσουμε τη συγκέντρωση της A, $C_{(IS)}$ η συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου στο πρότυπο διάλυμα ή στο εξεταζόμενο δείγμα, $Area_{(A)}$ το εμβαδό της κορυφής της ένωσης A και $Area_{(IS)}$ το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

5.5.2 Μέθοδος εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση, MSPD.

Η διαδικασία της εκχύλισης MSPD που ακολουθήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης περιλάμβανε την παρακάτω γενική πορεία. Οι παράγοντες που εξετάστηκαν κατά τις διαδικασίες βελτιστοποίησης δεν αναφέρονται ονομαστικά σ' αυτή τη γενική πορεία αλλά στις αντίστοιχες παραγράφους του 6^{ου} κεφαλαίου.

Ποσότητα 1g δείγματος ιχθυού (σύνθετο δείγμα) αναμιγνύεται με ποσότητα προσροφητικού υλικού (υλικό διασποράς) και ποσότητα 1g θεικού νατρίου, σε γυάλινο γουδί για περίπου 2 λεπτά με γυάλινο γουδοχέρι εωσότου παραληφθεί ομογενές μίγμα. Δεν ενδείκνυται η χρήση πορσελάνινου ή άλλου σκεύους ανάμιξης για την αποφυγή απωλειών των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Εάν χρησιμοποιείται εμβολιασμένο δείγμα, προστίθεται ποσότητα προτύπου διαλύματος των ενώσεων πριν την προσθήκη του υλικού διασποράς ώστε να επιτύχουμε το επιθυμητό επίπεδο εμβολιασμού, αναμιγνύεται και το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και στη συνέχεια ακολουθείται κανονικά η διαδικασία εκχύλισης.

Σε σύριγγα πολυπροπυλενίου χωρητικότητας 20 ml όπου έχουν προστεθεί κατά σειρά, από κάτω προς τα πάνω, φίλτρο μεμβράνης (0,22μm), ποσότητα υαλοάνθρακα και ποσότητα 2g προσροφητικού υλικού (υλικό καθαρισμού εκχυλίσματος) προσθέτουμε 10mL εξάνιο και αφήνουμε να στεγνώσει (περίπου 10 min). Προσθέτουμε το μίγμα (δείγμα + υλικό διασποράς), ποσότητα υαλοάνθρακα αναλυτικού βαθμού και πιέζουμε ελαφρώς με τροποποιημένο έμβολο το περιεχόμενο της στήλης ώστε να αποφευχθούν κανάλια εντός αυτής και αρχίζουμε την προσθήκη του διαλύτη ή του μίγματος διαλυτών έκλουσης συνολικού όγκου 15 mL. Η έκλυση πραγματοποιείται με αργό ρυθμό, σταγόνα-σταγόνα, με την εφαρμογή μικρού κενού όταν είναι απαραίτητο. Το έκλουσμα συλλέγεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται μέχρι όγκου περίπου 0,5 mL κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου. Ακολούθως, γίνεται επαναδιάλυση σε διαλύτη εξάνιο, προστίθεται το εσωτερικό πρότυπο χρωματογραφίας (2,4,5,6 tetrachloro-m-xylene) και ακολουθεί χρωματογραφική ανάλυση.

5.5.3 Προσδιορισμός λίπους ιχθυρών

Ο προσδιορισμός του λίπους ιχθυρών (Manirakiza P. et al (2001), Smedes F. et al (1996)) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τροποποιημένη μέθοδο των Bligh and Dyer (Inouye L. S. et al., 2006) ως εξής:

5g σύνθετου δείγματος τέθηκαν σε κωνική φιάλη και αναμίχθηκαν με ομογενοποιητή με μίγμα διαλυτών: 5 ml CHCl_3 και 5 ml MeOH για 2 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 ml CHCl_3 και το μίγμα αναμίχθηκε για 30 δευτερόλεπτα. Ακολούθως προστέθηκαν 5 ml νερό και αναμίχθηκαν για 30 δευτερόλεπτα. Η οργανική φάση του μίγματος, που περιέχει το λίπος (φάση CHCl_3), διηθήθηκε σε χωνί διηθήσεως με διηθητικό χαρτί Whatman no. 1. Προστέθηκαν επιπλέον 5 ml CHCl_3 και ακολούθησε ανάμιξη για 2 λεπτά με ομογενοποιητή. Το υγρό περιεχόμενο της κωνικής φιάλης διηθήθηκε στο ίδιο φίλτρο διηθήσεως και το

διήθημα συλλέχθηκε σε έναν βαθμονομημένο ογκομετρικό κύλινδρο των 50 ml. Μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων (οργανικής και υδατικής) μετρήθηκε ο όγκος της φάσης CHCl_3 . Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν δύο δισκία πορσελάνης με ακρίβεια 0,01g και σε κάθε ένα τοποθετήθηκαν 5 ml της φάσης του CHCl_3 και τέθηκαν στους 105°C για 30 λεπτά. Τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα και ζυγίστηκαν ξανά ώστε να υπολογιστεί το βάρος λίπους του δείγματος. Τελικά, υπολογίζεται το % ποσοστό λίπους επί του βάρους δείγματος, λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο της φάσης του CHCl_3 στο βαθμονομημένο ογκομετρικό κύλινδρο και την αρχική ποσότητα δείγματος.

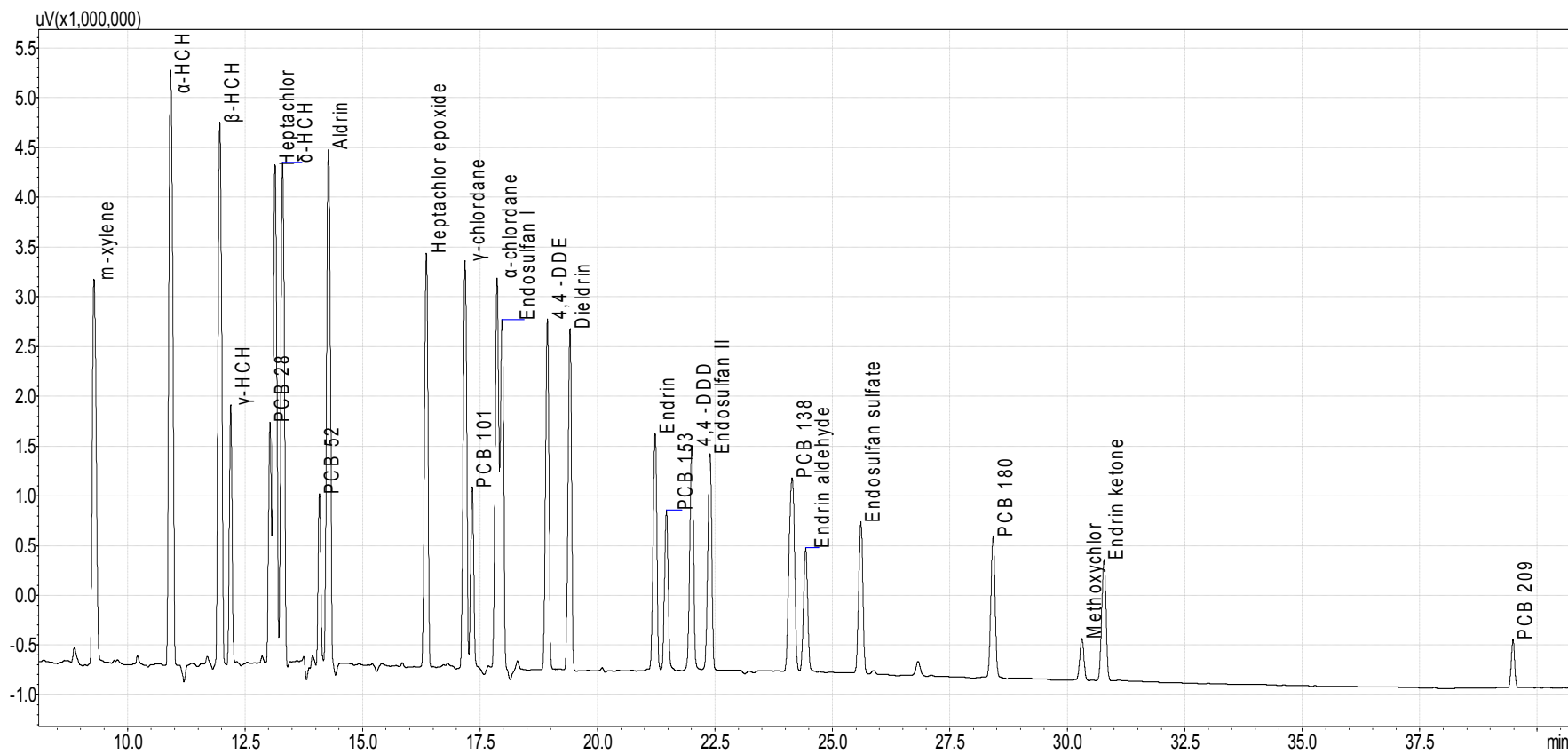
5.6 Χρωματογραφική ανάλυση δειγμάτων

5.6.1 Αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC)

Για την αεριο-χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή συλλήψεως ηλεκτρονίων GC-ECD –πηγή ηλεκτρονίων ^{63}Ni (GC 2010, SHIMADZU) και επεξεργαστή Class VP, εφοδιασμένο με στήλη Supelco SPB 608 (65% dimethyl και 35% diphenyl polysiloxane) διαστάσεων: μήκος=30 μέτρα, διάμετρος= 0,25mm, πάχος φιλμ= 0,25 μm . Οι χρωματογραφικές συνθήκες επιλέχθηκαν ως εξής: Θερμοκρασία ανιχνευτή: 300°C , Θερμοκρασία εισαγωγέα: 220°C , τρόπος έγχυσης δείγματος: splitless injection (βαλβίδα split κλειστή για 1,2 λεπτά), φέρον αέριο: He (99,999%) με ροή 1,30 mL/min, βοηθητικό (make up) αέριο: N_2 (99,999%) με ροή 30 mL/min. Το κατάλληλο θερμοκρασιακό πρόγραμμα επιλέχθηκε να είναι ως εξής: 120°C , 220°C ($10^\circ \text{C}/\text{min}$), 240°C ($2^\circ \text{C}/\text{min}$) για 3 min, 260°C ($2^\circ \text{C}/\text{min}$), 290°C ($5^\circ \text{C}/\text{min}$) για 10min.

Πίνακας 5.1 Χρόνοι κατακράτησης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων κατά την ανάλυση στον GC-ECD

α/α	Αναλυτέα ένωση	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)
1	α-HCH	10,991
2	β-HCH	12,057
3	γ-HCH	12,275
4	PCB 28	13,151
5	Heptachlor	13,260
6	δ-HCH	13,397
7	PCB 52	14,226
8	Aldrin	14,416
9	Heptachlor epoxide	16,540
10	γ-chlordane	17,370
11	PCB 101	17,520
12	α-chlordane	18,061
13	Endosulfan I	18,181
14	4,4 -DDE	19,142
15	Dieldrin	19,645
16	Endrin	21,500
17	PCB 153	21,712
18	4,4 -DDD	22,270
19	Endosulfan II	22,694
20	PCB 138	24,461
21	Endrin aldehyde	24,762
22	Endosulfan sulphate	25,943
23	PCB 180	28,728
24	Methoxychlor	30,684
25	Endrin ketone	31,166
26	PCB 209	39,767



Σχήμα 5.7 Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος 50 ppb του μίγματος των 26 οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε χρωματογράφο GC-ECD

5.6.2 Αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (Gas chromatography-Mass spectrometry, GC-MS)

Στην διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αέριος χρωματογράφος-φασματογράφος μάζας GC-MS-2010 (SHIMADZU) με επεξεργαστή Class VP. Ο χρωματογράφος ήταν εφοδιασμένος με στήλη DB-5 της εταιρείας Supelco (5% phenyl-methylpolysiloxane) διαστάσεων: μήκος=30 μέτρα, διάμετρος= 0,25mm, πάχος φιλμ= 0,25μm. Οι χρωματογραφικές συνθήκες επιλέχθηκαν ως εξής: Θερμοκρασία ανιχνευτή: 300⁰C, Θερμοκρασία εισαγωγέα: 220⁰C, τρόπος έγχυσης δείγματος: splitless injection και φέρον αέριο: He (99,999%) με ροή 1,75 mL/min. Το κατάλληλο θερμοκρασιακό πρόγραμμα επιλέχθηκε να είναι ως εξής: 50° C (1 min), 180° C (20° C/min), 185° C (10° C/min), 187,5° C (0,2° C/min), 240° C (3° C/min), 300° C (10° C/min) για 5min.

Η παραγωγή ιόντων έγινε με ιονισμό με ηλεκτρόνια (EI) όπου η θερμοκρασία της πηγής ιονισμού ήταν 290° C και του interface 240° C. Πραγματοποιήθηκαν δύο ειδών αναλύσεις ιόντων: διαλογής ιόντων (scan mode) με εύρος εξέτασης ιόντων (m/z 50–500) και επιλεγμένων ιόντων (SIM mode). Στην SIM mode ανάλυση ελέγχθηκε η παρουσία δύο τουλάχιστον χαρακτηριστικών ιόντων για κάθε αναλυτέα ένωση ενώ το πλήθος των ιόντων των ενώσεων της μελέτης χωρίστηκε σε 5 ομάδες σύμφωνα με τους χρόνους κατακράτησης των ενώσεων στον αέριο χρωματογράφο (πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.2 Μοριακά βάρη και επιλεγθέντα ιόντα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων για ανάλυση SIM / GC-MS

Ομάδα	Αναλυτέα ένωση	Μοριακό βάρος	Επιλεγθέντα ιόντα
Ομάδα I	α-HCH	288	181,219,217
	β-HCH	288	181,219,217
	γ-HCH	288	181,219,217
	δ-HCH	288	181,219,217
Ομάδα II	PCB 28	256	256,258
	Heptachlor	373	272,274
	PCB 52	290	290,292
	Aldrin	362	263,261,265
	Heptachlor epoxide	386	373,375,377
Ομάδα III	γ-chlordane	406	246,248
	PCB 101	324	326,328
	Endosulfan I	407	195,277
	α-chlordane	406	373,375,377
	4,4 -DDE	316	246,248
	Dieldrin	378	378,263
Ομάδα IV	Endrin	378	263,261
	Endosulfan II	407	195,241
	4,4 -DDD	318	235,237,165
	Endrin aldehyde	378	345,250
	PCB 153	358	360,362
	Endosulfan sulphate	420	270,272,274
	PCB 138	358	358,360
Ομάδα V	Endrin ketone	378	317,315,319
	Methoxychlor	344	227,228
	PCB 180	392	394,396
	PCB 209	498	496,498

5.7 Στατιστικά πακέτα επεξεργασίας

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) για: την παραγωγή της μήτρας των παραγοντικών σχεδιασμών, την επεξεργασία των δεδομένων που εξήχθησαν από αυτά (υπολογισμός μέσω ανακτήσεων ενώσεων και διακυμάνσεων των εξεταζόμενων παραγόντων στην ανάκτηση μεθόδου) και τη μοντελοποίηση των δεδομένων των κλασματικών παραγοντικών σχεδιασμών με τη χρήση των Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΕ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΦΑΣΗ (MSPD). ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η βελτιστοποίηση μιας μεθοδολογίας εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση αποσκοπεί στην εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης που επιφέρουν την υψηλότερη δυνατή απόδοση. Η απόδοση της μεθόδου MSPD επηρεάζεται κυρίως από την πλήρωση της στήλης εκχύλισης και τη διαδικασία έκλουσης των ενώσεων. Κύριος στόχος της βελτιστοποίησης είναι η ποιοτική και ποσοτική εκχύλιση των αναλυτέων ενώσεων από τα δείγματα ανάλυσης, δηλαδή επιθυμούνται υψηλά ποσοστά ανάκτησης των ενώσεων, καθαρά εκχυλίσματα, ελαχιστοποίηση παρεμποδίσεων (Martinez A. et al (2005), Pensado L. et al (2005), Criado Ramil M. et al (2004), Nardelli V. et al (2004) Albero B. et al (2003), Ling Y. C., Zhao M., (1999), Huang I. P. et al (1995)).

Τα στάδια της εκχύλισης που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας ήταν:

- δειγματοληψία, ομογενοποίηση και καθορισμός ποσότητας δείγματος
- επιλογή είδους και ποσότητας προσροφητικού υλικού, ως υλικού διασποράς
- επιλογή είδους και ποσότητας διαλύτη έκλουσης
- επιλογή είδους και ποσότητας προσροφητικού υλικού, ως μέσου καθαρισμού του εκχυλίσματος

Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές εργασίες για τη βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας εκχύλισης:

1. Μεταβάλλοντας έναν παράγοντα κάθε φορά
2. Με την εφαρμογή παραγοντικών σχεδιασμών

6.1 Μέθοδος αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά (One factor at a time)

6.1.1 Βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας εκχύλισης

Κατά τον πρώτο τρόπο, επιλέχθηκαν (βάσει μεμονωμένων πειραμάτων και βιβλιογραφικών δεδομένων) οι κυριότεροι τέσσερις **παράγοντες (παράμετροι)** που επηρεάζουν την απόδοση της μεθοδολογίας εκχύλισης και μελετήθηκε η επίδραση του καθενός, όταν μεταβάλλεται στο επιλεχθέν εύρος τιμών, στην απόδοση της εκχύλισης διατηρώντας σε σταθερές τιμές τους άλλους τρεις παράγοντες. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για καθέναν παράγοντα ξεχωριστά. Κριτήριο της απόδοσης εκχύλισης αποτέλεσε η ανάκτηση - για καθεμία από τις αναλυτέες ενώσεις - της ποσότητας με την οποία εμβολιάστηκε δείγμα ιχθυού πριν τη διαδικασία εκχύλισης. Οι υψηλότερες επιτρεπτές τιμές ανάκτησης των αναλυτέων ενώσεων καθόρισαν τη βέλτιστη περιοχή τιμών των μελετώμενων παραγόντων, βάσει των οποίων έγινε η επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας.

Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν είναι:

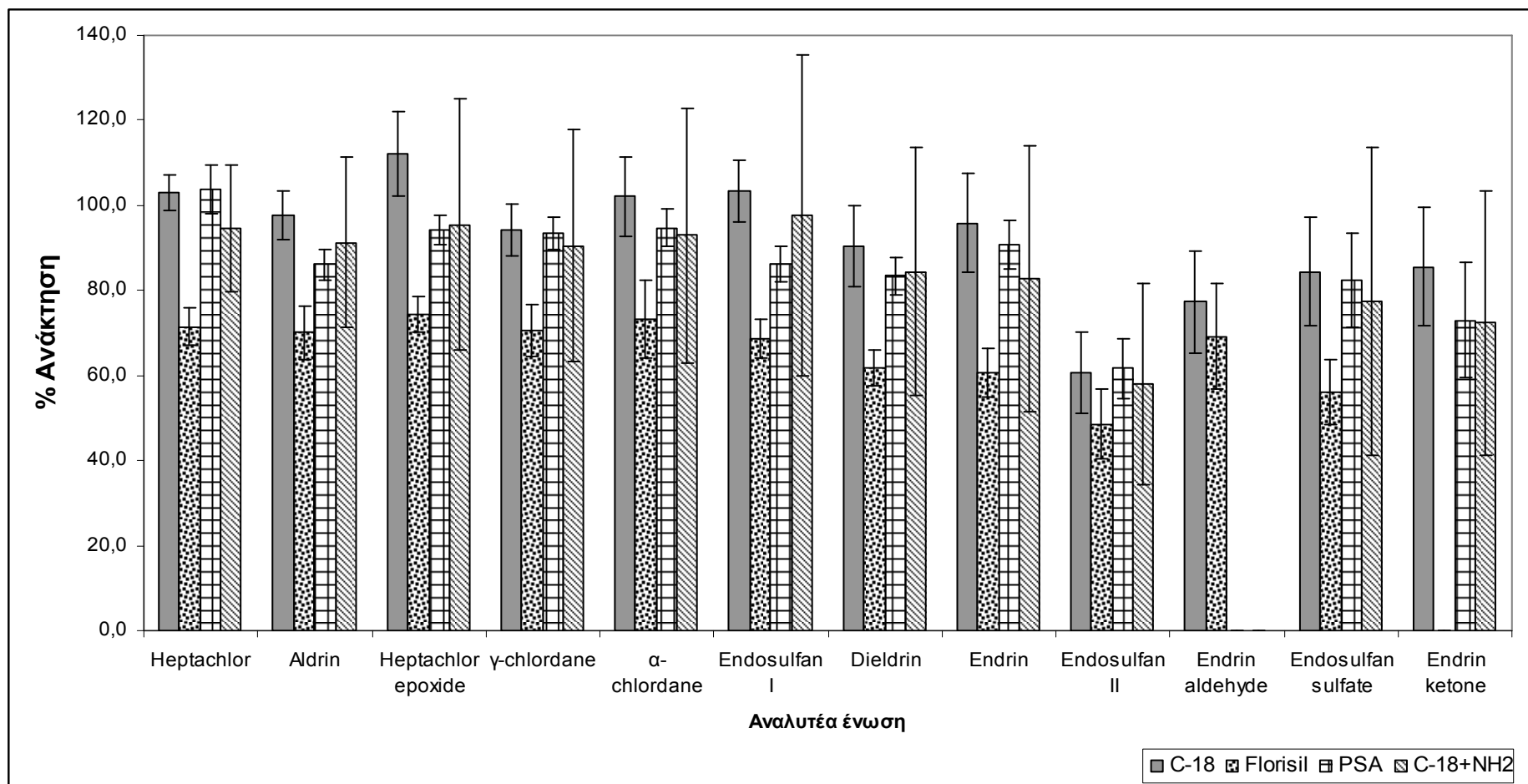
1. το υλικό διασποράς
2. η αναλογία δείγματος και υλικού διασποράς
3. ο διαλύτης έκλουσης
4. το υλικό καθαρισμού του εκχυλίσματος

Στον πίνακα 6.1 φαίνονται τα επίπεδα τιμών των παραγόντων που εξετάστηκαν κατά τη μελέτη.

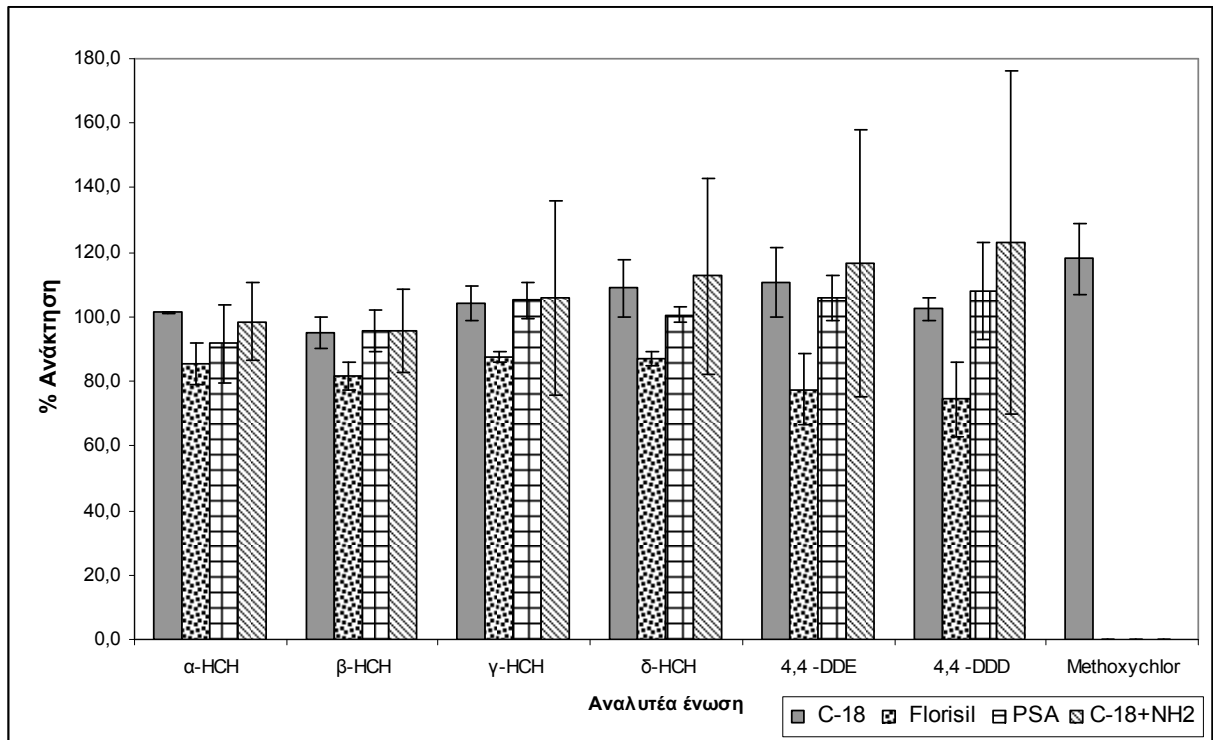
Πίνακας 6.1 Οι επιλεγμένοι παράγοντες και τα επίπεδα μελέτης τους

Παράγοντες	Υλικά και επίπεδα τιμών	
Υλικό διασποράς	C-18	100%
	Florisil	100%
	Bondesil-PSA	100%
	C-18 + Bondesil-NH ₂	1:1
Αναλογία δείγματος / υλικού διασποράς	C-18 / δείγμα	2:1
	C-18 / δείγμα	1:1
Διαλύτης έκλουσης	Εξάνιο / διχλωρομεθάνιο	1:1
	Εξάνιο / ακετόνη	9:1
	εξάνιο	100%
Υλικό καθαρισμού εκχυλίσματος	Florisil	100%
	Florisil / C-18	1:1

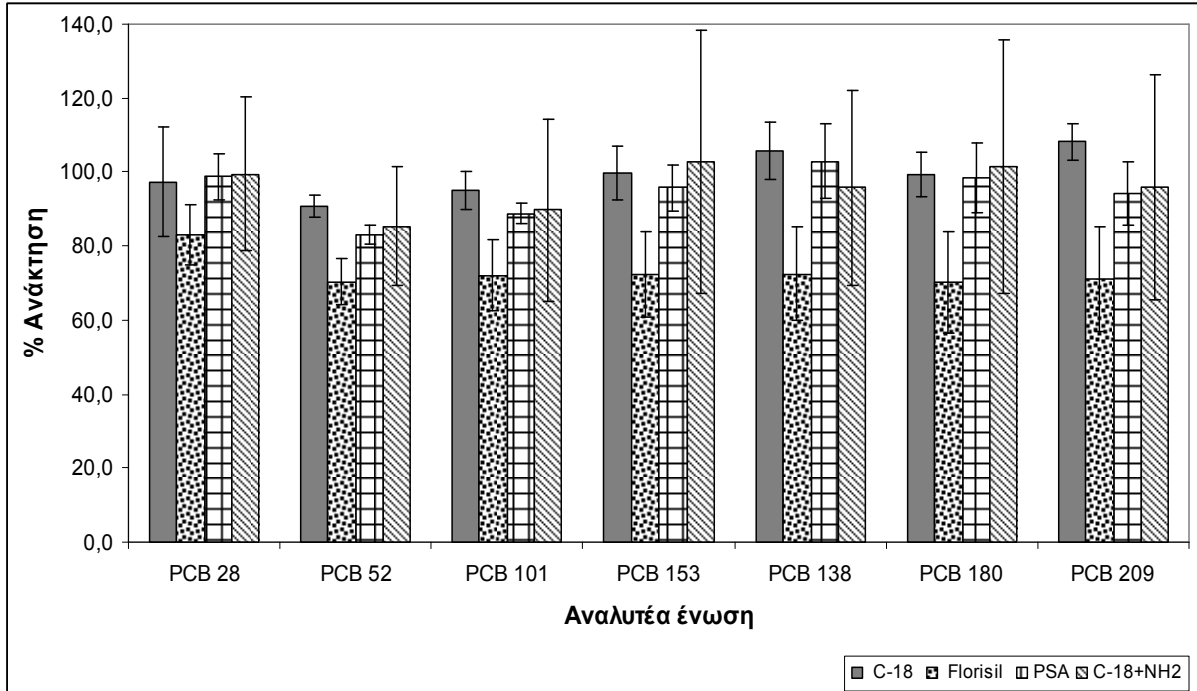
Με τις τιμές του ανωτέρω πίνακα και τον προαναφερόμενο τρόπο πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης για την επιλογή των πειραματικών συνθηκών της εκχύλισης. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων για τις 26 οργανοχλωριωμένες ενώσεις της μελέτης αναπαριστούνται στα σχήματα 6.1 – 6.9.



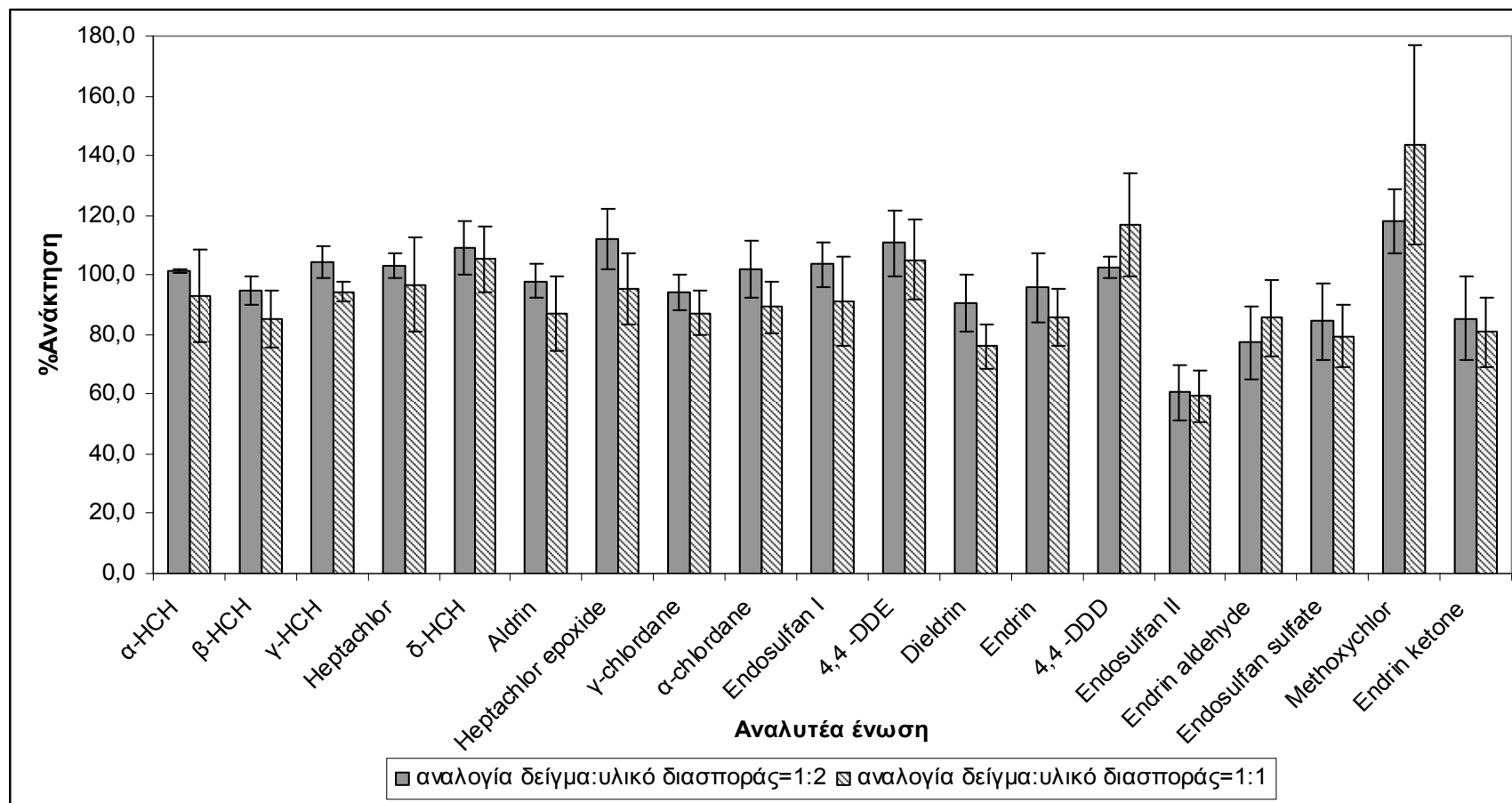
Σχήμα 6.1 Επίδραση του είδους υλικού διασποράς στην ανάκτηση των αναλυτέων ενώσεων από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.



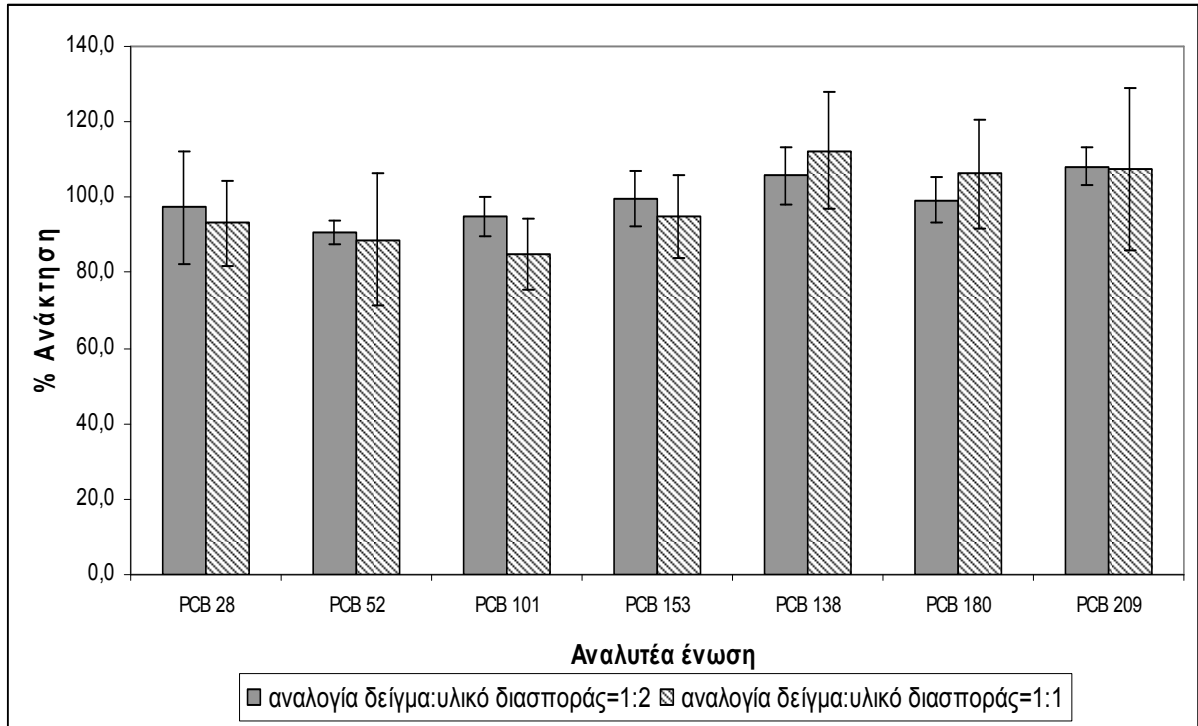
Σχήμα 6.2 Επίδραση του είδους υλικού διασποράς στην ανάκτηση των αναλυτέων ενώσεων από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.



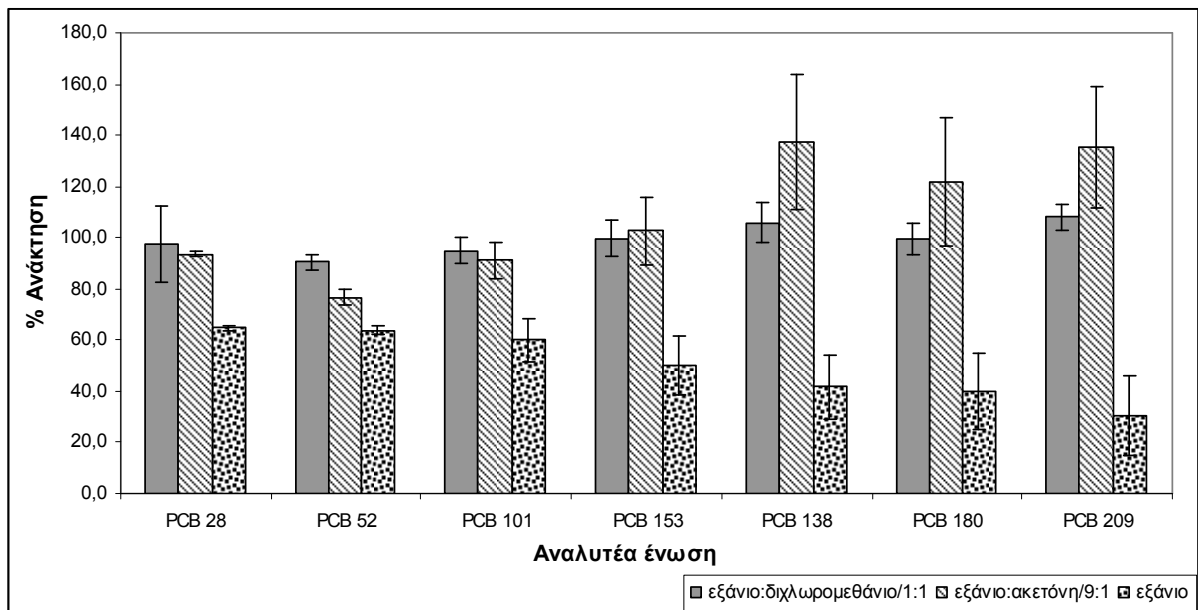
Σχήμα 6.3 Επίδραση του είδους υλικού διασποράς στην ανάκτηση των PCBs από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.



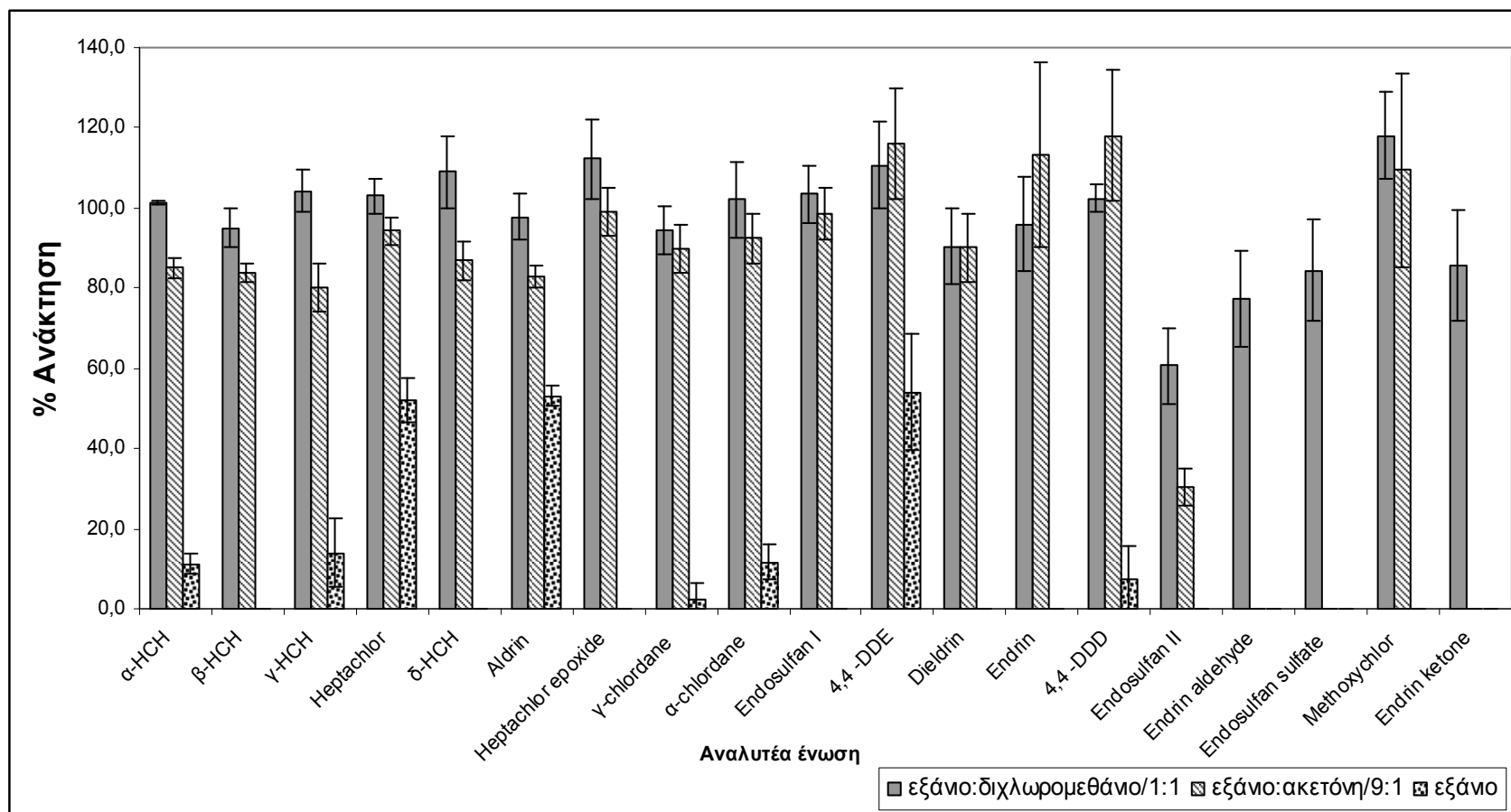
Σχήμα 6.4 Επίδραση της αναλογίας δείγμα : υλικό διασποράς στην ανάκτηση των αναλυτέων ενώσεων από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.



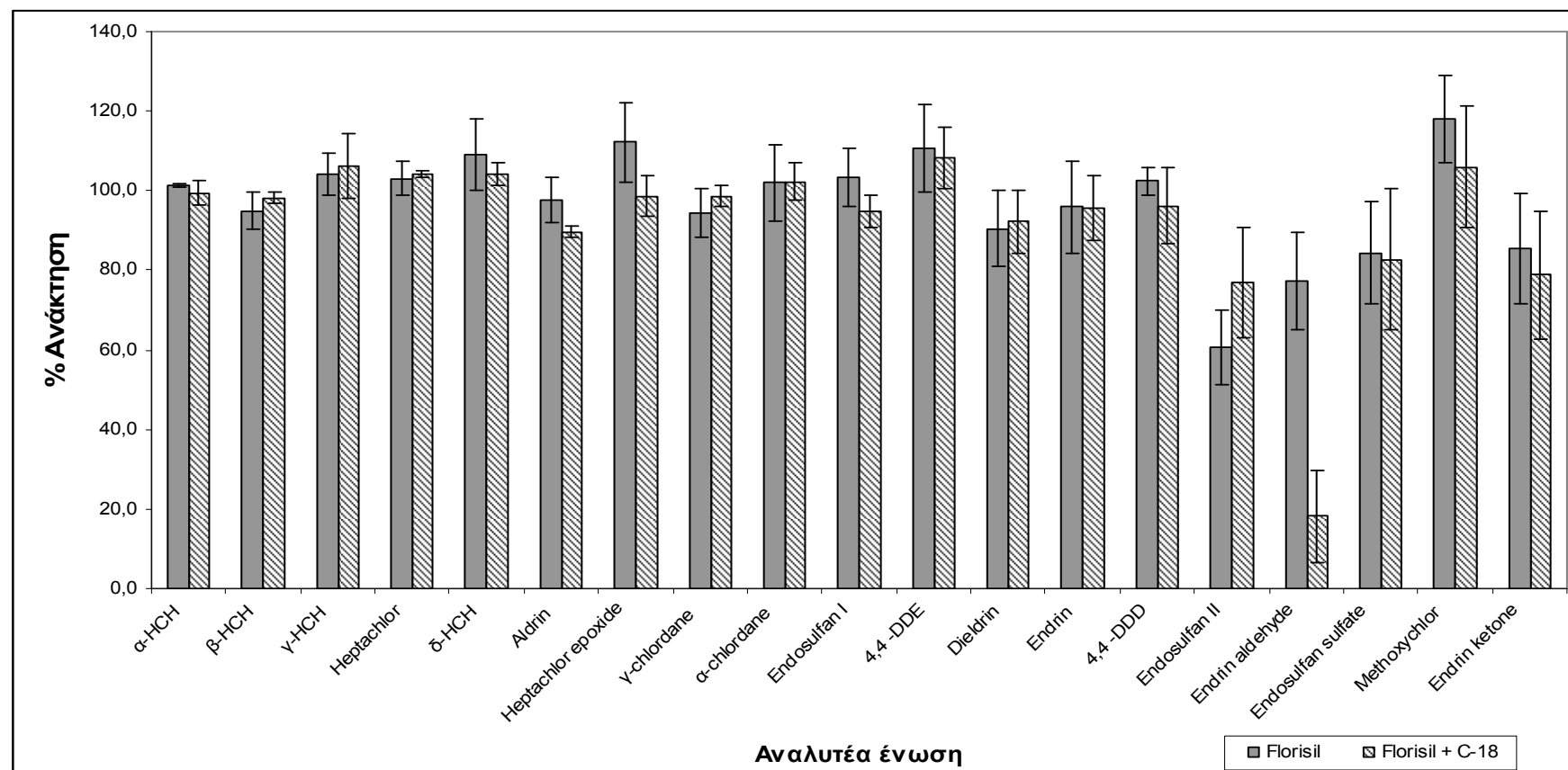
Σχήμα 6.5 Επίδραση της αναλογίας δείγμα : υλικό διασποράς στην ανάκτηση των PCBs από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.



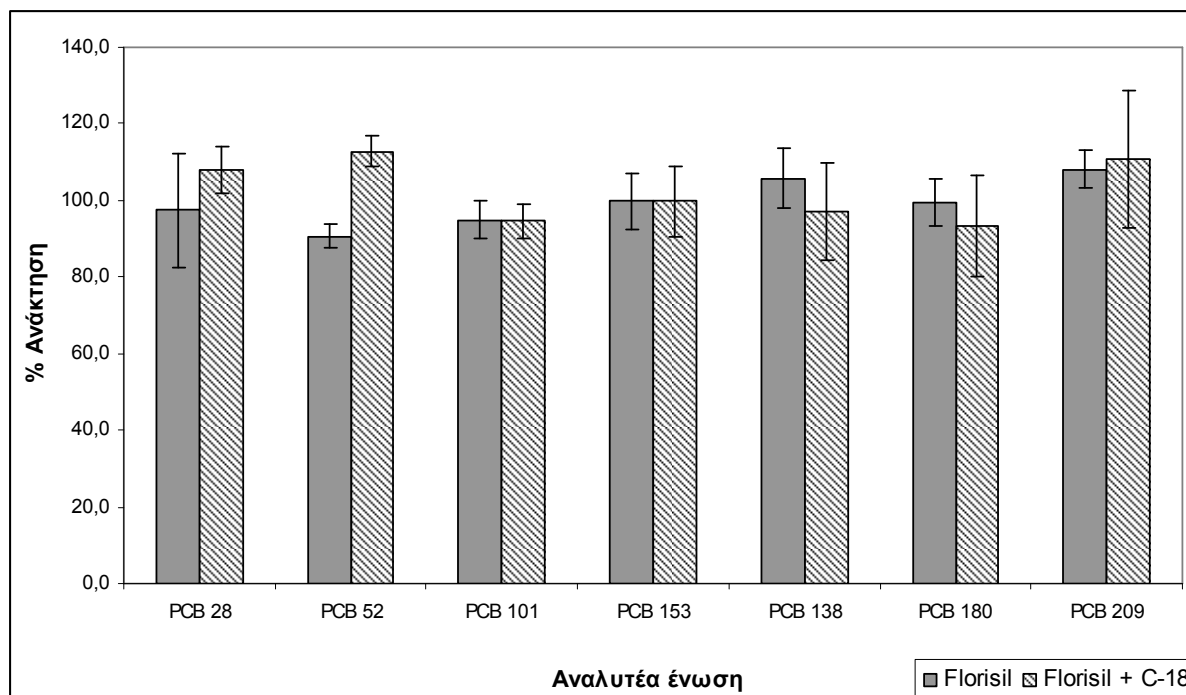
Σχήμα 6.6 Επίδραση του μίγματος διαλυτών έκλουσης στην ανάκτηση των PCBs από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.



Σχήμα 6.7 Επίδραση του μίγματος διαλυτών έκλουσης στην ανάκτηση των αναλυτέων ενώσεων από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.



Σχήμα 6.8 Επίδραση του είδους υλικού καθαρισμού του εκχυλίσματος στην ανάκτηση των αναλυτέων ενώσεων από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.



Σχήμα 6.9 Επίδραση του είδους υλικού καθαρισμού του εκχυλίσματος στην ανάκτηση των PCBs από εμβολιασμένο δείγμα ψαριού (Κέφαλος) σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g wet weight ιστού.

Από τα γραφήματα αυτά, φαίνεται ότι κάνοντας χρήση του υλικού C-18 (1^ο βήμα βελτιστοποίησης), η μέση τιμή και οι μεμονωμένες τιμές ανάκτησης όλων των ενώσεων είναι υψηλότερες σε σχέση με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα υλικά διασποράς ενώ παρελήφθησαν καθαρότερα εκχυλίσματα.

Κατά το 2^ο βήμα βελτιστοποίησης, εξετάστηκε ποια αναλογία δείγμα: υλικό διασποράς είναι ικανή να επιφέρει πλήρη εκχύλιση των αναλυτέων ενώσεων του δείγματος προς ανάλυση και όπως φάνηκε από τις τιμές ανάκτησης αυτή η αναλογία είναι 1:2.

Το είδος και ο όγκος διαλύτη έκλουσης (3^ο βήμα βελτιστοποίησης) αποτελούν σημαντικούς παράγοντες της εκλεκτικής έκλουσης ενώσεων και περιορισμού της συνέκλουσης παρεμποδιζουσών ουσιών. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν διαλύτες ή μίγματα διαλυτών διαφορετικής πολικότητας εξαιτίας της διαφορετικής σχετικής πολικότητας των αναλυτέων ενώσεων. Η διαλυτότητα των PCBs ήταν χαμηλή ή μηδενική για κάποιες ενώσεις κατά τη χρήση των διαλυτών: α) εξάνιο/διχλωρομεθάνιο (1/1) (μίγμα διαλυτών ενδιάμεσης πολικότητας) και β) εξάνιο/ακετόνη (9/1) αλλά υψηλότερη κατά τη χρήση διαλύτη εξάνιο (100%) (απολικός διαλύτης). Συγκεκριμένα, με τη χρήση εξανίου καταγράφηκαν πολύ χαμηλές ή μηδενικές τιμές ανάκτησης των ενώσεων, οι οποίες αυξάνονταν με αύξηση της πολικότητας του μίγματος διαλυτών μέχρι το μίγμα διαλυτών

εξάνιο/διχλωρομεθάνιο (1/1) όπου οι τιμές ανάκτησης ήταν ικανοποιητικές. Ο όγκος διαλύτη έκλουσης ορίστηκε 15 mL και προέκυψε από μεμονωμένα πειράματα και βιβλιογραφικά δεδομένα.

Τέλος, η εξέταση δύο ειδών υλικών καθαρισμού του εκχυλίσματος δεν φανέρωσε σημαντικές διαφορές στις τιμές ανάκτησης αλλά η χρήση υλικού florisil απέδωσε καθαρότερα εκχυλίσματα.

Στηριζόμενοι στην ερμηνεία των γραφημάτων καθώς και σε πειραματικές παρατηρήσεις (π.χ. καθαρά εκχυλίσματα, ανάκτηση όλων των ενώσεων) συμπεραίνεται ότι η υψηλότερη απόδοση εκχύλισης επιτυγχάνεται με τις εξής τιμές παραγόντων:

- υλικό διασποράς: C-18 (100%) - 2g,
- αναλογία δείγμα/ υλικό διασποράς: 1/2,
- διαλύτης έκλουσης: μίγμα εξάνιο/διχλωρομεθάνιο: (50%) / (50%) - 15mL,
- υλικό καθαρισμού εκχυλίσματος: Florisil (100%) - 2g

Ωστόσο μ'αυτόν τον τρόπο βελτιστοποίησης της μεθόδου, δεν είναι εφικτή η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των παραγόντων μεταξύ τους και ο συνυπολογισμός των ποικίλων συνδυασμών των τιμών των εξεταζόμενων παραγόντων στην απόδοση της εκχύλισης των ενώσεων.

6.1.2 Επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας

Για την επικύρωση της μεθοδολογίας MSPD (με τη συγκεκριμένη μέθοδο βελτιστοποίησης) προσδιορίστηκαν ορισμένα χαρακτηριστικά ποιότητας της. Πρόκειται για την ανάκτηση, τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και την πιστότητα (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα) της μεθόδου. Για τη μελέτη επικύρωσης χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα αντιπροσωπευτικό δείγμα ιχθυού (Κέφαλος, *mugil cephalus* - λίπος=4,5%), το οποίο εμβολιάστηκε με κατάλληλα πρότυπα διαλύματα των αναλυτέων ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Η ανάκτηση της μεθόδου υπολογίστηκε σε τρία ανεξάρτητα δείγματα ιχθυού (n=3) τα οποία είχαν εμβολιαστεί με πρότυπο διάλυμα ενώσεων σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης : 10, 50, 100 ng/g. Επιπρόσθετα, μη εμβολιασμένα δείγματα ιχθυού (n=3) αναλύθηκαν και λήφθηκαν υπόψη κατά τον υπολογισμό των ανακτήσεων.

Η γραμμικότητα της μεθόδου στην απόκριση των αναλυτέων ενώσεων προσδιορίστηκε με τη χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων ιχθυού σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης: 10, 50, 100 ng/g. Προσδιορίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης, r, και οι σταθερές προσδιορισμού, r².

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορίστηκαν προσδιορίστηκαν ως οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τις οποίες ο λόγος σήματος-θορύβου παίρνει τουλάχιστον τις τιμές 3 και 10 αντίστοιχα, ακολουθώντας τις συστάσεις της IUPAC και βρέθηκαν όπως αναπαρίσταται στον πίνακα 6.3.

Η πιστότητα της μεθόδου, ως το πλέον χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό επίδοσης μιας αναλυτικής μεθόδου, αντικατοπτρίζει τη διακύμανση στα αποτελέσματα όταν πραγματοποιείται επαναλαμβανόμενη ανάλυση του ίδιου δείγματος. Οι μετρήσεις πιστότητας εξειδικεύθηκαν σε μετρήσεις επαναληψιμότητας και σε μετρήσεις ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας. Η μέτρηση της επαναληψιμότητας περιλάμβανε προσδιορισμό της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) των τιμών ανάκτησης 6 επαναλήψεων εμβολιασμένου δείγματος ιχθυού με το μείγμα των αναλυτών ενώσεων σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g την ίδια ημέρα. Η μέτρηση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας περιλάμβανε προσδιορισμό της (%RSD) των τιμών ανάκτησης 6 επαναλήψεων εμβολιασμένου δείγματος ιχθυού με το μείγμα των αναλυτών ενώσεων σε επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g σε διάστημα τριών ημερών.

Έτσι η ανάκτηση κυμάνθηκε από 55% έως 114% (στο επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g), τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης από 0,3 έως 1,0 (ng/g) και 1,0 έως 3,3 (ng/g) αντίστοιχα. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου υπολογίστηκαν ως % RSD και βρέθηκαν στα επίπεδα τιμών 4,3-20,2 και 2,0-19,6 αντίστοιχα.

Πίνακας 6.2 Ανακτήσεις των αναλυτέων ενώσεων

α/α	Αναλυτές ενώσεις	Χρόνος κατακρ. (λεπτά)	Επίπεδο συγκέντρωσης	Επίπεδο συγκέντρωσης	Επίπεδο συγκέντρωσης
			10ng/g	50ng/g	100ng/g
			Ανάκτηση ^α (RSD) (%)	Ανάκτηση ^α (RSD) (%)	Ανάκτηση ^α (RSD) (%)
1	α-HCH	10,991	101,6 (11,0)	95,8 (1,4)	89,5 (2,0)
2	β-HCH	12,057	68,7 (9,6)	86,6 (5,2)	84,1 (3,8)
3	γ-HCH	12,275	140,0 (6,2)	98,3 (4,1)	91,1 (3,7)
4	PCB 28	13,151	96,1 (6,1)	93,2 (3,5)	80,3 (3,5)
5	Heptachlor	13,260	89,7 (0,6)	89,5 (15,6)	93,9 (2,2)
6	δ-HCH	13,397	93,7 (16,7)	101,1 (5,7)	105,7 (4,8)
7	PCB 52	14,226	111,4 (19,8)	73,1 (2,6)	69,1 (3,6)
8	Aldrin	14,416	83,4 (8,3)	74,7 (5,4)	71,7 (3,2)
9	Heptachlor epoxide	16,540	109,3 (21,5)	99,7 (9,3)	91,4 (4,9)
10	γ-chlordane	17,370	104,7 (7,3)	84,1 (9,5)	81,6 (3,2)
11	PCB 101	17,520	86,0 (3,3)	73,8 (2,8)	65,4 (2,6)
12	α-chlordane	18,061	101,9 (5,4)	79,7 (9,2)	79,0 (2,4)
13	Endosulfan I	18,181	58,5 (19,2)	75,8 (5,5)	78,4 (2,6)
14	4,4 -DDE	19,142	112,5 (3,1)	89,5 (7,7)	80,7 (2,7)
15	Dieldrin	19,645	88,9 (7,3)	85,0 (0,6)	82,2 (2,5)
16	Endrin	21,500	130,8 (10,2)	106,0 (2,4)	100,9 (4,5)
17	PCB 153	21,712	138,3 (1,4)	80,8 (10,9)	70,6 (2,8)
18	4,4 -DDD	22,270	119,5 (6,9)	86,0 (9,8)	80,7 (3,3)
19	Endosulfan II	22,694	82,7 (4,2)	61,9 (6,0)	60,7 (1,4)
20	PCB 138	24,461	133,5 (7,6)	95,6 (5,5)	82,6 (4,2)
21	Endrin aldehyde	24,762	60,7 (10,7)	55,0 (14,7)	53,4 (7,7)
22	Endosulfan sulphate	25,943	100,7 (1,6)	80,4 (10,0)	74,7 (1,5)
23	PCB 180	28,728	127,5 (7,4)	82,5 (7,4)	69,0 (5,9)
24	Methoxychlor	30,684	113,4 (2,1)	114,1 (7,9)	110,3 (5,1)
25	Endrin ketone	31,166	91,7 (2,1)	72,9 (10,5)	66,8 (1,7)
26	PCB 209	39,767	121,9 (7,1)	90,3 (0,9)	89,0 (3,2)

α: n=3

Πίνακας 6.3 Μετρήσεις γραμμικότητας, ανιχνευσιμότητας και πιστότητας μεθόδου

<i>a/a</i>	Αναλυτές ενώσεις	Γραμμικότητα r^2	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Επαναληψιμότητα RSD ^a (%)	Αναπαραγωγιμότητα RSD ^a (%)
1	α -HCH	0,999	0,3	1,0	6,8	8,1
2	β -HCH	0,999	0,5	1,7	6,9	7,1
3	γ -HCH	0,999	0,6	2,0	6,1	1,5
4	PCB 28	0,996	0,7	2,3	9,8	12,6
5	Heptachlor	0,999	0,3	1,0	11,6	5,7
6	δ -HCH	0,999	0,3	1,0	8,7	2,0
7	PCB 52	1,000	0,5	1,7	4,3	2,5
8	Aldrin	0,999	0,6	2,0	4,8	2,2
9	Heptachlor epoxide	0,999	0,5	1,7	8,5	3,7
10	γ -chlordane	1,000	0,7	2,3	10,9	4,6
11	PCB 101	0,998	0,5	1,7	7,3	2,2
12	α -chlordane	0,999	0,7	2,3	13,2	8,1
13	Endosulfan I	1,000	0,7	2,3	12,7	7,9
14	4,4 –DDE	0,999	0,5	1,7	10,6	6,8
15	Dieldrin	0,999	0,7	2,3	10,1	4,5
16	endrin	0,999	0,8	2,6	10,1	6,3
17	PCB 153	0,999	0,6	2,0	16,9	10,1
18	4,4 –DDD	1,000	0,9	3,0	20,2	19,6
19	Endosulfan II	0,999	0,6	2,0	7,6	8,1
20	PCB 138	0,998	0,5	1,7	8,1	7,0
21	Endrin aldehyde	1,000	0,8	2,6	11,5	5,9
22	Endosulfan sulphate	0,999	0,7	2,3	11,7	11,5
23	PCB 138	0,997	0,4	1,3	14,9	14,2
24	Methoxychlor	0,999	1,0	3,3	9,6	12,5
25	Endrin ketone	0,999	0,5	1,7	14,2	14,3
26	PCB 209	0,997	0,4	1,3	12,3	11,7

α: n=6

Ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης επιλέχθηκαν: 2g C-18 (προσδεμένη sílika ανάστροφης φάσης) ως υλικό διασποράς της ποσότητας (1g) δείγματος ιχθυού που εκχυλίστηκαν με 15mL μίγματος διαλυτών εξάνιο/διχλωρομεθάνιο σε αναλογία 50/50 ενώ ο καθαρισμός του εκχυλίσματος έγινε με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας 2g Florisil ως υλικό πλήρωσης.

6.2 Μέθοδος εφαρμογής παραγοντικών σχεδιασμών

6.2.1 Βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας εκχύλισης

Κατά αυτόν τον τρόπο βελτιστοποίησης της μεθοδολογίας εκχύλισης, η επίδραση των τεσσάρων προαναφερόμενων παραγόντων στην απόδοση της εκχύλισης μελετήθηκε μεταβάλλοντας ταυτόχρονα όλους τους παράγοντες μαζί και λαμβάνοντας υπόψη τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Η διαδικασία που επιτρέπει αυτή τη μελέτη περιλαμβάνει την εφαρμογή κατάλληλων στατιστικών μοντέλων που ονομάζονται παραγοντικοί σχεδιασμοί (experimental designs). Βάσει των σχεδίων αυτών, πραγματοποιούνται πειράματα εκχύλισης, διαφορετικών μεταξύ τους, ώστε να υπολογιστεί η ανάκτηση των αναλυτέων ενώσεων για κάθε πειραματική πορεία (runs). Ο αριθμός των πειραματικών πορειών και οι τιμές των παραγόντων για καθεμιά προέρχονται από την εφαρμογή των στατιστικών μοντέλων. Οι διαφορές μεταξύ των πειραματικών πορειών καθορίζονται από τις διαφορετικές τιμές των μελετώμενων παραγόντων για κάθε πορεία. Πολλές μελέτες φαίνεται να επιλέγουν να χρησιμοποιούν διάφορα είδη παραγοντικών σχεδιασμών για να βελτιστοποιήσουν μεθοδολογίες εκχύλισης ενώσεων από τρόφιμα (Hu Y. Y. et al (2005), Sun L. et al (2003), Aguilar C. et al (1999)).

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα «Statistica 7.0» (StatSoft, Inc. Tulsa, USA) και αφού μελετήθηκαν οι δυνατότητες εφαρμογής, επιλέχθηκε το «κλασματικό παραγοντικό σχέδιο $3^{(4-1)}$ » που περιλάμβανε 27 πειραματικές πορείες με τυχαία σειρά μεταβολής 4 παραγόντων σε 3 επίπεδα τιμών. Οι παράμετροι και τα επίπεδα τιμών στα οποία μελετήθηκαν καθώς και τα δεδομένα που προέκυψαν από τις πειραματικές μετρήσεις φαίνονται στον πίνακα 6.4 Ως μετρήσιμη απόκριση χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των είκοσι έξι (26) ενώσεων για κάθε σειρά πειραματικών πορειών. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας ως απόκριση την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής των ανακτήσεων των αναλυτέων ενώσεων.

Πίνακας 6.4 Το σύνολο δεδομένων του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού 3⁽⁴⁻¹⁾ που χρησιμοποιήθηκε για μοντελοποίηση με τη χρήση των ANN-1 και ANN-2

Πορεία	Είσοδοι ^α			Έξοδοι ^α		
	Florisil ^β (%)	Αναλογία δείγματος/υλικού διασποράς	Διγλωρομεθάνιο ^γ (%)	C-18 (%) ^δ	Μέση τιμή ανάκτησης (%)	Τυπική απόκλιση (%)
1	0	1:2	0	50	58,7	47,1
2	0	1:2	25	25	97,5	46,8
3	50	1:1	50	0	101,8	35,8
4	50	1:1	25	25	95,5	42
5	0	1:1	50	25	99	32,9
6	100	1:1	25	0	62,1	33,7
7	50	1:2	25	0	75,7	32,8
8	50	1:1	0	50	52,5	36
9	100	1:2	25	50	63,4	28,6
10	0	1:3	25	0	60,9	31,9
11	100	1:3	25	25	71,4	34,3
12	0	1:2	50	0	98,1	11,7
13	100	1:2	50	25	66,8	21,1
14	50	1:2	50	50	81,5	23,2
15	50	1:3	0	0	42,8	48,9
16	50	1:2	0	25	62,6	49,5
17	50	1:3	25	50	90,6	37,6
18	0	1:3	0	25	65,9	52
19	100	1:3	0	0	39,3	44,2
20	100	1:1	0	25	51,3	28,7
21	100	1:1	50	50	68,1	18,3
22	0	1:1	0	0	67,2	85,5
23	0	1:3	50	50	91,7	15,4
24	100	1:3	50	0	67	25,3
25	100	1:2	0	0	42,4	45,3
26	50	1:3	50	25	72,1	21,9
27	0	1:1	25	50	61,1	20,1

^αANN₁: τέσσερις είσοδοι και μια έξοδος (μέση τιμή ανάκτησης), ANN₂: τέσσερις είσοδοι και μια έξοδος (τυπική απόκλιση), ^β περιεχόμενο (%) Florisil σε υλικό C-18, ^γ περιεχόμενο (%) διγλωρομεθάνιο σε εξάνιο, ^δ περιεχόμενο (%) C-18 σε Florisil.

Μετά την πραγματοποίηση των ανωτέρω πειραμάτων, τα δεδομένα εκτιμήθηκαν με χρήση χημειομετρικών μεθόδων ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης. Συγκεκριμένα, το σύνολο των δεδομένων του πίνακα 6.4 χρησιμοποιήθηκε κατάλληλα για την εφαρμογή των Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων (Artificial Neural Networks, ANNs). Σύμφωνα με τη θεωρία των ANNs (4^ο κεφάλαιο), οι παράγοντες που επιλέχθηκαν για τη βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν ως είσοδοι για το τεχνητό νευρωνικό δίκτυο. Οι αποκρίσεις του κλασματικού παραγοντικού σχεδίου δηλαδή οι ανακτήσεις των αναλυτέων ενώσεων και η τυπική απόκλιση αυτών, έπρεπε να χρησιμοποιηθούν ως έξοδοι των δύο τεχνητών νευρωνικών δικτύων που εφαρμόστηκαν συνολικά στην παρούσα μελέτη. Έτσι, στο πρώτο νευρωνικό δίκτυο (ANN-1) έπρεπε να χρησιμοποιηθούν ως έξοδοι οι ανακτήσεις των αναλυτέων ενώσεων και στο δεύτερο νευρωνικό δίκτυο (ANN-2) έπρεπε να χρησιμοποιηθούν ως έξοδοι οι τυπικές αποκλίσεις της μέσης τιμής των ανακτήσεων των αναλυτέων ενώσεων. Θα έπρεπε δηλαδή ο αριθμός των εξόδων για κάθε ANN να είναι όσος και ο αριθμός των αναλυτέων ενώσεων (αφού για κάθε μια ένωση αντιστοιχεί ξεχωριστή τιμή αποκρίσεων). Η δομή του κάθε ANN θα περιλάμβανε τότε 4 εισόδους και 26 εξόδους αφού θα στόχευε στη βέλτιστη απόκριση για κάθε αναλυτέα ένωση ξεχωριστά. Όμως προκειμένου να εκμεταλλευτούμε τα πλεονεκτήματα των τεχνητών νευρωνικών δικτύων (ταχύτητα, ακρίβεια, αξιοπιστία, αποφυγή χρήσης κλασσικών υπολογιστικών μεθόδων) αλλά και να εκπληρώσουμε το σκοπό της μελέτης για ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μιας **πολύ-υπολειμματικής** μεθόδου προσδιορισμού οργανικών τοξικών ενώσεων σε ιχθυρά, χρησιμοποιήσαμε ως έξοδο για κάθε ANN τη μέση τιμή της απόκρισης των 26 αναλυτέων ενώσεων κάθε πειραματικής πορείας. Δηλαδή, η δομή του κάθε ANN περιλαμβάνει 4 εισόδους και 1 έξοδο (ο αριθμητικός μέσος όρος των τιμών ανακτήσεων ή της τυπικής απόκλισης του μέσου όρου των τιμών ανακτήσεων αντίστοιχα των 26 ενώσεων). Μ'αυτόν τον τρόπο μπορεί να βρεθεί μια κοινή περιοχή πειραματικών συνθηκών που να επιτρέπει το βέλτιστο προσδιορισμό όλων των αναλυτέων ενώσεων ταυτόχρονα. Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε από τους Hu et al. 2005, Boti et al. 2009, όπου χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή της απόκρισης 11 και 5 αναλυτέων ενώσεων αντίστοιχα ενός πειραματικού σχεδιασμού για τη βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου.

Η αιτία της δόμησης και εφαρμογής δυο διαφορετικών ANNs με διαφορετικές εξόδους είναι η αποφυγή ή ο περιορισμός αποκλίσεων της μετρούμενης μέσης τιμής των ανακτήσεων των 26 ενώσεων της μελέτης από την πραγματική μέση τιμή. Κατά τον υπολογισμό των αριθμητικών μέσων όρων των ανακτήσεων των 26 ενώσεων είναι δυνατό κάποιες τιμές να είναι αρκετά μεγαλύτερες ή μικρότερες του μέσου όρου και μπορεί να αυξάνουν ή να

μειώνουν αντίστοιχα τη μέση τιμή με λανθασμένο τρόπο. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε το ANN-2 με έξοδο την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής των ανακτήσεων των 26 ενώσεων ώστε να συμπεριληφθούν τυχόν τέτοιες αποκλίσεις στο μοντέλο εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης.

Η εφαρμογή των δύο ANNs μπορεί τώρα να οδηγήσει στη βέλτιστη περιοχή πειραματικών συνθηκών που επιφέρουν τη βέλτιστη δυνατή απόδοση εκχύλισης για τις ενώσεις της μελέτης. Ποιοτικά κριτήρια επιλογής των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών αποτέλεσαν η υψηλότερη επιτρεπτή μέση τιμή ανάκτησης για το ANN-1 και η χαμηλότερη δυνατή τιμή τυπικής απόκλισης της μέσης τιμής ανάκτησης των αναλυτέων ενώσεων για το ANN-2. Δηλαδή, οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες θα είναι αυτές που επιφέρουν τη μέγιστη δυνατή μέση τιμή ανάκτησης και ταυτόχρονα τη μικρότερη δυνατή τυπική απόκλιση αυτής της μέσης τιμής. Τα ποσοτικά κριτήρια επιλογής των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών απορρέουν από την εφαρμογή των δύο ξεχωριστών ANNs. Η αρχιτεκτονική δομή των τεχνητών νευρωνικών δικτύων ερευνήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Statistica. Τα ANNs δοκιμάζουν και αναζητούν μοντέλα (αλγόριθμους) προσομοίωσης των πειραματικών δεδομένων με τεχνητά δίκτυα ώστε να επιλεγθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες.

Οι 27 πειραματικές πορείες του παραγοντικού σχεδιασμού χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των κατάλληλων ANNs. Κατ'εφαρμογή της θεωρίας του κεφαλαίου 4, μέρος των πορειών αυτών (23 πορείες) χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση των δικτύων και άλλο μέρος αυτών (4 πορείες) χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για την επιβεβαίωση του προσδιορισμού του κατάλληλου νευρωνικού δικτύου από το σύνολο όσων εξετάστηκαν κατά τη διαδικασία εκπαίδευσης.

α) Κατά τη διαδικασία εκπαίδευσης και εκμεταλλευόμενοι τις τεχνικές δυνατότητες του στατιστικού πακέτου, δοκιμάστηκαν οι εξής παράμετροι:

- τύποι τεχνητών νευρωνικών δικτύων
- δομές δικτύων
- αλγόριθμοι εκπαίδευσης

Τροφοδοτούμε κάθε διαφορετικό νευρωνικό δίκτυο με τα δεδομένα εκπαίδευσης, το δίκτυο συνδυάζοντας δεδομένα, αποκρίσεις και παραμέτρους χτίζει τη δομή του και αποδίδει τελικά μια αρχιτεκτονική δομή που να ικανοποιεί με τον καλύτερο δυνατό τρόπο όλα τα δεδομένα εισόδου. Δηλαδή, τα δεδομένα εκπαίδευσης των δικτύων (23 πορείες), εξέτασαν κάθε δυνατό συνδυασμό των προαναφερόμενων παραμέτρων προκειμένου να ικανοποιηθούν

τα κριτήρια τερματισμού της διαδικασίας εκπαίδευσης και εξαγωγής του καταλληλότερου δικτύου. Ως **κριτήρια τερματισμού** τέθηκαν το σφάλμα εκπαίδευσης και το σφάλμα επιβεβαίωσης (Root Mean Square, RMS). Το RMS είναι η τιμή της ρίζας του αθροίσματος των διαφορών μέσου τετραγώνου μεταξύ των υπολογισμένων τιμών εξόδου του κάθε δικτύου και των επιθυμούμενων τιμών εξόδου (ή των τιμών εξόδου που εμείς θέτουμε κατά την εκπαίδευση του, δηλαδή οι αποκρίσεις του παραγοντικού σχεδίου). Η επιθυμητή τιμή RMS είναι η ελάχιστη τιμή που υπολογίζεται από την εξέταση όλων των δυνατών ANNs που δοκιμάζονται για την εύρεση του καταλληλότερου.

β) Κατά τη **διαδικασία επιβεβαίωσης** συγκρίθηκαν οι πραγματικές τιμές των εξόδων όλων των δυνατών δικτύων με τις επιθυμητές τιμές (αποκρίσεις του παραγοντικού σχεδίου) για να ελεγχθεί η ικανότητά του να μπορεί να προβλέπει τιμές με το χαμηλότερο σφάλμα επιβεβαίωσης, κοντά σε εκείνο για το οποίο εκπαιδεύθηκε. Δηλαδή, ένα δίκτυο εκπαιδεύεται με τα δεδομένα εκπαίδευσης που του θέτουμε αλλά θα πρέπει να είναι ικανό να προβλέπει τιμές εξόδου με σφάλμα κοντά στο σφάλμα εκπαίδευσής του κάθε φορά που εμείς του θέτουμε διαφορετικά δεδομένα εισόδου. Έτσι, κάθε δίκτυο που εξετάστηκε, δοκιμάστηκε με τις 4 πειραματικές πορείες των δεδομένων επιβεβαίωσης (άγνωστες πορείες για το δίκτυο εξέτασης) για να υπολογιστεί η τιμή RMS, η οποία επιθυμείται να είναι η χαμηλότερη δυνατή αλλά να πλησιάζει την τιμή RMS της διαδικασίας εκπαίδευσης. Τότε, επιλέγεται το τεχνητό νευρωνικό δίκτυο και χρησιμοποιείται για την εξαγωγή των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών.

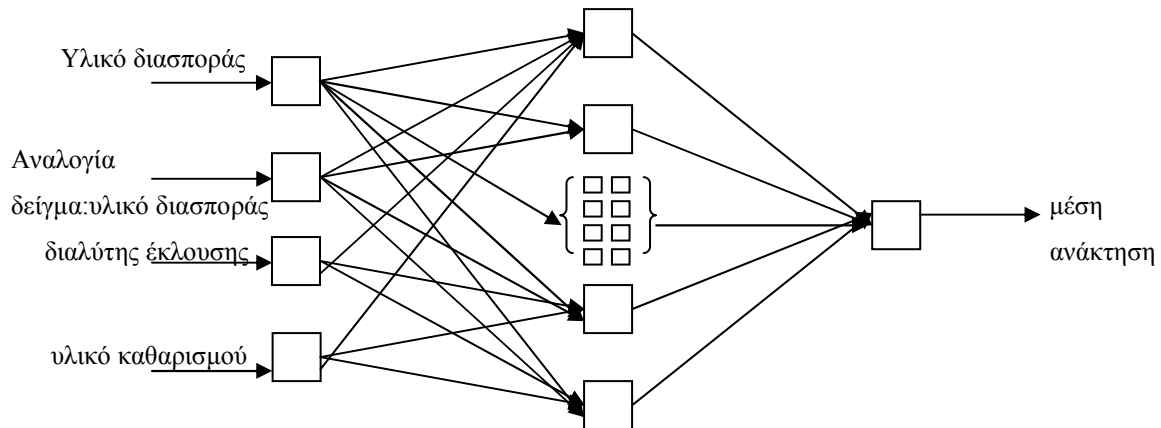
Οι τύποι τεχνητών νευρωνικών δικτύων που ερευνήθηκαν περιλάμβαναν τα είδη: πολυεπίπεδα perceptrons (multi-layer perceptrons, MLP) και τα δίκτυα RBF (radial basis function) με 1 έως 14 κρυμμένους νευρώνες. Για την εκπαίδευση των δικτύων MLP δοκιμάστηκαν οι αλγόριθμοι back propagation, gradient descent και conjugate gradient descent.

Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία ενεργειών καταλήξαμε στα εξής σχετικά με την επιλογή του κατάλληλου ANN και των βέλτιστων συνθηκών της μεθοδολογίας εκχύλισης:

I. ANN -1, με έξοδο τη μέση τιμή της ανάκτησης των αναλυτέων ενώσεων.

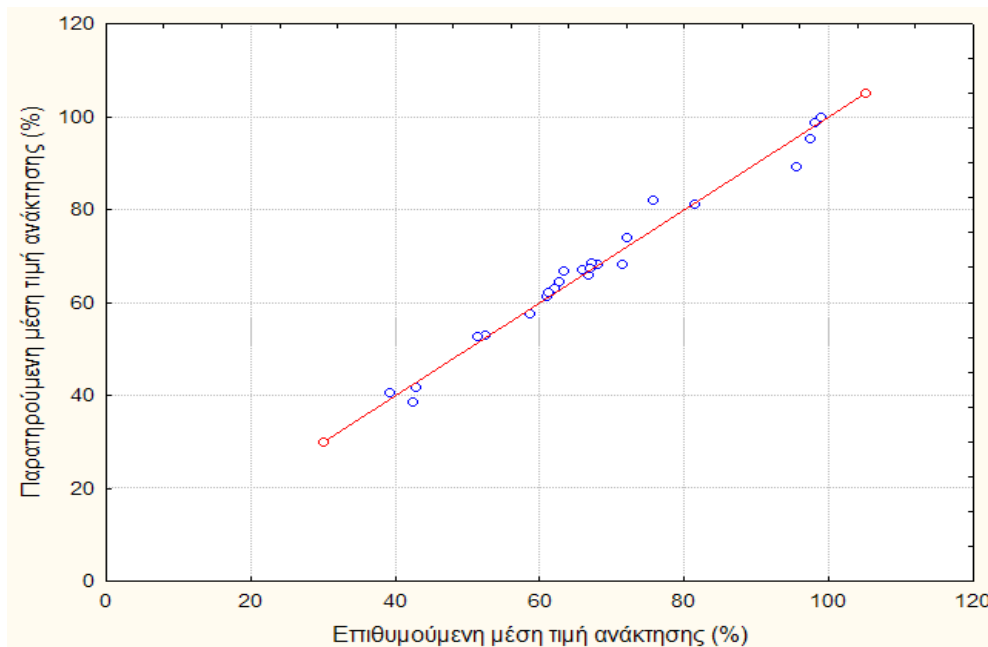
Η βέλτιστη δομή νευρωνικού δικτύου που βρέθηκε ήταν ένα πολυεπίπεδο perceptron με αρχιτεκτονική δομή «4:12:1», δηλαδή αποτελείται από 4 εισόδους, 12 νευρώνες στο κρυμμένο επίπεδο και 1 έξοδο. Ο αλγόριθμος conjugate gradient descent στην 145^η εποχή

βρέθηκε ο καταλληλότερος για την εκπαίδευση του νευρωνικού δικτύου ενώ τα σφάλματα εκπαίδευσης και επιβεβαίωσης ήταν 0,0289 RMS και 0,0071 RMS αντίστοιχα.



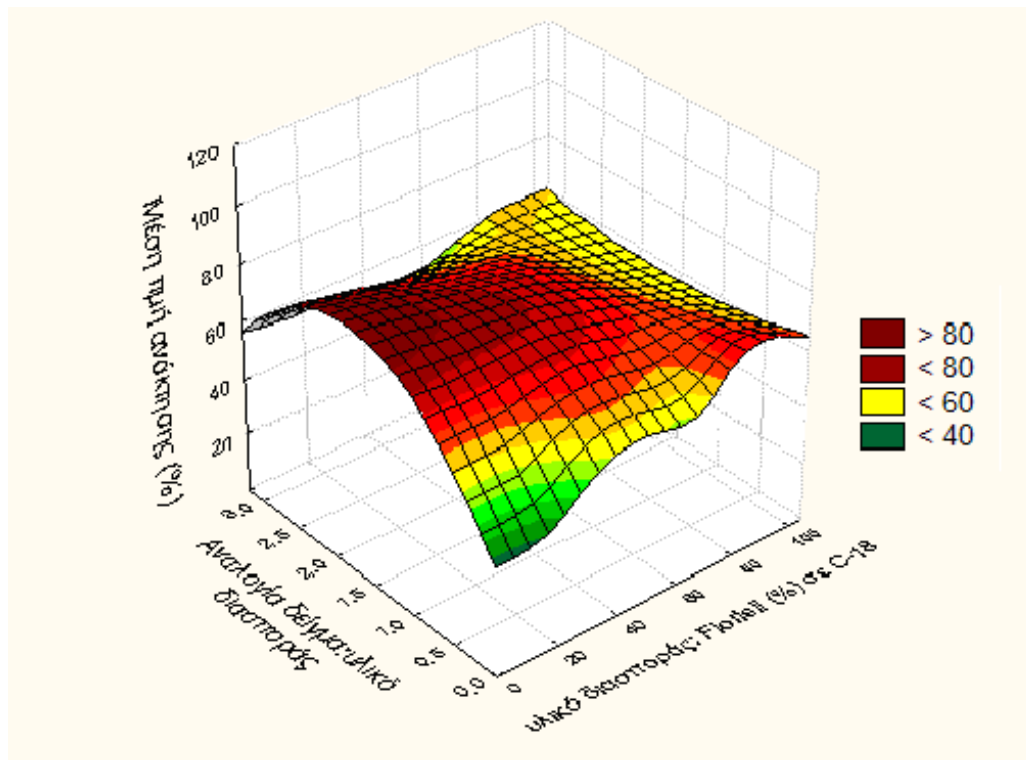
Σχήμα 6.6 Αρχιτεκτονική δομή του τεχνητού νευρωνικού δικτύου ANN -1

Από τα δεδομένα επιβεβαίωσης προέκυψε το γράφημα 6.7 που αναπαριστά τη συσχέτιση των παρατηρούμενων τιμών εξόδου του δικτύου με τις επιθυμητές τιμές που προκύπτουν από τον παραγοντικό σχεδιασμό και φαίνεται ότι η συσχέτιση αυτή είναι αρκετά καλή.

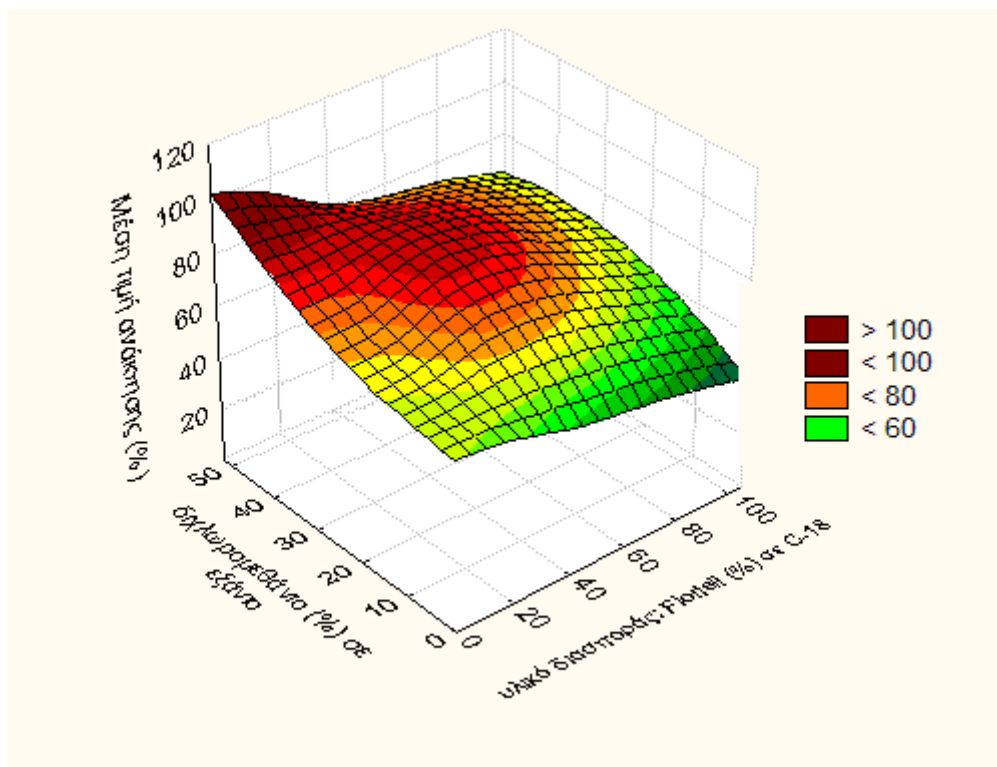


Σχήμα 6.7 Συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων και επιθυμώμενων μέσων τιμών ανάκτησης των αναλυόμενων ενώσεων

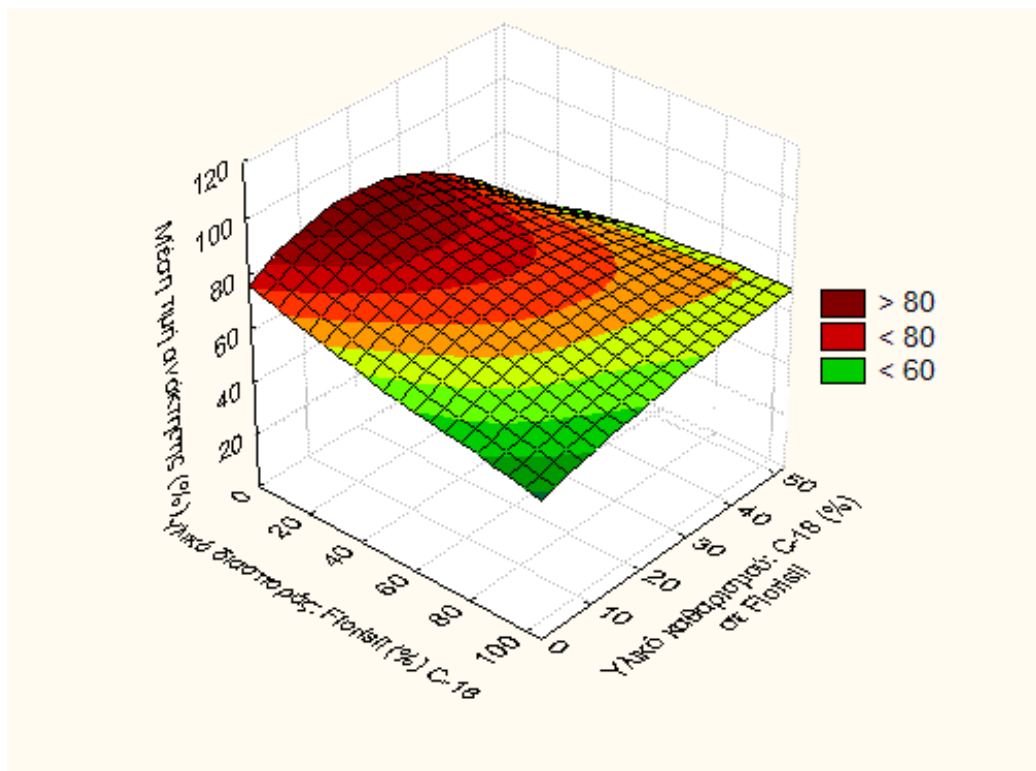
Έτσι, αυτή η δομή νευρωνικού δικτύου χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή επιφανειών απόκρισης της μέσης τιμής της ανάκτησης για δύο από τους τέσσερις παράγοντες της μελέτης κάθε φορά όπως φαίνεται στα σχήματα 6.8 - 6.13.



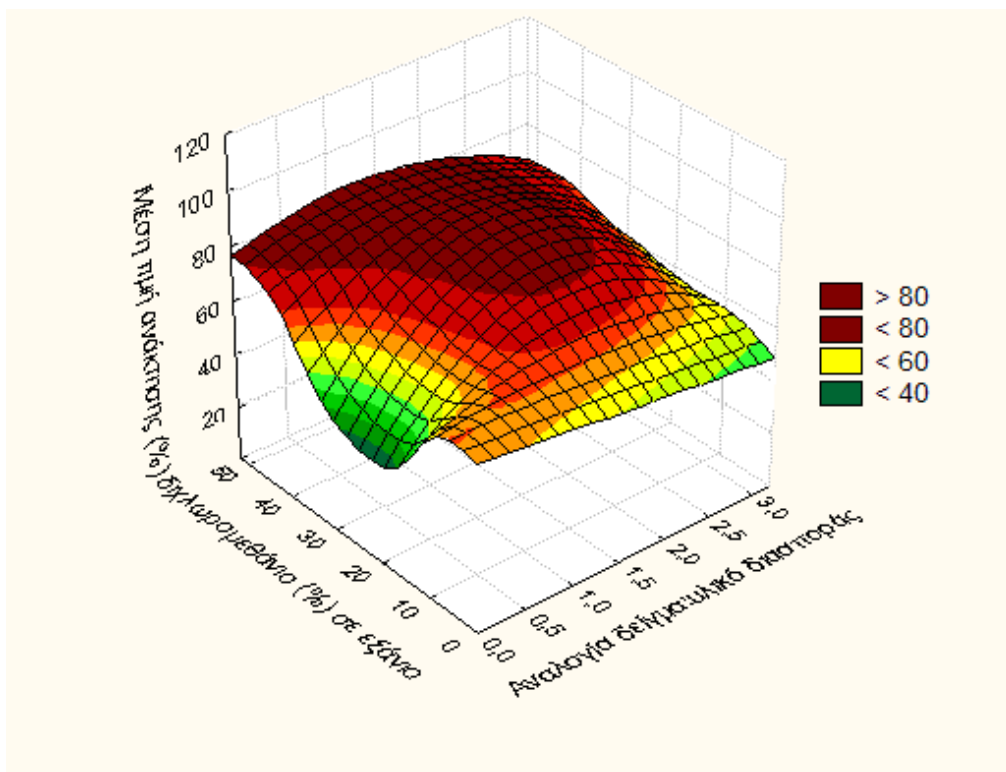
Σχήμα 6.8 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-1, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγμα: υλικό διασποράς / υλικό διασποράς: Florisil (%) σε C-18» στη μέση τιμή ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



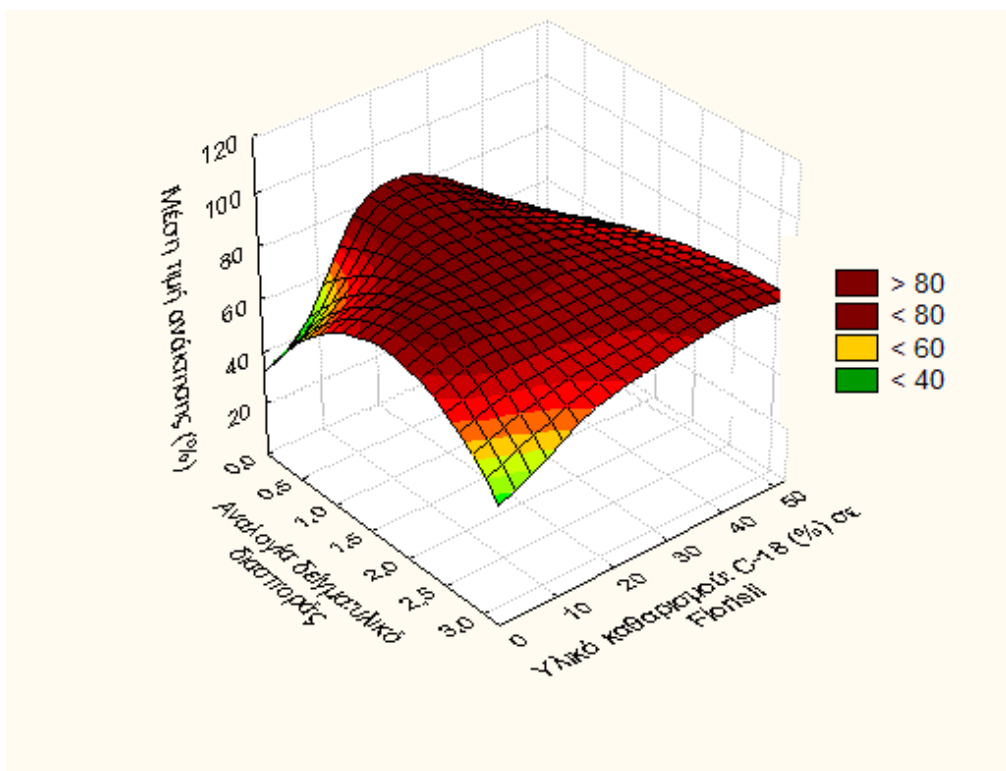
Σχήμα 6.9 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-1, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «διχλωρομεθάνιο (%) σε εξάνιο / υλικό διασποράς: Florisil (%) σε C-18» στη μέση τιμή ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



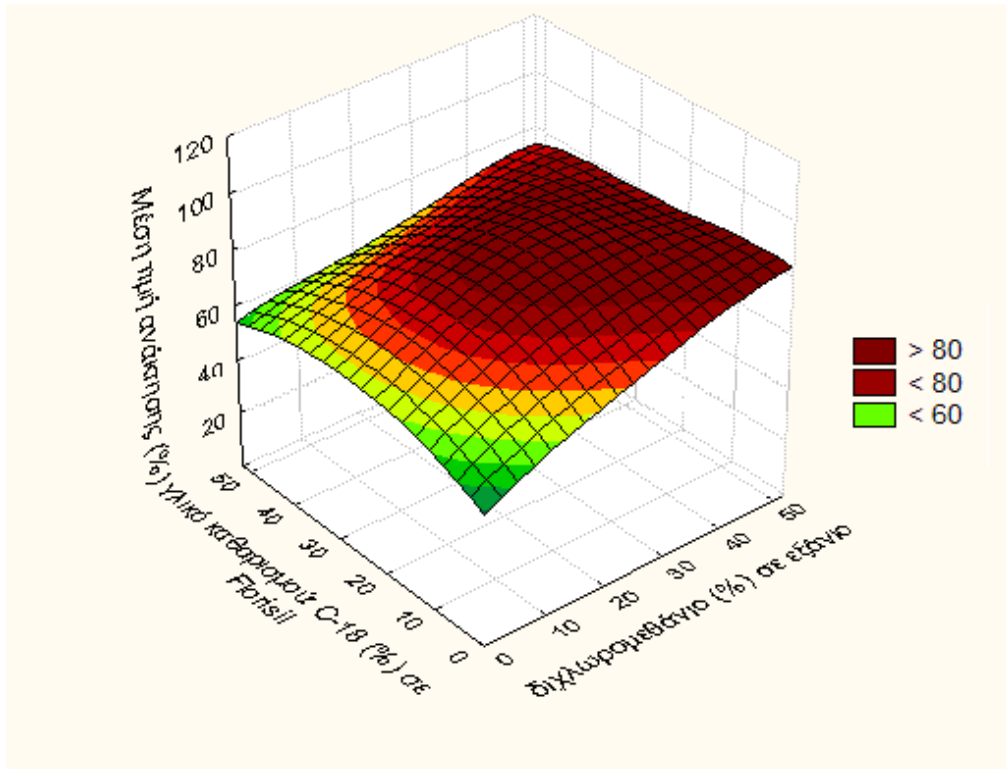
Σχήμα 6.10 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-1, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «υλικό καθαρισμού: C-18 (%) σε Florisil / υλικό διασποράς: Florisil (%) σε C-18» στη μέση τιμή ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



Σχήμα 6.11 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-1, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγμα: υλικό διασποράς / διχλωρομεθάνιο (%) σε εξάνιο» στη μέση τιμή ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



Σχήμα 6.12 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-1, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγμα: υλικό καθαρισμού: C-18 (%) σε Florisil » στη μέση τιμή ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



Σχήμα 6.13 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-1, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «υλικό καθαρισμού: C-18 (%) σε Florisil / διχλωρομεθάνιο (%) σε εξάνιο» στη μέση τιμή ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.

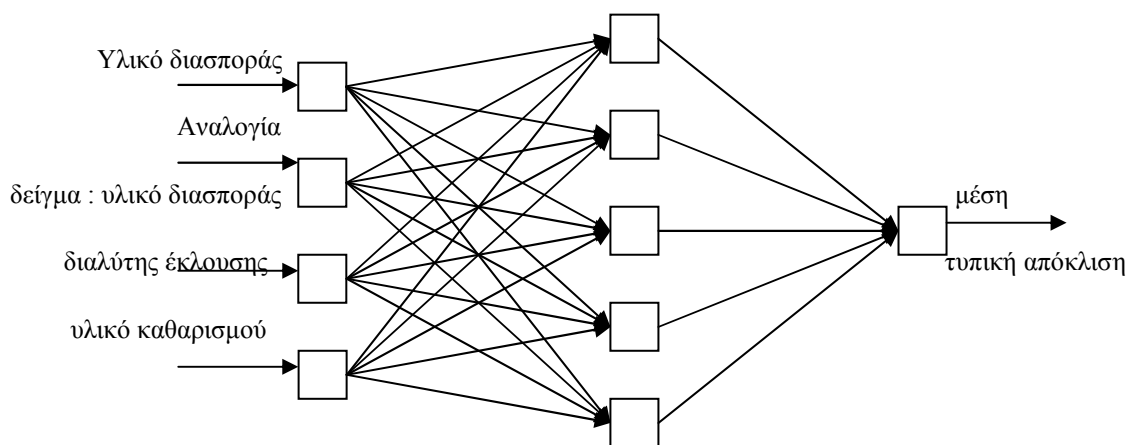
Από τα γραφήματα των σχημάτων αυτών συμπεραίνουμε ότι η μέγιστη απόδοση εκχύλισης όλων ταυτόχρονα των αναλυτέων ενώσεων επιτυγχάνεται υπό τις εξής πειραματικές συνθήκες:

- υλικό διασποράς: C-18 (80%) : Florisil (20%),
- αναλογία δείγματος/ υλικού διασποράς: 1/1,
- διαλύτης έκλουσης: μίγμα εξάνιο/διχλωρομεθάνιο: (50%) / (50%),
- υλικό καθαρισμού εκχυλίσματος: μίγμα C-18 (25%) / Florisil (75%)

Οι συνθήκες αυτές επιλέχθηκαν χωρίς προς το παρόν να ληφθεί υπόψη το ANN -2 με έξοδο την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής ανακτήσεων.

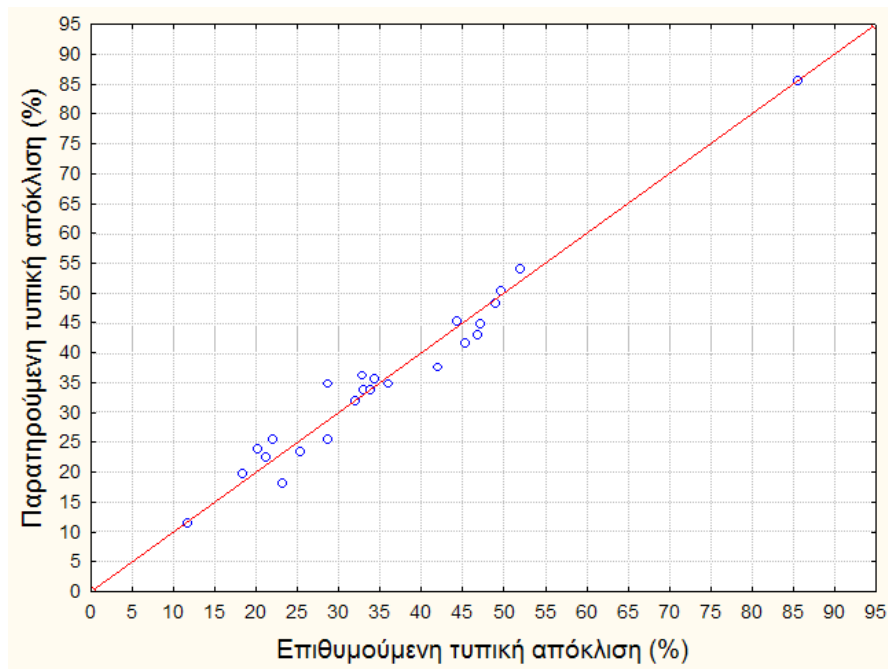
II. ANN -2, με έξοδο την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης των αναλυτέων ενώσεων

Η βέλτιστη δομή νευρωνικού δικτύου που βρέθηκε ήταν ένα πολυεπίπεδο perceptron με αρχιτεκτονική δομή «4:5:1», δηλαδή αποτελείται από 4 εισόδους, 5 νευρώνες στο κρυμμένο επίπεδο και 1 έξοδο. Ο αλγόριθμος conjugate gradient descent στην 182^η εποχή βρέθηκε ο καταλληλότερος για την εκπαίδευση του νευρωνικού δικτύου ενώ τα σφάλματα εκπαίδευσης και επιβεβαίωσης ήταν 0,0240 RMS και 0,0358 RMS αντίστοιχα.



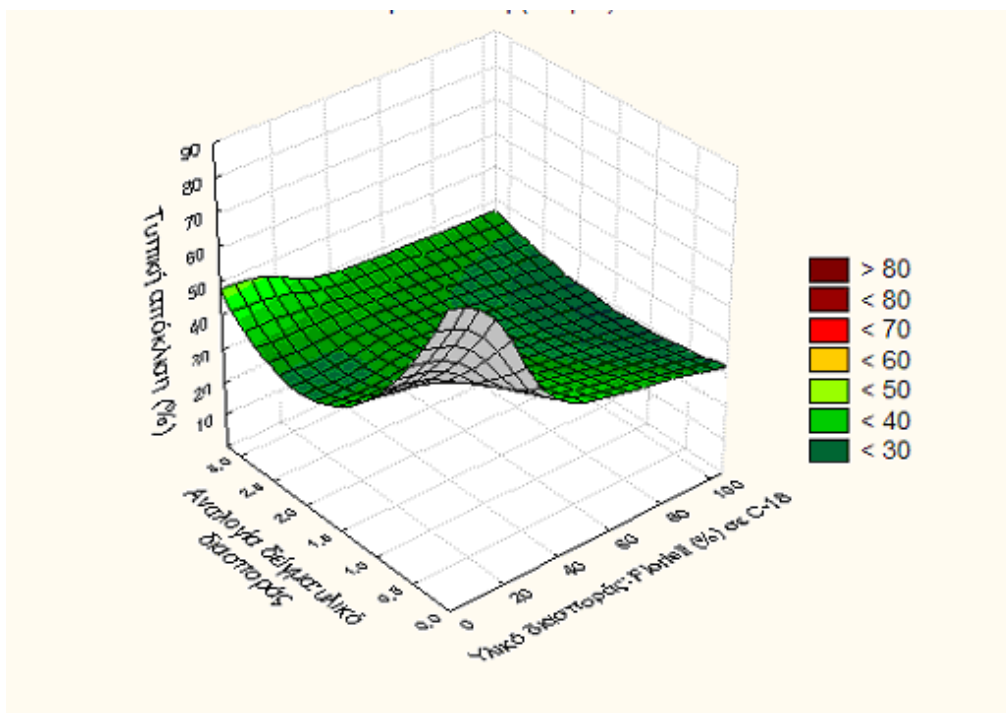
Σχήμα 6.14 Αρχιτεκτονική δομή του τεχνητού νευρωνικού δικτύου ANN -2

Από τα δεδομένα επιβεβαίωσης προέκυψε το γράφημα 6.15 που αναπαριστά τη συσχέτιση των πραγματικών τιμών εξόδου του δικτύου με τις επιθυμητές τιμές που προκύπτουν από τον παραγοντικό σχεδιασμό και φαίνεται ότι η συσχέτιση αυτή είναι καλή.

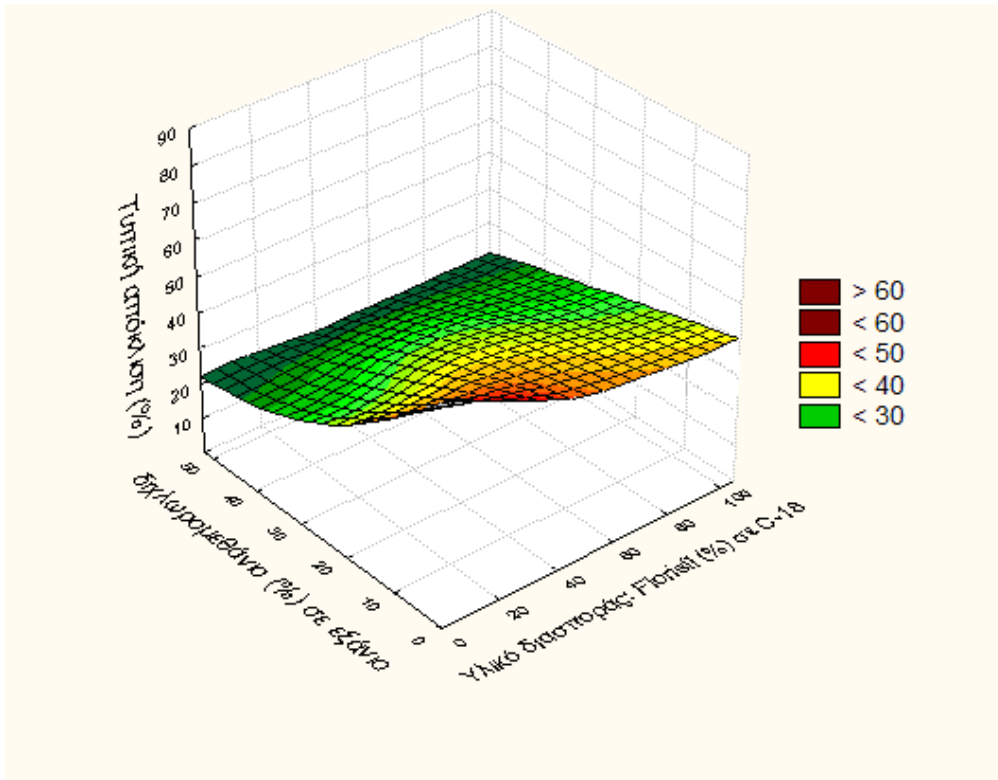


Σχήμα 6.15 Συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων και επιθυμούμενων τιμών της τυπικής απόκλισης των μέσων τιμών ανάκτησης των αναλυόμενων ενώσεων

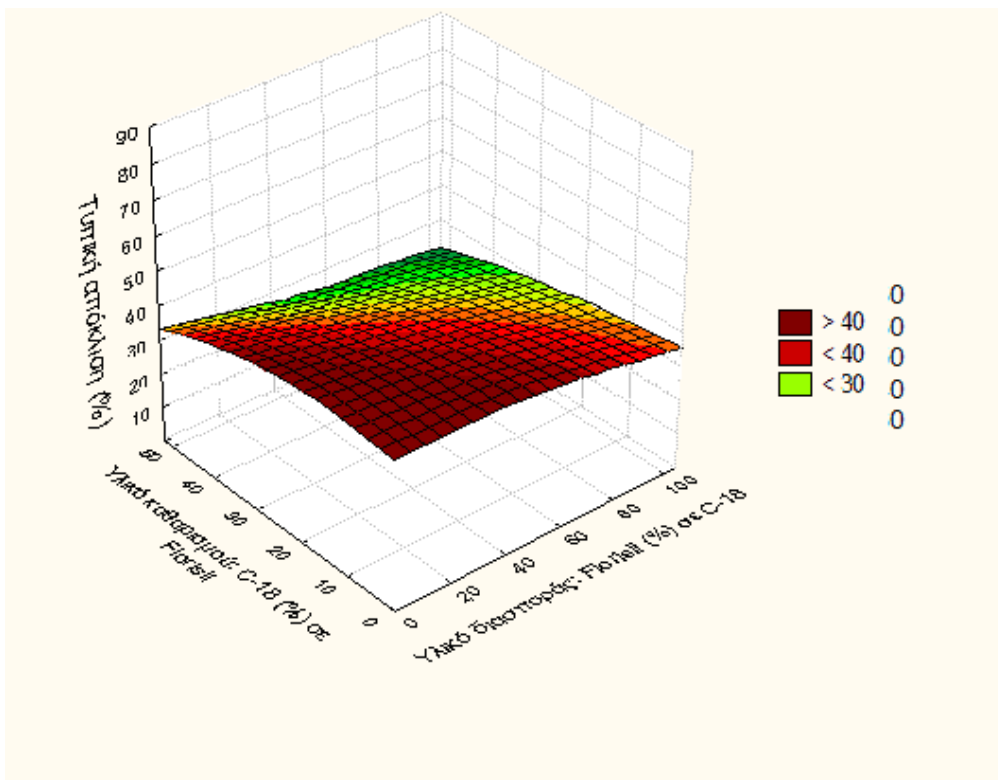
Έτσι, αυτή η δομή νευρωνικού δικτύου χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή επιφανειών απόκρισης της τυπικής απόκλισης της μέσης τιμής της ανάκτησης για δύο από τους τέσσερις παράγοντες της μελέτης κάθε φορά όπως φαίνεται στα σχήματα 6.16 – 6.21.



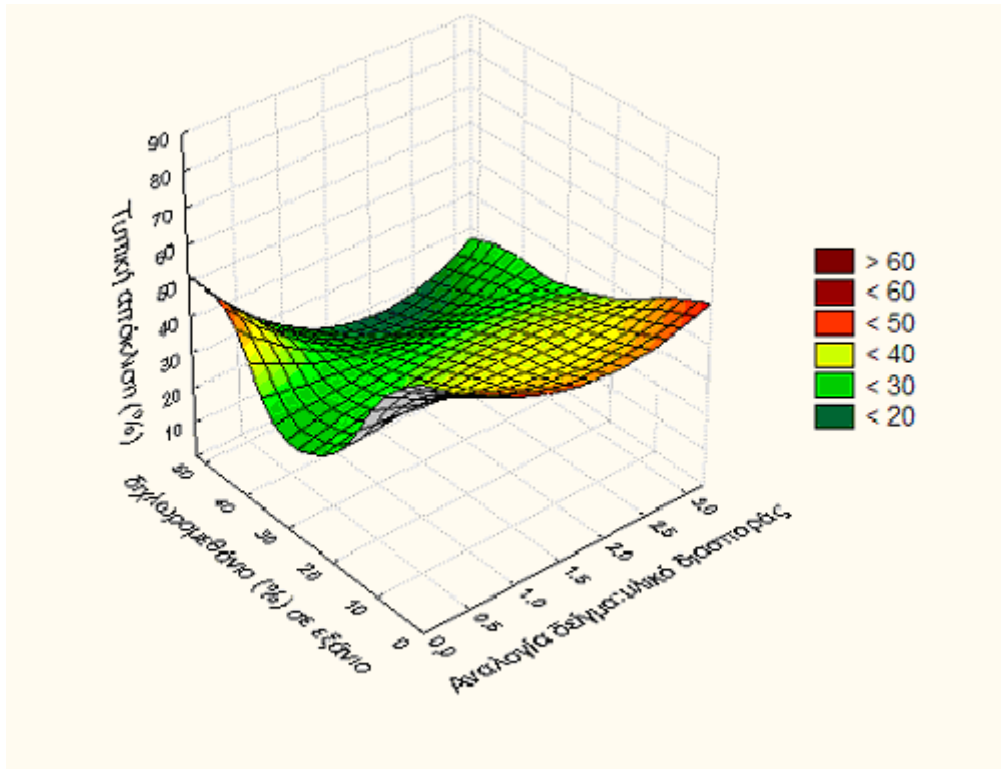
Σχήμα 6.16 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-2, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγμα: υλικό διασποράς / υλικό διασποράς: Florisil (%) σε C-18» στην τυπική απόκλιση της μέσης τιμής ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



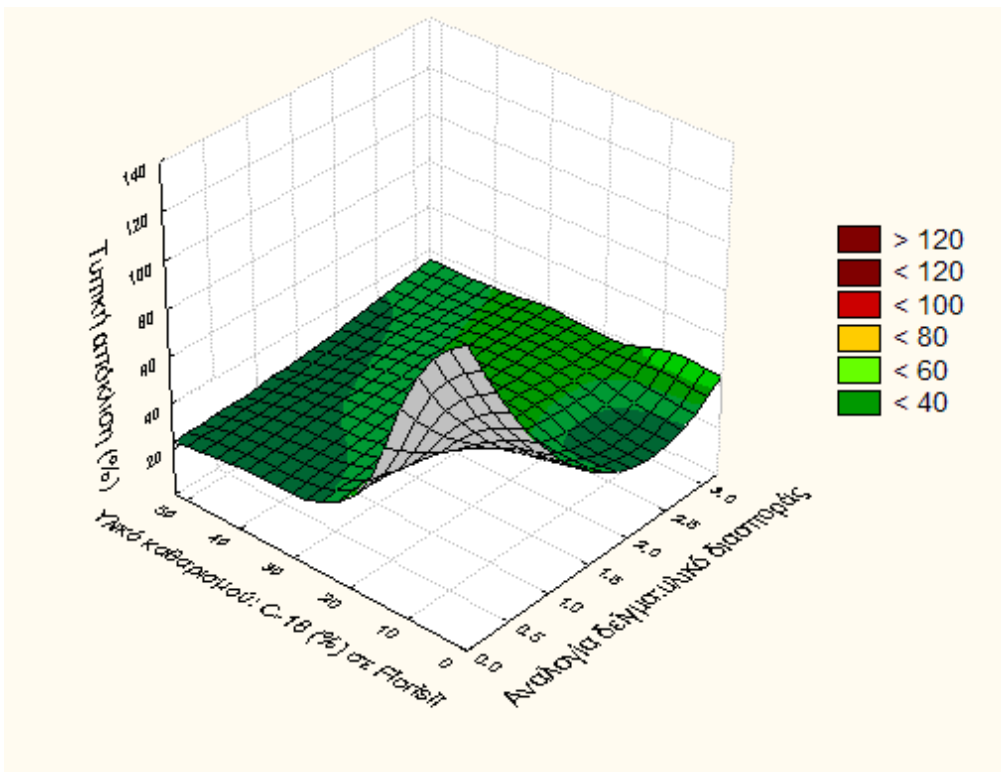
Σχήμα 6.17 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-2, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «διχλωρομεθάνιο (%) σε εξάνιο / υλικό διασποράς: Florisil (%) σε C-18» στην τυπική απόδοση της μέσης τιμής ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



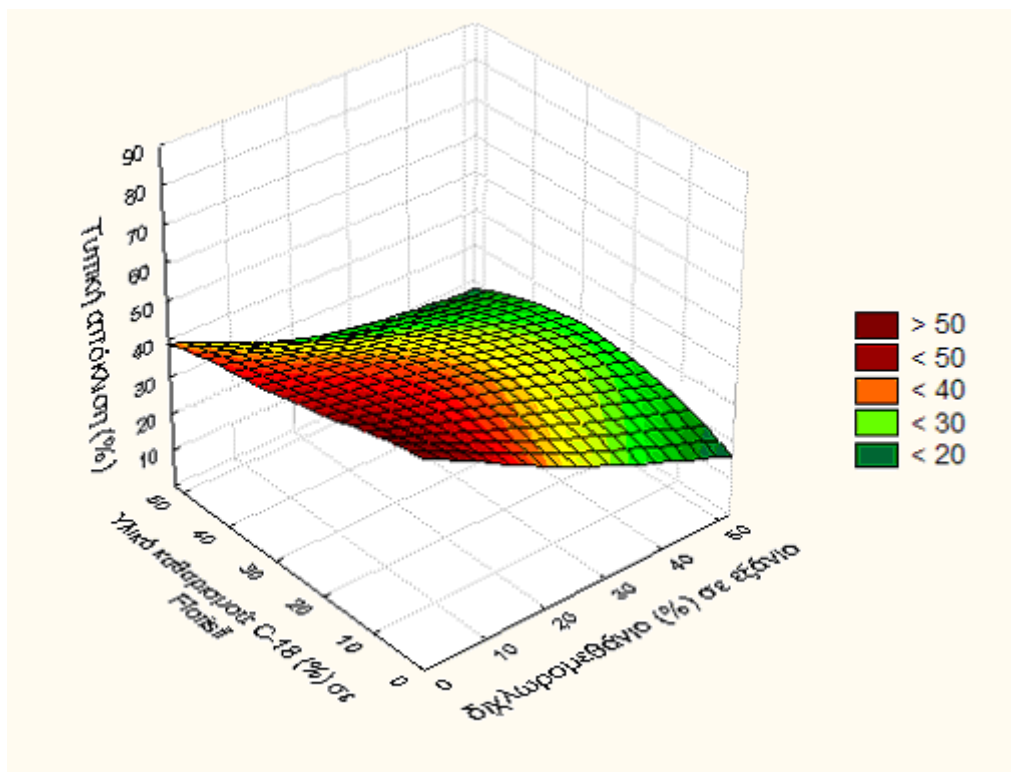
Σχήμα 6.18 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-2, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «υλικό καθαρισμού: C-18 (%) σε Florisil / υλικό διασποράς: Florisil (%) σε C-18» στην τυπική απόδοση της μέσης τιμής ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



Σχήμα 6.19 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-2, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγμα: υλικό διασποράς / διχλωρομεθάνιο (%) σε εξάνιο» στην τυπική απόδοση της μέσης τιμής ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



Σχήμα 6.20 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-2, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγμα: υλικό διασποράς / υλικό καθαρισμού: C-18 (%) σε Florisil» στην τυπική απόδοση της μέσης τιμής ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.



Σχήμα 6.21 Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή του ANN-2, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «υλικό καθαρισμού: C-18 (%) σε Florisil / διγλωρομεθάνιο (%) σε εξάνιο» στην τυπική απόδοση της μέσης τιμής ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων.

Από τα γραφήματα των σχημάτων αυτών συμπεραίνουμε ότι η μέγιστη απόδοση εκχύλισης όλων ταυτόχρονα των αναλυτέων ενώσεων επιτυγχάνεται υπό τις εξής πειραματικές συνθήκες:

- υλικό διασποράς: Florisil (100%),
- αναλογία δείγματος/ υλικού διασποράς: 1/2,
- διαλύτης έκλουσης: μίγμα εξάνιο/διγλωρομεθάνιο: (50%) / (50%),
- υλικό καθαρισμού εκχυλίσματος: μίγμα C-18 (50%) / Florisil (50%)

Οι συνθήκες αυτές επιλέχθηκαν χωρίς προς το παρόν να ληφθεί υπόψη το ANN -1 με έξοδο τη μέση τιμή ανακτήσεων.

Προκειμένου να αποφασίσουμε ποιες θα είναι οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες εκχύλισης, συνυπολογίσαμε τους κάτωθι παράγοντες:

- επίτευξη των υψηλότερων δυνατών μέσων τιμών ανακτήσεων των αναλυτέων ενώσεων (σχήματα 6.8 – 6.13)
- επίτευξη των χαμηλότερων δυνατών τιμών τυπικών αποκλίσεων των μέσων τιμών ανακτήσεων των αναλυτέων ενώσεων (σχήματα 6.16 – 6.21)

- πρακτικές παρατηρήσεις κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων (καθαρότητα εκχυλισμάτων, ανάμιξη υλικών και παρασκευή στήλης, θόρυβος χρωματογραφημάτων, συνεκχυλιζόμενες ουσίες, κ.α.)

και καταλήξαμε ότι οι βέλτιστες συνθήκες για την ταυτόχρονη ποιοτική και ποσοτική εκχύλιση των αναλυτών ενώσεων της μελέτης είναι:

- **υλικό διασποράς:** μίγμα C-18 (80%) / Florisil (20%),
- **αναλογία δείγματος/ υλικού διασποράς:** 1/2,
- **διαλύτης έκλουσης:** μίγμα εξάνιο/διγλωρομεθάνιο: (50%) / (50%),
- **υλικό καθαρισμού εκχυλίσματος:** μίγμα C-18 (40%) / Florisil (60%).

6.2.2 Επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας

Για την επικύρωση της μεθοδολογίας MSPD (με τη συγκεκριμένη μέθοδο βελτιστοποίησης) προσδιορίστηκαν ορισμένα χαρακτηριστικά ποιότητας της. Πρόκειται για την ανάκτηση, τη γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και την πιστότητα (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα) της μεθόδου.

Για τη μελέτη επικύρωσης χρησιμοποιήθηκαν δύο υποστρώματα (δύο είδη ιχθυρών): Κέφαλος, *mugil cephalus* (ποσοστό λίπους μυϊκού ιστού=4,5%) και Κυπρίνος, *cyprinus carpio* (ποσοστό λίπους μυϊκού ιστού=0,7%) ώστε να υπάρχει διαφοροποίηση ως προς το ποσοστό του μυϊκού ιστού των ιχθυρών σε λίπος. Τα δείγματα αυτών εμβολιάστηκαν με κατάλληλα πρότυπα διαλύματα των αναλυτών ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Η ανάκτηση της μεθόδου υπολογίστηκε σε τρία (3) ανεξάρτητα δείγματα κάθε είδους των ιχθυρών (για κάθε δείγμα, ο αριθμός επαναλήψεων ήταν n=3) τα οποία είχαν εμβολιαστεί με πρότυπο διάλυμα των ενώσεων σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης : 10, 50, 100 ng/g. Επιπρόσθετα, μη εμβολιασμένα δείγματα ιχθυρών (n=3) αναλύθηκαν και λήφθηκαν υπόψη κατά τον υπολογισμό των ανακτήσεων.

Πίνακας 6.5 Ανακτήσεις των αναλυτέων ενώσεων για το ψάρι με το υψηλότερο ποσοστό λίπους (*mugil cephalus*)

α/α	Αναλυτέες ενώσεις	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)	Ανάκτηση ^α (RSD) (%)	Ανάκτηση ^α (RSD) (%)	Ανάκτηση ^α (RSD) (%)
			ψάρι με το υψηλότερο ποσοστό λίπους (<i>mugil cephalus</i>)	ψάρι με το υψηλότερο ποσοστό λίπους (<i>mugil cephalus</i>)	ψάρι με το υψηλότερο ποσοστό λίπους (<i>mugil cephalus</i>)
			Επίπεδο συγκέντρωσης 10ng/g	Επίπεδο συγκέντρωσης 50ng/g	Επίπεδο συγκέντρωσης 100ng/g
1	α-HCH	10,991	78,1 (2,3)	75,4 (2,9)	72,1 (5,3)
2	β-HCH	12,057	82,7 (8,6)	89,5 (5,2)	77,1 (4,7)
3	γ-HCH	12,275	58,9 (1,1)	65,6 (3,5)	57,2 (6,9)
4	PCB 28	13,151	70,6 (10,4)	95,7 (9,4)	77,6 (2,4)
5	Heptachlor	13,260	89,5 (6,9)	87,0 (8,2)	74,7 (3,8)
6	δ-HCH	13,397	78,8 (5,5)	84,2 (8,9)	72,8 (5,3)
7	PCB 52	14,226	98,7 (14,2)	85,9 (11,0)	76,9 (6,8)
8	Aldrin	14,416	102,3 (0,2)	75,3 (7,4)	72,3 (6,5)
9	Heptachlor epoxide	16,540	91,0 (5,9)	92,0 (10,6)	83,8 (2,1)
10	γ-chlordane	17,370	100,8 (3,3)	92,1 (10,1)	75,5 (3,7)
11	PCB 101	17,520	49,7 (8,7)	61,7 (5,7)	65,6 (3,6)
12	α-chlordane	18,061	66,8 (22,0)	84,5 (14,4)	79,0 (13,2)
13	Endosulfan I	18,181	114,4 (18,7)	89,3 (6,6)	84,0 (9,6)
14	4,4 –DDE	19,142	75,3 (2,6)	86,1 (10,8)	77,8 (7,7)
15	Dieldrin	19,645	88,3 (4,3)	94,5 (6,1)	76,5 (1,7)
16	endrin	21,500	113,8 (4,5)	114,7 (4,3)	97,7 (2,0)
17	PCB 153	21,712	82,5 (5,8)	89,0 (13,2)	77,2 (13,6)
18	4,4 –DDD	22,270	97,8 (2,4)	93,7 (7,0)	98,2 (1,9)
19	Endosulfan II	22,694	81,2 (3,7)	96,6 (6,2)	87,5 (10,8)
20	PCB 138	24,461	104,6 (9,0)	105,6 (6,4)	88,3 (8,0)
21	Endrin aldehyde	24,762	48,2 (9,5)	67,5 (2,8)	56,5 (8,3)
22	Endosulfan sulphate	25,943	81,3 (7,3)	93,2 (3,5)	85,8 (11,9)
23	PCB 180	28,728	95,1 (7,7)	88,9 (6,9)	86,2 (8,5)
24	Methoxychlor	30,684	109,0 (11,4)	107,2 (8,6)	98,2 (8,7)
25	Endrin ketone	31,166	84,0 (10,6)	89,4 (6,0)	85,7 (5,3)
26	PCB 209	39,767	99,7 (3,5)	79,3 (7,7)	101,5 (9,3)

α: n=3

Πίνακας 6.6 Ανακτήσεις των αναλυτέων ενώσεων για το ψάρι με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους (*cyprinus carpio*)

α/α	Αναλυτέες ενώσεις	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)	Ανάκτηση ^α (RSD) (%)	Ανάκτηση ^α (RSD) (%)	Ανάκτηση ^α (RSD) (%)
			ψάρι με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους (<i>cyprinus carpio</i>)	ψάρι με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους (<i>cyprinus carpio</i>)	ψάρι με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους (<i>cyprinus carpio</i>)
			Επίπεδο συγκέντρωσης 10ng/g	Επίπεδο συγκέντρωσης 50ng/g	Επίπεδο συγκέντρωσης 100ng/g
1	α-HCH	10,991	54,4 (5,0)	70,7 (3,8)	66,1 (6,5)
2	β-HCH	12,057	65,1 (1,7)	64,0 (1,9)	67,8 (7,1)
3	γ-HCH	12,275	42,8 (4,2)	54,9 (8,7)	53,1 (8,7)
4	PCB 28	13,151	62,8 (14,0)	84,2 (2,3)	78,4 (6,1)
5	Heptachlor	13,260	70,4 (9,6)	87,5 (2,8)	76,4 (5,6)
6	δ-HCH	13,397	80,3 (9,5)	96,3 (3,6)	88,1 (9,9)
7	PCB 52	14,226	131,6 (14,9)	119,0 (9,5)	94,5 (3,2)
8	Aldrin	14,416	51,0 (15,9)	90,4 (9,9)	80,7 (5,7)
9	Heptachlor epoxide	16,540	84,5 (10,1)	97,5 (2,3)	83,3 (6,9)
10	γ-chlordane	17,370	90,2 (7,5)	99,5 (3,0)	86,3 (5,8)
11	PCB 101	17,520	91,2 (12,8)	94,7 (3,9)	87,0 (4,3)
12	α-chlordane	18,061	103,4 (14,5)	99,0 (1,7)	82,3 (6,8)
13	Endosulfan I	18,181	87,9 (10,3)	97,7 (3,3)	82,7 (6,4)
14	4,4 –DDE	19,142	88,2 (8,3)	103,9 (2,8)	85,5 (5,9)
15	Dieldrin	19,645	77,1 (9,9)	98,3 (2,6)	85,4 (7,2)
16	endrin	21,500	74,1 (2,5)	105,2 (9,2)	106,3 (8,1)
17	PCB 153	21,712	116,8 (9,4)	106,6 (0,7)	87,5 (5,9)
18	4,4 –DDD	22,270	70,7 (11,2)	92,5 (4,0)	82,2 (6,1)
19	Endosulfan II	22,694	63,6 (16,1)	82,8 (2,2)	65,5 (8,0)
20	PCB 138	24,461	92,5 (9,9)	100,0 (3,2)	89,9 (5,5)
21	Endrin aldehyde	24,762	38,6 (0,5)	37,0 (13,0)	33,7 (8,2)
22	Endosulfan sulphate	25,943	65,1 (7,9)	75,3 (2,0)	60,5 (10,8)
23	PCB 180	28,728	90,9 (9,8)	89,9 (3,2)	89,9 (6,6)
24	Methoxychlor	30,684	73,4 (11,3)	88,9 (6,7)	91,5 (6,7)
25	Endrin ketone	31,166	70,9 (11,1)	71,0 (14,0)	66,5 (9,6)
26	PCB 209	39,767	92,5 (4,5)	85,5 (11,6)	93,5 (3,4)

α: n=3

Η γραμμικότητα της μεθόδου στην απόκριση των αναλυτέων ενώσεων προσδιορίστηκε με τη χρήση εμβολιασμένων με πρότυπο διάλυμα των ενώσεων δειγμάτων ιχθυρών σε πέντε επίπεδα συγκέντρωσης: 10, 25, 50, 100, 200 ng/g. Προσδιορίστηκαν οι συντελεστές

συσχέτισης, r , και οι σταθερές προσδιορισμού, r^2 . Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορίστηκαν προσδιορίστηκαν ως οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τις οποίες ο λόγος σήματος-θορύβου παίρνει τουλάχιστον τις τιμές 3 και 10 αντίστοιχα, ακολουθώντας τις συστάσεις της IUPAC και βρέθηκαν όπως αναπαρίσταται στους πίνακες 6.7 και 6.8.

Πίνακας 6.7 Μετρήσεις γραμμικότητας και ανιχνευσιμότητας μεθόδου για το ψάρι με το υψηλότερο ποσοστό λίπους (*mugil cephalus*)

a/a	Αναλυτές ενώσεις	Γραμμικότητα (r^2) ψάρι με το υψηλότερο ποσοστό λίπους (<i>mugil cephalus</i>)	LOD (ng/g) ψάρι με το υψηλότερο ποσοστό λίπους (<i>mugil cephalus</i>)	LOQ (ng/g) ψάρι με το υψηλότερο ποσοστό λίπους (<i>mugil cephalus</i>)
1	α -HCH	0,990	0,090	0,29
2	β -HCH	0,994	0,10	0,33
3	γ -HCH	0,989	0,34	1,1
4	PCB 28	0,990	0,19	0,63
5	Heptachlor	0,992	0,33	1,1
6	δ -HCH	0,988	0,16	0,53
7	PCB 52	0,999	0,45	1,5
8	Aldrin	0,996	0,10	0,33
9	Heptachlor epoxide	0,998	0,19	0,63
10	γ -chlordane	0,998	0,22	0,73
11	PCB 101	0,998	0,70	2,3
12	α -chlordane	0,997	0,20	0,66
13	Endosulfan I	0,999	0,24	0,79
14	4,4 –DDE	0,996	0,18	0,59
15	Dieldrin	0,999	0,29	0,96
16	endrin	0,992	0,51	1,7
17	PCB 153	0,997	0,46	1,5
18	4,4 –DDD	0,995	0,32	1,1
19	Endosulfan II	0,998	0,67	2,2
20	PCB 138	0,997	0,94	3,1
21	Endrin aldehyde	0,996	0,57	1,9
22	Endosulfan sulphate	0,996	0,31	1,0
23	PCB 138	0,994	0,82	2,7
24	Methoxychlor	0,999	1,0	3,3
25	Endrin ketone	0,999	0,60	2,0
26	PCB 209	0,987	0,98	3,2

Πίνακας 6.8 Μετρήσεις γραμμικότητας και ανιχνευσιμότητας μεθόδου για το ψάρι με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους (*cyprinus carpio*)

α/α	Αναλυτές ενώσεις	Γραμμικότητα	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
		(r ²) ψάρι με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους (<i>cyprinus carpio</i>)	ψάρι με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους (<i>cyprinus carpio</i>)	ψάρι με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους (<i>cyprinus carpio</i>)
1	α-HCH	0,999	0,090	0,30
2	β-HCH	0,998	0,11	0,36
3	γ-HCH	0,999	0,29	0,96
4	PCB 28	0,999	0,17	0,56
5	Heptachlor	0,998	0,25	0,83
6	δ-HCH	0,999	0,13	0,43
7	PCB 52	0,993	0,22	0,73
8	Aldrin	0,998	0,090	0,30
9	Heptachlor epoxide	0,998	0,17	0,56
10	γ-chlordane	0,998	0,18	0,59
11	PCB 101	0,999	0,38	1,2
12	α-chlordane	0,997	0,090	0,30
13	Endosulfan I	0,997	0,18	0,59
14	4,4 –DDE	0,997	0,13	0,43
15	Dieldrin	0,998	0,23	0,76
16	endrin	0,999	0,45	1,5
17	PCB 153	0,997	0,43	1,4
18	4,4 –DDD	0,999	0,18	0,59
19	Endosulfan II	0,993	0,60	2,0
20	PCB 138	0,999	0,52	1,7
21	Endrin aldehyde	0,997	0,57	1,9
22	Endosulfan sulphate	0,992	0,29	0,96
23	PCB 138	0,999	0,57	1,9
24	Methoxychlor	0,999	0,95	3,1
25	Endrin ketone	0,998	0,61	2,0
26	PCB 209	0,998	1,03	3,4

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το ψάρι με το μικρότερο ποσοστό λίπους (κυπρίνος) ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα όρια της μεθόδου όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα το ψάρι με το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους (κέφαλος). Το γεγονός αυτό φανερώνει την επίδραση του παράγοντα λίπος κατά την εκχύλιση οργανοχλωριωμένων ενώσεων από ιχθυρά η οποία

μεταφράζεται στο υψηλότερο σήμα θορύβου και στην παρεμπόδιση ανίχνευσης πολύ μικρών ποσοτήτων υπολειμμάτων των ενώσεων.

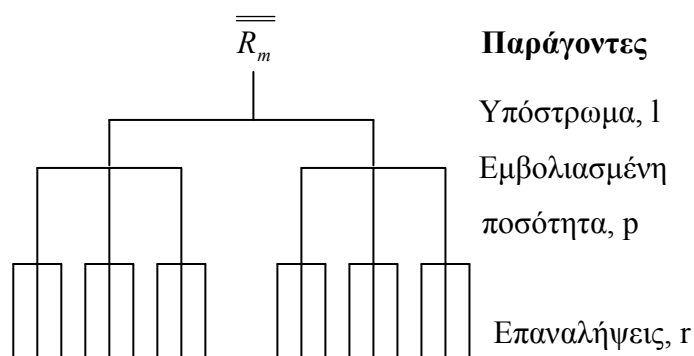
Η πιστότητα της μεθόδου, ως το πλέον χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό επίδοσης μιας αναλυτικής μεθόδου, αντικατοπτρίζει τη διακύμανση στα αποτελέσματα όταν πραγματοποιείται επαναλαμβανόμενη ανάλυση του ίδιου δείγματος. Οι μετρήσεις πιστότητας εξειδικεύθηκαν σε μετρήσεις επαναληψιμότητας και σε μετρήσεις ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας. Η μέτρηση της επαναληψιμότητας περιλάμβανε προσδιορισμό της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) των τιμών ανάκτησης 6 επαναλήψεων εμβολιασμένων δειγμάτων του ιχθυού με το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους με το μείγμα των αναλυτέων ενώσεων σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης 10, 50, 100 ng/g την ίδια ημέρα. Η μέτρηση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας περιλάμβανε προσδιορισμό της (%RSD) των τιμών ανάκτησης 6 επαναλήψεων εμβολιασμένων δειγμάτων του ιχθυού με το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους με το μείγμα των αναλυτέων ενώσεων σε ένα επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g σε διάστημα τριών ημερών.

Πίνακας 6.9 Μετρήσεις πιστότητας μεθόδου

α/α	Αναλυτές ενώσεις	Επαναληψιμότητα	Αναπαραγωγιμότητα
		RSD (%)	RSD (%)
		Επίπεδο συγκέντρωσης	Επίπεδο συγκέντρωσης
		50ng/g	50ng/g
1	α-HCH	5,6	2,6
2	β-HCH	6,9	6,0
3	γ-HCH	5,3	3,1
4	PCB 28	10,8	8,9
5	Heptachlor	7,7	7,3
6	δ-HCH	8,3	8,4
7	PCB 52	11,0	9,3
8	Aldrin	6,7	3,7
9	Heptachlor epoxide	13,3	13,4
10	γ-chlordane	11,2	10,8
11	PCB 101	8,0	7,6
12	α-chlordane	14,9	16,2
13	Endosulfan I	14,1	13,3
14	4,4 –DDE	14,4	14,4
15	Dieldrin	8,4	8,1
16	endrin	11,3	4,9
17	PCB 153	16,7	17,2
18	4,4 –DDD	8,1	10,3
19	Endosulfan II	9,1	9,7
20	PCB 138	11,4	13,8
21	Endrin aldehyde	14,3	11,5
22	Endosulfan sulphate	11,4	14,1
23	PCB 180	12,9	17,9
24	Methoxychlor	14,6	18,3
25	Endrin ketone	12,2	16,8
26	PCB 209	19,7	18,0

6.2.3 Εκτίμηση της αβεβαιότητας της μεθόδου εκχύλισης MSPD προερχόμενης από την ορθότητα αυτής

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 3, για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας που προέρχεται από την ορθότητα μιας μεθόδου εφαρμόζεται η χρήση πειραματικού σχεδίου (experimental design) ώστε να λαμβάνονται υπόψη όλοι οι παράγοντες διακύμανσης της ανάκτησης (που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ορθότητας) καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους που συνεισφέρουν στην αβεβαιότητα. Η διακύμανση της ανάκτησης εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση, τον τύπο του υποστρώματος και τη διακύμανση της μεθόδου κατά τη διεξαγωγή πειράματος την ίδια ημέρα. Στην παρούσα μελέτη, για τον προσδιορισμό της ανάκτησης μεθόδου (ορθότητα) και της προερχόμενης από αυτή αβεβαιότητας χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως ένθετο ή ιεραρχικό πειραματικό σχέδιο (fully – nested design) αποτελούμενο από τρεις παράγοντες: υποστρώματα (είδη ιχθυού), επίπεδα συγκεντρώσεων αναλυτέων ενώσεων, επαναλήψεις πειραματικών πορειών. Από τα δεδομένα του ιεραρχικού σχεδίου και σύμφωνα με τη θεωρία του 3^{ου} κεφαλαίου υπολογίστηκαν οι διακυμάνσεις των παραγόντων αυτών ώστε να εξαχθούν επιπλέον συμπεράσματα για την ύπαρξη ή μη συστηματικού σφάλματος της μεθόδου. Το ιεραρχικό σχέδιο που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 6.22 Πειραματικό σχέδιο για την εκτίμηση της ανάκτησης όταν l υποστρώματα διαφορετικών και αντιπροσωπευτικών προελεύσεων έχουν εμβολιαστεί σε p διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων με το μείγμα των αναλυόμενων ουσιών. Εξετάζονται τρεις παράγοντες διακύμανσης: ο παράγοντας υπόστρωμα «M», η προστιθέμενη ποσότητα «C» και ο αριθμός επαναλήψεων «r»

Η ιεράρχηση των παραγόντων στο χρησιμοποιούμενο ιεραρχικό σχέδιο πραγματοποιήθηκε βάσει του βαθμού επηρεασμού τους σε συστηματικές επιδράσεις της μεθόδου. Θεωρήσαμε, κατά ανάλογο τρόπο με άλλες μελέτες (Boti et al., 2009) ότι ο παράγοντας υπόστρωμα (διαφορετικό είδος ιχθυού) υφίσταται μεγαλύτερη συστηματική

επίδραση από τον παράγοντα των διαφορετικών επιπέδων συγκεντρώσεων αφού για την εκτίμηση της αβεβαιότητας χρησιμοποιήσαμε δύο είδη ιχθυρών με διαφορετικό ποσοστό λίπους γνωρίζοντας την ιδιότητα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων να συσσωρεύονται στο λίπος. Ο παράγοντας επαναλήψεις θεωρείται ότι έχει υπολειμματική διακύμανση (residual variation).

Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν δυο είδη ιχθυρών ($l=2$) με διαφορετικό ποσοστό λίπους: το είδος *Mugil cephalus* (ποσοστό λίπους = 4,5% επί του βάρους ιχθυρού) και το είδος *Cyprinus carpio* (ποσοστό λίπους = 0.7% επί του βάρους ιχθυρού). Για κάθε υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης των αναλυτέων ενώσεων ($p=3$): 25, 50, 100 ng/g και η ανάλυση για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε τρεις φορές δηλαδή ($r=3$). Από το σχήμα 6.22 προκύπτει ότι το σύνολο των αναλύσεων ήταν 18 για κάθε ένωση. Η εξασφάλιση υποστρωμάτων με τα επίπεδα συγκέντρωσης του σχεδίου πραγματοποιήθηκε με εμβολιασμό δειγμάτων ιχθυρών όπως αναφέρθηκε στο 5^ο κεφάλαιο.

Η διαδικασία και η πορεία προσδιορισμού της τελικής μέσης ανάκτησης, της αβεβαιότητάς της και των επιμέρους συστατικών αβεβαιότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA).

Πίνακας 6.10 Πίνακας ANOVA για το ιεραρχικό σχέδιο και την εκτίμηση αβεβαιότητας

Παράγοντες	Επίπεδα	Μέσα τετράγωνα	Βαθμοί ελευθερίας	Αβεβαιότητα
Υπόστρωμα	$l=2$	MS_M	$l-1=1$	$u^2(\Delta R_M) = MS_M - MSc/pr$
Επίπεδο συγκέντρωσης	$p=3$	MSc	$l(p-1)=4$	$u^2(\Delta R_C) = MSc - MSr /r$
Επαναλήψεις	$r=3$	MSr	$lp(r-1)=12$	$u^2(\Delta R_r) = MSr$
Σύνολο			$lpr-1=17$	

Πίνακας 6.11 Μέσα τετράγωνα και συστατικά της αβεβαιότητας από την εφαρμογή ANOVA στα δεδομένα του ιεραρχικού σχεδίου

	df	MS ^a /F-value ^b (p ^γ)			
		α-HCH	β-HCH	γ-HCH	PCB 28
Υπόστρωμα	1	0,02888/3,26(0,145404)	0,133817/6,61(0,061962)	0,016623/4,60(0,098601)	0,05238/2,16(0,21598)
Ποσότητα αναλυτέας ένωσης	4	0,008865/3,08(0,05857)	0,020256/7,79(0,002468)	0,003615/0,12(0,971182)	0,024302/1,57(0,244274)
Επαναλήψεις	12	0,002883	0,002602	0,029233	0,015451
Μέση τιμή ολικής ανάκτησης (R _m)		0,737	0,785	0,570	0,861
Αβεβαιότητα					
u²(ΔR_M)		0,002224	0,012618	0,001445	0,003119
u²(ΔR_C)		0,001994	0,005884	-0,008539	0,002950
u²(ΔR_r)		0,002883	0,002602	0,029233	0,15451
u(R_m)		0,000837	0,001633	0,000388	0,002551
u(R)		0,064951	0,136034	0,03802	0,077953

	df	MS ^a /F-value ^b (p ^γ)			
		Heptachlor	δ-HCH	PCB 52	Aldrin
Υπόστρωμα	1	0,000068/0,004(0,952998)	0,057574/3,12(0,152019)	0,371522/12,40(0,024431)	0,088621/6,74(0,060284)
Ποσότητα αναλυτέας ένωσης	4	0,017300/4,232(0,22992)	0,018445/5,93(0,007150)	0,029970/3,81(0,031768)	0,013147/1,39(0,295543)
Επαναλήψεις	12	0,004088	0,003109	0,007860	0,009463
Μέση τιμή ολικής ανάκτησης (R _m)		0,842	0,887	0,955	0,767
Αβεβαιότητα					
u²(ΔR_M)		-0,001914	0,004347	0,037950	0,008386
u²(ΔR_C)		0,004404	0,005112	0,00737	0,001228
u²(ΔR_r)		0,004088	0,003109	0,007860	0,009463
u(R_m)		0,001378	0,001631	0,003013	0,00106
U(R)		0,066377	0,097274	0,212907	0,098057

	df	MS ^a /F-value ^b (p ^γ)			
		Heptachlor epoxide	γ-chlordane	PCB 101	α-chlordane
Υπόστρωμα	1	0,002048/0,049(0,835776)	0,021081/0,455(0,53691)	0,360118/11,83(0,026309)	0,02205/0,41(0,556204)
Ποσότητα αναλυτέας ένωσης	4	0,041859/6,57(0,004873)	0,046323/11,19(0,000512)	0,030443/3,93(0,029009)	0,053608/3,93(0,029068)
Επαναλήψεις	12	0,006376	0,004141	0,007749	0,013655
Μέση τιμή ολικής ανάκτησης (R _m)		0,925	0,939	0,835	0,929
Αβεβαιότητα u²(ΔR_m)		-0,004423	-0,002805	0,036630	-0,003506
u²(ΔR_c)		0,011827	0,014060	0,007565	0,013317
u²(ΔR_r)		0,006376	0,004141	0,007749	0,013655
u(R_m)		0,00358	0,003833	0,002686	0,004216
u(R)		0,108814	0,11864	0,210244	0,115479

	df	MS ^a /F-value ^b (p ^γ)			
		Endosulfan I	4,4 -DDE	Dieldrin	Endrin
Υπόστρωμα	1	0,00646/0,26(0,638)	0,069938/2,29(0,204559)	0,00399/0,13(0,735926)	0,027067/0,93(0,388516)
Ποσότητα αναλυτέας ένωσης	4	0,025004/7,96(0,002254)	0,030506/8,42(0,001780)	0,030513/10,54(0,000670)	0,028974/5,58(0,008977)
Επαναλήψεις	12	0,003141	0,003622	0,002894	0,005196
Μέση τιμή ολικής ανάκτησης (R _m)		0,925	0,924	0,919	1,085
Αβεβαιότητα u²(ΔR_m)		-0,002060	0,004381	-0,002947	-0,000211
u²(ΔR_c)		0,007287	0,008961	0,009206	0,007926
u²(ΔR_r)		0,003141	0,003622	0,002894	0,005196
u(R_m)		0,002067	0,002497	0,002696	0,003154
u(R)		0,085393	0,115537	0,095988	0,089084

	df	MS ^a /F-value ^b (p ^c)			
		PCB 153	4,4 -DDD	Endosulfan II	PCB 138
Υπόστρωμα	1	0,064321/1,06(0,362056)	0,014849/2,04(0,225911)	0,069316/2,45(0,192368)	0,007771/0,23(0,655279)
Ποσότητα αναλυτέας ένωσης	4	0,060867/7,85(0,002384)	0,007260/1,20(0,360817)	0,028259/3,39(0,044977)	0,033510/13,3(0,000229)
Επαναλήψεις	12	0,007752	0,006055	0,008348	0,002519
Μέση τιμή ολικής ανάκτησης (R _m)		0,968	0,915	0,803	1,003
Αβεβαιότητα u²(ΔR_M)		0,000383	0,000843	0,004561	-0,002859
u²(ΔR_C)		0,017705	0,000401	0,006637	0,010330
u²(ΔR_r)		0,007752	0,006055	0,008348	0,002519
u(R_m)		0,004791	0,000591	0,002266	0,002912
u(R)		0,13458	0,035288	0,105849	0,10168

	df	MS ^a /F-value ^b (p ^c)			
		Endrin aldehyde	Endosulfan sulfate	PCB 180	Methoxychlor
Υπόστρωμα	1	0,286777/13,43(0,0215)	0,208012/7,06(0,056593)	0,009661/0,3(0,612115)	0,100203/15,91(0,016289)
Ποσότητα αναλυτέας ένωσης	4	0,021359/5,04(0,012878)	0,029475/0,7(0,605023)	0,032034/10,57(0,000661)	0,006300/1,03(0,431147)
Επαναλήψεις	12	0,004241	0,041946	0,003029	0,006116
Μέση τιμή ολικής ανάκτησης (R _m)		0,445	0,715	0,921	0,978
Αβεβαιότητα u²(ΔR_M)		0,029490	0,019837	-0,002486	0,010433
u²(ΔR_C)		0,005706	-0,004157	0,009668	0,000006
u²(ΔR_r)		0,004241	0,041946	0,003029	0,006116
u(R_m)		0,001834	0,002909	0,002649	0,000672
u(R)		0,187617	0,140876	0,098363	0,102447

	df	MS ^a /F-value ^b (p ^γ)	
		Endrin ketone	PCB 209
Υπόστρωμα	1	0.068573/5.03(0.088445)	0.062894/0.94(0.3877)
Ποσότητα αναλυτέας ένωσης	4	0.013645/2.17(0.134566)	0.067071/7.02(0.003747)
Επαναλήψεις	12	0.006293	0.009554
Μέση τιμή ολικής ανάκτησης (R _m)		0.763	0.942
Αβεβαιότητα u²(ΔR_M)		0.006103	-0.000464
u²(ΔR_C)		0.002451	0.019172
u²(ΔR_r)		0.006293	0.009554
u(R_m)		0.00134	0.006841
u(R)		0.092496	0.138633

df: βαθμοί ελευθερίας

^a MS: μέσο τετράγωνο

^b F-value : F-test, εκτίμηση διακυμάνσεων

^γ p: πιθανότητα

Για να διαπιστώσουμε εάν ένας παράγοντας εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη ή μικρότερη επίδραση στην μελετώμενη απόκριση σε σχέση με έναν άλλο παράγοντα και για να διαπιστωθεί η συνεισφορά ενός παράγοντα στην αύξηση της διακύμανσης σε σύγκριση με τους άλλους μελετώμενους παράγοντες εφαρμόσαμε δυο κριτήρια που πηγάζουν από τα δεδομένα της ανάλυσης διακύμανσης και των υπόλοιπων υπολογισμών του ιεραρχικού σχεδίου. Συγκεκριμένα:

1. συγκρίναμε τις υπολογιζόμενες τιμές μέσου τετραγώνου μεταξύ δύο εξεταζόμενων παραγόντων

Στην ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) των δεδομένων του ιεραρχικού σχεδίου αναμένεται οι τιμές των μέσων τετραγώνων να αυξάνονται από τα χαμηλά προς τα υψηλά επίπεδα του σχεδίου αφού ένας θετικός όρος προστίθεται στο μέσο τετράγωνο του χαμηλότερου επιπέδου. Έτσι, σύμφωνα με τον πίνακα 6.8 οι διακυμάνσεις αναμένεται να είναι θετικές. Αν όμως η διακύμανση ενός παράγοντα είναι αρνητική σημαίνει ότι ο παράγοντας αυτός εμφανίζει σημαντικά μικρότερη επίδραση στη μελετώμενη απόκριση σε σχέση με τον παράγοντα που βρίσκεται ακριβώς κάτω από αυτόν στο ιεραρχικό σχέδιο. Τότε η διακύμανση αυτή δεν λαμβάνεται υπόψη στον υπολογισμό της αβεβαιότητας $u(R)$ της πραγματικής ανάκτησης R.

2. εφαρμόσαμε τη δοκιμασία F (F-test) για τη σύγκριση των διακυμάνσεων των εξεταζόμενων παραγόντων

Με τη δοκιμασία F συγκρίναμε τα μέσα τετράγωνα των παραγόντων της ανάλυσης διακύμανσης του σχεδίου δηλαδή τις διακυμάνσεις αυτών. Η τιμή F για κάθε παράγοντα υπολογίζεται ως ο λόγος του μέσου τετραγώνου ενός παράγοντα προς το μέσο τετράγωνο του παράγοντα που βρίσκεται ένα επίπεδο ακριβώς από κάτω στο ιεραρχικό σχέδιο. Με αυτόν τον τρόπο εξακριβώνεται εάν ένας παράγοντας σε υψηλό επίπεδο στην ιεραρχική δομή του σχεδίου συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της διακύμανσης σε σύγκριση με τη συνεισφορά όλων των παραγόντων που βρίσκονται χαμηλότερα από αυτόν.

Σύμφωνα με το 1^ο κριτήριο, διαπιστώνουμε από τον πίνακα 6.9 ότι η διακύμανση που οφείλεται στα διαφορετικά είδη υποστρώματος έχει αρνητική τιμή για τις ενώσεις: heptachlor, heptachlor epoxide, γ -chlordane, α -chlordane, endosulfan I, dieldrin, endrin, PCB-138, PCB-180, PCB-209. Επομένως, ο κυριότερος παράγοντας που συνεισφέρει στην αβεβαιότητα της μεθόδου για τις παραπάνω ενώσεις είναι τα επίπεδα συγκέντρωσης αυτών. Για τις υπόλοιπες ενώσεις δεν διαφαίνεται σημαντικά μεγαλύτερη ή μικρότερη συνεισφορά στην αβεβαιότητα κάποιου από τους εξεταζόμενους παράγοντες.

Σύμφωνα με το 2^ο κριτήριο, λαμβάνοντας υπόψη τις τιμές F του πίνακα 6.9 συμπεραίνουμε ότι ο παράγοντας υπόστρωμα συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της διακύμανσης της ανάκτησης σε σχέση με τον παράγοντα του επιπέδου συγκέντρωσης για τις ενώσεις: PCB 52, PCB-101, endrin aldehyde, methoxychlor. Η τιμή F υπολογίζεται από τον πίνακα του παραρτήματος για $\nu_1=1$ (βαθμοί ελευθερίας του παράγοντα υπόστρωμα) και $\nu_2=4$ (βαθμοί ελευθερίας του παράγοντα ποσότητα αναλυτέας ένωσης). Η κρίσιμη τιμή F για $p=0,05$ (στατιστική βεβαιότητα 95%) είναι : 7,71. Για τις ενώσεις αυτές δηλαδή δεν διαφαίνεται σημαντική επίδραση του επιπέδου συγκεντρώσεων ενώ για όλες τις υπόλοιπες ενώσεις η επίδραση των παραγόντων εξισώνεται. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τα δυο κριτήρια αξιολόγησης των δεδομένων της ανάλυσης διακύμανσης καταλήξαμε στην εκτίμηση της επίδρασης των μελετώμενων παραγόντων στην αβεβαιότητα της μεθόδου για κάθε ένωση χωριστά όπως φαίνεται στον πίνακα 6.10.

Πίνακας 6.12 Επίδραση των μελετώμενων παραγόντων στην αβεβαιότητα της μεθόδου

Αναλυτέα ένωση	Εξέταση 1 ^{οο} κριτηρίου	Εξέταση 2 ^{οο} κριτηρίου	Συνολική επίδραση παραγόντων
α -HCH	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
β -HCH	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
γ -HCH	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
PCB 28	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
Heptachlor	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
δ -HCH	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
PCB 52	Καμιά σημαντική επίδραση	Επίδραση υποστρώματος	υπόστρωμα
Aldrin	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
Heptachlor epoxide	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
γ -chlordane	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
PCB 101	Καμιά σημαντική επίδραση	Επίδραση υποστρώματος	υπόστρωμα
α -chlordane	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
Endosulfan I	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
4,4 –DDE	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
Dieldrin	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
endrin	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
PCB 153	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
4,4 –DDD	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
Endosulfan II	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
PCB 138	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
Endrin aldehyde	Καμιά σημαντική επίδραση	Επίδραση υποστρώματος	υπόστρωμα
Endosulfan sulphate	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
PCB 180	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης
Methoxychlor	Καμιά σημαντική επίδραση	Επίδραση υποστρώματος	υπόστρωμα
Endrin ketone	Καμιά σημαντική επίδραση	Καμιά σημαντική επίδραση	-
PCB 209	Επίδραση επιπέδου συγκέντρωσης	Καμιά σημαντική επίδραση	επίπεδο συγκέντρωσης

Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 3.2.4, μπορούμε να εφαρμόσουμε έναν έλεγχο σημαντικότητας για την ύπαρξη ή μη συστηματικού σφάλματος της διαδικασίας ανάκτησης των ενώσεων. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιούμε τη σχέση:

$$\frac{|R_m - 1|}{u_{R_m}} > t,$$

όπου $\overline{R_m}$: η ολική μέση ανάκτηση, u_{R_m} : η αβεβαιότητα της ανάκτησης, t : η κρίσιμη τιμή βασιζόμενη σε έναν παράγοντα κάλυψης ή όταν ο έλεγχος είναι ολοκληρωτικά στατιστικός, t ($a/2$, $n-1$) είναι η σχετική τιμή του ελέγχου του Student's t – test για επίπεδο εμπιστοσύνης $1 - a$ και $n-1$ βαθμούς ελευθερίας. Ο έλεγχος αυτός περιλαμβάνει το ερώτημα «εάν η ποσότητα $R-1$ είναι μεγαλύτερη από την αβεβαιότητα του προσδιορισμού της ανάκτησης, u_R , σε κάποιο επίπεδο εμπιστοσύνης a .

Έτσι, για κάθε ένωση της μελέτης προέκυψαν τιμές t εφαρμόζοντας δοκιμή σημαντικότητας της ολικής ανάκτησης όπως φαίνεται στον πίνακα 6.11.

Στον πίνακα φαίνεται ότι για όλες τις ενώσεις – με εξαίρεση την ένωση PCB-138, οι τιμές $t_{\text{πειραμ.}}$ είναι μεγαλύτερες από την κρίσιμη τιμή t ($=2,11$ -για 17 βαθμούς ελευθερίας που σχετίζονται με την αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι οι τιμές ανάκτησης για τις προαναφερόμενες ενώσεις διαφέρουν στατιστικά σημαντικά από τη μονάδα και επομένως η μέθοδος έχει σημαντικό συστηματικό σφάλμα.

Πίνακας 6.13 Οι ολικές ανακτήσεις των ενώσεων και οι τιμές t από τη δοκιμή σημαντικότητας.

Αναλυτέα ένωση	α -HCH	β -HCH	γ -HCH	PCB 28	Heptachlor	δ - HCH	PCB 52	Aldrin	Heptachlor epoxide	γ - chlordane	PCB 101	α - chlordane	Endosulfan I	4,4- DDE
\bar{R}_m	0.737	0.785	0.570	0.861	0.842	0.887	0.956	0.767	0.924	0.939	0.835	0.930	0.925	0.924
t ($\alpha=0.05$)	314.41	131.45	1108.39	54.42	114.53	64.41	14.75	220.17	21.01	15.79	61.42	16.7	36.09	30.25

Αναλυτέα ένωση	Dieldrin	Endrin	PCB 153	4,4-DDD	Endosulfan II	PCB 138	Endrin aldehyde	Endosulfan sulfate	PCB 180	Methoxychlor	Endrin ketone	PCB 209
\bar{R}_m	0.919	1.085	0.968	0.915	0.803	1.004	0.445	0.715	0.921	0.978	0.763	0.942
t ($\alpha=0.05$)	29.96	27.05	6.63	144.67	87.15	1.22	302.85	98.14	29.88	32.48	176.57	8.43

6.3 Εφαρμογές της μεθοδολογίας MSPD για την εκχύλιση οργανοχλωριωμένων ενώσεων από ιχθυρά

Οι μελέτες για την ανίχνευση οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε ιχθυρά είναι πολυάριθμες και ξεκίνησαν από τη στιγμή που άρχισαν να διαφαίνονται οι αρνητικές επιπτώσεις τους στον άνθρωπο και το περιβάλλον. Διατρέχοντας τη σχετική βιβλιογραφία διαπιστώσαμε ότι δεν υπάρχει συστηματική προσπάθεια ενιαιοποίησης των δεδομένων και προϋποθέσεων των μελετών, δηλαδή χρησιμοποιούνται διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης, διαφορετική διαδικασία δειγματοληψίας, διαφορετικοί μέθοδοι ανίχνευσης και διαφορετική διαδικασία επεξεργασίας των δεδομένων της μελέτης (αξιολόγηση μετρήσεων), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα από τη μία την βελτίωση και ανάπτυξη των μεθοδολογιών αλλά από την άλλη τη δυσκολία σύγκρισης μεθοδολογιών.

Η τεχνική εκχύλισης MSPD εισήχθη για πρώτη φορά από τους Barker et al, (1989) και εφαρμόζεται αρκετά έως σήμερα ως αναλυτική μεθοδολογία εκχύλισης εξαιτίας των συγκριτικών πλεονεκτημάτων της σε σχέση με άλλες τεχνικές εκχύλισης όπως απλότητα, ευελιξία, ικανοποιητική απόδοση, εκλεκτικότητα, μικρός χρόνος και χαμηλό κόστος ανάλυσης και απαίτηση ήπιων συνθηκών εκχύλισης. Έχει καθιερωθεί ως αξιόπιστη αναλυτική μεθοδολογία των μεθοδολογιών εκχύλισης Soxhlet, MAE, SFE, PLE. Σύμφωνα με τους Carriotti et al. (2010), την περίοδο από 1990 έως Σεπτέμβριος 2010, έχουν καταγραφεί στην επιστημονική βιβλιογραφία 477 εγγραφές με τον όρο: «matrix solid phase extraction», εκ των οποίων 360 άρθρα στην Αγγλική γλώσσα. Ειδικότερα, τα έτη 2007-2009, η αρθρογραφία που περιέχει τον όρο: «matrix solid phase extraction» αριθμεί 113 άρθρα. Την τελευταία δεκαετία αρκετά άρθρα εστιάστηκαν στη διερεύνηση του μηχανισμού της MSPD, τα πλεονεκτήματα, τις εφαρμογές και τη βελτιστοποίηση της. Ελάχιστες όμως αναφορές υπάρχουν σχετικά με την εφαρμογή της μεθοδολογίας MSPD για την ταυτόχρονη εκχύλιση οργανοχλωριωμένων ενώσεων που περιλαμβάνουν πολυχλωριωμένα διφαινύλια από ιχθυρά και καμιά αναφορά για τη βελτιστοποίηση αυτής της μεθόδου με τη χρήση παραγοντικών σχεδιασμών με προσομοίωση με τεχνητά νευρωνικά δίκτυα για τον προαναφερόμενο σκοπό.

Οι Ling Y.C., Chang M.Y. και Huang I. P. (1994) χρησιμοποίησαν τη μεθοδολογία MSPD για την εκχύλιση πολυχλωριωμένων διφαινυλίων από ιχθυρά. Χωρίς να πραγματοποιηθεί κάποια διαδικασία βελτιστοποίησης για την εκχύλιση, χρησιμοποιήθηκαν: 0,5g δείγματος, 2g C-18 ως υλικό διασποράς, 10mL εξανίου ως διαλύτης έκλουσης και 1g πηκτική οξιμισμένης σίλικας ως υλικό καθαρισμού του εκχυλίσματος. Η μελέτη αυτή απέδωσε όρια ανίχνευσης από 0,13 έως 0,17 (μg/g) , τιμές ανάκτησης 94,8±5,9 (%) (μέση τιμή για τα

επίπεδα συγκέντρωσης: 0,37 έως 9,17 $\mu\text{g/g}$ και $84,1 \pm 4,9$ (%) (μέση τιμή για τα επίπεδα συγκέντρωσης: 0,89 έως 5,62 $\mu\text{g/g}$) για τα μίγματα PCBs: KC-300/KC-500 αντίστοιχα.

Λίγο αργότερα, οι Ling Y.C., και Huang I. P. (1995), προχώρησαν σε διαδικασία μερικής βελτιστοποίησης της μεθοδολογίας MSPD. Διερεύνησαν την αποτελεσματικότητα των σταδίων καθαρισμού εκχυλίσματος και έκλουσης, με τη μέθοδο της μεταβολής ενός παράγοντα τη φορά. Η βελτιστοποιημένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση 16 οργανοχλωριωμένων ενώσεων και PCBs από ιχθυρά αλλά διαχωρίζοντας τις δύο παραπάνω ομάδες ενώσεων σε δύο πειραματικές πορείες (μη ταυτόχρονος προσδιορισμός). Οι τιμές ανακτήσεων βρέθηκαν $>85\%$ για τις 16 ενώσεις και $>95\%$ για τα PCBs στα επίπεδα συγκέντρωσης εμβολιασμού του υποστρώματος: 0,1-2 $\mu\text{g/g}$. Τα LOD ήταν 19,6-91,1 ng/g και 71,4-112,2 ng/g , οι συντελεστές συσχέτισης 0,995 και 0,999 αντίστοιχα για τις παραπάνω κατηγορίες.

Μια πρώτη προσπάθεια βελτιστοποίησης της μεθοδολογίας MSPD με εφαρμογή παραγοντικών σχεδιασμών πραγματοποιήθηκε από τους Carró A. M. et al (2005) για την εκχύλιση χλωριωμένων και βρωμιωμένων ενώσεων από δείγματα ιχθυρών ιχθυοτροφείου και ιχθυοτροφές. Μελετήθηκαν οι παράγοντες: είδος υλικού διασποράς, ποσότητα υλικού C-18, όγκος διαλύτη έκλουσης και διαδικασία έκλουσης με τη χρήση πειραματικού σχεδίου $2^{33^2}/9$. Η απόδοση της βελτιστοποιημένης μεθόδου χαρακτηρίστηκε από τιμές ανάκτησης των ενώσεων (PCBs, 4,4,-DDT, α,γ -HCH, Heptachlor) μεταξύ 70-96%, LOD 0,1-7,1 ng/g , συντελεστή συσχέτισης 0,995 (για εύρος συγκεντρώσεων 50-400 ng/mL) και επαναληπτικότητα 1,1-7,7 %RSD σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng/mL . Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με GC-ECD. Ακολούθησε ανάλυση με GC-MS/MS όπου σημειώθηκαν όρια ανίχνευσης 0,4-1,2 ng/g .

6.4 Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη ασχολήθηκε με την ανάπτυξη και εφαρμογή μιας μεθοδολογίας για την εκχύλιση επιλεγμένων οργανοχλωριωμένων ενώσεων από ιχθυρά. Οι ενώσεις που επελέγησαν αποτελούν συστατικά εντομοκτόνων και πολυχλωριωμένα διφαινύλια όπως αναπτύχθηκε στο 1^ο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής. Ως μέθοδος εκχύλισης επιλέχθηκε η μέθοδος με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD) και διενεργήθηκαν δύο διαφορετικές διαδικασίες για την βελτιστοποίησή της με σκοπό την υψηλότερη δυνατή απόδοση. Στόχος της βελτιστοποίησης αποτελεί η εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών αλλά και η ικανοποίηση των πρακτικών πειραματικών συνθηκών.

Για την πρώτη διαδικασία, ακολουθήθηκε η μέθοδος της μεταβολής ενός παράγοντα τη φορά σύμφωνα με την οποία βρέθηκαν ως βέλτιστες συνθήκες οι :

- **υλικό διασποράς:** C-18 (100%) - 2g,
- **αναλογία δείγματος/ υλικού διασποράς:** 1/2,
- **διαλύτης έκλουσης:** μίγμα εξάνιο/διχλωρομεθάνιο: (50%) / (50%) - 15mL,
- **υλικό καθαρισμού εκχυλίσματος:** Florisil (100%) - 2g

Η απόδοση της μεθόδου μετρήθηκε υπολογίζοντας με κατάλληλα πειράματα ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά ποιότητά της. Έτσι η ανάκτηση κυμάνθηκε από 55% έως 114% (στο επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g) , τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης από 0,3 έως 1,0 (ng/g) και 1,0 έως 3,3 (ng/g) αντίστοιχα. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου υπολογίστηκαν ως % RSD και βρέθηκαν στα επίπεδα τιμών 4,3-20,2 και 2,0-19,6 αντίστοιχα.

Για τη δεύτερη διαδικασία ακολουθήθηκε η μέθοδος της εφαρμογής παραγοντικών σχεδιασμών με προσομοίωση των εξαγωγικών δεδομένων τους με εφαρμογή τεχνητών νευρωνικών δικτύων σύμφωνα με την οποία βρέθηκαν ως βέλτιστες συνθήκες οι :

- **υλικό διασποράς:** μίγμα C-18 (80%) / Florisil (20%),
- **αναλογία δείγματος/ υλικού διασποράς:** 1/2,
- **διαλύτης έκλουσης:** μίγμα εξάνιο/διχλωρομεθάνιο: (50%) / (50%),
- **υλικό καθαρισμού εκχυλίσματος:** μίγμα C-18 (40%) / Florisil (60%).

Η απόδοση της μεθόδου μετρήθηκε υπολογίζοντας με κατάλληλα πειράματα ορισμένα σημαντικά χαρακτηριστικά ποιότητά της. Η απόδοση της μεθόδου εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό κριτηρίων ποιότητας για δύο διαφορετικά υποστρώματα με κριτήριο διαφοροποίησης το ποσοστό λίπους που όπως φάνηκε επηρεάζει την εκχύλιση των

οργανοχλωριωμένων ενώσεων από ιχθυρά.. Έτσι, για το υπόστρωμα με το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους, η ανάκτηση κυμάνθηκε από 68% έως 115% (με εξαίρεση το PCB 101: 62%) στο επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης από 0,09 έως 1,0 (ng/g) και 0,29 έως 3,3 (ng/g) αντίστοιχα. Για το υπόστρωμα με το χαμηλότερο ποσοστό λίπους, η ανάκτηση κυμάνθηκε από 55% έως 119% (με εξαίρεση την endrin aldehyde: 37%) στο επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης από 0,09 έως 1,03 (ng/g) και 0,30 έως 3,4 (ng/g) αντίστοιχα. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου υπολογίστηκαν ως % RSD χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα με το υψηλότερο ποσοστό λίπους και βρέθηκαν στα επίπεδα τιμών 5,3-19,7 και 2,6-18,3 αντίστοιχα.

Εκτός από την εξέταση του εύρους τιμών για κάθε χαρακτηριστικό ποιότητας η μεμονωμένη εξέταση αυτών για κάθε ένωση φανερώνει την σημαντικά καλύτερη απόδοση της μεθόδου βελτιστοποίησης με την εφαρμογή των παραγοντικών σχεδιασμών, αφού επιτυγχάνει υψηλότερα επίπεδα ανάκτησης όλων των ενώσεων (πολυυπολειμματική μέθοδος), χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των περισσοτέρων ενώσεων (περίπου 3 φορές πιο χαμηλά) και χαμηλότερες τιμές % RSD ως δείκτες επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας. Αυτή η μέθοδος συνυπολογίζει τις αλληλεπιδράσεις των παραγόντων που επιδρούν σημαντικά στην απόδοση της εκχύλισης οδηγώντας έτσι περισσότερο πιθανά (μικρότερη απόκλιση) στο πραγματικό βέλτιστο σημείο εκχύλισης των ενώσεων. Οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων συνυπολογίζονται αφού προκύπτουν από τη δημιουργία της μήτρας των πειραματικών πορειών της βελτιστοποίησης από την εφαρμογή των παραγοντικών σχεδιασμών. Τα αποτελέσματα αυτά επιτυγχάνονται με μικρότερο αριθμό πειραμάτων και επομένως με μικρότερο κόστος, λιγότερο κόπο, υψηλότερη ταχύτητα παραγωγής αποτελεσμάτων. Η εφαρμογή των τεχνητών νευρωνικών δικτύων, σε συνέχεια της παραγωγής δεδομένων των παραγοντικών σχεδιασμών, είναι η διαδικασία για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η εφαρμογή παραγοντικών σχεδιασμών με προσομοίωση μετά τη χρήση ΤΝΔ είναι μια ποιοτική, αποδοτική, γρήγορη και πλήρης προσέγγιση για τη βελτιστοποίηση μεθοδολογίας εκχύλισης οργανοχλωριωμένων ενώσεων από ιχθυρά. Αποτελεί βελτιστοποιημένη μεθοδολογία εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση που μπορεί να αναπτυχθεί σε ικανοποιητικό χρόνο και να προσαρμόζεται ή/και να επαναπροσδιορίζονται οι συνθήκες της σύμφωνα με τις πειραματικές απαιτήσεις (π.χ. διαφορετικά είδη υποστρωμάτων).

Οι παραγοντικοί σχεδιασμοί εφαρμόστηκαν επιπλέον για την εκτίμηση της αβεβαιότητας που προέρχεται από την ορθότητα της μεθόδου (βελτιστοποιημένη μέθοδος εκχύλισης). Η αβεβαιότητα μέτρησης αποτελεί σημαντική παράμετρο υπολογισμού της διασποράς των πειραματικών τιμών από την αληθινή τιμή του μετρούμενου είδους. Χαρακτηρίζει και αξιολογεί την ορθότητα μιας μεθόδου. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε έρευνα για την εκτίμηση της αβεβαιότητας από την εκχύλιση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων από δείγματα ιχθυρών. Σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε ένα πλήρως ένθετο ή ιεραρχικό πειραματικό σχέδιο από τα δεδομένα του οποίου εξήχθησαν συμπεράσματα για:

- Τη συνεισφορά των επιλεγόμενων παραγόντων στην ορθότητα και άρα στην αβεβαιότητα της μεθόδου.
- Την απόκλιση της ανάκτησης της μεθόδου από τη μονάδα (ιδανική ανάκτηση $R=1$) και άρα την ύπαρξη συστηματικού σφάλματος στη μέθοδο.

Απ' αυτούς τους υπολογισμούς μπορούμε να ανιχνεύσουμε την ύπαρξη ή όχι συστηματικού σφάλματος της μεθόδου, να συνυπολογίσουμε στον υπολογισμό της ανάκτησης τη διακύμανση από εξεταζόμενους παράγοντες και να προβούμε σε πληρέστερη καταγραφή των αναλυτικών αποτελεσμάτων (συμπεριλαμβάνοντας την αβεβαιότητα στην έκφραση των αναλυτικών αποτελεσμάτων) και σε διόρθωση του αποτελέσματος λαμβάνοντας υπόψη το συστηματικό σφάλμα. Εναλλακτικά, εάν δε γίνει διόρθωση και το συστηματικό σφάλμα μπορεί να εξηγηθεί, γίνεται αναφορά σ' αυτό ώστε να λαμβάνεται υπόψη κατά τη χρήση της μεθόδου.

Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκε επίδραση του επιπέδου συγκέντρωσης στην ανάκτηση των περισσότερων ενώσεων του ιεραρχικού σχεδίου. Προκύπτει ως συμπέρασμα ότι για την ανάλυση μελλοντικών δειγμάτων ιχθυρών δεν απαιτείται διαφοροποίηση της μεθοδολογίας κατά την εξέταση διαφορετικών ειδών ιχθυρών, αφού το διαφορετικό υπόστρωμα δεν επιδρά στην ορθότητα της μεθόδου, δηλαδή δεν συνεισφέρει στην αβεβαιότητα των μετρήσεων. Προσδιορίστηκε ακόμη σημαντικό συστηματικό σφάλμα, από

τη δοκιμή $\frac{R_m - 1}{u_{Rm}} \geq t$ δηλαδή σημαντική στατιστική διαφορά της ανάκτησης μεθόδου από τη

μονάδα για όλες τις ενώσεις εκτός της ένωσης PCB-138. Στην αναλυτική Χημεία όταν εξετάζονται σύνθετα και ανομοιόμορφα δείγματα μεγάλου πληθυσμού και η μεθοδολογία ανάλυσης είναι πολύ υπολειμματική οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες επιλέγονται για να ικανοποιήσουν τις απαιτήσεις ανάλυσης όλων των ενώσεων μαζί. Είναι λοιπόν δυνατή και

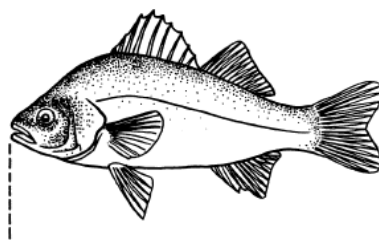
δικαιολογημένη, υπό προϋποθέσεις, η απόκλιση της τιμής ανάκτησης μιας ένωσης από την ιδανική τιμή, όπως συμβαίνει στην παρούσα μελέτη. Πέραν αυτού όμως, η εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης και ο υπολογισμός της στα πραγματικά δείγματα συμπεριλαμβάνει το σφάλμα στο αναλυτικό αποτέλεσμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

7.1 Προσδιορισμός των τιμών συγκέντρωσης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα δείγματα ιχθυρών της μελέτης

Η βελτιστοποιημένη (με την εφαρμογή των παραγοντικών σχεδιασμών) μεθοδολογία εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD), ύστερα από την επικύρωσή της, εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό των οργανοχλωριωμένων ενώσεων της μελέτης σε δύο περιοχές: τη λίμνη Τριγωνίδα και τη λιμνοθάλασσα Αιτωλικού. Όπως αναφέρθηκε στο 5^ο κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία δυο ειδών ιχθυρών από κάθε περιοχή και συγκεκριμένα: των ειδών κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) και γλανίδι (*Silurus aristotelis*) από τη λίμνη Τριγωνίδα και των ειδών κέφαλος (*Mugil cephalus*) και λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) από τη λιμνοθάλασσα Αιτωλικού. Ακολουθώντας πιστά τη διαδικασία δειγματοληψίας, τη διαδικασία εκχύλισης και τη χρωματογραφική αναλυτική διαδικασία προσδιορίσαμε τις ποσότητες οργανοχλωριωμένων ενώσεων της μελέτης στα εξεταζόμενα δείγματα ιχθυρών καθώς και το % ποσοστό λίπους των δειγμάτων κάθε μήνα δειγματοληψίας.



Μέγιστο μήκος ψαριού

Σχήμα 7.1 Μέτρηση μήκους ιχθυρών

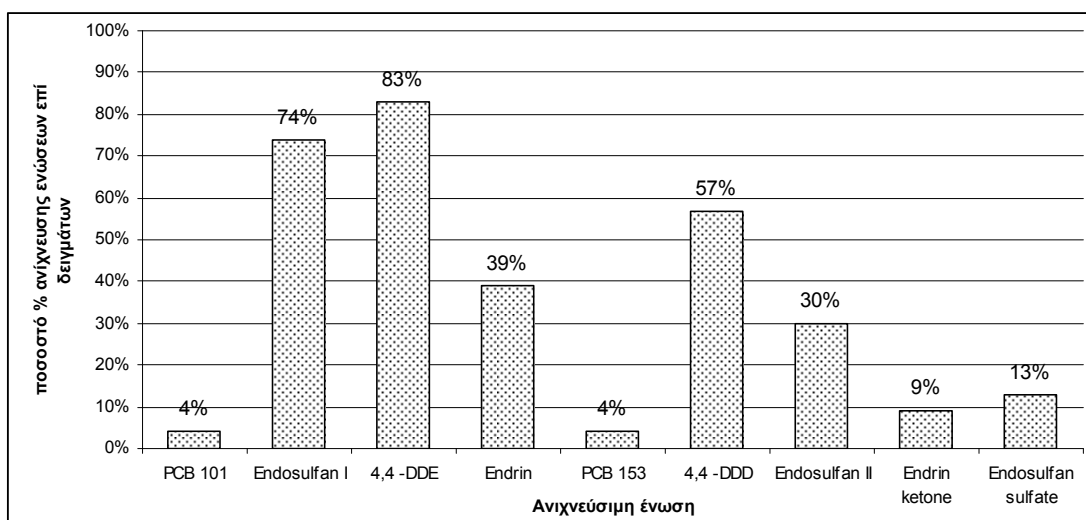
Πίνακας 7.1 Ανατομικά χαρακτηριστικά και ποσοστό (%) περιεχόμενου λίπους των δειγμάτων ιχθυρών της μελέτης

Μήνας δειγματοληψίας	Είδος ιχθυού	Βάρος (g)	Μήκος (cm)	Λίπος (%)
Ιούλιος				
	Κέφαλος	407±12	34±1	3,29
	Λαβράκι	370±101	33±3	2,30
	Γλανίδι	540±71	42±3	6,06
	Κυπρίνος	990±51	44±2	0,73
Αύγουστος				
	Κέφαλος	547±32	40±1	2,19
	Λαβράκι	307±6	32±1	1,68
	Γλανίδι	247±21	34±2	3,84
	Κυπρίνος	*	*	*
Σεπτέμβριος				
	Κέφαλος	1030±20	50±2	1,49
	Λαβράκι	850±33	47±2	1,24
	Γλανίδι	625±219	41±7	1,94
	Κυπρίνος	4910±182	66±25	1,66
Οκτώβριος				
	Κέφαλος	515±21	36±0	3,85
	Λαβράκι	203±31	30±2	0,72
	Γλανίδι	597±31	44±1	4,76
	Κυπρίνος	1805±163	51±3	1,94
Νοέμβριος				
	Κέφαλος	625±106	56±23	3,34
	Λαβράκι	280±25	33±3	0,34
	Γλανίδι	1150±30	53±7	5,08
	Κυπρίνος	1310±57	47±12	1,84
Δεκέμβριος				
	Κέφαλος	490±15	37±1	1,84
	Λαβράκι	410±60	35±3	1,53
	Γλανίδι	730±37	46±7	5,24
	Κυπρίνος	1120±63	49±12	1,70

* μη λήψη δείγματος

Οι τιμές των ποσοτήτων των ενώσεων εκφράστηκαν ως ng ποσότητας της κάθε ένωσης ανά g μυϊκού ιστού δείγματος (**ng/g ιστού**) καθώς και ως ng ποσότητας της κάθε ένωσης ανά g λίπους ιστού δείγματος (**ng/g λίπους**). Οι τιμές αυτές αποτελούν το μέσο όρο τριών

αναλύσεων, δηλαδή συνολικά αναλύθηκαν κατά την εξαμηνιαία δειγματοληψία εβδομήντα δύο (72) δείγματα. Σύμφωνα με τους Pastor D. et al (1996), η κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων των ρύπων ιχθυρών ως προς το λίπος τους είναι σημαντική τόσο για έλεγχο της βιοσυγκέντρωσης όσο και για την μείωση διακυμάνσεων μεταξύ ειδών ιχθυρών αλλά και μεταξύ δειγμάτων του ίδιου είδους ιχθυρών. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αναλύσεων στα δείγματα της μελέτης καταγράφονται στους πίνακες 7.2. και 7.3. Στους πίνακες αυτούς καταγράφονται οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που βρέθηκαν μεγαλύτερες από το όριο ποσοτικοποίησης της κάθε ένωσης ενώ δεν καταγράφηκαν οι ενώσεις της μελέτης για τις οποίες δεν μετρήθηκε ποσότητα για κανένα δείγμα ή ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης κάποιον από τους μήνες δειγματοληψίας.



Σχήμα 7.2 Ποσοστό ανίχνευσης των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο σύνολο των δειγμάτων ιχθυρών της μελέτης

Πίνακας 7.2 Συγκεντρώσεις (ng/g ιστού) των οργανοχλωριωμένων ενώσεων ιχθυρών των δύο περιοχών δειγματοληψίας (λίμνη Τριχωνίδα και λιμνοθάλασσα Αιτωλικού)

Μήνας δειγματοληψίας/Είδος δείγματος	Endosulfan I	4,4 - DDE	Endrin	4,4 - DDD	Endosulfan II	Endrin ketone	Endosulfan sulfate	PCB 101	PCB 153
Ιούλιος									
Κέφαλος	κ.ο.α	1,6	κ.ο.α	0,9	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	κ.ο.α	2,9	7,1	1,0	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	κ.ο.α	59,3	3,4	4,0	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	2,2	4,5
Κυπρίνος	4,6	4,4	3,7	2,0	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Αύγουστος									
Κέφαλος	9,4	6,7	10,0	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	9,2	κ.ο.α	24,8	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	5,7	31,3	6,3	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	Μη λήψη δείγματος								
Σεπτέμβριος									
Κέφαλος	κ.ο.α	2,1	10,0	1,0	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	7,7	3,1	8,7	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	8,3	26,1	κ.ο.α	7,9	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	κ.ο.α	13,9	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Οκτώβριος									
Κέφαλος	2,7	13,1	κ.ο.α	6,8	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	20,0	4,3	κ.ο.α	5,1	3,5	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	8,9	47,6	κ.ο.α	9,8	7,2	4,5	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	11,7	10,8	κ.ο.α	2,3	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Νοέμβριος									
Κέφαλος	2,2	2,7	1,3	κ.ο.α	3,9	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	4,9	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	4,2	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	15,5	77,2	κ.ο.α	9,3	4,0	κ.ο.α	15,3	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	19,8	7,5	κ.ο.α	κ.ο.α	5,8	κ.ο.α	4,5	κ.ο.α	κ.ο.α
Δεκέμβριος									
Κέφαλος	12,7	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	2,9	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	9,4	52,5	κ.ο.α	8,8	3,5	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	12,6	8,2	κ.ο.α	κ.ο.α	5,3	κ.ο.α	3,6	κ.ο.α	κ.ο.α

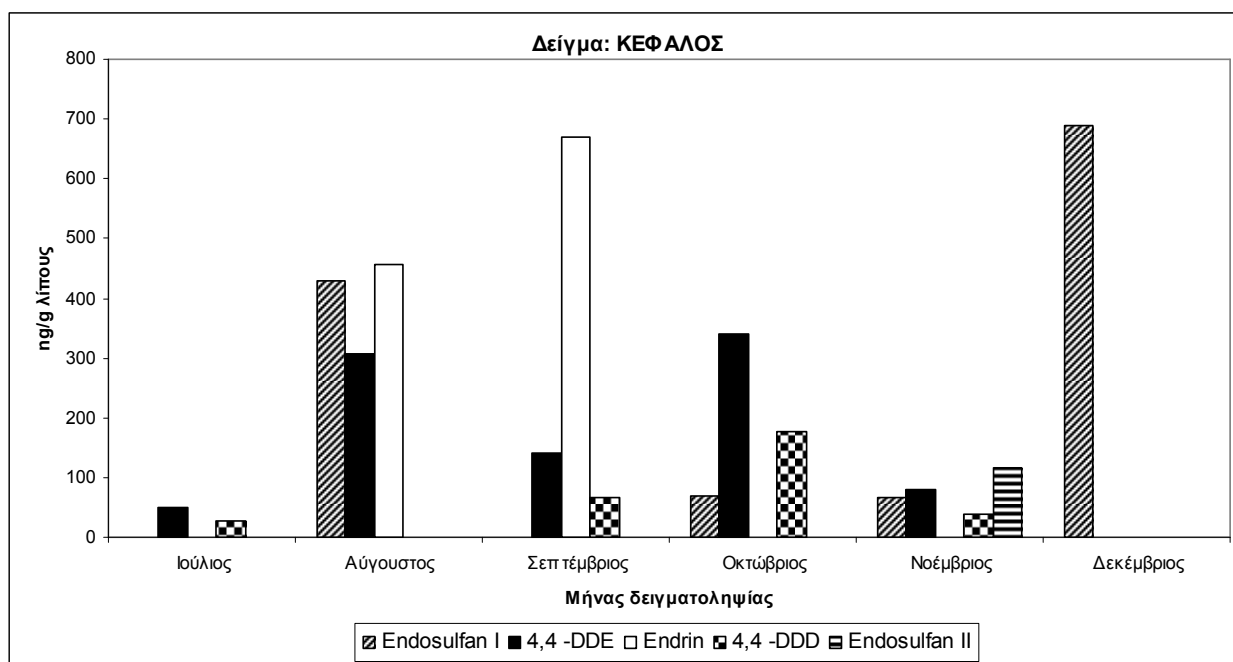
κ.ο.α.=κάτω του ορίου ανίχνευσης

Πίνακας 7.3 Συγκεντρώσεις (ng/g λίπους) των οργανοχλωριωμένων ενώσεων ιχθυρών των δύο περιοχών δειγματοληψίας (λίμνη Τριχωνίδα και λιμνοθάλασσα Αιτωλικού)

Μήνας δειγματοληψίας/ Είδος δείγματος	Endosulfan I	4,4 - DDE	Endrin	4,4 - DDD	Endosulfan II	Endrin ketone	Endosulfan sulfate	PCB 101	PCB 153
Ιούλιος									
Κέφαλος	κ.ο.α	49	κ.ο.α	27	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	κ.ο.α	126	309	43	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	κ.ο.α	979	56	66	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	36	74
Κυπρίνος	630	603	507	274	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Αύγουστος									
Κέφαλος	429	306	457	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	548	κ.ο.α	1476	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	148	815	164	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	Μη λήψη δείγματος								
Σεπτέμβριος									
Κέφαλος	κ.ο.α	141	671	67	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	621	250	702	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	428	1345	κ.ο.α	407	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	κ.ο.α	837	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Οκτώβριος									
Κέφαλος	70	340	κ.ο.α	177	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	2778	597	κ.ο.α	708	486	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	187	100	κ.ο.α	206	151	93	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	603	554	κ.ο.α	119	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Νοέμβριος									
Κέφαλος	66	81	39	κ.ο.α	117	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	1441	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	1235	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	304	1520	κ.ο.α	183	79	κ.ο.α	301	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	1073	408	κ.ο.α	κ.ο.α	315	κ.ο.α	245	κ.ο.α	κ.ο.α
Δεκέμβριος									
Κέφαλος	690	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Λαβράκι	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	190	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Γλανίδι	179	1002	κ.ο.α	168	67	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α	κ.ο.α
Κυπρίνος	741	482	κ.ο.α	κ.ο.α	312	κ.ο.α	182	κ.ο.α	κ.ο.α

κ.ο.α.=κάτω του ορίου ανίχνευσης

Από τους παραπάνω πίνακες φαίνεται ότι οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις που βρέθηκαν σε κάθε είδος ιχθυού κατά τη διάρκεια (αλλά όχι κάθε μήνα) της δειγματοληψίας ήταν οι: Endosulfan I, 4,4 –DDE, Endrin, 4,4 –DDD και Endosulfan II ενώ οι ενώσεις Endosulfan sulphate, Endrin ketone, PCB 101 και PCB 153 βρέθηκαν σε κάποια από τα είδη δειγμάτων. Συνολικά λοιπόν ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν 9 από τις 26 οργανοχλωριωμένες ενώσεις που μελετήθηκαν. Η ένωση 4,4 –DDE βρέθηκε να κατέχει την υψηλότερη συγκέντρωση, ίση με 77,2 ng/g ιστού (1520 ng/g λίπους), στο γλανίδι το μήνα δειγματοληψίας Νοέμβριο ενώ η ένωση endrin κατείχε τη χαμηλότερη συγκέντρωση, ίση με 1,3 ng/g ιστού (39 ng/g λίπους) στον κέφαλο, το μήνα δειγματοληψίας Νοέμβριο. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνονται οι ποσότητες των οργανοχλωριωμένων ενώσεων που προσδιορίστηκαν σε κάθε είδος ιχθυού ξεχωριστά κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.



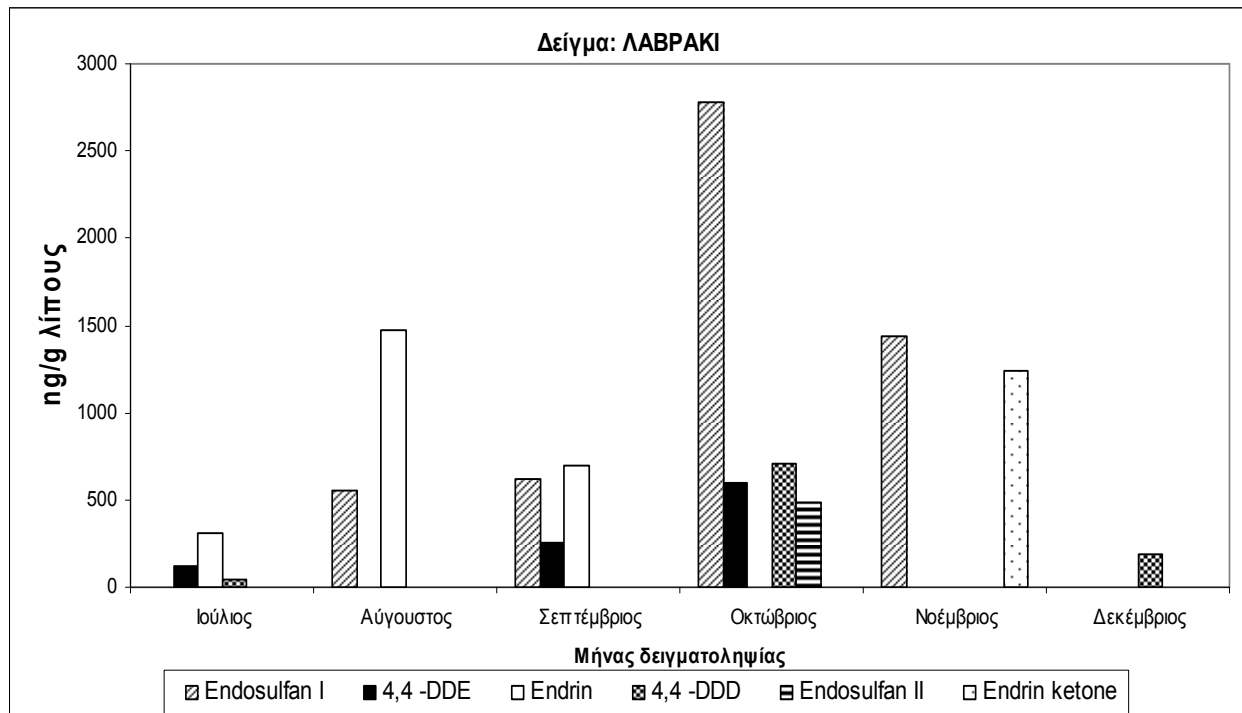
Σχήμα 7.3 Οι ποσότητες (ng/g λίπους) οργανοχλωριωμένων ενώσεων που προσδιορίστηκαν στο δείγμα Κέφαλος (περιοχή δειγματοληψίας: Λιμνοθάλασσα Αιτωλικού)

Στο δείγμα Κέφαλος ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις: Endosulfan I, 4,4 –DDE, Endrin, 4,4 –DDD και Endosulfan II. Η ένωση 4,4–DDD βρέθηκε να έχει τη μικρότερη συγκέντρωση (27 ng/g λίπους) και η ένωση endosulfan I τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (690 ng/g λίπους). Οι μεταβολίτες του 4,4-DDT: 4,4-DDD και 4,4-DDE, είχαν συνεχή παρουσία, σχεδόν σε κάθε μήνα δειγματοληψίας. Σύμφωνα με τους Pastor D. et al. (1996), τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες όπου η κινητικότητα του νερού των λιμνοθαλασσών είναι μικρή, η συγκέντρωση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων αυξάνει με αποτέλεσμα τα ψάρια που

τρέφονται κυρίως από το βυθό, όπως ο κέφαλος, να υπόκεινται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αυτών.

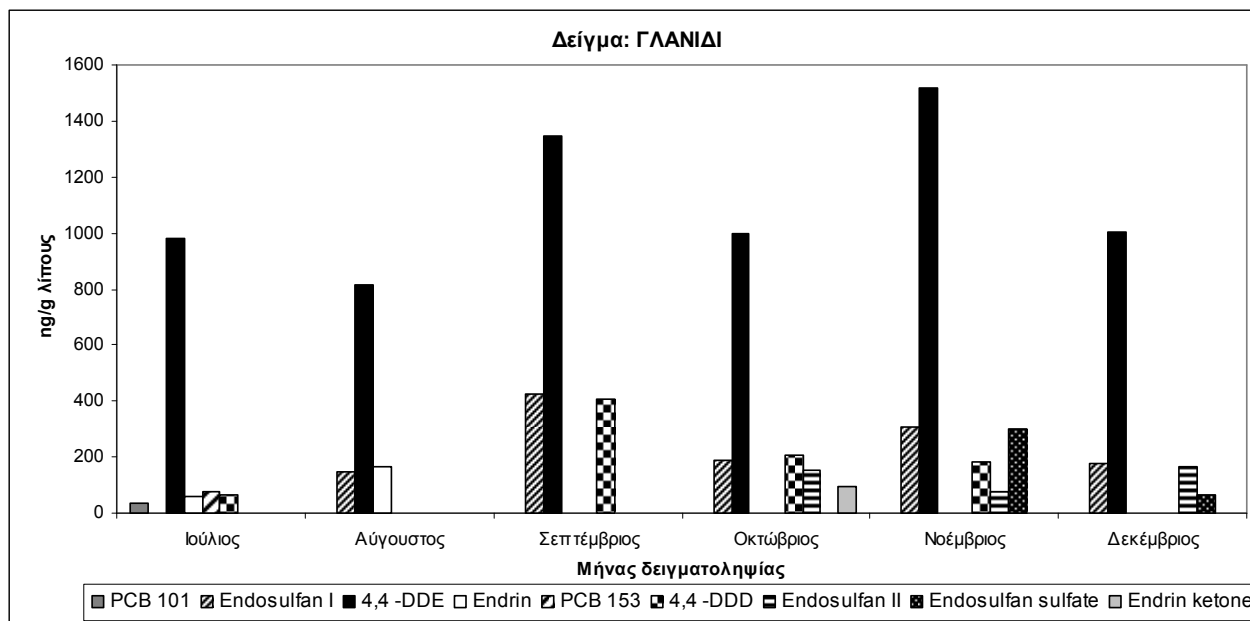
Η παρουσία της ένωσης endosulfan I πιθανόν να οφείλεται σε εφαρμογή σε καλλιέργειες παράκτιων περιοχών. Το φυτοπροστατευτικό εμπορικό προϊόν που περιέχει τη δραστική ουσία endosulfan είναι μίγμα των δύο διαστερεοισομερών: του α-endosulfan (ή I) και του β-endosulfan (ή II) σε αναλογία από 2:1 μέχρι 7:3. Τα σκευάσματα του είναι τα : Thiodan®, Endox®, Thiomul®, Beosit®, Endocell®, Malix®, Thionex®, Insecto®, και Tiovel® (Weber J. et al, 2010). Όμως η Ευρωπαϊκή Επιτροπή προχώρησε πρόσφατα στην ανάκληση των εγκρίσεων για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν αυτή τη δραστική ουσία. Οι εγκρίσεις φυτοπροστατευτικών προϊόντων που περιέχουν endosulfan ανακαλέστηκαν έως τις 2 Ιουνίου 2006. Από τις 3 Δεκεμβρίου 2005 δεν χορηγούνται ούτε ανανεώνονται εγκρίσεις για φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν endosulfan μέσα στο πλαίσιο της παρέκκλισης που προβλέπεται από το άρθρο 8 παράγραφος 2 της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ ενώ είναι δυνατόν να διατηρήσουν σε ισχύ τις εγκρίσεις για φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν endosulfan μέχρι τις 30 Ιουνίου 2007 εφόσον ικανοποιούνται συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Εν τέλει, η προθεσμία για κάθε χρήση του, έχει εκπνεύσει την 31^η Δεκεμβρίου 2007 (Εγκύκλιος ΥΠΑΑΤ 16-2-2006). Έτσι, η τωρινή ανίχνευση υπολειμμάτων φανερώνει συνέχιση της χρήσης του από αποθέματα εμπορικών σκευασμάτων ή από προμήθεια από χώρες του εξωτερικού αλλά και στην παραμονή και συσχέτισή του με το ίζημα των υδάτινων οικοσυστημάτων, γεγονός που συντέλεσε στην απαγόρευση χρήσης του από την Ευρωπαϊκή Ένωση.

Επίσης λόγω της μεγάλης πτητικότητάς του αφενός και της προσρόφησής του στα στερεά σωματίδια του εδάφους αφετέρου είναι δυνατό να μεταφερθεί και σε μεγάλες αποστάσεις από τις περιοχές εφαρμογής είτε με τον αέρα είτε προσροφημένο στη σκόνη του εδάφους.



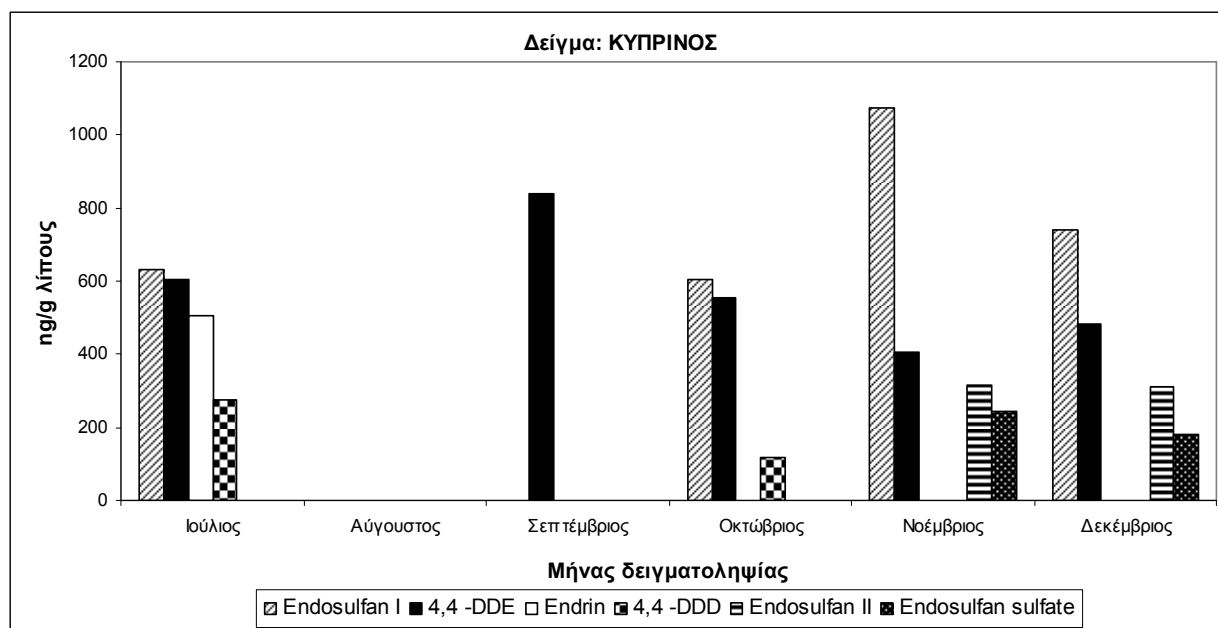
Σχήμα 7.4 Οι ποσότητες (ng/g λίπους) οργανοχλωριωμένων ενώσεων που προσδιορίστηκαν στο δείγμα Λαβράκι (περιοχή δειγματοληψίας: Λιμνοθάλασσα Αιτωλικού)

Στο δείγμα Λαβράκι ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις: Endosulfan I, 4,4 –DDE, Endrin, 4,4 –DDD, Endosulfan II, και Endrin ketone. Η ένωση 4,4–DDD βρέθηκε να έχει τη μικρότερη συγκέντρωση (43 ng/g λίπους) και η ένωση endosulfan I τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (2278 ng/g λίπους). Η παρουσία των μεταβολιτών 4,4-DDD/4,4-DDE δεν ήταν τόσο συχνή, όσο στο δείγμα κέφαλος που προέρχεται από την ίδια περιοχή δειγματοληψίας, αλλά οι συγκεντρώσεις τους συνολικά ήταν περίπου ίσες. Οι ενώσεις Endosulfan I και Endosulfan II ανιχνεύθηκαν την ίδια περίοδο όπως και στον κέφαλο, ψάρι της ίδιας περιοχής δειγματοληψίας πιθανόν λόγω εφαρμογής σε καλλιέργειες παράκτιων περιοχών.



Σχήμα 7.5 Οι ποσότητες (ng/g λίπους) οργανοχλωριωμένων ενώσεων που προσδιορίστηκαν στο δείγμα Γλανίδι (περιοχή δειγματοληψίας: Λίμνη Τριχωνίδα)

Στο δείγμα Γλανίδι ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις: PCB 101, Endosulfan I, 4,4 -DDE, Endrin, PCB 153, 4,4 -DDD, Endosulfan II, Endosulfan sulphate και Endrin ketone. Η ένωση PCB 101 βρέθηκε να έχει τη μικρότερη συγκέντρωση (36 ng/g λίπους) και η ένωση 4,4-DDE τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1520 ng/g λίπους). Η παρουσία της ένωσης 4,4-DDE ήταν συνεχής κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας και κυμάνθηκε στα επίπεδα συγκέντρωσης 815-1520 ng/g λίπους ενώ σημαντική ήταν η παρουσία των ενώσεων Endosulfan I, 4,4 -DDD και Endosulfan II. Το Γλανίδι είχε το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους από όλα τα είδη που εξετάστηκαν και σε συνδυασμό με το ότι είναι αρπακτικό είδος ιχθυού μπορεί να εξηγηθεί η αιτία των συνεχών υψηλών συγκεντρώσεων των ενώσεων 4,4 -DDE, 4,4 -DDD (ενώσεις υψηλής λιποφιλίας). Η ανίχνευση των ισομερών endosulfan και ο μεταβολίτης αυτών Endosulfan sulphate πιθανόν να οφείλεται σε πρόσφατη εφαρμογή σε καλλιέργειες παράκτιων περιοχών.



Σχήμα 7.6 Οι ποσότητες (ng/g λίπους) οργανοχλωριωμένων ενώσεων που προσδιορίστηκαν στο δείγμα Κυπρίνος (περιοχή δειγματοληψίας: Λίμνη Τριγωνίδα)

Στο δείγμα Κυπρίνος ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις: Endosulfan I, 4,4 –DDE, Endrin, 4,4 –DDD, Endosulfan II και Endosulfan sulfate. Η ένωση 4,4 –DDD βρέθηκε να έχει τη μικρότερη συγκέντρωση (119 ng/g λίπους) και η ένωση Endosulfan I τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (1073 ng/g λίπους). Η παρουσία της ένωσης 4,4–DDE ήταν συνεχής κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας και κυμάνθηκε στα επίπεδα συγκέντρωσης 408-837 ng/g λίπους ενώ μετρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων Endosulfan I, Endosulfan II και Endosulfan sulfate. Η παρουσία των ενώσεων 4,4 –DDE και 4,4 –DDD πιθανόν οφείλεται στο μέγεθος (ηλικία) του είδους αυτού αφού συλλέγεται σε βάρος > 1 Kg αλλά και στη συσσώρευση των ενώσεων αυτών στο ίζημα μιας και πρόκειται για ψάρι που τρέφεται από το βυθό.

Πίνακας 7.4 Συχνότητα ανίχνευσης (% ποσοστό επί συνόλου των δειγμάτων) των οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε κάθε δείγμα ιχθυού

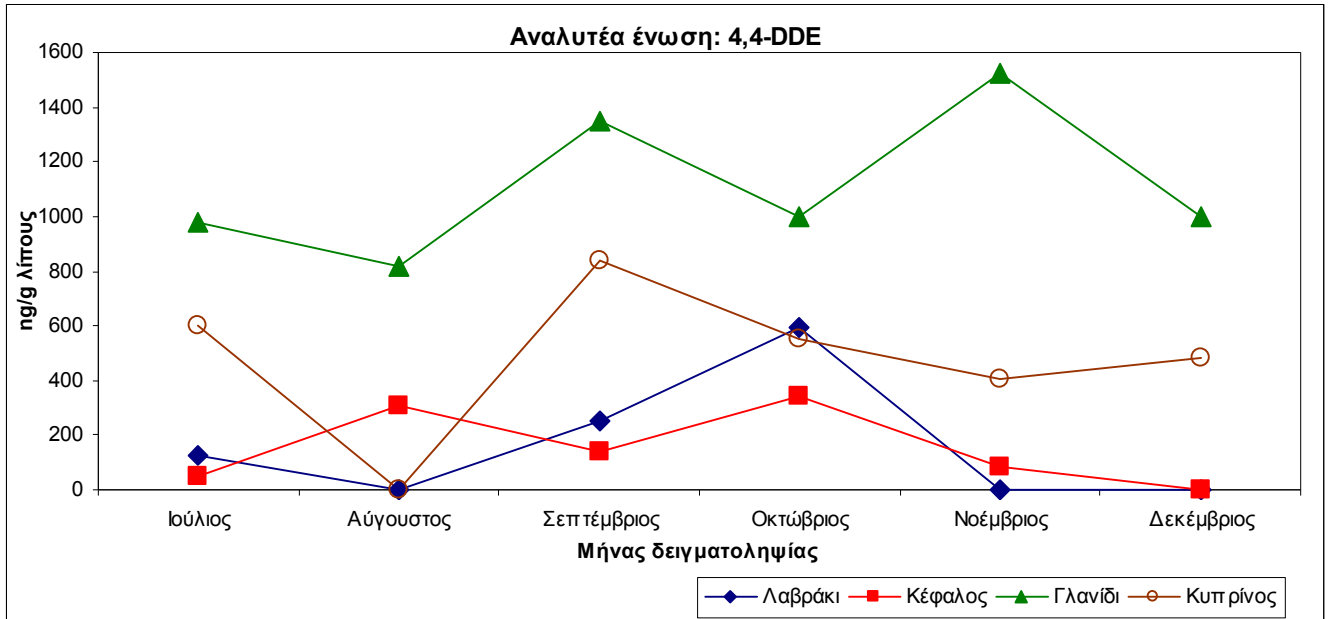
Είδος δείγματος	Endosulfan I	4,4 - DDE	Endrin	4,4 - DDD	Endosulfan II	Endrin ketone	Endosulfan sulfate	PCB 101	PCB 153
Κέφαλος	67	83	50	50	17	0	0	0	0
Λαβράκι	67	30	50	50	17	17	0	0	0
Γλανίδι	83	100	33	83	50	17	17	17	17
Κυπρίνος	80	100	20	40	40	0	40	0	0

Για να συγκρίνουμε τα επίπεδα των τιμών συγκεντρώσεων των ενώσεων μεταξύ των 4 ειδών ιχθυρών που μελετήθηκαν, μεταξύ των ειδών σε σχέση με τις δύο περιοχές δειγματοληψίας και μεταξύ των διατροφικών συνηθειών των ειδών ιχθυρών (αρπακτικό – τρεφόμενο από το βυθό) κατασκευάσαμε τον πίνακα 7.5 και τα διαγράμματα 7.7 έως 7.12 που αναφέρονται στην παρουσία των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα δείγματα της μελέτης.

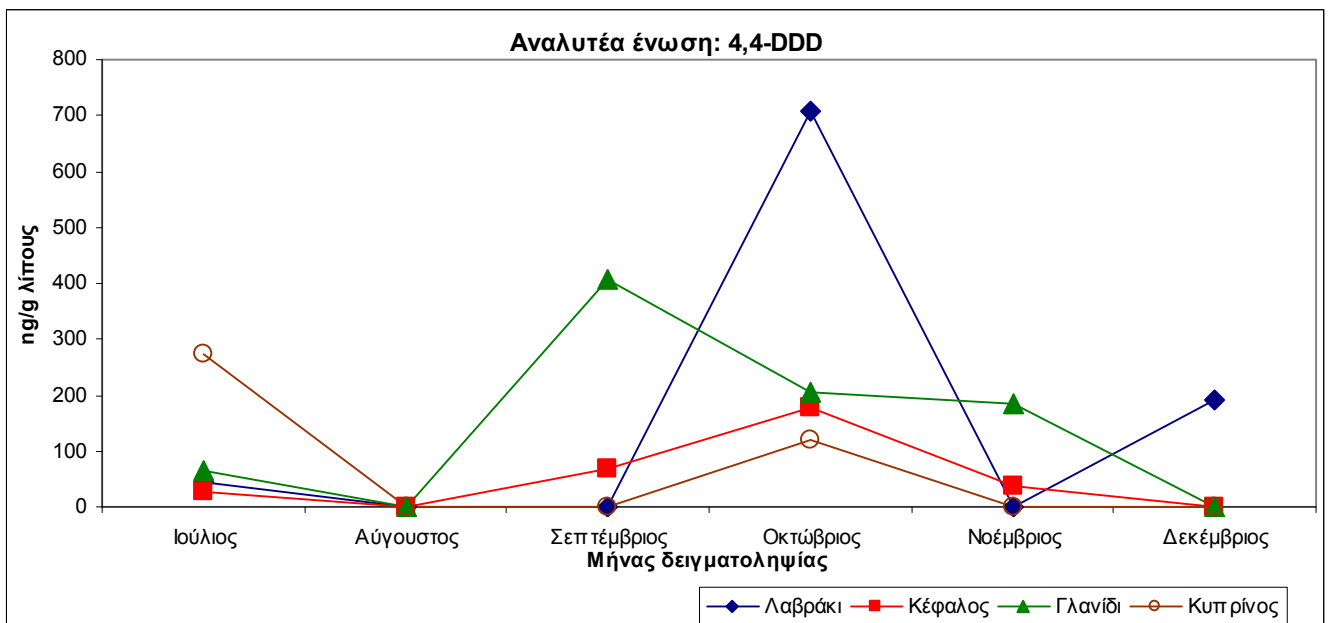
Πίνακας 7.5 Η μέση τιμή της συγκέντρωσης (ng/g λίπους) των αναλυτέων ενώσεων σε κάθε δείγμα ιχθυρού καθόλη τη διάρκεια της δειγματοληψίας

Ανιχνεύσιμη ένωση	<i>Είδος ψαριού</i>			
	Κέφαλος (μέση τιμή λίπους= 2,67%)	Λαβράκι (μέση τιμή λίπους=1,30%)	Γλανίδι (μέση τιμή λίπους=4,49%)	Κυπρίνος (μέση τιμή λίπους=1,31%)
4,4 -DDE	154	167	1110	481
4,4 -DDD	53	162	145	70
Endosulfan I	210	902	208	509
Endosulfan II	29	102	70	117
Endosulfan sulfate	-	-	63	77
Endrin	194	424	40	96
Endrin ketone	-	225	21	-
PCB 101	-	-	11	-
PCB 153	-	-	17	-

Για τους μήνες δειγματοληψίας όπου η τιμή συγκέντρωσης ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης για κάποια ένωση ενός δείγματος προσθέσαμε τιμή συγκέντρωσης ίση με το μισό της τιμής του ορίου ανίχνευσης προκειμένου να υπολογιστούν οι μέσες τιμές του πίνακα 7.5.



Σχήμα 7.7 Τιμές συγκέντρωσης (ng/g λίπους) της ένωσης 4,4-DDE για τα τέσσερα είδη ιχθυρών κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας



Σχήμα 7.8. Τιμές συγκέντρωσης (ng/g λίπους) της ένωσης 4,4-DDD για τα τέσσερα είδη ιχθυρών κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας

Οι μεταβολίτες του 4,4-DDT: 4,4-DDE και 4,4-DDD, έχουν μεγάλη ανθεκτικότητα στο περιβάλλον αφού ο χρόνος ημιζωής τους είναι περίπου 15 χρόνια και επιπλέον εμφανίζουν πολύ υψηλή τοξικότητα σε πολλούς υδρόβιους οργανισμούς (US EPA 1989, WHO 1989, Pastor D., et al 1996). Η ένωση 4,4-DDE ανιχνεύθηκε τις περισσότερες φορές και στις υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης συγκριτικά με τις άλλες ενώσεις της μελέτης. Σύμφωνα με τους πίνακες 7.5 και 7.6, οι υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης μετρήθηκαν για τα είδη της λίμνης (Γλανίδι>Κυπρίνος) και μεταξύ των ειδών ιχθυρών και των δύο περιοχών, τα αρπακτικά είδη (Γλανίδι, Λαβράκι) συγκέντρωσαν σημαντικά υψηλότερες ποσότητες σε σχέση με τα είδη που τρέφονται από το βυθό (απόδειξη βιοσυσσώρευσης). Οι τιμές συγκέντρωσης της ένωσης 4,4-DDD ήταν συνολικά χαμηλότερες σε σχέση με την ένωση 4,4-DDE γεγονός που αποδεικνύει την κυριαρχία του 4,4-DDE ως κύριου μεταβολικού προϊόντος του DDT. Μελέτη των Erdogul et al. (2005) στα είδη Γλανίδι και Κυπρίνος φανέρωσε ότι η ένωση 4,4-DDE συνεισέφερε περισσότερο από 90% στο σύνολο των ενώσεων της ομάδας DDT.

Αυτά τα δεδομένα φανερώνουν ότι τα είδη ιχθυρών της λίμνης συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες των ενώσεων αυτών ως αποτέλεσμα πιθανόν της παλαιότερης συχνής εφαρμογής του εντομοκτόνου DDT στην περιοχή καθώς και της χαμηλότερης κινητικότητας του νερού της λίμνης σχετικά με το νερό της λιμνοθάλασσας. Οι ενώσεις αυτές συσσωρεύονται στο ίζημα (λόγω του μεγάλου Κοο) από όπου ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες είναι δυνατό να εκροφηθούν στο νερό. Δηλαδή, το ίζημα λειτουργεί ως μια αποθήκη για τις ενώσεις αυτές. Δεν πρέπει να παραβλέπονται αλλά δεν μπορούν να ισχυριστούν χωρίς κατάλληλη μελέτη η επίδραση παραγόντων όπως ο μεταβολισμός, το είδος, η διατροφή, το μέγεθος, κ.α. στη βιοσυσσώρευση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Η υψηλότερη συγκέντρωσή τους στα αρπακτικά είδη αποδεικνύει την βιοσυσσώρευση των μεταβολιτών αυτών κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας και τη συνάρτησή της από το λίπος του μυϊκού ιστού των ιχθυρών αφού το γλανίδι είχε το υψηλότερο % ποσοστό λίπους από τα δείγματα ιχθυρών της δειγματοληψίας.

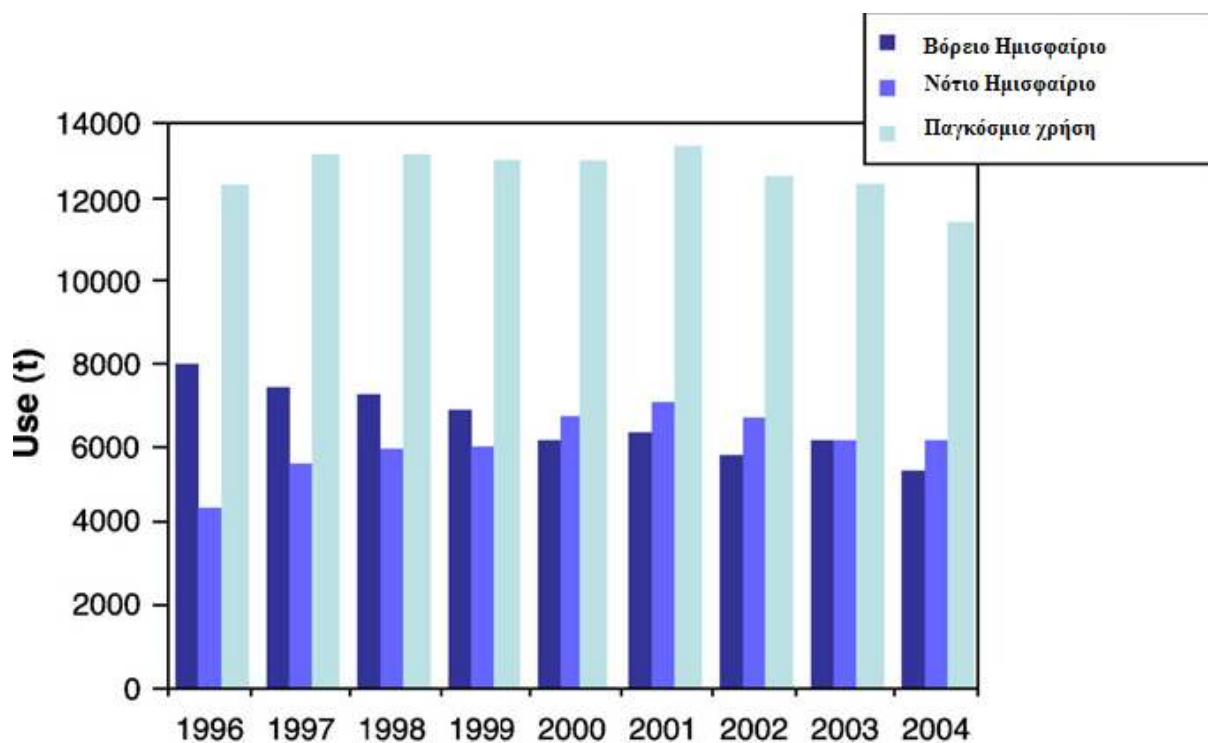
Μελέτη της Σαρηγιαννίδου Ε. Μ., (2007), για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων οργανικών ρύπων στο ίζημα της λιμνοθάλασσας Αιτωλικού κατέγραψε συγκεντρώσεις εύρους τιμών 0,1-65,5mg/g dw και 0,1-29,5 mg/g dw για τις ενώσεις 4,4-DDD και 4,4-DDE αντίστοιχα ενώ δεν ανιχνεύθηκε η ένωση 4,4-DDT.

Πίνακας 7.6 Συγκεντρώσεις (ng/g λίπους) των οργανοχλωριωμένων ενώσεων: 4,4-DDE και 4,4-DDD των δειγμάτων ιχθυρών των δύο περιοχών δειγματοληψίας (λίμνη Τριχωνίδα και λιμνοθάλασσα Αιτωλικού)

Μήνας δειγματοληψίας	Είδος ιχθυρού	4,4-DDE	4,4-DDD	Σ (DDE+DDD)
Ιούλιος	Κέφαλος	49	27	76
	Λαβράκι	126	43	169
	Γλανίδι	979	66	1045
	Κυπρίνος	603	274	877
Αύγουστος	Κέφαλος	306	κ.ο.α.	306
	Λαβράκι	κ.ο.α.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
	Γλανίδι	815	κ.ο.α.	815
	Κυπρίνος	*	*	*
Σεπτέμβριος	Κέφαλος	141	67	208
	Λαβράκι	250	κ.ο.α.	250
	Γλανίδι	1345	407	1752
	Κυπρίνος	837	κ.ο.α.	837
Οκτώβριος	Κέφαλος	340	177	517
	Λαβράκι	597	708	1305
	Γλανίδι	100	206	306
	Κυπρίνος	554	119	673
Νοέμβριος	Κέφαλος	81	κ.ο.α.	81
	Λαβράκι	κ.ο.α.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
	Γλανίδι	1520	183	1703
	Κυπρίνος	408	κ.ο.α.	408
Δεκέμβριος	Κέφαλος	κ.ο.α.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
	Λαβράκι	κ.ο.α.	190	190
	Γλανίδι	1002	168	1002
	Κυπρίνος	482	κ.ο.α.	482

κ.ο.α.=κάτω του ορίου ανίχνευσης, *=μη λήψη δείγματος

Το εντομοκτόνο endosulfan χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες οπωροκηπευτικών, καπνού, βαμβακιού, ελαιοκαλλιέργειες αλλά σε κάποιες περιπτώσεις για τη δημόσια υγεία.



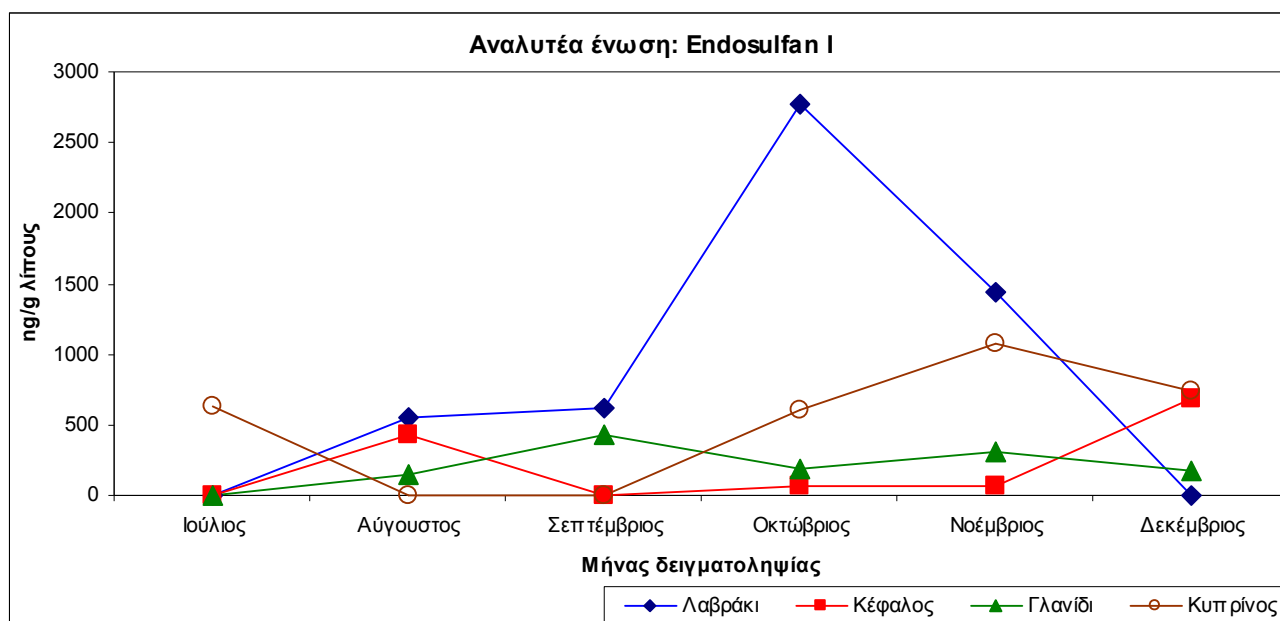
Σχήμα 7.9 Συνολικές ποσότητες χρήσης της ένωσης endosulfan σε παγκόσμιο επίπεδο (Weber J., 2010)

Οι ισομερείς ενώσεις και οι μεταβολίτες του εντομοκτόνου endosulfan, δηλαδή endosulfan I, endosulfan II και endosulfan sulfate, ανιχνεύθηκαν από Αυγουστο έως Δεκέμβριο. Οι σχετικές συγκεντρώσεις των ισομερών endosulfan I και II είχαν αναλογία σε γενικές γραμμές 70:30 που δικαιολογεί την ανίχνευση τους στα ιχθυρά ως αποτέλεσμα πρόσφατης εφαρμογής σε παράκτιες περιοχές των περιοχών δειγματοληψίας. Η εξάτμιση της ένωσης endosulfan από τις καλλιέργειες αποτελεί μια σημαντική πηγή της παρουσίας του στην ατμόσφαιρα και δευτερευόντως η άμεση διαφυγή του από την αέρια εφαρμογή (ψεκασμός). Γενικώς, η εξάτμιση του εμπορικού προϊόντος που περιέχει δραστική ουσία endosulfan από τις επιφάνειες των φυτών βρέθηκε 5 φορές υψηλότερη από ότι η εξάτμιση από το έδαφος (Ruedel, 1997).

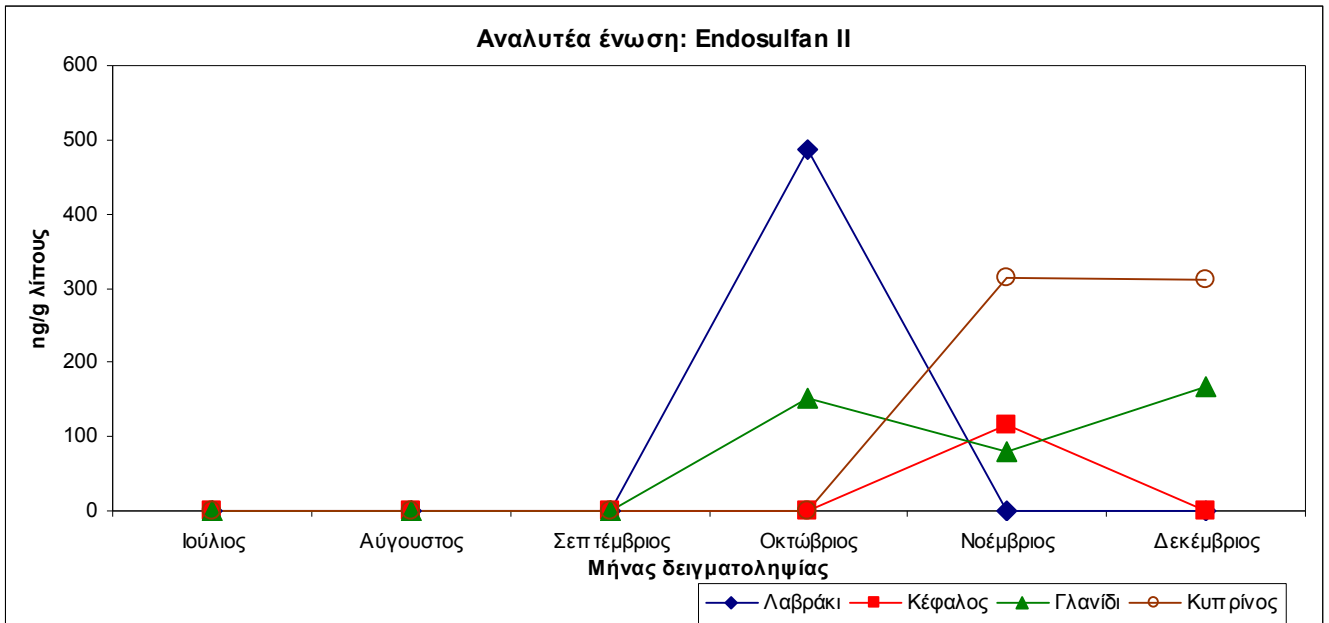
Εάν συγκρίνουμε τις τιμές συγκεντρώσεων των endosulfan I και endosulfan II (σχήματα 7.10, 7.11 και πίνακας 7.5) ανά μήνα δειγματοληψίας για τα ψάρια την λίμνης παρατηρούμε ότι αυτές είναι υψηλότερες στο είδος που τρέφεται από το βυθό. Δεν ισχύει το ίδιο όμως για τα ψάρια της λιμνοθάλασσας πιθανότατα εξαιτίας του μικρότερου μέσου

βάθους της. Η ένωση Endosulfan φαίνεται ότι συσχετίζεται κύρια με τα ιζήματα και τα υδάτινα συστήματα. Η μελέτη κατανομής και τύχης του endosulfan σε υδάτινα συστήματα (Peterson and Batley, 1993), φανέρωσε ότι σημαντικό ποσοστό της ένωσης καταλήγει στα ιζήματα γεγονός που δικαιολογείται από τις υψηλές τιμές K_{OC} , κυρίως για το β-ισομερές. Όμως, στη λιμνοθάλασσα όπου το βάθος νερού είναι μικρό και η θερμοκρασία νερού υψηλότερη σε σχέση με τη λίμνη, η εξάτμιση των ισομερών endosulfan είναι μεγαλύτερη γι' αυτό παρατηρούνται γενικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλλά και μη συσχέτιση της διατροφής των ιχθυρών με τα υπολείμματα endosulfan.

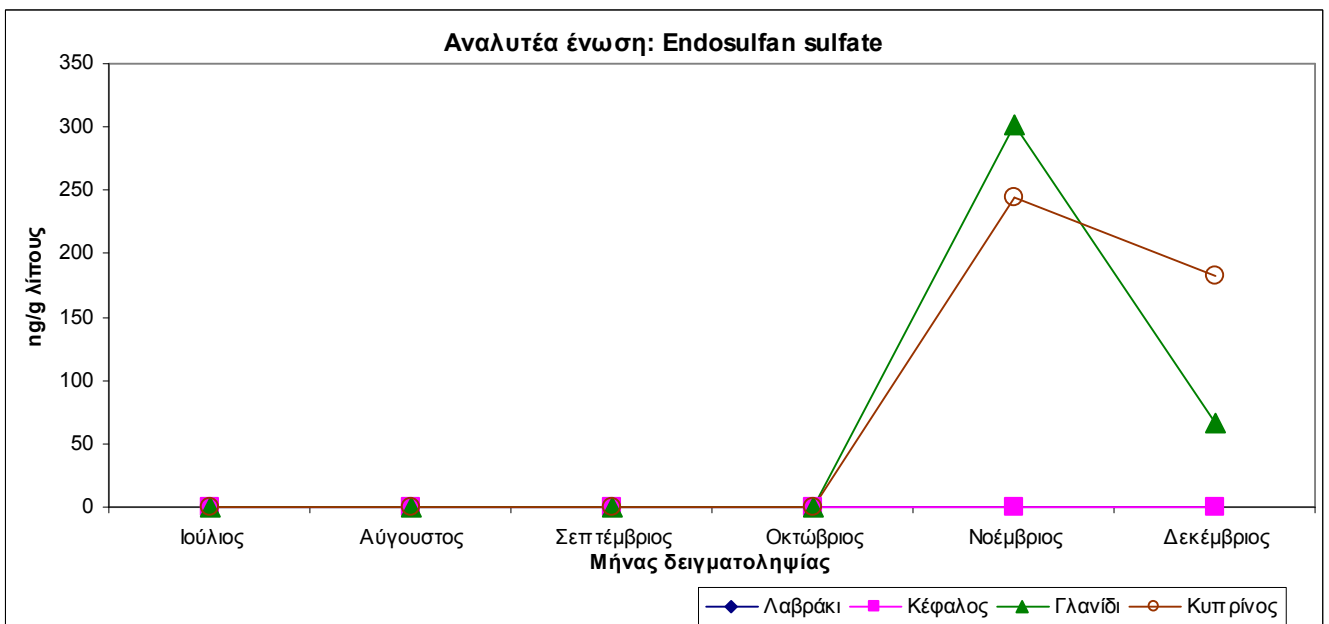
Όπως αναφέρθηκε στο 1^ο κεφάλαιο, οι συντελεστές βιοσυσσώρευσης των ισομερών endosulfan σε ψάρια, σύμφωνα με τις μέχρι τώρα μελέτες, κυμαίνονται σε επίπεδα τιμών που δεν ξεπερνούν την τιμή 5000. Η μελέτη των Jonsson και Toledo (1993) για τον προσδιορισμό των συντελεστών βιοσυγκέντρωσης (BCF) σε αντιπροσωπευτικά είδη υδρόβιων οργανισμών (εργαστηριακή μελέτη) φανέρωσε τιμές από 2006 έως 10994 για την ένωση – endosulfan και από 1398 έως 9908 για την ένωση β- endosulfan. Η UNEP (2001) καθόρισε ως οριακή τιμή συντελεστή βιοσυσσώρευσης των POPs για τους υδρόβιους οργανισμούς, την τιμή 5000. Επομένως, θα πρέπει οι αναφορές των τιμών BCF της βιβλιογραφίας να μελετηθούν με προσοχή ώστε να καθοριστούν οι επιπτώσεις της ένωσης endosulfan στους ζωικούς οργανισμούς (βιοσυσσώρευση). Επιπρόσθετα στη δική μας μελέτη βρέθηκαν μεγάλες τιμές της ένωσης στα ψάρια αλλά θα πρέπει να γίνουν αντίστοιχες μελέτες στα νερά των περιοχών δειγματοληψίας για να συμπεράνουμε ότι η ένωση endosulfan είναι ύποπτη βιοσυσσώρευσης.



Σχήμα 7.10 Τιμές συγκέντρωσης (ng/g λίπους) της ένωσης endosulfan I για τα τέσσερα είδη ιχθυρών κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας



Σχήμα 7.11 Τιμές συγκέντρωσης (ng/g λίπους) της ένωσης endosulfan II για τα τέσσερα είδη ιχθυρών κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας

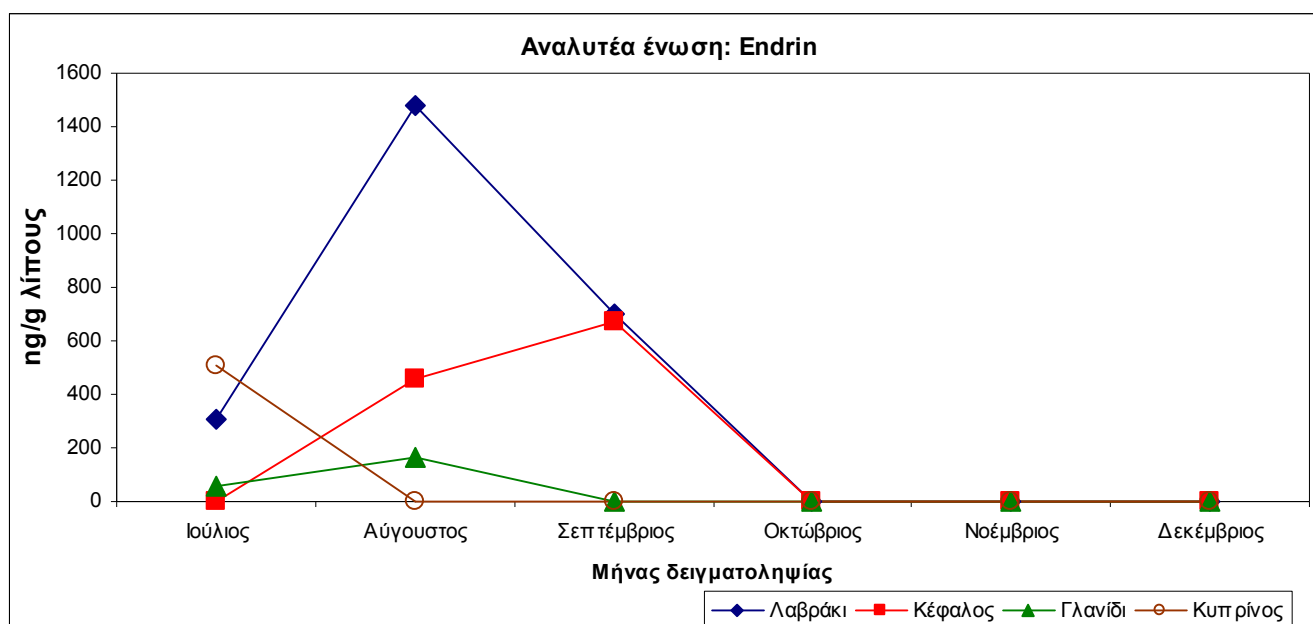


Σχήμα 7.12 Τιμές συγκέντρωσης (ng/g λίπους) της ένωσης endosulfan sulfate για τα τέσσερα είδη ιχθυρών κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας

Τέλος, η ανίχνευση του μεταβολίτη endosulfan sulfate μόνο στη λίμνη πιθανόν οφείλεται στο μεγαλύτερο χρόνο παραμονής endosulfan στα βαθιά και ψυχρότερα νερά αυτής ή στην μεγαλύτερη ποσότητα εφαρμογής του ως εντομοκτόνου στις παράκτιες περιοχές.

Η μελέτη της Σαρηγιαννίδου Ε. Μ., (2007), κατέγραψε τιμές των ενώσεων endosulfan I, endosulfan II και endosulfan sulfate στα επίπεδα 0,12-6,0 ng/g dw, 0,12-2,2 ng/g dw και 0,16-10,5 ng/g dw αντίστοιχα στο ίζημα της λιμνοθάλασσας Αιτωλικού. Η κυριαρχία της ένωσης endosulfan sulfate φανερώνει τη μεταφορά της ένωσης endosulfan στο ίζημα των υδάτινων οικοσυστημάτων και στην πραγματοποίηση διαδικαδιών μετατροπής του σε μεταβολικά προϊόντα.

Κατά τους τρεις πρώτους μήνες της δειγματοληψίας ανιχνεύθηκε στα είδη ιχθυρών, η ένωση endrin, όπου τα ψάρια λιμνοθάλασσας συγκέντρωσαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέσεις με τα ψάρια της λίμνης. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για το προϊόν μεταβολισμού της endrin, την ένωση endrin ketone. Δεν μπορεί όμως να εξαχθεί συσχέτιση μεταξύ των ειδών ιχθυρών.



Σχήμα 7.13 Τιμές συγκέντρωσης (ng/g λίπους) της ένωσης endrin για τα τέσσερα είδη ιχθυρών κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας

Σύμφωνα με τη Σαρηγιαννίδου E. M., (2007), η ένωση endrin ανιχνεύθηκε μόνο μια φορά (1,52 ng/g dw) ενώ ο μεταβολίτης της endrin ketone απαντήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από την αρχική ένωση. Στα ιζήματα βρέθηκαν και υπόλοιπες οργανοχλωριωμένες ενώσεις σε μικρότερες τιμές (μελετήθηκαν οι ίδιες ενώσεις με της παρούσας μελέτης) αλλά και PCBs. Συγκεκριμένα το εύρος τιμών των συμπαραγώγων PCBs ήταν: PCB 28 1,56-9,09 ng/g dw , PCB 52 0,11-3,4 ng/g dw, PCB 101 0,13-8,89 ng/g dw, PCB 153 0,1-13,4 ng/g dw και PCB 180 0,1-2,4 ng/g dw

7.2 Υπολογισμός της αβεβαιότητας των αποτελεσμάτων προσδιορισμού οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα δείγματα ιχθυρών της μελέτης

Ο υπολογισμός της αβεβαιότητας των αναλυτικών αποτελεσμάτων που προέρχονται από χρωματογραφικούς προσδιορισμούς μπορεί να πραγματοποιηθεί υπολογίζοντας τα επιμέρους συστατικά αβεβαιότητας των παραγόντων που συνεισφέρουν σημαντικά στην αβεβαιότητα του τελικού αποτελέσματος. Σύμφωνα με τους Konieczka et al (2010), αυτοί οι παράγοντες είναι: η ποσότητα δείγματος για τον προσδιορισμό, η τιμή ανάκτησης της αναλυτικής διαδικασίας, η επαναληψιμότητα των προσδιορισμών των πραγματικών δειγμάτων ανάλυσης (επαναληψιμότητα των σημάτων), η σχέση συγκέντρωσης αναλύτη και ανωτάτου ορίου ανίχνευσης και η βαθμονόμηση των χρωματογραφικών οργάνων. Στην ενότητα 3.2.2 της παρούσας μελέτης, αναφέρεται ο τρόπος προσδιορισμού των αβεβαιοτήτων που προέρχονται από τους παραπάνω παράγοντες καθώς και της τελικής εκτεταμένης αβεβαιότητας μιας μέτρησης, η οποία υπολογίζεται από τη σχέση:

$$U = kc\sqrt{(u_{r(\delta\acute{\alpha}\gamma\mu\alpha)})^2 + (u_{r(\alpha\nu\acute{\alpha}\kappa\tau)})^2 + (u_{r(\beta\alpha\theta\mu)})^2 + (u_{r(\epsilon\pi\alpha\nu)})^2 + (u_{r(LOD)})^2} \quad (\text{εξ. 7.1})$$

όπου:

U- η εκτεταμένη αβεβαιότητα μέτρησης

k- ο παράγοντας κάλυψης (έχει τιμή=2 σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%)

c- η μέση τιμή συγκέντρωσης ενός αναλύτη

$u_{r(\delta\acute{\alpha}\gamma\mu\alpha)}$ - η σχετική τυπική αβεβαιότητα δείγματος

$u_{r(\alpha\nu\acute{\alpha}\kappa\tau)}$ - η σχετική τυπική αβεβαιότητα ανάκτησης της μεθόδου

$u_{r(\beta\alpha\theta\mu)}$ - η σχετική τυπική αβεβαιότητα βαθμονόμησης της μεθόδου

$u_{r(\epsilon\pi\alpha\nu)}$ - η σχετική τυπική αβεβαιότητα επαναληψιμότητας

$u_{r(LOD)}$ - η σχετική τυπική αβεβαιότητα του ορίου ανίχνευσης

Ως **σχετική τυπική αβεβαιότητα** μιας μετρούμενης ποσότητας ορίζεται η τυπική αβεβαιότητα διηρημένη με την τιμή της μετρούμενης ποσότητας.

Η σχετική τυπική αβεβαιότητα δείγματος άλλες φορές συνυπολογίζεται για τον υπολογισμό της εκτεταμένης αβεβαιότητας μιας μέτρησης και άλλες όχι. Στην παρούσα μελέτη, συνυπολογίστηκε και ορίστηκε ίση με την ευαισθησία του ζυγού μέτρησης της ποσότητας δείγματος, δηλαδή $u_{r(\text{δείγμα})} = 0,001$.

Η σχετική τυπική αβεβαιότητα ανάκτησης της μεθόδου υπολογίστηκε ως το πηλίκο της αβεβαιότητας ολικής μέσης ανάκτησης της μεθόδου δια της ανάκτησης μεθόδου (όπως υπολογίστηκαν από τη μελέτη εκτίμησης της αβεβαιότητας που προέρχεται από την ορθότητα της μεθόδου):

$$u_{r(\text{ανακτ})} = \frac{u_{Rm}}{R_m} \quad (\text{εξ. 7.2})$$

Τα δύο συστατικά του πηλίκου προέρχονται από τους υπολογισμούς των αβεβαιοτήτων προερχόμενων από την εκτίμηση της ορθότητας μεθόδου που υπολογίστηκαν στο 6^ο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης (πίνακας 6.9). Στον παραπάνω τύπο χρησιμοποιήθηκε η u_{Rm} , δηλαδή η αβεβαιότητα της μέσης τιμής ανάκτησης, επειδή παρόλο που η μέθοδος φάνηκε να έχει συστηματικό σφάλμα δεν κρίναμε απαραίτητο να εφαρμόσουμε κάποιον συντελεστή διόρθωσης της ανάκτησης αφού η διαφορά της από την ιδανική τιμή (μονάδα) είναι αναμενόμενη στις αναλυτικές μεθοδολογίες εκχύλισης ενώσεων από σύνθετα υποστρώματα, όπως τα ψάρια.

Για τη βαθμονόμηση του οργάνου μέτρησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του εσωτερικού προτύπου που περιλαμβάνει τον υπολογισμό του συντελεστή σχετικής απόκρισης (RRF) των ενώσεων. Στην παρούσα μελέτη, ο RRF κάθε ένωσης προσδιορίστηκε ως μέσος όρος τριών τιμών υπολογιζόμενων από τρία ξεχωριστά πρότυπα διαλύματα που περιείχαν τις αναλυτέες ενώσεις και το εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση 50 ppb. Έτσι:

$$u_{r(\beta\alpha\theta\mu)} = \frac{SD_{RRF}}{\sqrt{3}} * \frac{1}{RRF} \quad (\text{εξ. 7.3})$$

Για τον υπολογισμό της σχετικής τυπικής αβεβαιότητας που προέρχεται από την επαναληψιμότητα των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε η επαναληψιμότητα της επικυρωμένης μεθόδου, στο επίπεδο συγκέντρωσης 50 ng/g, δηλαδή:

$$u_{r(\text{επαν})} = \frac{RSD}{\sqrt{6}} \quad (\text{εξ. 7.4})$$

Το πηλίκο του ορίου ανίχνευσης κάθε ένωσης δια της ανιχνεύσιμης ποσότητας των πραγματικών δειγμάτων ιχθυρών της μελέτης εφαρμογής αποδίδει τη σχετική τυπική αβεβαιότητα του ορίου ανίχνευσης:

$$u_{r(LOD)} = \frac{LOD}{C_{\text{δειγμα}}} \quad (\text{εξ. 7.5})$$

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω υπολογίστηκαν οι αβεβαιότητες των αποτελεσμάτων των πραγματικών δειγμάτων που αναλύθηκαν και παρουσιάστηκαν μαζί με το αναλυτικό αποτέλεσμα ως εύρος τιμών που φανερώνει τη διασπορά τιμών μέσα στο οποίο πιστεύεται ότι βρίσκεται η μετρούμενη τιμή με εμπιστοσύνη 95% (πίνακες 7.6 – 7.9).

Πίνακας 7.6 Υπολογισμός αβεβαιότητας αποτελεσμάτων ανάλυσης πραγματικών δειγμάτων του είδους: Κέφαλος (*mugil cephalus*)

Παράμετρος	Ιούλιος		Αύγουστος			Σεπτέμβριος		
	4,4 -DDE	4,4 -DDD	Endosulfan I	4,4 -DDE	Endrin	4,4 -DDE	Endrin	4,4 -DDD
Αναλυτέα ένωση								
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	1,6	0,9	9,4	6,7	10	2,1	10	1
LOD (ng/g)	0,16	0,25	0,21	0,16	0,48	0,16	0,48	0,25
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	8,7	8,7	13,3	8,7	5,5	8,7	5,5	8,7
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,924	0,915	0,925	0,924	1,085	0,924	1,085	0,915
Αβεβαιότητα								
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0417	0,0327	0,0298	0,0417	0,0093	0,0417	0,0093	0,0327
Ανάκτηση	0,0027	0,00065	0,00223	0,0027	0,00291	0,0027	0,00291	0,00065
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,035	0,035	0,054	0,035	0,022	0,035	0,022	0,035
Ορίου ανίχνευσης	0,1	0,277	0,022	0,024	0,048	0,076	0,048	0,25
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,113	0,281	0,065	0,059	0,054	0,093	0,054	0,254
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	23	56	13	12	11	19	11	51
Αποτέλεσμα								
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	1,6±0,36	0,9±0,5	9,4±1,2	6,7±0,79	10±1,1	2,1±0,39	10±1,1	1±0,5

Πίνακας 7.6 (συνέχεια)

Παράμετρος	Οκτώβριος			Νοέμβριος			Δεκέμβριος	
	Endosulfan I	4,4 -DDE	4,4 -DDD	Endosulfan I	4,4 -DDE	Endrin	Endosulfan II	Endosulfan I
Αναλυτέα ένωση								
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	2,7	13,1	6,8	2,2	2,7	1,3	3,9	12,7
LOD (ng/g)	0,21	0,16	0,25	0,21	0,16	0,48	0,64	0,21
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	13,3	8,7	8,7	13,3	8,7	5,5	6,0	13,3
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,925	0,924	0,915	0,925	0,924	1,085	0,803	0,925
Αβεβαιότητα								
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0298	0,0417	0,0327	0,0298	0,0417	0,0093	0,0295	0,0298
Ανάκτηση	0,00223	0,0027	0,00065	0,00223	0,0027	0,00291	0,00282	0,00223
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,054	0,035	0,035	0,054	0,035	0,022	0,023	0,054
LOD	0,077	0,012	0,037	0,095	0,059	0,369	0,164	0,016
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,099	0,056	0,061	0,113	0,08	0,369	0,168	0,0637
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	20	11	12	23	16	74	34	13
Αποτέλεσμα								
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	2,7±0,53	13,1±1,5	6,8±0,82	2,2±0,50	2,7±0,43	1,3±0,96	3,9±1,3	12,7±1,6

Πίνακας 7.7 Υπολογισμός αβεβαιότητας αποτελεσμάτων ανάλυσης πραγματικών δειγμάτων του είδους: Λαβράκι (*dicentrarcus labrax*)

Παράμετρος	Ιούλιος			Αύγουστος		Σεπτέμβριος		
	4,4-DDE	Endrin	4,4-DDD	Endosulfan I	Endrin	Endosulfan I	4,4-DDE	Endrin
Αναλυτέα ένωση								
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	2,9	7,1	1	9,2	24,8	7,7	3,1	8,7
LOD (ng/g)	0,16	0,48	0,25	0,21		0,21	0,16	
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	8,7	5,5	8,7	13,3	5,5	13,3	8,7	5,5
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,924	1,085	0,915	0,925	1,085	0,925	0,924	1,085
Αβεβαιότητα								
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0417	0,0093	0,0327	0,0298	0,0093	0,0298	0,0417	0,0093
Ανάκτηση	0,0027	0,00291	0,00065	0,00223	0,00291	0,00223	0,0027	0,00291
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,035	0,022	0,035	0,054	0,022	0,054	0,035	0,022
LOD	0,055	0,068	0,25	0,023	0,019	0,027	0,051	0,055
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,077	0,072	0,255	0,066	0,031	0,067	0,074	0,06
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	15	14	51	13	6	13	14	6
Αποτέλεσμα								
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	2,9±0,45	7,1±1,0	1±0,5	9,2±1,2	24,8±1,5	7,7±1,0	3,1±0,46	8,7±1,0

Πίνακας 7.7 (συνέχεια)

Παράμετρος	Οκτώβριος			Νοέμβριος		Δεκέμβριος	
	Endosulfan I	4,4-DDE	4,4-DDD	Endosulfan II	Endosulfan I	Endrin ketone	4,4-DDD
Αναλυτέα ένωση							
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	20	4,3	5,1	3,5	4,9	4,2	2,9
LOD (ng/g)	0,21	0,16	0,25		0,21	0,61	0,25
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	13,3	8,7	8,7	5,6	13,3	13,1	8,7
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,925	0,924	0,915	0,803	0,925	0,763	0,915
Αβεβαιότητα							
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0298	0,0417	0,0327	0,0294	0,0298	0,0109	0,0327
Ανάκτηση	0,00223	0,0027	0,00065	0,00282	0,00223	0,00176	0,00065
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,054	0,035	0,035	0,023	0,054	0,053	0,035
LOD	0,0105	0,037	0,049	0,183	0,043	0,145	0,086
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,063	0,066	0,068	0,187	0,075	0,155	0,098
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	13		14	3	15	31	20
Αποτέλεσμα							
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	20±2,5	4,3±0,57	5,1±0,72	3,5±1,3	4,9±0,74	4,2±1,3	2,9±0,57

Πίνακας 7.8 Υπολογισμός αβεβαιότητας αποτελεσμάτων ανάλυσης πραγματικών δειγμάτων του είδους: Γλανίδι (*Silurus arisototelis*)

Παράμετρος	Ιούλιος					Αύγουστος		
	4,4-DDE	Endrin	4,4-DDD	PCB 101	PCB 153	Endosulfan I	4,4-DDE	Endrin
Αναλυτέα ένωση								
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	59,3	3,4	4	2,2	4,5	5,7	31,3	6,3
LOD (ng/g)	0,16		0,25	0,54	0,69	0,21	0,16	
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	8,7	5,5	8,7	5,9	8,7	13,3	8,7	5,5
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,924	1,085	0,915	0,835	0,968	0,925	0,924	1,085
Αβεβαιότητα								
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0417	0,0093	0,0327	0,0144	0,0138	0,0298	0,0417	0,0093
Ανάκτηση	0,0027	0,00291	0,00065	0,00322	0,00495	0,00223	0,0027	0,00291
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,035	0,022	0,035	0,024	0,035	0,054	0,035	0,022
LOD	0,0027	0,141	0,0325	0,2454	0,1533	0,0368	0,0051	0,076
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,055	0,143	0,058	0,247	0,158	0,072	0,055	0,079
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	11	28	12	49	32	14	11	16
Αποτέλεσμα								
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	59,3±6,5	3,4±0,97	4,0±0,46	2,2±1,1	4,5±1,4	5,7±0,82	31,3±3,4	6,3±1,0

Πίνακας 7.8 (συνέχεια)

Παράμετρος	Σεπτέμβριος			Οκτώβριος				
	Endosulfan I	4,4-DDE	4,4-DDD	Endosulfan I	4,4-DDE	4,4-DDD	Endosulfan II	Endrin ketone
Αναλυτέα ένωση								
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	8,3	26,1	7,9	8,9	47,6	9,8	7,2	4,5
LOD (ng/g)	0,21	0,16	0,25	0,21	0,16	0,25	0,64	0,61
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	13,3	8,7	8,7	13,3	8,7	8,7	5,6	13,1
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,925	0,924	0,915	0,925	0,924	0,915	0,803	0,763
Αβεβαιότητα								
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0298	0,0417	0,0327	0,0298	0,0417	0,0327	0,0294	0,0109
Ανάκτηση	0,00223	0,0027	0,00065	0,00223	0,0027	0,00065	0,00282	0,00176
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,054	0,035	0,035	0,054	0,035	0,035	0,023	0,053
LOD	0,025	0,0061	0,032	0,023	0,0034	0,025	0,089	0,135
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,067	0,055	0,058	0,066	0,055	0,054	0,096	0,145
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	13	11	12	13	11	11	19	29
Αποτέλεσμα								
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	8,3±1,1	26,1±2,9	7,9±0,91	8,9±1,2	47,6±5,2	9,8±1,1	7,2±1,4	4,5±1,3

Πίνακας 7.8 (συνέχεια)

Παράμετρος	Νοέμβριος					Δεκέμβριος			
	Endosulfan I	4,4-DDE	4,4-DDD	Endosulfan II	Endosulfan sulfate	Endosulfan I	4,4-DDE	4,4-DDD	Endosulfan II
Αναλυτέα ένωση									
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	15,5	77,2	9,3	4	15,3	9,4	52,5	8,8	3,5
LOD (ng/g)	0,21	0,16	0,25	0,64	0,30	0,21	0,16	0,25	0,64
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	13,3	8,7	8,7	5,6	6,7	13,3	8,7	8,7	5,6
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,925	0,924	0,915	0,803	0,715	0,925	0,924	0,915	0,803
Αβεβαιότητα									
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0298	0,0417	0,0327	0,0294	0,0098	0,0298	0,0417	0,0327	0,0294
Ανάκτηση	0,00223	0,0027	0,00065	0,00282	0,00407	0,00223	0,0027	0,00065	0,00282
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,054	0,035	0,035	0,023	0,027	0,054	0,035	0,035	0,023
LOD	0,0135	0,0021	0,0269	0,16	0,02	0,0223	0,003	0,1284	0,183
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,063	0,055	0,055	0,164	0,035	0,066	0,055	0,137	0,187
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	13	11	11	33	7	13	11	27	37
Αποτέλεσμα									
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	15,5±1,9	77,2±8,4	9,3±1,0	4,0±1,3	15,3±1,1	9,4±1,2	52,5±5,7	8,8±2,4	3,5±1,3

Πίνακας 7.9 Υπολογισμός αβεβαιότητας αποτελεσμάτων ανάλυσης πραγματικών δειγμάτων του είδους: Κυπρίνος (*Cyprinus carpio*)

Παράμετρος	Ιούλιος			Σεπτέμβριος			Οκτώβριος	
	Endosulfan I	4,4-DDE	Endrin	4,4-DDD	4,4-DDE	Endosulfan I	4,4-DDE	4,4-DDD
Αναλυτέα ένωση								
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	4,6	4,4	3,7	2	13,9	11,7	10,8	2,3
LOD (ng/g)	0,21	0,16	0,48	0,25	0,16	0,21	0,16	0,25
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	13,3	8,7	5,5	8,7	8,7	13,3	8,7	8,7
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,925	0,924	1,085	0,915	0,924	0,925	0,924	0,915
Αβεβαιότητα								
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0298	0,0417	0,0093	0,0327	0,0417	0,0298	0,0417	0,0327
Ανάκτηση	0,00223	0,0027	0,00291	0,00065	0,0027	0,00223	0,0027	0,00065
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,054	0,035	0,022	0,035	0,035	0,054	0,035	0,035
LOD	0,0456	0,0363	0,13	0,125	0,0115	0,0179	0,0148	0,1087
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,076	0,065	0,132	0,134	0,055	0,064	0,056	0,119
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	15	13	26	27	11	13	11	24
Αποτέλεσμα								
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	4,6±0,71	4,4±0,58	3,7±0,98	2,0±0,53	13,9±1,5	11,7±1,5	10,8±1,2	2,3±0,55

Πίνακας 7.9 (συνέχεια)

Παράμετρος	Νοέμβριος				Δεκέμβριος			
	Endosulfan I	4,4-DDE	Endosulfan II	Endosulfan sulfate	Endosulfan I	4,4-DDE	Endosulfan II	Endosulfan sulfate
Αναλυτέα ένωση								
Συγκέντρωση (ng/g ιστού)	19,8	7,5	5,8	4,5	12,6	8,2	5,3	3,6
LOD (ng/g)	0,21	0,16	0,64	0,30	0,21	0,16	0,64	0,30
Επαναληψιμότητα-RSD (%)	13,3	8,7	5,6	6,7	13,3	8,7	5,6	6,7
Ορθότητα: Ανάκτηση (R _m)	0,925	0,924	0,803	0,715	0,925	0,924	0,803	0,715
Αβεβαιότητα								
Ποσότητα δείγματος	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Βαθμονόμηση	0,0298	0,0417	0,0294	0,0098	0,0298	0,0417	0,0294	0,0098
Ανάκτηση	0,00223	0,0027	0,00282	0,00407	0,00223	0,0027	0,00282	0,00407
Επαναληψιμότητα (για n επαναλήψεις)	0,054	0,035	0,023	0,027	0,054	0,035	0,023	0,027
LOD	0,0106	0,0213	0,11	0,067	0,0167	0,0195	0,121	0,083
Συνδυασμένη αβεβαιότητα	0,062	0,059	0,116	0,073	0,064	0,056	0,126	0,088
Εκτεταμένη αβεβαιότητα (%)	12	12	23	15	13	11	25	18
Αποτέλεσμα								
Συγκέντρωση± U(k=2) (ng/g ιστού)	19,8±2,5	7,5±0,88	5,8±1,3	4,5±0,66	12,6±1,6	8,2±0,95	5,3±1,3	3,6±0,63

Οι τιμές της εκτεταμένης αβεβαιότητας κάθε ένωσης των πινάκων 7.6 έως 7.9 υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που προτάθηκε από τους Konieczka P., (2010) και προστέθηκε ως διασπορά τιμών στη μετρούμενη τιμή της ποσότητας της κάθε ένωσης. Επιπρόσθετα, η εκτεταμένη αβεβαιότητα που περιέλαβε όλες τις πιθανές πηγές αβεβαιότητας της μεθοδολογίας της παρούσας μελέτης προσδιορίστηκε ως % ποσοστό. Οι τιμές αυτές είναι μεγαλύτερες όσο η τιμή μετρούμενης ποσότητας πλησιάζει το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, αφού τότε η αβεβαιότητα είναι ίση με 100% της μετρούμενης τιμής. Οι τιμές αυτές για τα πραγματικά δείγματα της μελέτης ήταν <20% για τις περισσότερες ενώσεις.

Ανάλογες τιμές εκτεταμένης αβεβαιότητας (<21%) αναφέρθηκαν σε μελέτη των Karakas S. Y., (2006) ενώ μεγαλύτερες τιμές (21 % έως 47%) αναφέρθηκαν στη μελέτη των Maroto A., (2001). Και οι δύο αυτές μελέτες προσδιόρισαν την εκτεταμένη αβεβαιότητα της μεθόδου και όχι των πραγματικών δειγμάτων, με διαφορετικό τρόπο η καθεμιά. Όπως συμπεράναν και οι παραπάνω μελέτες, κατά την ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών είναι δικαιολογημένες οι υψηλές τιμές εκτεταμένης αβεβαιότητας και μπορούν να βελτιωθούν με τη βελτίωση της πιστότητας της μεθόδου. Δηλαδή με την αύξηση των επαναλήψεων μέτρησης των μετρούμενων ποσοτήτων.

Παρόλα αυτά η αβεβαιότητα μέτρησης, είτε μεγάλη είτε μικρή πρέπει να συνοδεύει τα αποτελέσματα μιας μέτρησης ώστε να είναι συγκρίσιμα αλλά και να λαμβάνονται υπόψη οι παράγοντες που συμβάλλουν στη διακύμανση της μετρούμενης τιμής. Η χρήση του απλούστερου τρόπου διασποράς τιμών, που είναι η τυπική απόκλιση, δεν απεικονίζει την «περιγραφή» του τελικού αποτελέσματος και έτσι δεν φανερώνει την εικόνα των αλληλεπιδράσεων που σχηματίζουν το τελικό αποτέλεσμα μιας μέτρησης.

7.3 Σύγκριση επιπέδων τιμών των οργανοχλωριωμένων ενώσεων των δειγμάτων ιχθυρών της μελέτης με επίπεδα τιμών ενώσεων σε δείγματα ιχθυρών άλλων μελετών

Πολυάριθμες μελέτες στην επιστημονική βιβλιογραφία έχουν ασχοληθεί με τον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε ιχθυρά (ενδεικτικά: Easton M. D. L., 2002) αφού οι περισσότερες απ' αυτές εφαρμόστηκαν ή εφαρμόζονται σε μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον, είναι λιπόφιλες και συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό των ιχθυρών και χρησιμοποιούνται ως δείκτες ρύπανσης του περιβάλλοντος. Σ' αυτή την παράγραφο θα αναφερθούν επίπεδα τιμών των ενώσεων της μελέτης που αναφέρθηκαν τα τελευταία χρόνια σε ιχθυρά κυρίως από περιοχές δειγματοληψίας της ευρύτερης περιοχής της Μεσογείου.

Οι Christoforidis A. et al. (2008) ερεύνησαν την ύπαρξη των ενώσεων: PCBs, ισομερών HCH, DDT, DDE, DDD και άλλων οργανοχλωριωμένων ενώσεων όπως εξαχλωροβενζόλιο και ενώσεις της κατηγορίας chlordane σε δύο είδη ιχθυρών (*Leuciscus cephalus* και *Barbus cyclolepis*) του ποταμού Νέστου στη Βόρεια Ελλάδα. Η κυρίαρχη ένωση στο μυϊκό ιστό των δειγμάτων ήταν το lindane (0,73 ng/g ιστού) ενώ στο συκώτι των δειγμάτων η ένωση 4,4- DDD (30,71 ng/g ιστού). Αυτές οι ενώσεις ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 90% των δειγμάτων. Οι ενώσεις 4,4- DDT, α -chlordane, γ - chlordane, trans nonachlor βρίσκονταν κάτω του ορίου ανίχνευσης για όλα τα δείγματα ιστών των ιχθυρών. Μεταξύ των PCBs, τα συμπαράγωγα 47, 180, 190 ήταν τα περισσότερο ανιχνεύσιμα.

Οι Turco Lo V. et al. (2007) συνέκριναν τα επίπεδα τιμών συγκέντρωσης οργανοχλωριωμένων ενώσεων και PCBs σε δείγματα λαβρακιού (ελεύθερου και ιχθυοτροφείου) στη Σικελία, Νότια Ιταλία. Οι συγκεντρώσεις DDTs (p,p-DDE, o,p-DDE, p,p-DDD, o,p-DDT, p,p-DDT) και PCBs ήταν υψηλότερες στο λαβράκι ιχθυοτροφείου. Οι συγκεντρώσεις DDTs ήταν γενικά χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις της παρούσας μελέτης αλλά η δειγματοληψία τους πραγματοποιήθηκε μετά την περίοδο αναπαραγωγής του λαβρακιού όπου το περιεχόμενο λίπος στον μυϊκό ιστό είναι μικρότερο άρα και η συσσώρευση οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Οι τιμές DDTs στο ελεύθερο λαβράκι και στο λαβράκι ιχθυοτροφείου ήταν 0,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ και 0,2-1,3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ιστού αντίστοιχα. Οι τιμές συγκέντρωσης PCBs κυμάνθηκαν στα επίπεδα 1,1 έως 1,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ στο ελεύθερο λαβράκι.

Μελέτη για την μέτρηση των επιπέδων τιμών οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε 12 είδη ιχθυρών στη θάλασσα Μαρμαρά στην Τουρκία (Coelhan M. et al., 2006), κατέδειξε συνολικές συγκεντρώσεις από 329,41 έως 1453,87 ng/g λίπους. Η ομάδα των DDTs κατείχε

το 50% και περισσότερο της συνολικής συγκέντρωσης αυτών των ενώσεων κυμαινόμενη από 211,58 έως 810 ng/g λίπους. Για το είδος Κέφαλος, το σύνολο των DDTs ήταν 810 ng/g λίπους, δηλαδή υπερδιπλάσιο από της παρούσας μελέτης (313 ng/g λίπους). Συγκεκριμένα, κατά σειρά τιμών συγκέντρωσης οι ενώσεις κατατάχθηκαν ως εξής: DDTs> PCBs> HCHs>ομάδα κυκλοδιενίων=toxaphene>HCB.

Η μελέτη βιοσυσσώρευσης οργανοχλωριωμένων ενώσεων (PCBs, DDTs, HCBs) στα είδη ιχθυρών κέφαλος (*mugil cephalus*), *mugil barbatus* και λαβράκι (*dicentrarcus labrax*) του ποταμού Έβρου, ανατολικά της Ισπανικής χερσονήσου (Pastor D. et al, 1996) κατέγραψε τα επίπεδα των συγκεντρώσεων την άνοιξη 1992. Οι τιμές συγκέντρωσης των DDTs στον κέφαλο ήταν διπλάσιες (388 έως 840 ng/g λίπους) και στο λαβράκι σημαντικά μεγαλύτερες (454 έως 513 ng/g λίπους) από ότι των ίδιων ειδών στην παρούσα μελέτη. Επιπρόσθετα, μετρήθηκαν σημαντικές συγκεντρώσεις των ενώσεων PCBs και HCBs.

Οι τιμές συγκέντρωσης των ενώσεων της ομάδας DDT βρέθηκαν χαμηλότερες σε λαβράκι που συλλέχθηκε από ανοικτή θαλάσσια περιοχή και ιχθυοτροφεία της Πορτογαλίας (Antunes P. et al., 2004), σε σχέση με την παρούσα μελέτη. Οι συγκεντρώσεις αυτές κυμάνθηκαν από 108 έως 336 ng/g λίπους ενώ κυρίαρχο μέλος της ομάδας ήταν η ένωση 4,4-DDE. Ταυτόχρονα ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις ενώσεων PCBs σε τιμές 155 έως 294 ng/g λίπους.

Η μελέτη των Perugini M. et al. (2004) στην κεντρική Αδριατική θάλασσα στην Ιταλία, κατέδειξε ότι συνολική συγκέντρωση PCBs 1415 ng/g λίπους και οργανοχλωριωμένων ενώσεων 507 ng/g λίπους. Οι μεταβολίτες του DDT, 4,4,-DDE και 4,4,-DDD κατείχαν το υψηλότερο ποσοστό συγκέντρωσης μεταξύ των οργανοχλωριωμένων ενώσεων ενώ η ένωση DDT ανιχνεύθηκε μόνο σε δείγματα μυδιών. Η μελέτη κατέληξε στην συνεισφορά της επίδρασης κάποιων παραγόντων στη συσσώρευση οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Έτσι, φάνηκε: η ικανότητα μεταβολισμού της ένωσης DDT κυρίως σε 4,4,-DDE από ιχθυρά που τρέφονται από το βυθό και βρίσκονται υψηλότερα στην τροφική αλυσίδα και η επίδραση της εποχής δειγματοληψίας στα επίπεδα συγκεντρώσεων.

Παρόλο που το χέλι (*Anguilla anguilla*) έχει υψηλό ποσοστό λίπους (περίπου 26%) και αναμένεται υψηλή συσχέτιση των τιμών συγκέντρωσης PCBs και οργανοχλωριωμένων ενώσεων και ποσοστού λίπους, μελέτη των Ferrante M. C. et al (2010) στον ποταμό Carigliano στην Ιταλία φανέρωσε συσχέτιση των τιμών συγκέντρωσης μόνο με το μέγεθος των δειγμάτων (άρα και την ηλικία). Η ένωση 4,4,-DDE είχε την υψηλότερη συγκέντρωση μεταξύ των οργανοχλωριωμένων ενώσεων ενώ στο 93% των δειγμάτων ανιχνεύθηκε η ένωση

4,4-DDT. Κατά σειρά τιμών συγκέντρωσης, οι ενώσεις κατατάχθηκαν ως εξής: PCBs> DDTs >Dieldrin>HCB.

Πρόσφατη μελέτη στην Τουρκία (Kalyoncu L. et al, 2009), ασχολήθηκε με τη μέτρηση 14 οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε 18 είδη ιχθυρών, ευρείας κατανάλωσης. Όλες οι ενώσεις ανιχνεύθηκαν στα είδη ιχθυρών, με τις ενώσεις της ομάδας DDT να κυριαρχούν σε όλα τα είδη. Μεταξύ των ιχθυρών, εξετάστηκαν τα είδη Κέφαλος (*mugil cephalus*) και Λαβράκι (*dicentrarcus labrax*) στα οποία μετρήθηκαν κυρίως οι ενώσεις: endrin (16,3 ng/g και 9,5 ng/g), Σ_{HCH} (8,8 ng/g και 18,1 ng/g), Σ_{DDT} (38,4 ng/g και 49,3 ng/g) endosulfan I (4.7 ng/g και 5.9 ng/g) και endosulfan II (8,2 ng/g και 17,8 ng/g) για τα δύο είδη αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι οι παραπάνω ενώσεις με εξαίρεση την ομάδα των HCH, ανιχνεύθηκαν και στη δική μας μελέτη αλλά σε μικρότερες ποσότητες για τα αντίστοιχα είδη ιχθυρών.

Η βιοσυσσωρευση των ενώσεων PCBs και DDTs και η συσχέτιση των επιπέδων της ένωσης DDT με το βάθος διαβίωσης και το μεταβολισμό των ιχθυρών καταγράφηκαν στη μελέτη των Storelli M. M. et al (2009) ιχθυρά που ζούν σε μεγάλα βάθη (300 μέτρων). Η ανάλυση δειγμάτων συκωτιού των ιχθυρών κατέγραψε συγκεντρώσεις οργανοχλωριωμένων ενώσεων με τη σειρά επιπέδων ως εξής: PCBs> DDTs >>HCB και η ένωση 4,4-DDE να είναι η επικρατούσα (>90%) μεταξύ της ομάδας των DDTs.

Στα πλαίσια εκτεταμένης μελέτης στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου (Albaiges J., 2005) κατά τη δεκαετία 1995-2005, μετρήθηκαν μεταξύ άλλων τα επίπεδα τιμών συγκέντρωσης ορισμένων POPs σε επιλεγμένα είδη ιχθυρών. Μετρήθηκαν ποσότητες DDTs, HCBs, Endrin, PCBs, PAHs, HCHs, Aldrin, Dieldrin, Heptachlor, Heptachlor epoxide. Οι ενώσεις Endrin και Dieldrin ανιχνεύθηκαν σε τιμές συγκέντρωσης από <0,01 ng/g έως 1,3 ng/g στο είδος κέφαλος (*mugil cephalus*). Για τις υπόλοιπες ενώσεις, οι μετρήσιμες ποσότητες φαίνονται στον πίνακα 7.10.

Πίνακας 7.10 Συγκεντρώσεις (ng/g ιστού) οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε ιχθυρά που συλλέχθηκαν στην ΒΔ Μεσόγειο τη δεκαετία 1995-2005

Είδος Ιχθυού	DDTs (DDT+DDE)	HCBs	PCBs
<i>Mullus sp. (Ligurian sea)*</i>	17-82	0,2-1,5	41-147
<i>Mullus sp. (Catalan sea)</i>	4,4-16,8	1,6-6,7	8,7-20,3
<i>Dicentrarchus sp.</i>	2,6-4,0	0,6-0,8	4,4-6,2
<i>Lepidorombus sp.</i>	0,8±0,2	-	2,1±0,3
<i>Phycis sp.</i>	0,4±0,1	-	1,0±0,2
<i>Lepidion sp.</i>	6,0-7,1	0,14-0,17	8,3-9,4
<i>Coryphaenoides sp.</i>	1,9-4,3	0,25-0,67	2,5-4,6
<i>Bathypterois sp.</i>	5,0-10,2	0,12-0,25	6,0-10,0
<i>Mora moro</i>	7,4-12,6	-	9,0-16,2

* επί ξηρού βάρους ιστού

7.4 Συμπεράσματα

Η βελτιστοποιημένη μεθοδολογία εκχύλισης MSPD εφαρμόστηκε μετά την επικύρωσή της σε δύο υδάτινες περιοχές του νομού Αιτωλοακαρνανίας (Ελλάδα): στη λιμνοθάλασσα Αιτωλικού και στη λίμνη Τριχωνίδα. Είναι η πρώτη φορά που μελετάται η ύπαρξη υπολειμμάτων οργανοχλωριωμένων ενώσεων στα ιχθυρά των περιοχών αυτών. Από κάθε περιοχή συλλέξαμε για έξι μήνες τρία ξεχωριστά δείγματα ιχθυρών κάθε είδους ακολουθώντας τη διαδικασία δειγματοληψίας της EPA που χρησιμοποιείται για μελέτες ελέγχου τιμών ρύπων σε ιχθυρά. Η διαδικασία αυτή απαιτεί μεταξύ άλλων την επιλογή δύο ειδών ιχθυρών από μια περιοχή όπου το ένα είδος να είναι αρπακτικό και το άλλο να τρέφεται από το βυθό. Έτσι, επιλέχθηκαν τα είδη ιχθυρών της παρούσας μελέτης (κεφάλαιο 5).

Από τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνεται ότι οι ενώσεις που ανιχνεύονται σε σημαντικές τιμές συγκέντρωσης σε όλα τα δείγματα ιχθυρών είναι: 4,4-DDE, (83%), endosulfan I (74%), 4,4-DDD (57%), endrin (39%), endosulfan II (30%) (σχήμα 7.2). Οι ενώσεις 4,4-DDE και 4,4-DDD αποτελούν μεταβολίτες του 4,4-DDT. Το έτος 1995, το εντομοκτόνο DDT είχε απαγορευτεί σε 59 χώρες, είχε περιοριστεί η χρήση του σε 20 χώρες ενώ δεν απαγορευόταν η χρήση του σε 13 χώρες (Li and Bidleman, 2003b). Πολλές μελέτες (ενότητα 7.3) αναφέρουν ότι η ένωση 4,4-DDT δεν ανιχνεύεται ή ανιχνεύεται σε συγκέντρωση κοντά στα όρια ανίχνευσης των αναλυτικών οργάνων ενώ οι μεταβολίτες του είναι σημαντικά παρόντες σε δείγματα ιχθυρών στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου αλλά και παγκοσμίως.

Στην παρούσα μελέτη, οι ενώσεις αυτές μετρήθηκαν συνολικά σε συγκέντρωση κάτω του νομίμου ορίου (MRL, maximum residue limit / αναφέρεται στο παράρτημα Δ) της Ευρωπαϊκής ένωσης με εξαίρεση το άθροισμα υπολειμμάτων 4,4-DDE και 4,4-DDD στο είδος Γλανίδι. Στα είδη ιχθυρών της λίμνης μετρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές και μεταξύ ειδών στα αρπακτικά είδη. Οι λίμνες εμφανίζουν μειωμένη εισροή-εκροή υδάτων σε σχέση με τη θάλασσα και συνυπολογίζοντας τη μικρή τάση εξάτμισης των μεταβολιτών από τις υδάτινες επιφάνειες και την παραμονή τους στο ίζημα (μικρές τιμές τάσης ατμών και μεγάλες τιμές K_{OC}) είναι δυνατόν να εξηγηθούν οι υψηλές τιμές τους στα ιχθυρά της λίμνης. Ακόμα, οι υψηλές τιμές K_{OW} των μεταβολιτών αυτών, οφείλονται για τη συσσώρευση τους στα αρπακτικά είδη ιχθυρών. Ανάλογα επίπεδα τιμών μετρήθηκαν και από μελέτες της περιοχής Μεσογείου (ενότητα 7.3). Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι παρόλο που η χρήση DDT απαγορεύτηκε επίσημα τη δεκαετία 1980 στην Ελλάδα, οι μεταβολίτες του εξακολουθούν να μετρούνται σε υψηλές τιμές συγκέντρωσης εξαιτίας των χημικών ιδιοτήτων τους αλλά και

της χρήσης DDT σε άλλες χώρες του κόσμου. Είναι γι' αυτό απαραίτητες οι μελέτες ελέγχου της παρουσίας των ενώσεων αυτών για τον έλεγχο της δημόσιας υγείας. Η παρούσα μελέτη όμως δε μπορεί να προχωρήσει σε λεπτομερή ανάλυση των αιτιών βιοσυσσώρευσης των ενώσεων αυτών αφού αυτή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως περιεχόμενο λίπος ιστού, διατροφή και τόπος διαβίωσης ιχθυού, μεταβολισμός, ρυθμός ανάπτυξης, κ.α., αφού δεν ήταν αντικείμενό της.

Μετρήθηκαν επίσης τιμές συγκέντρωσης των ισομερών endosulfan και του μεταβολίτη endosulfan sulfate. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από πρόσφατους ψεκασμούς καλλιεργειών στις παράκτιες περιοχές αφού το εμπορικό προϊόν αυτών χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα σε μεγάλες ποσότητες και εξατμίζεται γρήγορα και σε μεγάλες ποσότητες από τις επιφάνειες των φυτών και το έδαφος. Η πρόσληψή τους από τα ιχθυρά γίνεται μέσω του νερού και του ιζήματος (σχετικές μελέτες – κεφάλαιο 7- το αποδεικνύουν) γεγονός που αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα της μελέτης. Οι υψηλές ποσότητες που μετρήθηκαν, για κάποιους μήνες δειγματοληψίας, είναι ένδειξη της μεταφοράς τους στην ατμόσφαιρα των τοπικών περιοχών, της ανεξέλεγκτης ίσως χρήσης τους και της πρόσληψής τους από τους υδρόβιους οργανισμούς. Η Ευρωπαϊκή ένωση απαγόρευσε από 1/1/2008 την έγκριση αδειών και χρήση σκευασμάτων που περιέχουν endosulfan ως δραστική ουσία.

Η παρούσα μελέτη δε φανέρωσε συγκεντρώσεις πολυχλωριομένων διφαινυλίων στις περιοχές δειγματοληψίας ως αποτέλεσμα πιθανότατα της απουσίας πρωτογενούς βιομηχανικής παραγωγής σε αντίθεση με μελέτες από άλλες περιοχές της Μεσογείου όπου μετρήθηκαν σημαντικές ποσότητες PCBs (ενότητα 7.3)

Ε. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η διαδικασία ανάπτυξης μιας πολυπολειμματικής μεθοδολογίας εκχύλισης οργανοχλωριωμένων ενώσεων από ιχθυρά περιγράφηκε και αναλύθηκε στο 6^ο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής. Πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη με τη χρήση κλασσικών και χημειομετρικών μεθόδων και σύγκριση βάσει μελετών επικύρωσης δύο μεθόδων βελτιστοποίησης της μεθοδολογίας εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD) βάσει μελετών επικύρωσης. Ο υπολογισμός της αβεβαιότητας μέτρησης που προέρχεται από την ορθότητα της μεθόδου αποτελεί σημαντικό κριτήριο ποιότητας και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση ύπαρξης σημαντικού συστηματικού αναλυτικού σφάλματος. Η βελτιστοποιημένη αναλυτική μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα ιχθυρών φυσικών αποδεκτών του νομού Αιτωλοακαρνανίας (Ελλάδα) προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα τιμών των μελετώμενων οργανικών ρύπων.

Συμπερασματικά, η πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής κατέληξε στα εξής:

- Η εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων (παραγοντικοί σχεδιασμοί, τεχνητά νευρωνικά δίκτυα) για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθοδολογίας παρέχει μια πλήρη και ολοκληρωμένη πορεία βελτιστοποίησης που μπορεί να συμπεριλάβει όλους τους πιθανούς παράγοντες που επιδρούν στην απόδοση της μεθόδου καθώς και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Η πορεία βελτιστοποίησης υλοποιείται με σημαντικά μειωμένο αριθμό επιμέρους πειραματικών πορειών και επομένως μειωμένο συνολικό κόστος ανάλυσης χωρίς οποιαδήποτε μείωση της αξιοπιστίας της μεθόδου.
- Η εφαρμογή παραγοντικών σχεδιασμών διερευνά και επιλέγει τους παράγοντες που συνεισφέρουν σημαντικά στην απόδοση της ανάλυσης και προσδιορίζει τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις ώστε να παρέχει ένα πλαίσιο μελετώμενων παραγόντων για την εύρεση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών. Έτσι, στη μεθοδολογία εκχύλισης MSPD που αναπτύχθηκε οι παράγοντες που συνεισφέρουν σημαντικά είναι: το υλικό διασποράς του υποστρώματος, η αναλογία δείγμα ανάλυσης : υλικό διασποράς, το μίγμα διαλυτών έκλουσης των αναλυτέων ενώσεων και το στερεό υλικό καθαρισμού του εκχυλίσματος.
- Οι βέλτιστες συνθήκες της αναλυτικής μεθοδολογίας προσδιορίστηκαν με τη χρήση τεχνητών νευρωνικών δικτύων αντί των κλασσικών διαδικασιών. Έτσι, δεν απαιτείται η γνώση συναρτήσεων της μορφής $y=f(x)$, όπου y : η απόκριση και x : οι μελετώμενοι

παράγοντες ενώ επιτυγχάνεται προσδιορισμός οποιασδήποτε (γραμμικής και μη-γραμμικής) σχέσης απόκρισης-παραγόντων. Τα ΤΝΔ προσομοιώνουν επιτυχώς πειραματικά δεδομένα με τεχνητά δίκτυα και προσδιορίζουν τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες.

- Παραγοντικοί σχεδιασμοί εφαρμόζονται για τον κατάλληλο προσδιορισμό της αβεβαιότητας μέτρησης που προέρχεται από την ορθότητα της μεθόδου. Έτσι, υπολογίζεται η αβεβαιότητα της ανάκτησης ή αβεβαιότητα της μεθόδου, εφόσον οι μελετώμενοι παράγοντες είναι αντιπροσωπευτικοί των πραγματικών δειγμάτων ανάλυσης. Επιπρόσθετα, γίνεται εκτίμηση της ύπαρξης συστηματικού σφάλματος ώστε να εφαρμοστεί ή όχι διορθωτικός παράγοντας στην ανάκτηση της μεθόδου. Η συνολική μελέτη αβεβαιότητας πραγματοποιείται κατά τη μελέτη επικύρωσης και δεν απαιτεί πρόσθετες ενέργειες.
- Η αναλυτική μεθοδολογία που αναπτύχθηκε μπορεί να εφαρμοστεί σε ψάρια κάθε είδους θαλάσσιων ή λιμναίων αποδεκτών για τον προσδιορισμό των επιπέδων τιμών των οργανοχλωριωμένων ενώσεων της μελέτης. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη προσδιορισμού υπολειμμάτων των αναλυτέων ενώσεων στις συγκεκριμένες περιοχές εφαρμογής.
- Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των ενώσεων που μετρήθηκαν ήταν των: 4,4-DDE και 4,4-DDD στα αρπακτικά ψάρια και στα ψάρια της λίμνης Τριχωνίδας ενώ μετρήθηκαν υπολείμματα της ένωσης Endosulfan μετά την επίσημη απαγόρευσή του.
- Οι πηγές προέλευσης των τοξικών οργανοχλωριωμένων ενώσεων στους αποδέκτες φαίνεται να είναι περισσότερο η αγροκαλλιέργεια και όχι η βιομηχανική δραστηριότητα.
- Ο προσδιορισμός της αβεβαιότητας των αποτελεσμάτων ανάλυσης πραγματικών δειγμάτων συμβάλλει στην καλύτερη προσέγγιση της πραγματικής τιμής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aguilar C., Penalver A., Pocurull E., Ferre J., Borrull F., Marce R. M., "Optimization of solid phase microextraction conditions using a response surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron capture detection", *J. Chromatography A*, 844 (1999) 425-432

Ahmed E. Farid, "Analysis of pesticides and their metabolites in food and drinks", *Trends in analytical chemistry* 20(11) (2001) 649-661.

Ahmed E. Farid, "Analysis of polychlorinated biphenyls in food products", *Trends in analytical chemistry* 22(3) (2003) 170-185.

Albaiges Joan, "Persistent Organic Pollutants in the Mediterranean Sea", *Hdb Env Chem* 5, Part K (2005) 89-149

Albero B., Sanchez-Brunete C., Tadeo J. L., "Determination of endosulfan isomers and endosulfan sulfate in tomato juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography", *J. Chromatography A*, 1007 (2003) 137-143

Antunes P., Gil O., "PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria de Aveiro, Portugal", *Chemosphere* 54 (2004) 1503-1507

Araujo P. W., Brereton R. G., "Experimental design I. Screening", *Trends in analytical chemistry*, 15 (1) (1996) 26-31

Araujo P. W., Brereton R. G., "Experimental design II. Optimization", *Trends in analytical chemistry*, 15 (2) (1996) 63-70

Araujo P. W., Brereton R. G., "Experimental design III. Quantification", *Trends in analytical chemistry*, 15 (3) (1996) 156-163

Balinova, A., "Strategies for chromatographic analysis of pesticides residues in water", *J. Chromatography A* 754 (1996) 125-135

Barcelo D., "Sample handling and trace analysis of pollutants: techniques, applications and quality assurance", (2000) 1st edition, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands

Barker S. A., "Matrix solid-phase dispersion" Review, *J. Chromatography A* 885 (2000) 115-127.

Barker S.A., Long A.R., Short C.R., "Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion", *J. Chromatography* 475 (1989) 353.

Barwick, V.J. and Ellison, S.L.R. "The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies Part I: Description of a laboratory protocol", *Accred Qual Assur*, 5, (2000) 47-53

Borja J., Taleon D. M., Auresenia J., Gallardo S. «Polychlorinated biphenyls and their biodegradation», *Process Biochemistry* 40 (2005) 1999-2013

Boti V. I., Sakkas V. A., Albanis T. A., "An experimental design approach employing artificial neural networks for the determination of potential endocrine disruptors in food using matrix solid-phase dispersion", *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 1296–1304.

Boti V. I., Sakkas V. A., Albanis T. A., "Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples Part I: Ultrasonic extraction from diverse sediment matrices", *Journal of Chromatography A*, 1146 (2007) 139–147.

Boti V. I., Sakkas V. A., Albanis T. A., "Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples Part II: Solid-phase extraction from environmental natural waters", *Journal of Chromatography A*, 1146 (2007) 148-156

Brereton, R.G., *Introduction to chemometrics*, Centre for Chemometrics, University of Bristol, United Kingdom.

Capriotti Anna Laura, Chiara Cavaliere, Piero Giansanti, Riccardo Gubbiotti, Roberto Samperi, Aldo Lagana, “Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction”, *J. Chromatography A* 1217 (2010) 2521-2532

Carro A.M., Lorenzo R.A., Fernandez F., Rodil R., Cela R., “Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry”, *J. Chromatography A* 1071 (2005) 93-98

CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment, 2001, “Canadian tissue guidelines for the protection of wildlife consumers of aquatic biota: summary table”. Updated in: Canadian Environmental Quality Guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg

Christoforidis A., Stamatis N., Schmieder K., Tsachalidis E., “Organochlorine and mercury contamination in fish tissues from the River Nestos, Greece”, *Chemosphere* 70 (2008) 694–702

CITAC/Eurachem Guide (2002): Guide to quality in analytical chemistry-An aid to Accreditation. Available from: <http://www.Eurachem.bam.de>

Coelhan M., Strohmeier J., Barlas H., “Organochlorine levels in edible fish from the Marmara Sea, Turkey”, *Environment International* 32 (2006) 775–780

Colin Baird, Cann Michael (2005), *Environmental chemistry* 3rd edition, W.H.Freeman and company Ltd, New York.

Cooper K., (1991), “Effects of pesticides in wildlife. In: Hayes, W.J., Lawes, E.R. (Eds.), *Handbook of pesticide Toxicology*. Academic Press, San Diego.

Criado Ramil M., Fernandez Hernanz D., Pereiro Rodriguez I., Cela Torrijos R., “Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of polychlorinated biphenyls in fat by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection”, *J. Chromatography A*, 1056 (2004) 187-194

Easton M. D. L., Luszniak D., Vov de Geest E., “Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed”, *Chemosphere* 46 (2002) 1053-1074

Economou A. N., Daoulas C., Psarras T., Barbieri-Tseliki R., “Freshwater larval fish from Trichonis (Greece)”, *L. Fish Biol.* 45 (1994) 17-35

EEC-European Economic Community (1976). Council directive 76/769. Official Journal N. L 262, 27/9/1976

EEC-European Economic Community (1985). Council directive 85/467. Official Journal N. L 269, 11/10/1985

Ellison S. L. R., Rosslein M., Williams A., EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd edition, 2000.

Erdogrul O., Covaci A., Schepens P., “Levels of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish species from Kahramanmaras, Turkey”, *Environment International* 31 (2005) 703-711

European commission, Directive 96/46/EC, Off. J. Eur. Commun., No. L 214, 23.08.1996, 18 (1996).

European commission, Guidance document on residue analytical methods, SANCO/825/00/rev. 6, 20.06.00 European commission, Brussels (2000).

European mountain lake fish through multivariate analysis (PCA and PLS)”, *Science of the total Environment* 404 (2008)148-161

Feinberg M. H., Ducauze C. J., “Techniques in chemometrical modeling for micro-pollutants assessment”, *Fresenius J. Anal Chem* 339 (1991) 604-607

Ferrante M. C., Clausi M. T., Meli R., Fusco G., Naccari C., Lucisano A., “Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy)”, *Chemosphere* 78 (2010) 709–716

Garcia S. F., Sanchez M. J., Delgado M. A. R., “Optimization of the separation of a group of triazine herbicides by micellar electrophoresis using experimental design and artificial neural networks”, *Electrophoresis*, 25 (2004) 1042-1050

Guidance for Assessing Chemical Contaminant: Data for Use in Fish Advisories, Volume 1: Fish Sampling and Analysis, Third Edition, Environmental Protection Agency (EPA) 823-B-00-007, November 2000.

Haesselbarth W., “Accounting for bias in measurement uncertainty estimation”, *Accred Qual Assur* 9 (2004) 509-514

Hamilton Denis and Crossley Stephen, “Pesticide residues in food and drinking water: human exposures and risks”, John Wiley & sons, Ltd, England, 2004.

Hanrahan G., Zhu J., Gibani S., Patil D. G., “Experimental design”, *Chemometrics and Statistics*” (2005), Elsevier ltd.

Hayo M.G. van der Werf, «Assessing the impact of pesticides on the environment», *Agriculture, Ecosystems and Environment* 60 (1996) 81-96

Hibbert D. B., “Method validation of modern analytical techniques”, *Accred Qual Assur*, 4 (1999) 352-356

Hong J., Kim H-Y., Kim D-G., Seo J., Kim K-J., “Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry”, *J. Chromatography A*, 1038 (2004) 27-35

Hu Y. Y., Zheng P., He Y. Z., Sheng G-P., “Response surface optimization for determination of pesticide multiresidues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography”, *J. Chromatography A* 1098 (2005) 188-193

Huitao L., Keati W., Hongping X., Xingguo C., Zhide H., “Application of experimental design and artificial neural networks to separation and determination of active components in traditional Chinese medicinal preparations by capillary electrophoresis”, *Chromatographia* 55 (2002) 579-583

Inouye L. S., Lotufo G. R., “Comparison of macro-gravimetric and micro-colorimetric lipid determination methods”, *Talanta* 70 (2006) 584-587.

International Standards Organization, GUM: Guide to the expression of uncertainty in measurement, ISO, Geneva, Switzerland, 1999.

IPCS (1995), “The International Programme on Chemical Safety”, L. Ritter, K.R. Solomon, J. Forget, M. Stemeroff and C. O’Leary, PCS/95.39

ISO (1994), “Accuracy (trueness and prediction) of measurement methods and results”, ISO 5724, Geneva.

IUPAC ιστοσελίδα : <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>

Iwata, H., S. Tanabe, H. Sakai, and R. Tasukawa, “ Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate “, *Environmental Science and Technology*, 27 (1993) 1080-1098.

Kalyoncu L., Agca I., Aktumsek A., "Some organochlorine pesticide residues in fish species in Konya, Turkey", *Chemosphere* 74 (2009) 885-889

Karakas S. Y. "Validation and uncertainty assessment of rapid extraction and clean-up methods for the determination of 16 organochlorine pesticide residues in vegetables", *Analytica Chimica Acta* 571 (2006) 298-307

Kataoka, H., "New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 232-243.

Konieczka P., Namiesnik J., "Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques", *J. Chromatography A*, 1217 (2010) 882-891.

Kristenson E. Maria, Lourdes Ramos, Udo A. Th. Brinkman "Recent advances in matrix solid-phase dispersion", *Trends in analytical chemistry* 25(2) (2006) 96-111.

Lambropoulou D. A., Sakkas V. A, Hela D. G., Albanis T. A., "Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas River (N.W. Greece)", *Journal of Chromatography A*, 963 (2002) 107–116

Lambropoulou D. A. & Albanis T. A. "Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review", *Anal Bioanal Chem* (2007) 389:1663–1683

Lambropoulou D. A., Konstantinou I. K., Albanis T. A. "Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices" *Journal of Chromatography A*, 1152 (2007) 70–96

Lasrado J. A., Santerre C. R., Stahl J. R., Noltemeyer T., Deardorff D., "Measurement of polychlorinated biphenyls in fish tissue by gas chromatography with electron capture detection and enzyme-linked immunosorbent assay", *J. food protection* 67 (6) (2004) 1209-1213

Lee W. Philip (2003) "Handbook of residue analytical methods for agrochemicals", John Wiley & Sons, England

Lehotay J. Steven "Application of gas chromatography in food analysis", Trends in analytical chemistry, 21 (9+10) (2002) 686-697

Leonardos I., Kagalou I., Triantafyllidis A., "Threatened fishes of the world: *Silurus aristotelis* (Agassiz 1856) (Siluridae)", Environmental Biology of Fishes 78 (2007) 285-286

Li Y. F., Macdonald R. W., "Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: a review", Science of the Total Environment 342 (2005) 87-106

Ling Y. C., Chang M. Y., Huang I. P., "Matrix solid phase dispersion extraction and gas chromatographic screening of polychlorinated biphenyls in fish", J. Chromatography A 669 (1994) 119-124

Ling Y. C., Huang I. P., "Multiresidue-Matrix solid phase dispersion method for determining 16 organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in fish", Chromatographia 40 (1995)

Ling Y. C., Huang I. P., "Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection", J. Chromatography A, 695 (1995) 75-82

Manirakiza P., Covaci A., Schepens P., "Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh&Dyer and modified Bligh&Dyer extraction methods", J. of Food Composition and Analysis, 14 (2001) 93-100

Maroto A., Boque R., Riu J., Rius F. X., "Should non-significant bias be included in the uncertainty budget?", Accred Qual Assur 7 (2002) 90-94

Maroto A., Ricard Boqué, Jordi Riu, F. Xavier Rius, “Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays”, *Analytica Chimica Acta* 440, (2001) 171–184.

Maroto Alicia, Ricard Boqué, Jordi Riu, F. Xavier Rius “Evaluating uncertainty in routine analysis”, *Trends in analytical chemistry*, 18 (9+10) (1999) 577-584.

Martinez A., Ramil M., Montes R., Hernanz D., Rubi E., Rodriguez I., Cela Torrijos R., “Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron-capture detection”, *J. Chromatography A*, 1072 (2005) 83-91

McNair H. M. and Miller J. M., “Basic Gas Chromatography” (1997), John Wiley & sons, INC, Canada

Menzie, C.A. (2003), “Using weight of evidence approaches fro sediment management, Chemical stability workshop, Menzie-Cura & Associates, Inc.”, San Diego

Meyer V. R., “Measurement uncertainty”, *J. Chromatography A*, 1158 (2007) 15-24

Miller J.N., Miller J.C. (2005) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 5th edition, Pearson ltd, England.

Muir D., Sverko Ed, “Analytical methods for PCBs and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: a critical appraisal”, *Anal Bioanal Chem* 386 (2006) 769-789

Nardelli V., Palermo C., Centonze D., “Rapid myltiresidue extraction method of organochlorinated pesticides from fish feed”, *J. Chromatography A*, 1034 (2004) 33-40

Papadopoulos A., Vassiliadou I., Costopoulou D., Papanicolaou C., Leondiadis L., “Levels of dioxins and dioxin-like PCBs in food samples on the Greek market”, *Chemosphere* 57 (2004) 413-419

Pastor D., Boix J., Fernandez V., Albaiges J. "Bioaccumulation of organochlorinated contaminants in three estuarine fish species (*Mullus barbatus*, *Mugil cephalus*, *Dicentrarchus labrax*), *Marine Pollution Bulletin*, 32 (1996) 257-262

Pena A., Ruano F., Mingorance M. D., "Ultrasound-assisted extraction of pesticides from olive branches: a multifactorial approach to method development", *Anal Bioanal Chem* 385 (2006) 918-925

Pensado L., Casais M. C., Mejuto M. C., Cela R., "Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples", *J. Chromatography A* 1077 (2005) 103-109

Perugini M., Cavaliere M., Giammarino A., Mazzone P., Olivieri V., Amorena M., "Levels of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some edible marine organisms from the Central Adriatic Sea", *Chemosphere* 57 (2004) 391-400

Peterson SM, Batley GE "The fate of endosulfan in aquatic ecosystems", *Environ Pollut*

Rajendran, N., V.K. Venugopalan, "Bioconcentration of Endosulfan in different body tissues of estuarine organisms under sublethal exposure", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46(1), (1991) 151-158

Risebrough R. W., De Lappe B. W., Schmidt T. T., "Bioaccumulation factors of chlorinated hydrocarbons between mussels and seawater", *Marine Pollution Bulletin*, 7 (1976b) 225-228

Ruedel H. "Volatilisation of pesticides from soil and plant surfaces", *Chemosphere* 35 (1997)

Santos F. J., Galceran M. T., "The application of gas chromatography to environmental analysis", *Trends in analytical chemistry*, 21 (9+10) (2002) 672-685

Schimmel, S.C et al. "Acute toxicity to and bioconcentration of endosulfan in estuarine animals. In: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, edited by F.L. Mayer, J.L. Hamelink, 1st Symp. ASTM STP 634, Philadelphia (PA), (1977) 241-252

Smedes F. and Thomasen T. K., "Evaluation of the Bligh and Dyer lipid determination method", Marine Pollution Bulletin, 32 (8/9) (1996) 681-688

Smith A. G., Gangolli S. D., "Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns", Food and Toxicology, 40 (2002) 767-779

Spack, L. (2002), "Introduction of the measurement uncertainty concept in Nestle laboratories", NRC Nestle Research Center.

Storelli M. M., Losada S., Marcotrigiano G.O., Roosens L., Barone G., Neels H., Covaci A., "Polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide contamination signatures in deep-sea fish from the Mediterranean Sea", Environmental Research 109 (2009) 851–856

Sun L., Lee H. K., "Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology", J. Chromatography A, 1014 (2003) 165-177

Taverniers I. , Marc de Loose, Erik van Bockstaele, "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance", Trends in analytical chemistry 23 (8) (2004) 535-552

Taverniers I., Erik van Bockstaele, Marc de Loose, "Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results", Trends in analytical chemistry 23 (7) (2004) 480-490

Thompson M., Ellison S. L. R., Fajgelj, A., Willetts P., Wood R., "Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement", Pure & Appl. Chem, 71 (2) (1999) 337-348

Toledo MCF, Jonsson CM, “Bioaccumulation and elimination of endosulfan in Zebra Fish
Trepát-Pere E., Olivella L., Ginebreda A., Caixach J., Tauler R., “Chemometrics modeling of
organic contaminants in fish and sediment river samples”, *Science of the total Environment*
371 (2006) 223-237

Turco V. Lo, Bella G. Di, Pera L. La, Conte F., Macrí B., Dugo G. mo, “Organochlorine
pesticides and polychlorinated biphenyl residues in reared and wild *Dicentrarchus labrax* from
the Mediterranean Sea (Sicily, Italy), *Environ Monit Assess* (2007) 132:411–417

U.S. Department of Health and Human Services (2000) / public health service, agency for
toxic substances and disease registry, “Toxicological profile for endosulfan”, Atlanta G.A.,
USA.

UNEP (2001), “Final act of the conference of plenipotentiaries on the Stockholm Convention
on Persistent Organic Pollutants, United Nations, Environment Programme, Geneva,
Switzerland.

United States Environmental Protection Agency (US EPA), 1989 “Environmental fate and
effects division, Pesticide environmental fate one line summary: DDT (p,p), Washington, DC

Vassilopoulou V., Georgakopoulos-Gregoriades E., “Factors influencing the uptake of PCBs
and DDTs in red mullet (*Mullus barbatus*) from Pagassitikos Gulf, Central Greece”, *Marine
Pollution Bulletin* 26 (1993) 285-287

Weber J., Halsall C. J., Muir D., Teixeira C., Small J., Solomon K., Hermanson M., Hung H.,
Bidleman T., “Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and
occurrence in the Arctic”, *Science of the Total Environment* 408 (2010) 2966–2984

WHO (1989), “Environmental Health Criteria 83: “DDT and its derivatives environmental
effects”, World Health Organization, Geneva

WHO (1992), “Environmental Health Criteria 130: Endrin”, World Health Organization,
Geneva

WHO (2003), "Health risks of persistent organic pollutants from long range transboundary air pollution-Joint WHO/Concentration task force on the health aspects of air pollution", World Health Organization, Geneva

WHO (2003b), "Polychlorinated biphenyls: Human health aspects", Concise International Chemical Assessment Document 55, World Health Organization, Geneva

Wikipedia (the free encyclopedia), Chemometrics (<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemometrics>)

Wood Roger "How to validate analytical methods", Trends in analytical chemistry, 18 (9+10) (1999) 624-632

Zhao M., Wielen F., Voogt P., "Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkylophenol ethoxylates in biological tissues", J. Chromatography A, 837 (1999) 129-138

Zoonen P., Ronald Hoogerbrugge, Steven M. Gort, Henk J. van Wiel, Henk A. van't Klooster (1999), "Some practical examples of method validation in the analytical laboratory", Trends in analytical chemistry 18 (9+10) (1999) 584-593

Αγατζίνη-Λεονάρδου, Σ., Χρήση του παραγοντικού σχεδιασμού στο μεταλλουργικό πειραματισμό, Μεταλλειολογικά-Μεταλλουργικά Χρονικά, **54** (1983) 51-54

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος (1999), Ρύπανση και τεχνολογία προστασίας περιβάλλοντος, β' έκδοση, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Δεληγιαννάκης Ιωάννης-Δήμητρα Χελά (2003), "Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση", Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Εγκύκλιος ΥΠΑΑΤ 16-2-2006 (ΕΕ L 259 της 13.10.2000, σ. 27).

Ζιώγας Β. Ν. και Μαρκόγλου Α. Ν. (2010) «Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί δράσης & Χρήσεις των Φυτοπρ. Προϊόντων», Β΄ έκδοση.

Καραγιάννης, Μ.Ι. (1987) Επεξεργασία, αξιολόγηση και παρουσίαση αναλυτικών δεδομένων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ελλάδα

Κωνσταντίνου Ιωάννης (2005), “Εργαλεία Πιστοποίησης Γνησιότητας-Ποιότητας ΙΙ (Χημική μετρολογία, Η ποιότητα της μέτρησης στο εργαστηριακό περιβάλλον, Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων)”, Σημειώσεις ΠΜΣ «Πιστοποίηση Αγροτικών Προϊόντων Ποιότητας», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Αγρίνιο

Λυκοθανάσης Σ., Γεωργόπουλος Ε. (2003), “Βασικές αρχές νευρωνικών δικτύων-Ηλεκτρονικές εκπαιδευτικές σημειώσεις”, Τμήμα μηχανικών Η/Υ & Πληροφορικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα, Ελλάδα.

Σαρηγιανίδου Ευα-Μαρία (2008) «Προσδιορισμός υπολειμμάτων οργανικών μικρορυπαντών σε επιφανειακά νερά και ιζήματα στη λιμνοθάλασσα Αιτωλικού», Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Αγρίνιο

Σπύρου, Σ. (1997), “Ανάπτυξη αλγορίθμων εξομοίωσης, ενδεικτική εφαρμογή OCR: Νευρωνικά δίκτυα ευθείας τροφοδότησης με ανάστροφη διάδοση σφάλματος, Εισηγητής: Λεβέντης Σ. Κ., ΤΕΙ Πειραιά-ReLAB

Χελά Δ. Γ., (1999), «Προσδιορισμός και μεταφορά υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα επιφανειακά ύδατα και ιζήματα: Μελέτη του υδατικού συστήματος Λούρου ποταμού-Αμβρακικού κόλπου», Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ (Summary)

Development and application of a method controlling organic toxic compounds in fish

Thesis
Papadopoulos Vasilios (Chemist)

Organic toxic compounds found in the environment from human activity are pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, persistent organic pollutants, organic solvents and others. In this thesis, the selection of the toxic compounds was based on their toxicity, persistence and frequency in the environment, especially in fish organisms. Among them, the following compounds: aldrin, endrin, dieldrin, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, α -chlordane, γ -chlordane, 4,4-DDE, 4,4- DDD, endrin aldehyde, heptachlor, heptachlor epoxide, endrin ketone and methoxychlor were selected as members of the dirty dozen of compounds as defined under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). The use of compounds endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulfate has stopped since 2008 from E.U directive (2005) as susceptible for toxicity and bioaccumulation, as the above mentioned POPs. Among polychlorinated biphenyls (PCBs), PCBs congeners 28, 52, 101, 138, 153, 180 and 209 were also selected as a representative group of the overall PCBs congeners.

Matrix solid phase dispersion (MSPD) was used for the extraction of all the above analytes from fish matrices. This process extracts different kinds of compounds from solid, semi-solid and liquid matrices using solid-phase materials. MSPD is a simple preparation method that comprises sample homogenization, cellular disruption, fractionation, and purification in a single process. In the performance of MSPD, the analytes recoveries and matrix cleanup depend on several parameters such as the solid support and the bound phase, the nature of the sample matrix, the sample to solid support ratio, the solvent elution sequence performed, as well as the use of matrix modifiers. The influence of the main factors on the

extraction process yield was thoroughly evaluated. In order to maximize the extraction yield, we develop an analytical methodology with two optimization methods: the classical approach for an experiment involving factors named “one-factor-at-a-time strategy” and an alternative experimental arrangement named “factorial experiment”. In the step-by step approach, one experimental parameter is regularly changed within an interval of interest while other parameters are kept constant. This classic approximation methodology may not be efficient enough to reach true optimal conditions because a local optimum instead of a global one may be found. Using factorial experiments, the levels of a given factor are combined with all levels of every other factor in the experiment. In these cases the factorial will give a combination of variables near the maximum in contrast to the one-factor-at-a-time procedure.

From the first optimization method, the maximum yield is achieved through the below optimum conditions of target analytes extraction: the dispersant C-18 100% (2g) mixed with the sample matrix at a ratio of 1:2, extracted with 50% dichloromethane : 50% hexane elution solvent (15mL) since the clean up material is 100% florisil (2g). The recovery at 50 ng/g spiking level was ranged from 55% to 114%, the limits of detection and quantification from 0.3 to 1.0 (ng/g) and from 1.0 to 3.3 (ng/g) respectively. Repeatability of the method ranged from 4.3 to 20.2 (% RSD) and reproducibility of the method ranged from 2.0 to 19.6 (% RSD). The correlation coefficient, r^2 value, was above or equal to 0.996.

Multivariable approach successfully overcomes the limitation of the classical method thus the probability of global optimum finding is much higher. Experimental design methods allow the experimenter to understand better and evaluate the factors that influence a particular system (e.g. extraction method) by means of statistical approaches. Such approaches combine theoretical knowledge of experimental designs and a working knowledge of the particular factors to be studied. A $3^{(4-1)}$ fractional factorial design was developed to optimize the factors related to the extraction procedure to assure quantitative simultaneous extraction of the target analytes. Thus, all the variables were being changed at the same time according to the multivariable approach. These factors were: the dispersant, the sample to dispersant ratio, the elution solvent and cleaning up material for the column chromatography. The experimental data of $3^{(4-1)}$ fractional factorial design were treated for modeling using artificial neural networks (ANNs). In general, compared with classical statistical optimization techniques, such as response surface methodology, ANNs show superiority as a modeling technique for data sets showing no linear relationships and act as global approximators and thus for both data fitting and prediction abilities. This combination (experimental design-ANN) allows the reduction of the number of experiments in order to obtain the optimal conditions and it

improves the development in analysis. Two different ANNs were used, the first one had as output the average recovery of the analytes and the second had as output the standard deviation of averaged recoveries. The optimum region found was the region generating the highest average recovery values for the 1st ANN and the lowest standard deviation of averaged recovery for each run for the 2nd ANN. The common region or values deriving from these two optimum regions could then best describe the global optimum for the MSPD method under investigation.

From this optimization method, the maximum yield is achieved through the below optimum conditions of target analytes extraction: the dispersant C-18 80% / Florisil 20% (2g) mixed with the sample matrix at a ratio of 1:2, extracted with 50% dichloromethane : 50% hexane elution solvent (15mL) since the clean up material was C-18 40% / Florisil 60% (2g).

The recovery was determined at two fish matrices differentiated in amount of lipid content. At matrix with higher lipid content, at 50ng/g spiking level, recovery was ranged from 68% to 115% (except for congener PCB 101: 62%), the limits of detection and quantification from 0.09 to 1.0 (ng/g) and from 0.29 to 3.3 (ng/g) respectively. The correlation coefficient, r^2 value, was above or equal to 0.987. At matrix with lower lipid content, at 50 ng/g spiking level, recovery was ranged from 55% to 119% (except for endrin aldehyde: 37%), the limits of detection and quantification from 0.09 to 1.03 (ng/g) and from 0.30 to 3.4 (ng/g) respectively. The correlation coefficient, r^2 value, was above or equal to 0.992. Repeatability of the method ranged from 5.3 to 19.7 (% RSD) and reproducibility of the method ranged from 2.6 to 18.3 (% RSD).

A fully nested experimental design is applied to estimate the uncertainty of measurement arising from trueness. The recovery was estimated in two fish species of different lipid content (*mugil cephalus* and *cyprinus carpio*, $l=2$). For each matrix, the analysis was carried out on three concentration levels, that is, 0.25, 0.50, 0.1 $\mu\text{g/g}$ ($p=3$) and samples in triplicates ($r=3$). Using analysis of variances (ANOVA), the recovery of each analyte, the variations of the factors mentioned above and the overall recovery were determined. The matrices tested seem to cause a negligible variation in the measured recovery values than the different concentration levels for many analytes and no important variation was found for the rest of them.

The proposed procedure was applied to real samples of four fish species (*mugil cephalus*, *dicentrarchus labrax*, *cyprinus carpio* and *silurus aristotelis*) sampled from two regions of Aitolokarnania, Greece: Mesolonghi lagoon and Trichonis lake. The sampling period was extended from July to December 2009 and three samples of each species were

collected and prepared according to EPA protocol of sampling. The analytes: Endosulfan I, 4,4 -DDE, Endrin, 4,4 -DDD and Endosulfan II were found in each species (but not in each month of sampling) and the analytes: Endosulfan sulphate, Endrin ketone, PCB 101 και PCB 153 were found in some cases. No other of the 26 studied analytes were found.

Finally, uncertainties of measurements of real samples analysis were calculated and presented together with the analytical results as a numeric range. The expanded uncertainty of each result including all possible sources of uncertainty was introduced to each result. These values of uncertainty were below 20% for most of the analytes.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Σύνοψη των σχέσεων που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό:

- **της αβεβαιότητας μέτρησης που προέρχεται από την ορθότητα της μεθόδου (αβεβαιότητα ανάκτησης)**
- **της αβεβαιότητας των αποτελεσμάτων ανάλυσης των πραγματικών δειγμάτων**

A.

$$R = \overline{\overline{R}}_m + \Delta R_C + \Delta R_M$$

$$\overline{\overline{R}}_m = \frac{\sum_{i=1}^l \overline{R}_i}{l}$$

$$u_R = \sqrt{u^2(\overline{\overline{R}}_m) + u^2(\Delta R_C) + u^2(\Delta R_M)}$$

$$u(\overline{\overline{R}}_m) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l u^2(R_i)}{l^2}}$$

$$u(\overline{R}_i) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p (\overline{R}_{ij} - \overline{R}_i)^2}{p \cdot (p-1)}}$$

$$\frac{|\overline{R}_m - 1|}{u_{Rm}} \leq t$$

B.

$$u_r = \sqrt{(u_{r(\delta\alpha\gamma\mu\alpha)})^2 + (u_{r(\alpha\nu\kappa\tau)})^2 + (u_{r(\beta\alpha\theta\mu)})^2 + (u_{r(\varepsilon\pi\alpha\nu)})^2 + (u_{r(LOD)})^2}$$

$$u_{r(LOD)} = \frac{LOD}{C_{\mu\epsilon\tau\phi}}$$

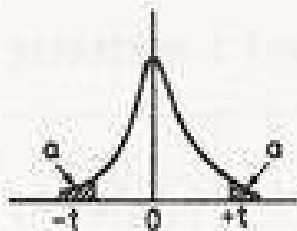
$$U_{(\varepsilon\pi\alpha\nu)} = k \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

$$u_{(\beta\alpha\theta\mu)} = \frac{SD_{RRF}}{\sqrt{n}}$$

Σημείωση: Η επεξήγηση των σχέσεων αναφέρεται στο 3^ο κεφάλαιο

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

**Πίνακες με τις τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιούνται για τις
δοκιμές σημαντικότητας: τιμές «t» και τιμές «F»**



Τιμές του t για διάφορα επίπεδα σημαντικότητας 2α σε συνάρτηση με τους βαθμούς ελευθερίας ν^*

$\nu \backslash 2\alpha$	0.50	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001	0.0001
1	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.309	636.619	6366.198
2	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.598	99.992
3	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214	12.924	28.909
4	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610	15.544
5	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869	11.178
6	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959	9.082
7	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408	7.885
8	0.706	1.397	1.840	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041	7.120
9	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781	6.594
10	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.567	6.211
11	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437	5.921
12	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318	5.694
13	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221	5.513
14	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140	5.363
15	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073	5.239
16	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015	5.134
17	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965	5.044
18	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.876	3.610	3.922	4.966
19	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883	4.897
20	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850	4.837
21	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819	4.784
22	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792	4.736
23	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.767	4.693
24	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745	4.654
25	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450	3.725	4.619
26	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707	4.587
27	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421	3.690	4.558
28	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674	4.530
29	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659	4.506
30	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646	4.482
35	0.682	1.306	1.690	2.030	2.438	2.724	3.340	3.591	4.389
40	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551	4.321
45	0.680	1.301	1.679	2.014	2.412	2.690	3.281	3.520	4.269
50	0.679	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261	3.496	4.228
60	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460	4.169
70	0.678	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211	3.435	4.127
80	0.678	1.292	1.664	1.990	2.374	2.639	3.195	3.416	4.096
90	0.677	1.291	1.662	1.987	2.368	2.632	3.183	3.402	4.072
100	0.677	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174	3.390	4.053
120	0.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.160	3.373	4.028
200	0.676	1.286	1.653	1.972	2.345	2.601	3.131	3.340	3.970
500	0.675	1.283	1.648	1.965	2.334	2.586	3.107	3.310	3.922
1000	0.675	1.282	1.646	1.962	2.330	2.581	3.098	3.300	3.906
-	0.675	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.290	3.891
$\nu \backslash \alpha$	0.25	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005	0.00005

* Το επίπεδο σημαντικότητας 2α δύναται πολλές φορές στο κείμενο του βιβλίου καί σαν p .

Πίνακας που δείχνει το ανώτερο όριο της τιμής $F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$, για τιμή $p=0,05$ (στατιστική βεβαιότητα 95%) και διάφορους βαθμούς ελευθερίας v_1 και v_2 .

$v_1 \backslash v_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,9	245,9	248,0	249,1	250,1	251,1	252,2	253,3	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,06	2,01	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	1,96	1,92	1,87	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77	1,71
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,90	1,85	1,80	1,75	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57	1,52	1,46	1,39	1,32	1,22	1,00

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ
Ανώτατα επιτρεπτά όρια των υπολειμμάτων οργανοχλωριωμένων ενώσεων
της μελέτης σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

A. Ανώτατα επιτρεπτά όρια οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (ng/g λίπους)

Ένωση	Ανώτατο επιτρεπτό όριο (ng/g)
Σchlordane	50
ΣDDT	1000
Dieldrin	200
Σendosulfan	100
Σheptachlor	200
HCB	200
α-HCH	200
β-HCH	100
γ-HCH	1000
Endrin	50

B.

Όριο συγκέντρωσης για την προστασία των καταναλωτών από άγριας φύσης υδρόβιους οργανισμούς: 140 ng/g wet weight