



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ ΚΑΙ ΙΖΗΜΑΤΑ

Χριστίνα Ι. Νάννου
Χημικός MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ ΚΑΙ ΙΖΗΜΑΤΑ

Χριστίνα Ι. Νάννου
Χημικός MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2018



UNIVERSITY OF IOANNINA
SCHOOL OF SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

**Modern analytical methods for the determination of
pesticide and pharmaceutical residues in natural
waters and sediments**

Christina I.Nannou
Chemist MSc

DOCTORATE THESIS

Ioannina 2018

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2».

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: **901/13-2-2015**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Επιβλέπων)

Ιωάννης Κωνσταντίνου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Βασίλειος Σακκάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: **901/13-2-2015**

Ημερομηνία τροποποίησης θέματος: **944/8-3-2017**

Θέμα: «Σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε φυσικά νερά και ιζήματα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: **984/28-9-2018**

1. Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. Ιωάννης Κωνσταντίνου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. Βασίλειος Σακκάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
4. Αθανάσιος Βλεσσίδης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. Μαρία-Ελένη Λέκκα, Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
6. Δήμητρα Λαμπροπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Αριστοτέλειο Παν/μιο Θεσσαλονίκης
7. Δήμητρα Χελά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 10-12-2018

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Η Γραμματέας του Τμήματος Χημείας

Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια

Ξανθή Τουτουτζόγλου

Στη μητέρα μου Κατερίνα,
και στον καλύτερο πατέρα που θα είναι για πάντα παρών.

“But man is a part of nature, and his war against nature is inevitably a war against himself.”

Rachel Carson

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πρώτη σελίδα αυτής της Διδακτορικής Διατριβής είναι η τελευταία σελίδα μιας προσωπικής προσπάθειας, που δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τη συνδρομή και υποστήριξη πολλών ανθρώπων.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα της Διατριβής κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την υπόδειξη του θέματος, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη του. Το μεγάλο ειδικό βάρος του αποτέλεσε αρωγό για να αξιοποιήσω κάθε δυνατή πηγή γνώσης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, κ. Ιωάννη Κωνσταντίνου και κ. Βασίλειο Σακκά, Αναπληρωτές Καθηγητές του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για τις παρατηρήσεις τους ως προς τη δομή και το περιεχόμενο της Διατριβής. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, κ. Αθανάσιο Βλεσσίδα, κ. Μαριλένα Λέκκα, κ. Δήμητρα Χελά και κ. Δήμητρα Λαμπροπούλου, για την αποδοχή να αξιολογήσουν τη Διατριβή.

Στο μεγάλο αυτό ταξίδι, είχα την τύχη να έχω συνοδοιπόρο από την πρώτη στιγμή τη Δρ. Βάσια Μπότη, μέλος ΕΔΙΠ στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η οποία μου όχι μόνο μου προσέφερε ανεκτίμητη βοήθεια ως προς την επιστημονική καθοδήγηση αλλά αποτέλεσε το μεγαλύτερο μου στήριγμα. Την ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου για την εμπιστοσύνη και την ανιδιοτελή διάθεση για μετάδοση των γνώσεών της.

Δεν μπορώ να μην αναφερθώ ιδιαίτερα στην αγαπημένη μου φίλη, Δρ. Χριστίνα Κοσμά για το συνεργατικό πνεύμα, την άνευ όρων βοήθεια και αδιάλειπτη παρουσία της στην εργαστηριακή μου ζωή, η οποία ξεκίνησε δίπλα της πριν από οκτώ χρόνια και συνεχίστηκε μέχρι σήμερα.

Ευχαριστώ για τη συνεργασία μας στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας τους συναδέλφους Δρ. Χαρούλα Τσούτση, Μαργαρίτα Καψή, Έμη Γότση, Νότη Τραντόπουλο και ιδιαίτερα τη συνάδελφο και φίλη Μερίνα Καλαμπόκα, που έχει αφήσει τη δική της σφραγίδα στην εργαστηριακή μου καθημερινότητα.

Ευχαριστώ επίσης τη Μονάδα περιβαλλοντικής, οργανικής και βιοχημικής ανάλυσης υψηλής ευκρίνειας Orbitrap-LC-MS του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πρόσβαση στις υπηρεσίες της Μονάδας και προσωπικά τον Υπεύθυνο Δρ. Αθανάσιο Καρκαμπούνα, για τη φιλική του διάθεση. Επίσης, ευχαριστώ για τη συνεργασία μας τον Καθηγητή Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου κ. Γεώργιο Καρρά, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Πατακιούτα για το χαρακτηρισμό των δειγμάτων ιζήματος.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Amadeo Rodríguez Fernandez-Alba, Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας στο Πανεπιστήμιο της Αλμερίας, για την τρίμηνη φιλοξενία στο εργαστήριό του, καθώς και τις ερευνήτριες Carmen Ferrer-Amate, Maria del Mar Gómez-Ramos, Maria Jesus Martinez-Bueno και Maria Jose Gómez-Ramos για τη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους στην προσαρμογή μου.

Σε όλους τους δικούς μου ανθρώπους που είναι αδύνατο να αναφερθώ ονομαστικά, οφείλω την επιμονή μου και τους ευγνωμονώ. Οι «ειδικές συνθήκες» δεν εμπόδισαν την αφοσίωση και αμέριστη κατανόηση τους. Τέλος, ευχαριστώ τη μητέρα μου, για όλα.

Χριστίνα Ι. Νάννου

Δεκέμβριος 2018

Περιεχόμενα

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
Κεφάλαιο 1	5
Ρύπανση υδάτινου περιβάλλοντος	5
1.1 Εισαγωγή	5
1.2 Φυσικά νερά.....	6
1.3 Χρήσεις του νερού.....	9
1.4 Υδατοκαλλιέργειες	10
1.5 Ρύποι και πηγές ρύπανσης.....	12
1.5.1 Αναδυόμενοι ρύποι.....	13
1.5.2 Ρύπανση υδάτινου περιβάλλοντος.....	15
1.6 Παρουσία φυτοπροστατευτικών φαρμακευτικών ενώσεων στο υδάτινο περιβάλλον ...	16
1.7 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά οργανικών ρύπων.....	20
1.7.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την περιβαλλοντική τύχη των μικρορύπων.....	21
1.7.2 Διεργασίες μεταφοράς και μετατροπή των οργανικών μικρορύπων στο περιβάλλον .	23
1.8 Τοξικότητα και εκτίμηση επικινδυνότητας των υπολειμμάτων των μικρορύπων	27
Κεφάλαιο 2	33
Φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις	33
A. Φυτοπροστατευτικές ενώσεις	33
2.1 Ιστορική αναδρομή	33
2.2 Σκοπός και χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων	35
2.3 Κατηγοριοποίηση φυτοφαρμάκων	37
2.4 Οφέλη και κίνδυνοι από τη χρήση των φυτοφαρμάκων	39
2.5 Μεταβολίτες και προϊόντα μετατροπής φυτοφαρμάκων	41
2.6 Η αγορά των φυτοφαρμάκων	42
2.7 Νομοθετικό πλαίσιο για τα φυτοφάρμακα	46
B. Φαρμακευτικές ενώσεις	49
2.8 Σκοπός και χρήση των φαρμάκων.....	49
2.9 Κατηγοριοποίηση φαρμάκων	50
2.10 Οφέλη και κίνδυνοι από τη χρήση των φαρμάκων	51
2.11 Μεταβολισμός των φαρμάκων	52
2.12 Η αγορά και η κατανάλωση των φαρμάκων.....	53
2.12.1 Η αγορά του φαρμάκου στην Ελλάδα	56
2.13 Νομοθετικό πλαίσιο για τα φάρμακα.....	58
2.14 Πηγές ρύπανσης από φαρμακευτικές ενώσεις.....	60

Κεφάλαιο 3	67
Τεχνικές εκχύλισης μικρορύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα	67
3.1 Εισαγωγή	67
3.2 Δειγματοληψία.....	69
3.3 Τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων.....	69
3.3.1 Κύριες τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από υγρά υποστρώματα.....	70
3.3.1.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης–υγρού (Solid Phase Extraction, SPE)	70
3.3.1.2 Υγρή–υγρή εκχύλιση (Liquid–Liquid Extraction, LLE)	73
3.3.1.3 Μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)	74
3.3.1.4 Εκχύλιση με μεμβράνες (Membrane Extraction).....	75
3.3.1.5 Εκχύλιση με προσρόφηση σε μαγνήτη ανάδευσης (Stir Bar Sorption Extraction, SBSE)	77
3.3.2 Κύριες τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από στερεά και ημι-στερεά υποστρώματα.....	78
3.3.2.1 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)	80
3.3.2.2 Εκχύλιση διασποράς στο υπόστρωμα (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD).....	85
3.3.2.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Extraction, SFE)	85
3.3.2.4 Ταχεία εκχύλιση με διαλύτες (Accelerated Solvent Extraction, ASE)	86
3.3.2.5 Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave–Assisted Extraction, MAE)	87
3.3.2.6 Εκχύλιση με υπερήχους (Ultra-sound – assisted extraction, UAE)	88
3.3.2.7 Εκχύλιση Soxhlet	88
3.4 Καθαρισμός εκχυλισμάτων με εκχύλιση δια της στερεής φάσης σε διασπορά	89
Κεφάλαιο 4	93
Υγρή χρωματογραφία–Φασματομετρία μάζας	93
A. Φασματομετρία μάζας.....	93
4.1 Εισαγωγή	93
4.1.1 Η έννοια της μάζας στη φασματομετρία μάζας.....	94
4.1.2 Ισοτοπικές αφθονίες	95
4.2 Διάταξη φασματομέτρου μάζας	96
4.3 Τεχνικές ιοντισμού	98
4.3.1 Ιοντισμός σε αέρια φάση	99
4.3.1.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)	101
4.3.1.2 Φάσματα ESI.....	103
4.3.1.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα από τη χρήση του ESI	103
4.3.2 Ιοντισμός με εκρόφηση.....	104
4.4 Αναλυτές μάζας.....	104
4.4.1 Χαρακτηριστικά επίδοσης αναλυτών μάζας.....	106

4.4.2 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap	107
4.4.2.1 Αρχή λειτουργίας αναλυτή Orbitrap	108
4.4.2.2 Πλεονεκτήματα χρήσης αναλυτή Orbitrap	110
4.5 Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας	112
4.5.1 Τεχνική πλήρους σάρωσης (FS).....	112
4.5.2 Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM).....	113
4.5.3 Τεχνική φασματομετρίας μάζας σε σειρά (MS/MS)	113
4.5.3.1 Σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product Ion Scan)	115
4.5.3.2 Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scan)	115
4.5.3.3 Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου.....	116
4.5.3.4 Επιλεκτική παρακολούθηση θραυσματοποίησης ιόντων	116
4.5.3.5 Τεχνική σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα (data dependent).....	116
B. Υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας	117
4.6 Υγρή χρωματογραφία.....	117
4.6.1 Υγρή χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης	119
4.6.2 Αποδοτικότητα συστημάτων υγρής χρωματογραφίας.....	119
4.6.3 Αναλυτικές στήλες.....	120
4.7 Σύζευξη υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας	121
4.7.1 Απόκριση συστημάτων LC–MS.....	122
4.7.2 Σύζευξη LC–ESI	123
4.7.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία του LC–ESI–MS	124
4.7.2.1 Κινητή φάση	124
4.7.2.2 Διάμετρος αναλυτικής στήλης	126
4.7.2.3 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά πηγής ESI.....	127
4.7.2.4 Φύση προσδιοριζόμενης ουσίας–Επίδραση υποστρώματος.....	127
4.7.2.5 Συγκέντρωση προσδιοριζόμενης ένωσης	128
B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	131
Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	133
Κεφάλαιο 5	137
Επιλογή ενώσεων και περιοχών μελέτης.....	137
5.1 Επιλεγμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις.....	137
5.1.1 Επιλεγμένα εντομοκτόνα	138
5.1.2 Επιλεγμένα ζιζανιοκτόνα.....	142
5.1.3 Επιλεγμένα μυκητοκτόνα.....	143
5.2 Επιλεγμένες φαρμακευτικές ενώσεις	144
5.2.1 Επιλεγμένα αναλγητικά και μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα	150

5.2.2 Επιλεγμένα ψυχιατρικά.....	150
5.2.3 Επιλεγμένα υπολιπιδαιμικά.....	152
5.2.4 Επιλεγμένα αντιυπερτασικά	153
5.2.5 Επιλεγμένα φάρμακα για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους.....	153
5.2.6 Επιλεγμένα κορτικοστεροειδή	153
5.3 Επιλογή εσωτερικών προτύπων.....	154
5.4 Επιλογή ποταμών	156
5.5 Επιλογή υδατοκαλλιεργειών	157
Κεφάλαιο 6	161
Υλικά και μέθοδοι	161
6.1 Χημικά, υλικά και όργανα	161
6.1.1 Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα.....	161
6.1.2 Διαλύτες	163
6.1.3 Αντιδραστήρια.....	164
6.1.4 Προσροφητικά υλικά.....	164
6.1.5 Υλικά και σκεύη	165
6.1.6 Συσκευές.....	165
6.1.7 Χρωματογραφικό σύστημα.....	166
6.2 Δείγματα.....	167
6.2.1 Δείγματα για την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων.....	167
6.2.2 Πραγματικά δείγματα	168
6.2.3 Εμβολιασμός δειγμάτων	169
6.2.3.1 Ιζήματα	169
6.2.3.2 Νερά	169
6.3 Μέθοδοι	170
6.3.1 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	170
6.3.2 Εκχύλιση QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).....	171
6.3.3 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας	172
6.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός.....	175
6.5 Επικύρωση μεθόδων.....	177
6.5.1 Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)	180
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	183
Κεφάλαιο 7	187
Βελτιστοποίηση μεθόδου UHPLC–LTQ/Orbitrap MS	187
7.1 Εισαγωγή	187
7.2 Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης	188

7.3 Μελέτη παραμέτρων πηγής ESI	194
7.4 Δυναμικό δακτυλιοειδούς φακού εστίασης	196
7.5 Άλλες παράμετροι στη φασματομετρία μάζας	196
7.6 Φασματομετρία μάζας εξαρτώμενη από δεδομένα	199
7.7 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός	199
Κεφάλαιο 8	207
Βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων σε ιζήματα	207
A. Βελτιστοποίηση	207
8.1. Εισαγωγή	207
8.2 Μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την εκχύλιση QuEChERS	208
8.2.1 Άλατα εκχύλισης	208
8.2.2 Διαλύτης εκχύλισης	212
8.2.3 pH διαλύτη εκχύλισης	212
8.2.4 Ποσότητα δείγματος	215
8.2.5 Επανυδάτωση ιζήματος πριν από την εκχύλιση	216
8.2.6 Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση	217
8.3 Καθαρισμός εκχυλισμάτων (clean-up)	218
8.3.1 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις	220
8.3.2 Φαρμακευτικές ενώσεις	226
B. Επικύρωση	235
8.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου	235
8.4.1 Ανακτήσεις	235
8.4.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	237
8.4.3 Γραμμικότητα	239
8.5 Επίδραση υποστρώματος	240
8.6 Συνολική απόδοση μεθόδου	242
Κεφάλαιο 9	249
Βελτιστοποίηση και επικύρωση της τεχνικής SPE για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από φυσικά νερά	249
A. Βελτιστοποίηση	249
9.1. Εισαγωγή	249
9.2 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης των φυτοπροστατευτικών ενώσεων από τα νερά ...	250
9.3 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης των φαρμακευτικών ενώσεων από τα νερά	253
9.4 Χαρακτηριστικά των επιλεγμένων συνθηκών εκχύλισης	257
B. Επικύρωση	261

9.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.....	261
9.6 Επίδραση υποστρώματος.....	268
Κεφάλαιο 10	273
Ανίχνευση φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε υδάτινα σώματα της Ευρώπης	273
10.1 Περιγραφή των περιοχών μελέτης	273
10.1.1 Ελλάδα: Υδατικό διαμέρισμα Ηπείρου	278
10.1.1.1 Ο ποταμός Άραχθος και η λεκάνη απορροής του	281
10.1.1.2 Ο ποταμός Λούρος και η λεκάνη απορροής του	282
10.1.1.3 Η Λωρίδα Σαγιάδας	283
10.1.2 Άλλες ευρωπαϊκές χώρες	284
10.1.2.1 Αλβανία: Λιμνοθάλασσα Butrint.....	284
10.1.2.2 Ιταλία: Λιμνοθάλασσα Sacca di Goro και Θάλασσα Λιγυρίας	285
10.1.2.3 Ισπανία: Εκβολές ποταμού Ebro	290
10.1.2.4 Πορτογαλία: Λιμνοθάλασσα Aveiro.....	291
10.1.2.5 Ηνωμένο Βασίλειο: Εκβολές ποταμού Exe	292
10.1.2.6 Νορβηγία: Θαλάσσια περιοχή Rong	293
10.2 Επίπεδα συγκεντρώσεων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά.....	293
10.3 Επίπεδα συγκεντρώσεων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα ιζήματα.....	302
10.4 Επίπεδα συγκεντρώσεων φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά.....	312
10.5 Επίπεδα συγκεντρώσεων φαρμακευτικών ενώσεων στα ιζήματα.....	319
10.6 Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας.....	329
10.6.1 Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας σε νερά βάσει δεδομένων για την υδάτινη οξεία τοξικότητα.....	331
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	341
Κεφάλαιο 11	343
Συμπεράσματα Διδακτορικής Διατριβής	343
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	351
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ/ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ	381
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ/ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ	386
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	387
SUMMARY	391
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ	395

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΡΥΠΑΝΣΗ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΡΥΠΑΝΣΗ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Η περιβαλλοντική ρύπανση αποτελεί μείζον παγκόσμιο πρόβλημα και θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως «το τίμημα της εξέλιξης». Η ραγδαία τεχνολογική και επιστημονική πρόοδος προσφέρει σημαντικά οφέλη στην ανθρωπότητα, ωστόσο έχει τεράστιο αντίκτυπο στα οικοσυστήματα και κατά συνέπεια στον άνθρωπο.

Εκτιμάται ότι παγκοσμίως πάνω από ένα δισεκατομμύριο λίβρες τοξικών χημικών ουσιών απελευθερώνονται στον αέρα και το νερό. Στο ίδιο πλαίσιο, περίπου 6×10^6 χημικές ουσίες έχουν παραχθεί, ενώ 1000 νέα χημικά προϊόντα συντίθενται σε ετήσια βάση [1]. Πάνω από 131 εκατομμύρια χημικές ουσίες, με τεράστιο εύρος κατηγοριών, εμφανίζονται στο Μητρώο Χημικών Ουσιών (Chemical Abstracts Service Registry File), ενώ 387150 από αυτές υπόκεινται σε έλεγχο κυκλοφορίας [1]. Η απελευθέρωση και συσσώρευση ορισμένων από αυτές στο υδάτινο περιβάλλον σε συνδυασμό με την κακή διαχείριση των υδάτων και την έλλειψη σχεδιασμού, μοιραία οδηγούν στην υποβάθμιση της ποιότητας των διαθέσιμων υδατικών αποθεμάτων καθαρού νερού, μετατρέποντας το πολυτιμότερο αγαθό σε απόβλητο.

Για την αξιολόγηση και την αντιμετώπιση του προβλήματος, απαιτείται γνώση της χημικής κατάστασης των υδατινών οικοσυστημάτων. Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί

πολλές μελέτες συστηματικής παρακολούθησης της ποιότητας των υδάτων σε ποταμούς και λίμνες σε διάφορες περιοχές του πλανήτη, με στόχο τον προσδιορισμό πληθώρας ομάδων ενώσεων, με διαφορετικές στρατηγικές δειγματοληψίας, ανάλυσης και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων.

Το επιστημονικό ενδιαφέρον για την παρουσία οργανικών ρύπων στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι πολύ πιο πρόσφατο σε σχέση με αυτό στα οικοσυστήματα του γλυκού νερού. Παρόλο που οι παράκτιες περιοχές θεωρούνται ο τελικός δέκτης των λυμάτων και άλλων παραπροϊόντων των ανθρωπίνων δραστηριοτήτων, ο αριθμός των σχετικών μελετών σε παράκτιες ζώνες, οι οποίες υποφέρουν εξίσου από τις ανθρώπινες δραστηριότητες αλλά και από τη δραστηριότητα υδατοκαλλιεργειών, είναι σημαντικά μικρότερος, ενώ ακόμα πιο περιορισμένος είναι ο αριθμός των μελετών που εστιάζουν εκτός από τα νερά, στα ιζήματα των υδάτινων συστημάτων. Ειδικότερα στη χώρα μας, οι έρευνες με σκοπό τη συστηματική μελέτη των θαλάσσιων υδάτων είναι ελάχιστες και δεν αναφέρονται σε περιοχές με έντονη δραστηριότητα υδατοκαλλιεργειών, όπως επιχειρείται στην παρούσα Διατριβή.

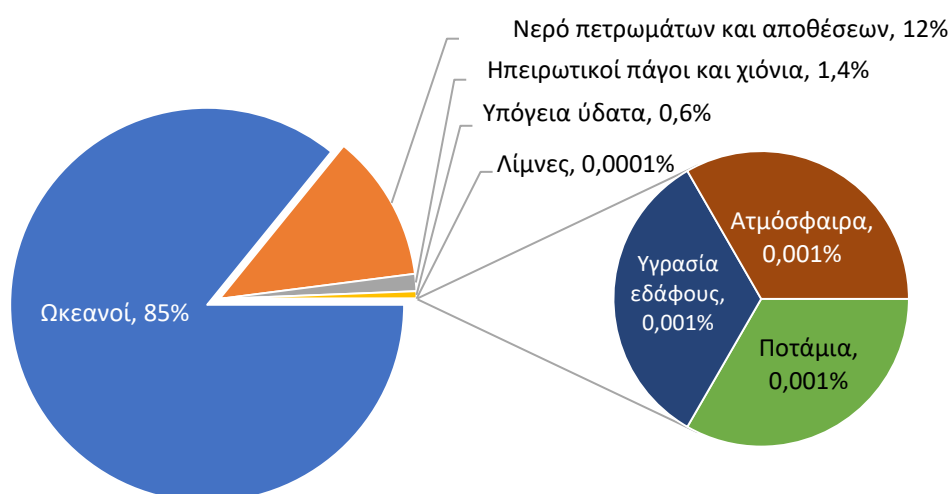
Από το Δεκέμβριο του 2000 έχει τεθεί σε ισχύ η Ευρωπαϊκή Οδηγία–Πλαίσιο για τη Διαχείριση των Υδάτων (Οδηγία 2000/60/ΕΚ) με την οποία εγκαθιδρύθηκε ένα κοινό πλαίσιο δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων. Έκτοτε, καθιερώθηκαν και εφαρμόζονται πλέον κοινές αρχές και κοινοί στόχοι για όλα τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με κοινή συνισταμένη τη σταδιακή επίτευξη και διατήρηση της "καλής κατάστασης" (οικολογικής και χημικής) όλων των υδάτων. Προοίμιο της τελικής κατάταξης των υδάτων αποτελεί ο εντοπισμός και η εκτίμηση των πιέσεων, δηλαδή των σημαντικών πηγών ρύπανσης και η αξιολόγηση των επιπτώσεών τους στα υδάτινα σώματα, με στόχο την αναγνώριση των υδάτων που ενδέχεται να μην επιτύχουν τους περιβαλλοντικούς στόχους.

1.2 Φυσικά νερά

Το νερό είναι ο πολυτιμότερος φυσικός πόρος της γης και ο σημαντικότερος παράγοντας για την ύπαρξη ζωής, την ανάπτυξη και την υγιεινή διαβίωση. Τα υδάτινα συστήματα του πλανήτη αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή ζωντανών οργανισμών και ακρογωνιαίο λίθο για τη βιοποικιλότητα, τη διατήρηση ευαίσθητων οικοσυστημάτων και των βιογεωλογικών κύκλων.

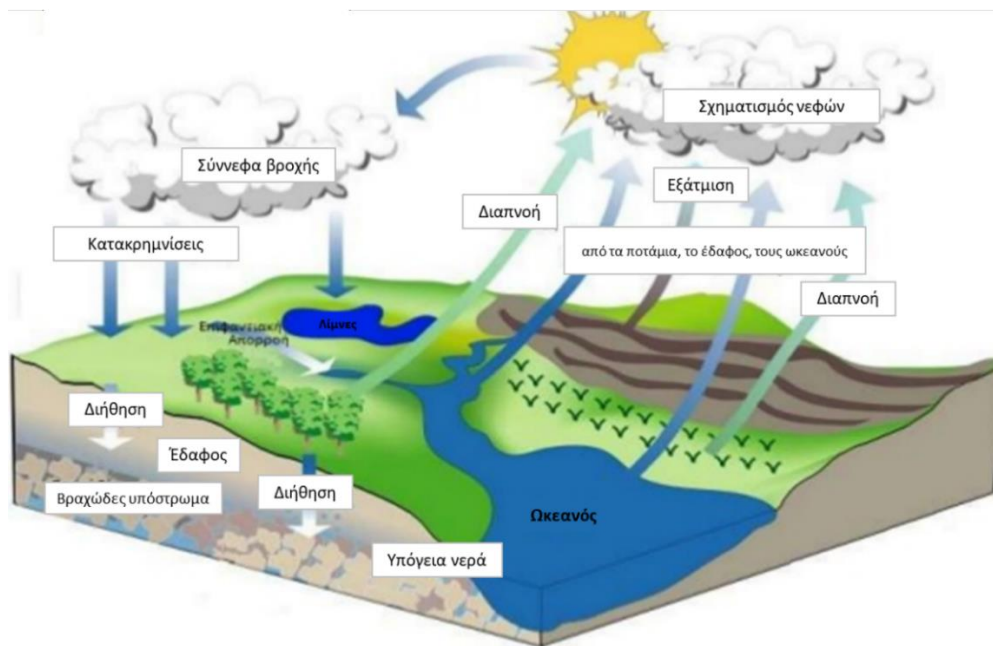
Στα φυσικά νερά ανήκουν (α) τα επιφανειακά νερά, δηλαδή οι ποταμοί, οι λίμνες, οι λιμνοθάλασσες, οι θάλασσες και (β) τα υπόγεια νερά. Τα επιφανειακά νερά είναι περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητα στη ρύπανση από διάφορους ρύπους, ανάλογα με τη

δυνατότητα ανανέωσής τους. Οι λίμνες, για παράδειγμα, έχουν πολύ μικρή δυνατότητα ανανέωσης των νερών τους και είναι πολύ πιο ευαίσθητοι αποδέκτες σε σχέση με τα ποτάμια και τις θάλασσες. Οι ωκεανοί και οι υπόλοιποι επιφανειακοί ταμιευτήρες χρησιμοποιούνται ως αποδέκτες των ρυπαντικών φορτίων, τα οποία προκύπτουν από ανθρώπινες δραστηριότητες. Στο Σχήμα 1.1 αποτυπώνεται η κατανομή του νερού στις διάφορες υδάτινες ενότητες.



Σχήμα 1.1 Κατανομή ύδατος σε διάφορες υδάτινες ενότητες

Το σύνολο του νερού του πλανήτη βρίσκεται σε αέναη κίνηση, με εξαίρεση το ποσοστό του νερού που περιέχεται στους πάγους και παγετώνες. Η κίνηση αυτή πραγματοποιείται στην ατμόσφαιρα, στην υδρόσφαιρα, στη λιθόσφαιρα αλλά και μέσα στους έμβιους οργανισμούς αλλάζοντας διαρκώς φυσική κατάσταση. Η διαδικασία της φυσικής ροής η κίνησης του νερού αποτελεί τον υδρολογικό κύκλο (Σχήμα 1.2), πραγματοποιείται ως επί το πλείστον ανάμεσα στα επιφανειακά ύδατα και την ατμόσφαιρα και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την τοπογραφία και γεωμορφολογία της περιοχής, τη δομή και τη σύσταση του εδάφους, την υγρασία του εδάφους, το κλίμα, τη βλάστηση, τις χρήσεις της γης, το είδος των κατακρημνίσεων κ.ά. Η συνολική ποσότητα του νερού θεωρείται σταθερή, αν και το παγκόσμιο ισοζύγιο του κύκλου του νερού είναι δύσκολο να προσδιορισθεί με ακρίβεια.



Σχήμα 1.2 Υδρολογικός κύκλος

Το ποσοστό του νερού που κατακρημνίζεται από την ατμόσφαιρα και φτάνοντας στην επιφάνεια του εδάφους ρέει επιφανειακά αποτελεί την επιφανειακή απορροή. Έτσι, δημιουργούνται τα επιφανειακά νερά, τα οποία πρακτικά είναι αυτά που συγκεντρώνονται στην επιφάνεια του εδάφους (ποτάμι, λίμνη, θάλασσα). Τα επιφανειακά νερά συγκροτούν το υδρογραφικό δίκτυο μιας περιοχής. Το τμήμα της επιφάνειας του εδάφους πάνω στο οποίο ρέουν τα επιφανειακά νερά και μέσω του υδρογραφικού δικτύου κατευθύνονται προς την κύρια μάζα και έκταση του υδάτινου συστήματος ονομάζεται λεκάνη απορροής (ΛΑΠ).

Σύμφωνα με την οδηγία 2000/60/EK [2], οι ποταμοί είναι συστήματα εσωτερικών υδάτων τα οποία ρέουν, κατά το πλείστον στην επιφάνεια του εδάφους, αλλά το οποίο μπορεί για ένα μέρος της διαδρομής του να ρέει υπογείως. Τα συστήματα επιφανειακών υδάτων πλησίον του στομίου ποταμών, τα οποία είναι εν μέρει αλμυρά λόγω της γειτνίασής τους με παράκτια ύδατα, αλλά επηρεάζονται ουσιαστικά από ρεύματα γλυκού νερού ονομάζονται «μεταβατικά ύδατα». Ως «παράκτια ύδατα» ορίζονται τα επιφανειακά ύδατα που βρίσκονται στην πλευρά της ξηράς μιας γραμμής, κάθε σημείο της οποίας βρίσκεται σε απόσταση ενός ναυτικού μιλίου προς τη θάλασσα από το πλησιέστερο σημείο της γραμμής από την οποία μετράται το εύρος των χωρικών υδάτων και τα οποία, κατά περίπτωση, εκτείνονται μέχρι του απώτερου ορίου των μεταβατικών υδάτων.

Τα επιφανειακά νερά κάθε κατηγορίας χωρίζονται σε τμήματα που ονομάζονται «υδάτινα σώματα». Ο καθορισμός των υδάτινων σωμάτων γίνεται αρχικά με βάση τα

ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που καθορίζουν την οικολογία τους. Έτσι προκύπτουν τύποι υδάτινων σωμάτων με διαφορετικά οικολογικά χαρακτηριστικά με τρόπο που να είναι δυνατή η αξιολόγηση της οικολογικής κατάστασης των υδάτινων σωμάτων που εμπίπτουν σε κάθε τύπο με τον ίδιο τρόπο.

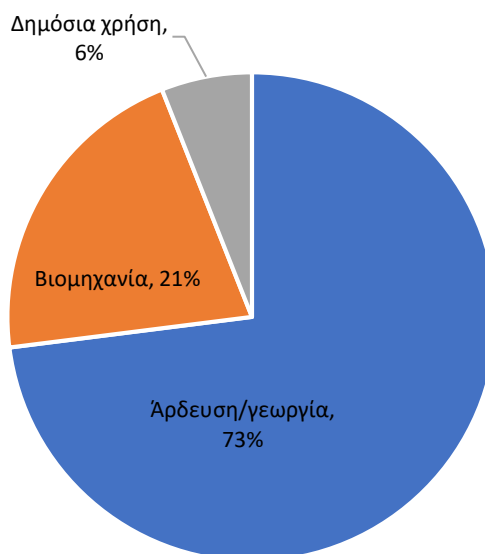
Στη συνέχεια τα υδάτινα σώματα διαχωρίζονται περαιτέρω με βάση το διαφορετικό καθεστώς προστασίας (π.χ. αν εμπίπτουν σε προστατευόμενη περιοχή) ή τις ιδιαίτερες ανθρωπογενείς δραστηριότητες που τα επηρεάζουν (πιέσεις).

Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η τελική οριοθέτηση ποτάμιων, λιμναίων, μεταβατικών και παράκτιων υδάτινων σωμάτων, στο καθένα από τα οποία μπορεί να αξιολογηθεί η οικολογική και χημική του κατάσταση και να ληφθούν τα μέτρα που απαιτούνται, ώστε η κατάσταση του να προσεγγίζει την «καλή».

Το υδάτινο σώμα αποτελεί επί της ουσίας τη μικρότερη μονάδα διαχείρισης της Οδηγίας – Πλαίσιο με σχετικά ομοιόμορφα οικολογικά χαρακτηριστικά.

1.3 Χρήσεις του νερού

Ο άνθρωπος χρησιμοποιεί το νερό εδώ και χιλιάδες χρόνια για την άρδευση, βιομηχανία, τη μεταφορά υλικών, την κατασκευή έργων και εργαλείων, την παραγωγή ενέργειας και φυσικά για τη συντήρησή του στη ζωή. Η επάρκεια γλυκού νερού και η συντήρηση της χλωρίδας και της πανίδας είναι απαραίτητα για τη βιωσιμότητα της ανθρωπότητας. Στο Σχήμα 1.3 απεικονίζονται οι κύριες χρήσεις του νερού.



Σχήμα 1.3 Χρήσεις του νερού (Πηγή: AQUASTAT, Food and Agriculture Organization)

Είναι προφανές από το παραπάνω Σχήμα ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του νερού καταναλώνεται για την άρδευση και τη γεωργία. Η χρήση του σε αυτόν τον τομέα είναι πολλές φορές αλόγιστη και αποτελεί αιτία αλυσιδωτών περιβαλλοντικών προβλημάτων. Μεταξύ αυτών, είναι η εξάντληση των υδροφόρων αποθεμάτων και η πτώση των υδροφόρων οριζόντων, η αύξηση της αλατότητας ή της αλκαλικότητας και η διαταραχή της μικροβιακής πανίδας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της γόνιμης αγροτικής γης με αποτέλεσμα την καταστροφή της. Επίσης, η εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων προκαλεί εκτεταμένη ρύπανση και αύξηση της συσσώρευσης ανεπιθύμητων συστατικών υπεύθυνων για τον ευτροφισμό λιμνών ή για οικολογικές καταστροφές, ενώ παράλληλα κατεβάζει την επιφάνεια λιμνών και ανυψώνει τους πυθμένες τους αλλοιώνοντας τη γεωμορφολογία.

Μεγάλο μέρος των αποθεμάτων νερού καταναλώνεται στη βιομηχανία, συμπεριλαμβανομένου του νερού για ψύξη, βρασμό, διαλύσεις, πλύσεις, μεταφορές, ρύθμιση υγρασίας, χώρων, κ.ά. Η ανακύκλωση νερού μέσα στις βιομηχανικές μονάδες είναι μια λύση που κερδίζει συνεχώς έδαφος και έχει ως αποτέλεσμα τόσο την εξοικονόμηση κόστους υπέρ της μονάδας όσο και την προστασία του περιβάλλοντος λόγω της μείωσης των αναγκών σε νερό αλλά και από τα ρυπαντικά φορτία που μεταφέρουν μετά την παραγωγική διαδικασία και κατά την απόχυσή τους στο περιβάλλον.

Τέλος, μόνο το 6% των αποθεμάτων προορίζεται για δημόσια χρήση. Πρόκειται για το πόσιμο νερό και το νερό που χρησιμοποιείται στην υγιεινή. Το εξαιρετικά μικρό ποσοστό μπορεί να αποδοθεί –δυστυχώς– στο γεγονός ότι κάτοικοι των χωρών του «Τρίτου Κόσμου» στερούνται την πρόσβαση στο γλυκό και ακίνδυνο νερό, ενώ παράλληλα δεν εξυπηρετούνται από κανένα είδος αποχέτευσης. Έτσι, δισεκατομμύρια κατοίκων εκτίθενται σε ασθένειες που προκαλούνται από μολυσμένο νερό. Όμως, πέρα από την παροχή και αποχέτευση του νερού που εξασφαλίζει στοιχειώδεις συνθήκες διαβίωσης, η δημόσια χρήση νερού φορτίζει με τεράστια ποσά λυμάτων τους φυσικούς αποδέκτες. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος είναι απαραίτητη η συστηματική επεξεργασία των αστικών λυμάτων και η επαναχρησιμοποίηση του νερού από τα επεξεργασμένα υγρά λύματα.

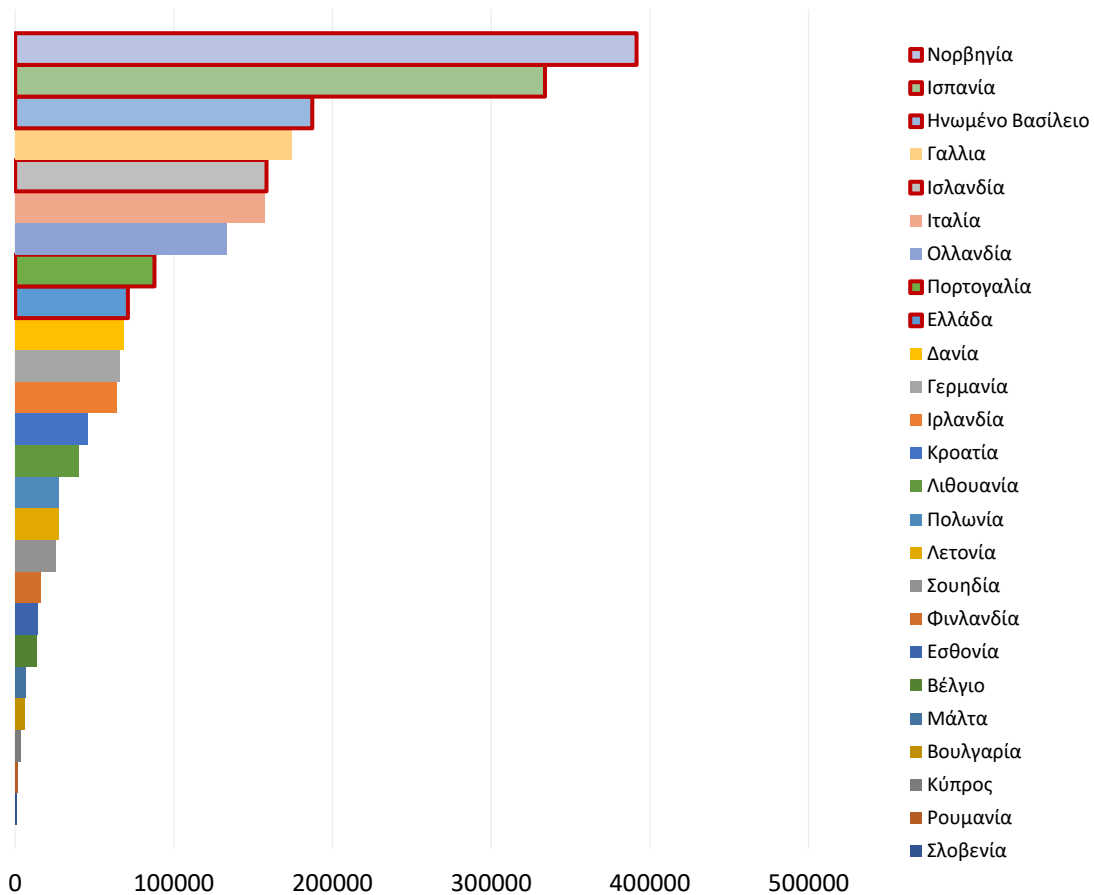
1.4 Υδατοκαλλιέργειες

Η οδηγία 2006/88/ΕΚ [3] της Ευρωπαϊκής Ένωσης ορίζει ως «υδατοκαλλιέργεια» την εκτροφή ή καλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών χρησιμοποιώντας τεχνικές σχεδιασμένες για την αύξηση της παραγωγής των οργανισμών αυτών περισσότερο από τη φυσική ικανότητα του περιβάλλοντος και όπου οι οργανισμοί παραμένουν στην ιδιοκτησία ενός ή

περισσότερων φυσικών ή νομικών προσώπων σε όλα τα στάδια της εκτροφής ή της καλλιέργειας, μέχρι και τη συγκομιδή [3]. Σκοπός είναι η παραγωγή αλιευμάτων υψηλής θρεπτικής αξίας προς κατανάλωση από τον άνθρωπο ή η παραγωγή υδρόβιων οργανισμών που χρησιμοποιούνται είτε ως τροφή για τα καλλιεργούμενα είδη, είτε στην παραγωγή διατροφικών και φαρμακευτικών προϊόντων, ή προϊόντων βιοτεχνολογίας. Πιο σπάνια η υδατοκαλλιέργεια στοχεύει στην παραγωγή καλλωπιστικών ειδών και στην παραγωγή γόνου (αβγά, προνύμφες, νεαρά άτομα) με σκοπό τον εμπλουτισμό των φυσικών αποθεμάτων.

Η παραγωγή υδρόβιων ειδών μπορεί γενικά να διακριθεί, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα, σε τρεις τύπους: τον εκτατικό, τον ημι-εντατικό και τον εντατικό τύπο καλλιέργειας. Στον εκτατικό τύπο οι οργανισμοί καλλιεργούνται σε φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα (π.χ. μικρές λίμνες ή λιμνοθάλασσες) και εξαρτώνται σχεδόν αποκλειστικά από τροφή που υπάρχει στο φυσικό περιβάλλον με ελάχιστη ή και καμία ανθρώπινη παρέμβαση. Στον ημιεντατικό τύπο η παραγωγή γίνεται επίσης σε φυσικές υδατοσυλλογές (π.χ. μικρής έκτασης χωμάτινες λιμνοδεξαμενές), αυτή τη φορά όμως με ανθρώπινη παρέμβαση που συνίσταται στην προσθήκη λιπασμάτων ή οργανικής ύλης για αύξηση της παραγωγικότητας κι ενίσχυση της τροφικής αλυσίδας. Στον εντατικό τύπο τα επίπεδα της ανθρώπινης συμβολής και ελέγχου είναι τα μέγιστα. Η πυκνότητα ή φόρτιση των καλλιεργούμενων οργανισμών (αριθμός ατόμων ανά μονάδα όγκου νερού) είναι πολύ μεγάλη, ενώ γίνεται εκτεταμένη χρήση τεχνητής ιχθυοτροφής που μπορεί επιπλέον να συνοδεύεται κι από χορήγηση βιταμινών, ιχνοστοιχείων και αντιβιοτικών. Τα συστήματα αυτά έχουν πολύ υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις και συχνά η παραγωγή ζωικής πρωτεΐνης είναι πιο ενεργοβόρα σε σχέση με τους άγριους πληθυσμούς [4].

Συγκεκριμένα στην ΕΕ, ο τομέας των υδατοκαλλιεργειών αποτελεί βασικό πυλώνα της «γαλάζιας ανάπτυξης». Σύμφωνα με το τελευταίο τεύχος (2016) του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών με τίτλο «Η κατάσταση της παγκόσμιας αλιείας και υδατοκαλλιέργειας» [5], οι υδατοκαλλιεργείες εξακολουθούν να εμφανίζουν εντυπωσιακούς ρυθμούς ανάπτυξης, τόσο σχετικά με την αυξανόμενη ποσότητα στην παραγωγή όσο και με τη βελτιωμένη ποιότητα. Στο Σχήμα 1.4 αποτυπώνεται η συνολική ετήσια παραγωγή ιχθυοκαλλιεργειών στις χώρες τις Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ επισημαίνονται με κόκκινο πλαίσιο οι χώρες από τις οποίες όπως θα αναφερθεί αργότερα, αναλύθηκαν δείγματα νερού και ιζήματος για την παρούσα Διατριβή.



Σχήμα 1.4 Αλιευτικός στόλος στις χώρες της ΕΕ (χωρητικότητα σε τόνους) (Πηγή: Eurostat)

1.5 Ρύποι και πηγές ρύπανσης

Οι ρύποι είναι ουσίες που μπορούν να δράσουν βλαπτικά στους οργανισμούς ή ακόμη και να προκαλέσουν τον θάνατο και περιλαμβάνουν πληθώρα ουσιών ή ομάδων ουσιών, όπως επικίνδυνες χημικές ενώσεις, τοξικά αέρια, αιωρούμενα σωματίδια, φυτοφάρμακα, κ.ά. Ένας ρύπος χαρακτηρίζεται τοξικός όταν έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει σοβαρή βλάβη ή θάνατο σε ανθρώπους ή ζώα.

Σύμφωνα με την οδηγία 2000/60/ΕΚ [2], με τον όρο ρύπανση αναφερόμαστε στη συνέπεια ανθρωπίνων δραστηριοτήτων εξαιτίας της άμεσης ή έμμεσης εισαγωγής στον αέρα, το νερό ή το έδαφος, ουσιών ή θερμότητας που μπορούν να είναι επιζήμια για την υγεία του ανθρώπου ή για την ποιότητα των υδάτινων οικοσυστημάτων ή χερσαίων οικοσυστημάτων, που εξαρτώνται άμεσα από υδάτινα οικοσυστήματα. Είναι σημαντικό να κατανοηθεί η διάκριση μεταξύ ρύπανσης και μόλυνσης, που συχνά χρησιμοποιείται εσφαλμένα, αφού αναφέρεται μόνο στη μορφή ρύπανσης που χαρακτηρίζεται από την

παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο περιβάλλον ή δεικτών που υποδηλώνουν την πιθανότητα παρουσίας τέτοιων μικροοργανισμών.

Οι πηγές ρύπανσης μπορεί να είναι φυσικές, δηλαδή να οφείλονται στη φυσική δραστηριότητα (διάβρωση των πετρωμάτων, ηφαιστειακή δραστηριότητα) ή ανθρωπογενείς, δηλαδή να οφείλονται στην ανθρώπινη δραστηριότητα (εξόρυξη ορυκτών, βιομηχανία, διωλιστήρια πετρελαίου, χαλυβουργία, παραγωγή λιπασμάτων, πετροχημικά, παραγωγή χημικών, χρωμάτων κ.λπ.). Η επιβάρυνση και υποβάθμιση των υδάτων οφείλεται κυρίως στις ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης. Οι πηγές ρύπανσης ταξινομούνται επίσης σε σημειακές και μη σημειακές. Οι σημειακές είναι εκείνες που είναι εντοπισμένες σε μια στάσιμη τοποθεσία ή εγκατάσταση που απελευθερώνει στο περιβάλλον επιβαρυντικές για αυτό ουσίες (π.χ. εργοστάσια, τάφροι, σωλήνες απορροής κ.ά.). Οι μη σημειακές πηγές δεν εντοπίζονται σε συγκεκριμένο σημείο αλλά είναι διάχυτες στο χώρο με αποτέλεσμα τη δύσκολη αντιμετώπισή τους (π.χ. όμβρια ύδατα, γεωργία, μεταλλευτικές περιοχές κ.ά.).

Οι δυσμενείς επιπτώσεις της ρύπανσης του νερού μπορεί να είναι οικολογικές, αισθητικές ή υγιεινολογικές. Στην πρώτη περίπτωση οι ρύποι προκαλούν δυσμενείς μεταβολές στα υδάτινα οικοσυστήματα. Στη δεύτερη περίπτωση η ρύπανση γίνεται αιτία δυσάρεστων οσμών, χρωματισμού ή θολότητας του υδάτινου σώματος (θάλασσας, λίμνης, ποταμού) εμποδίζοντας τη χρήση του για σκοπούς αναψυχής. Κατά την υγιεινολογική ρύπανση το νερό γίνεται φορέας παθογένειας και τοξικότητας για τον άνθρωπο και τα ζώα που χρησιμοποιούν το ίδιο (πόση, κολύμβηση) ή τους υδρόβιους οργανισμούς για τροφή.

1.5.1 Αναδυόμενοι ρύποι

Το σύνολο των ρύπων που περιέχονται σε υγρά απόβλητα ή υδάτινα σώματα μπορούν να διακριθούν, ανάλογα με την προέλευσή τους και τις επιπτώσεις που προκαλούν στους υδάτινους αποδέκτες, σε συμβατικούς ρύπους (όπως οργανική ύλη, αμμωνιακά, νιτρικά και φωσφορικά άλατα), μη συμβατικούς ρύπους (κυρίως τοξικές ουσίες) και παθογόνους μικροοργανισμούς (με βασική προέλευση στα περιττώματα ανθρώπων και ζώων). Μέχρι πρόσφατα, η χημική ρύπανση των υδάτων εστιαζόταν κυρίως στην επιρροή των «συμβατικών» ρύπων. Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες, η έρευνα για τη ρύπανση των υδάτων από τις χημικές ουσίες εστιάζεται στους επονομαζόμενους «αναδυόμενους ρύπους» (emerging contaminants, ECs). Ως «αναδυόμενοι ρύποι» ορίζονται οι ουσίες οι οποίες δεν συμπεριλαμβάνονται στην υπάρχουσα νομοθεσία σχετικά με την ποιότητα των υδάτων, ανιχνεύονται συχνά σε μη αναμενόμενες συγκεντρώσεις, θεωρούνται εν δυνάμει επιβλαβείς

για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία και οι επιπτώσεις τους στο περιβάλλον δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά [1, 2]. Ωστόσο, η απαρχή της μελέτης αυτών των ουσιών, φαίνεται πως δεν οφείλεται μόνο στην αβεβαιότητα για τους πιθανούς κινδύνους που θέτει η αμείωτη χρήση τους από τον άνθρωπο αλλά και στην ανάπτυξη νέων αναλυτικών τεχνικών, πολύ πιο εκλεκτικών και ευαίσθητων, οι οποίες καθιστούν δυνατή την ανίχνευση τους σε επίπεδα ακόμα και ελάχιστων ng L^{-1} . Έτσι, κατατάσσονται πλέον ως ρύποι ουσίες οι οποίες λόγω των εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων μέχρι πρότινος δεν ήταν δυνατό να ανιχνευθούν [6].

Η μεγάλη κατηγορία των αναδυόμενων ρύπων περιλαμβάνει κυρίως ξενοβιοτικές ενώσεις, δηλαδή χημικές ενώσεις οι οποίες αν και συντίθενται και χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο, είναι ξένες προς το σώμα και περιβάλλον του [7]. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν ενδιαφέρον σε σχέση με την υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων, κυρίως λόγω της υψηλής πολικότητας τους και της συνεχούς χρήσης τους και εισαγωγής τους στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα τη συχνή διασπορά τους στα νερά. Πολλές φορές οι ουσίες αυτές εμφανίζουν σημαντική βιολογική δράση, έχουν μεγάλο χρόνο υποδιπλασιασμού και μπορεί να βιοσυσσωρεύονται προκαλώντας βαριές ασθένειες. Ορισμένες είναι καρκινογόνες, μεταλλαξιζόνες, τερατογόνες ή προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές και αποτελούν τεράστιο κίνδυνο για το περιβάλλον.

Στις ουσίες αυτές, μεταξύ άλλων ανήκουν φυτοπροστατευτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία για την αποφυγή και τον έλεγχο της ανάπτυξης ανεπιθύμητων ειδών, φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται τόσο από τον άνθρωπο όσο και σε κτηνιατρικές εφαρμογές, προϊόντα προσωπικής φροντίδας (personal care products, PCPs), αντηλιακά, πλήθος καλλυντικών και ειδών μακιγιάζ, σαμπουάν, αρώματα, εντομοαπωθητικά που χρησιμοποιούνται στο σώμα και τα ρούχα, συστατικά χρωμάτων, πλαστικοποιητές, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές τροφίμων και ποτών, λιπαντικά, καθαριστικά διαφόρων ειδών, απορρυπαντικά, επιβραδυντές φλόγας, εκρηκτικά και δηλητηριώδη αέρια για στρατιωτικούς σκοπούς και πολλά άλλα [8]. Στην ίδια κατηγορία περιλαμβάνονται τα βαρέα μέταλλα αλλά και ελαφρύτερα στοιχεία όπως το αργίλιο (Al) και το βηρύλλιο (Be) και μεταλλοειδή όπως αρσενικό το (As) και το αντιμόνιο (Sb).

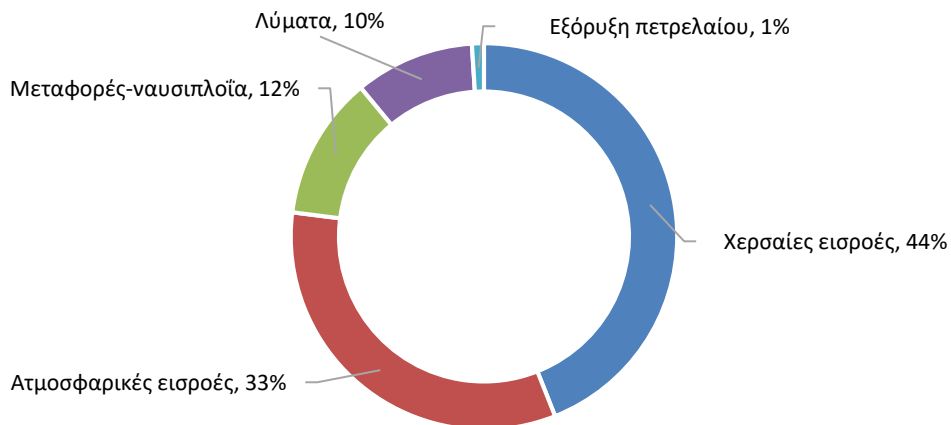
Όλες οι παραπάνω ουσίες έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα (υγρά αστικά, βιομηχανικά ή νοσοκομειακά απόβλητα, επιφανειακά νερά, πόσιμο νερό, ιζήματα, έδαφος, κ.ά.) σε εύρος συγκεντρώσεων από μερικά ng L^{-1} έως χιλιάδες mg L^{-1} ανάλογα με το είδος του δείγματος, την περιοχή αλλά και την περίοδο δειγματοληψίας [9]. Η οδηγία 2000/60/EK [2], γνωστή και ως «οδηγία-πλαίσιο για τα νερά» (Water Framework Directive) και η οδηγία 2008/56/EC [10], γνωστή ως «οδηγία για τη θαλάσσια

στρατηγική» (Marine Strategy Framework Directive, MSFD) καθορίζουν τη λίστα με τις ενώσεις που αποτελούν ρύπους προτεραιότητας αλλά και ρύπους υπό παρακολούθηση, για την εκτίμηση της κατάστασης και της ποιότητας των υδάτων που εκτείνονται έως και 12 ναυτικά μίλια από την πλησιέστερη ακτογραμμή.

1.5.2 Ρύπανση υδάτινου περιβάλλοντος

Ως ρύπανση του νερού χαρακτηρίζεται η επιβάρυνση του με ύλη ή ενέργεια. Πρόκειται δηλαδή για ανεπιθύμητη μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών του (φυσικών, χημικών, ραδιολογικών, βιολογικών, μικροβιολογικών), εξαιτίας κυρίως των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, σε βαθμό που μπορεί να προκληθεί κίνδυνος για την υγεία και να υποβαθμιστεί η ποιότητα ζωής του ανθρώπου. Η ρύπανση προκαλεί βλάβη στα φυσικά οικοσυστήματα και παρεμποδίζει τις επιθυμητές χρήσεις των υδάτινων πόρων. Μια ουσία χαρακτηρίζεται ως ρύπος εφόσον η συγκέντρωσή της στο νερό είναι αρκετά μεγαλύτερη από αυτήν που συνήθως συναντάται στα φυσικά αποθέματα του γλυκού νερού.

Το υδάτινο περιβάλλον είναι αυτό που διατρέχει το μεγαλύτερο κίνδυνο από τις ανθρωπογενείς χημικές ουσίες, αφού είναι συνεχής δέκτης βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, βαρέων μετάλλων και μεταλλοειδών, αλογονωμένων και πολυαλογονωμένων ουσιών, φυτοφαρμάκων, πετρελαιοειδών, ραδιενεργών υλικών, ουσιών που δρουν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, αποβλήτων μεταλλευτικών εκμεταλλεύσεων και μεγάλου αριθμού επικίνδυνων φερτών υλικών που παρασύρονται από τα ποτάμια και τους χείμαρρους καταλήγοντας στη θάλασσα [11]. Οι σημειακές πηγές ρύπανσης των επιφανειακών υδάτινων σωμάτων, σχετίζονται με απορροές ρυπαντικών φορτίων, κυρίως από τα αστικά υγρά απόβλητα από οικισμούς που εξυπηρετούνται από δίκτυα αποχέτευσης και κεντρικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, την εσταυλισμένη κτηνοτροφία, τη βιομηχανία και τους χώρους ανεξέλεγκτης διάθεσης απορριμμάτων (ΧΑΔΑ). Δευτερεύουσας σημασίας πηγές ρύπανσης είναι οι ιχθυοκαλλιέργειες, οι Χώροι Υγειονομικής Ταφής (ΧΥΤΑ) και τα μεταλλεία – λατομεία. Η ρύπανση των θαλασσών και η υποβάθμιση των παράκτιων περιοχών είναι εξίσου ανησυχητική λόγω του τεράστιου αριθμού χημικών ουσιών που καταλήγουν στο θαλάσσιο περιβάλλον, κυρίως διαμέσου των ποταμών και των άμεσων εκροών, και ανιχνεύονται στο νερό, στα ιζήματα και στους έμβιους οργανισμούς [25]. Στο Σχήμα 1.5 φαίνονται οι κύριες ανθρωπογενείς πηγές θαλάσσιας ρύπανσης.



Σχήμα 1.5 Πηγές ρύπανσης στο θαλάσσιο περιβάλλον από τις ανθρώπινες δραστηριότητες
(Πηγή: *European Environmental Agency, EEA*)

Εξίσου σημαντικό ρόλο στο περιβάλλον και τη χημική ρύπανση αυτού διαδραματίζουν τα ιζήματα. Τα ιζήματα είναι πολύπλοκα υποστρώματα, με πορώδη δομή η οποία περιέχει οργανικά και ανόργανα συστατικά και η προσροφητική τους ικανότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την περιεκτικότητά τους σε άμμο, άργιλο και οργανική ύλη [12]. Λόγω της χαρακτηριστικής τους δομής ενέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στο περιβάλλον, παρεμποδίζοντας τη ρύπανση των παρακείμενων σε αυτά οικοσυστημάτων. Τελευταία, τα ιζήματα υπόκεινται σε εκτεταμένη χημική ρύπανση καθώς οι οργανικοί ρύποι που υπόκεινται διάφορες φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις με ανόργανα και οργανικά συστατικά δεν έχουν μόνο άμεσες αρνητικές επιπτώσεις στα ζώα και στον άνθρωπο αλλά επίσης υποβαθμίζουν την ποιότητα κι τις ιδιότητες του εδάφους και των ιζημάτων.

Σύμφωνα με την Οδηγία Πλαίσιο, στα υδάτινα συστήματα των υπόγειων νερών και στα υδάτινα σώματα των επιφανειακών νερών που γίνεται άντληση-απόληψη νερού με σκοπό την ύδρευση θα πρέπει να εφαρμόζονται κατάλληλα μέτρα προστασίας ώστε να αποφεύγεται η υποβάθμιση της ποιότητάς τους και να είναι εφικτή η περαιτέρω επεξεργασία-καθαρισμός που απαιτείται για την παραγωγή πόσιμου ύδατος.

1.6 Παρουσία φυτοπροστατευτικών φαρμακευτικών ενώσεων στο υδάτινο περιβάλλον

Η εκτεταμένη χρήση των φυτοφαρμάκων και τα υψηλά επίπεδα κατανάλωσης φαρμακευτικών ουσιών, καθώς και η ανεπαρκής εφαρμογή της τεχνολογίας για την

εξυγίανση των υδάτων έχουν ως αποτέλεσμα την ανίχνευση των ενώσεων αυτών στο υδάτινο περιβάλλον. Η ύπαρξη τέτοιων μικρορύπων στο περιβάλλον μπορεί αποδεδειγμένα να επιφέρει μη αναστρέψιμα αποτελέσματα. Το χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι οι διαταραχές που προκαλούν στο ενδοκρινικό σύστημα των ζώντων οργανισμών, οι οποίες επηρεάζουν την ανάπτυξη, την ψυχολογία και την αναπαραγωγή τους αλλά οδηγούν επίσης σε ανοσοκαταστολή και σε μεταλλάξεις [13].

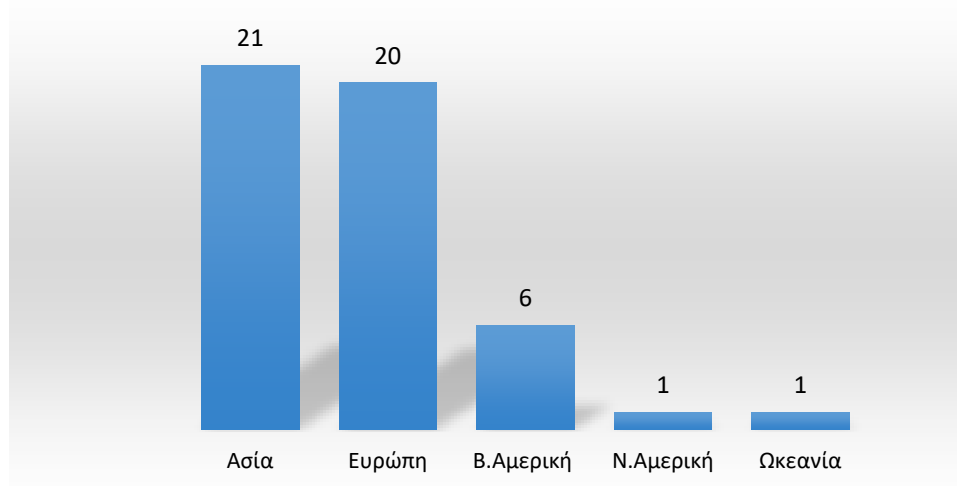
Ειδικά η παρουσία των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον έχει μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, ωστόσο εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο μελέτης των επιστημών του περιβάλλοντος και της αναλυτικής χημείας, αφού ανιχνεύονται πολύ συχνά σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα, πολλές φορές σε υψηλές συγκεντρώσεις, προκαλούν τη ρύπανση των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων, των ιζημάτων και του εδάφους, προκαλώντας αναπόφευκτα σημαντικές οικοτοξικολογικές επιπτώσεις στη χλωρίδα, την πανίδα και τελικά τον άνθρωπο. Είναι επίσης πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι είναι ουσίες με πιθανή ενδοκρινική δράση [14].

Επιπλέον, η ανεξέλεγκτη χρήση των φαρμάκων και των αντιβιοτικών και η ανεπαρκής απομάκρυνση τους στις Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) έχει οδηγήσει στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών πολλών παθογόνων μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την ύπαρξη ενός ακόμα κινδύνου για τον ανθρώπινο οργανισμό και τα οικοσυστήματα. Ωστόσο, γεγονός ακόμα πιο ανησυχητικό από τη ρύπανση των υδάτων από τέτοιες ουσίες είναι η ταυτόχρονη ύπαρξη αυτών, των μεταβολιτών τους και των παραπροϊόντων τους, αφού φαίνεται πως ο κίνδυνος και η τοξικότητα πολλαπλασιάζεται σε αυτές τις περιπτώσεις λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ όλων αυτών των ουσιών.

Για τη διασφάλιση της ανθρώπινης υγείας, η ΕΕ και άλλες νομοθετικές αρχές παγκοσμίως (WHO, EPA κ.ά.), έχουν θεσπίσει ανώτερα όρια συγκεντρώσεων για διάφορους μικρορύπους, γνωστά ως ανώτατα όρια καταλοίπων (maximum residue limits, MRLs). Από το 1989, τέτοια MRLs έχουν θεσπιστεί για τα υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων που εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα για περισσότερες από 140 ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και των αντιβιοτικών. Όσον αφορά τα επιφανειακά ύδατα, με την οδηγία 2013/39/ΕΕ θεσπίστηκαν ανώτατες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις (maximum allowable concentrations, MACs) που αφορούν 21 φυτοπροστατευτικές ενώσεις, ενώ για τα ιζήματα δεν έχουν θεσπιστεί ακόμα αντίστοιχα όρια.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα υπάρχοντα δεδομένα για την περιβαλλοντική τύχη των ρύπων στα γλυκά νερά δεν είναι κατ'ανάγκη ανάλογα για το θαλάσσιο περιβάλλον (Σχήμα 1.6). Αυτό συμβαίνει λόγω σημαντικών διαφορών στις φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η

αλατότητα, το pH και η οργανική ύλη που μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά των ρύπων στο θαλάσσιο περιβάλλον [15]. Η περιβαλλοντική τύχη των ιονιζόμενων φαρμακευτικών ενώσεων μπορεί για παράδειγμα να επηρεαστεί από αυξημένο pH στο θαλάσσιο νερό. Επίσης, η φωτοδιάσπαση μπορεί να είναι λιγότερο αποτελεσματική ως προς την απομάκρυνση των φαρμακευτικών στο θαλάσσιο περιβάλλον σε σχέση με πιο ρηχά γλυκά νερά, λόγω της μικρότερης απορρόφησης ηλιακού φωτός. Οι μηχανισμοί έμμεσης φωτοδιάσπασης επίσης μπορεί να είναι διαφορετικοί λόγω των διαφορών στη σύσταση του νερού [16, 17].



Σχήμα 1.6 Δημοσιευμένες εργασίες για την παρουσία φαρμακευτικών ενώσεων σε παράκτια ύδατα (2000-2014) [18]

Οι συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων στα θαλάσσια νερά οφείλονται κυρίως στην απόσταση από τις εκροές των ΜΕΥΑ [19, 20], την υψηλή ροή στις εκροές [21], το μέγεθος και τον πληθυσμό της αστικής περιοχής [22–24], τον αριθμό των ποταμών που εκβάλλουν στις παράκτιες περιοχές [23], τον τύπο επεξεργασίας των λυμάτων στις ΜΕΥΑ [25], το χαμηλό ρυθμό υδροδυναμικής ανάμειξης και αραιώσης στις εκροές των ΜΕΥΑ [26], την υδροδυναμική έκπλυση και το χρόνο παραμονής για τα περικλειστα υδάτινα σώματα [27–29], τον τύπο, την κλίμακα και την πυκνότητα της κτηνοτροφίας [30, 31] και τη μικρή απόσταση από υδατοκαλλιέργειες [29]. Υψηλότερες συγκεντρώσεις φαρμακευτικών ενώσεων έχουν επίσης υπολογιστεί σε εκβολές εν αναμονή και κατά τη διάρκεια άμπωτης [32]. Τέλος, οι τοπικές συνθήκες ενδέχεται να εμποδίσουν την επεξεργασία των λυμάτων, με

αποτέλεσμα υψηλότερες συγκεντρώσεις στα επιφανειακά ύδατα. Για παράδειγμα, οι αρκτικές συνθήκες του μόνιμα παγωμένου υπεδάφους μειώνουν την αποδοτικότητα των ΜΕΥΑ [33]

Τα ιζήματα αποτελούν δεξαμενή συσσώρευσης ρύπων σε θαλάσσια οικοσυστήματα και μπορούν να λειτουργήσουν ως δευτερεύουσα πηγή ρύπανσης από την οποία τα φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να απελευθερωθούν εξαιτίας αλλαγών στις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η αλατότητα και το pH [34]. Τα ιζήματα μπορούν να επαναιωρηθούν κατά τη διάρκεια παλιρροϊκών αλλαγών ή μεγάλων καταιγίδων, εκθέτοντας το θαλάσσιο βιοτικό περιβάλλον στους προηγούμενως προσροφημένους ρύπους. Η επαναιώρηση των ιζημάτων κατά τη διάρκεια ακραίων καιρικών φαινομένων όπως μουσώνες και επερχόμενες παλίρροιες μπορεί επίσης να αυξήσει τη συγκέντρωση των φαρμακευτικών στα επιφανειακά νερά. Επίσης, υπάρχει διαστρωμάτωση των φαρμακευτικών ενώσεων στην υδάτινη στήλη με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να ανιχνεύονται στην επιφάνεια [25, 35].

Οι υδατοκαλλιέργειες δύνανται να αποτελούν έναν από τους πλέον στρεσογόνους παράγοντες των παράκτιων οικοσυστημάτων, εισάγοντας σε αυτά διάφορους ρύπους όπως τα φαρμακευτικά και τα βιοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και την πρόληψη των ασθενειών που μπορεί να εμφανιστούν στους πληθυσμούς καθώς και τα φυτοφάρμακα, που καταλήγουν εκεί μέσω πολλαπλών οδών και προσλαμβάνονται από τους υδρόβιους οργανισμούς είτε με την τροφή, μέσω του πεπτικού συστήματος, είτε από το νερό, σε διαλυμένη ή αιωρούμενη μορφή, μέσω των βραγχίων τους. Επίσης, τα συστατικά των εμπορικών διαθέσιμων τροφών για τα ψάρια μπορεί να εγκυμονούν κινδύνους, Έχει αναφερθεί ότι στις ιχθυοτροφές ανιχνεύονται υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων, επίμονοι οργανικοί ρύποι (persistent organic pollutants, POPs), φυτοφάρμακα, ανόργανα άλατα και μέταλλα (χαλκός, μόλυβδος, κάδμιο, εξασθενές χρώμιο, σελήνιο, αρσενικό) [36].

Ο προσδιορισμός ρύπων στις υδατοκαλλιέργειες είναι πολύ σημαντικός για τον έλεγχο της ασφάλειας των τροφίμων και των παραγόμενων οργανισμών. Ο εμπλουτισμός των νερών των ιχθυοκαλλιεργειών με οργανική ύλη από τα ιζήματα είναι επίσης πολύ σημαντικός για αυτό και την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού είναι πολύ σημαντική η συστηματική παρακολούθηση τόσο των νερών όσο και των ιζημάτων. Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την παρουσία ρύπων στα απόβλητα των μονάδων υδατοκαλλιεργειών, οι οποίες αποτελούν ένα σημαντικό ζήτημα για το χαρακτηρισμό και την κατανομή των ρύπων στις υδατοκαλλιέργειες.

1.7 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά οργανικών ρύπων

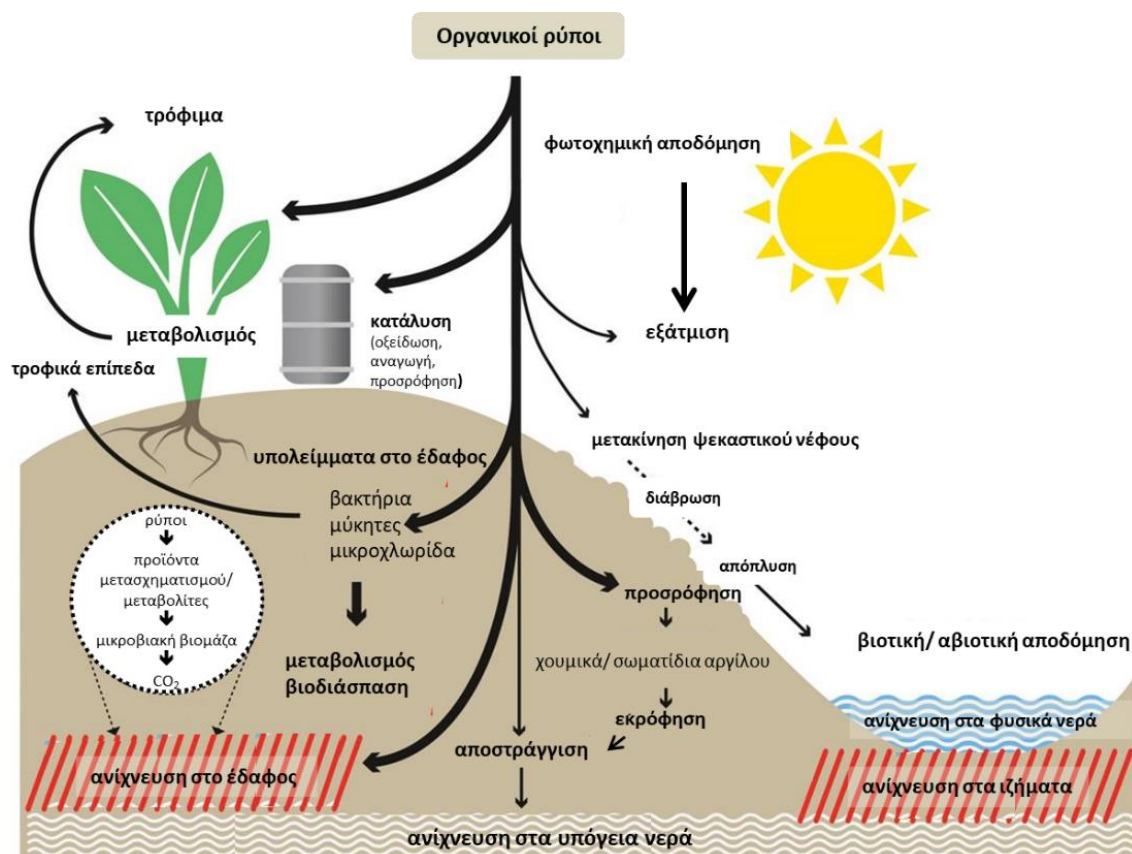
Οι οργανικοί ρύποι, με την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον υπόκεινται σε μια σειρά διεργασιών μεταφοράς, συγκράτησης και μετατροπής με αποτέλεσμα να κατανέμονται στο περιβάλλον και τα υπολείμματά τους να ανιχνεύονται σε φυτά, σε εδάφη, σε υδάτινα οικοσυστήματα και κατά συνέπεια στα ανώτερα είδη της τροφικής αλυσίδας όπως τα πουλιά, τα ψάρια, τα ζώα και τέλος τον άνθρωπο. Σημειώνεται ότι στα ανιχνευόμενα υπολείμματα περιλαμβάνονται και οι ουσίες που είναι προϊόντα διάσπασης, μεταβολισμού ή χημικής αντίδρασης εφόσον είναι τοξικολογικά σημαντικές.

Οι ρύποι εισχωρούν στο υδάτινο οικοσύστημα είτε άμεσα, μέσω απευθείας απόθεσης (π.χ. εφαρμογή φυτοφαρμάκων, διάθεση ληγμένων ή αχρησιμοποίητων φαρμάκων), είτε έμμεσα, μέσω της έκπλυσης και επιφανειακής απορροής από τους αγρούς, λόγω ατυχημάτων σε σημειακές πηγές, όπως εργοστάσια παραγωγής και αποθήκες που βρίσκονται κοντά σε επιφανειακούς αποδέκτες, άρδευσης με νερά από την έξοδο των ΜΕΥΑ κ.ά.

Οι ποταμοί αποτελούν ένα σύνθετο και ιδιαίτερου ενδιαφέροντος οικολογικό σύστημα του φυσικού περιβάλλοντος και συνδέονται απευθείας δια των εκβολών με τις ακτές και την ανοιχτή θάλασσα. Έτσι, οι ρύποι μεταφέρονται μέσω της υγρής ή της αέριας φάσης (οι πτητικοί ρύποι σε επαφή με την ατμόσφαιρα) στο περιβάλλον. Τα ποτάμια συστήματα επικοινωνούν επιπλέον με τα υπόγεια ύδατα είτε γιατί τα τελευταία καταλήγουν στο ποτάμι όταν το πιεζομετρικό επίπεδο είναι υψηλότερο από αυτό των νερών του ποταμού είτε διότι ισχύει το αντίστροφο. Στην δεύτερη περίπτωση, οι χημικοί ρύποι που υπάρχουν στο ποτάμι μπορούν να μεταφερθούν στον υδροφόρο ορίζοντα με συνέπεια την ρύπανση αυτού. Κατ' επέκταση, το πόσιμο νερό που προκύπτει από υπόγεια ύδατα μπορεί να θέσει κινδύνους για την υγεία [37].

Τα ιζήματα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά και τύχη των οργανικών ρύπων, αφού αποτελούν τις κύριες λεκάνες απορροής και συχνά σωρεύουν το μεγαλύτερο μέρος αυτών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Όταν οι οργανικοί ρύποι καταλήξουν εκεί μπορεί να προσδεθούν και να μη είναι διαθέσιμοι για το υπερκείμενο οικοσύστημα, να μετασχηματιστούν σε περισσότερο ή λιγότερο τοξικές μορφές τους ή τελικά να μεταναστεύσουν από τα ιζήματα στους βενθικούς οργανισμούς ή στα υπερκείμενα ύδατα. Εν τέλει, μπορεί να εισαχθούν στην τροφική αλυσίδα περνώντας στα ψάρια, την άγρια πανίδα και τον άνθρωπο. Επίσης, η χαμηλή ικανότητα ανανέωσης των ιζημάτων, σε σύγκριση με τα υδάτινα σώματα ή την ατμόσφαιρα καθώς και το γεγονός ότι η ιζηματοποίηση είναι αποτέλεσμα διαφόρων φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών, τα καθιστούν ως ένα

εξαιρετικά χρήσιμο υπόστρωμα-δείκτη ρύπανσης ικανό να προσφέρει πληροφορίες για τη γενική εκτίμηση της ποιότητας των μελετώμενων συστημάτων, παρέχοντας ταυτόχρονα αξιόπιστα δεδομένα για τη ρύπανση τους διαχρονικά [14]. Το Σχήμα 1.7 απεικονίζει συνοπτικά την περιβαλλοντική τύχη των οργανικών ρύπων στο περιβάλλον.



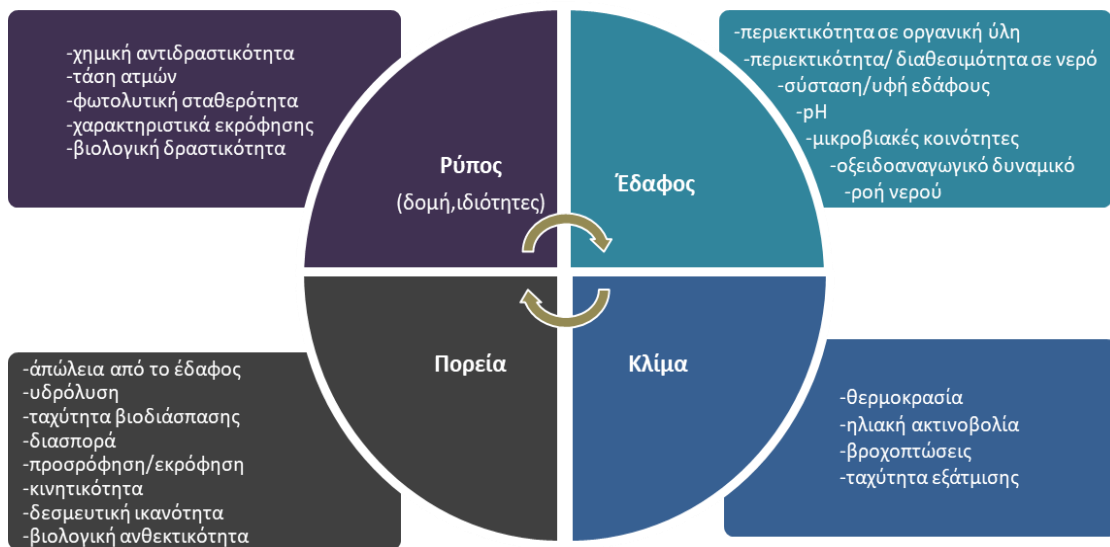
Σχήμα 1.7 Περιβαλλοντική τύχη οργανικών ρύπων (Αναπροσαρμογή από: Helmholtz Centre for Environmental Research, UFZ)

1.7.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την περιβαλλοντική τύχη των μικρορύπων

Οι ρύποι από την στιγμή της εισαγωγής τους στο περιβάλλον υπόκεινται σε ποικίλες φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες μετατροπής και μεταφοράς. Η τύχη και η παραμονή των χημικών ενώσεων στο φυσικό περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ρύπων (τάση ατμών, διαλυτότητα στο νερό, και λιποφιλία), τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του μέσου στο οποίο βρίσκεται ο ρύπος (pH, υφή του εδάφους και περιεκτικότητα σε οργανική ύλη), οι

εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής (υγρασία του εδάφους, θερμοκρασία) και οι τρόποι διαχείρισης αυτών.

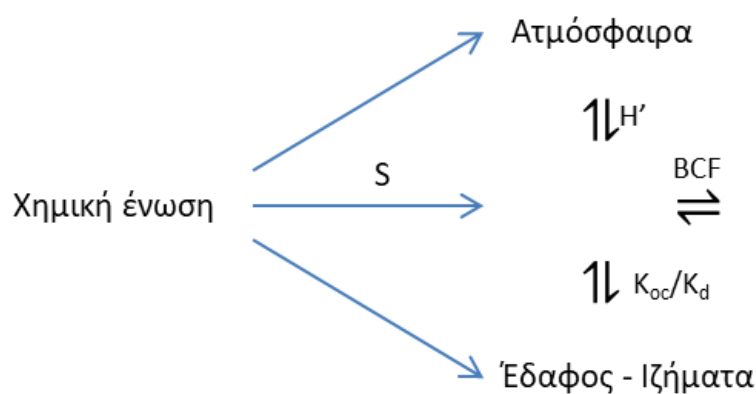
Οι κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες που επηρεάζουν την τύχη των ρύπων είναι η διαλυτότητα και η πτητικότητα. Γενικά, οι πολικές ενώσεις βρίσκονται κυρίως στη διαλυτή φάση και προσδένονται σε πολικές θέσεις της αιωρούμενης φάσης, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τις μη πολικές. Οι ιδιότητες του εδάφους και των ιζημάτων όπως η υφή, η δομή και η διαπερατότητα παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των προσροφημένων μορίων των ενώσεων στα σωματίδια της αργίλου και της οργανικής ύλης. Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση της οργανικής ύλης του εδάφους και της υγρασίας που αυτή περικλείει στην τύχη των ρύπων. Επιπλέον, οι κλιματολογικές και μορφολογικές συνθήκες της περιοχής επιδρούν στην κατανομή τους στο περιβάλλον. Άλλες σημαντικές παράμετροι είναι οι βροχοπτώσεις, το βάθος στο οποίο βρίσκεται ο υδροφόρος ορίζοντας, η στατικότητα ή όχι του νερού, η μορφή και η ταχύτητα ροής, το pH, η αλατότητα και η περιεχόμενη βιομάζα του υδάτινου συστήματος της περιοχής. Το Σχήμα 1.8 απεικονίζει τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την περιβαλλοντική τύχη των οργανικών ρύπων.



Σχήμα 1.8 Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την περιβαλλοντική τύχη των μικρορύπων

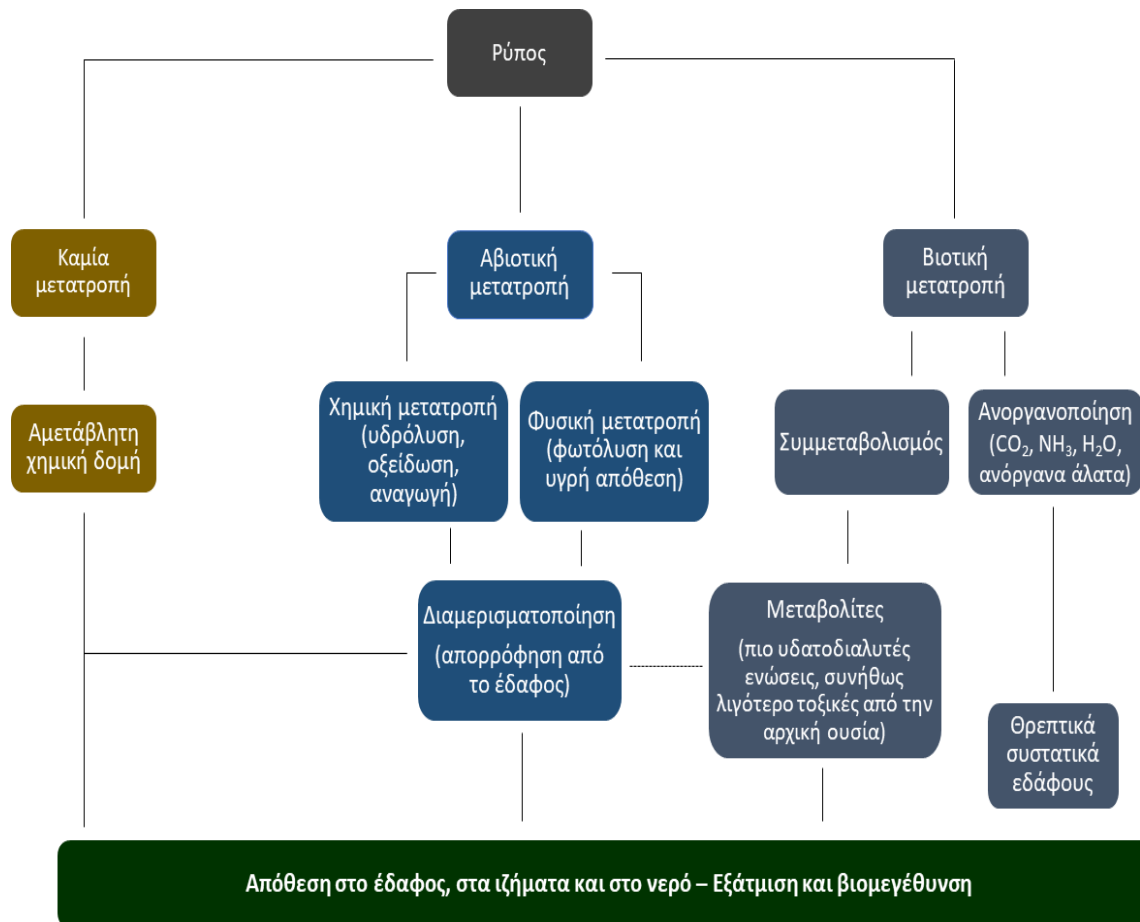
1.7.2 Διεργασίες μεταφοράς και μετατροπή των οργανικών μικρορύπων στο περιβάλλον

Μετά την απομάκρυνση από τα σημεία εφαρμογής τους, οι οργανικοί ρύποι διασπείρονται στο περιβάλλον και κατανέμονται μεταξύ των διαφόρων συστημάτων του, μέσω των διεργασιών μεταφοράς και μετατροπής. Η κατανομή τους ρυθμίζεται από τους συντελεστές κατανομής μεταξύ νερού-ιζήματος, νερού-φυσικών λιπιδίων και νερού-αέρα. Στο Σχήμα 1.9 συνοψίζονται οι ιδιότητες αυτές και οι σχέσεις τους με τα στοιχεία του περιβάλλοντος.



Σχήμα 1.9 Κατανομή των χημικών ενώσεων στα περιβαλλοντικά συστήματα σε σχέση με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες [37] (S:διαλυτότητα στο νερό, H': σταθερά Henry, BCF: συντελεστής βιοσυγκέντρωσης, K_{oc}/K_d : σταθερές κατανομής στα ιζήματα)

Οι οργανικοί μικρορύποι κατανέμονται στο περιβάλλον βάσει φυσικών διεργασιών, όπως η ιζηματοποίηση, η προσρόφηση και η εξάτμιση. Μπορούν επίσης να αποικοδομηθούν μέσω χημικών και βιολογικών διεργασιών. Οι χημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο νερό και την ατμόσφαιρα ακολουθούν μια από τις τέσσερις αντιδράσεις (α) οξείδωση, (β) αναγωγή, (γ) υδρόλυση και (δ) φωτοδιάσπαση. Οι βιολογικοί μηχανισμοί στα εδάφη ή τα ιζήματα και στους ζωντανούς οργανισμούς διέπονται συνήθως από αντιδράσεις όπως η οξείδωση, η αναγωγή, η υδρόλυση και η σύζευξη. Οι διεργασίες αυτές παρουσιάζονται συνοπτικά στο Σχήμα 1.10.



Σχήμα 1.10 Διεργασίες μεταφοράς και μετατροπής των οργανικών μικρορύπων στο περιβάλλον

Εξάτμιση

Η διεργασία μεταφοράς ενός ρύπου από το νερό ή το έδαφος στην αέρια φάση αποτελεί την εξάτμιση. Η μεταφορά είναι ανάλογη της πτητικότητας και εξαρτάται τόσο από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ένωσης (τάση ατμών, διαλυτότητα, συμπεριφορά κατά την προσρόφηση και την παραμονή στην επιφάνεια των σωματιδίων) όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και η κίνηση του αέρα.

Έκπλυση

Η διεργασία της έκπλυσης αναφέρεται κυρίως στην μεταφορά των οργανικών ρύπων προς τα βαθύτερα στρώματα του εδάφους υπό την επίδραση του νερού. Ο βαθμός έκπλυσης εξαρτάται κυρίως από τη διαλυτότητα της ένωσης στο νερό και το συντελεστή κατανομής της ουσίας στην οργανική ύλη του εδάφους, K_{oc} .

Φωτοδιάσπαση

Το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που απαιτείται για την πρόκληση περιβαλλοντικών μετατροπών των ρύπων προέρχεται απευθείας από την ηλιακή ακτινοβολία. Οι ρύποι, που είναι διαλυμένοι ή αιωρούμενοι στην υδατική ή αέρια φάση, μπορούν να απορροφήσουν ακτινοβολία και να διασπαστούν αυθόρμητα ή αντιδρώντας με παραγόμενες από την ακτινοβολία ενώσεις. Η φωτόλυση μπορεί να είναι άμεση όπου γίνεται απευθείας απορρόφηση της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας από την διασπώμενη ένωση ή έμμεση, όπου η ακτινοβολία απορροφάται από μόρια άλλων ουσιών στον αέρα ή το νερό, τα οποία στην συνέχεια αντιδρούν με τα μόρια των ρύπων, είτε παράγουν δραστικές ελεύθερες ρίζες που με τη σειρά τους συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οδηγώντας στη διάσπαση του ρύπου.

Η φωτοδιάσπαση των ρύπων στο υδάτινο περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως την ένταση του φωτός και το μήκος κύματος, τη θολρότητα του νερού, το pH και την περιεχόμενη οργανική ύλη. Η τελευταία αποτελεί ίσως τον σημαντικότερο παράγοντα που μπορεί να επιταχύνει ή να επιβραδύνει τη φωτοδιάσπαση ανάλογα με την προέλευση του νερού [37].

Υδρόλυση

Η υδρόλυση είναι η κατεχοχόν διεργασία διάσπασης των ρύπων στο νερό. Η υδρόλυση συνίσταται στη διάσπαση των μορίων του νερού σε H^+ και OH^- και την αντίδραση των παραπάνω ιόντων με τα οργανικά μόρια. Το ποσοστό υδρόλυσης γενικά εκφράζεται μέσω του χρόνου ημισείας ζωής αυτού που μπορεί να ποικίλει από μερικά λεπτά μέχρι πολλούς μήνες. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την υδρόλυση μιας χημικής ένωσης στα νερά είναι η θερμοκρασία όπου συνήθως η αύξηση αυτής συνεπάγεται την αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης, το pH και η παρουσία διαλυμένης οργανικής ουσίας (Dissolved Organic Matter, DOM).

Προσρόφηση

Η προσρόφηση είναι μια φυσικοχημική διεργασία κατά την οποία τα μόρια ή ιόντα μιας χημικής ουσίας έλκονται και συγκρατούνται από την επιφάνεια ενός στερεού σώματος. Χαρακτηρίζεται ως χημική προσρόφηση όταν οι δεσμοί προσροφηθέντος-προσροφητικού είναι ισχυροί (ομοιοπολικοί δεσμοί, δεσμοί ηλεκτροστατικής φύσεως) και είναι μη

αντιστρεπτή διεργασία. Στην περίπτωση που αναπτύσσονται ασθενείς δεσμοί (δεσμοί υδρογόνου, Van der Waals) χαρακτηρίζεται ως φυσική και είναι αντιστρεπτή διαδικασία.

Η ένταση με την οποία λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της προσρόφησης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι η θερμοκρασία του συστήματος, το pH, η επιφάνεια και η κατανομή μεγέθους σωματιδίων του στερεού, η αλατότητα, το είδος του εδάφους (περιεχόμενο σε άργιλο ή σε οργανική ύλη), η ικανότητα ιοντοανταλλαγής καθώς και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ρύπων όπως η διαλυτότητα, ο όξινος ή βασικός χαρακτήρας τους, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης - νερού, η πτητικότητα και το μέγεθος και σχήμα των μορίων τους. Μια ποσοτική έκφραση της προσρόφησης ενός ρύπου στο έδαφος είναι ο συντελεστής κατανομής της ουσίας στην οργανική ύλη του εδάφους (Organic Carbon Partition Coefficient, K_{oc}) και αποτελεί δείκτη της κινητικότητάς του στο έδαφος. Χαμηλές τιμές K_{oc} υποδηλώνουν μεγαλύτερη πιθανότητα έκπλυσης των ρύπων και κατά συνέπεια μεγάλη πιθανότητα ρύπανσης των υπογείων υδάτων.

Βιολογική μετατροπή

Οι οργανικοί ρύποι, με την εισαγωγή τους στο περιβάλλον, μπορεί προσλαμβάνονται από τους οργανισμούς. Η χλωρίδα και η πανίδα εμπλέκεται στη διαδικασία με τέσσερις τρόπους [37]:

1. Οι ρύποι συσσωρεύονται στο σώμα και παρουσιάζουν τοξικότητα για τον οργανισμό ή ακόμα επιφέρουν και το θάνατο. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται από τους όρους βιοσυσσώρευση και βιοσυγκέντρωση. Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (bioconcentration factor, BCF) ορίζεται ως το πηλίκο της συγκέντρωσης του ρύπου στον ιστό του οργανισμού προς τη συγκέντρωση του ρύπου στο νερό. Όταν η πρόσληψη των ρύπων δεν είναι άμεση από το νερό χρησιμοποιείται ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης (bioaccumulation factor, BAF). Αυτός ορίζεται ως το πηλίκο της συγκέντρωσης του ρύπου στον ιστό του οργανισμού προς τη συγκέντρωση του ρύπου σε κάποιο περιβαλλοντικό υπόστρωμα (νερό, ίζημα, τροφή κ.α). Η βιοσυσσώρευση εκτιμάται βάσει δύο παραγόντων: του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης και του συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}). Ο πρώτος καθορίζει την δυνατότητα μιας ένωσης για βιοσυσσώρευση σε έναν οργανισμό και ο δεύτερος αποτελεί το μέτρο μεταφοράς της ένωσης από την υδατική στην οργανική φάση.

2. Μπορούν επίσης να μεταφερθούν μέσω της τροφικής αλυσίδας και να συσσωρευτούν σε οργανισμούς που βρίσκονται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας, όπως τα άγρια πουλιά και ο άνθρωπος. Ο όρος που περιγράφει αυτήν τη διεργασία είναι η βιομεγέθυνση και

χρησιμοποιείται όταν η συγκέντρωση του οργανικού ρύπου σε έναν οργανισμό είναι υψηλότερη από αυτή στην τροφή που καταναλώνει.

3. Επιπλέον μπορούν να μεταβολιστούν από τους οργανισμούς και να αποβληθούν στη συνέχεια στο περιβάλλον. Η βιομετατροπή αυτή συμβαίνει σε ορισμένα ζώα του νερού και στους μύκητες.

4. Τέλος, οι ρύποι μπορεί να βιοδιασπαστούν σε τελικά προϊόντα όπως CO₂, CH₄ και H₂O και ανόργανα υλικά από ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών που είτε μεταβολίζουν τα υπολείμματα των ρύπων είτε τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και τροφή για την ανάπτυξή τους (συμμεταβολισμός).

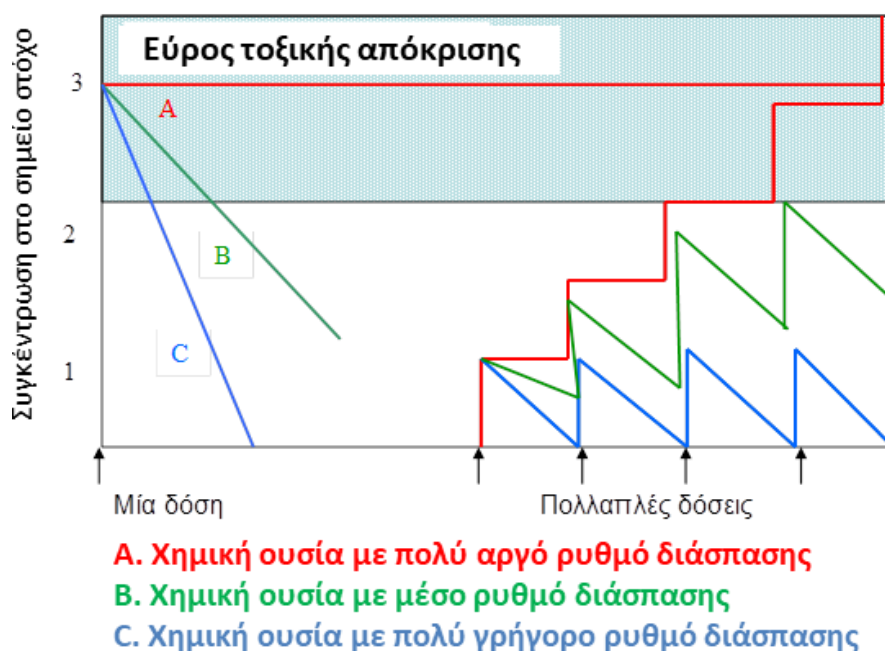
Η βιοτική αποδόμηση αποτελεί πολύ σημαντική διεργασία. Βακτήρια και μύκητες φαίνεται να υιοθετούν διαφορετικές αλλά συμπληρωματικές μεταβολικές οδούς, χρησιμοποιώντας ένα φάσμα ενδοκυτταρικών και εξωκυτταρικών ενζύμων αντιστοίχως για την αποδόμηση των υπολειμματικών γεωργικών φαρμάκων. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να αποδομούν ενεργά τους ρύπους και να τους χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας, μια διαδικασία γνωστή ως καταβολισμός ή να τους μετατρέπουν χωρίς κανένα ενεργειακό όφελος, μια διαδικασία γνωστή ως συμμεταβολισμός [38]. Ιδανικά, ο μικροβιακός μετασχηματισμός των ρύπων θα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή απλούστερων μορίων όπως το CO₂, H₂O, ή ενδιάμεσων που θα μπορούσαν να τροφοδοτούν τον αναβολισμό των μικροοργανισμών (πυροσταφυλικό, ακεταλδεΐδη). Ωστόσο, αυτό δεν συμβαίνει πάντα και η ελλιπής αποδόμηση των γεωργικών φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στην συσσώρευση μεταβολιτών με παρόμοια ή ακόμη υψηλότερη τοξικότητα από τη μητρική ένωση [38].

1.8 Τοξικότητα και εκτίμηση επικινδυνότητας των υπολειμμάτων των μικρορύπων

Ως τοξικότητα ορίζεται η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να προκαλεί εσωτερικές ή εξωτερικές βλάβες στους οργανισμούς. Για να υπάρχει τοξική δράση θα πρέπει οι χημικές ουσίες να εισχωρήσουν σε ένα σημείο-στόχο σε κατάλληλη συγκέντρωση και για κατάλληλο χρονικό διάστημα.

Ανάλογα με τη διάρκεια έκθεσης η τοξικότητα μιας ένωσης χαρακτηρίζεται ως οξεία (όταν η επίδραση γίνεται αισθητή σε χρονικό διάστημα μικρότερο ή ίσο με 24 ώρες), υποξεία (για χρονικό διάστημα μικρότερο ή ίσο με έναν μήνα), υποχρόνια (για 1 με 3 μήνες) και χρόνια (για περισσότερο από 3 μήνες). Η συχνότητα της έκθεσης διαδραματίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα μιας ένωσης (Σχήμα 1.11). Σχετικά με τη χρονική στιγμή της

έκθεσης, συνήθως οι οργανισμοί σε εμβρυική κατάσταση και στα πρώτα στάδια της ζωής τους εμφανίζονται να είναι πιο ευαίσθητοι στη επίδραση των τοξικών ρύπων.



Σχήμα 1.11 Σχέση της συχνότητας της έκθεσης και της τοξικότητας μιας χημικής ένωσης [37]

Η συγκέντρωση του ρύπου στην οποία εκτίθεται ο οργανισμός-στόχος μπορεί από μόνη της να οδηγήσει στην τοξικότητα αλλά και να δρα μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες υπάρχουσες τοξικές ουσίες είτε προσθετικά, είτε συνεργιστικά, είτε ανταγωνιστικά. Επιπλέον, μια μη-τοξική ένωση μπορεί να αποκτήσει τοξική δράση όταν βρεθεί μαζί με μια άλλη ένωση. Η συγκέντρωση μιας ένωσης έχει άμεση σχέση με τη δόση, δηλαδή την ποσότητα της χημικής ένωσης που τελικά παρέχεται σε έναν οργανισμό. Όταν αυτή εκφράζεται ανά μονάδα σωματικού βάρους θα πρέπει να αναφέρεται ως δοσολογία (mg χημικής ένωσης/Kg σωματικού βάρους). Τέλος, η ευπάθεια του βιολογικού συστήματος μπορεί επίσης να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα που επιδρά στην τοξικότητα.

Οι κυριότεροι οδοί έκθεσης είναι η κατάποση, η εισπνοή και η δερματική επαφή. Η τοξικότητα των υπολειμμάτων εκτιμάται μέσα από μια σειρά in vivo και in vitro δοκιμών σε πειραματόζωα. Η απόκριση σε μια δόση που ορίζει την τοξικότητα μπορεί να είναι οποιαδήποτε αλλαγή παρατηρείται από τη φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού. Αυτή μπορεί να είναι τοπική ή συστηματική, αντιστρεπτή ή όχι, άμεση ή βραδεία, βαθμωτή ή κβαντισμένη.

Η επικινδυνότητα των τοξικών ουσιών εκφράζεται με δύο δείκτες βάσει ενός επιπέδου δόσης κάτω από το οποίο καμία επίδραση δεν παρατηρείται ή η απόκριση δεν είναι μετρήσιμη (threshold). Ο δείκτης NOAEL (No-Observable-Adverse-Effect-Level) εκφράζει το επίπεδο κάτω από το οποίο δεν παρατηρείται αρνητική επίδραση και ουσιαστικά υποδεικνύει την υψηλότερη έκθεση χωρίς αρνητική επίδραση. Ο δείκτης LOAEL (Lowest-Observable-Adverse-Effect-Level) εκφράζει από την άλλη το χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης που σχετίζεται με κάποια αρνητική επίδραση. Και οι δύο δείκτες σχετίζονται με τη χρόνια τοξικότητα.

Σχετικά με την οξεία επίδραση μιας τοξικής ένωσης χρησιμοποιείται ως απόκριση η θνησιμότητα και οι συντελεστές που την περιγράφουν είναι η θανατηφόρος συγκέντρωση (LC₅₀, Lethal Concentration) και θανατηφόρος δόση (LD₅₀, Lethal Dose) που προσδιορίζουν τη συγκέντρωση της ουσίας ή τη δόση (σε mg/Kg βάρους πειραματόζωου) αντίστοιχα που απαιτείται για τη θανάτωση του 50% ενός πληθυσμού πειραματόζωων που έλαβαν εφάπαξ την εν λόγω δόση ή εκτέθηκαν στη συγκεκριμένη συγκέντρωση.

Η επαφή του ανθρώπου με τους ρύπους μπορεί να είναι άμεση (π.χ. κατά την εφαρμογή ενός φυτοφαρμάκου) ή έμμεση, που είναι και ο πιο συνηθισμένος τρόπος. Στην τελευταία περίπτωση ο καταναλωτής εκτίθεται μέσω των καταλοίπων τους στο νερό και σε γεωργικά προϊόντα όπως φρούτα και λαχανικά. Η επίδραση της έμμεσης έκθεσης στον άνθρωπο μπορεί να είναι χειρότερη από την άμεση ιδιαίτερα για ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού όπως τα παιδιά και οι ηλικιωμένοι. Η χρόνια έκθεση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος, σεξουαλικές δυσλειτουργίες, καρκίνους, στειρότητα, γενετικές δυσμορφίες και καταστροφή του νευρικού και γενετικού συστήματος. Ο κίνδυνος έκθεσης του ανθρώπου στους εν δυνάμει τοξικούς ρύπους χαρακτηρίζεται βάσει των ακόλουθων δόσεων αναφοράς (αποδεκτά όρια έκθεσης), οι οποίες εκφράζονται σε :

1. Αποδεκτή Ημερήσια Δόση (ADI, Acceptable Daily Intake): Ορίζεται ως η ημερήσια δόση δραστικής ουσίας, η οποία χορηγούμενη καθημερινά για όλη τη διάρκεια της ζωής του ενήλικα, με βάση τα γνωστά στοιχεία δεν ενέχει κίνδυνο για την υγεία του
2. Οξεία Δόση Αναφοράς (ARfD, Acute Reference Dose): Ορίζεται ως η ημερήσια δόση δραστικής ουσίας, η οποία χορηγούμενη σε ένα γεύμα ή μια ημέρα, με βάση τα γνωστά στοιχεία δεν ενέχει κίνδυνο για την υγεία του
3. Αποδεκτό Επίπεδο Έκθεσης Χειριστή (AOEL, Acceptable Operator Exposure Level): Ορίζεται ως το ημερήσιο επίπεδο έκθεσης των χειριστών-ανθρώπων που εργάζονται με τοξικούς ρύπους τακτικά (για περίοδο ημερών, εβδομάδων ή μηνών)

Ωστόσο, γεγονός είναι ότι ο άνθρωπος δεν εκτίθεται μόνο σε μια ένωση αλλά σε σύνθετα μείγματα χημικών ενώσεων για τα οποία δεν υπάρχουν ακόμη επαρκείς μελέτες εκτίμησης της επικινδυνότητας. Είναι λοιπόν πολύ δύσκολο έως απίθανο να γίνει εκτίμηση της συνολικής αποτελεσματικής επίδρασης στην υγεία του ανθρώπου όλων των ουσιών που σήμερα χρησιμοποιούνται αφού η απαιτούμενη μεθοδολογία δεν είναι ακόμη διαθέσιμη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ & ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ



ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

A. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

2.1 Ιστορική αναδρομή

Ο μεγάλος αριθμός ανθρωπογενών ρύπων που καταλήγουν στο περιβάλλον περιλαμβάνει μεταξύ πολλών άλλων κατηγοριών ουσιών τα φυτοφάρμακα ή γεωργικά φάρμακα ή φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Η πρώτη γνωστή εφαρμογή φυτοφαρμάκου ήταν το στοιχειακό θείο που χρησιμοποιούσαν οι αρχαίοι Σουμέριοι περίπου 4500 χρόνια πριν, στην αρχαία Μεσοποταμία [39]. Μέχρι το 15^ο αιώνα, τοξικές χημικές ουσίες, όπως το αρσενικό, ο υδράργυρος και ο μόλυβδος εφαρμόζονταν στις καλλιέργειες για να σκοτώσουν τα παράσιτα. Το 17^ο αιώνα, όταν η νικοτίνη άρχισε να απομωνώνεται από τα φύλλα καπνού, άρχισε να χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο, ενώ το 19^ο αιώνα εισάγονται δύο νέα φυσικά φυτοφάρμακα, το πύρεθρο, το οποίο προέρχεται από χρυσάνθεμα και η ροτενόνη, η οποία προερχόταν από τις ρίζες τροπικών λαχανικών [40].

Πριν την ανακάλυψη και την επακόλουθη ανάπτυξη των σύγχρονων φυτοφαρμάκων, η έλλειψη τροφής εξαιτίας της εκτεταμένης καταστροφής των τροφίμων από τα παράσιτα, αποτελούσε σοβαρή απειλή για τους ανθρώπους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο

περιβόητος «Λιμός της Ιρλανδίας» ή «Ιρλανδικός λιμός της πατάτας», που έλαβε χώρα κατά το 19^ο αιώνα και παραμένει ένα από τα πιο σοβαρά περιστατικά που συντελέστηκαν στη νεότερη ιστορία. Την περίοδο αυτή, εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν και πολλοί άλλοι αναγκάστηκαν να μεταναστεύσουν. Ως ένα βαθμό, αυτός ο λιμός ήταν αποτέλεσμα του λεγόμενου περονόσπορου της πατάτας (late blight of potato), μιας μυκητιακής λοίμωξης που εξαφάνισε την καλλιέργεια πατάτας που αποτελεί βασική τροφή. Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα ήταν η καταστροφή καλλιεργειών πατάτας στη Γερμανία και πάλι από μύκητες, στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, το οποίο είχε ως αποτέλεσμα 700000 θανάτους λόγω υποσιτισμού.

Τα φυτοφάρμακα έκτοτε αποτέλεσαν βασικά εργαλεία στη βιώσιμη παραγωγή τροφίμων και άλλων αγροτικών προϊόντων υψηλής ποιότητας. Με την εισαγωγή τους στην αγορά, η παραγωγικότητα αυξήθηκε σημαντικά, αφού οι αγρότες ήταν πλέον σε θέση να παράγουν προϊόντα με υψηλότερες αποδόσεις χρησιμοποιώντας μικρότερες εκτάσεις. Τα φυτοφάρμακα επέτρεψαν στους καλλιεργητές να μεγιστοποιήσουν τα οφέλη και σε άλλους παράγοντες, όπως οι σπόροι υψηλής ποιότητας, τα λιπασμάτα, το νερό, κ.ά. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, τα φυτοφάρμακα συνέβαλλαν στην καταπολέμηση της πείνας και του υποσιτισμού, που σκοτώνει εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο [41].

Η δεκαετία του '30 αποτελεί την αρχή της σύγχρονης εποχής για την παραγωγή συνθετικών φυτοφαρμάκων. Το 1930 ο Paul Müller συνθέτει το DDT και ανακαλύπτει τις ισχυρές εντομοκτόνες ιδιότητες του. Το 1940, συντίθενται και χρησιμοποιούνται ευρέως πολλά οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα ενώ στη συνέχεια, το 1975, αντικαθίστανται στις Η.Π.Α από οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά φυτοφάρμακα. Από τότε, τα πυρεθροειδή κατέχουν τον κυρίαρχο ρόλο ως εντομοκτόνα. Τη δεκαετία του 1960, τα ζιζανιοκτόνα όπως οι τριαζίνες και άλλες αζωτούχες ενώσεις και τα καρβοξυλικά οξέα άρχισαν να χρησιμοποιούνται ευρέως [3].

Η καταπολέμηση ασθενειών όπως η ελονοσία, που μεταδιδόταν από τα κουνούπια και η βουβωνική χολέρα που μεταδίδονταν από τους ψύλλους είχε ως αποτέλεσμα τη θετική αντιμετώπιση για τη χρήση των φυτοφαρμάκων από το μεγαλύτερο μέρος της κοινωνίας. Ωστόσο, η άποψη αυτή άλλαξε άρδην όταν διαπιστώθηκε ότι το DDT αποτελούσε ανασταλτικό παράγοντα στην αναπαραγωγή πολλών ψαριών που τρέφονταν με πουλιά αποτελώντας σοβαρή απειλή για τη βιοποικιλότητα. Το 1962, η Αμερικανίδα θαλάσσια βιολόγος Rachel Carson εξέδωσε το βιβλίο «Σιωπηλή Άνοιξη» σχετικά με τη βιολογική μεγέθυνση, υποστηρίζοντας πως αν εξαιρεθεί το ενδεχόμενο ενός πυρηνικού πολέμου, η μεγαλύτερη απειλή για την ανθρωπότητα είναι η ρύπανση του ανθρώπινου περιβάλλοντος.

Το βιβλίο έγειρε ανησυχίες για το περιβάλλον σε μεγάλη μερίδα της αμερικανικής κοινωνίας και οδήγησε στην αλλαγή της εθνικής πολιτικής των ΗΠΑ για τη χρήση εντομοκτόνων που περιλάμβανε την απαγόρευση του DDT και άλλων εντομοκτόνων, ενώ αποτέλεσε έμπνευση για το περιβαλλοντικό κίνημα που οδήγησε στη δημιουργία της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (United States Environmental Protection Agency, USEPA). Σήμερα η γεωργική χρήση του DDT έχει απαγορευθεί και με βάση της Σύμβασης της Στοκχόλμης για τους έμμορους οργανικούς ρύπους [42], αλλά εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες για την πρόληψη της ελονοσίας και άλλων τροπικών ασθενειών.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 εμφανίστηκαν στην αγορά και άλλα αποτελεσματικά μυκητοκτόνα, όπως οι οξαθειίνες (oxathiins), οι βενζιμιδαζόλες (benzimidazoles) και οι πυριμιδίνες (pyrimidines). Η τρίτη γενιά φυτοφαρμάκων εμφανίστηκε κατά την περίοδο 1970-1980 και περιλαμβάνει τα πυρεθροειδή (pyrethroids) και τις σουλφονουλουρίες (sulfonylureas), τα οποία και χρησιμοποιούνται σε μικρές ποσότητες λόγω της ισχυρής βιολογικής τους δράσης. Τα αποστειρωτικά (sterilants), οι φερομόνες (feromones) και οι αναστολείς χιτίνης (chitin inhibitors) εμφανίστηκαν αργότερα [43].

Συνοπτικά, η ιστορία της χρήσης των φυτοφαρμάκων χωρίζεται σε τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει μόνο φυσικά γεωργικά φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνταν για τον έλεγχο των παρασίτων και λαμβάνει χώρα πριν την δεκαετία του 1870. Ακολουθεί η δεύτερη φάση, την περίοδο 1870-1945, η οποία χαρακτηρίζεται ως η «εποχή των ανόργανων συνθετικών γεωργικών φαρμάκων». Η τρίτη και τελευταία φάση την οποία διανύουμε από το 1945 έως σήμερα είναι η «εποχή των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων» [44].

2.2 Σκοπός και χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις (pesticides/agrochemicals) είναι «χημικές ή βιολογικές ουσίες ή μείγματα ουσιών που προορίζονται για την πρόληψη, καταστροφή, απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου που έχει επιβλαβή επίδραση στις καλλιέργειες και επιφέρει μείωση στην απόδοσή τους». Είναι συνήθως ανθρωπογενείς συνθετικές οργανικές ενώσεις, ωστόσο υπάρχουν άλλες που είναι παράγωγα των φυτών ή φυσικώς απαντώμενα ανόργανα ορυκτά. Αντίστοιχοι ορισμοί έχουν δοθεί από άλλους οργανισμούς. Επί παραδείγματι, ο Αμερικανικός Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος (U.S. Environmental Protection Agency, USEPA) ορίζει ως φυτοφάρμακο «οποιαδήποτε ουσία ή μείγμα ουσιών προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή την μείωση των παρασίτων». Ο αντίστοιχος Αγγλικός Οργανισμός (Food and Environment Protection Act,

FEPA) ορίζει ως φυτοφάρμακο «οποιαδήποτε ουσία, παρασκεύασμα ή οργανισμό που παρασκευάζεται ή χρησιμοποιείται, μεταξύ άλλων χρήσεων, για την προστασία των φυτών, των ξύλων ή άλλων φυτικών προϊόντων από επιβλαβείς οργανισμούς, για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών, για την προστασία κατά των επιβλαβών πλασμάτων ή τη μετατροπή αυτών σε αβλαβή».

Σύμφωνα με την ορολογία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τα φυτοφάρμακα χωρίζονται σε φυτοπροστατευτικές ενώσεις (χρήση στη γεωργία και τις φυτοκαλλιέργειες/ανθοκομία) και σε βιοκτόνα. Ωστόσο, οι δυο αυτοί όροι χρησιμοποιούνται αδιάκριτα και διέπονται από τις ίδιες οδηγίες και κανονισμούς. Κατά τον τον ορισμό της ΕΕ, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι προϊόντα συγκεκριμένης δομής τα οποία περιέχουν δραστικές ουσίες που προορίζονται για μια από τις ακόλουθες χρήσεις:

- Να προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβή οργανισμό ή να προλαμβάνουν τη δράση των οργανισμών αυτών
- Να επεμβαίνουν στις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, όπου αυτό είναι απαραίτητο
- Να συμβάλλουν στη διαφύλαξη των φυτικών προϊόντων, σύμφωνα πάντα με τις ειδικές κοινοτικές διατάξεις σχετικές με τα προσθετικά
- Να καταστρέφουν ανεπιθύμητα φυτά ή μέρη φυτών
- Να επιβραδύνουν ή να προλαμβάνουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη φυτών.

Τα φυτοφάρμακα συνίστανται κυρίως σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα και βιοκτόνα, έχουν σχεδιαστεί για να επιδρούν σε θεμελιώδεις λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών, άρα είναι ικανά να θανατώνουν ή να καταπολεμούν επιβλαβείς οργανισμούς, όπως οι φυσικοί εχθροί. Παρά τις μικρές διαφοροποιήσεις στη διατύπωση των διάφορων διαθέσιμων ορισμών των φυτοφαρμάκων, σε κάθε περίπτωση πρόκειται για χημικές ουσίες οι οποίες είναι δηλητηριώδεις και αποτελεσματικές κατά οργανισμών-στόχων, αλλά δεν συνεπάγονται κανένα κίνδυνο για τους οργανισμούς-μη στόχους και το περιβάλλον [44].

Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σε αγροτικές περιοχές, συμβάλλοντας στην επιτυχία της σύγχρονης γεωργίας και στην εξασφάλιση επαρκών ποσοτήτων υγιεινών γεωργικών προϊόντων υψηλής ποιότητας σε προσιτές τιμές, γεγονός που καθιστά τη χρήση τους αποδεκτή από την κοινωνία ως ένα σημείο, λαμβάνοντας υπόψη τα οικονομικά οφέλη που απορρέουν από αυτή. Χάρη στα άμεσα οφέλη που προκύπτουν από τη χρήση τους, τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα και θεωρούνται εν γένει απαραίτητα για τα σύγχρονα καλλιεργητικά συστήματα. Ωστόσο, όταν η απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον προκύπτει από μη εγκεκριμένη χρήση ή λανθασμένη πρακτική, μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση των υπόγειων και επιφανειακών υδάτινων πόρων

και να έχει ανεπιθύμητες και δυσμένεις επιπτώσεις στο περιβάλλον, τους οργανισμούς μη-στόχους και τον άνθρωπο. Έχει αποδειχτεί από την ήδη υπάρχουσα ερευνητική εμπειρία ότι μέσω πολλών βιοχημικών και βιολογικών διεργασιών, αρκετές από αυτές τις ενώσεις ή από τα προϊόντα διάσπασής τους μπορούν να εισέλθουν σε όλα σχεδόν τα οικοσυστήματα και τελικά την τροφική αλυσίδα. Επίσης, η επαναλαμβανόμενη έκθεση ορισμένων περιοχών σε αυτά μπορεί να οδηγήσει στην προσαρμογή των ενδογενών μικροβιακών κοινοτήτων, που αναπτύσσουν ενζυμικούς μηχανισμούς αποδόμησης των γεωργικών φαρμάκων. Τα συγκεκριμένα ένζυμα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές όπως η περιβαλλοντική απορρύπανση ή ως αντίδοτα σε νευροτοξικά φάρμακα (π.χ. εντομοκτόνα παλαιάς γενιάς).

2.3 Κατηγοριοποίηση φυτοφαρμάκων

Η κατηγοριοποίηση των φυτοφαρμάκων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Ωστόσο, συνήθως κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τη φύση τους, τον τρόπο επαφής τους με τα φυτά, τη δρασικότητά τους και τη χημική τους δομή.

Ανάλογα με τη φύση τους, τα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε οργανικά και ανόργανα. Σήμερα, τα περισσότερα φυτοφάρμακα είναι οργανικές ενώσεις και μόνο ένα μικρό μέρος είναι παράγωγο φυσικών προϊόντων, όπως το πύρεθρο, η ροτενόνη και η νικοτίνη.

Ανάλογα με τον τρόπο επαφής τους με τα φυτά, τα φυτοφάρμακα μπορούν να χωριστούν σε συστηματικά και μη συστηματικά. Τα μη συστηματικά φυτοφάρμακα δεν διεισδύουν αισθητά στο φυτικό ιστό και κατά συνέπεια δεν μεταφέρονται ούτε μετατοπίζονται εντός του αγγειακού συστήματος των φυτών. Τα πρώτα φυτοφάρμακα ήταν αυτού του είδους και κύριο μειονέκτημά τους ήταν η ευαισθησία τους στις επιδράσεις του καιρού, γεγονός που αποτελεί εμπόδιο για την ανάπτυξη νέων φυτών. Αντίθετα, τα περισσότερα από τα σύγχρονα φυτοφάρμακα εμφανίζουν συστηματική δράση και ως εκ τούτου διεισδύουν στην επιδερμίδα των φυτών και μεταφέρονται διαμέσου του αγγειακού τους συστήματος. Οι συστηματικοί παράγοντες δεν προστατεύουν μόνο το φυτό από παράσιτα, αλλά αναστέλλουν ή θεραπεύουν υφιστάμενες μολύνσεις. Δεν επηρεάζονται από τις καιρικές συνθήκες και προσφέρουν ανοσία σε όλα υπό ανάπτυξη τα φυτά [43].

Ανάλογα με τη δρασικότητά ως προς τα παράσιτα-στόχους τους, τα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε:

- Ζιζανιοκτόνα (herbicides), τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ζιζανίων και άλλων φυτών που αναπτύσσονται σε μέρη που δεν είναι επιθυμητό

- Εντομοκτόνα (insecticides), κατασκευασμένα να καταπολεμούν τα έντομα και άλλα αρθρόποδα, προστίθενται είτε στο χώμα, είτε στην εναέρια περιοχή του φυτού
- Μυκητοκτόνα (fungicides), χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ασθενειών που οφείλονται σε μύκητες
- Ακαρεοκτόνα (acaricides)
- Νηματοδοκτόνα (nematicides)
- Βακτηριοκτόνα (bacteriocides)
- Μαλακιοκτόνα (molluscicides)
- Φερομόνες (pheromones)
- Ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών (plant growth regulators)
- Απωθητικές ούσες (repellents)
- Τρωκτικοκτόνα (rodenticides)

Τα ζιζανιοκτόνα, η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία παγκοσμίως, χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση ή τη διακοπή της φυσιολογικής πορείας αύξησης και ανάπτυξης των ζιζανίων. Βάσει του εύρους του φάσματος των φυτών που επηρεάζουν, διακρίνονται σε εκλεκτικά και καθολικά. Ανάλογα με τον τρόπο πρόσληψης και μετακίνησης στα φυτά διακρίνονται σε επαφής, διασυστηματικά και εδάφους. Η πρόσληψη των ζιζανιοκτόνων μπορεί να γίνει από τα φύλλα, τις ρίζες ή τον βλαστό του φυτού. Η κίνηση αυτών μέσα στο φυτό μπορεί να είναι αποπλαστική (προς τα επάνω), συμπλαστική (προς τα κάτω) ή ακόμα να μην κινούνται καθόλου [37]. Τέλος ανάλογα με τον χρόνο εφαρμογής τους διακρίνονται σε προφυτευτικά, προφυτρωτικά και μεταφυτρωτικά.

Ανάλογα με την χημική τους δομή και επομένως βάσει της δραστικής ουσίας την οποία περιέχουν, τα φυτοφάρμακα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε διάφορες χημικές ομάδες. Η κατηγοριοποίηση αυτού του είδους είναι πολύ σημαντική, δεδομένου ότι οι λειτουργικές ομάδες αποτελούν δείκτες των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εκάστοτε φυτοφαρμάκου. Οι βασικότερες από τις οποίες είναι οι ακόλουθες:

- χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (chlorinated hydrocarbons)
- οργανοφωσφορικοί εστέρες (OP-esters)
- καρβαμιδικά και αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους (carbamates and aliphatic acids and their esters)
- τριαζίνες, χλωρο- και αμινο- τριαζινών (triazines, chloro-, amino- triazines derivatives)
- ενώσεις της ομάδας των ουριών (urea derivatives)
- φαίνοξυ-οξέα (phenoxies)
- βενζοϊκά οξέα (benzoic acids)

- φαινυλουρίες (phenylureas)
- χλωροακεταμίδια και ανιλίδια (chloroacetamides/anilides and derivatives)
- (δι)νιτρο–ανιλίνες (dinitroanilines)
- θειοκαρβαμικοί εστέρες (thiocarbamates)
- διπυριδύλια (bipyridyl)
- πυρεθρινοειδή και οι φυσικές πυρεθρίνες (pyrethroids)
- φερομόνες (pheromones)
- αζόλες (azoles)
- φθαλιμιδικά (phthalimides)
- νικοτινοειδή (nicotinoids)
- ανόργανα άλατα των μετάλλων As, Zn, Cu.

2.4 Οφέλη και κίνδυνοι από τη χρήση των φυτοφαρμάκων

Η απόδοση των καλλιεργειών σε παγκόσμια κλίμακα, απειλείται από περίπου 9000 είδη εντόμων και ακάρεων, 50000 είδη παθογόνων των φυτών και 8000 είδη ζιζανίων. Η απώλεια φρούτων, λαχανικών και δημητριακών από παράσιτα σε περίπτωση απουσίας εφαρμογής φυτοφαρμάκων, αναμένεται να φτάσει το 78%, 54% και 32% αντίστοιχα [45]. Το όφελος από τη χρήση των φυτοφαρμάκων είναι η βελτίωση της απόδοσης των καλλιεργειών, εξαλείφοντας ή περιορίζοντας τον ανταγωνισμό από ζιζάνια και την προσβολή από επιβλαβείς οργανισμούς και η διασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων.

Τα φυτοφάρμακα διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εξασφάλιση αξιόπιστων προμηθειών γεωργικών προϊόντων κάθε χρόνο, συμβάλλοντας στην αποφυγή των διακυμάνσεων της ετήσιας απόδοσης και στην εξασφάλιση της διαθεσιμότητας φρούτων και λαχανικών σε χαμηλές τιμές, προσιτών για όλους τους καταναλωτές. Επιπλέον ελαχιστοποιούν τον απαιτούμενο χρόνο εργασίας για τις καλλιέργειες.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα φυτοφάρμακα θα μπορούσαν να προστατεύσουν τη δημόσια υγεία. Μια τέτοια περίπτωση είναι η εφαρμογή γεωργικών φαρμάκων για τον έλεγχο των κουνουπιών, τα οποία δρουν ως φορείς της ελονοσίας [46]. Τέλος, η βιομηχανία φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι ένας βασικός οικονομικός παράγοντας στην παγκόσμια αγορά και αποτελεί σημαντικό εργοδότη στην Ευρώπη με περίπου 26000 εργαζόμενους στην ΕΕ [47, 48].

Ωστόσο, η αλόγιστη και μη ορθή χρήση των φυτοφαρμάκων και η εισαγωγή τους στο περιβάλλον, αποδεδειγμένα προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις. Μερικές από αυτές είναι, η

ελάττωση της βιοποικιλότητας, η ρύπανση των επιφανειακών και υπογείων υδάτων καθώς και η αύξηση του κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία που προέρχεται είτε από την απευθείας έκθεση στα φυτοφάρμακα είτε από τα υπολείμματά τους στα τρόφιμα και τα ύδατα. Σύμφωνα με τον ορισμό που έδωσε η GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution) ως ρύπανση ορίζεται «η άμεση ή έμμεση εισαγωγή, από τον άνθρωπο ουσιών και ενέργειας που έχουν ή θα μπορούσαν να έχουν επιβλαβή δράση στο φυσικό περιβάλλον».

Το μέγεθος αυτών των επιπτώσεων εξαρτάται από το βαθμό ευαισθησίας των εκτειθέμενων οργανισμών και την εγγενή τοξικότητα του φυτοφαρμάκου [49, 50]. Ιδανικά, ένα γεωργικό φάρμακο πρέπει να είναι θανατηφόρο για το παράσιτο-στόχο, αλλά να μην έχει καμία επίδραση στους οργανισμούς μη-στόχους, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Δυστυχώς, αυτό δεν συμβαίνει πάντα [48]. Έχει υπολογιστεί, για παράδειγμα, ότι πάνω από το 98% των ψεκαζόμενων εντομοκτόνων και πάνω από το 95% των ζιζανιοκτόνων καταλήγουν να αποτίθενται εκτός του αρχικού στόχου τους οδηγώντας στην έκθεση άλλων οργανισμών -μη στόχων που διαβιούν στο ίδιο ενδιαίτημα [51].

Οι κίνδυνοι για την υγεία του ανθρώπου από τα γεωργικά φάρμακα μπορεί να εμφανιστούν μέσω άμεσης και έμμεσης έκθεσης. Έτσι, στο φάκελο έγκρισης για κυκλοφορία γεωργικών φαρμάκων στην αγορά σε επίπεδο ΕΕ απαιτούνται επί του παρόντος δεδομένα σχετικά με πιθανές αρνητικές επιπτώσεις των δραστικών ουσιών των γεωργικών φαρμάκων στην ανθρώπινη υγεία. Υπάρχουν μερικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αυτών των δεδομένων, π.χ. μεταβολικά πρότυπα, οξείας τοξικότητας, υπο-χρόνιας ή υπο-οξείας τοξικότητας, χρόνιας τοξικότητας, καρκινογένεσης, γονιδοτοξικότητας, τερατογένεσης, μελέτες αναπαραγωγικότητας και επίσης δοκιμές ερεθισμού χρησιμοποιώντας αρουραίο ως μοντέλο θηλαστικό ή σε μερικές περιπτώσεις σκύλους και κουνέλια [52].

Εκτός από την υγεία του ανθρώπου, η απελευθέρωση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένου του νερού, του αέρα, και του εδάφους, μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς επιπτώσεις σε οργανισμούς μη-στόχους όλων των τροφικών επιπέδων, συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών του εδάφους, ευεργετικών αρθρόποδων, φυτών, υδρόβιων οργανισμών και πτηνών ή θηλαστικών. Τέλος, τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στην καλλιέργεια στην οποία εφαρμόζονται λόγω υψηλών ποσοστών εφαρμογής, κακής εφαρμογής και μη ευνοούμενων περιβαλλοντικών συνθηκών κατά και μετά την εφαρμογή τους [52, 53].

2.5 Μεταβολίτες και προϊόντα μετατροπής φυτοφαμάκων

Τα φυτοφάρμακα μετά την εφαρμογή τους δύνανται να διασπαστούν μέσω διάφορων βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών σε χημικές ενώσεις, οι οποίες έχουν μικρότερο μοριακό βάρος, διαφορετική τοξικότητα και διαφορετική περιβαλλοντική συμπεριφορά από την αρχική ένωση. Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μπορεί να οφείλονται τόσο σε μεταβολικές αντιδράσεις, οπότε προκύπτουν οι μεταβολίτες, όσο και σε χημικές διεργασίες (υδρόλυση, οξείδωση που συμβαίνουν στο έδαφος, το νερό ή τον αέρα) οπότε παράγονται τα προϊόντα διάσπασης ή μετασχηματισμού.

Ωστόσο, πολλές φορές ο όρος μεταβολίτης χρησιμοποιείται για να περιγράψει οποιοδήποτε παράγωγο διάσπασης της αρχικής χημικής ένωσης που σχηματίζεται αμέσως μετά την χρήση της. Ένας μεταβολίτης θεωρείται ότι έχει περιβαλλοντική σημασία όταν υπάρχουν αρκετά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η έκθεση του ανθρώπου στα μέγιστα επίπεδα αυτού, δηλαδή να προκαλεί αρνητική επίδραση στον ίδιο ή στις μελλοντικές γενιές ή να θέτει σε κίνδυνο την επιβίωση ή ανάπτυξη των ειδών του ζωικού βασιλείου [37].

Γενικά, τα προϊόντα διάσπασης ή μετατροπής των φυτοφαμάκων εμφανίζουν μικρότερη τοξικότητα σε σύγκριση με τις αρχικές ενώσεις από τις οποίες προέρχονται αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι πιο τοξικά [37]. Στην τελευταία περίπτωση, η επικινδυνότητα για το περιβάλλον είναι υψηλότερη σε σχέση με αυτή που προκαλείται από τις αρχικές ενώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα μετατροπής ενός φυτοφαμάκου το οποίο αρχικά είναι μικρής σημασίας για την ρύπανση των υδάτων λόγω της μικρής κινητικότητας και υπολειμματικότητάς του, μπορεί να εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα και υπολειμματικότητα και τελικά να δύνανται να επιδρούν αρνητικά στο περιβάλλον [54]. Οι πιθανές αιτίες για να είναι ένα προϊόν μετατροπής εξίσου ή πιο τοξικό από την αρχική ένωση πιθανώς είναι οι εξής [55]:

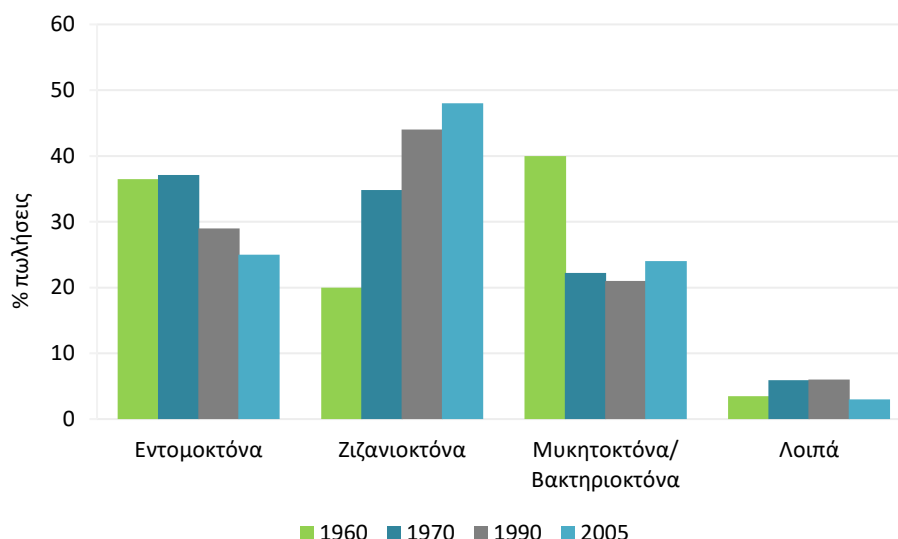
- α. Η δραστική ομάδα της αρχικής ένωσης να είναι ακόμη παρούσα στο προϊόν μετατροπής με αποτέλεσμα να επιδεικνύει τον ίδιο μηχανισμό τοξικότητας με την αρχική ένωση
- β. Το προϊόν μετατροπής να είναι το δραστικό στοιχείο ενός προ-φυτοφαμάκου, όπου η εφαρμοζόμενη ουσία έχει σχεδιαστεί να απορροφάται από έναν οργανισμό και στη συνέχεια να μεταβολίζεται σε μια δραστική ένωση που επιφέρει την επιθυμητή επίδραση
- γ. Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης του προϊόντος μετατροπής είναι μεγαλύτερος από αυτόν της αρχικής ουσίας και επομένως θα προσεγγίσει περισσότερο το σημείο δράσης
- δ. Το μονοπάτι μετατροπής καταλήγει σε ένα προϊόν με διαφορετικό και πιο ικανό τρόπο δράσης από την αρχική ένωση.

Ο προσδιορισμός των μεταβολιτών και των προϊόντων διάσπασης των φυτοφαρμάκων είναι εξέχουσας σημασίας, παρόλα αυτά παραμένει δύσκολος και περίπλοκος, κυρίως εξαιτίας της έλλειψης διαθεσιμότητας υλικών αναφοράς για τα περισσότερα από αυτά. Στην Ευρώπη σύμφωνα με το ισχύον νομοθετικό πλαίσιο, θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για όλους τους μεταβολίτες και τα προϊόντα διάσπασης ή μετατροπής, τα οποία υπολογίζεται πως αποτελούν πάνω από το 10% της ποσότητας της προστιθέμενης δραστικής ουσίας. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον ορισμό της οδηγίας της ΕΕ ως «κατάλοιπα ή υπολείμματα φυτοφαρμάκων» ορίζονται τα κατάλοιπα, συμπεριλαμβανομένων των δραστικών ουσιών, των μεταβολιτών ή/και των προϊόντων αποδόμησης ή αντίδρασης δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ή έχουν χρησιμοποιηθεί σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ή υπάρχουν εντός/ επί των προϊόντων που περιλαμβάνονται στο παράρτημα Ι του κανονισμού, συμπεριλαμβανομένων ιδίως εκείνων τα οποία ενδέχεται να προκύψουν από τη χρήση τους για φυτοπροστασία, στην κτηνιατρική και ως βιοκτόνων [56].

2.6 Η αγορά των φυτοφαρμάκων

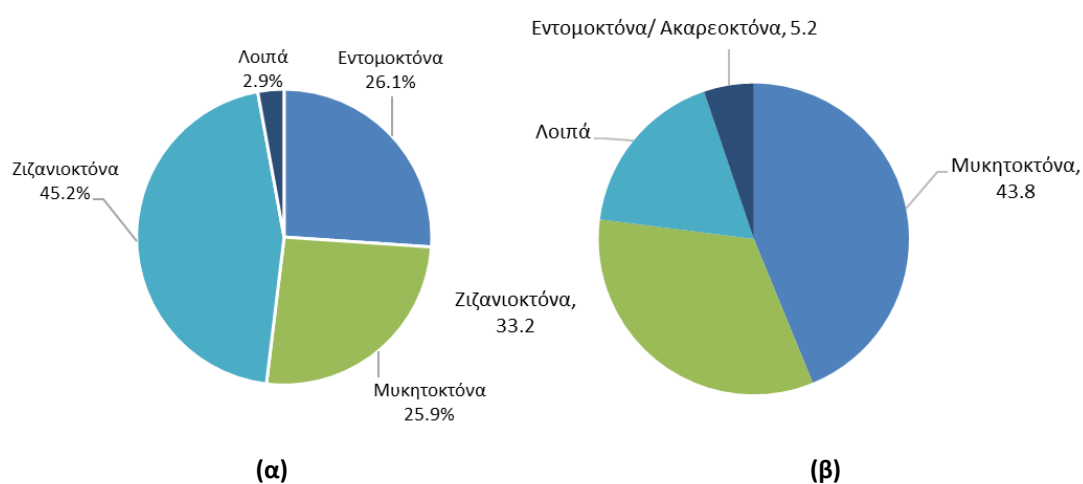
Στην παγκόσμια αγορά, κυκλοφορούν περίπου 25000 φυτοφάρμακα, βασιζόμενα σε περίπου 700 δραστικές ουσίες. Το 2010, υπολογίστηκε ότι η παγκόσμια αγορά φυτοφαρμάκων ανήλθε στα 38 δισεκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ. Τον ίδιο χρόνο, στην Ευρώπη, πωλήθηκαν φυτοφάρμακα που περιείχαν 281056 τόνους δραστικών ουσιών, αξίας περίπου 8 δισεκατομμύρια ευρώ.

Τα τελευταία 50 χρόνια, η χρήση των λιπασμάτων και των φυτοφαρμάκων έχει συνεισφέρει στον τριπλασιασμό της αύξησης της αγροτικής παραγωγής. Η βελτίωση των μεθόδων καλλιέργειας και η εκμηχάνιση της έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της παραγωγής των ζιζανιοκτόνων έναντι των εντομοκτόνων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.1. Σε παγκόσμια κλίμακα, τα ζιζανιοκτόνα είναι η κατηγορία των παρασιτοκτόνων που χρησιμοποιείται ευρύτερα, ακολουθούμενη με μικρή διαφορά από τα εντομοκτόνα και τα μυκητοκτόνα. Στην Ευρώπη, τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται περισσότερο, προφανώς λόγω διαφορετικών αναγκών που πρέπει να αντιμετωπιστούν στις καλλιέργειες.



Σχήμα 2.1 Η εξέλιξη των πωλήσεων φυτοφαρμάκων παγκοσμίως (1960–2005) (Eurostat)

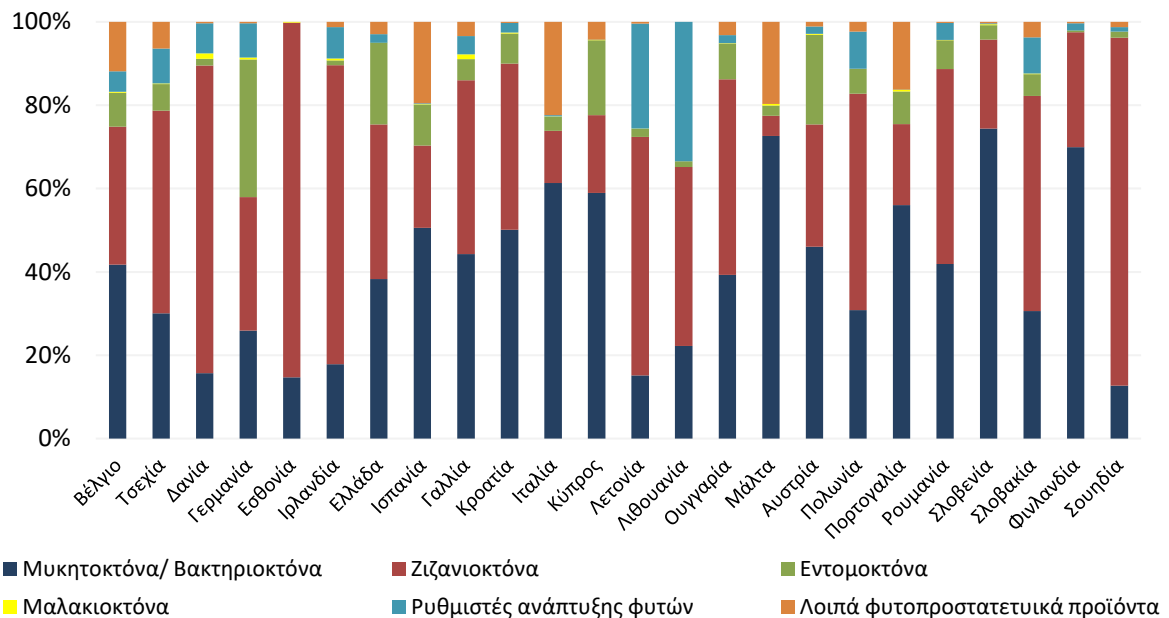
Σε παγκόσμια κλίμακα, τα ζιζανιοκτόνα είναι η κατηγορία των παρασιτοκτόνων που χρησιμοποιείται ευρύτερα, ακολουθούμενη με μικρή διαφορά από τα εντομοκτόνα και τα μυκητοκτόνα. Στην Ευρώπη, τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται περισσότερο, προφανώς λόγω διαφορετικών αναγκών που πρέπει να αντιμετωπιστούν στις καλλιέργειες. Οι πωλήσεις αναβασική κατηγορία φυτοφαρμάκων παγκοσμίως αλλά και σε ευρωπαϊκή κλίμακα απεικονίζονται στο Σχήμα 2.2.



Σχήμα 2.2 Πωλήσεις φυτοφαρμάκων ανά κατηγορία: (α) παγκοσμίως και (β) στην Ευρώπη [57]

Η Ευρωπαϊκή βιομηχανία «προστασίας» των καλλιεργειών απασχολεί περίπου 26000 άτομα εργατικό δυναμικό και η Ευρώπη εξακολουθεί να αποτελεί τον μεγαλύτερο καταναλωτή φυτοφαρμάκων στον κόσμο, ακολουθούμενη από την Ασία, τη Λατινική Αμερική, τη Βόρεια Αμερική και την Αφρική.

Οι συνολικές πωλήσεις φυτοφαρμάκων διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των χωρών μελών της ΕΕ και σε ένα βαθμό αντικατοπτρίζουν τη σημασία του τομέα της γεωργίας, τον τρόπο και τα είδη της καλλιέργειας κάθε χώρας. Το Σχήμα 2.3 παρουσιάζει τη χρήση των διαφορετικών κατηγοριών φυτοφαρμάκων για τα κράτη μέλη της ΕΕ που υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα.

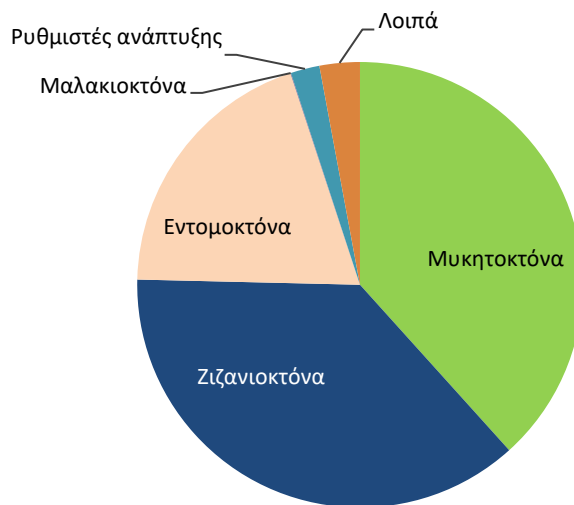


Σχήμα 2.3 Χρήση διαφορετικών κατηγοριών φυτοφαρμάκων για τα κράτη-μέλη της ΕΕ (Eurostat 2017)

Το 2014, η συνολική ποσότητα των πωλήσεων γεωργικών φαρμάκων στην Ευρωπαϊκή Ένωση ανήλθε σε 400000 τόνους περίπου. Βάσει των στοιχείων της Eurostat, τα κράτη-μέλη στα οποία πωλήθηκαν οι μεγαλύτερες ποσότητες φυτοφαρμάκων ήταν η Ισπανία (19,9%), η Γαλλία (19,0%), η Ιταλία (16,2%), η Γερμανία (11,6%) και η Πολωνία (5,9%), ενώ όλες μαζί συνιστούσαν συνολικά το 72,7% των συνολικών πωλήσεων γεωργικών φαρμάκων στην ΕΕ. Τα μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα ήταν οι πλέον πωλούμενες ομάδες γεωργικών φαρμάκων με μερίδιο αγοράς 44%, ακολουθούμενες από τα ζιζανιοκτόνα με 33% μερίδιο στην αγορά. Μαζί με την ομάδα «άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα» (14%), αυτές

οι τρεις ομάδες προστίθενται στο 91% των γεωργικών φαρμάκων που πωλήθηκαν στην ΕΕ το 2014. Από τις άλλες τρεις ομάδες γεωργικών φαρμάκων, τα εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα με μερίδιο 5%, οι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών 3% και τα μαλακιοκτόνα που κατέλαβαν το μικρότερο ποσοστό με λιγότερο από 1%.

Στην Ελλάδα σήμερα κυκλοφορούν περίπου 1350 εμπορικά σκευάσματα φυτοφαρμάκων και η χρήση των διαφορετικών κατηγοριών φυτοφαρμάκων φαίνεται να ακολουθεί την ίδια τάση με αυτή της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Σχήμα 2.4).



Σχήμα 2.4 Χρήση φυτοφαρμάκων στην Ελλάδα ανά κατηγορία (Eurostat, 2017)

Παρά τις υφιστάμενες πολιτικές και την ισχύουσα νομοθεσία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου και του περιβάλλοντος, η πραγματική κατανάλωση και χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην Ευρωπαϊκή Ένωση δεν έχει μειωθεί σημαντικά, όπως καταδεικνύουν τα επίσημα στοιχεία. Οι τρέχουσες προσεγγίσεις για την μείωση της χρήσης των φυτοφαρμάκων περιλαμβάνουν εφαρμογή αρχών ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας, βιολογικές καλλιέργειες και εσοδείες ανθεκτικές σε παράσιτα, που προέρχονται από τη γενετική μηχανική. Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα του Ευρωβαρόμετρου για τα τους κινδύνους που σχετίζονται με τη διατροφή [58], προκύπτει η βασικότερη ανησυχία των ευρωπαίων πολιτών σχετικά με την τροφή είναι τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων. Συγκεκριμένα, το 72% των πολιτών της ΕΕ ανησυχούν για την ύπαρξη υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά.

2.7 Νομοθετικό πλαίσιο για τα φυτοφάρμακα

Οι πωλήσεις και η εφαρμογή των φυτοφαρμάκων ελέγχονται αυστηρά στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, εξαιτίας της γενικευμένης χρήσης τους στο περιβάλλον και της δυνητικής επικινδυνότητας τους για αυτό αλλά και για τον άνθρωπο. Τα τελευταία είκοσι χρόνια, οι κανονισμοί που αφορούν την εμπορία και χρήση τους έχουν γίνει πιο περίπλοκοι και αυστηροί και πλέον η βιομηχανία των φυτοφαρμάκων θεωρείται ως η κατ'εξοχήν ρυθμιζόμενη βιομηχανία, διεπόμενη από ένα μεγάλο αριθμό εθνικών, κοινοτικών και διεθνών οδηγιών. Η νομοθεσία που διέπει τα φυτοφάρμακα καθορίζεται τόσο από αρμόδια κρατικά νομοθετικά όργανα όσο και από υπερεθνικά όργανα, καθώς και από διμερείς ή πολυμερείς συμφωνίες που παράγονται μεταξύ διαφόρων κρατών. Στην περίπτωση της Ελλάδας το 60-70% της εθνικής νομοθεσίας για το περιβάλλον έχει προέλθει από την εναρμόνιση του Ελληνικού Δικαίου με το Κοινοτικό.

Πριν το 1991, τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης λειτουργούσαν αυτόνομα στην επιβολή κανόνων για την κυκλοφορία και χρήση των φυτοφαρμάκων. Ωστόσο, η επιμέρους εθνική νομοθεσία αντικαταστάθηκε το 1991, με την οδηγία 91/414/ΕΟΚ και έκτοτε, η ΕΕ έχει υιοθετήσει ενιαία στρατηγική για να εξασφαλίσει τη βιώσιμη και αειφόρο χρήση των φυτοφαρμάκων και απαιτεί τα φυτοφάρμακα να είναι αποτελεσματικά, χωρίς να έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις.

Ακρογωνιαίο λίθο για την εκτίμηση, παρακολούθηση και διαχείριση της οικολογικής και χημικής κατάστασης όλων των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων αποτέλεσε η οδηγία 2000/60/ΕΚ, γνωστή ως οδηγία πλαίσιο για τα νερά. Έτσι, τέθηκαν από την ΕΕ νομικά όρια για τις διαφορετικές παραμέτρους του νερού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί προς ανθρώπινη κατανάλωση, με σκοπό την προστασία της ανθρώπινης υγείας. Ένας από τους γενικότερους κανόνες που θεσπίστηκαν θέτει ως όριο την τιμή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ για μεμονωμένα φυτοφάρμακα, ενώ όταν πρόκειται για το άθρισμα των ανιχνεύθόντων φυτοφαρμάκων η τιμή αυτή ορίζεται στα $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ [59]. Η εν λόγω οδηγία έχει τροποποιηθεί από την 2013/39/ΕΚ [60] που θέτει όρια για 45 διαφορετικές ενώσεις σε ηπειρωτικά υδάτινα σώματα, σε επιφανειακά, μεταβατικά, παράκτια και υπόγεια ύδατα [2, 60, 61]. Ανάμεσα στις ελεγχόμενες ενώσεις είναι τα φυτοφάρμακα alachlor ($0,7 \text{ mg L}^{-1}$), aclonifen ($0,012 \text{ mg L}^{-1}$), atrazine (2 mg L^{-1}), bifenox ($0,004 \text{ mg L}^{-1}$), chlorfenvinphos ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$), chlorpyrifos ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), cybutrine ($0,016 \text{ mg L}^{-1}$), cypermethrin ($6 \times 10^{-5} \text{ mg L}^{-1}$), dichlorvos ($7 \times 10^{-5} \text{ mg L}^{-1}$), diuron ($1,8 \text{ mg L}^{-1}$), endosulfan ($0,004 \text{ mg L}^{-1}$), heptachlor ($3 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$) isoproturon (1 mg L^{-1}), quinoxifen ($0,54 \text{ mg L}^{-1}$), simazine (4 mg L^{-1}) και terbutryn ($0,034 \text{ mg L}^{-1}$).

Από το 2009, η κοινή Ευρωπαϊκή Νομοθεσία για τα φυτοφάρμακα άλλαξε ολοκληρωτικά με την ψήφιση του «νομοθετικού πακέτου για τα φυτοφάρμακα», οπότε και θεσπίστηκαν νέες διαδικασίες για την άδεια κυκλοφορίας τους, νέο πλαίσιο για τη βιώσιμη χρήση τους, νέα προσέγγιση στις στατιστικές μελέτες και νέοι κανόνες για το μηχανικό εξοπλισμό με τον οποίο πραγματοποιείται η εφαρμογή τους. Η νομοθεσία αυτή βασίζεται στην «αρχή της προφύλαξης» και καλύπτει όλες τις πτυχές που μπορεί να επηρεάσουν το περιβάλλον και τον καταναλωτή. Συγκεκριμένα, απαιτεί έγκυρα αποδεικτικά στοιχεία της ασφάλειας πριν την κυκλοφορία ενός φυτοφαρμάκου, κατάλληλη επισήμανση, ύπαρξη βιολογικών καλλιεργειών και θέτει μέγιστα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα. Επίσης, εφαρμόζεται η αρχή της Ορθής Γεωργικής Πρακτικής, ΟΓΠ, (*GAP, Good Agricultural Practice*) η οποία ορίζεται ως η σε εθνικό επίπεδο συνιστώμενη, εγκεκριμένη ή καταχωρισμένη ασφαλής χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων υπό πραγματικές συνθήκες σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγής, της αποθήκευσης, της μεταφοράς, της διανομής και της μεταποίησης τροφίμων και ζωοτροφών και διέπεται από την οδηγία 2009/128/ΕΚ. Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται οι οδηγίες/κανονισμοί της ΕΕ που αφορούν τα φυτοφάρμακα.

Πίνακας 2.1 Κύριες οδηγίες και κανονισμοί της ΕΕ σχετικά με τα φυτοφάρμακα

Οδηγία	Περιεχόμενο	Αναφορά
2000/60/ΕΚ	Θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων	[2]
2013/39/ΕΕ, 2455/2001/ΕΚ	Τροποποίηση της 2000/60/ΕΚ για τους ρύπους προτεραιότητας	[60] [62]
2009/127/ΕΚ	Μηχανήματα για την εφαρμογή φυτοφαρμάκων	[63]
2009/128/ΕΚ	Ορθολογική χρήση των γεωργικών φαρμάκων	[64]
98/83/ΕΚ	Οδηγία για το πόσιμο νερό	[59]
Κανονισμός	Περιεχόμενο	
889/2008/ΕΚ	Βιολογική παραγωγή και επισήμανση των βιολογικών προϊόντων	[65]
1185/2009/ΕΚ	Στατιστικές που αφορούν τα γεωργικά φάρμακα	[66]
1272/2008/ΕΚ	Ταξινόμηση, επισήμανση και συσκευασία ουσιών και μειγμάτων ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των φυτοφαρμάκων	[67]
396/2005/ΕΚ	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων των δραστικών ουσιών σε τρόφιμα και ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης	[56]
1107/2009/ΕΚ	Διάθεση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά	[68]

Η ΕΕ και τα κάτω μέλη συμμετέχουν σε διεθνείς συμφωνίες σχετικές με τα φυτοφάρμακα. Η Διεθνής Σύμβαση για την Προστασία των Φυτών (*International Plant Protection Convention, IPPC*) [69] είναι μια διεθνής συμφωνία που αφορά την προστασία

φυσικών και καλλιεργούμενων φυτών από τα παράσιτα. Τέθηκε σε ισχύ το 1952 και έχουν προσχωρήσει σε αυτή η ΕΕ και όλα τα κράτη-μέλη της. Η Σύμβαση του Ρόντερνταμ αφορά ορισμένα επικίνδυνα χημικά προϊόντα και φυτοφάρμακα στο διεθνές εμπόριο με σκοπό την προφύλαξη της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος. Τα φυτοφάρμακα αποτελούν βασική κατηγορία προϊόντων που συμπεριλαμβάνονται στη Σύμβαση, που τέθηκε σε ισχύ το 2004 και έχουν προσχωρήσει σε αυτή 26 κράτη-μέλη της Ένωσης. Η Σύμβαση της Στοκχόλμης [70] είναι μια διεθνής συμφωνία που στοχεύει στην προστασία του ανθρώπου και του περιβάλλοντος από ιδιαίτερα επικίνδυνες, επίμονες ουσίες (όπως το DDT) περιορίζοντας και προσφάτως καταργώντας την παραγωγή, τη χρήση, την κυκλοφορία και την αποθήκευσή τους. Τέθηκε σε ισχύ το 2004 και έχει υπογραφεί από όλα τα κράτη μέλη. Μάλιστα, με πρωτοβουλία της ΕΕ το 2009, προστέθηκαν στην «απαγορευμένη λίστα της» 9 ακόμη ουσίες, μεταξύ των οποίων και φυτοφάρμακα. Άλλοι διεθνείς οργανισμοί που ασχολούνται με το θέμα της ορθής χρήσης των φυτοφαρμάκων, εκτός από την ΕΕ είναι:

1. Ο Οργανισμός Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ). Με το Πρόγραμμα για τα Φυτοφάρμακα (Pesticides Programme of the OECD) συμβάλλει στη συνεργασία μεταξύ των κυβερνήσεων και ενισχύει την προσπάθειά τους για την εκτίμηση και τη μείωση των κινδύνων από τη χρήση των φυτοφαρμάκων [71].
2. Ο Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (Food Agricultural Organization, FAO) που έχει εκδόσει το «Διεθνή Κώδικα Δεοντολογίας για τη διανομή και χρήση των φυτοφαρμάκων» (International Code of Conduct on the Distribution and Use of pesticides) και προάγει την ανταλλαγή πληροφοριών και των καλύτερων πρακτικών [72].
3. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) που ασχολείται με το ζήτημα των φυτοφαρμάκων στο «Διεθνές Προγράμμα για την ασφάλεια των χημικών ουσιών» (International Programme on Chemical Safety) [73] και διαχειρίζεται το «Σύστημα Αξιολόγησης των φυτοφαμάκων» (pesticides evaluation scheme) [74].
4. Η συνεργασία των FAO/WHO για τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων φυτοφαρμάκων, με τη διοργάνωση κοινής συνάντησης με σκοπό τη συνεργασία των ειδικών παγκοσμίως [75].

Β.ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

2.8 Σκοπός και χρήση των φαρμάκων

Σύμφωνα με την οδηγία 2001/83 ΕΚ περί κοινοτικού κώδικος για τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση [76], «φάρμακο είναι κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που εμφανίζεται να έχει θεραπευτικές ή προφυλακτικές ιδιότητες για τις ασθένειες ανθρώπων» ή «κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ή να χορηγηθεί σε ανθρώπους, με σκοπό είτε να αποκατασταθούν, να διορθωθούν ή να τροποποιηθούν φυσιολογικές λειτουργίες με την άσκηση φαρμακολογικής, ανοσολογικής ή μεταβολικής δράσης, είτε να γίνει ιατρική διάγνωση». Αξίζει να σημειωθεί ότι στον παραπάνω ορισμό, δε γίνεται διάκριση μεταξύ του ορισμού του φαρμάκου και της δραστικής ουσίας. Ως δραστική ουσία ορίζεται «κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ενός φαρμάκου και η οποία, όταν χρησιμοποιείται στην παραγωγή του, γίνεται ενεργό συστατικό του εν λόγω προϊόντος που προορίζεται να ασκήσει φαρμακολογική, ανοσολογική ή μεταβολική δράση με σκοπό να αποκατασταθούν, να διορθωθούν ή να τροποποιηθούν φυσιολογικές λειτουργίες ή να γίνει ιατρική διάγνωση».

Τα φάρμακα είναι μια μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων, που συμπεριλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος πολύπλοκων μορίων με ποικιλία διαφορετικών χαρακτηριστικών ομάδων, φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων. Σχεδιάζονται για να χρησιμοποιούνται για συγκεκριμένες βιολογικές δραστηριότητες, είναι στην πλειοψηφία τους ιοντικής φύσης μόρια, ενώ τυπικά τα μοριακά τους βάρη κυμαίνονται μεταξύ 300 έως 1000 [13, 77].

Τα περισσότερα φάρμακα κυκλοφορούν στο εμπόριο ως «φαρμακοτεχνικά σκευάσματα» ή «ιδιοσκευάσματα» με τη μορφή μείγματος δραστικών συστατικών και αδρανών εκδόχων. Αρκετά συχνά, κάποιο δραστικό συστατικό διατίθεται με πολλά εμπορικά ιδιοσκευάσματα μιας συγκεκριμένης φαρμακοτεχνικής μορφής ή πολλών διαφορετικών μορφών. Στις περιπτώσεις αυτές, έχει μεγάλη πρακτική σημασία η ομοιότητα της βιοδιαθεσιμότητας όλων των παρεμφερών ιδιοσκευασμάτων, ιδιαίτερα όταν κυκλοφορούν με την ίδια φαρμακοτεχνική μορφή και προορίζονται για χορήγηση από του στόματος (βιοϊσοδυναμία). Η φαρμακοτεχνική μορφή, όπως και τα έκδοχα, έχει ως στόχο να καταστήσει το φάρμακο περισσότερο εύληπτο και αποτελεσματικό, δηλαδή να βελτιώσει τις οργανοληπτικές του ιδιότητες [78]. Έτσι, οι φαρμακοτεχνικές μορφές μπορεί να είναι δισκία, κάψουλες, υπόθετα, εναιωρήματα, απλά διαλύματα, σιρόπια, βάμματα, ενέσιμα διαλύματα, οφθαλμικά διαλύματα, αλοιφές, εμποτισμένα αυτοκόλλητα, εισπνεόμενα κ.ά.

2.9 Κατηγοριοποίηση φαρμάκων

Για την ταξινόμηση των φαρμάκων χρησιμοποιείται το Ανατομικό, Θεραπευτικό και Χημικό σύστημα ταξινόμησης (Anatomic, Therapeutic, Chemical classification system, ATC), το οποίο ελέγχεται από το συνεργαζόμενο κέντρο για τη μεθοδολογία στατιστικής φαρμάκων (WHO Collaborating Centres Database, WHOCC) του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας, και δημοσιεύθηκε αρχικά το 1976.

Το σύστημα ταξινόμησης διαιρεί τα φάρμακα σε διαφορετικές ομάδες σύμφωνα με το όργανο ή το σύστημα στο οποίο ενεργούν ή/και τα θεραπευτικά και χημικά χαρακτηριστικά. Οι δραστικές ουσίες ταξινομούνται ιεραρχικά σε πέντε διαφορετικά επίπεδα. Το σύστημα έχει 14 κύριες ανατομικές/φαρμακολογικές ομάδες οι οποίες αποτελούν το πρώτο επίπεδο. Κάθε κύρια ομάδα ATC χωρίζεται σε δεύτερο επίπεδο που μπορεί να αποτελείται από φαρμακολογικές είτε θεραπευτικές ομάδες. Το τρίτο και τέταρτο επίπεδο είναι χημικές, φαρμακολογικές ή θεραπευτικές υποομάδες και το πέμπτο επίπεδο είναι η χημική ουσία. Το δεύτερο, τρίτο και τέταρτο επίπεδο χρησιμοποιούνται συχνά για τον εντοπισμό φαρμακολογικών υποομάδων όταν αυτό θεωρείται πιο κατάλληλο από τις θεραπευτικές ή χημικές υποομάδες. Οι κύριες ομάδες των φαρμάκων (πρώτο επίπεδο) του συστήματος και περιγράφονται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Κύριες ομάδες φαρμάκων (1^ο επίπεδο ATC)

Ομάδα ATC	Περίληψη περιεχομένων φαρμάκων
A	πεπτική οδός και μεταβολισμός
B	αίμα και αιμοποιητικά όργανα
C	καρδιαγγειακό σύστημα
D	δερματολογικά φάρμακα
G	ουροποιογεννητικό σύστημα και ορμόνες του φύλου
H	ορμονικά σκευάσματα, εξαιρουμένων των γεννητικών οργάνων
J	φάρμακα κατά των λοιμώξεων για συστηματική χορήγηση
L	αντινεοπλασματικοί και ανοσοτροποποιητικοί παράγοντες
M	φάρμακα αρθροπαθειών και μυοσκελετικών παθήσεων
N	Νευρικό σύστημα
P	Αντιπαρασιτικά φάρμακα, εντομοκτόνα και εντομοαπωθητικά
R	Αναπνευστικό σύστημα
S	Αισθητήρια όργανα
V	Διάφορα άλλα όργανα

Πηγή: WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology

2.10 Οφέλη και κίνδυνοι από τη χρήση των φαρμάκων

Τα φάρμακα προορίζονται για την ανακούφιση από τα συμπτώματα για τη θεραπεία της ασθένειας για την οποία είναι σχεδιασμένα. Οι αλλαγές που επήλθαν στο σύγχρονο τρόπο διαβίωσης καθώς και η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης έχουν οδηγήσει στην εμφάνιση νότερων παθήσεων οι οποίες απαιτούν αυξημένη χορήγηση φαρμάκων, όχι όμως αλόγιστη χρήση. Η αλόγιστη χρήση φαρμάκων ενέχει κινδύνους για τον ασθενή, κυρίως λόγω της αλληλεπίδρασης των δραστικών ουσιών που περιέχουν τα φάρμακα σε όλες τις μορφές τους καθώς και λόγω των ανεπιθύμητων ενεργειών τους.

Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «πολυφαρμακία» και ορίζεται ως η ταυτόχρονη χρήση πολλών φαρμάκων στη θεραπεία μιας νόσου, υποδηλώνοντας αδιάκριτη, μη επιστημονική ή υπερβολική συνταγογράφηση. Πρόκειται για μάλιστα, από την οποία απειλούνται περισσότερο οι ηλικιωμένοι, οι ψυχιατρικοί και οι παιδιατρικοί ασθενείς, οι ασθενείς που λαμβάνουν ταυτόχρονα πέντε ή περισσότερα φάρμακα, εκείνοι που επισκέπτονται πολλούς γιατρούς και φαρμακοποιούς, τα άτομα με συνυπάρχουσες παθήσεις, καθώς κι εκείνοι με προβλήματα όρασης και πνευματικής λειτουργίας.

Η υπερκατανάλωση φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει σε αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα που έχουν συνταγογραφηθεί, σε ανεπιθύμητες παρενέργειες ακόμα και σε δηλητηρίαση. Έχει αναφερθεί ότι το 80% των ασθενών παίρνουν φάρμακα μόνοι τους, χωρίς τη συνταγή ή την υπόδειξη του γιατρού και το ποσοστό αυτό αυξάνει με την ηλικία, ενώ το 10-20% αυτών εισάγονται στα νοσοκομεία λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών των φαρμάκων.

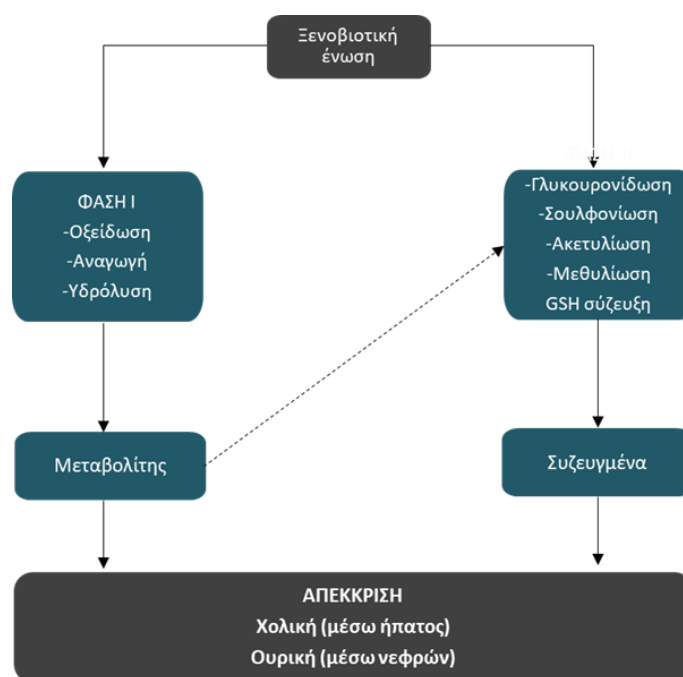
Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας υπολογίζει ότι περισσότερο από το μισό όλων των φαρμάκων, συνταγογραφούνται, διανέμονται ή πωλούνται ανάρμοστα, και ότι το ήμισυ όλων των ασθενών αδυνατούν να τα λάβουν σωστά. Η υπερβολική χρήση, η υποχρησιμοποίηση ή η κακή χρήση των φαρμάκων οδηγεί σε σπατάλη των σπάνιων πόρων και κινδύνους για την υγεία. Διάφορες εκφάνσεις της αλόγιστης χρήσης των φαρμάκων είναι:

- η χρήση πάρα πολλών φαρμάκων ανά ασθενή
- η ακατάλληλη χρήση αντιβιοτικών, συχνά σε ανεπαρκή δοσολογία ή για μη βακτηριακές λοιμώξεις
- η υπερβολική χρήση ενέσεων, ενώ οι από του στόματος μορφές θα ήταν πιο κατάλληλες
- η μη συνταγογράφηση σύμφωνα με τις επίσημες κατευθυντήριες οδηγίες
- η ακατάλληλη αυτοθεραπεία, με φάρμακα που θα έπρεπε να χορηγούνται με συνταγή.

2.11 Μεταβολισμός των φαρμάκων

Οι φαρμακευτικές και γενικότερα οι τοξικές ουσίες που εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό χαρακτηρίζονται ως ξενοβιοτικές και υφίστανται αντιδράσεις μεταβολισμού. Μετά τη χορήγησή τους ο οργανισμός μπορούν να μετατραπούν σε έναν ή περισσότερους μεταβολίτες και να απεκκριθούν ως μείγμα της αρχικής ουσίας ή/και των μεταβολιτών, στο οποίο η αρχική ουσία κατέχει μικρότερη ποσότητα. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές ουσίες που μεταβολίζονται ασθενώς και αποβάλλονται από τον οργανισμό σχεδόν αμετάβλητες ως προς την αρχική ουσία.

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων στον άνθρωπο μπορεί να χωριστεί σε δυο φάσεις. Στην πρώτη φάση (φάση I) μπορεί να πραγματοποιηθεί υδρόλυση, οξείδωση, αναγωγή, ή αλκυλίωση. Στη δεύτερη φάση (φάση II) πραγματοποιούνται αντιδράσεις σύζευξης, όπου μια πολική ομάδα ή μόριο μεταφέρεται στην αρχική ουσία ή σε ένα μεταβολίτη που προέκυψε από την πρώτη φάση δημιουργώντας υδρόφιλα και πιο απεκκρίσιμα μόρια (π.χ. προσθήκη καρβοξυ-, αλογονο-, νίτρο- ή αμινο- ομάδων καθώς και σχηματισμός πεπτιδίων), τα οποία είναι συνήθως ανενεργά. Η πιο κοινή αντίδραση που απαντάται στη δεύτερη φάση είναι αυτή της γλυκουρονίδωσης, κατά την οποία γλυκουρονικά οξέα μεταφέρονται σε φαινόλες, αλειφατικά υδροξύλια, καρβοξύλια, θειόλες, αμίνες ή υδροξυαμίνες. Λιγότερο συχνά πραγματοποιείται σουλφονίωση, N-ακετυλίωση, ή σύζευξη αμινοξέος. Ο μεταβολισμός των φαρμακευτικών στον ανθρώπινο οργανισμό φαίνεται στο Σχήμα 2.5.



Σχήμα 2.5 Μεταβολισμός ξενοβιοτικών ενώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό [79]

Οι δύο φάσεις της μεταβολικής διεργασίας, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταβολιτών που είναι πιο πολικοί και κατά συνέπεια πιο διαλυτοί στο νερό από τις αρχικές ουσίες και ως εκ τούτου επιτείνουν την απέκκριση [77, 79–81]. Η διεργασία του μεταβολισμού στον οργανισμό συνήθως δεν ολοκληρώνεται και κάποιο ποσοστό της αρχικής ουσίας απεκκρίνεται μαζί με τους μεταβολίτες. Οι περισσότερες διεργασίες που αφορούν το μεταβολισμό των φαρμάκων, οδηγούν στην μερική έως πλήρη απώλεια της φαρμακευτικής δραστηριότητας της ουσίας ενώ παράλληλα αυξάνουν τον πολικό χαρακτήρα, ενάγοντας την αποβολή τους από τον οργανισμό. Παρόλα αυτά, ορισμένα φάρμακα, γνωστά ως «προφάρμακα», απαιτούν την πραγματοποίηση μεταβολικών διεργασιών προκειμένου να απελευθερωθεί η δραστική ουσία.

Ο βαθμός μεταβολισμού εξαρτάται από ένα πλήθος παραμέτρων, όπως η ηλικία, το φύλο, η σωματική κατάσταση του ασθενούς και η διάρκεια χορήγησης του φαρμάκου και παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις, αφού υπάρχουν ουσίες στις οποίες είναι μηδαμινός έως σχεδόν πλήρης. Η κινητική των φαρμακευτικών ουσιών (φαρμακοκινητική) μπορεί να επηρεαστεί από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων αλλά και από προηγούμενη έκθεση του οργανισμού στις ίδιες ουσίες που έχει ως αποτέλεσμα την πιο ενισχυμένη φράση του μεταβολισμού [79].

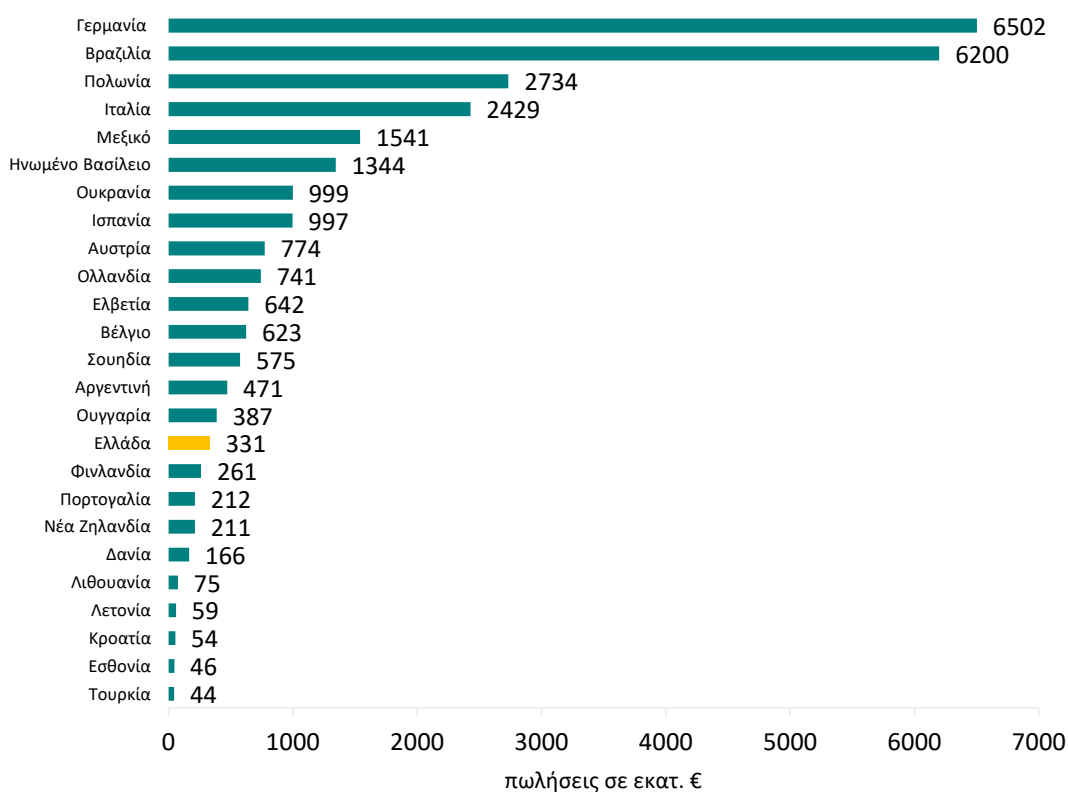
Τόσο η αρχική ουσία όσο και οι πιθανοί μεταβολίτες της εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον μετά την απέκκρισή τους από τον ανθρώπινο οργανισμό, κυρίως μέσω των ΜΕΥΑ. Παρόλο που οι ουσίες που δεν έχουν μεταβολιστεί και εισέρχονται αμετάβλητες στις εισροές των ΜΕΥΑ υφίστανται χημικούς μετασχηματισμούς κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τους, πιστεύεται πως η μη ανίχνευση ορισμένων φαρμακευτικών ουσιών στις εκροές δε συνεπάγεται απαραίτητα και την πλήρη απομάκρυνσή τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα φάρμακα έχουν μεταβολιστεί στον οργανισμό σε πολικότερες ενώσεις, οι οποίες είναι πιθανότερο να διέλθουν από τις ΜΕΥΑ. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές στις εκροές των ΜΕΥΑ συνυπάρχουν οι αρχικές ουσίες και οι μεταβολίτες τους (είτε λόγω μεταβολισμού στον οργανισμό είτε λόγω αποδόμησης από μικροοργανισμούς στις ΜΕΥΑ) [55].

2.12 Η αγορά και η κατανάλωση των φαρμάκων

Περίπου 6 εκατομμύρια φαρμακευτικές ουσίες και προϊόντα προσωπικής φροντίδας είναι διαθέσιμα στο εμπόριο παγκοσμίως, ενώ η χρήση τους αυξάνεται 3-4% ανά κιλό κάθε χρόνο [82]. Η παγκόσμια αγορά συνταγογραφούμενων φαρμάκων αναμένεται να αυξηθεί κατά 6% έως το 2022 για να φτάσει σχεδόν τα 1,05 τρισεκατομμύρια δολάρια. Στην

Ευρωπαϊκή Ένωση περίπου 3000 ουσίες διαφορετικών κατηγοριών χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των ασθενειών αλλά και στην κτηνιατρική.

Η καταγραφή της ολικής κατανάλωσης φαρμακευτικών ουσιών παγκοσμίως βασίζεται σε εκτιμήσεις, δεδομένου ότι η χρήση τους ποικίλει σε μεγάλο βαθμό από χώρα σε χώρα [77]. Επίσης, υπάρχουν κατηγορίες φαρμάκων όπως μερικά αντιβιοτικά (π.χ. στρεπτομυκίνες) που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια των φρούτων ενώ κάποια άλλα στη μελισσοκομική, ενώ πολλά φάρμακα για ανθρώπινη χρήση είναι κοινά με τα κτηνιατρικά. Σε αρκετές χώρες, πολλά φάρμακα πωλούνται και καταναλώνονται χωρίς ιατρική συνταγή (Over The Counter, OTC). Επομένως, οι πραγματικοί δείκτες πώλησης φαρμάκων είναι αρκετά υψηλότεροι. Στο Σχήμα 2.6 φαίνονται οι πωλήσεις (σε εκατομμύρια ευρώ) για τα μη υποχρεωτικά συνταγογραφούμενα φάρμακα (Μ.Υ.Συ.Φα) για διάφορες χώρες.



Σχήμα 2.6 Συνολικές πωλήσεις Μ.Υ.Συ.Φα. σε διάφορες χώρες, σε εκατομμύρια €
(Πηγή: Association of the European Self-Medication Industry)

Παρόλα αυτά, για την εκτίμηση της ετήσιας ποσότητας κατανάλωσης μιας συνταγογραφούμενης φαρμακευτικής ουσίας έχει προταθεί η παρακάτω εξίσωση [83]:

$$\text{Σύνολική κατανάλωση} = \left(\frac{\text{αριθμός συνταγών}}{\text{έτος}} \right) \times \text{δόση μονάδας} \times \left(\frac{\text{δόσεις}}{\text{συνταγή}} \right) \quad (2.1)$$

Τα 20 πρώτα σε κατανάλωση συνταγογραφούμενα φάρμακα παγκοσμίως αντιπροσωπεύουν συνολικά το 10% της παγκόσμιας αγοράς. Τα φάρμακα αυτά είναι σχεδιασμένα κατά κύριο λόγο για τη θεραπεία και τη διαχείριση του καρκίνου, του διαβήτη, των φλεγμονωδών διαταραχών και των λοιμώξεων από τον HIV ή τον HCV. Στα νοσοκομεία καταναλώνονται πολύ μεγάλες ποσότητες φαρμακευτικά ενεργών ουσιών (pharmaceutically active compounds, PhACs) συχνά σε υψηλές δόσεις και σε καθημερινή βάση για να καλυφθούν οι ανάγκες για την φαρμακευτική αγωγή των ασθενών για πολλές διαφορετικές παθήσεις [84]. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι είναι διαφορετικά από αυτά που χρησιμοποιούνται σε άλλα μέρη, όπως για παράδειγμα στην κατ'οίκον νοσηλεία. Επομένως, τα επεξεργασμένα λύματα των ΜΕΥΑ των μονάδων υγείας δύνανται να επιφέρουν μεγαλύτερους περιβαλλοντικούς κινδύνους σε σχέση με άλλες ΜΕΥΑ, όπως αποδεικνύεται και σε ένα σημαντικό αριθμό εργασιών στη διεθνή βιβλιογραφία [85–89]. Επίσης, στις ψυχιατρικές κλινικές νοσοκομείων ή σε αυτόνομες ψυχιατρικές μονάδες, καταναλώνεται και επομένως και διοχετεύεται στο περιβάλλον ένας μεγάλος αριθμός ψυχιατρικών ουσιών και όχι μόνο, αφού οι ασθενείς, μακροχρόνιοι και μη, δύνανται να χρήζουν θεραπευτικής αγωγής και για άλλες χρόνιες παθήσεις ή για την αντιμετώπιση λοιμώξεων κλπ [90].

Σύμφωνα με την τελευταία Παγκόσμια Έκθεση του ΟΗΕ για τα Ναρκωτικά και το Έγκλημα (World Drug Report of the United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC), 247 εκατομμύρια άνθρωποι, αριθμός που αντιστοιχεί στο 5% του παγκόσμιου πληθυσμού, ηλικίας από 15 έως και 64 χρόνων, κατανάλωσαν τουλάχιστον μια ναρκωτική ουσία κατά τη διάρκεια του 2014 [91]. Για τη συλλογή και την καταγραφή αυτών των δεδομένων, λήφθηκαν υπόψη έρευνες σχετικές με τη χρήση παράνομων ναρκωτικών ουσιών στο γενικό πληθυσμό, στοιχεία πωλήσεων, κατασχέσεις ναρκωτικών ουσιών, ιατρικά αρχεία κ.ά. Ωστόσο, αυτές οι προσεγγίσεις ενέχουν ορισμένους περιορισμούς όπως:

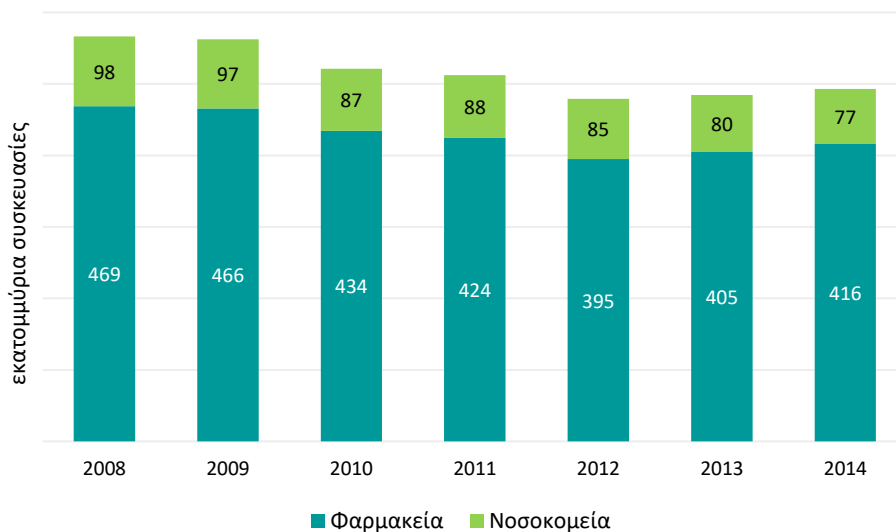
- έλλειψη αντικειμενικότητας, εφόσον οι πληροφορίες που προκύπτουν από τις δημογραφικές έρευνες προέρχεται από τους ίδιους τους καταναλωτές
- ανεπαρκής χωρική ανάλυση η οποία θα επέτρεπε μια ρεαλιστική εκτίμηση της χρήσης ναρκωτικών ουσιών σε περιφερειακό επίπεδο λόγω των διαφόρων

κοινωνικοοικονομικών και πολιτιστικών παραγόντων που επηρεάζουν τις συνήθειες και τις τάσεις των καταναλωτών

- ετεροχρονισμένος χρόνος απόκρισης, αφού οι έρευνες και οι στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι χρονοβόρα και επιπροσθέτως ακριβή [92].

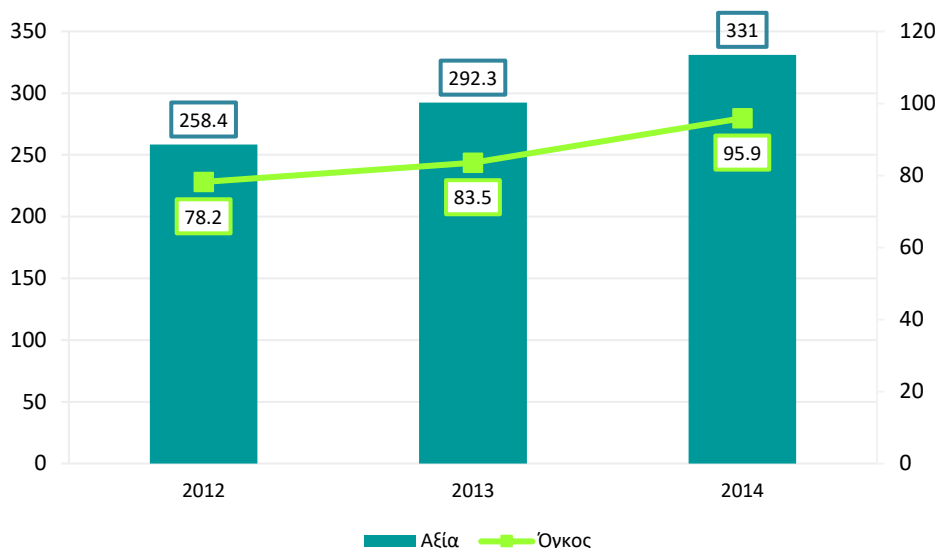
2.12.1 Η αγορά του φαρμάκου στην Ελλάδα

Οι πωλήσεις φαρμακευτικών προϊόντων στην Ελλάδα αυξήθηκαν σημαντικά την περασμένη δεκαετία τόσο ως προς την ποσότητα όσο και την αξία. Κάθε χρόνο διατίθενται στην Ελλάδα περίπου 440 εκατομμύρια μονάδες φαρμάκων, εκ των οποίων μόνο τα 55 εκατομμύρια καταναλώνονται εντός των νοσοκομείων. Εκτιμάται ότι ο κάθε πολίτης καταναλώνει περίπου 44 φαρμακευτικές ουσίες το χρόνο. Στο Σχήμα 2.7 φαίνεται η πώληση φαρμάκων στην Ελλάδα σε όγκο συσκευασιών.



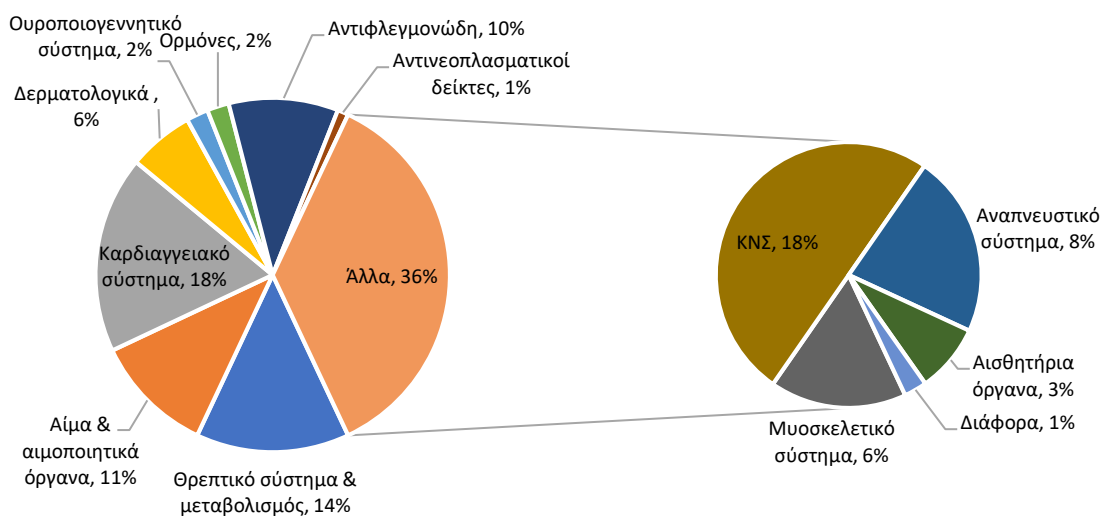
Σχήμα 2.7 Πωλήσεις φαρμάκων σε όγκο στην Ελλάδα (2008-2014) [93]

Σύμφωνα με στοιχεία του Συνδέσμου Φαρμακευτικών Επιχειρήσεων Ελλάδας (ΣΦΕΕ), τα μη συνταγογραφούμενα φάρμακα έχουν ανοδική πορεία παρά την αύξηση της αξίας τους. Στο Σχήμα 2.8 φαίνεται η ανοδική πορεία της κατανάλωσης των Μ.Υ.Συ.Φα. (εκατ. συσκευασίες) συγκριτικά με την αξία τους (εκατ. ευρώ).



Σχήμα 2.8 Πωλήσεις Μ.Υ.Συ.Φα. (2012-2014) σε αξία και όγκο (σε εκατ. €)[93]

Πρώτα σε πωλήσεις φάρμακα στην Ελλάδα είναι τα αναλγητικά παρακεταμόλης και οι συνδυασμοί τους με βιταμίνες ή αποσυμφορητικά. Στη δεύτερη θέση βρίσκονται τα φάρμακα για τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τα αντικαταθλιπτικά. Ακολουθούν τα φάρμακα για το ΚΝΣ και τα αιμοποιητικά όργανα ενώ καταγράφεται και αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών. Η Ελλάδα είναι η πρώτη χώρα στην Ευρώπη στην ανάπτυξη ανθεκτικών στα βακτήρια στελεχών. Οι πωλήσεις των φαρμακευτικών προϊόντων ανά θεραπευτική κατηγορία στην Ελλάδα παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.9.



Σχήμα 2.9 Ποσοστά πωλήσεων όγκων ανά θεραπευτική κατηγορία σύμφωνα με τον IOBE

2.13 Νομοθετικό πλαίσιο για τα φάρμακα

Σήμερα, η αποδεδειγμένη ύπαρξη υπολειμμάτων φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον έχει επιβάλλει την καθιέρωση νομοθεσίας με στόχο την προστασία τόσο των υδάτινων όσο και των χερσαίων οικοσυστημάτων. Η εφαρμογή του κοινοτικού κώδικα για τα κτηνιατρικά φάρμακα αλλά και τα φάρμακα προς ανθρώπινη χρήση προβλέπει τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την έγκριση κυκλοφορίας και διέπεται από τις οδηγίες 2001/82/ΕΚ και 2001/83 αντίστοιχα. Σύμφωνα με τις οδηγίες αυτές, η έγκριση φαρμακευτικών προϊόντων θα πρέπει να συνοδεύεται από τους αντίστοιχους ελέγχους εκτίμησης περιβαλλοντικής επικινδυνότητας (Environmental Risk Assessment, ERA). Έτσι, πριν την κυκλοφορία ενός φαρμακευτικού προϊόντος στην αγορά, θα πρέπει να ελέγχεται αν υπάρχουν πιθανές αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις από το συγκεκριμένο προϊόν. Παρόλα αυτά, έως σήμερα, ενώ έχουν θεσπιστεί ανώτατα όρια καταλοίπων φαρμακευτικών ενώσεων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης με τον Κανονισμό 470/2009 [94], δεν έχουν θεσπιστεί ακόμα αντίστοιχα όρια στο περιβάλλον.

Στον Πίνακα 2.3, καταγράφονται οι κύριες οδηγίες και κανονισμοί περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος σχετικά με τα φάρμακα, που είναι διαθέσιμοι στην Τράπεζα Πληροφοριών της Κοινότητας (EUR-lex).

Πίνακας 2.3 Κύριες οδηγίες και κανονισμοί περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος της ΕΕ για τα φάρμακα

Οδηγία	Περιεχόμενο	Αναφορά
2000/60/ΕΚ	Θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων	[2]
2013/39/ΕΕ	Τροποποίηση της 2000/60/ΕΚ για τους ρύπους προτεραιότητας	[60]
98/83/ΕΚ	Οδηγία για το πόσιμο νερό	[59]
92/18/ΕΟΚ	Αναλυτικά, φαρμακοτοξικολογικά και κλινικά πρότυπα για τα κτηνιατρικά φάρμακα	[95]
2001/82/ΕΚ	Κοινοτικός Κώδικας για τα κτηνιατρικά φάρμακα	[96]
2001/83/ΕΚ	Κοινοτικός Κώδικας για τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση	[76]
Κανονισμός	Περιεχόμενο	Αναφορά
(ΕΚ) 470/2009	Θέσπιση κοινοτικών διαδικασιών για τον καθορισμό ορίων καταλοίπων των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης	[94]
(ΕΚ) 1272/2008	Ταξινόμηση, την επισήμανση και τη συσκευασία των ουσιών και των μειγμάτων	[67]

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA), έχει εκδώσει οδηγία για τον έλεγχο των φαρμάκων που προορίζονται για την κατανάλωση από ανθρώπους, σύμφωνα με την οποία, στην περίπτωση που η προβλεπόμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας ενός φαρμακευτικού είναι υψηλότερη από $1 \mu\text{g L}^{-1}$, η εκτίμηση της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας είναι προαπαιτούμενη για την έγκριση του συγκεκριμένου φαρμάκου.

Ενώ στις ΗΠΑ υπήρξε πρώιμη αναγνώριση των οικιακών φαρμάκων ως περιβαλλοντικών ρύπων, στις περισσότερες χώρες του κόσμου δεν υπάρχουν συστήματα συλλογής και ασφαλούς διαχείρισης των φαρμάκων από τον οικιακό τομέα, με αποτέλεσμα πολλά από τα ληγμένα ή αχρησιμοποίητα φάρμακα που υπάρχουν στο κάθε σχεδόν σπίτι να καταλήγουν μαζί με τα υπόλοιπα απορρίμματα στους όποιους χώρους διάθεσης απορριμμάτων διαθέτει η κάθε χώρα ή η κάθε περιοχή.

Οι κίνδυνοι για την υγεία υφίστανται όταν οι ρύποι αυτοί εισέρχονται στη διατροφική αλυσίδα και όταν ανευρίσκονται στο πόσιμο νερό, αφού η χλωρίωση του νερού δεν έχει επίδραση στα περισσότερα φάρμακα και άρα δεν αποτελεί μέτρο προστασίας. Επιπρόσθετα, οι ισχύουσες μέθοδοι ελέγχου της ποιότητας του νερού των πόλεων δεν επιτρέπουν την ανίχνευση ουσιών που προέρχονται από φαρμακευτικά προϊόντα και επομένως είναι απαραίτητοι ειδικοί περιοδικοί έλεγχοι. Για όλους αυτούς τους λόγους, σε πολλές πλέον χώρες και όχι μόνο στις ΗΠΑ, είναι διαδεδομένη πρακτική η ανακύκλωση των φαρμάκων, με σημεία συλλογής τα ίδια σημεία όπου γίνεται η προμήθεια των φαρμάκων, κυρίως στα φαρμακεία, αν και η Ευρωπαϊκή Ένωση, δεν έχει ακόμα ολοκληρωμένο ενιαίο νομοθετικό πλαίσιο, ούτε έχουν γίνει οι απαραίτητες υποστηρικτικές δράσεις μέσω προγραμμάτων επίδειξης και ευαισθητοποίησης των πολιτών.

Στην Ελλάδα, το πρόβλημα της διάθεσης των οικιακών φαρμάκων είναι ιδιαίτερα οξύ, κυρίως λόγω της πολυφαρμακίας για την η οποία η χώρα μας διακρίνεται διεθνώς αλλά και επειδή δεν υπάρχουν συστηματικές πρωτοβουλίες για την ασφαλή διαχείριση και αποκομιδή των φαρμακευτικών σκευασμάτων. Έχει υπολογιστεί ότι από τα περίπου 500 εκατομμύρια φαρμακευτικά σκευάσματα που διακινούνται κάθε χρόνο στην Ελλάδα, το 10% απορρίπτονται στους κάδους αχρησιμοποίητα ή ληγμένα. Οι δε χωματερές που λειτουργούν ακόμα στη χώρα μας, καθιστούν την περιβαλλοντική ρύπανση πολύ πιο άμεση και επικίνδυνη από ότι σε άλλες χώρες που εφαρμόζουν σύγχρονα συστήματα διαχείρισης των οικιακών απορριμμάτων.

2.14 Πηγές ρύπανσης από φαρμακευτικές ενώσεις

Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων

Τα φάρμακα καταναλώνονται και καταλήγουν στην αποχέτευση μέσω των ούρων και των κοπράνων, ή διαφορετικά, τα ληγμένα ή αχρησιμοποίητα σκευάσματα διατίθενται στα αστικά ή νοσοκομειακά απόβλητα. Οι διεργασίες που υφίσταται μια φαρμακευτική ουσία στις ΜΕΥΑ είναι:

- α.** Αποικοδόμηση από μικροοργανισμούς προς διοξείδιο του άνθρακα και νερό.
- β.** Μερική προσρόφηση στην ιλύ της μονάδας, σε περίπτωση που η ουσία είναι λιπόφιλη και δεν αποικοδομείται εύκολα. Όταν η ιλύς χρησιμοποιείται ως βελτιωτικό εδάφους, αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάθεση των φαρμακευτικών στις αγροκαλλιέργειες.
- γ.** Η φαρμακευτική ουσία είναι σταθερή και ταυτόχρονα πολύ πολική με αποτέλεσμα να μην προσροφάται σε στερεό υπόστρωμα. Έτσι, δεν συγκρατείται ούτε αποδομείται στις ΜΕΥΑ, αλλά καταλήγει στο υδάτινο περιβάλλον και μπορεί να επηρεάσει τους υδάτινους οργανισμούς.

Επομένως, τα απόβλητα των επεξεργασμένων λυμάτων είναι η κύρια οδός μέσω της οποίας μεγάλος αριθμός φαρμάκων και μεταβολιτών τους εισέρχεται στο υδάτινο περιβάλλον. Τα ποσοστά απομάκρυνσης των φαρμακευτικών προϊόντων στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων κυμαίνονται από λιγότερο από 10% έως σχεδόν 100% και εξαρτώνται από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου, καθώς επίσης και από τον τύπο της τεχνολογίας επεξεργασίας [97]. Οι πηγές των φαρμακευτικών προϊόντων ανθρώπινης προέλευσης στα λύματα περιλαμβάνουν τα φαρμακευτικά απόβλητα των πολιτών, είτε μέσω των απεκκρίσεων είτε από την απόρριψη αχρησιμοποίητων σκευασμάτων, νοσοκομειακά απόβλητα και σε ορισμένες περιπτώσεις, τα λύματα από τη φαρμακευτική βιομηχανία [80]. Τα λύματα μπορεί να καταλήγουν επίσης στο θαλάσσιο περιβάλλον μέσω παράκτιων και ωκεάνιων εκροών σε συνδυασμού με τις ΜΕΥΑ [25, 80]. Τα επεξεργασμένα λύματα των ΜΕΥΑ των νοσοκομείων έχει αποδείχτει πως είναι περισσότερο τοξικά για το περιβάλλον σε σχέση με αυτά των αστικών ΜΕΥΑ [98], ενώ αυτά των ψυχιατρικών νοσοκομείων φαίνεται να προκαλούν ακόμα μεγαλύτερα περιβαλλοντικά προβλήματα [85, 88, 99–101]. Σχετικά με την επεξεργασία των αστικών λυμάτων, την παραγομένη ιλύ και τις περιβαλλοντικές τους επιπτώσεις έχουν εκδοθεί οι οδηγίες 91/271/ΕΟΚ και 86/278/ΕΟΚ αντίστοιχα [102, 103].

Υγειονομική ταφή

Όταν τα φάρμακα διατίθενται μαζί με τα οικιακά απορρίμματα, καταλήγουν σε χώρους υγειονομικής ταφής. Τα υγρά από τους χώρους υγειονομικής καταλήγουν μέσω

απόπλυσης στο υδάτινο περιβάλλον. Ιστορικά, σε ορισμένες περιοχές, τα απόβλητα από τη βιομηχανία παραγωγής φαρμάκων, η επεξεργασμένη ιλύς καθώς και τα κόπρανα των ζώων απορρίπτονταν στη θάλασσα [104].

Σηπτικές δεξαμενές

Ακόμα και σήμερα, σε πολλές μεγάλες πόλεις κυρίως της Ασίας, η διαχείριση των λυμάτων εξακολουθεί να βασίζεται σε σηπτικές δεξαμενές, με ανεπαρκή επεξεργασία που έχει ως αποτέλεσμα την κατάληξη μεγάλων ποσοτήτων φαρμακευτικών ενώσεων στο υδάτινο περιβάλλον και στη θάλασσα [105].

Κτηνοτροφία – Κηπουρική

Η κτηνοτροφία και η κηπουρική κατά μήκος των ποταμών και στις παράκτιες περιοχές συνισφέρει σημαντικά στην επιβάρυνση των περιοχών αυτών με φαρμακευτικές ουσίες μέσω των καναλιών νερού [97]. Τα φάρμακα που προορίζονται για κτηνιατρική χρήση περιλαμβάνουν τις ουσίες που χρησιμοποιούνται στις μονάδες εκτροφής χοίρων, τις αντιβιοτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις κτηνιατρικές μονάδες, τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται στις πτηνοτροφικές μονάδες και τις ουσίες που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες όπως είναι οι ορμόνες και τα αντιβιοτικά. Τα περισσότερα κτηνιατρικά φάρμακα καταλήγουν στο λίπασμα. Το λίπασμα διατηρείται σε δεξαμενές για χρονικό διάστημα το οποίο καθορίζεται από τη νομοθεσία της εκάστοτε χώρας και στη συνέχεια διατίθεται στα χωράφια. Όταν τα φάρμακα χορηγούνται σε ζώα ελεύθερας βοσκής, τότε καταλήγουν απευθείας στα χωράφια μέσω της απέκκρισης, δίνοντας σε αυτή την περίπτωση υψηλότερες σημειακές συγκεντρώσεις. Τα αντιβιοτικά προστίθενται στις ζωοτροφές και σε ορισμένες περιπτώσεις και στο πόσιμο νερό για την αντιμετώπιση ασθενειών, ιδιαίτερα σε κτηνοτροφικές μονάδες πάχυνσης που φιλοξενούν μεγάλο αριθμό ζώων [106]. Επίσης, η πρακτική της χορήγησης χαμηλών δόσεων αντιβιοτικών στις ζωοτροφές ώστε να λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες, εξακολουθεί να είναι δημοφιλής σε αρκετές χώρες, ωστόσο έχει απαγορευτεί στην Ευρώπη [107]. Η εφαρμογή των δημοτικών βιοσπορών στις γεωργικές εκτάσεις ως λίπασμα αποτελεί ακόμα μια πηγή φαρμακευτικών προϊόντων που εισέρχονται στα γεωργικά συστήματα [97]. Έτσι, οι φαρμακευτικές ουσίες μπορούν να αποτελέσουν απειλή για τα υπόγεια ύδατα, τους υδάτινους και τους χερσαίους οργανισμούς.

Ιχθυοκαλλιέργειες

Μια σειρά κτηνιατρικών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών, που προορίζονται και για ανθρώπινη χρήση, χρησιμοποιείται προληπτικά για τον έλεγχο των επιδημιών στη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια. Υπολογίζεται ότι μέχρι και το 75% της χορηγούμενης δόσης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου μπορεί να χαθεί στο περιβάλλον. Οι μηχανισμοί απώλειας περιλαμβάνουν τη διασπορά των μη προσλαμβανόμενων σφαιριδίων της τροφής, τη νεφρική και από τα βράγχια απέκκριση του μη επεξεργασμένου φαρμάκου και την απέκκριση των μεταβολιτών των φαρμάκων από τα νεφρά και τα κόπρανα [108]. Άλλοι θαλάσσιοι οργανισμοί στην περιοχή, συμπεριλαμβανομένων των άγριων ψαριών, τρέφονται με τρόφιμα και φερτά υλικά κοπράνων που προέρχονται από τη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια, και ενδεχομένως φαρμακευτικά προϊόντα και μεταβολίτες εξαπλώνονται περαιτέρω. Επίσης, μονάδες υδατοκαλλιέργειας με βάση τις λίμνες που βρίσκονται σε παράκτιες περιοχές αποτελούν επίσης πηγή αντιβιοτικών που εισέρχονται στα παράκτια ύδατα μέσω διαρροών και εκροής λυμάτων. Εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών έως $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ μετρήθηκαν σε δείγματα νερού λίμνης όπου εκτρέφονται γαρίδες σε μαγγρόβια του Βιετνάμ [109]. Επίσης, η αρχαία πρακτική όπου η υδατοκαλλιέργεια βασίζεται στα λύματα (ανθρώπινα και ζωικά) για την εκτροφή των ψαριών, δυστυχώς εξακολουθεί να υφίσταται σε ορισμένα μέρη της Ασίας [110]. Οι πρακτικές που συμπεριλαμβάνουν εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών, ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των χωρών [109].

Έτσι, αρκετές φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες, καταλήγουν άμεσα στους υδάτινους αποδέκτες καθώς συχνά δεν καταναλώνονται από τα ψάρια [18]. Σε αρκετές περιπτώσεις, μπορεί να υπάρξει μια μικρή μονάδα επεξεργασίας του νερού των ιχθυοκαλλιεργειών πριν καταλήξουν στον υδάτινο αποδέκτη. Η ιλύς που προέρχεται από την επεξεργασία αυτή, χρησιμοποιείται σαν λίπασμα με αποτέλεσμα η τελική κατάληξη των φαρμάκων στο έδαφος να είναι ίδια με αυτή των υπολοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων.

Βιομηχανίες

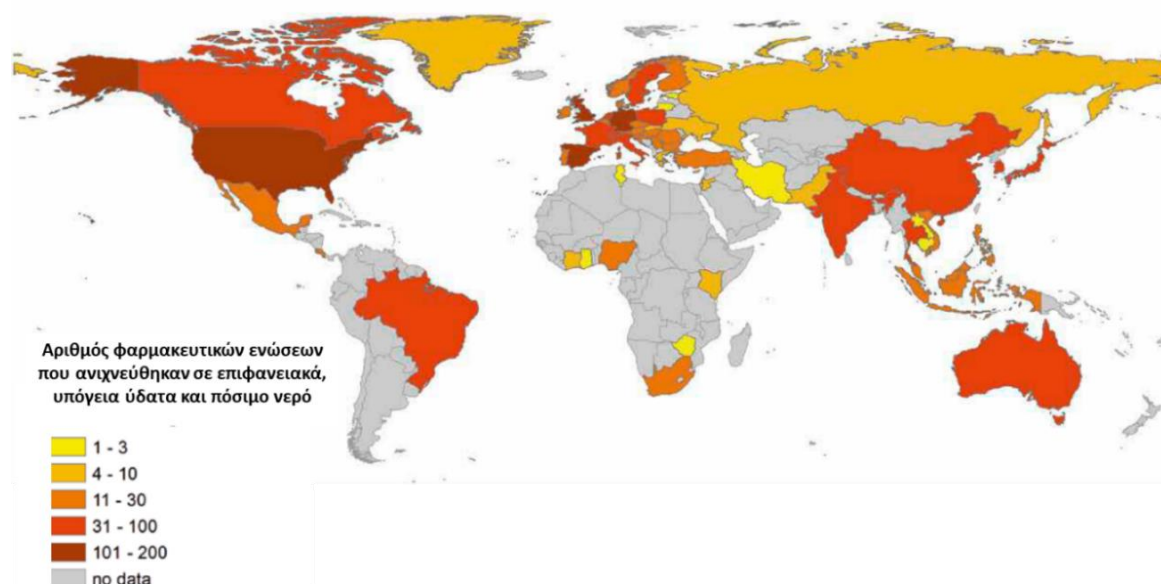
Λόγω της απαιτούμενης νομοθεσίας στη βιομηχανία φαρμάκων για τη σωστή βιομηχανική πρακτική (Good Manufacturing Practice, GMP) και το συχνά υψηλό κόστος των δραστικών ουσιών, τα ποσοστά των εκπομπών που προκύπτουν από τις βιομηχανίες θεωρούνται αμελητέα. Στην Ευρώπη και στην Βόρεια Αμερική μάλιστα, τα ποσοστά αυτά θεωρούνται χαμηλά. Παρόλα αυτά, μέχρι και σήμερα οι βιομηχανίες δεν έχουν δημοσιοποιήσει σχετικές πληροφορίες.

Οικιακά απόβλητα

Τα ληγμένα ή αχρησιμοποίητα φάρμακα, καταλήγουν συχνά στις αποχετεύσεις μέσω των οικιακών αποβλήτων και κατ' επέκταση στις ΜΕΥΑ. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία, η διάθεση αχρησιμοποίητων φαρμάκων μέσω των οικιακών αποβλήτων έχει απαγορευθεί από το 1994. Σύμφωνα με μια πρόσφατη έρευνα, το 17,7 % των ατόμων εναποθέτει τα ληγμένα ή αχρησιμοποίητα φάρμακα στη λεκάνη της τουαλέτας και περίπου το 20 % κάνει το ίδιο με τα υγρά φάρμακα. Η επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων οικιακών αποβλήτων για την άρδευση μπορεί και αυτή να συμβάλλει στη ρύπανση των υπογείων υδάτων [111]. Σε ολόκληρο τον κόσμο, οι αγροτικές και περιαστικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων των δημοφιλών τουριστικών παραθαλάσσιων περιοχών, βασίζονται σε σπητικές δεξαμενές ή σε μικρά αποκεντρωμένα συστήματα για τη διάθεση των λυμάτων [112]. Ανάλογα με την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας και την χωρητικότητα των τοπικών εδαφών, τα συστήματα αυτά αποτελούν πιθανή πηγή φαρμακευτικών για τα παράκτια συστήματα μέσω διαρροών στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα [113].

Πλοία

Τα λύματα μπορούν επίσης να απορρίπτονται στο θαλάσσιο περιβάλλον από πλοία και σκάφη. Σύμφωνα με το παράρτημα IV του MARPOL 73/78, τα πλοία, μπορούν να εκκενώσουν επεξεργασμένα λύματα στη θάλασσα έως και 4 ναυτικά μίλια από την πλησιέστερη ακτή και ανεπεξέργαστα λύματα έως και 12 ναυτικά μίλια [114]. Οι ποσότητες αποβλήτων που απορρίπτονται μπορεί να είναι σημαντικές καθώς τα μεγάλα κρουαζιερόπλοια μπορεί να μεταφέρουν αριθμό επιβατών ισοδύναμο με τον πληθυσμό μιας μικρής πόλης. Από την άλλη πλευρά, απόβλητα λυμάτων από μικρά σκάφη, δεν υποβάλλονται καν σε στοιχειώδη επεξεργασία και απορρίπτονται απευθείας στη θάλασσα. Στο Σχήμα 2.10, αποτυπώνεται στον παγκόσμιο χάρτη ο αριθμός των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά, και τα υπόγεια ύδατα καθώς και στο πόσιμο νερό, για διάφορες χώρες.



Σχήμα 2.10 Αριθμός φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν σε επιφανειακά, υπόγεια ύδατα και πόσιμο νερό



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΙΚΡΟΥΡΥΠΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΙΚΡΟΡΥΠΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.1 Εισαγωγή

Ο προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων και των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού τους σε περιβαλλοντικά δείγματα παρουσιάζει αρκετές ιδιαιτερότητες. Πρώτον, η ανάλυση περιλαμβάνει ενώσεις ή ομάδες ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες (πτητικότητα, πολικότητα, διαλυτότητα στο νερό, οξύτητα, κ.ά.). Δεύτερον, οι ενώσεις αυτές συνήθως απαντώνται στο περιβάλλον σε ίχνη (επίπεδα της τάξης των ppt), δηλαδή σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες συγκριτικά με άλλους οργανικούς ρύπους. Επιπλέον, η συνύπαρξη τους στο υπόστρωμα με ένα μεγάλο αριθμό οργανικών και ανόργανων ενώσεων που δρουν ως «παρεμποδίζουσες» δυσχεραίνει την ανάλυση των δειγμάτων και τον προσδιορισμό των επιθυμητών ενώσεων. Τέλος, τις περισσότερες φορές το ιστορικό των δειγμάτων προς ανάλυση είναι άγνωστο [115]. Για αυτό τα περιβαλλοντικά υποστρώματα όπως τα επιφανειακά ύδατα, τα ιζήματα, το έδαφος, οι βενθικοί οργανισμοί, τα υγρά απόβλητα, η ιλύς των ΜΕΥΑ, κ.ά., συχνά χαρακτηρίζονται ως «πολύπλοκα». Οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων διακρίνονται σε μονοδύναμες (single-residue) όταν προσδιορίζεται ένας ρύπος, και πολύ-υπολειμματικές (multi-residue) όταν προσδιορίζονται ταυτόχρονα πολλοί ρύποι ή ομάδες ρύπων [116].

Για να είναι αποτελεσματική η πολυ-υπολειμματική ανάλυση, τα δείγματα υφίστανται προκατεργασία, η οποία ανεξάρτητα από το είδος και τη φύση του δείγματος πρέπει να επιτελεί τρεις στόχους: (α) τροποποίηση του υποστρώματος του δείγματος ώστε να είναι σε θέση να αναλυθεί, π.χ. εισαγωγή στη χρωματογραφική στήλη χωρίς να προκαλέσει προβλήματα στο εκάστοτε αναλυτικό σύστημα (β) απομάκρυνση τυχόν παρεμποδίσεων, ώστε να βελτιωθεί η ακρίβεια και η εκλεκτικότητα του προσδιορισμού αλλά και να προστατευθεί το όργανο, με έμμεσο αποτέλεσμα την ελάττωση του κόστους των αναλύσεων και (γ) εκλεκτική προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων, ώστε να βελτιωθεί η ευαισθησία της μεθόδου. Στις περιπτώσεις των πολυ-υπολειμματικών μεθόδων οι βέλτιστες συνθήκες διαφέρουν ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και απαιτείται «συμβιβασμός» για να αναπτυχθεί μια αποτελεσματική μέθοδος, κοινή και ικανή για την ανάλυση μεγάλου αριθμού ενώσεων.

Η μέθοδος προκατεργασίας εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του υποστρώματος του προς ανάλυση δείγματος, τις ιδιότητες του και το αναμενόμενο επίπεδο συγκέντρωσης της ένωσης προς ανάλυση. Πρόκειται για χρονοβόρο και απαιτητικό στάδιο, καθώς έχει υπολογιστεί ότι το 60%–80% του συνολικού χρόνου κάθε ανάλυσης αναλώνεται στην προκατεργασία. Επιπλέον, ανεπαρκής ή λανθασμένη προκατεργασία μπορεί να εισάγει στην ανάλυση σφάλματα που αποτελούν συνολικά μέχρι και το 30% του συνολικού πειραματικού σφάλματος. Τα τυπικά στάδια της προκατεργασίας του δείγματος περιλαμβάνουν:

- δειγματοληψία και ομογενοποίηση, ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό
- εκχύλιση, για την απομόνωση των επιθυμητών ενώσεων
- καθαρισμό, για την απομάκρυνση των παρεμποδισουσών ουσιών
- συμπύκνωση, αν κρίνεται απαραίτητη για να επιτευχθεί προσυγκέντρωση
- διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση με ενόργανες διατάξεις

Τα στάδια αυτά είναι διαδοχικά και αλληλεξαρτώμενα, επομένως στην περίπτωση που κάποιο από αυτά δεν ολοκληρωθεί σωστά, τα σφάλματα εισέρχονται από το ένα στάδιο στο άλλο με αποτέλεσμα την εξαγωγή μη ορθών αποτελεσμάτων.

Η ανάγκη ανάπτυξης απλών, γρήγορων, χαμηλού κόστους και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων που παρέχουν αναλυτικά χαρακτηριστικά όπως υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία, χαμηλά όρια ανίχνευσης και επαναληψιμότητα είναι επιτακτική. Τελευταία, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές που ανήκουν στην κατηγορία των επονομαζόμενων «σύγχρονων τεχνικών» αντικαθιστώντας αρκετές φορές τις κλασικές τεχνικές εκχύλισης. Δεδομένου όμως ότι καμία τεχνική εκχύλισης, είτε κλασική, είτε σύγχρονη, δεν πληροί όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις, θα πρέπει να επιλέγεται κάθε φορά η καταλληλότερη. Η

καταλληλότητα μιας μεθόδου εξαρτάται από το είδος του δείγματος, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των προσδιοριζόμενων ενώσεων, την επιθυμητή ακρίβεια των προσδιορισμών, κ.ά. Στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου υπεισέρχονται και άλλοι παράγοντες, όπως η χρήση μικρών μεγεθών (μάζας ή όγκου) αρχικού δείγματος και όγκων οργανικών διαλυτών καθώς και ο εξοπλισμός του εκάστοτε εργαστηρίου, που καθορίζει της δυνατότητές του, όπως η δυνατότητα αυτοματοποίησης, η χρήση τεχνικών εκχύλισης σε απευθείας σύνδεση (on-line) με την ενόργανη διάταξη κ.ά.

3.2 Δειγματοληψία

Ο ρόλος της δειγματοληψίας ως πρώτο βήμα της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος είναι σημαντικός και δεν πρέπει να υποτιμάται. Ειδικά στις μελέτες για τον έλεγχο υπολειμμάτων, η ποσότητα του δείγματος και ο τρόπος δειγματοληψίας και αποθήκευσης των δειγμάτων είναι πρωταρχικής σημασίας προκειμένου να ληφθούν αντιπροσωπευτικά δείγματα. Η ανάγκη για χρήση όλο και μικρότερου μεγέθους δείγματος θα πρέπει να εξισορροπείται με την ανάγκη για τη χρήση όσο το δυνατόν περισσότερο αντιπροσωπευτικού δείγματος προς ανάλυση. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η φάση της δειγματοληψίας όταν πρόκειται για στερεά δείγματα προκειμένου το δείγμα προς ανάλυση να είναι αντιπροσωπευτικό του συνολικού όγκου και της φύσης του αρχικού δείγματος. Έτσι, για τον έλεγχο υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων ή φαρμάκων η δειγματοληψία θα πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με τις εκάστοτε επίσημες οδηγίες [117].

3.3 Τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων

Ως εκχύλιση ορίζεται η μεταφορά ενός συγκεκριμένου συστατικού από μια φάση (διάλυμα ή αιώρημα) σε μια άλλη (υγρή) και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την παραλαβή ενός συστατικού από ένα χημικό σύστημα. Η εκχύλιση των ενώσεων από υγρά και στερεά περιβαλλοντικά υποστρώματα βασίζεται στην κατανομή αυτών μεταξύ ενός μη αναμίξιμου με το νερό διαλύτη και της υδατικής φάσης, ή στην “παγίδευση” των ενώσεων πάνω σε μια στήλη, ή σε στερεάς φάσης υπόστρωμα, ή – σπανιότερα– στην εξάτμιση του δείγματος μέχρι ξηρού και την επιλεκτική επαναδιάλυση των αναλυόμενων ενώσεων.

Οι παλαιότερες και πιο κλασικές τεχνικές είναι η υγρή–υγρή εκχύλιση (Liquid–Liquid Extraction, LLE) και η εκχύλιση Soxhlet που στηρίζονται στη χρήση μεγάλων όγκων διάφορων

οργανικών διαλυτών. Ωστόσο, το ενδιαφέρον στρέφεται πλέον προς τις αναλυτικές τεχνικές με περιορισμένη χρήση οργανικών διαλυτών, με εναλλακτικούς μη χλωριωμένους διαλύτες και με δυνατότητα αυτοματοποίησης οι οποίες θα είναι σε θέση να παρέχουν αξιόπιστα, εκλεκτικά και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Από την εξέλιξη της κλασικής τεχνικής εκχύλισης προέκυψε μια σειρά τεχνικών εκχύλισης με χρήση στερεού προσροφητικού υλικού. Βασική αρχή όλων αυτών των τεχνικών, είναι η εκλεκτική συγκράτηση του προσδιοριζόμενου συστατικού ενός δείγματος στο προσροφητικό υλικό και στη συνέχεια η εκλεκτική παραλαβή του από αυτό.

Εκπρόσωποι των σύγχρονων τεχνικών εκχύλισης είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME), η εκχύλιση με ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE), η εκχύλιση μέσω μεμβρανών (Membrane Extraction), η μικροεκχύλιση σταγόνας (Single Drop Micro Extraction, SDME), η QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe), η εκχύλιση με υπερήχους (ultra-sound–assisted extraction, USE), η επιταχυνόμενη εκχύλιση διαλύτη (accelerated-solvent extraction, ASE) γνωστή και ως εκχύλιση με υγρό υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE), η εκχύλιση με μικροκύματα (microwave–assisted extraction, MAE), η διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (matrix solid phase dispersion, MSPD), η εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά (dispersive solid phase extraction, dSPE) κ. ά.

Σήμερα, η πλέον διαδεδομένη και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική εκχύλισης οργανικών ενώσεων από υγρά περιβαλλοντικά υποστρώματα όπως το νερό είναι η εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (SPE) η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα Διατριβή για την εκχύλιση των δειγμάτων νερού και θα περιγραφεί αναλυτικά στο εδάφιο 3.3.1.1. Εκτενώς θα περιγραφεί και η μέθοδος QuEChERS (εδάφιο 3.3.2.1) που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των ιζημάτων.

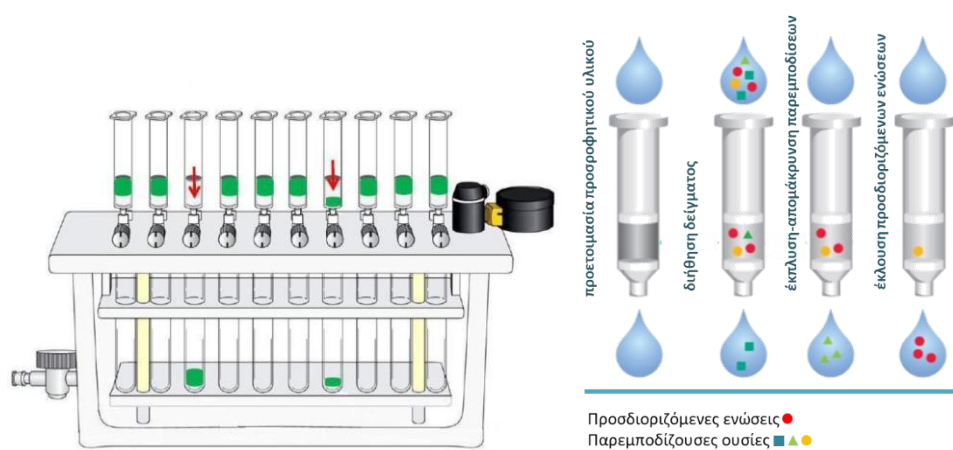
3.3.1 Κύριες τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από υγρά υποστρώματα

3.3.1.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης–υγρού (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης–υγρού (SPE) είναι μια απλή και αποτελεσματική τεχνική που εφαρμόζεται για την εκλεκτική απομόνωση, παραλαβή και προσυγκέντρωση των

επιθυμητών συστατικών, και αποτελεί την πιο δημοφιλή μέθοδο προκατεργασίας υδατικών αλλά και στερεών δειγμάτων, που μετά από προκατεργασία καταλήγουν σε υγρή μορφή για την περαιτέρω εκχύλιση των ενώσεων. Τα βασικά στάδια της SPE (Σχήμα 3.1) είναι τα εξής:

1. προετοιμασία του προσροφητικού υλικού
2. διήθηση του δείγματος
3. έκπλυση για την απομάκρυνση πιθανών παρεμποδισουσών ουσιών
4. εκρόφηση και ανάκτηση των ενώσεων προς ανάλυση.



Σχήμα 3.1 Πειραματική πορεία SPE με τη χρήση μικροστηλών εκχύλισης

Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται μικροστήλες εκχύλισης, το προσροφητικό υλικό διαβρέχεται αρχικά με κατάλληλο οργανικό διαλύτη ώστε να ενεργοποιηθεί και στη συνέχεια με νερό για εγκλιματισμό. Έπειτα, το υδατικό δείγμα διέρχεται από το στερεό υλικό της μικροστήλης, όπου και συγκρατούνται οι προς ανάλυση ενώσεις. Ακολουθεί έκπλυση της μικροστήλης για την άρση των παρεμποδισουσών ουσιών και στη συνέχεια οι προς ανάλυση ενώσεις εκκλύονται με την βοήθεια μικρής ποσότητας κατάλληλου οργανικού διαλύτη.

Οι κύριες πειραματικές παράμετροι που επηρεάζουν τις ανακτήσεις των προς ανάλυση ενώσεων κατά την εφαρμογή της τεχνικής εκχύλισης δια της στερεής φάσης είναι:

1. ο διαλύτης προετοιμασίας προσροφητικού υλικού
2. η ταχύτητα ροής του δείγματος
3. οι ιδιότητες του δείγματος (pH, ιοντική ισχύς, κλπ.)
4. ο χρόνος ξήρανσης του προσροφητικού πριν την έκλυση
5. ο διαλύτης καθαρισμού (προαιρετικό στάδιο)
6. ο διαλύτης και ο όγκος διαλύτη έκλυσης (2–3 φορές ο κενός όγκος των μικροστηλών)

Η τεχνική βασίζεται στους μηχανισμούς της προσρόφησης και της κατανομής. Το σύστημα αποτελείται από μια στατική φάση (προσροφητικό) και μια κινητή φάση (διαλύτης έκλυσης). Τα συνηθέστερα προσροφητικά μέσα είναι ο ενεργός άνθρακας και τα πορώδη πολυμερή, τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα είτε σε μικροστήλες (extraction cartridges), οι οποίες περιέχουν κατάλληλο προσροφητικό υλικό, είτε σε δίσκους εκχύλισης (extraction disks), στους οποίους το προσροφητικό υλικό έχει ενσωματωθεί σε πολυμερή μεμβράνη, είτε και σε μικροπλάκες 96 κυψελών (96-well plates).

Η κατανομή της προς ανάλυση ένωσης μεταξύ της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού και του νερού είναι ο δεύτερος μηχανισμός στον οποίο βασίζεται η τεχνική SPE. Η εκχύλιση είναι αποτέλεσμα των ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων των ιοντικών δυνάμεων που συγκρατούν τις διαλυμένες ουσίες στο νερό και των δυνάμεων διάχυσης που προκαλούν την μεταφορά των ενώσεων από το υδατικό μέσο στα προσδεμένα οργανικά μόρια που βρίσκονται στην προσροφητική επιφάνεια. Η κατακράτηση των ενώσεων επιτυγχάνεται με ισχυρές αλλά αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων προς ανάλυση και της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού. Τυπικά είδη αυτών είναι οι υδρόφοβες δυνάμεις (δεσμοί van der Waals), οι πολικές (δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις διπόλου–διπόλου), καθώς και οι επιδράσεις ιονανταλλαγής των δεσμών.

Πριν την επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού θα πρέπει να μελετηθεί η φυσικοχημεία του συστήματος όπως οι λειτουργικές ομάδες των προς ανάλυση ενώσεων, η φύση του προσροφητικού υλικού, οι ενέργειες των δεσμών που δημιουργούνται, οι δευτερεύουσες επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις του προσροφητικού υλικού, καθώς και των ενώσεων προς ανάλυση με τα άλλα συστατικά του υποστρώματος.

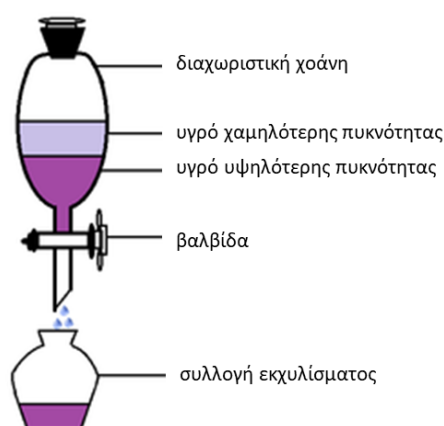
Οι προς ανάλυση ενώσεις εκροφώνται από τα προσροφητικά υλικά με μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ή μείγματος διαλυτών εξαρτάται από τη φύση του διαλύτη και της ένωσης που εκροφάται. Όταν η τεχνική της SPE εφαρμόζεται σε φυσικά νερά υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να συνεκχυλιστούν μαζί με τις ενώσεις προς ανάλυση και άλλες ουσίες που δρουν παρεμποδιστικά. Επομένως, αρκετές φορές είναι απαραίτητο να λάβει χώρα ένα στάδιο εκπλύσεων του προσροφητικού υλικού με λίγο απεσταγμένο νερό ή νερό που να περιέχει μικρή ποσότητα κατάλληλου οργανικού διαλύτη ή κάποια επιφανειοδραστική ουσία, ώστε να απομακρυνθούν ενώσεις που παρεμβάλλονται στην ανάλυση με χρωματογραφία, όπως για παράδειγμα τα χουμικά και φουλβικά οξέα. Ωστόσο, το στάδιο της έκπλυσης ενέχει τον κίνδυνο για απώλειες των πιο ασθενώς συγκρατούμενων ενώσεων όπως οι πολικές ενώσεις. Οι μικροστήλες εκχύλισης έχουν εισάγει δύο σημαντικά χαρακτηριστικά, την τυποποίηση και κατά συνέπεια την

μεγαλύτερη επαναληψιμότητα, καθώς και το μεγαλύτερο πλήθος προσροφητικών υλικών με κυριότερα τα υλικά ανάστροφης φάσης (reversed-phase) και ιονανταλλαγής (ion-exchange), τα οποία είναι απαραίτητα για την επεξεργασία των υδατικών δειγμάτων καθώς και αρκετούς άλλους μηχανισμούς συγκράτησης των αναλυόμενων ουσιών. Στο Σχήμα 3.1 φαίνεται η διαδικασία εκχύλισης δια της στερεής φάσης με μικροστήλες.

Η τεχνική της εκχύλισης δια της στερεής φάσης έχει τα εξής πλεονεκτήματα έναντι των υγρών-υγρών διεργασιών: (α) υψηλότερες ανακτήσεις, (β) αποτελεσματικότερη προσυγκέντρωση, (γ) περιορισμένη χρήση οργανικού διαλύτη, (δ) αποφυγή σχηματισμού γαλακτωμάτων ή φυσαλίδων, (ε) συντομότερος χρόνος προετοιμασίας του δείγματος, (στ) ευκολία χειρισμού και (ζ) ευκολότερη προσαρμογή σε αυτοματοποιημένη διαδικασία.

3.3.1.2 Υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Η πιο γνωστή μέθοδος εκχύλισης ενώσεων από υδατικό υπόστρωμα είναι η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE). Βασίζεται στην κατανομή των οργανικών ενώσεων μεταξύ του υδατικού δείγματος και ενός μη αναμίξιμου με το νερό οργανικού διαλύτη. Η αποτελεσματικότητα του διαλύτη στην εκχύλιση εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής ο οποίος εκφράζει την χημική συγγένειά του με την οργανική ένωση που αναλύεται. Η υγρή-υγρή εκχύλιση πραγματοποιείται σε διαχωριστικές χοάνες (separating funnels) όπου οι ενώσεις προς ανάλυση κατανέμονται μεταξύ της υδατικής φάσης και ενός μη πολικού διαλύτη. Ο συντελεστής κατανομής των ενώσεων πρέπει να είναι μεγάλος, διότι πρακτικά υπάρχει περιορισμός αφ' ενός στην αναλογία όγκου διαλύτη-δείγματος και αφ' ετέρου στον αριθμό των εκχυλίσεων. Η τεχνική απεικονίζεται σχηματικά στο Σχήμα 3.2.



Σχήμα 3.2 Πειραματική πορεία SPME συζευγμένης με GC-MS

Η τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης παρόλο που έχει πολλές εφαρμογές στην εκχύλιση διαφόρων κατηγοριών φυτοφαρμάκων από φυσικά νερά, παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα. Πρόκειται για χρονοβόρα τεχνική, καθώς απαιτείται απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη με εξάτμιση, η οποία συνεπάγεται αύξηση του χρόνου προκατεργασίας. Άλλος περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι ότι πολικοί υδατοδιαλυτοί διαλύτες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση. Επιπλέον απαιτείται η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων διαλυτών υψηλής καθαρότητας που είναι τοξικές ενώσεις για τον άνθρωπο και το περιβάλλον και συχνά έχουν υψηλό οικονομικό κόστος. Επίσης, δεν μπορεί να αποφευχθεί η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του υποστρώματος που παρεμποδίζουν, λόγω του ότι έχουν παραπλήσιες ιδιότητες, καθώς οι διαλύτες δεν είναι εκλεκτικοί. Η δυνατότητα αυτοματοποίησης είναι περιορισμένη ενώ συχνά παρουσιάζει ορισμένα πρακτικά προβλήματα, όπως το σχηματισμό σταθερών γαλακτωμάτων και τη δυσκολία εκχύλισης των πολικών και ιοντικών ενώσεων από το νερό.

Η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση (Micro-Liquid-Liquid Extraction, MLLE) αποτελεί παραλλαγή της LLE και είναι μια απλή μέθοδος που αναπτύχθηκε με βασική αρχή την εκχύλιση από έναν μεγάλο όγκο νερού (400 mL) σε έναν πολύ μικρό όγκο οργανικού διαλύτη (500 μ L) και την απευθείας ανάλυση στον χρωματογράφο παραλείποντας το στάδιο της συμπύκνωσης.

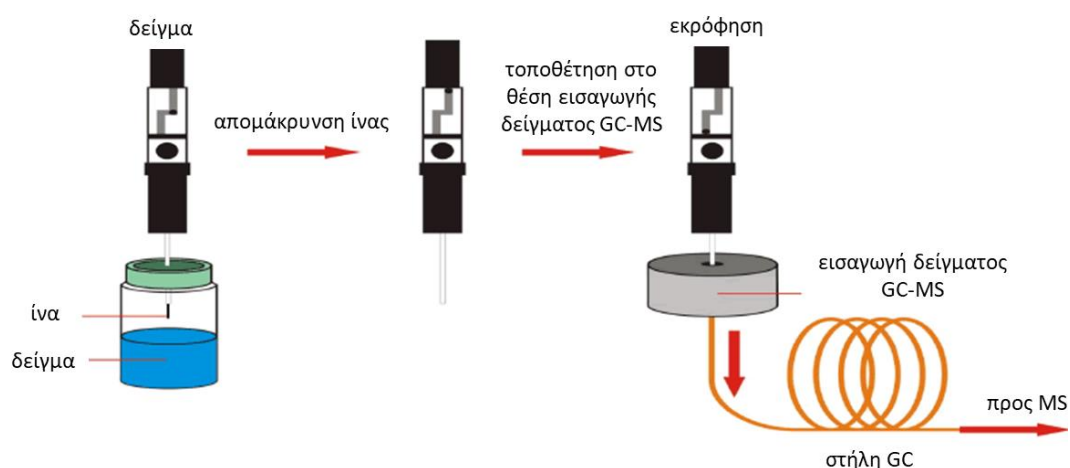
3.3.1.3 Μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)

Η τεχνική μικρο-εκχύλισης στερεάς φάσης είναι μια σύγχρονη τεχνική εκχύλισης που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την προσυγκέντρωση οργανικών ενώσεων κυρίως από υγρά, αλλά επίσης από αέρια ή στερεά δείγματα. Είναι αποτελεσματική τόσο για πολικές όσο και για μη πολικές ενώσεις και για διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων.

Η τεχνική αυτή προκατεργασίας στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των επιθυμητών συστατικών σε μια οπτική ίνα λίγων cm και μικρής διαμέτρου από τηγμένο πυρίτιο επιστρωμένο σε πολυμερές υλικό, η οποία είναι προσαρμοσμένη σε μικροσύριγγα. Η μικροσύριγγα αυτή εισάγεται στο εξεταζόμενο δείγμα, οπότε η οπτική ίνα εκτείνεται μέσα στο δείγμα και τα προσδιοριζόμενα συστατικά προσροφώνται σ' αυτήν. Η προσρόφηση όμως δε γίνεται ποσοτικά, αλλά αποκαθίσταται μια ισορροπία κατανομής των συστατικών ανάμεσα στη φάση του δείγματος και στη στατική φάση της ίνας. Στη συνέχεια η ίνα απομακρύνεται από το δείγμα κι επαναφέρεται στο εσωτερικό της μικροσύριγγας. Η εκρόφηση των προσροφημένων στην ίνα συστατικών πραγματοποιείται στην περίπτωση

αναλύσεων με αέριο χρωματογράφο ή με αέριο χρωματογράφο σε συνδυασμό με φασματοόμετρο μάζας, με απευθείας εισαγωγή της ίνας στο σύστημα και θερμική εκρόφιση των συστατικών. Στην περίπτωση διαχωρισμού των συστατικών με υγρή χρωματογραφία (LC), αυτή συνδέεται με κατάλληλη βαλβίδα δύο θέσεων, στην οποία όταν εισαχθεί η ίνα, τα συστατικά παραλαμβάνονται με τη βοήθεια της κινητής φάσης.

Η πρώτη από τις δύο διεργασίες που περιλαμβάνει η SPME, η προσρόφιση των συστατικών, καθορίζει την ταχύτητα, την ευαισθησία, την ακρίβεια και την εκλεκτικότητα της εκχύλισης, ενώ από την εκρόφιση εξαρτώνται η αποτελεσματικότητα του χρωματογραφικού διαχωρισμού και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία της τεχνικής καθορίζεται ακόμα από το πάχος της ίνας, αλλά και τα χαρακτηριστικά του υλικού επίστρωσης. Η τεχνική αυτή προκατεργασίας χαρακτηρίζεται ως οικονομική, ταχεία, ελεύθερη διαλυτών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση οργανικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ng L^{-1} . Είναι κατάλληλη για την παραλαβή ενώσεων τόσο από υγρά, όσο και από αέρια δείγματα και μπορεί να εφαρμοστεί στο πεδίο της δειγματοληψίας αμέσως μετά από αυτήν. Τέλος με την SPME ελαχιστοποιούνται τα σφάλματα λόγω του κακού χειρισμού των δειγμάτων. Η τεχνική παριστάνεται σχηματικά στο Σχήμα 3.3.

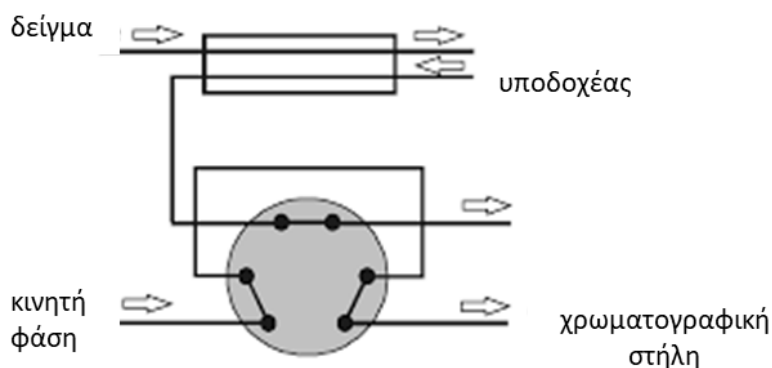


Σχήμα 3.3 Πειραματική πορεία SPME συζευγμένης με GC-MS

3.3.1.4 Εκχύλιση με μεμβράνες (Membrane Extraction)

Εφαρμογή στην προκατεργασία των δειγμάτων στη χημική ανάλυση βρίσκουν και οι μεμβράνες από οργανικά πολυμερή (κυτταρίνης, ίνες υάλου κ.ά.). Η χρήση τους στηρίζεται στην εκλεκτική φύση τους, η οποία επιτρέπει σε ορισμένα μόνο συστατικά του δείγματος να

τις διαπεράσουν με τη βοήθεια κατάλληλων κινητήριων δυνάμεων: λόγω διαφοράς πίεσης (ΔP), διαφοράς συγκέντρωσης (ΔC) ή διαφοράς δυναμικού (ΔV) ανάμεσα στις δύο επιφάνειες της μεμβράνης. Έτσι από την μεμβράνη διέρχονται είτε μόνο τα προσδιοριζόμενα συστατικά, οπότε και απομονώνονται, είτε μόνο οι παρεμποδίσεις με συνέπεια να παραλαμβάνονται μόνο τα επιθυμητά συστατικά (Σχήμα 3.4).



Σχήμα 3.4 Πειραματική πορεία εκχύλισης υποβοηθούμενης με μεμβράνες

Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται μπορούν να έχουν τη μορφή δίσκου, φύλλου ή κοίλης ίνας, ενώ ενδέχεται να είναι πορώδεις ή μη. Βρίσκουν εφαρμογή στις τεχνικές της διήθησης, εκχύλισης και διαπίδυσης. Η αρχή στην οποία στηρίζεται η διαπίδυση είναι αυτή του αποκλεισμού μεγέθους, και κινούσα δύναμη είναι η διαφορά συγκέντρωσης. Η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή στην απομάκρυνση αλάτων από διαλύματα ή στην απομόνωση μεγαλομοριακών ενώσεων, και χρησιμοποιεί ημιπερατές πορώδεις μεμβράνες διαμέσου των οποίων διέρχονται τα διάφορα συστατικά λόγω διαφοράς συγκέντρωσης. Μια παραλλαγή της διαπίδυσης είναι η ηλεκτροδιαπίδυση, όπου κινούσα δύναμη είναι η διαφορά δυναμικού κατά μήκος της μεμβράνης, οπότε παρατηρείται εκλεκτική μεταφορά ιόντων.

Στην περίπτωση της διήθησης, ως κινητήριος δύναμη λειτουργεί η διαφορά πίεσης στις δύο πλευρές της μεμβράνης, ενώ τέλος, στην τεχνική της εκχύλισης μεμβράνης όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μη πορώδεις μεμβράνες, στις οποίες τα επιθυμητά συστατικά εκχυλίζονται από τη μια φάση στην άλλη μέσω της μεμβράνης και πάλι λόγω διαφοράς συγκέντρωσης. Σημαντικό πλεονέκτημα των τεχνικών αυτών είναι η δυνατότητα on-line συνδυασμού με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές.

3.3.1.5 Εκχύλιση με προσρόφηση σε μαγνήτη ανάδευσης (Stir Bar Sorption Extraction, SBSE)

Η SBSE είναι μια τεχνική προσροφητικής εκχύλισης υδατικών δειγμάτων. Ένας μαγνήτης ανάδευσης (stir bar), εμπεριέχεται σε γυάλινο περίβλημα και είναι επικαλυμμένος με το υλικό PDMS (polydimethylsiloxane). Ο μαγνήτης ανάδευσης εισάγεται στο υδατικό διάλυμα και η προσροφητική εκχύλιση επιτυγχάνεται κατά την διάρκεια της ανάδευσης. Ο μαγνήτης αφαιρείται από το δείγμα, στεγνώνεται και εισάγεται σε έναν γυάλινο σωλήνα εκρόφησης. Ο γυάλινος σωλήνας ο οποίος περιέχει το μαγνήτη ανάδευσης, τοποθετείται μέσα στη μονάδα θερμικής εκρόφησης (TDU), ώστε να πραγματοποιηθεί η θερμική εκρόφηση των ενώσεων που εκχυλίστηκαν από το μαγνήτη. Στη συνέχεια οι ενώσεις εκροφώνται θερμικά και μεταφέρονται σε (αέριο) χρωματογράφο (Σχήμα 3.5).



Σχήμα 3.5 Πειραματική πορεία SBSE συζευγμένης με GC-MS

Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει την ανίχνευση οργανικών ουσιών σε υδατικά διαλύματα με αέρια χρωματογραφία, χωρίς προετοιμασία του δείγματος και επιτρέπει όρια ανίχνευσης πολύ χαμηλά (1000 φορές χαμηλότερα από αυτά της μεθόδου SPME). Βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην ανάλυση κρασιών, αρωματικών ουσιών, εντομοκτόνων, φυτοφαρμάκων, ανάλυση χυμών και άλλων αλκοολούχων ποτών, νερών, υγρών αποβλήτων κ.ά.

3.3.2 Κύριες τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από στερεά και ημι-στερεά υποστρώματα

Αρκετές νέες τεχνικές εκχύλισης αναπτύσσονται για την απομόνωση ενώσεων από στερεά και ημιστερεά υποστρώματα, βρίσκοντας όλο και περισσότερες εφαρμογές. Ωστόσο, η πολύπλοκη φύση των περισσότερων στερεών υποστρωμάτων όπως είναι τα ιζήματα, είναι ένας από τους παράγοντες που δυσκολεύουν την ανάλυσή τους. Έτσι, παρά το συνεχές ενδιαφέρον για την εκτίμηση της ρύπανσης στερεών υποστρωμάτων, οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την εκχύλιση των οργανικών ρύπων παραμένουν πολύπλοκες, χρονοβόρες και με υψηλό κόστος.

Η διαδικασία εκχύλισης ενώσεων από στερεά υποστρώματα πραγματοποιείται γενικά σε πέντε στάδια:

1. εκρόφηση των ενώσεων προς ανάλυση από τα δραστικά μέρη του υποστρώματος
2. διάχυση στο υπόστρωμα
3. διαλυτοποίηση των ενώσεων στον διαλύτη έκλουσης
4. διάχυση των ενώσεων στον διαλύτη έκλουσης
5. συλλογή του εκλούσματος.

Καθώς το πρώτο βήμα της ανάλυσης των στερεών υποστρωμάτων είναι και το πιο καθοριστικό, η προκατεργασία τους είναι απαραίτητη τόσο αφενός λόγω της μείωσης του χρόνου της ανάλυσης και αφετέρου λόγω του γεγονότος ότι κάθε βήμα της ανάλυσης αποτελεί μια πιθανή πηγή σφάλματος που προστίθεται στο συνολικό σφάλμα της μεθόδου. Ειδικά όταν απαιτείται ανάλυση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, η φάση της προκατεργασίας του δείγματος είναι ίσως η πιο κρίσιμη. Ο προσδιορισμός ιχνών διαφόρων ρύπων από πολύπλοκα υποστρώματα απαιτεί συνήθως εκτεταμένες και χρονοβόρες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος, εκχύλισης αλλά και καθαρισμού (clean-up). Το μέγεθος των σωματιδίων αποτελεί μια σημαντική παράμετρο για να υπάρχουν επαναλήψιμα αποτελέσματα αφού μπορεί να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Η αναλυόμενη ένωση εκροφάται από το υπόστρωμα και διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη. Επομένως, η εκχύλιση της αναλυόμενης ουσίας εξαρτάται από τη διαλυτότητα, τη διεισδυτικότητα του διαλύτη στο δείγμα και την επίδραση του υποστρώματος. Τα στερεά δείγματα υπόκεινται πρώτα σε τεμαχισμό και ομογενοποίηση άμεσα ή μετά από ξήρανση και στη συνέχεια ακολουθεί η υδατική εκχύλιση ή εκχύλιση με κατάλληλο συνήθως οργανικό διαλύτη.

Η αποτελεσματική εκχύλιση στερεών δειγμάτων με υψηλά ποσοστά υγρασίας όπως τα δείγματα ιζημάτων, προϋποθέτει την απομάκρυνση της υγρασίας. Η συνηθέστερη

μέθοδος για να επιτευχθεί αυτό είναι η λυοφιλίωση. Πρόκειται για τεχνική όμοια με την εξάτμιση, που πραγματοποιείται όμως σε μειωμένη θερμοκρασία και υπό κενό. Η λυοφιλίωση μπορεί επιπλέον να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην περίπτωση όπου οι ενώσεις που αναλύονται έχουν αρκετά υψηλή τάση ατμών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Καθώς η τάση ατμών μιας ένωσης σχετίζεται εκθετικά με την θερμοκρασία, είναι πιθανές απώλειες των ενώσεων υπό φυσιολογικές διαδικασίες εξάτμισης. Η τεχνική της λυοφιλίωσης είναι πιο ήπια από τις άλλες διεργασίες εξάτμισης και για αυτό χρησιμοποιείται πολλές φορές για βιολογικά δείγματα που είναι ασταθή, για θερμικά ευαίσθητα φυτοφάρμακα, καθώς και για ουσίες όπως οι πρωτεΐνες που μετουσιώνονται εύκολα [37].

Το μέγεθος των σωματιδίων αποτελεί μια σημαντική παράμετρο για να υπάρχουν επαναλήψιμα αποτελέσματα αφού μπορεί να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Η αναλυόμενη ένωση εκροφάται από το υπόστρωμα και διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη. Επομένως, η εκχύλιση της αναλυόμενης ουσίας εξαρτάται από τη διαλυτότητα, τη διεισδυτικότητα του διαλύτη στο δείγμα και την επίδραση του υποστρώματος.

Οι παλαιότερες και πλέον συμβατικές μέθοδοι εκχύλισης ρύπων από στερεά υποστρώματα είναι η υπερηχητική εκχύλιση (Ultra-sound-Assisted extraction, UAE), η ανατάραξη (shake-flask) και η Soxhlet. Πιο πρόσφατες μέθοδοι είναι η εκχύλιση με τη μέθοδο διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση (Matrix Solid Phase Dispersion – MSPD), η εκχύλιση στο υπερκρίσιμο σημείο (Supercritical Fluid Extraction, SFE), η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (Microwave-Assisted Extraction, MAE) καθώς και η επιταχυνόμενη διαλυτική εκχύλιση ή εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού ή (Pressurized Liquid Extraction, PLE ή Accelerated Solvent Extraction, ASE), οι οποίες όμως έχουν μεγαλύτερο κόστος από τις “παραδοσιακές” τεχνικές. Επίσης για ορισμένες υπάρχει ο περιορισμός της καταλληλότητας μόνο για την εκχύλιση αναλυτών με συγκεκριμένες ιδιότητες (π.χ. οξύτητα, πολικότητα κ.ά.). Αυτά τα προβλήματα οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων οι οποίες καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα αναλυτών και πραγματοποιούνται σε ελάχιστα αναλυτικά βήματα, αποτρέποντας έτσι μεγαλύτερα συστηματικά και τυχαία σφάλματα. Μια από αυτές τις αναλυτικές τεχνικές είναι η QuEChERS η οποία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω αφού αποτελεί σημαντική και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης ενώσεων, ενώ ταυτόχρονα η αποτελεσματικότητα της σε υποστρώματα όπως δείγματα ιζημάτων, αποτελεί και το αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης διατριβής. Στον Πίνακα 3.1 δίνονται συνοπτικά πληροφορίες βιβλιογραφικής ανασκόπησης για τις τεχνικές εκχύλισης φαρμακευτικών ενώσεων από ιζήματα τα τελευταία χρόνια.

Πίνακας 3.1 Πρόσφατη βιβλιογραφία για την εκχύλιση φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων από ιζήματα

Μελετώμενες ενώσεις	Εκχύλιση	Καθαρισμός	Ανάλυση	Αναφορά
Φυτοπροστατευτικές ενώσεις				
23 φυτοφάρμακα	Soxhlet	alumina/silica	GC-MS	[118]
36 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	GC-TOF-MS	[119]
9 φυτοφάρμακα και 8 TPs	MSPD	διήθηση	LC-ESI-MS/MS	[120]
22 φυτοφάρμακα	UAE	alumina/silica	LC-ESI-MS/MS	[121]
12 φυτοφάρμακα, 32 αντιβιοτικά	UAE	SPE	LC-ESI-MS/MS	[122]
253 φυτοφάρμακα	MAE	διήθηση	LC-TQD-MS/MS	[123]
54 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LTQ-Orbitrap MS	[124]
2 φυτοφάρμακα, 6 φάρμακα	UAE	SPE	LC-MS/MS	[125]
180 αναδύομενοι ρύποι	PLE	LLE	LTQ-Orbitrap MS	[126]
18 φυτοφάρμακα	Soxhlet	silica	GCD	[127]
26 φυτοφάρμακα	PLE	SPE	LC-ESI-MS/MS	[115]
50 φυτοφάρμακα	QuEChERS	dSPE	LC-ESI-MS/MS	[128]
Φαρμακευτικές ενώσεις				
11 ψυχιατρικά/μεταβολίτες	QuEChERS	dSPE	UHPLC-MS/MS	[129]
carbamazepine και TPs	PLE	SPE	UPLC-MS/MS	[130]
32 αντιβιοτικά	UAE	SPE	LC-ESI-MS/MS	[122]
9 φαρμακευτικά	UAE	SPE	HPLC-MS/MS	[131]
43 φαρμακευτικά	PLE	SPE	HPLC-QqLIT-MS/MS	[132]
180 αναδύομενοι ρύποι	PLE	LLE	LC/LTQ-Orbitrap-MS	[126]
12 φαρμακευτικά	MSPD	-	LC-MS/MS	[133]
3 φαρμακευτικά	UAE	SPE	HPLC-FD	[134]
144 φαρμακευτικά	PLE	-	LC-HRMS	[135]
8 φαρμακευτικά /PPCPs	UAE	SPME	GC-MS	[136]

FD: Fluorescence Detection; QqLIT: hybrid quadrupole-linear ion trap

3.3.2.1 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

Η μέθοδος QuEChERS αποτελεί ακρωνύμιο των λέξεων 'Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe' δηλαδή, δηλαδή «γρήγορη, εύκολη, οικονομική, αποτελεσματική, ανθεκτική, ασφαλής» και βρίσκει ευρύ φάσμα αναφορών για τον προσδιορισμό καταλοίπων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα. Η πρώτη ανακοίνωση της μεθόδου που πραγματοποιήθηκε στο 4th European Pesticides Residues Workshop στη Ρώμη τον Ιούνιο του 2002 στη Ρώμη, προκάλεσε ενθουσιασμό και συνεχίζει να κερδίζει δημοτικότητα συνεχώς μέχρι σήμερα.

Δημοσιεύτηκε πρώτη φορά το 2003 από τους Anastassiades et al. [90] και στόχευε στον προσδιορισμό υπολειμμάτων κυρίως υδρόφοβων φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτή μάζας (GC-MS). Έκτοτε, έχει εξελιχθεί, βελτιστοποιηθεί και τροποποιηθεί ώστε πλέον να εφαρμόζεται και για τον προσδιορισμό άλλων καταλοίπων όπως κτηνιατρικ, μυκοτοξίνες, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), δισφαινόλη Α και Β κ.ά. Επίσης, σήμερα εφαρμόζεται και σε άλλα υποστρώματα (έδαφος, υλός, ίζημα, αίμα, ζωικοί ιστοί, νεφροί, ήπαρ ζώων, κοτόπουλο, γάλα κ.α. και συνδυάζεται όχι μόνο με αέρια αλλά και με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη ανιχνευτή μάζας (LC-MS/MS).

Η πειραματική πορεία είναι εξαιρετικά απλή. Τα προς ανάλυση δείγματα ομογενοποιούνται και ποσότητα αυτών ζυγίζεται σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες από πολυαιθυλένιο. Ακολουθεί εκχύλιση με τη χρήση οργανικού διαλύτη (συνήθως ακετονιτρίλιο) και προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου ($MgSO_4$) και χλωριούχου νατρίου (NaCl) ή οξικού νατρίου (NaAcetate) ή και κάποιου ρυθμιστικού διαλύματος όπως τα κιτρικά άλατα αν κριθεί απαραίτητη η ρύθμιση pH. Το μείγμα αναδεύεται έντονα και ακολουθεί φυγοκέντριση για το διαχωρισμό των φάσεων. Έπειτα, μέρος της υπερκείμενης φάσης καθαρίζεται με υγρή-στερεή εκχύλιση εν διασπορά (dispersive SPE) με τη χρήση $MgSO_4$ και υλικών όπως η πρωτοταγής-δευτεροταγής αμίνη (Primary Secondary Amine, PSA), το υλικό προσρόφησης ανάστροφης φάσης πυριτία C18 ή και ο γραφίτιοποιημένος άνθρακας (graphitized carbon black, GCB). Για την εξισορρόπηση του pH και τη βελτίωση της σταθερότητας κατά την αποθήκευση των ευαίσθητων στο pH αναλυτών ενίοτε προστίθεται μικρή ποσότητα φορμικού οξέος ή αμμωνίας. Το τελικό εκχύλισμα αν χρειαστεί συμπυκνώνεται και επαναδιαλύεται στον επιθυμητό διαλύτη πριν την έγχυση σε υγρό ή αέριο χρωματογράφο σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας.

Η μέθοδος βασίζεται σε ένα απλό στάδιο υγρής-υγρής/στερεής εκχύλισης του ομογενοποιημένου δείγματος με τη χρήση ακετονιτρίλιου και παρουσία μεγάλων ποσοτήτων αλάτων όπως άνυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$), χλωριούχο ή οξικό νάτριο (NaCl ή NaOAc) ή κιτρικά άλατα ακολουθούμενο από ένα στάδιο καθαρισμού με εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (dispersive SPE). Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ικανότητα ανάκτησης βασικών και όξινων δραστικών ουσιών ακόμα και σε τιμές pH που αναμένεται να υφίστανται ιονισμό. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε νερό της οργανικής φάσης μετά το στάδιο διαχωρισμού.

Το ακετονιτρίλιο είναι ο διαλύτης που προτιμάται, καθώς διαχωρίζεται εύκολα από την υδατική φάση με την προσθήκη ενός μείγματος αλάτων (συνήθως $MgSO_4$ και NaCl),

παρέχοντας υψηλές ανακτήσεις ακόμα και για πολικές ενώσεις, ενώ παράλληλα τα εκχύλισματά του είναι σχετικά απαλλαγμένα από παρεμποδίζουσες ενώσεις. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ακετόνη ή οξικός αιθυλεστέρας, ωστόσο αποφεύγονται καθώς η ακετόνη αναμειγνύεται εύκολα με το νερό δυσκολεύοντας τον διαχωρισμό τους, ενώ ο οξικός αιθυλεστέρας είναι λιγότερο αναμίξιμος με το νερό αλλά δεν παραλαμβάνει ποσοτικά τα πολικά φυτοφάρμακα.

Ανάλογα με τη φύση των δειγμάτων, η συγκεκριμένη μέθοδος διαφοροποιείται. Για παράδειγμα, δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (<80%) απαιτούν την προσθήκη ύδατος πριν από την αρχική εκχύλιση προκειμένου να περιέχεται η ίδια αναλογία νερού και δείγματος σε τελική ποσότητα δείγματος ίση με 10 mL. Όταν πρόκειται για δείγματα που περιέχουν <25% νερό (π.χ. σιτηρά, ξηρούς καρπούς, μέλι, καρκεύματα) η ποσότητα του δείγματος ανάλυσης μπορεί να μειωθεί (π.χ. 1–5 g) και ακολουθεί συμπλήρωση με νερό ώστε να εξασφαλιστεί ικανοποιητικό ποσοστό υγρασίας. Το νερό που προστίθεται πρέπει να είναι σε χαμηλή θερμοκρασία (π.χ. <4°C) προκειμένου να αντισταθμίσει την αύξηση της θερμοκρασίας που προκαλείται από την προσθήκη των αλάτων.

Η προσθήκη αλάτων κατά το στάδιο της εκχύλισης αποσκοπεί στον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων και τη σταθεροποίηση των δραστικών φυτοφαρμάκων, δηλαδή την υψηλότερη ανάκτηση και εκλεκτικότητα για ευρύ φάσμα αναλυτών. Το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) μειώνει τον όγκο της υδατικής φάσης βοηθώντας την κατανομή των πολικών αναλυτών στην οργανική φάση. Το χλωριούχο νάτριο ($NaCl$) βελτιώνει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης καθώς με μεταβολή της ποσότητας αυτού δύναται να ελεγχθεί η πολικότητα της μεθόδου και επομένως η ποσότητα των παρεμβαλλόμενων ουσιών στο εκχύλισμα. Τέλος, το οξικό νάτριο βοηθά στη διάλυση σφαιριδίων λίπους.

Υπάρχουν τρεις στοιχειώδεις «προσεγγίσεις–παραλλαγές» για τη μέθοδο, η οποίες ενδέχεται να τροποποιηθούν περαιτέρω ανάλογα με τις ανάγκες της ανάλυσης. Στην «αυθεντική» μέθοδο ('original' QuEChERS) ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο, ενώ η σύνθεση της QuEChERS περιλαμβάνει επίσης χλωριούχο νάτριο ($NaCl$) για να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης και να μειώσει τις παρεμποδίσεις που οφείλονται σε πολικές ενώσεις. Στη μέθοδο AOAC 2007.01, ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο με προσθήκη οξικού οξέος (1%), και άνυδρο οξικό νάτριο (CH_3COONa) ως ρυθμιστής pH για να αποτρέψει την αποδόμηση ενώσεων που είναι ευαίσθητες σε βασικό περιβάλλον ενώ ταυτόχρονα βοηθά στην καλύτερη ανάκτηση και σταθερότητα των ενώσεων που είναι ευαίσθητες στις ακραίες μεταβολές του pH [137]. Τέλος, στη μέθοδο που είναι γνωστή ως EN15662 (βάσει του αντίστοιχου ευρωπαϊκού

προτύπου) ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο και η σύνθεση της εκτός από NaCl για την απομάκρυνση των πολικών παρεμποδίσεων, περιλαμβάνει και ρυθμιστικά άλατα του κιτρικού οξέος για τη συντήρηση των ευαίσθητων σε βασικό pH ενώσεων.

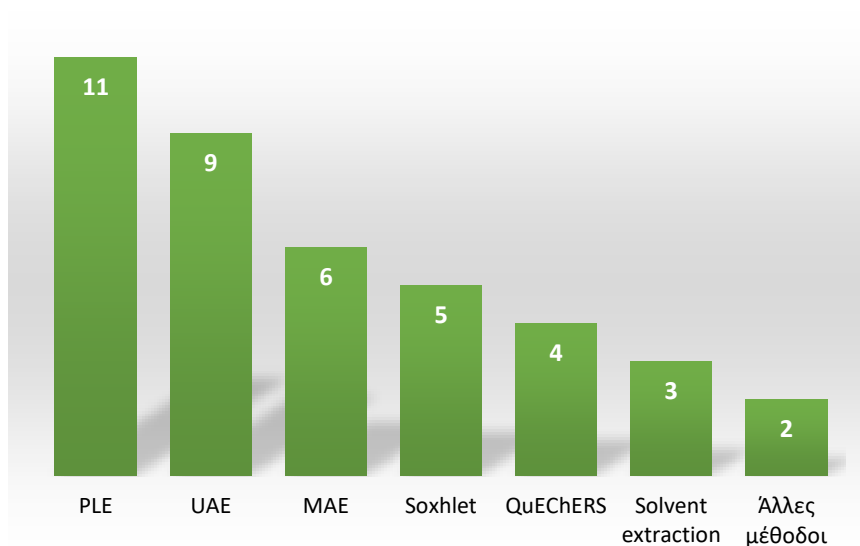
Ανεξάρτητα από την προσέγγιση που χρησιμοποιείται κάθε φορά, η μέθοδος QuEChERS πλεονεκτεί έναντι των περισσότερων κλασικών τεχνικών εκχύλισης για στερεά υποστρώματα, καθώς :

- Απαιτεί μικρούς όγκους οργανικών διαλυτών και η ποσότητα των αποβλήτων είναι επίσης μικρή
- Απαιτείται ελάχιστος εργαστηριακός εξοπλισμός και μικρός χώρος για την προκατεργασία των δειγμάτων
- Το κόστος αντιδραστηρίων και αναλωσίμων είναι χαμηλό
- Είναι δυνατή η επεξεργασία 10–20 προζυγισμένων δειγμάτων ταυτοχρόνως μέσα σε 30–40 λεπτά [96].
- Δεν απαιτούνται ιδιαίτερες ικανότητες, δεξιότητες και εκπαίδευση για τον αναλυτή ώστε να πραγματοποιήσει την προκατεργασία
- Είναι συμβατή με αέρια και υγρή χρωματογραφία
- Παρέχει υψηλές ανακτήσεις (>85% για μη πολικές ουσίες)
- Ελάχιστη έκθεση του χειριστή σε διαλύτες [138]

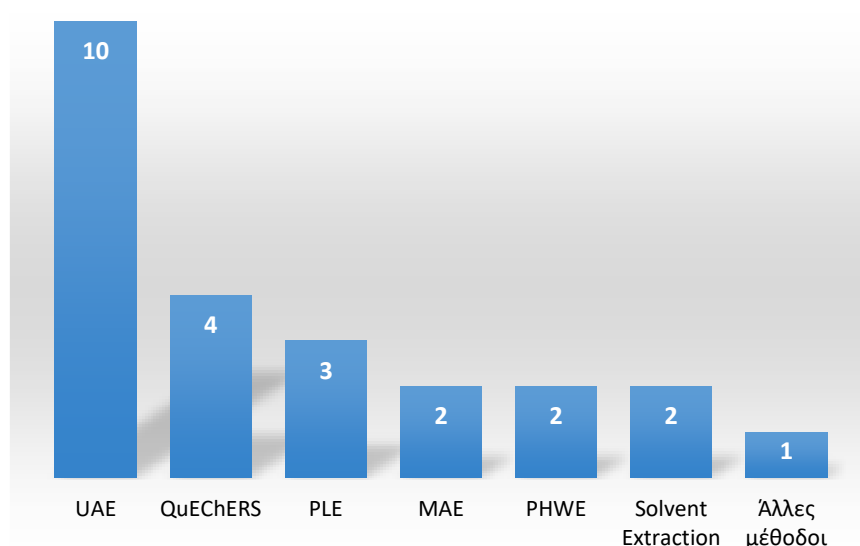
Με την υιοθέτηση και ευρεία χρησιμοποίηση της QuEChERS έναντι παραδοσιακών μεθόδων υπολογίζεται ότι στην Ευρώπη η κατανάλωση διαλύτη μειώθηκε κατά περίπου 95% τα τελευταία 15 χρόνια (10 mL έναντι έως και 535 mL ανά δείγμα) με επακόλουθη μείωση 95% των δαπανών για αναλώσιμα και περίπου 90% μείωση στο χρόνο ανάλυσης. Επίσης, σύμφωνα με στοιχεία που παρουσιάστηκαν στο EPRW, ο αριθμός των εργαστηρίων που χρησιμοποιούν QuEChERS αυξάνεται συνεχώς, έχοντας φτάσει το 40% περίπου το 2009. Για τα ιδιωτικά εργαστήρια η χρήση της QuEChERS υπολογίζεται κοντά στο 70%. Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν υπάρχει κάποιο στάδιο προσυγκέντρωσης με αποτέλεσμα τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης να είναι σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (SPE).

Η χρήση της QuEChERS πρόσφατα άρχισε να γίνεται δημοφιλής για την εκχύλιση φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων από ιζήματα. Κατά την περίοδο συγγραφής της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική έρευνα στη βάση δεδομένων Scopus για τις τεχνικές ανάλυσης φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε ιζήματα για τα έτη 2013–2018. Στα Σχήματα 3.6 και 3.7 φαίνεται ο αριθμός των

δημοσιευμένων εργασιών και οι εκάστοτε τεχνικές εκχύλισης για την ανάλυση φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων αντίστοιχα.



Σχήμα 3.6 Αριθμός δημοσιευμένων εργασιών ανά τεχνική για την εκχύλιση φυτοπροστατευτικών ενώσεων από ιζήματα (2013–2018) [14, 115, 141–150, 121, 151–160, 122, 161–170, 123, 124, 126, 127, 139, 140]



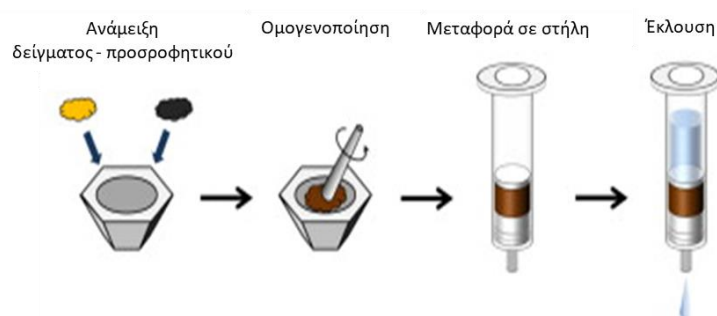
Σχήμα 3.7 Αριθμός δημοσιευμένων εργασιών ανά τεχνική για την εκχύλιση φαρμακευτικών ενώσεων από ιζήματα (2013–2018) [124, 126, 175–184, 134, 185–188, 135, 136, 164, 171–174]

3.3.2.2 Εκχύλιση διασποράς στο υπόστρωμα (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD)

Η εκχύλιση διασποράς στο υπόστρωμα (MSPD), μια τεχνική προκατεργασίας που εμφανίστηκε πρόσφατα, βρίσκει εφαρμογή κατά κύριο λόγο στην κατεργασία στερεών δειγμάτων ή υγρών με υψηλό ιξώδες και ημιστερεών υποστρωμάτων. Ως τεχνική μοιάζει αρκετά με την SPE, με τη διαφορά ότι εδώ τα προσδιοριζόμενα συστατικά έρχονται σε επαφή με το κατάλληλο προσροφητικό υλικό όχι μέσα σε μια μικροστήλη, αλλά αναμιγνυόμενα μαζί του.

Αρχικά το δείγμα ομογενοποιείται σε ιγδίο μαζί με το προσροφητικό υλικό με αποτέλεσμα να προσροφώνται σε αυτό τα επιθυμητά συστατικά. Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι όμοια με αυτά της SPE. Στη συνέχεια το μείγμα που έχει προκύψει μεταφέρεται σε μικροστήλη, όπου συμπιέζεται με τη βοήθεια σύριγγας για μην υπάρχουν κενά, ενώ για την καλύτερη συγκράτηση του υλικού στο πάνω και κάτω άκρο του τοποθετούνται φρίτες. Τέλος, όπως και στην SPE απομακρύνονται οι παρεμποδίσσεις με πλύση και εκλύονται τα συστατικά με τον κατάλληλο διαλύτη έκλουσης (Σχήμα 3.8). Το εκχύλισμα που προκύπτει από την MSPD μπορεί να αναλυθεί απευθείας με την τεχνική διαχωρισμού, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητη μια επιπλέον διαδικασία απομάκρυνσης συστατικών που συνεκλούσθησαν με τα προσδιοριζόμενα συστατικά.

Η τεχνική είναι απλή και ευέλικτη και προσφέρει τη δυνατότητα διεξαγωγής της εκχύλισης και του καθαρισμού σε ένα βήμα, με αποτέλεσμα μικρότερους χρόνους ανάλυσης και χαμηλότερη κατανάλωση διαλύτη.

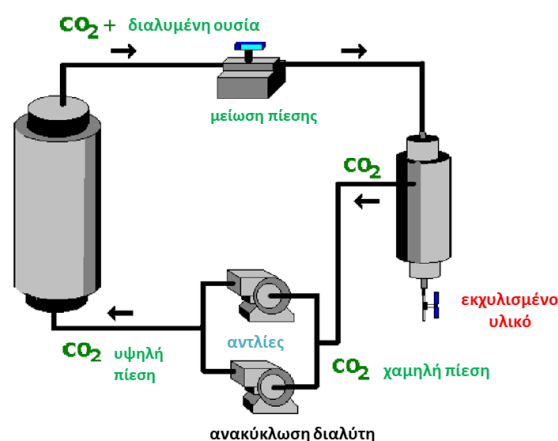


Σχήμα 3.8 Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής πορείας MSPD

3.3.2.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Η τάση ατμών μιας ένωσης στην κρίσιμη θερμοκρασία ονομάζεται κρίσιμη πίεση. Σε θερμοκρασίες και πιέσεις πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία, η ουσία λέγεται υπερκρίσιμο

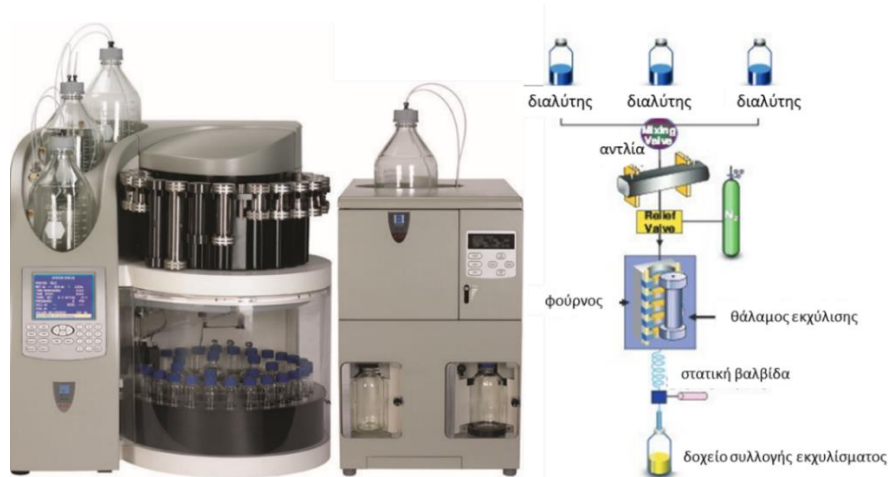
ρευστό. Τα υπερκρίσιμα ρευστά (π.χ. CO₂, N₂O, NH₃, η-βουτάνιο) χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων συστατικών από υποστρώματα. Το δείγμα τοποθετείται σε περιέκτη ροής και υπερκρίσιμο ρευστό περνά μέσα από το δείγμα. Μετά από αποσυμπίεση, η εκχυλισμένη ένωση συλλέγεται σε διαλύτη ή εγκλωβίζεται σε προσροφητικό και εν συνεχεία ακολουθεί εκρόφηση και έκπλυση με διαλύτη (Σχήμα 3.9).



Σχήμα 3.9 Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης υπερκρίσιμου ρευστού (SFE)

3.3.2.4 Ταχεία εκχύλιση με διαλύτες (Accelerated Solvent Extraction, ASE)

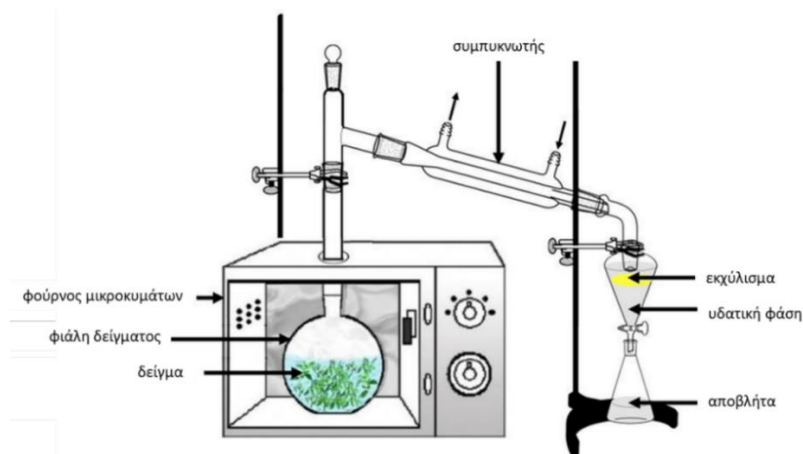
Πρόκειται για μια πρόσφατη τεχνική που χρησιμοποιεί κλασικά συστήματα διαλυτών για την εκχύλιση ενώσεων, αλλά κάτω από ποικίλες παραμέτρους εκχύλισης, όπως θερμοκρασία, πίεση και όγκος. Η ASE είναι αυτοματοποιημένη, καταναλώνει πολύ χαμηλότερο όγκο διαλύτη και είναι μη χρονοβόρα, καθώς οι ενώσεις εκχυλίζονται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από το σημείο βρασμού του διαλύτη λόγω υψηλών πιέσεων που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία. Αυτό ενισχύει την διαλυτοποίηση και τη διάχυση των αναλυτών από τα δείγματα στο διαλύτη, μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο εκχύλισης και την κατανάλωση του διαλύτη. Η τεχνική απεικονίζεται στο Σχήμα 3.10.



Σχήμα 3.10 Σχηματική απεικόνιση ταχείας εκχύλισης με διαλύτες (ASE)

3.3.2.5 Εκχύλιση με μικροκύματα (Microwave-Assisted Extraction, MAE)

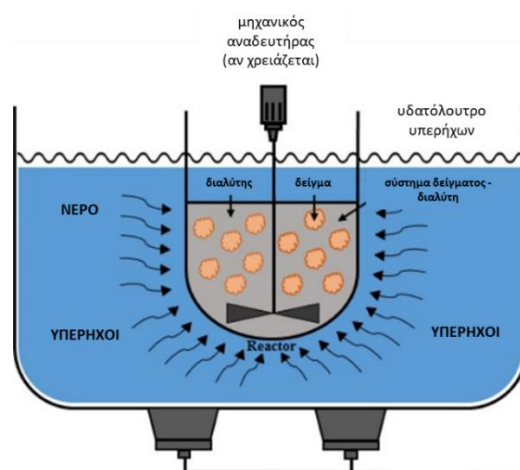
Η χρήση των μικροκυμάτων στην εκχύλιση έχει αποφέρει σημαντική μείωση στο χρόνο εκχύλισης, σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους. Ενώ με τις συμβατικές μεθόδους η θερμότητα μεταδίδεται από την θερμαντική πλάκα στο δοχείο θέρμανσης και από εκεί στο διάλυμα, με τα μικροκύματα η θέρμανση ξεκινάει από το δείγμα, αφού το δοχείο δεν απορροφά την ακτινοβολία των μικροκυμάτων (Σχήμα 3.11). Η θερμότητα που παράγεται από τα μικροκύματα εξαρτάται από το διάλυμα. Αυτό συμβαίνει καθώς υπάρχουν διαλύτες που απορροφούν τα μικροκύματα (π.χ. μεθανόλη) και άλλοι που δεν τα απορροφούν, συνεπώς δε θερμαίνονται (π.χ. εξάνιο). Με τη MAE υπάρχει επίσης σημαντική μείωση στον όγκο δείγματος και διαλύτη, λόγω της αποδοτικότερης εκχύλισης.



Σχήμα 3.11 Σχηματική απεικόνιση ταχείας εκχύλισης με μικροκύματα (MAE)

3.3.2.6 Εκχύλιση με υπερήχους (Ultra-sound – assisted extraction, UAE)

Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης (Σχήμα 3.12). Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Η εκχύλιση με υπέρηχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ενώσεων που είναι θερμικά ασταθείς.

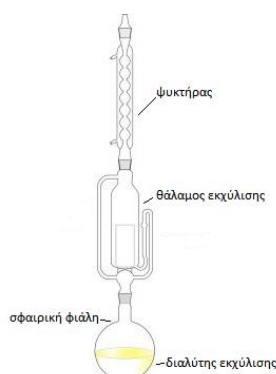


Σχήμα 3.12 Σχηματική απεικόνιση ταχείας εκχύλισης με υπερήχους (UAE)

3.3.2.7 Εκχύλιση Soxhlet

Σε αντίθεση με την εκχύλιση υγρού-υγρού, η εκχύλιση Soxhlet, βρίσκει εφαρμογή στην προκατεργασία στερεών δειγμάτων. Το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται σε ειδικό πορώδη χάρτινο ή γυάλινο υποδοχέα στο επίθεμα της συσκευής. Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό γυάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα και επαναρρέουν πάνω στον υποδοχέα του στερεού δείγματος. Όταν ο χώρος του επιθέματος πληρωθεί με διαλύτη, γίνεται αυτόματος σιφωνισμός οπότε ο διαλύτης επαναρρέει στη φιάλη A και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Με αυτόν τον τρόπο τα διαλυτά συστατικά του στερεού μείγματος περνούν στο διαλυτικό σύστημα (Σχήμα 3.13). Παρά το γεγονός ότι οι δύο αυτές τεχνικές αποτελούσαν την πρώτη επιλογή στην προκατεργασία δειγμάτων στο παρελθόν, σήμερα η χρήση τους έχει περιοριστεί σημαντικά λόγω των πολλών μειονεκτημάτων που τις χαρακτηρίζουν, όπως η μεγάλη κατανάλωση διαλυτών, οι εξαιρετικά

χρονοβόρες διαδικασίες, η δημιουργία γαλακτωμάτων και η μη ποσοτική και μη επαναλήψιμη παραλαβή των συστατικών.



Σχήμα 3.13 Σχηματική απεικόνιση συσκευής Soxhlet

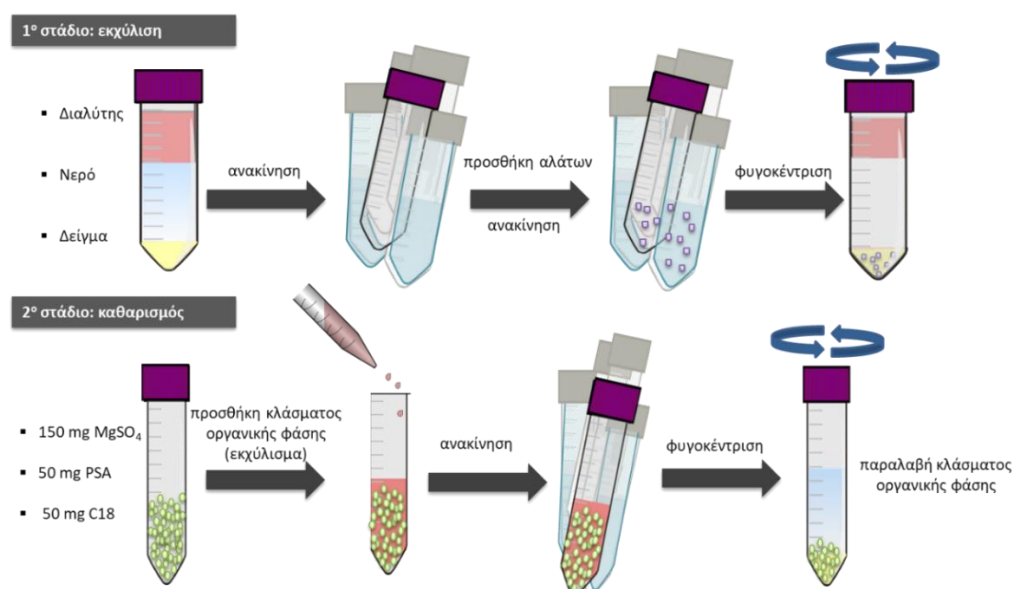
3.4 Καθαρισμός εκχυλισμάτων με εκχύλιση δια της στερεής φάσης σε διασπορά

Η πολυπλοκότητα της φύσης ορισμένων υποστρωμάτων όπως τα ιζήματα, έχει ως συνέπεια τα εκχυλίσματα να περιέχουν συχνά πλήθος από άλλες ενώσεις που παρεμποδίζουν κατά την ανάλυση. Επομένως, το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) πολλές φορές δεν μπορεί να παραλειφθεί.

Κατά την εφαρμογή της QuEChERS, ο καθαρισμός του δείγματος είναι απαραίτητος και συνήθως επιτυγχάνεται με τεχνική της εκχύλισης δια της στερεής φάσης σε διασπορά (dispersive solid phase extraction, dSPE). Συχνά προτείνεται επίσης ψύξη του δείγματος: πριν την ανάλυση ως επιπλέον στάδιο καθαρισμού, αφού όταν χρησιμοποιείται κατεψυγμένο ομογενοποιημένο δείγμα συστατικά του υποστρώματος όπως λίπη, κηροί και σάκχαρα μπορεί να απομακρυνθούν. Επίσης, το εκχύλισμα από την πρώτη φάση μπορεί να αποθηκευτεί στην κατάψυξη ώστε τα συνεκχυλιζόμενα συστατικά του υποστρώματος με χαμηλή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο να καθιζάνουν.

Η πειραματική πορεία για τον καθαρισμό με d-SPE είναι εξίσου απλή με την εκχύλιση QuEChERS. Ένα μέρος από το υπερκείμενο διάλυμα που προκύπτει από την εκχύλιση μεταφέρεται σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωλήνα από πολυαιθυλένιο ο οποίος περιέχει άνυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) για την απομάκρυνση της περίσσειας νερού και μικρή ποσότητα άλλης προσροφητικής ουσίας ή συνδυασμού προσροφητικών ουσιών. Ακολουθεί και πάλι ανακίνηση και φυγοκέντρωση του δείγματος, και το τελικό υπερκείμενο διάλυμα είτε αναλύεται απευθείας με υγρή ή αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο

μάζας, είτε προηγουμένως συμπυκνώνεται για να επαναδιαλυθεί σε καταλληλότερο διαλύτη. Επίσης, όταν κρίνεται απαραίτητο στο στάδιο αυτό, μπορεί να ρυθμίζεται το pH. Η συνολική πειραματική πορεία για την εκχύλιση QuEChERS και τον καθαρισμό με d-SPE φαίνεται στο Σχήμα 3.14.



Σχήμα 3.14 Πειραματική πορεία QuEChERS

Κατά τη διάρκεια του καθαρισμού, λαμβάνει χώρα μια δεύτερη εκχύλιση που στοχεύει εκτός από την απομάκρυνση του νερού και στην απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων παρεμποδισουσών ουσιών από το υπόστρωμα. Έτσι, τα προσροφητικά που χρησιμοποιούνται διαφέρουν ανάλογα με το αναλυόμενο υπόστρωμα αλλά και τις παρεμποδίζουσες ουσίες. Τα προσροφητικά/μείγματα προσροφητικών που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι:

- Πρωτοταγής–δευτεροταγής αμίνη (PSA): ως ασθενής ιονανταλάκτης ελαττώνει ή απομακρύνει εντελώς παρεμποδίζουσες ενώσεις όπως λιπαρά οξέα, πολικά οργανικά οξέα και σάκχαρα.
- Γραφίτοποιημένος άνθρακας (GCB): απομακρύνει χρωστικές ουσίες, όπως η χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή. Ωστόσο, μπορεί μαζί με τις παρεμποδίζουσες ουσίες να απομακρύνει και ορισμένους αναλύτες που δεν παρουσιάζουν επίπεδη γεωμετρία στο χώρο, όπως φυτοφάρμακα με επίπεδη δομή δακτυλίου (ring-planar pesticides).
- Πυριτία C18 (octadecyl silica): απομακρύνει τα λιπίδια και τις μη πολικές ενώσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ



ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ–ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

A. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

4.1 Εισαγωγή

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια των συστατικών ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z) [189]. Πρόκειται για μια τεχνική προσδιορισμού δομής αλλά και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων βασιζόμενη στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων, ή στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Η μορφή του φάσματος μάζας, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της. Οι μέθοδοι φασματομετρίας μάζας είναι κατάλληλες για ποσοτικοποίηση μόνο αφού προηγηθεί χρωματογραφικός διαχωρισμός.

Από το 1995 και έπειτα, η ανάπτυξη της φασματομετρίας μάζας είναι ταχύτατη και εφαρμόζεται ευρέως σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας. Η πρόοδος στη μικροηλεκτρονική και οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση, έχουν βελτιώσει σημαντικά την ανάπτυξη της τεχνικής και την έχουν καταστήσει απαραίτητο εργαλείο για

μεγάλο φάσμα ερευνητικών δραστηριοτήτων, καθώς η φασματομετρία μάζας προσφέρει πληροφορίες για (α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μειγμάτων, (β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων, (γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων και (δ) τη δομή και τη σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

Η δυναμική της φασματομετρίας μάζας στην αναλυτική χημεία μπορεί να αποδοθεί σε πολλά χαρακτηριστικά της, τα οποία την κατατάσσουν πολύ υψηλά σε σχέση με τις υπόλοιπες αναλυτικές τεχνικές. Αρχικά, με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών επιτυγχάνεται μεγάλη εκλεκτικότητα που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ παράλληλα παρέχει εξαιρετική ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} mol. Επίσης, το γεγονός ότι η φασματομετρία μάζας μπορεί θεωρητικά να δράσει σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector), την καθιστά κατάλληλη για την ανάλυση οποιασδήποτε ένωσης. Τέλος, παρέχει τη δυνατότητα εύρεσης δομής αγνώστων ενώσεων, συνεισφέροντας στην επίλυση βιοχημικών προβλημάτων, όπως είναι η πρωτεομική, ενώ χρησιμοποιείται ακόμη και στην ατομική φυσική, την κινητική αντιδράσεων, τη γεωχρονολόγηση, την ανόργανη χημική ανάλυση, τον προσδιορισμό θερμοδυναμικών παραμέτρων κ. ά. [189, 190].

4.1.1 Η έννοια της μάζας στη φασματομετρία μάζας

Η μετρούμενη φυσική ιδιότητα στη φασματομετρία μάζας είναι ο λόγος μάζας προς φορτίο (m/z), όπου z είναι ο αριθμός του φορτίου ή των φορτίων που φέρει το μετρούμενο ιόν. Αν και στην πλειοψηφία των αναλυτικών τεχνικών χρησιμοποιείται η έννοια της μέσης μοριακής μάζας μιας ένωσης, στη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται η ακριβής μάζα ενός ισοτόπου μιας ένωσης. Είναι σημαντικό οι δυο έννοιες να μη συγχέονται, για αυτό και ακολούθως ορίζεται η διάκριση μεταξύ τους.

Για την ατομική και μοριακή μάζα χρησιμοποιούνται τρεις ισοδύναμες εκφράσεις, οι οποίες βασίζονται στη σχετική κλίμακα που καθορίζεται από το σταθερό ισότοπο του $^{12}_6\text{C}$ (το οποίο εξ' ορισμού έχει ατομική μάζα ίση με 12 ακριβώς). Οι τρεις εκφράσεις είναι (α) η μονάδα ατομικής μάζας (atomic mass unit, amu), (β) το dalton (Da) και (γ) η ενοποιημένη μονάδα ατομικής μάζας (unified atomic mass unit, u), με τις δυο τελευταίες να είναι οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες [190, 191]. Οι τρεις εκφράσεις συνδέονται μεταξύ τους με την Εξίσωση 4.1:

$$1 u = 1 amu = 1 Da = 1,66054 \times 10^{-27} kg \pm 0,59 ppm \quad (4.1)$$

Είναι γνωστό ότι στη φύση πολλά στοιχεία απαντώνται σε περισσότερες από μια ισοτοπικές μορφές, με τον ίδιο αριθμό πρωτονίων και ηλεκτρονίων αλλά με διαφορετική μάζα λόγω του διαφορετικού αριθμού νετρονίων. Έτσι, έχει οριστεί η μέση ατομική μάζα A ενός στοιχείου (Εξίσωση 4.2).

$$A = \sum_{i=1}^n (A_i \times p_i) \quad (4.2)$$

Όπου A_i η ατομική μάζα του ισοτόπου i και p_i η κλασματική αφθονία του ισοτόπου στη φύση [190].

Το άθροισμα των μέσων ατομικών μαζών των ατόμων που περιέχονται σε μια ένωση αποτελεί τη σχετική μοριακή μάζα M_r . Το μέγεθος που καταγράφεται στη φασματομετρία μάζας όμως δεν είναι η σχετική μοριακή μάζα, αλλά η ακριβής μάζα m συγκεκριμένου ισοτόπου ενός στοιχείου, συνήθως του πιο άφθονου, και η ακριβής μάζα ένωσης που περιέχει συγκεκριμένα ισότοπα στοιχείων. Ειδικότερα, στη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιούνται κυρίως η μονοϊσοτοπική μάζα και η ονομαστική μάζα στοιχείων και μορίων.

Η μονοϊσοτοπική μάζα ενός στοιχείου είναι η ακριβής μάζα του πιο άφθονου και σταθερού ισοτόπου που απαντάται στη φύση η οποία έχει προσδιοριστεί ως προς τη μάζα του $^{12}_6\text{C}$, και της αποδίδεται η ακριβής τιμή των 120000 Da. Η μονοϊσοτοπική μάζα ενός μορίου, ρίζας ή ιόντος είναι το άθροισμα των μονοϊσοτοπικών μαζών όλων των ατόμων των στοιχείων που το συνιστούν [192]. Αντίστοιχα, η ονομαστική μάζα ενός στοιχείου είναι η ακέραια μάζα του πιο άφθονου, σταθερού ισοτόπου. Η ονομαστική μάζα ενός μορίου, ρίζας ή ιόντος είναι το άθροισμα των ονομαστικών μαζών όλων των ατόμων των στοιχείων που το συνιστούν [192]. Η ακριβής μοριακή μάζα άλλοτε δίνεται ως ακέραιος αριθμός και άλλοτε με δεκαδικά ψηφία, το πλήθος των οποίων καθορίζεται από τη διακριτική ικανότητα του φασματομέτρου μάζας, που θα περιγραφεί αργότερα.

4.1.2 Ισοτοπικές αφθονίες

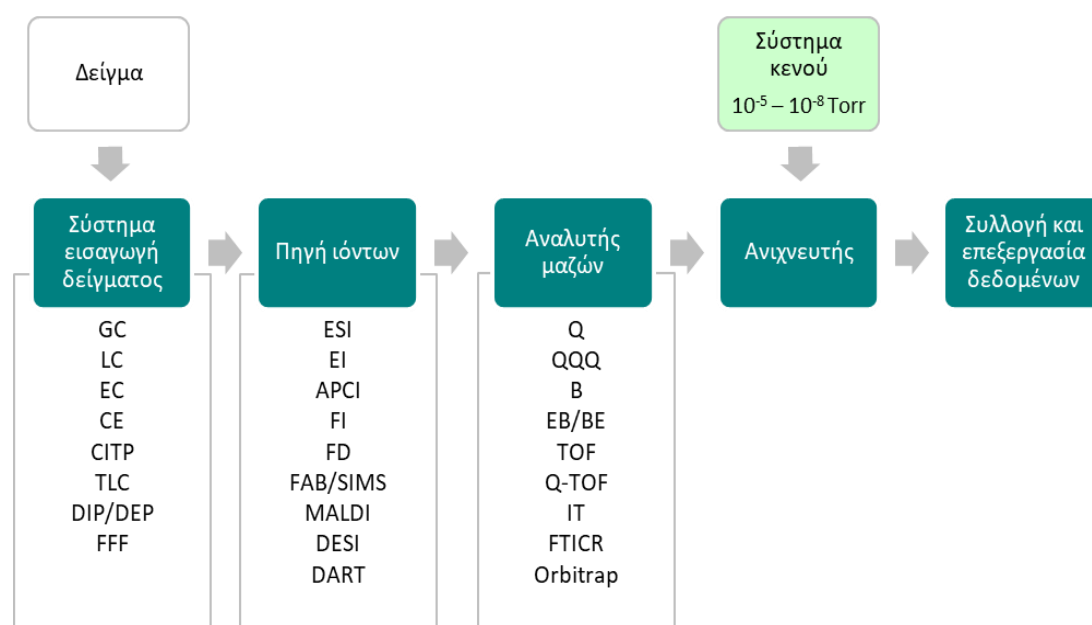
Τα περισσότερα στοιχεία βρίσκονται στη φύση ως μείγματα ισοτόπων. Η ύπαρξη των ισοτόπων είναι αυτή που προκαλεί στα φάσματα μάζας την εμφάνιση ισοτοπικών συστάδων (isotope clusters), οι οποίες μπορούν να προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για τη στοιχειακή σύνθεση του μετρούμενου ιόντος. Η σύνθεση μιας ισοτοπικής συστάδας

εξαρτάται από τα στοιχεία που περιέχονται στο μόριο της ένωσης, τα ισότοπα των στοιχείων, τον αριθμό τους, καθώς και τις σχετικές αφθονίες του κάθε ισότοπου.

Προφανώς, δεν υπάρχουν έντονες ισοτοπικές κορυφές σε όλες τις περιπτώσεις μορίων, για παράδειγμα, σε μόρια που αποτελούνται μόνο C και H υπάρχει μικρή αφθονία των βαρύτερων ισωτόπων. Σε αυτές τις περιπτώσεις που οι ισοτοπικές κορυφές είναι χαμηλής έντασης, δε λαμβάνονται υπόψιν καθώς δεν είναι χρήσιμες για την εξαγωγή αναλυτικού αποτελέσματος. Από την άλλη, ενώσεις οι οποίες περιέχουν άτομα Cl, Br, S, έχουν ισοτοπικές κορυφές υψηλής έντασης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς.

4.2 Διάταξη φασματομέτρου μάζας

Ένα τυπικό φασματομέτρο μάζας αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα (Σχήμα 4.1): (α) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, (β) την πηγή ιόντων, (γ) έναν ή περισσότερους αναλυτές μάζας, (δ) τον ανιχνευτή, (ε) το σύστημα κενού και (στ) έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή εξοπλισμένο με το κατάλληλο λογισμικό [193].



Σχήμα 4.1 Σχηματική απεικόνιση της διάταξης του φασματομέτρου μάζας

Πρώτο τμήμα στο φασματομέτρο μάζας είναι το σύστημα εισαγωγής δείγματος. Σκοπός αυτού του τμήματος της διάταξης είναι η εισαγωγή του δείγματος σε αέρια ή υγρή μορφή χωρίς τη διατάραξη του κενού. Υπάρχουν διαφορετικά συστήματα για την εισαγωγή

αερίων, υγρών ή στερεών δειγμάτων. Στην περίπτωση όπου η φασματομετρία μάζας είναι σε σύζευξη με σύστημα υγρής χρωματογραφίας, η εισαγωγή δείγματος γίνεται μέσω μιας διάταξης σύζευξης. Για την εισαγωγή στερεών ή μη πτητικών υγρών χρησιμοποιείται ειδικό σύστημα εισαγωγής δείγματος με ακροφύσιο (direct probe), το οποίο εισέρχεται στην πηγή ιόντων. Το ακροφύσιο συχνά είναι μεταλλικός ή υάλινος σωλήνας, ο οποίος, συνήθως, καταλήγει σε μικροδοχείο όπου και βρίσκεται το προς ανάλυση δείγμα.

Μέσω του συστήματος εισαγωγής, το δείγμα αρχικά εισάγεται στην πηγή ιόντων για τον ιοντισμό των προς ανάλυση ενώσεων. Εκεί, τα εισερχόμενα μόρια μετατρέπονται σε ιόντα είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια ή ιόντα ή μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, τα παραγόμενα ιόντα διαχωρίζονται στο τμήμα του αναλυτή μάζας, σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z). Ακολούθως, γίνεται η σύλληψη της δέσμης των ιόντων και η μετατροπή τους σε ηλεκτρικό σήμα στον ανιχνευτή.

Όλα τα φασματόμετρα μάζας λειτουργούν υπό υψηλό κενό, επομένως η λειτουργία τους εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την πίεση. Το υψηλό κενό εξασφαλίζει τη χαμηλή πίεση που είναι απαραίτητη ώστε να αποτραπεί τυχόν σύγκρουση των ιόντων με άλλα αέρια μόρια πριν φτάσουν στον ανιχνευτή. Τυχόν συγκρούσεις θα προκαλούσαν απόκλιση της τροχιάς του μετρούμενου ιόντος, το οποίο θα έχανε το φορτίο του εξαιτίας της πρόσκρουσης με τα τοιχώματα του οργάνου. Επίσης, τέτοιες συγκρούσεις θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση του ιόντος, με αποτέλεσμα την εξαγωγή πολύπλοκων φασμάτων [190, 191]. Μεταξύ της πηγής ιόντων και του ανιχνευτή η εφαρμοζόμενη πίεση κυμαίνεται μεταξύ 10^{-4} – 10^{-7} Pa, και ρυθμίζεται μέσω ισχυρού συστήματος παραγωγής κενού, το οποίο αποτελείται από μηχανικές αντλίες, οι οποίες δημιουργούν αρχικά ένα κενό έως και 0,13 Pa. Το κενό αυτό μπορεί να μειωθεί περισσότερο σε συνδυασμό με στροβιλομοριακές αντλίες, αντλίες διάχυσης ή κρυογονικές [192].

Το σύστημα των οπτικών φακών είναι ένα επίσης σημαντικό τμήμα του φασματομέτρου μάζας, καθώς ο ρόλος του είναι να περιορίζει την απόκλιση της δέσμης ιόντων και βοηθά στην εστίασή της προς συγκεκριμένη κατεύθυνση. Η αποκλίνουσα δέσμη ιόντων ελέγχεται μέσω προ- και μετα- φίλτρων, με ειδικούς δακτυλιοειδείς φακούς, στην είσοδο και στην έξοδο του αναλυτή μάζας, αντίστοιχα. Τα οπτικά αυτά συστήματα ονομάζονται συχνά και οδηγοί ιόντων ή συσκευές εστίασης [190, 191].

Τέλος, το σήμα του ανιχνευτή μετατρέπεται σε χρωματογράφημα και σε φάσμα μάζας, με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού το οποίο ελέγχει όλη λειτουργία του οργάνου καθ' όλη τη διάρκεια των αναλύσεων, ενώ επίσης καταχωρεί και επεξεργάζεται τα

δεδομένα. Οι σύγχρονες διατάξεις χρησιμοποιούν πολύ εξελιγμένα λογισμικά, τα οποία εκτός των άλλων εκτελούν ταχύτατη βαθμονόμηση του φασματομέτρου, ταυτοποιούν τα ιοντικά θραύσματα με βάση τις ακριβείς τιμές m/z ή από τις σχετικές τιμές των ισοτοπικών κορυφών και τέλος, με βάση τα φασματικά δεδομένα κάνουν προκαταρκτικές για την ταυτότητα της εξεταζόμενης ένωσης [194].

4.3 Τεχνικές ιοντισμού

Η παραγωγή αέριων ιόντων των προσδιοριζόμενων ενώσεων είναι το πρώτο στάδιο στη φασματομετρία μάζας και λαμβάνει χώρα στην πηγή ιοντισμού. Οι πηγές ιοντισμού, άρα και οι εκάστοτε εφαρμοζόμενες τεχνικές ιοντισμού είναι πολλές. Η επιλογή της τεχνικής είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει, καθώς για την ίδια ένωση το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό, με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιοντισμού. Η επιλογή της κατάλληλης πηγής εξαρτάται (α) από την ενόργανη διάταξη που χρησιμοποιείται (β) το είδος και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων που πρόκειται να προσδιοριστούν και (γ) από την επιδιωκόμενη μεταφορά εσωτερικής ενέργειας στα μόρια αυτών. Με βάση την τελευταία, οι τεχνικές ιοντισμού μπορούν να ταξινομηθούν σε «ήπιες ή μαλακές» και σε «σκληρές» τεχνικές.

Στις σκληρές τεχνικές ιοντισμού η πηγή μεταδίδει στα μόρια του αναλύτη υψηλή ενέργεια. Έτσι, αυτά βρίσκονται αρχικά σε έντονα διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση, κατά την αποδιέγερσή τους προκαλείται ρήξη δεσμών και εκτενής θραυσματοποίηση των μορίων, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων (ή ιόντων θραυσματοποίησης) με λόγους m/z μικρότερους από του μοριακού ιόντος.

Από την άλλη, οι ήπιες τεχνικές επιτυγχάνουν τον ιοντισμό σε ηπιότερες συνθήκες και προκαλούν περιορισμένη ή μηδαμινή θραυσματοποίηση. Κατά συνέπεια, το λαμβανόμενο φάσμα μάζας αποτελείται από την κορυφή του μοριακού ιόντος και λίγες ακόμη κορυφές. Στον Πίνακα 4.1 περιγράφονται οι κύριες τεχνικές ιοντισμού, οι διατάξεις με τις οποίες συνδυάζονται, τα είδη των ιόντων που παράγονται, οι κατηγορίες των ενώσεων προς ανάλυση που ενδείκνυνται καθώς και οι εκάστοτε κατηγορίες ενώσεων που μπορούν να προσδιοριστούν.

Πίνακας 4.1 Κύριες τεχνικές ιοντισμού

Τεχνική Ιοντισμού	Κύρια ιόντα	Αναλυτής μάζας	Κατηγορίες ενώσεων
Ιοντισμός ηλεκτρονίων (EI)	M ⁺ , θυγατρικά ιόντα	B ^α , Q ^β , TRAP ^γ	Μη πολικές, κάποιες πολικές (<1000 Da)
Χημικός ιοντισμός (CI)	[M+H] ⁺ , [M-H] ⁻ , M ⁺ , M ⁻	B, Q, TRAP	Μη πολικές, κάποιες πολικές (<1000 Da)
Βομβαρδισμός με άτομα υψηλής ταχύτητας (FAB)	[M+H] ⁺ , [M-H] ⁻	B, Q	Πολικές οργανικές, πρωτεΐνες, οργανομεταλλικές (<10000 Da)
Thermospray	[M+H] ⁺ , [M+NH ₄] ⁺	B, Q	Πολικές, κάποιες μη πολικές, οργανικές (<1000 Da)
Ιοντισμός με laser υποβοηθούμενος από υπόστρωμα σε ατμοσφαιρική πίεση (MALDI)	[M+H] ⁺ , [M-H] ⁻	TOF ^δ , Orbitrap	Πολικές, μη πολικές, κάποιες μη πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή (<10 ⁶ Da)
Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray)	[M+H] ⁺ , [M+NH ₄] ⁺ , [M-H] ⁻	B, Q, TRAP, TOF, QTOF, FTMS ^ε , Orbitrap	Μη πολικές και πολικές (<1000 Da)

^αB: magnetic sector, ^βQ: Quadrupole, ^γTRAP: Ion Trap, ^δTOF: Time-of-flight, ^εFTMS: Fourier Transform MS

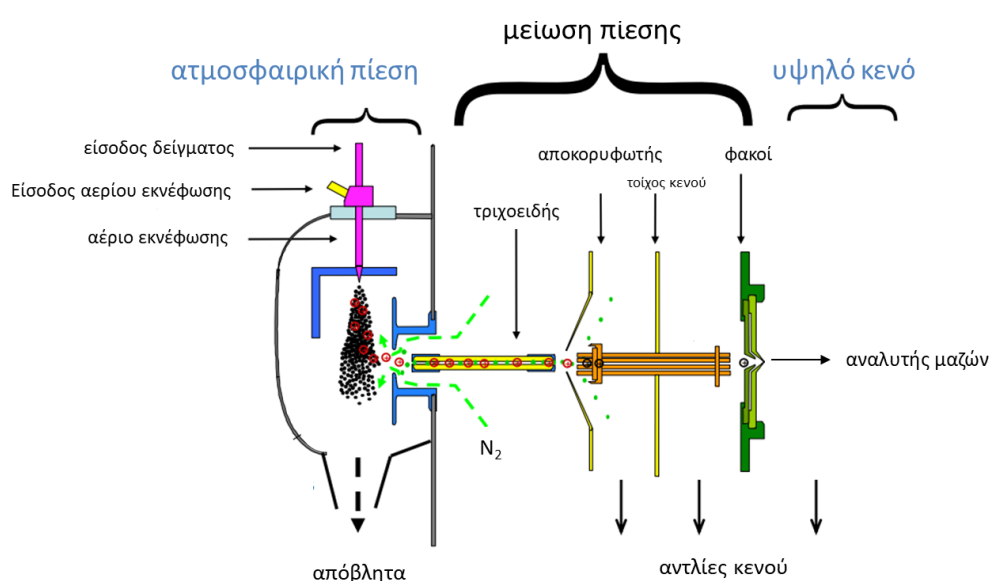
Οι πηγές ιοντισμού μπορούν επίσης να ταξινομηθούν με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε δύο βασικές κατηγορίες: (α) στις πηγές αέριας φάσης και (β) στις πηγές εκρόφησης.

4.3.1 Ιοντισμός σε αέρια φάση

Ο ιοντισμός σε αέρια φάση είναι η πιο συνηθισμένη πρακτική. Συνήθως εφαρμόζεται σε ενώσεις σταθερές στη θέρμανση, με σημείο ζέσεως κάτω από τους 500 °C, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή του όταν πρόκειται για προσδιορισμό ενώσεων με μοριακές μάζες μικρότερες από 103 Da [192]. Στις πηγές αέριας φάσης το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται.

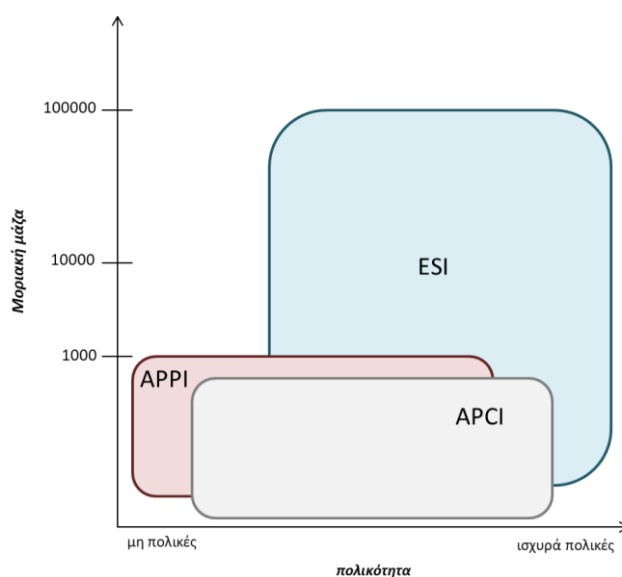
Οι τεχνικές ιοντισμού σε αέρια φάση διαχωρίζονται επίσης (α) σε αυτές που εφαρμόζονται σε συνθήκες κενού, όπως ο ιοντισμός ηλεκτρονίων (electron impact, EI), ο χημικός ιοντισμός (chemical ionization, CI) κ.ά., που συνδυάζονται κυρίως με την αέρια χρωματογραφία και (β) στις τεχνικές ατμοσφαιρικής πίεσης, οι οποίες κυριαρχούν στην υγρή

χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Οι τελευταίες αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο τμήμα των εφαρμογών και της αγοράς οργάνων. Οι τεχνικές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης περιλαμβάνουν τον ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI), το χημικό ιοντισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), το φωτοϊοντισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI) και τον ιοντισμό με λέιζερ υποβοηθούμενο από υπόστρωμα σε ατμοσφαιρική πίεση (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI). Μια τυπική πηγή ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης απεικονίζεται στο Σχήμα 4.2.



Σχήμα 4.2 Απεικόνιση πηγής ατμοσφαιρικής πίεσης

Η επιλογή της τεχνικής εξαρτάται από την απόδοση ιοντισμού ανά περίπτωση. Η ESI μπορεί να εφαρμοστεί για την ανάλυση ενώσεων μέσης έως υψηλής πολικότητας και με μοριακά βάρη έως 100000, ενώ οι APCI και APPI εφαρμόζονται σε μικρότερα και λιγότερο πολικά μόρια όπως λιπίδια, στεροειδή, ορμόνες κλπ. Στην παρούσα Διατριβή, επιλέχθηκε η τεχνική ESI που θα περιγραφεί αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο. Στο Σχήμα 4.3 συσχετίζεται η καταλληλότητα και η χρήση των τεχνικών ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης με την πολικότητα και τις μοριακές μάζες των προσδιοριζόμενων ενώσεων.



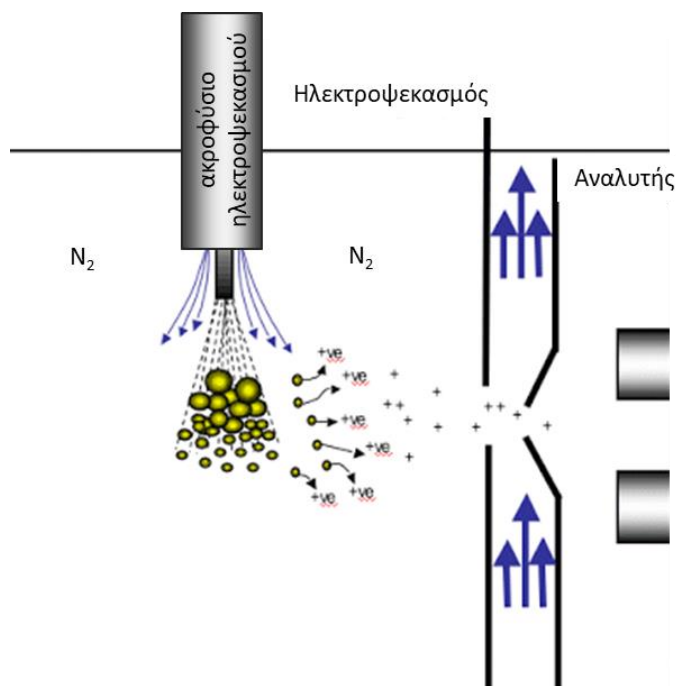
Σχήμα 4.3 Το πεδίο εφαρμογής των τεχνικών ιονισμού σε ατμοσφαιρική πίεση

4.3.1.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (LC–MS). Κατατάσσεται στις ήπιες τεχνικές ιοντισμού και επιτρέπει την ανάλυση μοριακών βαρών έως και 200000 Da, βρίσκοντας έτσι εφαρμογή και στον προσδιορισμό μεγαλομορίων (πρωτείνες, νουκλεοτίδια κ.α.) φορτίζοντάς τα πολλαπλά και μειώνοντας έτσι το λόγο m/z .

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται με εφαρμογή ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, υπό ατμοσφαιρική πίεση, σε ένα υγρό το οποίο διέρχεται μέσα από ένα τριχοειδή σωλήνα με χαμηλή ροή ($1\text{--}10 \mu\text{L min}^{-1}$). Για την παραγωγή του ηλεκτρικού πεδίου απαιτείται εφαρμογή διαφοράς δυναμικού, ($3\text{--}6 \text{ kV}$), μεταξύ του τριχοειδούς σωλήνα και ενός αντιηλεκτροδίου, που βρίσκεται σε απόσταση $0,3\text{--}2 \text{ cm}$ [195]. Το υψηλό δυναμικό προκαλεί στην άκρη του τριχοειδούς ένα αερόλυμα πολλαπλά φορτισμένων σταγόνων. Οι σταγόνες αυτές, καθώς διασχίζουν την πηγή ιοντισμού και οδηγούνται προς το φασματόμετρο μάζας υφίστανται αποδιαλύτωση [191]. Σταδιακά, το μέγεθος των σταγόνων μειώνεται, και μέσα σε $100 \mu\text{s}$ φτάνουν σε ένα σημείο όπου οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των φορτίων στην επιφάνεια κάθε σταγόνας υπερिशύουν των συνεκτικών δυνάμεων της επιφανειακής τάσης. Τότε, λαμβάνει χώρα έκρηξη Coulomb με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών μικρότερων σταγονιδίων. Ακολουθεί αλληλουχία τέτοιων εκρήξεων που οδηγούν στην παραγωγή αέριων ιόντων των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Καθώς τα φορτισμένα σταγονίδια κατευθύνονται προς το φασματόμετρο μάζας, περνούν μέσα από μια οπή δειγματοληψίας με συνέπεια να απομακρύνονται και τα τελευταία μόρια διαλύτη (α) μέσω

κουρτίνας θερμαινόμενου αδρανούς αερίου (συνήθως N_2) το οποίο έρχεται από δύο κατευθύνσεις, με κύριο αέριο (sheath gas) και βοηθητικό αέριο (auxiliary gas) ή (β) μέσω θερμαινόμενου τριχοειδούς. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται σταδιακή μείωση της πίεσης. Τελικά, τα παραγόμενα αέρια ιόντα μεταφέρονται προς τον αναλυτή με τη βοήθεια των δακτυλιοειδών φακών [191]. Στο Σχήμα 4.4 απεικονίζεται της λειτουργίας του ESI.



Σχήμα 4.4 Σχηματική απεικόνιση ESI σε λειτουργία

Παρόλο που ο μηχανισμός δημιουργίας αέριων ιόντων από τις φορτισμένες σταγόνες έχει μελετηθεί διεξοδικά και πολλά σημεία της πορείας έχουν ερμηνευθεί, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμα κατανοηθεί πλήρως. Οι δύο θεωρίες που έχουν διατυπωθεί περιλαμβάνουν το μοντέλο της εξάτμισης ιόντος (Ion Evaporation Model, IEM) και το μοντέλο υπολειμματικού φορτίου (Charge Residue Model, CRM) [191]. Ωστόσο, φαίνεται να είναι σαφές ότι η πορεία δημιουργίας αέριων ιόντων μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια:

- (α) στην παραγωγή φορτισμένων σταγόνων στην άκρη του τριχοειδούς του ηλεκτροψεκασμού
- (β) στη συρρίκνωση των φορτισμένων σταγόνων
- (γ) στη δημιουργία των αέριων ιόντων

4.3.1.2 Φάσματα ESI

Όπως έχει αναφερθεί, το ESI αποτελεί ήπια τεχνική ιοντισμού. Για αυτό και τα φάσματα που προκύπτουν αποτελούνται συνήθως από μοριακά ιόντα. Θεωρώντας ως M τη μοριακή μάζα της ένωσης, οι βασικές ενώσεις φορτίζονται θετικά (πρωτονιώνονται) άρα το φάσμα έχει τη μορφή $[M+H]^+$ και ο παρακολουθούμενος λόγος m/z είναι $M+1$. Αντίθετα, τα οξέα φορτίζονται αρνητικά (αποπρωτονιώνονται) παρέχοντας φάσματα της μορφής $[M-H]^-$ και ο λόγος m/z είναι $M-1$. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μόρια όπου σε περισσότερα από ένα σημεία μπορεί να λάβει χώρα πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση (π.χ πρωτεΐνες) και στο φάσμα παρατηρούνται και πολυφορτισμένα μοριακά ιόντα της ένωσης. Επίσης, ο ιοντισμός με ESI στη μέθοδο θετικού ιονισμού μπορεί επίσης να προκαλέσει σχηματισμό ιόντων προσθήκης (adduct ions). Τα πιο συχνά εμφανιζόμενα ιόντα προσθήκης είναι τα εξής: $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+K]^+$, $[M+MeOH+H]^+$ και $[M+ACN+H]^+$. Αν και στη μέθοδο αρνητικού ιονισμού είναι λιγότερο πιθανόν να σχηματιστούν ιόντα προσθήκης, ορισμένες φορές παρατηρούνται ιόντα προσθήκης με οξικό και μυρμηκικό οξύ, $[M+HCOOH-H]^-$ και $[M+CH_3COOH-H]^-$.

4.3.1.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα από τη χρήση του ESI

Συνοψίζοντας, τα κύρια πλεονεκτήματα από τη χρήση ESI είναι:

- Ο ιοντισμός συμβαίνει κατευθείαν στο διάλυμα, άρα η μελέτη μη πτητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων είναι εφικτή.
- Οι ταχύτητες ροής κινητής φάσης κυμαίνονται από λίγα μL έως και περισσότερα από 1 mL ανά λεπτό, όταν το επιτρέπει ο εξοπλισμός. Αυτό έχει ως συνέπεια τη δυνατότητα επιλογής συμβατικών αναλυτικών στηλών ή στηλών μικρού διαμετρήματος, ακόμα και τριχοειδών.
- Παράγονται πολυφορτισμένα ιόντα από ανέπαφα μακρομόρια διαλυμένης ουσίας, με συνέπεια την αύξηση του εύρους μαζών αρά και τη δυνατότητα μελέτης μορίων με μεγάλα μοριακά βάρη.
- Το φάσμα του ESI για ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους παρέχει έναν μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων προσδιορισμών της μοριακής μάζας από ένα μόνο φάσμα, αυξάνοντας έτσι την ακρίβεια.

Ωστόσο ο ESI παρουσιάζει τα εξής μειονεκτήματα:

- Είναι ακατάλληλος για μη πολικές ή χαμηλής πολικότητας ενώσεις.
- Το φάσμα μάζας που παράγεται για έναν αναλύτη, όσον αφορά το εύρος m/z των ιόντων που παρατηρούνται και των σχετικών τους εντάσεων, εξαρτάται από διάφορους

παράγοντες και τα φάσματα που αποκτώνται υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες μπορεί να διαφέρουν σημαντικά στην εμφάνιση.

- Η απευθείας ανάλυση μειγμάτων μπορεί να μην είναι εφικτή λόγω της επίδρασης του υποστρώματος, με αποτέλεσμα την παρουσία συνεκλούμενων ενώσεων.
- Καθώς πρόκειται για μια ήπια τεχνική ιονισμού που παράγει ανέπαφα μοριακά είδη, οι πληροφορίες δομής είναι συνήθως διαθέσιμες μόνο αν χρησιμοποιηθεί MS/MS.

4.3.2 Ιοντισμός με εκρόφηση

Οι τεχνικές ιονισμού με εκρόφηση εφαρμόζονται σε υγρά ή στερεά δείγματα, τα οποία μετατρέπονται αμέσως σε αέρια ιόντα. Τα δείγματα δέχονται ενέργεια από πηγές (δέσμη σωματιδίων, laser, κλπ.) και με την απορρόφηση της ενέργειας τα μόρια της αναλυόμενης ένωσης εκροφώνται και ιονίζονται. Τα φάσματα που λαμβάνονται είναι απλά και συχνά αποτελούνται μόνο από το μοριακό ή το πρωτονιωμένο/αποπρωτονιωμένο ιόν. Οι πηγές εκρόφησης δεν απαιτούν εξάτμιση των μορίων του αναλύτη και μπορούν να εφαρμοσθούν σε μη πτητικές ενώσεις, θερμικώς ασταθείς, με μοριακές μάζες έως και 10^5 Da. Οι πηγές εκρόφησης μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω:

1. στις πηγές ιονισμού υγρής φάσης, όπως ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI), ο χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI) και ο φωτοϊοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APPI)
2. πηγές στερεάς κατάστασης, όπως ο ιοντισμός με λέιζερ υποβοηθούμενος από υπόστρωμα (matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI), ο ιοντισμός εκρόφησης με πλάσμα (Plasma Desorption, PD), ο βομβαρδισμός με άτομα υψηλής ταχύτητας (Fast Atom Bombardment, FAB), ο βομβαρδισμός με ιόντα (Secondary Ion MS), ο ιοντισμός εκρόφησης πεδίου (Field Desorption, FD) κ.ά.
3. πηγές δευτερογενούς ιόντος σε ατμοσφαιρική πίεση, όπως ο ιοντισμός σε πραγματικό χρόνο (direct analysis in real time, DART) και ο ιοντισμός εκρόφησης με ηλεκτροψεκασμό (desorption ESI, DESI).

4.4 Αναλυτές μάζας

Οι τύποι αναλυτών μάζας που έχουν αναπτυχθεί είναι πολλοί. Αν και όλοι οι αναλυτές μάζας χρησιμοποιούν στατικά ή δυναμικά, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφοροποιήσεις οι οποίες έγκεινται στον τρόπο με τον οποίο χρησιμοποιούν τα εν λόγω πεδία ώστε να επέλθει ο διαχωρισμός. Αυτές οι διαφοροποιήσεις

είναι κριτήριο για την εκάστοτε επιλογή του καταλληλότερου αναλυτή για την επιθυμητή εφαρμογή.

Υπενθυμίζεται ότι τα αέρια ιόντα που έχουν παραχθεί στην πηγή ιονισμού, φτάνουν στον αναλυτή μάζας όπου διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο. Ο ιδανικός αναλυτής μάζας πρέπει να είναι σε θέση να διαχωρίσει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές m/z και να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, ώστε να έχει μεγάλη ευαισθησία και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος και ιονισμού.

Γενικά, υπάρχουν τρεις μεγάλες κατηγορίες αναλυτών μάζας: (α) οι αναλυτές σάρωσης, όπως ο τετραπολικός αναλυτής μάζας (Q) και οι αναλυτές μαγνητικού τομέα και (β) οι παλμικοί αναλυτές μάζας, όπως η τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT), οι αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF) και ο αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (FT-ICR) και (γ) υβριδικοί αναλυτές που περιλαμβάνουν συνδυασμό αναλυτών σε σειρά, όπως το Orbitrap και το Q-TOF [191]. Τα βασικά χαρακτηριστικά για διάφορους αναλυτές μάζας αναφέρονται στον Πίνακα 4.2. Ο υβριδικός αναλυτής μάζας Orbitrap που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.4.2.

Πίνακας 4.2 Τυπικά χαρακτηριστικά επιλεγμένων αναλυτών μάζας

Φασματόμετρο μάζας	Διακριτική ικανότητα (FWHM)	Ακρίβεια Μάζας (ppm)	Ευαισθησία (g)
Quadrupole (Q)	έως 5000	50	10^{-15} (SRM)
Quadrupole ion trap (IT)	10000	50	10^{-15}
Time of flight (TOF)	20000	3	10^{-12} (full scan)
Magnetic Sector (B)	50000	≈1	10^{-12}
Orbitrap	100000	2	10^{-15} (full scan)
FT-ICR	1000000	≈1	10^{-12} (full scan)

Στον Πίνακα 4.3 επιχειρείται αξιολόγηση του κατά προσέγγιση με βαθμολόγηση από το 1 έως το 10.

Πίνακας 4.3 Σύγκριση αναλυτών μάζας με κατά προσέγγιση βαθμολόγηση από το 1 έως το 10 των σημαντικών χαρακτηριστικών τους [189]

Χαρακτηριστικό	Q	TOF	IonTrap	FTMS
Εύρος μαζών	5	10	5	7
Διακριτική ικανότητα (<i>R</i>)	4	8	6	10
Ευαισθησία	7	9	7	8
Δυνατότητα ολικής ανίχνευσης	5	10	7	5
Αποθήκευση ιόντων	5	-	10	6
Ταχύτητα σάρωσης	7	10	9	3
Δυναμική περιοχή	9	3	8	8
Ποσοτικοποίηση	8	5	5	6
Αλληπάλληλα MS/MS	4	5	10	8
Εισαγωγή δείγματος	9	9	8	5
Απλότητα	10	8	8	3
Συμβατότητα με αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού	10	10	8	5
Απόδοση συγκριτικά με την τιμή	8	8	8	6

4.4.1 Χαρακτηριστικά επίδοσης αναλυτών μάζας

Οι αναλυτές μάζας έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά επίδοσης των οποίων οι τιμές ποικίλλουν. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι η διακριτική ικανότητα (resolving power ή resolution, *R*), η ακρίβεια μάζας, η ταχύτητα ανάλυσης, και η διαπερατότητα των ιόντων. Η διακριτική ικανότητα είναι το σημαντικότερο από τα παραπάνω μεγέθη και περιγράφεται από την Εξίσωση 4.3:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (4.3)$$

Όπου: Δm είναι η διαφορά μαζών m_1 και m_2 , μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών και m είναι η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής ή η μέση τιμή των δύο κορυφών του φάσματος.

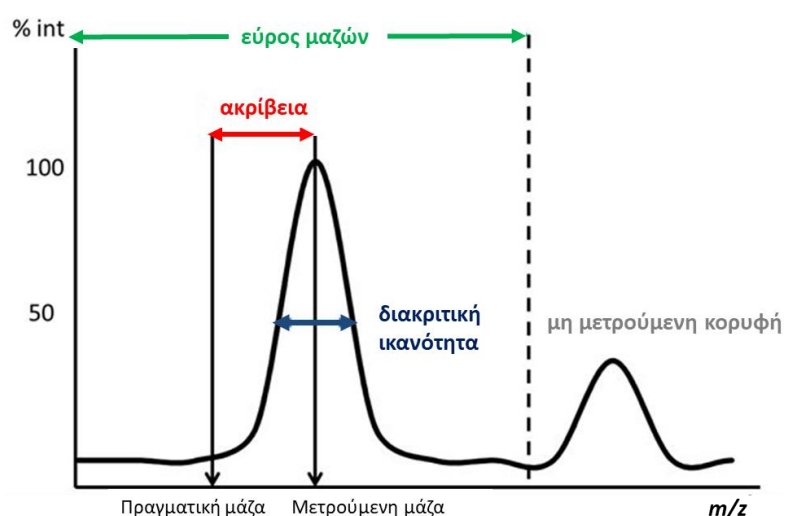
Δύο κορυφές με παρόμοια ένταση θεωρείται ότι διαχωρίζονται ικανοποιητικά όταν το ύψος της βασικής γραμμής μεταξύ τους είναι μικρότερο του 10% του ύψους τους. Αν δεν υπάρχει γειτονική κορυφή με παρόμοια ένταση για να προκύψει σύγκριση άρα και να οριστεί η αλληλοεπικάλυψη, τότε ως Δm χρησιμοποιείται το πλήρες εύρος στο μισό του μέγιστου της κορυφής ενδιαφέροντος (full width half minimum, FWHM).

Πρακτικά, ένα φασματόμετρο μάζας με διακριτική ικανότητα 1000 μπορεί να διαχωρίσει το ιόν με τιμή m/z 100,1 από το 100,2 ή το ιόν με τιμή m/z 1001 από το 1000. Τα φασματόμετρα μάζας κατηγοριοποιούνται με βάση την διακριτική τους ικανότητα σε χαμηλής και υψηλής διακριτικής ικανότητας. Η υψηλή διακριτική ικανότητα και η υψηλή ευαισθησία δεν μπορούν να επιτευχθούν ταυτόχρονα. Για το λόγο αυτό, όταν απαιτείται

υψηλή ευαισθησία σε όργανα πολύ υψηλής διακριτικής ικανότητας επιλέγεται συχνά η λειτουργία σε χαμηλότερη διακριτική ικανότητα.

Η ακρίβεια μάζας ορίζεται ως η διαφορά $(m_2 - m_1)/m_1$ και εκφράζεται σε μονάδες χιλιοστομάζας (mmu) ή συχνότερα σε μέρη στο εκατομμύριο (ppm). Όταν το μοριακό βάρος μιας ένωσης είναι <200 Da, η ακρίβεια εκφράζεται σε mmu.

Το εύρος μαζών καθορίζει τα όρια των τιμών m/z μέσα στα οποία ο αναλυτής μάζας μπορεί να μετρήσει ιόντα. Η ταχύτητα ανάλυσης ή ταχύτητα σάρωσης είναι ο ρυθμός με τον οποίο ο αναλυτής μετράει σε ένα συγκεκριμένο εύρος μαζών και εκφράζεται σε μονάδες μάζας ανά ms ή μ s. Η διαπερατότητα ιόντων είναι ο λόγος του αριθμού των ιόντων που φτάνουν στον ανιχνευτή προς τον αριθμό των ιόντων που εισέρχονται στον αναλυτή μάζας. Η διαπερατότητα γενικά περιλαμβάνει τις απώλειες των ιόντων κατά τη διαδρομή τους σε διάφορα σημεία του αναλυτή, όπως είναι οι φακοί πριν και μετά τον αναλυτή. Τα χαρακτηριστικά επίδοσης που περιγράφηκαν αποδίδονται σχηματικά στο Σχήμα 4.5.



Σχήμα 4.5 Χαρακτηριστικά επίδοσης αναλυτή μάζας

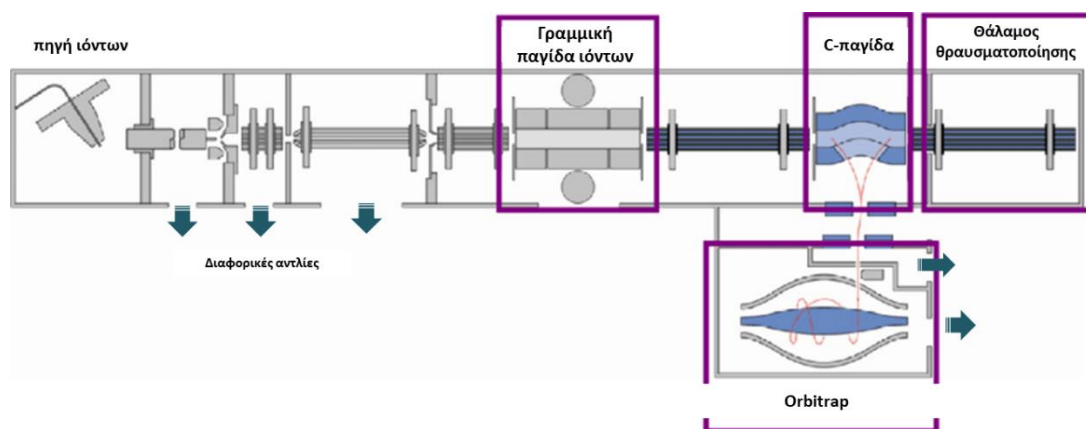
4.4.2 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap

Ο καινοτόμος υβριδικός αναλυτής μάζας Orbitrap είναι ο πρώτος υψηλής απόδοσης αναλυτής μάζας που χρησιμοποιεί συνδυασμό της γραμμικής και ηλεκτροστατικής παγίδας ιόντων και κατασκευάστηκε από τη Thermo Electron, εισάγοντας στην αγορά το σύστημα LTQ Orbitrap (linear ion trap quadrupole). Εφευρέθηκε από τον Makarov και η βάση για την

κατασκευή του προήλθε από την παγίδα ιόντων Kingdon, που είχε συλληφθεί ως ιδέα αλλά δεν είχε κατασκευαστεί πρακτικά [64,65].

Ο αναλυτής μάζας Orbitrap αποτελείται από δύο ειδικά διαμορφωμένα κεντρικά και εξωτερικά ηλεκτρόδια. Ο τροχιακός αναλυτής μάζας είναι ένα υβριδικό σύστημα που συνδυάζει τη γραμμική παγίδα ιόντων LTQ με τον αναλυτή μάζας Orbitrap. Τα παραγόμενα ιόντα στην πηγή ιοντισμού παγιδεύονται στον αναλυτή μάζας LTQ και μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση μεθόδων σαρώσεως MS και MSⁿ.

Η γενική συνδεσμολογία του αναλυτή Orbitrap, ο οποίος είναι τροχιακός παγίδα ιόντων (orbitrap analyzer) ακολουθεί τις βασικές αρχές της οργανολογίας αναλυτών μάζας και απεικονίζεται στο Σχήμα 4.6.



Σχήμα 4.6 Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή LTQ Orbitrap

Συγκεκριμένα, τα τμήματα του αναλυτή τροχιακής παγίδας ιόντων περιλαμβάνουν διαφορικό σύστημα με τελικό κενό $<8 \times 10^{-10}$ Torr, πολυπολικούς φακούς μεταφοράς ιόντων υπό υψηλό κενό, κελί θραυσματοποίησης με άζωτο (C-Trap), ευθύγραμμο πολυπολικό κελί θραυσματοποιήσεων, τροχιακή παγίδα, σύστημα για τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας, ενισχυτές χαμηλού θορύβου και μετατροπείς σήματος σε συχνότητα σε συνδυασμό με μετασχηματισμούς Fourier (Fourier Transformation, FT) για την απόκτηση φασμάτων μάζας [194, 196].

4.4.2.1 Αρχή λειτουργίας αναλυτή Orbitrap

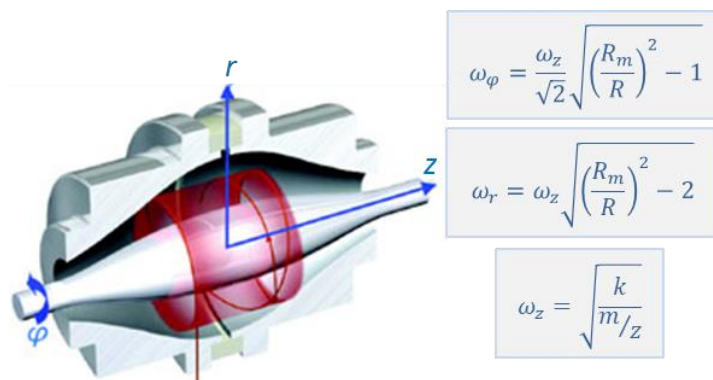
Η αρχή λειτουργίας του αναλυτή μάζας Orbitrap βασίζεται στην τροχιακή παγίδευση των ιόντων. Τα ιόντα που έχουν προηγουμένως παραχθεί στην πηγή, εισέρχονται και

συσσωρεύονται στη γραμμική παγίδα ιόντων. Στη γραμμική παγίδα, τα ιόντα αρχίζουν να επιταχύνονται για να οδηγηθούν τάχιστα στη C-παγίδα ιόντων (C-trap), όπου παγιδεύονται με απότομη άνοδο του δυναμικού στο κεντρικό ηλεκτρόδιο. Στη συνέχεια, συμπιέζονται δημιουργώντας ένα θύσανο ιόντων και τελικά εισέρχονται στο Orbitrap [196, 197]. Τα συμμετρικά αξονικά ηλεκτρόδια του Orbitrap δημιουργούν ένα ηλεκτροστατικό δυναμικό, που περιγράφεται από την Εξίσωση 4.4.

$$U_{(r,z)} = \frac{k}{2} \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} (R_m)^2 \ln \left[\frac{r}{R_m} \right] + C \quad (4.4)$$

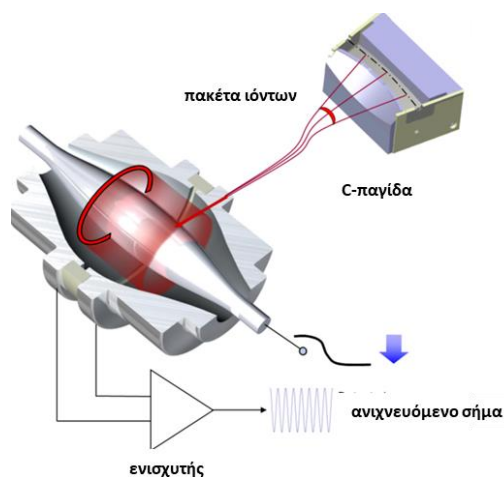
Όπου: r , z οι κυλινδρικές συντεταγμένες, k η σταθερά καμπυλότητας του πεδίου και R_m η χαρακτηριστική ακτίνα καμπυλότητας.

Τα εκχεόμενα ιόντα εκτελούν περιστροφική κίνηση γύρω από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο (r , φ όπου φ η γωνιακή συντεταγμένη), και παράλληλα ταλαντώνονται κατά μήκος του οριζώντιου άξονα (z), όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.7. Η ταλάντωση μπορεί να θεωρηθεί αρμονική και είναι ανεξάρτητη από τις παραμέτρους r , φ της κίνησης των ιόντων.



Σχήμα 4.7 Απεικόνιση του τροχιακού αναλυτή μάζας Orbitrap [198]

Τα αξονικά ταλαντευόμενα ιόντα παράγουν ένα περιοδικό σήμα στα εξωτερικά ηλεκτρόδια, το οποίο ανιχνεύεται με ένα διαφοροποιημένο ενισχυτή ως αποτυπωμένο ρεύμα (image current). Τα σήματα του αποτυπωμένου ρεύματος (ιόντα συγκεκριμένης μάζας) μετατρέπονται σε φάσμα συχνοτήτων με χρήση του αλγορίθμου μετατροπής Fourier (FT algorithm) (Σχήμα 4.8).



Σχήμα 4.8 Σύζευξη της παγίδας C με τον υβριδικό αναλυτή Orbitrap

Επειδή η συχνότητα ταλάντωσης (ω) σχετίζεται ευθέως με το λόγο μάζας/φορτίου (m/z), το φάσμα συχνοτήτων μετατρέπεται εύκολα σε φάσμα μάζας (Εξίσωση 4.5).

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \quad (4.5)$$

Όπου ω είναι η συχνότητα της ταλάντωσης, k η σταθερά του συστήματος και m/z ο λόγος μάζα προς φορτίο. Ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z θα διαφέρουν στην περιστροφή και την αξονική ταλάντωση με αποτέλεσμα να παράγουν διαφοροποιημένα τελικά σήματα στον ενισχυτή. Από τον υπολογισμό της συχνότητας ταλάντωσης προκύπτει ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας. Η ανάλυση μάζας μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: (α) Fourier Transform (FT) mode, όπου πραγματοποιείται μέτρηση των συμφασικών ταλαντώσεων στην οριζόντια κατεύθυνση (image current detection) και (β) Mass Selective Instability (MSI) mode, η οποία περιλαμβάνει την έγχυση ιόντων και τη συλλογή τους πάνω σε έναν ανιχνευτή.

4.4.2.2 Πλεονεκτήματα χρήσης αναλυτή Orbitrap

Οι τεχνικές παγίδευσης ιόντων (ion trap) αποτελούν σημαντικά εργαλεία για τη φασματομετρία μάζας. Ωστόσο, οι παραδοσιακοί αναλυτές μάζας με παγίδευση ιόντων έχουν πολλά μειονεκτήματα είτε στην απόδοσή τους (ανεπαρκής ακρίβεια μάζας, περιορισμένη γραμμική περιοχή, μειωμένη ικανότητα φόρτισης κ.α.), είτε λόγω μεγάλης πολυπλοκότητας και κόστους. Ο αναλυτής μάζας Orbitrap προσελκύει το ενδιαφέρον λόγω της αναλυτικής απόδοσής (υψηλή διακριτική ικανότητα και ακρίβεια μάζας, χωρητικότητα

φορτίων, μεγάλο γραμμικό δυναμικό εύρος, σταθερότητα). Οι αναλυτές Orbitrap μπορούν να συνδυάσουν την αξιόπιστη ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών σε μια μόνο ανάλυση.

Με εξωτερική βαθμονόμηση του οργάνου η ακρίβεια μάζας φτάνει τα 3 ppm και με εσωτερική βαθμονόμηση το 1 ppm. Παράλληλα, το δυναμικό εύρος μπορεί να είναι μεγαλύτερο από 4000 σε μια σάρωση Η διακριτική ικανότητα είναι 60000–100000 σε (m/z 400) με ταχύτητα σάρωσης 1 Hz. Το εύρος μάζας είναι μεταξύ 50 και 2000 amu, ενώ η ευαισθησία φτάνει και σε επίπεδα fmol. Επίσης, υπάρχει δυνατότητα παράλληλης ανάλυσης MS και MSⁿ, (θεωρητικά: n=1–10), χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές διάσπασης ανά περίπτωση (CID και HCD, PQD κ.ά.).

Σήμερα, η «οικογένεια» των προϊόντων LTQ Orbitrap περιλαμβάνει επιπλέον δυνατότητες όπως τον ιοντισμό με τη μέθοδο MALDI και τη διάσπαση με μεταφορά ηλεκτρονίων (electron-transfer dissociation, ETD). Η καινοτομία στον τομέα της οργανολογίας συμπληρώνεται από μια νέα προσέγγιση στην απόκτηση δεδομένων, το σύστημα automatic gain control (AGC), που μπορεί να προβλέψει τον απαιτούμενο χρόνο πλήρωσης της παγίδας ιόντων χρησιμοποιώντας ένα πανοραμικό φάσμα μάζας.

Ο υβριδικός αναλυτής μάζας Orbitrap έχει ευρύ πεδίο εφαρμογής, με την πρωτεομική ανάλυση να κατέχει το σημαντικότερο ποσοστό. Μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων πραγματεύεται την ανάλυση, ταυτοποίηση, το χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών, την ανάλυση λιπιδίων και τον έλεγχο doping ενώ τελευταία και η περιβαλλοντική ανάλυση κατέχει σημαντική θέση στο πεδίο εφαρμογής. Λόγω της μεγάλης διακριτικής ικανότητας και της υψηλής ακρίβειας μάζας που προσφέρει η τεχνολογία Orbitrap, εφαρμόζεται αρχικά στη μελέτη και ταξινόμηση των αναλυτών ρουτίνας (screening), αλλά και στην ποσοτικοποίησή τους.

Η περιβαλλοντική ανάλυση κερδίζει συνεχώς έδαφος στον αναλυτή Orbitrap MS λόγω των αυξημένων απαιτήσεων της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας για παρακολούθηση των επιπέδων ρύπανσης από πιο υδρόφιλες πλέον ενώσεις σε υδάτινα οικοσυστήματα. Επίσης, ο τομέας της ανάλυσης προϊόντων τροφίμων και ζωοτροφών αποτελεί πρόκληση λόγω της πολυπλοκότητας των εκχυλισμάτων των δειγμάτων προς ανάλυση, που συχνά προκύπτουν από γενικευμένες μεθόδους, όπου αντί σταδίου καθαρισμού πραγματοποιείται απλή αραίωση του εκχυλίσματος. Έτσι, προκύπτει μειωμένη εκλεκτικότητα, η οποία μπορεί να εξισορροπηθεί από την υψηλή απόδοση της ανάλυσης στα όργανα όπως ο αναλυτής Orbitrap. Ακόμη, η συνολική ευαισθησία της μεθόδου πρέπει να ικανοποιεί τις νομοθετικές απαιτήσεις για ανίχνευση υπολειμμάτων σε χαμηλά επίπεδα ($ng\ g^{-1}$).

4.5 Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας

Οι κύριες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μάζας είναι:

- (α) η τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan, FS),
- (β) η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM)
- (γ) η φασματομετρία μάζας σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS), που διακρίνεται σε άλλες υποκατηγορίες τεχνικών σάρωσης. Οι κύριες τεχνικές ανάλυσης της απλής φασματομετρίας μάζας και της φασματομετρίας μάζας σε σειρά συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.4, ενώ στα εδάφια που ακολουθούν περιγράφονται αναλυτικά αυτές και επιπλέον η τεχνική σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα.

Πίνακας 4.4 Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας [196]

Τεχνική σάρωσης	Q1	Q2	Q3	Πληροφορίες
FS (πλήρης σάρωση)	σάρωση	διέλευση όλων των ιόντων	διέλευση όλων των ιόντων	μοριακή μάζα
SIM (παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος)	ορισμένο m/z	διέλευση όλων των ιόντων	διέλευση όλων των ιόντων	ποσοτικοποίηση
Product scan (σάρωση προϊόντων ιόντων)	ορισμένο m/z	διέλευση όλων των ιόντων, ενέργεια σύγκρουσης	σάρωση	δομή
Precursor scan (σάρωση πρόδρομων ιόντων)	σάρωση	διέλευση όλων των ιόντων, ενέργεια σύγκρουσης	ορισμένο m/z	screening
Neutral loss (ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου)	σάρωση	διέλευση όλων των ιόντων, ενέργεια σύγκρουσης	σάρωση	screening
SRM (επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης ιόντος)	ορισμένο m/z	διέλευση όλων των ιόντων, ενέργεια σύγκρουσης	ορισμένο m/z	ποσοτικοποίηση

4.5.1 Τεχνική πλήρους σάρωσης (FS)

Στην τεχνική πλήρους σάρωσης (FS) λαμβάνεται το ολικό φάσμα μεταξύ δύο τιμών m/z για καθορισμένο χρόνο. Με τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους, η πλήρης σάρωση βοηθά στον προσδιορισμό της ταυτότητας μιας άγνωστης ένωσης, ενώ μπορεί να γίνει και σύγκριση με πρότυπα φάσματα. Η αύξηση του χρόνου σάρωσης συνεπάγεται αύξηση του

συνολικού αριθμού των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή, συνεπώς αύξηση στην ευαισθησία της μέτρησης. Η αύξηση της ευαισθησίας επιτυγχάνεται επίσης με μείωση του εύρους σάρωσης μαζών, ωστόσο σε αυτή την περίπτωση ενέχεται ο κίνδυνος να χαθούν πληροφορίες.

4.5.2 Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM)

Η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων προτιμάται όταν η ανάλυση στοχεύει στη μέτρηση ενώσεων με γνωστά φάσματα. Επιλέγονται κάποια χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματος μιας ένωσης και ο αναλυτής μεταβαίνει πολύ γρήγορα από τη μια μάζα στην άλλη, μετρώντας μόνο τις επιλεγμένες μάζες. Η τεχνική αυτή υπερέχει σε ευαισθησία, αλλά υπάρχει ο κίνδυνος για ψευδώς θετικά αποτελέσματα (false positives) καθώς μπορεί να συμπεριοριστεί οποιαδήποτε ένωση δίνει τα ίδια ιόντα με τα επιλεγμένα.

4.5.3 Τεχνική φασματομετρίας μάζας σε σειρά (MS/MS)

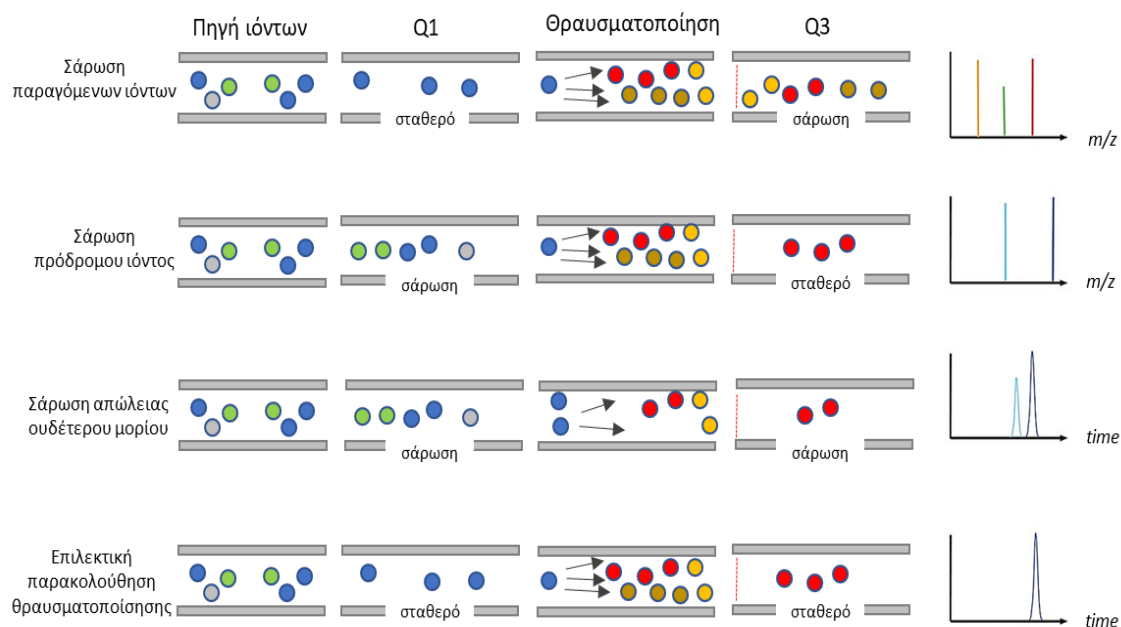
Η φασματομετρία μάζας σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες τεχνικές φασματομετρίας μάζας και περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης. Μεταξύ των επιπέδων MS τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες (Σχήμα 4.9), όπως σύγκρουση με αδρανή ή δραστικά αέρια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση, επιβράδυνση, σταθεροποίηση κτλ. Σε τριπλά τετράπολα (QQQ) ή υβριδικούς αναλυτές (π.χ. Q-TOF, IT-TOF, IT-Orbitrap), τα επιμέρους τμήματα μπορούν να επιλέξουν να περάσει μόνο ένα ιόν ή όλα τα ιόντα. Η επιλογή ανάμεσα στους διάφορους αναλυτές MS σάρωσης ή μη σάρωσης και ανάμεσα στις διάφορες διαδικασίες στις οποίες υποβάλλονται τα ιόντα μεταξύ των αναλυτών, παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης πολυάριθμων πειραμάτων MS/MS, τα οποία μπορούν να προσφέρουν πολύτιμη πληροφορία για τη δομή της αναλύμενης ένωσης και να αυξήσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της μέτρησης [189].

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά μπορεί να πραγματοποιηθεί στο χώρο (Tandem Mass Spectrometry in Space) ή στο χρόνο (Tandem Mass Spectrometry in Time). Για πειράματα φασματομετρίας μάζας σε σειρά στο χώρο, απαιτούνται τουλάχιστον δύο αναλυτές μάζας. Η πιο κοινή διαμόρφωση είναι το τριπλό τετράπολο. Το τριπλό τετράπολο χρησιμοποιεί τα τετράπολα Q1 και Q3 ως αναλυτές MS και το τετράπολο Q2 ως χώρο θραύσης των ιονισμένων μορίων. Το Q2 πληρώνεται με αέριο σύγκρουσης (collision gas) που

είναι, συνήθως, αδρανές αέριο. Ο συνδυασμός τετραπόλου με παγίδες ιόντων ή αναλυτή χρόνου πτήσης στη θέση του τελικού αναλυτή (Q3) επιτρέπει τη λήψη φασμάτων υψηλής διαχωριστικής ικανότητας καθώς και πειράματα MSⁿ. Πρόκειται για οργανολογία που χρησιμοποιείται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς ή για την ανάπτυξη νέων μεθόδων και είναι αρκετά απαιτητική τόσο σε κόστος αγοράς όσο και στη λειτουργία της.

Για τη φασματομετρία μάζας σε σειρά στο χρόνο χρησιμοποιούνται οι παγίδες ιόντων και οι αναλυτές FT-MS (αναλυτής μάζας κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων ή Orbitrap με μετασχηματισμό Fourier). Τα ιόντα μπορούν να επιλεγούν και να αποθηκευτούν στον αναλυτή, να διασπαστούν και τα παραγόμενα ιόντα να αναλυθούν κατά τη διάρκεια ενός δεύτερου πειράματος MS, στον ίδιο αναλυτή. Το πλεονέκτημα στην περίπτωση αυτή είναι η δυνατότητα πραγματοποίησης πειραμάτων MSⁿ. Ωστόσο, μειονέκτημα της χρήσης των παγίδων είναι η αδυναμία συλλογής ιόντων θραυσματοποίησης με m/z μικρότερο του 1/3 σε σχέση με το πρόδρομο ιόν.

Στη φασματομετρία MS/MS υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής διάφορων πειραμάτων σάρωσης. Τα πειράματα αυτά απεικονίζονται στο Σχήμα 4.9 και ακολουθεί σύντομη περιγραφή τους.



Σχήμα 4.9 Από πάνω προς τα κάτω: (α) πείραμα σάρωσης παραγόμενων ιόντων, (β) πείραμα σάρωσης πρόδρομου ιόντος, (γ) πείραμα για ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου και (δ) πείραμα επιλεκτικής παρακολούθησης αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων [199]

4.5.3.1 Σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product Ion Scan)

Κατά τη σάρωση παραγόμενων ιόντων ή «σάρωση θυγατρικού ιόντος» (Daughter Ion Scan), ο πρώτος αναλυτής μάζας (π.χ. τετράπολο Q1) χρησιμοποιείται για την επιλογή ενός πρόδρομου ιόντος (precursor ion), το οποίο στη συνέχεια οδηγείται στο χώρο θραυσματοποίησης (Q2-collision cell). Εκεί, λόγω της υψηλής ενέργειας και της παρουσίας αερίου (αργό ή άζωτο) λαμβάνουν χώρα συγκρούσεις του πρόδρομου ιόντος με τα μόρια του αερίου. Έτσι, προκύπτει η θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος σε ιόντα θραυσματοποίησης και ένα ή περισσότερα ουδέτερα μόρια. Στη συνέχεια, τα παραγόμενα ιόντα διέρχονται από τον επόμενο αναλυτή μάζας (Q3), ο οποίος λειτουργεί σε πλήρη σάρωση.

Η διαδικασία της θραυσματοποίησης αυτή ονομάζεται «διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση» (Collision Induced Dissociation, CID). Τα ιόντα μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν προς θραυσματοποίηση με την τεχνική «υψηλής ενέργειας διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση» (higher energy CID, HCD), η οποία είναι διαθέσιμη μόνο ως το τελευταίο βήμα μιας MSⁿ πορείας και τα φάσματα που προκύπτουν είναι σαν αυτά του τριπλού τετραπόλου. Άλλη τεχνική θραυσματοποίησης είναι η PQD (Pulsed-Q dissociation), η οποία εισήχθη από τη Thermo Scientific για τις γραμμικές παγίδες ιόντων και τα φάσματά της είναι παρόμοια με αυτά της CID. Ωστόσο, επιτρέπει ταυτόχρονα την παρατήρηση ιόντων θραυσματοποίησης χαμηλών m/z τα οποία συνήθως αποκλείονται με την τεχνική CID.

Με τη σάρωση παραγόμενων ιόντων παρέχονται πληροφορίες για τη δομή μιας ένωσης που μπορεί να είναι πολύ χρήσιμες στην εξέταση πολύπλοκων μιγμάτων, ωστόσο η αργή σάρωση περιορίζει τη χρησιμότητά τους για ποσοτικές αναλύσεις. Σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές MS/MS χρησιμοποιούνται για την ποσοτική αποτίμηση ενώσεων σε περίπλοκα δείγματα.

4.5.3.2 Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scan)

Σε αυτή την τεχνική, το Q1 λειτουργεί σε πλήρη σάρωση όταν τα ιόντα εισέρχονται σε αυτό, για να ακολουθήσει η είσοδός τους στο Q2, όπου υφίστανται διάσπαση, σχηματίζοντας θυγατρικά ιόντα. Το τετράπολο Q3 στο δεύτερο στάδιο ανάλυσης επιτρέπει μόνο σε θυγατρικά ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z , να εξέλθουν προς τον ανιχνευτή. Το φάσμα μάζας που προκύπτει, δείχνει τα πρόδρομα ιόντα που διασπάστηκαν για την παραγωγή του επιλεγμένου θυγατρικού ιόντος. Ο τύπος αυτός σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σχετικές με τη δομή και τη θραυσματοποίηση μιας ένωσης.

4.5.3.3 Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου

Τα τετράπολα Q1 και Q3 σαρώνουν με καθορισμένη διαφορά μάζας $(m/z)_{Q1} > (m/z)_{Q3}$. Ανιχνεύονται μόνο τα ιόντα τα οποία χάνουν αυτήν τη συγκεκριμένη μάζα στο θάλαμο θραυσματοποίησης. Το πείραμα σάρωσης για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (Constant Neutral Loss Scan, CNL) παρέχει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν παραγόμενα ιόντα με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά, τα οποία προέρχονται από μια κατηγορία ενώσεων και χρησιμοποιείται για αναλύσεις συγγενών ενώσεων.

4.5.3.4 Επιλεκτική παρακολούθηση θραυσματοποίησης ιόντων

Σε αυτή την περίπτωση παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ιόντος ή μια ομάδα αντιδράσεων θραυσματοποίησης. Όταν επιλέγεται μια μόνο αντίδραση θραυσματοποίησης (ένα πρόδρομο ιόν προς ένα παραγόμενο ιόν), η μέθοδος ονομάζεται «επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων» (Single Reaction Monitoring, SRM) και παρέχει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, εξαιτίας της μείωσης του χημικού θορύβου. Όταν επιλέγονται δύο ή περισσότερα χαρακτηριστικά θραύσματα, η τεχνική ονομάζεται «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Επιτυγχάνεται γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα, καθώς μια ένωση θα παρεμποδίσει τη μέτρηση μόνο σε περίπτωση που σχηματίσει μητρικό ιόν του ίδιου λόγου m/z με την ένωση-στόχο και τα ίδια θυγατρικά ιόντα κατά τη διάσπασή της. Το υπόβαθρο θορύβου είναι χαμηλό, άρα ένα συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε πολύ υψηλότερο λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N), αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου.

4.5.3.5 Τεχνική σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα (data dependent)

Ο όρος “data dependent” (ddMS) χρησιμοποιείται από την εταιρεία Thermo Fisher. Με την τεχνική αυτή, η ανάλυση περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο συμβάντα σάρωσης (scan events), εκ των οποίων το δεύτερο είναι η εξαρτώμενη σάρωση. Η εξαρτώμενη σάρωση χρησιμοποιεί ένα “ιόν –στόχο” από μια προηγούμενη σάρωση, για αυτό και το πρώτο συμβάν μπορεί να είναι, είτε Full Scan, ή SIM ή SRM [196].

Κατά τη ρύθμιση των παραμέτρων της τεχνικής ddMS, για το συμβάν της εξαρτώμενης σάρωσης ορίζονται κριτήρια για ένα ή περισσότερα ιόντα ενδιαφέροντος τα οποία περιλαμβάνονται στο προηγούμενο συμβάν σάρωσης. Ο καθορισμός των παραμέτρων

των πειραμάτων της εξαρτώμενης από τα δεδομένα σάρωσης, μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους [196]:

α. Αν το πρόδρομο ιόν είναι γνωστό ή αναμένεται μια συγκεκριμένη ομάδα πρόδρομων ιόντων, μπορεί να εισαχθεί από το χρήστη στο λογισμικό ένας κατάλογος πιθανών πρόδρομων ιόντων. Έτσι, η ανίχνευση κάποιου από αυτά τα πρόδρομα ιόντα στο πρώτο συμβάν σάρωσης ενεργοποιεί αυτόματα τη λήψη φάσματος των προϊόντων ιόντων. Παράλληλα, αν αυτό κρίνεται σκόπιμο, μπορεί, να οριστεί ένας κατάλογος με μη επιθυμητά ιόντα προς θραυσματοποίηση.

β. Αν δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για τη μελετώμενη ένωση, ορίζονται οι παράμετροι του συμβάντος της εξαρτώμενης σάρωσης έτσι, ώστε όταν ανιχνευθεί ιόν με ένταση σήματος πάνω από ένα καθορισμένο «κατώφλι» (threshold), να ενεργοποιηθεί αυτόματα η λήψη του φάσματος προϊόντων ιόντων. Το κατώφλι αυτό συνήθως αναφέρεται στο ιόν που εμφανίζει τη μεγαλύτερη ένταση (most intense ion). Από τα φάσματα των προϊόντων μπορεί να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για το πρόδρομο ιόν.

B. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΕ ΣΥΖΕΥΞΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

4.6 Υγρή χρωματογραφία

Ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυόμενων οργανικών μικρορύπων που προηγουμένως έχουν απομονωθεί από ένα υπόστρωμα, επιτυγχάνεται συνήθως με τεχνικές υγρής ή αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών, όπως ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD), οι θερμοϊοντικοί ανιχνευτές φλόγας (flame thermionic detector, FTD), οι ανιχνευτές αζώτου-φωσφόρου (nitrogen-phosphorus detector, NPD), ο φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής (flame photometric detector, FPD), οι ανιχνευτές ατομικής εκπομπής (atomic emission detector, AED), ο ανιχνευτής ηλεκτρολυτικής αγωγιμότητας (electrolytic conductivity) και ο ανιχνευτής μάζας (mass spectrometry, MS). Η χρήση χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας με τη μέθοδο χημικού ιοντισμού (chemical ionization, CI) ή ιοντισμού ηλεκτρονίων (electron impact, EI) αποτελεί μια σημαντική αναλυτική τεχνική που κυριαρχεί τα τελευταία χρόνια στις περιβαλλοντικές αναλύσεις.

Η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC) είναι η πλέον διαδεδομένη τεχνική διαχωρισμού, με ετήσιες πωλήσεις σε όργανα που είναι της τάξης των δισεκατομμυρίων δολαρίων. Η ευρεία αποδοχή της οφείλεται στην υψηλή της ευαισθησία,

στην εύκολη προσαρμογή σε ποσοτικούς προσδιορισμούς και κυρίως στην καταλληλότητα της για τον άμεσο προσδιορισμό θερμικά ασταθών και χαμηλής πτητικότητας ενώσεων που απαιτούν παραγωγοποίηση προκειμένου να προσδιοριστούν με αέρια χρωματογραφία.

Η χρησιμοποιούμενη κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση είναι στερεή ή υγρή, ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. Κατά το διαχωρισμό, κάθε ένωση κατανέμεται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης και παράλληλα μετακινείται προς την έξοδο της στήλης, εξαιτίας της ροής του διαλύτη, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια μετακινούμενη ζώνη μέσα στη στήλη, η οποία τελικά αποδίδεται ως μια κορυφή στο χρωματογράφημα. Η ποσοτικοποίηση γίνεται βάσει του εμβαδού της επιφάνειας ή του ύψους της κορυφής, μεγέθη που είναι ανάλογα με τη συγκέντρωση ή την ποσότητα της προς ανάλυση ένωσης.

Ο διαχωρισμός ενός μείγματος ενώσεων βασίζεται στη διαφορετική αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με την κινητή και τη στατική φάση, με συνέπεια να απαιτείται διαφορετικός χρόνος για την έκλουση κάθε ένωσης από τη στήλη. Η αλληλεπίδραση αυτή σχετίζεται με το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα. Υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας, τα οποία ταξινομούνται ανάλογα με την κατηγορία των ενώσεων που διαχωρίζουν και το μηχανισμό αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και τις δύο φάσεις. Τα κυριότερα είδη χρωματογραφίας και το πεδίο εφαρμογών τους είναι τα ακόλουθα:

- Χρωματογραφία προσρόφησης, για το διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων
- Χρωματογραφία κατανομής, για το διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ενώσεων
- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής για το διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων
- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, για το διαχωρισμό ενώσεων με μοριακή μάζα μεγαλύτερη από 10000.

Στην υγρή χρωματογραφία μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλοί ανιχνευτές, όπως ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) σε ένα ή πολλαπλά μήκη κύματος, ο ανιχνευτής ηλεκτρικής αγωγιμότητας, ο ανιχνευτής φθορισμού και ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης, ο ανιχνευτής υπεριώδους συστοιχίας διόδων (UV-diode array detector, UV-DAD) κ.ά. Η πιο πρόσφατα εξελιγμένη τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού στην ανάλυση των υπολειμμάτων οργανικών μικρορύπων είναι ο συνδυασμός των τεχνικών υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Η τεχνική συνδυάζει την εγκυρότητα της ταυτοποίησης των υπολειμμάτων που προσδίδει η φασματομετρία μάζας και την ευελιξία του διαχωρισμού πλήθους ενώσεων που παρέχει η υγρή χρωματογραφία.

4.6.1 Υγρή χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης

Σήμερα, ο συχνότερα και ευρύτερα χρησιμοποιούμενος τύπος υγρής χρωματογραφίας είναι η υγρή χρωματογραφία κατανομής. Με βάση τη σχετική πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης, διακρίνονται δύο υποκατηγορίες για την υγρή χρωματογραφία κατανομής:

(α) Υγρή χρωματογραφία κατανομής κανονικής φάσης, όπου χρησιμοποιείται στατική φάση υψηλής πολικότητας και ως κινητή φάση ένας σχετικά άπολος διαλύτης.

(β) Υγρή χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης, όπου η στατική φάση είναι μη πολική και η κινητή είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης.

Στην περίπτωση της αντίστροφης φάσης, η στατική φάση αποτελείται συνήθως από αλυσίδες υδρογονανθράκων χημικά συνδεδεμένων πάνω σε υλικό πλήρωσης από σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου. Το πλέγμα του διοξειδίου του πυριτίου αποτελείται από άτομα πυριτίου τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με γέφυρες οξυγόνου και στην επιφάνεια του πλέγματος υπάρχουν ελεύθερες σιλανολικές ομάδες (-SiOH). Η κινητή φάση συνήθως αποτελείται από πολικούς διαλύτες, κυρίως μείγματα νερού ή ρυθμιστικών υδατικών διαλυμάτων, με διάφορους οργανικούς διαλύτες αναμίξιμους με το νερό όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και πιο σπάνια διμεθυλοφορμαμίδιο, διοξάνιο και τετραϋδροφουράνιο.

4.6.2 Αποδοτικότητα συστημάτων υγρής χρωματογραφίας

Η αποδοτικότητα ενός χρωματογραφικού συστήματος μπορεί να περιγραφεί από διάφορα ποσοτικά μεγέθη, όπως ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, το ύψος της θεωρητικής πλάκας, η διαχωριστική ικανότητα της στήλης, ο παράγοντας ασυμμετρίας κ.ά. Παρακάτω δίνονται οι εξισώσεις που περιγράφουν τα μεγέθη αυτά (Εξ. 4.6 και 4.7).

1. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (N) και ύψος θεωρητικής πλάκας (H), τα οποία δίνονται από τις Εξισώσεις 4.6 και 4.7 αντίστοιχα:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4.6)$$

$$N = \left(\frac{L}{H} \right) \quad (4.7)$$

Όπου: t_R ο χρόνος κατακράτησης της ένωσης, W το εύρος της κορυφής της και L το μήκος του πληρωμένου τμήματος της στήλης. Τα μεγέθη N και H εκφράζουν την αποδοτικότητα της

στήλης που σχετίζεται με τη διεύρυνση των κορυφών. Η αποδοτικότητα είναι ανάλογη του N και αντιστρόφως ανάλογη του H [200].

2. Η διαχωριστική ικανότητα της στήλης (R_s) αποτελεί ποσοτικό μέτρο της ικανότητάς της να διαχωρίζει δύο προσδιοριζόμενες ουσίες και δίνεται από την Εξίσωση 4.8:

$$R_s = \frac{2[(t_R)_A - (t_R)_B]}{W_A + W_B} \quad (4.8)$$

Όπου: t_{RA} , t_{RB} οι χρόνοι κατακράτησης των δύο ενώσεων και W_A , W_B τα εύρη των κορυφών τους. Δύο ενώσεις διαχωρίζονται πλήρως όταν το R_s είναι $\geq 1,5$ [200].

3. Η ασυμμετρία ή παράγοντας ασυμμετρίας (A_f) των χρωματογραφικών κορυφών δίνεται από την Εξίσωση 4.9:

$$A_f \text{ ή } S_{10} = \frac{a}{b} \quad (4.9)$$

Όπου: a και b τα εύρη της κορυφής εκατέρωθεν του κεντρικού άξονα, στο 1/10 του ύψους της κορυφής. Η τιμή της παραμέτρου S_{10} (ή A_f) πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,8 και 1,2 [200].

4.6.3 Αναλυτικές στήλες

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι κυρίως ανεστραμμένης φάσης (π.χ. C18 ή C8, κύανο-, άμινο-). Η επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής στήλης είναι ιδιαίτερα κρίσιμη και καθορίζεται από: (α) το μέγεθος των μορίων του υλικού πληρώσεως και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης, (β) τη φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, η οποία καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης, (γ) τη διάμετρο των πόρων του υλικού πληρώσεως, (δ) τον τύπο του υποστρώματος ο οποίος πρέπει να είναι χημικά αδρανής και (ε) την περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους, τόσο πιο πολική (όξινη) είναι η στήλη και τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων.

Οι αναλυτικές στήλες ταξινομούνται επίσης με βάση την εσωτερική διάμετρο και κατατάσσονται στις συμβατικές στήλες, τις στήλες στενού διαμετρήματος (narrow bore), και τις τριχοειδείς στήλες (Πίνακας 4.5). Οι δύο πρώτες κατηγορίες ήταν για πολλά χρόνια οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν με τις τυπικές αντλίες

HPLC σε ροές συμβατές με τις πηγές ψεκασμού ιόντων (ion spray), αποτρέποντας το διαμοιρασμό της ροής της κινητής φάσης. Ωστόσο, η χρήση τριχοειδών στηλών αυξάνεται σταδιακά λόγω των χαμηλών τιμών ταχυτήτων ροής στο ESI.

Πίνακας 4. 5 Κατηγοριοποίηση αναλυτικών στηλών ανάλογα με την εσωτερική τους διάμετρο [192]

Στήλες	Διάμετρος	Ταχύτητα ροής
Συμβατικές στήλες		
Μεγάλου διαμετρήματος (wide-bore)	>4,6 mm	>3 mL min ⁻¹
Κανονικού διαμετρήματος (normal-bore)	3–4,6 mm	0.5–3 mL min ⁻¹
Στήλες στενού διαμετρήματος (narrow-bore)		
Τριχοειδείς		
Microbore	0,15–0,8 mm	2–20 µL min ⁻¹
Nanobore	20 µm	0,1–1 µL min ⁻¹

4.7 Σύζευξη υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας

Η ικανότητα της υγρής χρωματογραφίας να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος και η ικανότητα της φασματομετρίας μάζας να τα ταυτοποιεί συνδυάζονται με αποτέλεσμα τη σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας (LC–MS).

Η χρήση ανιχνευτών απορρόφησης και φθορισμού επιτρέπει το διαχωρισμό με κριτήριο τη σύγκριση των χρόνων κατακράτησης των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε ένα δείγμα με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης σε ένα πρότυπο διάλυμα, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Ωστόσο, ο τεράστιος αριθμός χημικών ενώσεων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως προς την ανίχνευση τους, έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη μεγάλου αριθμού ενώσεων με παρόμοιους χρόνους κατακράτησης. Συνεπώς, η ταυτοποίηση ενώσεων με βεβαιότητα είναι αδύνατη. Επίσης, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας σε πολύπλοκα υποστρώματα, η αδυναμία πλήρους διαχωρισμού όλων των συστατικών που εκφράζεται με την αλληλοεπικάλυψη χρωματογραφικών κορυφών είναι πιθανή, με αποτέλεσμα ο ποσοτικός προσδιορισμός να είναι περιορισμένης αξιοπιστίας, ή σε μερικές περιπτώσεις ανέφικτος.

Από την άλλη, η φασματομετρία μάζας έχει την ικανότητα ταυτοποίησης ενώσεων με αξιοπιστία, καθώς τα φάσματα μάζας είναι μοναδικά για πολλές ενώσεις. Παρόλα αυτά, αν δεν προηγηθεί διαχωρισμός μιας προσδιοριζόμενης ένωσης που αποτελεί συστατικό ενός

μείγματος πριν την εισαγωγή της στο φασματόμετρο μάζας, το φάσμα θα περιέχει και τα ιόντα των υπόλοιπων συστατικών, δυσχεραίνοντας την ταυτοποίηση. Ειδικά στις περιπτώσεις όπου οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις των προς προσδιορισμό ενώσεων είναι πολύ χαμηλές ή ίχνη, τότε ο προσδιορισμός είναι αδύνατος.

Επομένως, η σύζευξη των δύο τεχνικών επιτρέπει την εισαγωγή διαχωρισμένων ουσιών μείγματος στο φασματόμετρο μάζας, παρέχοντας αξιόπιστη ταυτοποίηση, ακόμα και εάν ο διαχωρισμός δεν είναι πλήρης καθώς ενώσεις με διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μάζας. Επίσης, η ακρίβεια που προσφέρουν τα χρωματογραφήματα από την παρακολούθηση ενός χαρακτηριστικού ιόντος (SIM) ή μεταπτώσεων (SRM και MRM) όταν χρησιμοποιείται MS/MS, παρέχει ακόμα μεγαλύτερη ακρίβεια για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

4.7.1 Απόκριση συστημάτων LC–MS

Σε αυτή την παράγραφο δίνονται οι εξισώσεις που περιγράφουν την απόκριση ενός συστήματος LC–MS. Για ένα φασματόμετρο μάζας του οποίου ο ανιχνευτής αποκρίνεται στη ροή μάζας, είναι προφανές πως το παραγόμενο αναλυτικό σήμα θα είναι ανάλογο του συνολικού αριθμού ιόντων που ανιχνεύονται στη μονάδα του χρόνου. Η απόκριση ενός ανιχνευτή (R) εκφράζεται με την Εξίσωση 4.10 [191]:

$$R = \alpha C_{max} F S \quad (4.10)$$

Όπου: F η ροή, S : ο λόγος διαμοιρασμού της ροής μάζας και C_{max} η μέγιστη συγκέντρωση δείγματος στο έκλουσμα της στήλης (μέγιστο ύψος της χρωματογραφικής κορυφής).

Η μέγιστη συγκέντρωση δείγματος C_{max} εκφράζεται από την Εξίσωση 4.11 [191]:

$$C_{max} = \frac{m N^{1/2}}{(2\pi)^{1/2} V_0 (1 + k)} \quad (4.11)$$

Όπου: m η ποσότητα του δείγματος που εισάγεται στη στήλη, N η αποδοτικότητα της στήλης, k ο παράγοντας κατακράτησης και V_0 ο νεκρός όγκος της στήλης ο οποίος εξαρτάται από το μήκος της (L) και την εσωτερική της διάμετρο (d).

Σύμφωνα με τις παραπάνω εξισώσεις είναι προφανές ότι οι ανιχνευτές που αποκρίνονται στη ροή μάζας, θα έχουν αυξημένα ύψη κορυφής με αύξηση της ταχύτητας

ροής. Ταυτόχρονα όμως, θα μειώνεται το εύρος της, επομένως το εμβαδό θα παραμένει σταθερό. Στην περίπτωση που πρόκειται για ανιχνευτές που αποκρίνονται στη συγκέντρωση και όχι στη ροή μάζας, τότε το σήμα θα είναι ανάλογο μόνο της C_{max} :

$$R = \alpha C_{max} \quad (4.12)$$

Επομένως, η αύξηση της ταχύτητας ροής δεν θα επηρεάσει το ύψος κορυφής το οποίο θα παραμένει σταθερό, αλλά το εύρος της κορυφής θα μειώνεται, και ως επακόλουθο θα μειώνεται και το εμβαδό της.

4.7.2 Σύζευξη LC–ESI

Η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με πηγή ESI απαιτεί είτε διαμοιραστές ροής μετά τη στήλη είτε τριχοειδείς στήλες τηγμένης πυριτίας, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι συνήθεις τιμές ροής. Επίσης, κάποιοι από τους κοινώς χρησιμοποιούμενους διαλύτες υγρής χρωματογραφίας εμφανίζουν υψηλή αγωγιμότητα ή επιφανειακή τάση, δυσχεραίνοντας περισσότερο τη σύζευξη. Για να υπερκεραστούν αυτά τα εμπόδια προς μια αποτελεσματική σύζευξη του LC με το ESI χρησιμοποιούνται σύγχρονες υποβοηθούμενες ενδιάμεσες πηγές ESI, με την εσωτερική διάμετρο του ακροφυσίου του τριχοειδούς ηλεκτροψεκασμού να κυμαίνεται μεταξύ μερικών δεκάδων μm [190]. Η χρήση τους επιτρέπει την εφαρμογή ροών στο LC μέχρι και 2 mL min^{-1} , με πνευματικά υποβοηθούμενη εκνέφωση (Ionspray, ISP) προαιρετικά σε συνδυασμό με θερμαινόμενη πηγή εισόδου.

Για την πραγματοποίηση της υποβοηθούμενης εκνέφωσης παρέχεται ομοαξονικά στη ροή της κινητής φάσης αέριο (Σχήμα 4.2), προάγοντας τη δημιουργία των σταγόνων από την κύρια μάζα του υγρού και επιτρέποντας την εφαρμογή ροής περίπου $200 \mu\text{L min}^{-1}$. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται θερμαινόμενη πηγή εισόδου, ένα θερμαινόμενο τριχοειδές είναι τοποθετημένο στη σειρά, μετά το ακροφύσιο του ηλεκτροψεκασμού ώστε να μπορούν οι παραγόμενες σταγόνες να εισχωρήσουν σε αυτό οδεύοντας προς τους φακούς εστίασης και το φασματόμετρο μάζας. Για την αποδιαλύτωση των σταγόνων, κάποιες φορές χρησιμοποιείται επιπλέον και ξηραντικό αέριο N_2 , το οποίο παρέχεται ομοαξονικά με τη ροή της κινητής φάσης, πιο μακριά όμως από το εκνεφωτικό αέριο.

4.7.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ευαισθησία του LC-ESI-MS

4.7.2 1 Κινητή φάση

Στην υγρή χρωματογραφία, ο ιοντισμός λαμβάνει χώρα απευθείας στην κινητή φάση. Επομένως, η σύνθεσή της επηρεάζει άμεσα και σημαντικά την παραγωγή των ιόντων. Παρακάτω περιγράφονται οι παράμετροι που σχετίζονται με την κινητή φάση και επιδέχονται μελέτη.

Φύση και συγκέντρωση οργανικού διαλύτη

Οι δυο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι διαλύτες στην υγρή χρωματογραφία είναι η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Για αυτό, η επίδρασή τους στο αναλυτικό σήμα, ιδιαιτέρως των μικρών μορίων, έχει μελετηθεί για διαφορετικές κατηγορίες ενώσεων, και ποικίλλει ανάλογα με τη φύση του αναλύτη. Σε πειράματα με τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα παρατηρήθηκε πως ο ιοντισμός ενισχύεται με το ακετονιτρίλιο και καταστέλλεται με τη μεθανόλη. Αντιθέτως, σε πειράματα με αλκυλοβενζοϊκούς εστέρες παρατηρήθηκε καταστολή του σήματος παρουσία ακετονιτρίλιου και ενίσχυση του σήματος παρουσία μεθανόλης. Η διαφορά αυτή σχετίστηκε με την επιδιалύτωση του ιόντος και τη διαφορά της φύσης των δύο διαλυτών, ως προς τον πρωτικό χαρακτήρα της μεθανόλης και τον απρωτικό χαρακτήρα του ακετονιτρίλιου [192].

Στις συμβατικές πηγές ESI, η αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση βελτιώνει την απόδοση του ηλεκτροψεκασμού λόγω της χαμηλότερης επιφανειακής τάσης του [191]. Έτσι, η αύξηση του ποσοστού του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση διευκολύνει μετρήσεις με έγχυση δείγματος σε ροή ή μετρήσεις με άμεση έγχυση στην πηγή ιοντισμού. Ωστόσο, όταν πριν την εισαγωγή του δείγματος στην πηγή εφαρμόζεται διαχωρισμός με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η χρήση ποσοστών οργανικού διαλύτη πιθανώς διαταράσσει το χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η αντικατάσταση των στατικών φάσεων C18 από πιο υδρόφοβες (π.χ. πενταφθοροφαινυλοπροπύλιο, PFP, συνδεδεμένο πάνω σε υπόστρωμα διοξειδίου του πυριτίου) μπορεί εν μέρει να δώσει λύσει, καθώς οι στήλες αυτές επιτρέπουν τη χρήση υψηλότερων ποσοστών οργανικού διαλύτη [192]. Όταν χρησιμοποιούνται χαμηλές ταχύτητες ροής, υψηλότερα ποσοστά ύδατος βελτιώνουν το σήμα χωρίς να ενέχεται κίνδυνος για το σύστημα. Ενδεχομένως αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι πολύ μικρές σταγόνες νερού δεν εξατμίζονται γρήγορα, άρα αποτρέπεται η έκθεση του αναλύτη σε πιθανή θερμική διάσπαση μέσα στο θερμαινόμενο ξηραντικό αέριο [190].

Ρυθμιστικά διαλύματα

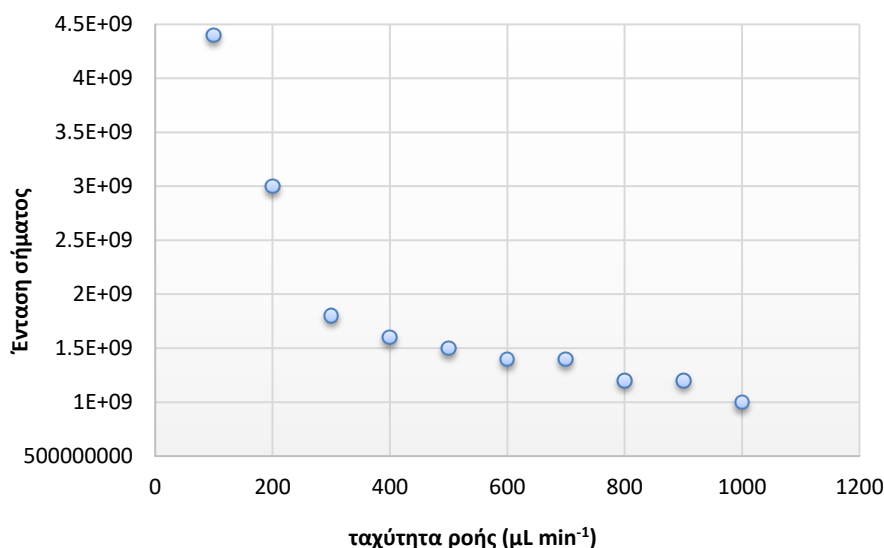
Η συγκέντρωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων επηρεάζει την ικανότητα ιοντισμού. Ωστόσο, όταν τα ρυθμιστικά διαλύματα είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις ($>10^{-3}M$), η σχέση μεταξύ απόκρισης ανιχνευτή και συγκέντρωσης επηρεάζεται και πολλές φορές παύει να είναι γραμμική [190]. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων, τόσο μικρότερες είναι οι σχηματιζόμενες σταγόνες. Επίσης, εφόσον τα ιόντα σχηματίζονται αρχικά στην υγρή φάση, τα ρυθμιστικά διαλύματα ενισχύουν την πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Πρακτικά, για τον επαρκή ιοντισμό μιας βασικής ένωσης, θα πρέπει να προστεθεί στην κινητή φάση ένας πρωτονιοδότης, (π.χ. μυρμηκικό ή οξικό οξύ) ώστε το pH να ρυθμιστεί περίπου 2 μονάδες κάτω από την pK_a του συζυγούς οξέος της ένωσης. Αντίστοιχα, για τον επαρκή ιοντισμό μιας όξινης ένωσης, θα πρέπει να προστεθεί στην κινητή φάση ένας πρωτονιοδέκτης, (π.χ. υδροξείδιο του αμμωνίου) ώστε το pH να ρυθμιστεί περίπου 2 μονάδες πάνω από την pK_a της ένωσης. Για την αποφυγή επιβάρυνσης διαφόρων εξαρτημάτων, κυρίως των δακτυλιοειδών φακών εστίασης, συστήνεται η αποφυγή μη πτητικών διαλυμάτων [196].

Επιφανειακή τάση και ιξώδες

Η δημιουργία αέριων ιόντων ενισχύεται με τον αρχικό σχηματισμό μικρών σταγόνων. Δεν είναι επιθυμητό η κινητή φάση να είναι υψηλής επιφανειακής τάσης, όπως για παράδειγμα το καθαρό νερό [115]. Το ιξώδες της κινητής φάσης φαίνεται να είναι ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει τον ιοντισμό. Η κινητικότητα του διαλυμένου ιόντος της προσδιοριζόμενης ένωσης, η οποία καθορίζεται από το ιξώδες της κινητής φάσης ελέγχει το διαχωρισμό στις παραγόμενες σταγόνες του ESI. Συνεπώς, διαλύτες με υψηλό ιξώδες εμποδίζουν το διαχωρισμό φορτίων και ευνοούν τη δημιουργία ζεύγους ιόντων μέσα στα σταγονίδια εξαιτίας της μειωμένης κινητικότητας [192].

Ταχύτητα ροής κινητής φάσης

Η ταχύτητα ροής επηρεάζει την απόκριση του φασματομέτρου μάζας. Ο βαθμός επίδρασής της όμως εξαρτάται από τον τύπο της χρησιμοποιούμενης πηγής ESI και συνεπώς από αντίστοιχης κλίμακας ροή. Επί παραδειγματι, σε μια πηγή micro-ESI εφαρμόζονται χαμηλές ροές, ενώ σε μια πνευματικά υποβοηθούμενη πηγή, υψηλές. Πρακτικά, όταν εφαρμόζεται ροή της τάξης των $\mu L \min^{-1}$ σε μια απλή πηγή ESI, το λαμβανόμενο σήμα και η ταχύτητα ροής έχουν αντίστροφη εξάρτηση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.10.



Σχήμα 4.10 Επίδραση της ταχύτητας ροής για εξεταζόμενο εύρος τιμών 100–1000 $\mu\text{L min}^{-1}$ στο αναλυτικό σήμα (Αναπροσαρμογή από Gallagher et. al 2003 [201])

Από το παραπάνω σχήμα φαίνεται ο ρυθμός μείωσης του αναλυτικού σήματος (άρα και του εμβαδού κορυφής) ανάλογα με την ταχύτητα ροής, σε όλο το εξεταζόμενο εύρος ροών. Από τα 100 στα 1000 $\mu\text{L min}^{-1}$ παρατηρείται μείωση του σήματος κατά περίπου μια τάξη μεγέθους. Συμπεραίνεται έτσι πως η διάταξη ESI–MS αποκρίνεται στη συγκέντρωση και όχι στη ροή μάζας.

4.7.2.2 Διάμετρος αναλυτικής στήλης

Το παραγόμενο αναλυτικό σήμα είναι ανάλογο του συνολικού αριθμού ανιχνευόμενων ιόντων ανά μονάδα χρόνου, καθώς το φασματόμετρο μάζας είναι ανιχνευτής που αποκρίνεται στη ροή μάζας. Επίσης, όπως περιγράφηκε στην Εξίσωση 4.6, η μέγιστη συγκέντρωση του δείγματος εξαρτάται από το νεκρό όγκο της στήλης, συνεπώς από την εσωτερική της διάμετρο. Έτσι, μείωση στη διάμετρο της στήλης επιφέρει οξύτερες και μεγαλύτερου ύψους χρωματογραφικές κορυφές, άρα υψηλότερη μέγιστη συγκέντρωση δείγματος στον ανιχνευτή. Παρόλα αυτά, οι αναλυτικές στήλες μικρότερης διαμέτρου απαιτούν και την εφαρμογή χαμηλότερων ταχυτήτων ροής, που συνεπάγονται μείωση της απόκρισης του ανιχνευτή. Άρα, όταν πρόκειται για υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με χρωματογραφία μάζας, η χρήση στηλών μικρότερης διαμέτρου και η μείωση της ταχύτητας ροής δρουν ανταγωνιστικά ως προς την ευαισθησία του οργάνου.

4.7.2.3 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά πηγής ESI

Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της πηγής ESI, όπως η θέση του ακροφυσίου ψεκασμού σε σχέση με την οπή δειγματοληψίας όπως και η εσωτερική και εξωτερική του διάμετρος, επηρεάζουν επίσης την απόδοση του ιοντισμού και τη δειγματοληψία των ιόντων.

Το ακροφύσιο ηλεκτροψεκασμού (probe) είναι ουσιαστικά ο διαμοιραστής της ροής μάζας, καθώς μόνο ένα μέρος του αερολύματος των πολλαπλά φορτισμένων σταγόνων ιόντων θα εισέλθει στην οπή δειγματοληψίας που είναι η είσοδος για το φασματόμετρο μάζας και από εκεί θα μεταφερθεί στο εσωτερικό τριχοειδές μεταφοράς ιόντων και τελικά στον ανιχνευτή, υπό τη μορφή αέριων ιόντων. Ο ηλεκτροψεκασμός μικρών αερολυμάτων κάθε φορά, φαίνεται να αυξάνει την απόδοση της δειγματοληψίας [201]. Όταν τα τριχοειδή χαμηλής ροής τοποθετούνται κοντά στην οπή, τότε μεγαλύτερο μέρος του ψεκαζόμενου αερολύματος που εξέρχεται από το τριχοειδές ESI θα εστιάζεται προς τον αναλυτή μάζας. Εναλλακτικά, για την αύξηση του αριθμού των ιόντων που εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας είναι η χρήση εσωτερικών τριχοειδών μεταφοράς ιόντων και αποκορυφωτών με μεγαλύτερη διάμετρο εισόδου.

4.7.2.4 Φύση προσδιοριζόμενης ουσίας–Επίδραση υποστρώματος

Η πηγή ESI είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό ενώσεων που μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες: (α) ιοντικές, εγγενώς φορτισμένες σε διάλυμα, (β) ουδέτερες/πολικές ενώσεις που μπορούν να πρωτονιωθούν ή να αποπρωτονιωθούν στο διάλυμα ανάλογα με το pH και (γ) στις μη πολικές ενώσεις που μπορούν να οξειδωθούν ή να αναχθούν στο ακροφύσιο του τριχοειδούς του ESI [202].

Η ευαισθησία του ESI ως προς την προσδιοριζόμενη ένωση εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες όχι μόνο της ίδιας της ένωσης αλλά και των υπόλοιπων συστατικών του εισερχόμενου διαλύματος. Τα συστατικά αυτά μπορούν είτε να είναι ενδογενή στο υπόστρωμα (μήτρα) του δείγματος είτε να προέρχονται από τους διαλύτες που υπεισέρχονται στην αναλυτική πορεία. Έτσι, η απόδοση του ιοντισμού της προσδιοριζόμενης ένωσης είναι εξαρτώμενη και από τη συγκέντρωση των υπόλοιπων συστατικών καθώς και από την ικανότητά τους να μεταβούν στην αέρια φάση [202].

Η επιφανειοδραστικότητα μιας ένωσης επηρεάζει σημαντικά την απόκριση του ESI, καθώς καθορίζει την τάση της να φτάσει στην επόμενη σειρά σταγόνων κατά τη διάρκεια των διαδοχικών σχάσεων των σχηματιζόμενων σταγόνων, συνθήκη αναγκαία για την απελευθέρωσή της στην αέρια φάση. Η ερμηνεία του φαινομένου έγκειται στο γεγονός ότι

στον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό η εκρόφηση των αέριων ιόντων πραγματοποιείται από την επιφάνεια των σταγόνων, άρα η ευαισθησία της τεχνικής είναι μεγαλύτερη για ενώσεις με μεγαλύτερη συγκέντρωση στην επιφάνεια (π.χ. πιο λιπόφιλες ενώσεις). Αντίθετα, οι πιο υδρόφιλες ενώσεις είναι πιο διαλυτές στην κύρια μάζα της σταγόνας. Πρακτικά, κατά την ανάλυση μειγμάτων ενώσεων, οι ενώσεις που είναι πάνω στην επιφάνεια των σταγονιδίων μπορεί ακόμα και να επικαλύψουν τελείως τις ενώσεις που είναι πιο διαλυτές στην κύρια μάζα της σταγόνας [191].

Κατά την ανάλυση δειγμάτων όπου οι αναλύτες παρουσιάζουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, παρατηρείται συχνά μείωση του σήματος (φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος). Αυτή η μείωση του σήματος, είναι πολύ μικρή στις χαμηλές ροές και αυξάνει στις μεγαλύτερες ($> 50 \text{ nL min}^{-1}$). Ωστόσο, στις σύγχρονες πηγές ESI που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία εφαρμόζονται πολύ μεγαλύτερες ταχύτητες ροής. Για την αντιμετώπιση του φαινομένου έχουν προταθεί και υιοθετηθεί διάφορα μέσα όπως: (α) χρήση ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων [203] (β) προσθήκη τροποποιητών στην κινητή φάση και (γ) μέθοδος σταθερής προθήκης [204].

4.7.2.5 Συγκέντρωση προσδιοριζόμενης ένωσης

Η απόκριση του ESI δεν είναι πάντα γραμμική ως προς τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ένωση για όλα τα επίπεδα. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η γραμμική σχέση για το σήμα m/z ως προς τη συγκέντρωση για έναν ιοντικό αναλύτη ισχύει για διαλύματα συγκέντρωσης $10^{-9} - 10^{-5} \text{ M}$. Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ($10^{-5} - 10^{-4} \text{ M}$) το σήμα αυξάνεται, προσεγγιστικά, με την τετραγωνική ρίζα της συγκέντρωσης, ενώ σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επέρχεται κορεσμός, το σήμα αρχίζει να μειώνεται και τελικά η ευαισθησία μειώνεται δραστικά [195]. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην αύξηση του μεγέθους της σταγόνας λόγω αύξησης της συγκέντρωσης σχετική μείωση στην παραγωγή αέριων ιόντων από σταγόνες που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση ηλεκτρολύτη [192].

B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρουσία φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον αποτελεί σημαντικό ζήτημα και καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον έλεγχο της υπολειμματικότητάς τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα. Τα τελευταία χρόνια, ο αριθμός των μελετών παγκοσμίως που πραγματοποιούνται την ανάπτυξη και την εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων για την εκτίμηση των επιπέδων συγκεντρώσεων και την τύχη τέτοιων ξеноβιοτικών ενώσεων στο περιβάλλον αυξάνεται συνεχώς. Στην πλειονότητά τους, οι μελέτες αυτές ασχολούνται με επιφανειακά και υπόγεια νερά, με νερά από τις εισόδους και εξόδους των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων και λιγότερο με έδαφος και ιζήματα, ενώ υπάρχει σημαντική έλλειψη δεδομένων για τα παράκτια και θαλάσσια οικοσυστήματα. Ειδικότερα στην χώρα μας, αυτές οι έρευνες είναι ελάχιστες και αποσπασματικές, ενώ δεν αναφέρονται σε περιοχές με έντονη ιχθυοτροφική δραστηριότητα, που αποτελεί σημαντική εν δυνάμει πηγή θαλάσσιας ρύπανσης.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και ανάγκες, αντικείμενο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση, η επικύρωση και η εφαρμογή αναλυτικών μεθοδολογιών με στόχο τον προσδιορισμό επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε νερά και ιζήματα από περιοχές της Ελλάδας και της Ευρώπης όπου υπάρχει ιχθυοτροφική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, οι στόχοι που τέθηκαν ήταν:

- (α)** η επιλογή των υπό έρευνα ενώσεων, οι οποίες είναι εν δυνάμει επικίνδυνες για το υδάτινο περιβάλλον και τον άνθρωπο
- (β)** η μελέτη και βελτιστοποίηση των κυριότερων συνθηκών στην υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης καθώς και των κρίσιμων παραμέτρων στη φασματομετρία μάζας με τον υβριδικό τροχιακό αναλυτή μάζας Orbitrap
- (γ)** η βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε ιζήματα
- (δ)** η βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου SPE για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε επιφανειακά νερά
- (ε)** η εφαρμογή των μεθόδων που αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν για τη μελέτη της υπολειμματικότητας των επιλεχθέντων ενώσεων και η εκτίμηση της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας τους (Environmental Risk Assessment, ERA)

Η εφαρμογή πραγματοποιήθηκε σε δείγματα νερών και ιζημάτων από τα ποτάμια υδάτινα σώματα των ποταμών Λούρου και Αράχθου, καθώς επίσης σε υδάτινα σώματα πλησίον υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα, την Αλβανία, την Ιταλία, την Ισπανία, την

Πορτογαλία, την τη Νορβηγία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Στη δεύτερη περίπτωση, ο έλεγχος της ρύπανσης πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού ερευνητικού έργου “Real-time monitoring of sea contaminants by an autonomous Lab-on-a-chip biosensor”, καλύπτοντας μεγάλο γεωγραφικό εύρος και παρέχοντας δεδομένα για πλήθος ενώσεων για τα οποία ως τώρα υπάρχουν μόνο αποσπασματικές μελέτες. Ειδικότερα στη χώρα μας, οι έρευνες με αντικείμενο τη συστηματική μελέτη των θαλάσσιων υδάτων είναι ελάχιστες και δεν αναφέρονται σε περιοχές με έντονη ιχθυοτροφική δραστηριότητα.

Οι σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι γρήγορες, εύκολες, φιλικές προς το περιβάλλον, έχουν σχετικά χαμηλό κόστος, αυξημένη ευαισθησία και καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα αναλυτών. Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό, χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής πίεσης (ultra-high pressure liquid chromatography, UHPLC) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (high-resolution-accurate-mass spectrometry, HRMS) και συγκεκριμένα με τον υβριδικό αναλυτή LTQ/Orbitrap MS. Η επικύρωση των μεθόδων πραγματοποιήθηκε με βάση την ισχύουσα νομοθεσία της ΕΕ, όπως αυτή ορίζεται στις οδηγίες 2002/657/ΕΚ και SANTE 11813/2017.

Συνολικά επιλέχθηκαν 43 ενώσεις (18 φυτοπροστατευτικές και 25 φαρμακευτικές) με βάση τη χρήση και την κατανάλωση τους, την αποδεδειγμένη παρουσία τους στο υδάτινο περιβάλλον σύμφωνα με πηγές από τη διεθνή βιβλιογραφία και την εν δυνάμει επικινδυνότητά τους για αυτό. Προερχόμενες από διάφορες χημικές ομάδες, οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν διαφορές στη δομή, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και στη συμπεριφορά τους στο περιβάλλον. Συμπεριλήφθηκαν, μεταξύ άλλων, «ρύποι προτεραιότητας» και ενώσεις από τον «κατάλογο επιτήρησης ουσιών» σύμφωνα με τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες 2013/39/ΕΕ και 2015/495/ΕΕ, αντίστοιχα.

Η παρούσα Διατριβή μπορεί να αποτελέσει μια πλήρη και εμπειριστατωμένη μελέτη σε θέματα που άπτονται ακόμα και στην πιο πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την περιβαλλοντική συμπεριφορά των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε επιλεγμένα ποτάμια και θαλάσσια οικοσυστήματα για την εκτίμηση της υποβάθμισης του υδάτινου περιβάλλοντος. Η αξιοποίηση των αποτελεσμάτων της Διατριβής μπορεί να συμβάλλει στην κατάδειξη της περιβαλλοντικής συμπεριφοράς των επιλεγμένων ενώσεων στα μελετώμενα συστήματα, με απώτερο στόχο τη συνολική αποτίμηση της υποβάθμισης του υδάτινου περιβάλλοντος σε ποτάμια και θαλάσσια νερά και ιζήματα και την αναβάθμιση του status quo του εν λόγω ερευνητικού αντικειμένου.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΜΕΛΕΤΗΣ

5.1 Επιλεγμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Η επιλογή των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα Διατριβή πραγματοποιήθηκε το έτος 2014. Η αναφορά του έτους είναι σημαντική για δύο λόγους: πρώτον, η έγκριση ή κατάργηση των εμπορικά διαθέσιμων σκευασμάτων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποια από τις επιλεγμένες ενώσεις είναι πιθανή και δεύτερον, η προτεραιοποίηση των οργανικών ρύπων, όπως π.χ. στη λίστα ρύπων προτεραιότητας της ΕΕ [205], στη λίστα παρακολούθησης (“watch list”) της ΕΕ [206] κ.ά. διαμορφώνεται ανάλογα με τα νέα δεδομένα και με την ανάπτυξη πιο ευαίσθητων μεθόδων, ικανών να ανιχνεύσουν υπολείμματα ενώσεων που έως τώρα δεν είχαν ταυτοποιηθεί.

Τα κριτήρια στα οποία βασίστηκε η επιλογή των φυτοπροστατευτικών ενώσεων ήταν ο βαθμός χρήσης τους και οι ανάγκες των γεωργικών δραστηριοτήτων στις περιοχές μελέτης, η δυνατότητα προσδιορισμού τους με χρήση υγρής χρωματογραφίας, καθώς και η ανεπάρκεια βιβλιογραφικών δεδομένων για την ανάλυση πολικών φυτοφαρμάκων με σύγχρονες μεθόδους εκχύλισης και χρωματογραφικής ανάλυσης. Σημειώνεται ότι μέχρι

πρότινος, οι περισσότερες έρευνες για την παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο περιβάλλον, συμπεριλάμβαναν κυρίως μη πολικά φυτοφάρμακα.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ενδελεχής έρευνα στα καταστήματα πώλησης φυτοφαρμάκων της ευρύτερης περιοχής της Ηπείρου για την καταγραφή των συχνότερα χρησιμοποιούμενων φυτοπροστατευτικών προϊόντων για γεωργική και αστική χρήση. Επιλέχθηκαν ενώσεις οι οποίες καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δράσης σε καλλιέργειες σε όλη την Ελλάδα και εν γένει στην Ευρώπη. Οι επιλεγμένες ενώσεις είναι στην πλειοψηφία τους εγκεκριμένες και είναι πιθανή η ανίχνευσή τους σε ίχνη σε επιφανειακά ύδατα. Παρόλα αυτά, συμπεριλήφθηκαν και ενώσεις οι οποίες δεν κατέχουν πλέον άδεια κυκλοφορίας στην Ελλάδα, καθώς συχνά αναφέρονται κρούσματα μη σύννομης και ορθής χρήσης τους. Ακόμη, καταγράφηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό διερεύνηση ενώσεων, ώστε η μέθοδος να καλύπτει ένα εύρος πολικότητας και οξεοβασικών ιδιοτήτων των ενώσεων. Τέλος, λήφθηκε υπόψιν η λίστα ρύπων προτεραιότητας της Ευρωπαϊκής Ένωσης αλλά και της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (US Environmental Protection Agency).

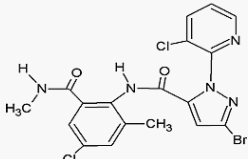
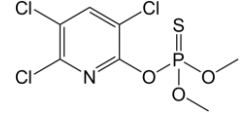
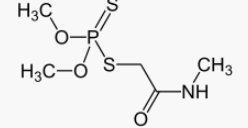
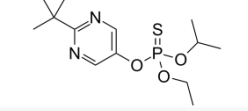
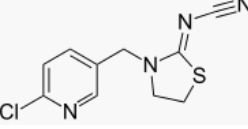
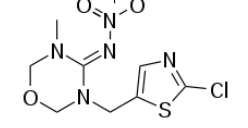
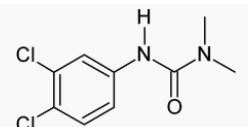
Στον Πίνακα 5.1 φαίνονται οι επιλεγμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι καλλιέργειες όπου χρησιμοποιούνται, ο αριθμός CAS, η χημική δομή και ο μοριακός τύπος τους καθώς και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες.

5.1.1 Επιλεγμένα εντομοκτόνα

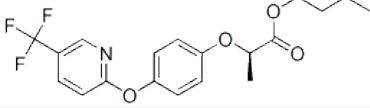
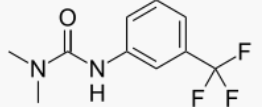
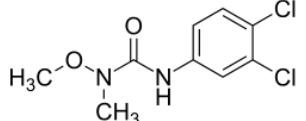
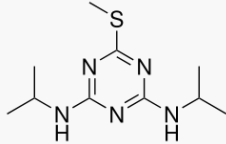
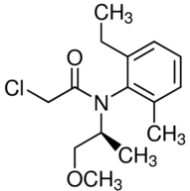
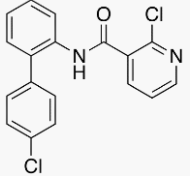
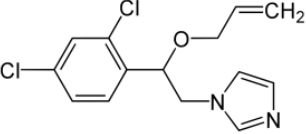
Το chlorantraniliprole ανήκει στην χημική οικογένεια των ανθρανιλικών διαμιδίων και έχει ένα νέο τρόπο δράσης, μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων ρυανοδίνης των εντόμων. Αυτή η ενεργοποίηση προκαλεί την απελευθέρωση ασβεστίου από τις εσωτερικές αποθήκες των μυών των εντόμων, με άμεσο αποτέλεσμα τη μειωμένη μυϊκή λειτουργία, παράλυση και ακολούθως θανάτωση των εντόμων-στόχων. Είναι εντομοκτόνο επαφής και στομάχου, με προνυμφοκτόνο δράση για την καταπολέμηση των πιο διαδεδομένων λεπιδοπτέρων και ορισμένων κολεοπτέρων που προσβάλλουν διάφορες καλλιέργειες. Καταπολεμά όλα τα προνυμφικά στάδια και περιορίζει την δράση των ακμαίων σε ορισμένα έντομα. Επίσης επιδεικνύει εξαιρετική ωο-προνυμφοκτόνο δράση.

Το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο chlorpyrifos είναι ένα από τα πλέον μελετημένα φυτοφάρμακα ως προς τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις του στο περιβάλλον και είναι από τις πρώτες ενώσεις που συμπεριλήφθηκαν στη λίστα με τους ρύπους προτεραιότητας της ΕΕ. Καταπολεμά μασητικά και μυζητικά έντομα αναστέλλοντας τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (acetylcholinesterase).

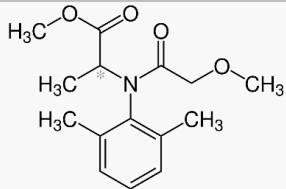
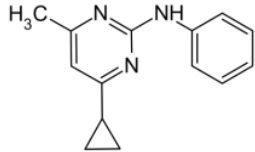
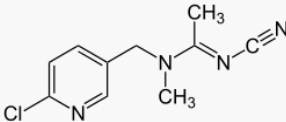
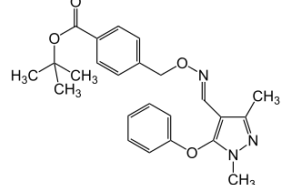
Πίνακας 5.1 Ιδιότητες και χρήση επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Ένωση ^[α]	Χρήση σε καλλιέργειες	Αριθμός CAS	Δομή ^[β]	Χημικός τύπος	$K_{oc}^{[γ]}$ (mL g ⁻¹)	log $K_{ow}^{[γ]}$	p <i>K_a</i> ^[β] (25°C)
Εντομοκτόνα							
Chlorantraniliprole (ανθρανιλικό διαμίδιο)	μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, κηπευτικά θερμοκηπίου	500008-45-7		C ₁₈ H ₁₄ BrCl ₂ N ₅ O ₂	2,56	2,86	10,88
Chlorpyrifos ^[δ] (οργανοφωσφορικό)	καλαμπόκι, καπνός, λαχανικά, βαμβάκι, πατάτες, φρούτα	2921-88-2		C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	3,91	4,96	4,70
Dimethoate (οργανοφωσφορικό)	ελιά, καπνός, πατάτες, εσπεριδοειδή	60-51-5		C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	1,94	0,70	15,93
Tebupirimfos (οργανοφωσφορικό)	καλαμπόκι και άλλα σιτηρά	96182-53-5		C ₁₃ H ₂₃ N ₂ O ₃ PS	3,27	4,20	6,10
Thiacloprid ^[ε] (νεονικοτινοειδές)	μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, οπωροκηπευτικά πατάτα, καλλωπιστικά φυτά,	111988-49-9		C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	2,04	1,26	1,62
Thiamethoxam ^[ε] (νεονικοτινοειδές)	τομάτα, οπωροκηπευτικά, καρπούζι, πεπόνι	153719-23-4		C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	1,75	-0,13	0,40
Ζιζανιοκτόνα							
Diuron ^{[δ], [στ]} (ουρία)	ελιά, εσπεριδοειδή, βαμβάκι, ψυχανθή, όσπρια	330-54-1		C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	2,91	2,87	13,20

Πίνακας 5.1 (συνέχεια) Ιδιότητες και χρήση επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Fluazifop- <i>p</i> -butyl (φαινόξυ- προπιονικά οξέα)	κυρίως εσπεριδοειδή	7921-46-6		C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	3,53	4,50	0,80
Fluometuron (ουρία)	βαμβάκι	2164-17-2		C ₁₀ H ₁₁ F ₃ N ₂ O	2,24	2,28	13,22
Linuron ^[στ] (ουρία)	πατάτα, καρότα, ηλίανθος, αραβόσιτος, πράσα, σπαράγγια ακινάρες κ.ά.	330-55-2		C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	2,93	3,00	-4,7/11,94
Prometryn ^[στ] (τριαζίνη)	βαμβάκι, σέλινο, μιζέλια, άνηθος	7287-19-6		C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	2,60	3,34	4,10
S-metolachlor (χλωροακετανιλίδιο)	καλαμπόκι, βαμβάκι, καπνός, πατάτες, ντομάτες	87392-12-9		C ₁₅ H ₂₂ ClNO ₂	3,35	3,05	-
Μυκητοκτόνα							
Boscalid (ανιλίδιο)	κηπευτικά θερμοκηπίου, αμυγδαλιά, καστανιά	188425-85-6		C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	2,89	2,96	3,50/0,30
Imazalil (αζόλη)	κυρίως τομάτα	35554-44-0		C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	3,68	3,82	6,50

Πίνακας 5.1 (συνέχεια) Ιδιότητες και χρήση επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Metalaxyl (παράγωγο αλανίνης)	αμπέλι, πατάτα	57837-19-1		C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	2,21	1,75	-
Myclobutanil (αζόλη)	αμπέλι, μηλοειδή, πυρηνόκαρπα, κηπευτικά θερμοκηπίου	88671-89-0		C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	2,71	2,89	2,30
Ακαρεοκτόνα							
Acetamiprid ^[ε] (νεονικοτινοειδές)	πατάτα, τομάτα, οπωροκηπευτικά, βαμβάκι, πυρηνόκαρπα, εσπεριδοειδή, μηδική	135410-20-7		C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	2,30	0,80	0,70
Fenpyroximate (πυραζόλιο)	εσπεριδοειδή, μηλοειδή	134098-61-6		C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₄	1,72	5,01	2,70

[α] Η χημική κατηγορία στην οποία ανήκει κάθε ένωση δίνεται σε παρένθεση

[β] Δεδομένα από <https://chemicalize.com/>

[γ] Δεδομένα από Agricultural Substances Database, Agriculture & Environment Research Unit, University of Hertfordshire, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>

[δ] Ρύποι προτεραιότητας σύμφωνα με την οδηγία 2000/60/ΕΕ

[ε] Ενώσεις στη λίστα παρακολούθησης της ΕΕ (watch list) (ΕΚ) 495/2015

[στ] Έχει αποσυρθεί από την ελληνική αγορά (Πηγή: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων)

Το dimethoate είναι οργανοφωσφορικό διασυστηματικό εντομοκτόνο/ακαρεοκτόνο επαφής και στομάχου. Όπως και άλλα οργανοφωσφορικά, δρα ως αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης. Απορροφάται εύκολα, κατανέμεται σε όλους τους ιστούς των φυτών και αποικοδομείται σχετικά γρήγορα. Στην Ελλάδα η κυκλοφορία του εγκρίθηκε το 2012.

Το tebuirimfos, γνωστό μέχρι πρότινος ως phosteburirim, είναι ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο που δρα ως αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης. Χρησιμοποιείται κυρίως στην προστασία των καλλιεργειών καλαμποκιού, αλλά δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στη χώρα μας.

Το thiacloprid είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου με προληπτική και κατασταλτική δράση για την αντιμετώπιση κυρίως μυζητικών καθώς και μασητικών εντόμων σε διάφορες καλλιέργειες. Η δράση του εντοπίζεται στην παρεμπόδιση της μεταφοράς των νευρικών ερεθισμάτων στα έντομα. Δρα ανταγωνιστικά ως προς την ακετυλοχολίνη και δεσμεύεται αντί αυτής στους υποδοχείς της που υπάρχουν στις νευρικές συνάψεις. Το thiacloprid δεν αποδομείται όπως η ακετυλοχολίνη, αλλά παραμένει δεσμευμένο στη συγκεκριμένη θέση, με αποτέλεσμα να προκαλείται διατάραξη της ισορροπίας στη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος και τελικά θάνατος του εντόμου. Η κυκλοφορία του στη χώρα μας εγκρίθηκε το 2008.

Το thiamethoxam ανήκει χημικά στα νεονικοτινοειδή και είναι διασυστηματικό εντομοκτόνο επαφής και στομάχου, το οποίο καταπολεμά μυζητικά και μασητικά έντομα. Η εντομοκτόνος δράση του οφείλεται στη δέσμευση των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης, που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των νευρικών σημάτων στα έντομα, στις συνάψεις του περιφερειακού νευρικού συστήματος. Εισέρχεται στα φυτά από τα φύλλα και τις ρίζες και μεταφέρεται ακροπεταλικά. Η χρήση του στην Ελλάδα επανεγκρίθηκε το 2009 και περιλαμβάνεται στη “watch list” της ΕΕ, καθώς έχει αποδεδειγμένα χαρακτηριστεί επικίνδυνο για το περιβάλλον.

5.1.2 Επιλεγμένα ζιζανιοκτόνα

Το diuron, ένα από τα πλέον επιβλαβή και επικίνδυνα για το περιβάλλον φυτοφάρμακα, είναι διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο για τη καταπολέμηση ετήσιων και ορισμένων πολυετών αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων, το οποίο αποσύρθηκε από την αγορά το 2007.

Το linuron αποσύρθηκε οριστικά από την ελληνική αγορά το 2017. Είναι διασυστηματικό προφυτρωτικό-μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο για την καταπολέμηση ετήσιων πλατύφυλλων και αγρωστωδών ζιζανίων. Δρα κυρίως από τις ρίζες αλλά και από το φύλλωμα κατά των ζιζανίων. Στο βιοχημικό επίπεδο η δράση του είναι στο φωτοσύνθεση II της φωτοσύνθεσης. Η υπολειμματική του δράση στο έδαφος υπολογίζεται σε 3-6 μήνες ανάλογα με τη δόση που χρησιμοποιήθηκε και τις συνθήκες του εδάφους και του κλίματος.

Το fluazifor-*p*-butyl είναι εκλεκτικό διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος για την μεταφυτρωτική καταπολέμηση αγρωστωδών ζιζανίων σε καλλιέργειες εσπεριδοειδών. Απορροφάται από τα φύλλα και μετακινείται μέσα στα φυτά στους υπέργειους και υπόγειους ιστούς των φυτών. Κυκλοφορεί στην Ελλάδα εγκεκριμένα από το 2008.

Το fluometuron είναι προφυτρωτικό-μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο κατά των ετήσιων αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων στο βαμβάκι. Δρα διασυστηματικά. Απορροφάται κυρίως από τις ρίζες και δευτερευόντως από το φύλλωμα. Παρεμποδίζει τη φωτοσύνθεση.

Το prometryn είναι ένα εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο που δρα κατά των πλατύφυλλων ζιζανίων και χρησιμοποιείται σε διάφορες καλλιέργειες, κυρίως καλαμποκιού και σέλινου. Αναστέλλει τη φωτοσύνθεση στα πιο ευαίσθητα είδη.

Το S-metolachlor είναι ζιζανιοκτόνο εγκεκριμένο από το 2008, για την καταπολέμηση ετήσιων αγρωστωδών και μερικών πλατύφυλλων ζιζανίων στον αραβόσιτο, στα ζαχαρότευτλα, στο βαμβάκι, στην τομάτα, στην πατάτα και στον καπνό. Το S-metolachlor απορροφάται κυρίως από το στέλεχος και το κολεόπτιλο και λιγότερο από τις ρίζες. Στα ζιζάνια παρεμποδίζεται η διαίρεση των κυττάρων και η ανάπτυξη βλαστών και ριζών.

5.1.3 Επιλεγμένα μυκητοκτόνα

Το boscalid, εγκρίθηκε το 2011 και είναι μυκητοκτόνο με προληπτική και κατά περίπτωση θεραπευτική δράση που παρεμποδίζει την βλάστηση των σπορίων, την ανάπτυξη του μυκηλίου και τη σποριογένεση παρεμποδίζοντας την κυτταρική αναπνοή αλλά σε διαφορετική θέση δράσης (σύμπλοκο II) και εμφανίζει διασυστηματική κίνηση.

Το imazalil είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο της ομάδας των ιμιδαζολών, με προληπτική, θεραπευτική και αντισπορογόνο δράση. Σε βιοχημικό επίπεδο δρα παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση εργοστερόλης και εφαρμόζεται αποκλειστικά μετά τη συγκομιδή των εσπεριδοειδών για την αποφυγή των σήψεων από *Penicillium*. Στην Ελλάδα κυκλοφορεί εγκεκριμένα από το 2011.

Το metalaxyl είναι εκλεκτικό διασυστηματικό μυκητοκτόνο κατά του περονόσπορου στις καλλιέργειες: αμπελιού, πατάτας, καπνού, τομάτας, αγγουριού, πεπονιού, μαρουλιού

(υπαίθρου) και κρεμμυδιού (υπαίθρου). Η δράση του εστιάζεται κατά των ωμοκλήτων που κινείται μέσα στο φυτό με αποπλαστική κυρίως κίνηση παρεμποδίζοντας την ανάπτυξη του παθογόνου μέσα στους ιστούς του φυτού. Η χρήση του στην Ελλάδα εγκρίθηκε το 2015.

Το myclobutanil είναι παράγωγο τριαζόλης που κυκλοφορεί εγκεκριμένα στη χώρα μας από το 2008 και είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο με προστατευτική και θεραπευτική δράση. Δρα ως αναστολέας απομεθυλίωσης στεροειδών, συγκεκριμένα της βιοσύνθεσης της εργοστερόλης, ενός κρίσιμου συστατικού των κυτταρικών μεμβρανών των μυκήτων. Όταν θερμαίνεται αποσυντίθεται για να παράγει διαβρωτικούς και τοξικούς καπνούς, συμπεριλαμβανομένων μονοξειδίου του άνθρακα, διοξειδίου του άνθρακα, υδροχλωρίου, υδροκυανίου και οξειδίων του αζώτου. Η χρήση του απαγορεύεται στον Καναδά, το Κολοράντο, την Ουάσιγκτον και το Όρεγκον για την παραγωγή ιατρικής και ψυχαγωγικής μαριχουάνας.

5.1.4 Επιλεγμένα ακαρεοκτόνα

Το acetamiprid είναι διασυστηματικό ακαρεοκτόνο επαφής και στομάχου της ομάδας των νεονικοτινοειδών με ευρύ φάσμα δράσης εναντίον κυρίως μυζητικών εντόμων. Δρα δεσμεύοντας τους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα του εντόμου. Εγκρίθηκε για πρώτη φορά το 2011.

Το fenpyroximate ανήκει χημικά στα πυραζόλια και είναι μη διασυστηματικό ακαρεοκτόνο που δρα δι' επαφής και από στομάχου σε όλα τα στάδια των ακάρεων. Πρόκειται για ένα από τα παλαιότερα εγκεκριμένα σκευάσματα στην Ελλάδα (έχει άδεια από το 1993).

5.2 Επιλεγμένες φαρμακευτικές ενώσεις

Αρχικά, οι μελέτες για την υπολειμματικότητα των φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον εστίαζαν στην παρουσία αντιβιοτικών στα νερά [207–212]. Την τελευταία δεκαετία όμως, οι μέθοδοι που αναπτύσσονται για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων τείνουν να είναι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ενώσεων που ανήκουν σε διαφορετικές θεραπευτικές κατηγορίες, εν αντιθέσει με παλαιότερα που αφορούσαν συγκεκριμένες ομάδες φαρμάκων [213, 214]. Σε πολλές εργασίες επισημαίνεται ότι η επιλογή των ενώσεων βασίζεται στην ικανότητα τους να αναλυθούν με μονοδύναμες μεθόδους (single methods), λόγω παρόμοιου φορτίου, διαθεσιμότητας αντίστοιχων

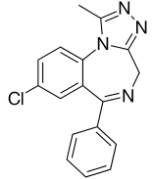
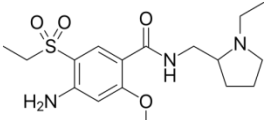
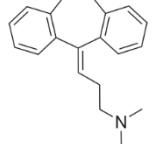
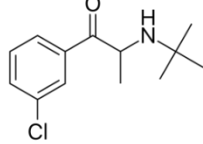
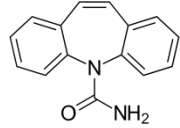
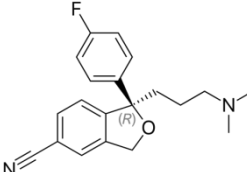
ιστοπικά σημασμένων προτύπων και προηγούμενης ανίχνευσής τους στο περιβάλλον [207, 215]. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία η κατανάλωση των ενώσεων στην Ελλάδα και την Ευρώπη τα τελευταία χρόνια θεωρήθηκε πιο σημαντική παράμετρος για την πιο ρεαλιστική κατανόηση της υπάρχουσας κατάστασης.

Η λίστα των φαρμακευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα Διατριβή, αποτελεί επέκταση προηγούμενης εργασίας που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας [6, 13, 77, 216] και συμπεριλαμβάνει 25 φαρμακευτικές ενώσεις που ανήκουν σε διάφορες θεραπευτικές κατηγορίες. Στην προϋπάρχουσα λίστα, προστέθηκαν ψυχιατρικές ενώσεις οι οποίες αρχικά δεν είχαν περιληφθεί, καθώς η συνταγογράφηση και κατανάλωσή τους τα τελευταία χρόνια στην χώρα μας έχει αυξηθεί σημαντικά. Εφαρμόστηκαν τα βασικά κριτήρια σύμφωνα με τα οποία επιλέγονται προς παρακολούθηση στο περιβάλλον οι φαρμακευτικές ενώσεις, τα οποία μεταξύ άλλων είναι:

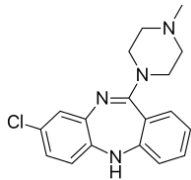
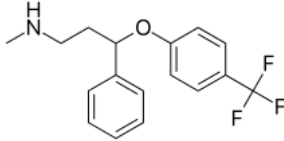
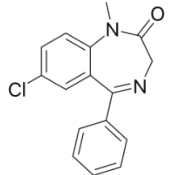
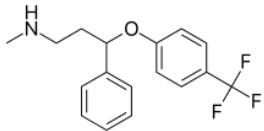
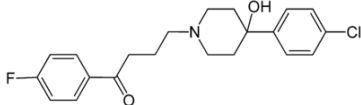
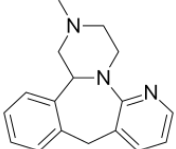
- Ο υψηλός βαθμός κατανάλωσης και συνταγογράφησής τους [217] και ο τρόπος χρήσης τους.
- Η αυξανόμενη μη συνταγογραφούμενη χρήση τους [6, 216].
- Τα αναφερόμενα χαμηλά ποσοστά απομάκρυνσής τους στις ΜΕΥΑ.
- Η αποδεδειγμένη ύπαρξή και ανθεκτικότητα τους στο περιβάλλον, τα επίπεδα συγκεντρώσεων στα οποία ανιχνεύονται σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία [218] και οι πιθανές επιπτώσεις τους στον άνθρωπο και τους υδάτινους οργανισμούς.
- Η περιορισμένη βιβλιογραφία που αφορά τον προσδιορισμό αυτών των ενώσεων με σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους σε ιζήματα και θαλάσσια οικοσυστήματα.

Για την επιλογή των ψυχιατρικών ενώσεων συλλέχθηκαν στοιχεία από την Ψυχιατρική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και από Ιδιωτική Ψυχιατρική Κλινική της πόλης, σχετικά με την κατανάλωση και τη συνταγογράφησή τους. Στον Πίνακα 5.2 αναφέρονται οι επιλεγμένες φαρμακευτικές ενώσεις, η θεραπευτική κατηγορία στην οποία ανήκουν, ο αριθμός CAS, η χημική δομή και ο μοριακός τύπος τους καθώς και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες.

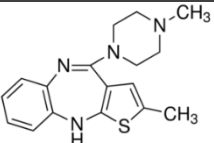
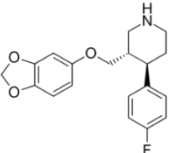
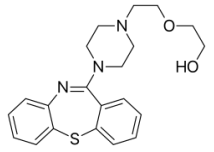
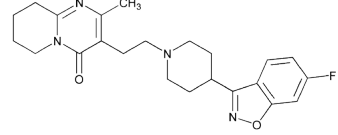
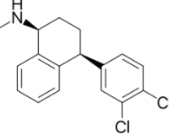
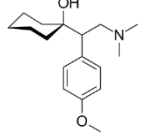
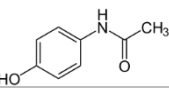
Πίνακας 5.2 Ιδιότητες επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων

Ένωση	Αριθμός CAS	Χημική δομή ^[α]	Μοριακός τύπος	$\log K_{oc}^{[α]}$ (mL g ⁻¹)	$\log K_{ow}^{[α]}$	$pK_a^{[α]}$ (25 °C)
Ψυχιατρικά						
Alprazolam (ηρεμιστικό, υπνωτικό)	28981-97-7		C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	6,33	3,87	18,30/5,08
Amisulpride (αντιψυχωσικό)	53583-79-2		C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₄ S	2,80	1,10	7,05/14,03
Amitriptyline (αντικαταθλιπτικό)	50-48-6		C ₂₀ H ₂₃ N	5,70	4,92	9,76
Bupropion (αντικαταθλιπτικό)	34841-39-9		C ₁₃ H ₁₈ ONCl	3,01	3,85	8,22/18,29
Carbamazepine (αντιεπιληπτικό)	298-46-4		C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	3,59	2,45	15,96
Citalopram (αντικαταθλιπτικό)	59729-32-7		C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	4,40	3,74	9,78

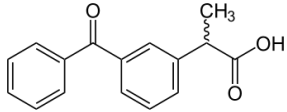
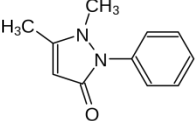
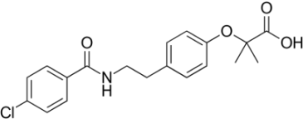
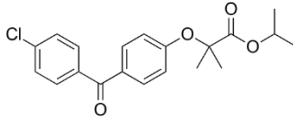
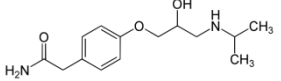
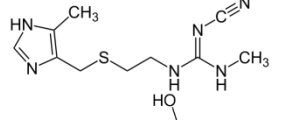
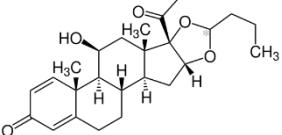
Πίνακας 5.2 (συνέχεια) Ιδιότητες επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων

Ένωση	Αριθμός CAS	Χημική δομή ^[α]	Μοριακός τύπος	$\log K_{oc}^{[α]}$ (mL g ⁻¹)	$\log K_{ow}^{[α]}$	$pK_a^{[α]}$ (25 °C)
Clozapine (άτυπο αντιψυχωσικό)	5786-21-0		C ₁₈ H ₁₉ N ₄ Cl	4,72	3,35	7,50
Fluoxetine (αντικαταθλιπτικό)	57226-07-0		C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	5,32	4,05	9,80
Diazepam (ηρεμιστικό, υπνωτικό)	439-14-5		C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	4,05	2,82	2,92
Fluoxetine (αντικαταθλιπτικό)	57226-07-0		C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	5,32	4,05	9,80
Haloperidol (αντιψυχωσικό)	52-86-8		C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	4,11	4,30	8,66
Mirtazapine (αντικαταθλιπτικό)	85650-52-8		C ₁₇ H ₁₉ N ₃	4,45	3,03	6,67

Πίνακας 5.2 (συνέχεια) Ιδιότητες επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων

Ένωση	Αριθμός CAS	Χημική δομή ^[α]	Μοριακός τύπος	logK _{oc} ^[α] (mL g ⁻¹)	logK _{ow} ^[α]	pK _a ^[α] (25 °C)
Olanzapine (αντικαταθλιπτικό)	132539-06-1		C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S	4,79	2,56	7,24/14,17
Paroxetine (αντικαταθλιπτικό)	63952-24-9		C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	2,63	2,57	9,77
Quetiapine (αντιψυχωσικό)	111974-69-7		C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	4,19	1,94	7,06/15,12
Risperidone (αντιψυχωσικό)	106266-06-2		C ₂₃ H ₂₇ FN ₄ O ₂	6,65	3,49	8,76
Sertraline (αντικαταθλιπτικό)	79559-97-0		C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	2,16	5,29	9,85
Venlafaxine (αντικαταθλιπτικό)	93413-69-5		C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	3,17	3,28	8,91/14,42
Αναλγητικά						
Paracetamol	103-90-2		C ₈ H ₉ NO ₂	1,79	0,46	9,46

Πίνακας 5.2 (συνέχεια) Ιδιότητες επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων

Ένωση	Αριθμός CAS	Χημική δομή ^[α]	Μοριακός τύπος	$\log K_{oc}^{[α]}$ (mL g ⁻¹)	$\log K_{ow}^{[α]}$	$pK_a^{[α]}$ (25 °C)
ΜΣΑΦ^[β]						
Ketoprofen	172964-50-0		C ₁₆ H ₁₄ O ₃	2,46	3,12	4,45
Phenazone	60-80-0		C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	2,35	0,58	1,40
Υπολιπιδαιμικά						
Bezafibrate	41859-67-0		C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄	3,17	4,25	3,83
Fenofibrate	49562-28-9		C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄	3,64	5,19	-
Άλλα φάρμακα						
Atenolol (αντιυπερτασικό)	60966-51-0		C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	2,17	0,16	9,67/14,08
Cimetidine (ανταγωνιστής H ₂ υποδοχέων)	51481-61-9		C ₁₀ H ₁₆ N ₆ S	2,96	0,40	6,53/14,16
Budesonide (κορτικοστεροειδές)	51333-22-3		C ₂₅ H ₃₄ O ₆	1,00	3,98	13,74/-2,90

[α] Δεδομένα από <https://chemicalize.com/>

[β] ΜΣΑΦ: Μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

5.2.1 Επιλεγμένα αναλγητικά και μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Τα περισσότερα αναλγητικά έχουν αντιφλεγμονώδεις και αντιπυρετικές ιδιότητες. Πολλά φάρμακα της κατηγορίας αυτής και κυρίως εκείνα που χρησιμοποιούνται για την ανακούφιση από τον πόνο (pain killers), πωλούνται σε πολύ μεγάλες ποσότητες και είναι ευρέως γνωστά ως μη συνταγογραφούμενα φάρμακα (over the counter, OTC drugs).

Η παρακεταμόλη ή ακεταμινοφαίνη (paracetamol ή acetaminophen) είναι το πιο διαδεδομένο μη συνταγογραφούμενο φάρμακο παγκοσμίως [219]. Είναι ασθενής αναστολέας της βιοσύνθεσης των προσταγλανδινών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) και αυτό εξηγεί τις αναλγητικές και αντιπυρετικές ιδιότητες.

Η κετοπροφένη (ketoprofen) ανήκει στην ομάδα των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών παραγώγων του προπιονικού οξέος και χρησιμοποιείται ως αντιφλεγμονώδες και αναλγητικό.

Η φαιναζόνη ή αντιπυρίνη (phenazone ή antipyrine) είναι και αυτή ΜΣΑΦ με αντιπυρετική και αναλγητική δράση και χορηγείται από το στόμα ή σε ωτικές σταγόνες.

5.2.2 Επιλεγμένα ψυχιατρικά

Τα ψυχιατρικά φάρμακα δρουν στο ΚΝΣ μειώνοντας την ολική νευρωνική συμπεριφορά. Χωρίζονται σε αρκετές διαφορετικές κατηγορίες με βάση τα χημικά χαρακτηριστικά όπως τα αντιψυχωσικά, τα αντικαταθλιπτικά, τα αντιεπιληπτικά, τα ηρεμιστικά–υπνωτικά κ.ά. Η παρουσία των φαρμάκων που δρουν στο ΚΝΣ στο περιβάλλον δεν έχει μελετηθεί αρκετά, ενώ η κατανάλωση τους έχει αυξηθεί κατακόρυφα.

Η καρβαμαζεπίνη (carbamazepine) ανήκει στην φαρμακευτική κατηγορία των αντιεπιληπτικών, νευροτρόπων και ψυχοτρόπων φαρμάκων και είναι η πιο διαδεδομένη αντιεπιληπτική ουσία σε παγκόσμιο επίπεδο και καταναλώνεται σε αρκετά υψηλές ποσότητες το χρόνο. Βοηθά στον έλεγχο της διαβίβασης των μηνυμάτων από τον εγκέφαλο στους μυς. Έχει αναφερθεί η ύπαρξή της στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα καθώς επίσης και σε πόσιμο νερό [219, 220].

Οι βενζοδιαζεπίνες χαλαρώνουν την σπαστικότητα των σκελετικών μυών, αυξάνοντας την προσυναπτική αναστολή στον νωτιαίο μυελό. Η αλπραζολάμη (alprazolam) είναι μια τριαζολοβενζοδιαζεπίνη που ενισχύει τη δράση των GABA υποδοχέων οδηγώντας έτσι στην αναστολή της νευρικής λειτουργίας. Παρουσιάζει κατασταλτικές, υπνωτικές και αγχολυτικές ιδιότητες και επιπρόσθετα εμφανίζει αντισπασμωδική και κεντρική μυοχαλαρωτική δράση. Η διαζεπάμη (diazepam) όπως και οι υπόλοιπες βενζοδιαζεπίνες

μειώνουν το άγχος αναστέλλοντας με εκλεκτικό τρόπο νευρωνικά κυκλώματα στο μεταιχμιακό σύστημα του εγκεφάλου.

Η βενλαφαξίνη (venlafaxine) είναι ισχυρός αναστολέας της επαναπρόσληψης σεροτονίνης και έχει αντικαταθλιπτική δράση. Ο μηχανισμός αντικαταθλιπτικής δράσης της βενλαφαξίνης πιστεύεται ότι συνδέεται με την ενίσχυση της νευροδιαβιβαστικής δραστηριότητας στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Η παροξετίνη (paroxetine) είναι ισχυρός και εκλεκτικός αναστολέας της 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) και η αντικαταθλιπτική της ενέργεια και αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της ιδεοληπτικής ψυχαναγκαστικής διαταραχής, στη θεραπεία της διαταραχής του πανικού και στο κοινωνικό άγχος/κοινωνική φοβία, θεωρείται ότι σχετίζεται με την αναστολή της επαναπρόσληψης της 5-HT στους νευρώνες του εγκεφάλου.

Η φλουοξετίνη (fluoxetine) είναι ένας εκλεκτικός αναστολέας της επαναπρόσληψης της σεροτονίνης και σε αυτό φαίνεται ότι οφείλεται ο μηχανισμός δράσης της. Η αμιτριπτυλίνη (amitriptyline) είναι τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό.

Η αμιτριπτυλίνη έχει αρκετά ισχυρές αντιχολινεργικές, αντισταμινικές και κατασταλτικές ιδιότητες και ενισχύει τις δράσεις των κατεχολαμινών. Η αμιτριπτυλίνη ανυψώνει το υποβιβασμένο επίπεδο του συναισθήματος.

Η μιρταζαπίνη (mirtazapine) είναι ένας κεντρικά δρών ανταγωνιστής των α2 προσυναπτικών υποδοχέων, ο οποίος αυξάνει την κεντρική νοραδρενεργική και σεροτονινεργική νευρομεταβίβαση.

Η αλοπεριδόλη (haloperidol) είναι ένας ισχυρός ανταγωνιστής της ντοπαμίνης και έτσι, ένα ταχείας δράσεως νευροληπτικό, που ανήκει στην ομάδα των βουτυροφαινονών και έχει μεγάλο φάσμα δράσης. Πιο πιθανός τρόπος δράσεως θεωρείται ο αποκλεισμός των υποδοχέων D2 της ντοπαμίνης. Η ιδιότητα αυτή φαίνεται να συσχετίζεται θετικά με τη θεραπευτική της αποτελεσματικότητα. Ακόμη, η εμφάνιση εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων και η αύξηση της προλακτίνης οφείλεται στην αντιντοπαμινεργική της δράση. Η σερτραλίνη (sertraline) αναστέλλει εκλεκτικώς την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης.

Η βουπροπιόνη (bupropion) είναι εκλεκτικός αναστολέας της νευρωνικής επαναπρόσληψης κατεχολαμινών (νοραδρεναλίνης και ντοπαμίνης) με αμελητέα δράση στην σεροτονίνης. Η βουπροπιόνη χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτικό κι ως παράγοντας που ενισχύει την ικανότητα των ασθενών να απέχουν από το κάπνισμα.

Η κουετιαπίνη (quetiapine) ανήκει σε μια ομάδα φαρμάκων που ονομάζονται αντιψυχωσικά, τα οποία βελτιώνουν τα συμπτώματα ορισμένων τύπων ψυχικών ασθενειών, όπως είναι οι ψευδαισθήσεις (π.χ. ανεξήγητες φωνές), οι παράξενες και τρομακτικές σκέψεις, οι αλλαγές στην συμπεριφορά, το αίσθημα μοναξιάς και σύγχυσης.

Η ολανζαπίνη (olanzapine) είναι αντιψυχωσικός, αντιμανιακός και σταθεροποιητικός της διάθεσης παράγοντας, ο οποίος εκδηλώνει ένα ευρύ φαρμακολογικό προφίλ επιδράσεων σε ένα αριθμό συστημάτων υποδοχέων.

Η αμισουλπρίδη (amisulpride) είναι ένα αντιψυχωσικό φάρμακο που συνδέεται εκλεκτικά, παρουσιάζοντας υψηλή συγγένεια, με τους υποτύπους των ντοπαμινεργικών υποδοχέων D2/D3, ενώ στερείται συγγένειας με τους υποτύπους D1, D4 και D5 των ντοπαμινεργικών υποδοχέων.

Η ρισπεριδόνη (risperidone) ενδείκνυται για την συμπτωματική αντιμετώπιση των ψυχωτικών διαταραχών. Η αντιψυχωσική αποτελεσματικότητα της ρισπεριδόνης έχει ιδιαίτερα επιβεβαιωθεί σε βραχύχρονες, διάρκειας 4–6 εβδομάδων μελέτες, χορήγησης του φαρμάκου σε σχιζοφρενικούς ασθενείς.

Η κλοζαπίνη (clozapine) έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας αντιψυχωσικός παράγοντας που χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της σχιζοφρένειας, όταν η χορήγηση άλλων αντιψυχωσικών δεν είναι αποτελεσματική, καθώς είναι ισχυρότερο. Έτσι, η χρήση του προτιμάται για τους πιο «ανθεκτικούς» στη θεραπεία ασθενείς.

5.2.3 Επιλεγμένα υπολιπιδαιμικά

Τα υπολιπιδαιμικά φάρμακα χρησιμοποιούνται για τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο αίμα και για αυτό ονομάζονται αλλιώς και ρυθμιστές λιπιδίων στο αίμα (lipid lowering agents). Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες υπολιπιδαιμικών φαρμάκων, οι στατίνες (statins) και οι φιβπράτες (fibrates). Οι φιβπράτες έχουν τύχει μεγαλύτερης έρευνας έως τώρα και έχει βρεθεί η ύπαρξή τους στο υδάτινο περιβάλλον [220]. Καθώς αποτελούν μια από τις πιο συχνά συνταγογραφούμενες ομάδες φαρμάκων, η ανίχνευσή τους στο περιβάλλον έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων.

Η βεζαφιβπράτη (bezafibrate) ελαττώνει τα αυξημένα επίπεδα των λιπιδίων του αίματος (τριγλυκερίδια και χοληστερόλη). Η θεραπεία με βεζαφιβπράτη αυξάνει τη δραστηριότητα των τριγλυκεριδολιπασών (λιποπρωτεϊνική λιπάση και ηπατική λιποπρωτεϊνολιπάση) που συμμετέχουν στον καταβολισμό των πλούσιων σε τριγλυκερίδια

λιποπρωτεϊνών. Κατά την έντονη αποικοδόμηση των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών σχηματίζονται πρόδρομες μορφές της HDL, γεγονός που εξηγεί την αύξηση της τιμής της τελευταίας. Η φαινοφιμπράτη (fenofibrate) είναι δυνατόν να μειώσει την υπερχοληστερολαιμία κατά 20–25% και την υπερτριγλυκεριδαίμια κατά 40–50%.

5.2.4 Επιλεγμένα αντιυπερτασικά

Η ατενολόλη (atenolol) είναι β-αδρενεργικός αναστολέας με καρδιοεκλεκτική δράση (δράση β₁) και χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της αυξημένης αρτηριακής πίεσης και στις καρδιακές αρρυθμίες.

5.2.5 Επιλεγμένα φάρμακα για τη θεραπεία του πεπτικού έλκους

Τα φάρμακα αυτά χορηγούνται με σκοπό την καταπολέμηση των γαστρικών ασθενειών και της έκκρισης οξικών ουσιών. Ανήκουν στα φάρμακα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση παγκοσμίως και θεωρούνται αρκετά δραστικά και αποτελεσματικά. Η σιμετιδίνη (cimetidine) ασκεί ανασταλτική δράση τόσο στην βασική όσο και στη μετά από διέγερση έκκριση γαστρικού οξέος και ελαττώνει την παραγωγή πεψίνης. Ανταγωνίζεται τη δράση της ισταμίνης καταλαμβάνοντας τους H₂-υποδοχείς αυτής στα τοιχωματικά κύτταρα, δηλαδή ανήκει στους ανταγωνιστές των H₂-υποδοχέων της ισταμίνης. Εκτός από την αντιεκκριτική της δράση, η σιμετιδίνη έχει και κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες και έτσι συντελεί στη διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού του γαστρεντερικού βλεννογόνου.

5.2.6 Επιλεγμένα κορτικοστεροειδή

Τα κορτικοστεροειδή ή γλυκοκορτικοειδή φάρμακα είναι φυσικά παραγόμενες στεροειδείς ορμόνες ή συνθετικά συστατικά που προκαλούν μείωση του φλεγμονικού οιδήματος και των βρογχικών εκκρίσεων. Καταναλώνονται παγκοσμίως σε μεγάλες ποσότητες ως αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά. Παρόλο που με βάση τις έρευνες που έχουν γίνει έως σήμερα η ανίχνευσή τους στο περιβάλλον είναι αναμενόμενη, οι πληροφορίες σχετικά με τις συγκεντρώσεις τους είναι περιορισμένες [221]. Η βουδεσονίδη (budesonide) είναι ένα συνθετικό, μη αλογονωμένο κορτικοστεροειδές για τοπική χρήση με εισπνοές, το οποίο στις συνιστώμενες δόσεις διαθέτει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση και

στερείται συστηματικών επιδράσεων ή ανασταλτικής δράσης για την επινεφριδική λειτουργία.

5.3 Επιλογή εσωτερικών προτύπων

Το εσωτερικό πρότυπο είναι μια ένωση αναφοράς η οποία εφαρμόζεται στην περίπτωση που αναμένονται μεταβολές στην ευαισθησία της ενόργανης διάταξης από μέτρηση σε μέτρηση και σε μη απόλυτα επαναλαμβανόμενη επίδραση της μήτρας σε διαδικασίες της μεθόδου, όπως η εκχύλιση και άλλες κατεργασίες του δείγματος. Η χρήση του βασίζεται στη λογική ότι οι σχετικές αυξομειώσεις της ευαισθησίας της μεθόδου σε συστατικό Α του δείγματος θα είναι ίδιες για το συστατικό Β. Όταν υπάρχει στάδιο κατεργασίας του δείγματος (π.χ. εκχύλιση) το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να δείχνει συμπεριφορά παρόμοια με τον αναλύτη [222].

Ιδανικά, τα εσωτερικά πρότυπα θα πρέπει να προμηθεύονται σε καθαρή μορφή και να είναι πιστοποιημένα ελεύθερα προσμίξεων, ειδικά όταν πρόκειται για πολυ-υπολειμματικές μεθόδους, όπου οι κορυφές στα πραγματικά δείγματα μπορεί να είναι πολλές και μικρές και να συγχέονται με τυχόν κορυφές από τις προσμίξεις. Όταν αδύνατο να παραμένει πάντα αμετάβλητο, το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να είναι τουλάχιστον αρκετά σταθερό στις εφαρμοζόμενες χρωματογραφικές συνθήκες. Πρακτικά, αυτό σημαίνει πως δε θα πρέπει να διασπάται, να αντιδρά ή να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, καθώς σε αυτές τις περιπτώσεις θα ήταν αδύνατο να αντλήσουμε από αυτό πληροφορίες για τη συνοχή της ανάλυσης. Επίσης, τα εσωτερικά πρότυπα θα πρέπει να παρουσιάζουν την ίδια συμβατότητα με τους αναλύτες ως προς τους ανιχνευτές.

Το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να είναι ένωση η οποία δεν υπάρχει περίπτωση να ανιχνευτεί στο προς ανάλυση δείγμα. Επίσης, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του από τις κορυφές των αναλυτών του δείγματος και των κορυφών του υποστρώματος να είναι εύκολος, ώστε να μην υπάρχουν συνεκλώσεις και ενίσχυση του σήματος της κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Μοναδική εξαίρεση σε αυτή την προϋπόθεση είναι η χρήση σταθερών και ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων (isotopically-labelled internal standards, IISs ή απλά IS) στο LC-MS. Αυτό συμβαίνει επειδή στη φασματομετρία μάζας είναι εύκολο να διαφοροποιηθεί το εσωτερικό πρότυπο και ο αναλύτης στην περίπτωση που συνεκλούνται. Ένας ακόμη γενικός κανόνας, είναι πως το εσωτερικό πρότυπο που θα επιλεγεί, ιδανικά θα πρέπει να εκλούεται μετά ή σε πολύ παρόμοιο χρόνο

με από τον αντίστοιχο αναλύτη. Αν και ο κανόνας αυτός δεν είναι अपαραβάτος, συνεισφέρει σημαντικά στη χρησιμότητα των εσωτερικών προτύπων.

Το εσωτερικό πρότυπο θα έχει τον ίδιο χρόνο κατακράτησης και την ίδια απόκριση κορυφής (εμβαδό, ύψος, σχήμα) σε κάθε χρωματογράφημα. Επομένως, αν παρατηρηθεί αλλαγή στο χρόνο κατακράτησης ή στην απόκριση κορυφής, εντός αποδεκτών ορίων, όταν πρόκειται για ανάλυση με την ίδια μέθοδο, τότε μπορεί να εξαχθεί με αρκετά μεγάλη βεβαιότητα το συμπέρασμα ότι όλες οι κορυφές που εκλούνται πριν από το εσωτερικό πρότυπο εκλούνται επίσης υπό αποδεκτές συνθήκες. Σε περίπτωση που η απόκριση είναι μη αναμενόμενη, ελέγχονται αρχικά οι κορυφές που προηγήθηκαν και το δείγμα επανεξετάζεται η εγχέεται ξανά. Η δομή του εσωτερικού προτύπου προτιμάται να είναι παρόμοια με της προσδιοριζόμενης ένωσης, ωστόσο η προϋπόθεση αυτή μπορεί να παραληφθεί σε περίπτωση που πληρούνται όλες οι παραπάνω.

Στη χρήση LC-MS, ιδιαίτερα διαδεδομένη είναι η χρήση ισοτοπικά σημασμένων εσωτερικών προτύπων (isotopically-labelled internal standards, ILISs) και ιδανικά των δευτεριωμένων παραγώγων ενώσεων. Συχνά υιοθετείται η τεχνική της ισοτοπικής αραίωσης (isotope dilution), όπου τα ILISs χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα με τις καμπύλες αναφοράς προσομοίωσης υποστρώματος. Η τεχνική προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως μεγαλύτερη ακρίβεια, ανθεκτικότητα, μετρίαση του φαινομένου της επίδρασης του υποστρώματος, εντοπισμό τυχόν απώλειας αναλυτών και εξουδετέρωση σφαλμάτων που οφείλονται σε διακυμάνσεις παραμέτρων λειτουργίας του οργάνου κατά τη διάρκεια μετρήσεων και επαναληψιμότητα. Για αυτό, όσο νωρίτερα στην πειραματική πορεία εισάγονται τα εσωτερικά πρότυπα, τόσο μικρότερη είναι η επίδραση των τυχόν μεταβολών στο χειρισμό των δειγμάτων άρα και μικρότερο το σφάλμα [223].

Με την εφαρμογή της μεθόδου του εσωτερικού προτύπου, για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τον προς ανάλυση ενώσεων, υπολογίζεται ο λόγος της τιμής του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη, προς την τιμή του εμβαδού της κορυφής του εσωτερικού προτύπου, σε σχέση με τη συγκέντρωση. Η ένωση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εσωτερικό πρότυπο προστίθεται σε όλα τα δείγματα σε σταθερή συγκέντρωση.

Δεδομένου ότι το κόστος για να αγοραστεί το αντίστοιχο δευτεριωμένο παράγωγο για κάθε ένωση είναι εξαιρετικά υψηλό, για τις ανάγκες της Διατριβής επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικές ενώσεις για μεγάλο μέρος των μελετώμενων φαρμακευτικών ενώσεων. Τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα που επιλέχθηκαν ήταν τα D3-olanzapine, D10-carbamazepine, D4-haloperidol, D6-amitriptyline και D5-fluoxetine και χρησιμοποιήθηκαν

μόνο για ορισμένες φαρμακευτικές ενώσεις. Στον Πίνακα 5.3 δίνεται ο μοριακός τύπος, η ακριβής μοριακή μάζα και οι προσδιοριζόμενες φαρμακευτικές ενώσεις.

Πίνακας 5.3 Εσωτερικά πρότυπα και οι αντίστοιχες προσδιοριζόμενες ενώσεις

Δευτεριωμένη ένωση	Μοριακός τύπος	Μοριακή μάζα	Προσδιοριζόμενες ενώσεις
D ₃ -olanzapine	C ₁₇ H ₁₇ D ₃ N ₄ S	316,1670	olanzapine, quetiapine
D ₁₀ -carbamazepine	C ₁₅ D ₁₀ H ₂ N ₂ O	247,1650	carbamazepine
D ₄ -haloperidol	C ₂₁ D ₄ H ₁₉ ClFNO ₂	380,1725	haloperidol
D ₆ -amitriptyline	C ₂₀ H ₁₇ D ₆ N	284,2290	amitriptyline
D ₅ -fluoxetine	C ₁₇ D ₅ H ₁₃ F ₃ NO	315,1727	citalopram, paroxetine, fluoxetine, sertraline

5.4 Επιλογή ποταμών

Η επιλογή των ποταμών Λούρου και Αράχθου για την εφαρμογή των αναλυτικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν είναι καθοριστικής σημασίας. Ως γνωστόν, όσο πιο έντονες είναι οι ανθρώπινες και γεωργικές δραστηριότητες, τόσο μεγαλύτερες είναι οι επιπτώσεις στην ποιότητα των υδάτων στην ευρύτερη περιοχή επιρροής των λεκανών απορροής. Εκτός από τα αστικά κέντρα (Άρτα, Φιλιπιάδα, Πρέβεζα) και τους οικισμούς γύρω από τα δύο υδάτινα συστήματα που είναι εν δυνάμει πηγές υπολειμμάτων φαρμακευτικών ενώσεων, στην περιοχή αυτή της Ηπείρου υπάρχουν εκτάσεις καλλιεργήσιμης γης όπου εφαρμόζεται πλήθος παρασιτοκτόνων.

Η ρύπανση των περιοχών αυτών σχετίζεται κυρίως με δραστηριότητες του πρωτογενή τομέα παραγωγής (πτηνοτροφία, ενσταυλισμένη κτηνοτροφία, ιχθυοκαλλιέργεια) καθώς και με βιομηχανική δραστηριότητα, κυρίως αξιοποίησης προϊόντων πρωτογενούς τομέα. Επίσης, στην περιοχή υπάρχει εν δυνάμει ρυπαντικό φορτίο από τα αστικά υγρά απόβλητα των ΜΕΥΑ, από οικισμούς που δεν εξυπηρετούνται από κεντρικά δίκτυα αποχέτευσης και από χώρους ανεξέλεγκτης διάθεσης απορριμμάτων (ΧΑΔΑ). Δευτερεύουσας σημασίας πηγές ρύπανσης είναι οι χώροι υγειονομικής ταφής (ΧΥΤΑ) και οι μεταλλευτικές–εξορυκτικές δραστηριότητες όσον αφορά τις εγκαταστάσεις λατομείων. Συνεπώς, καθίσταται προφανής η αυξημένη πίεση στα υδάτινα σώματα των ποταμών Αράχθου και Λούρου, τα οποία θα περιγραφούν πιο αναλυτικά στο Κεφάλαιο 10 και συγκεκριμένα στα εδάφια 10.1.1.1 και 10.1.1.2.

Η απουσία βιβλιογραφικών δεδομένων για την ανίχνευση φαρμακευτικών ενώσεων στα ύδατα και ιζήματα των δύο ποταμών λήφθηκε επίσης υπόψιν, ενώ όσον αφορά τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα βιβλιογραφικά δεδομένα για την περιοχή δεν έχουν ανανεωθεί εδώ και πολλά χρόνια και οι τελευταίες μελέτες είχαν πραγματοποιηθεί με λιγότερο εκλεκτικές και ευαίσθητες αναλυτικές μεθόδους.

5.5 Επιλογή υδατοκαλλιεργειών

Όπως έχει αναφερθεί, οι υδατοκαλλιέργειες που δραστηριοποιούνται σε πολλές περιοχές της Ευρώπης και της Ελλάδας δύνανται να αποτελούν έναν από τους πλέον στρεσογόνους παράγοντες των παράκτιων οικοσυστημάτων, εισάγοντας σε αυτά διάφορους ρύπους όπως φαρμακευτικά, βιοκτόνα και φυτοφάρμακα. Στην παρούσα Διατριβή, επιλέχθηκε αρχικά η ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου όπου δραστηριοποιούνται πολυάριθμες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μόνο η παράκτια ζώνη της Θεσπρωτίας παράγει περίπου το 15% της ετήσιας ελληνικής παραγωγής, ενώ τεράστια ποσότητα ιχθυρών εξάγεται ετησίως στο εξωτερικό. Έτσι, επιλέχθηκαν τρία αντιπροσωπευτικά σημεία δειγματοληψίας στην παράκτια ζώνη της (Ιόνιο Πέλαγος), σε κομβικό σημείο μεταξύ των μεγαλύτερων μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας.

Στη συνέχεια, στο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος Sea-on-a-chip, επιλέχθηκαν από κοινού με τις υπόλοιπες ερευνητικές ομάδες σημεία δειγματοληψίας σε περιοχές με έντονη ιχθυοκαλλιεργική δραστηριότητα, για επτά συνολικά χώρες. Τα βασικά κριτήρια ήταν η γεωγραφική θέση, το φορτίο ρύπανσης που δέχονται και η βιοποικιλότητά τους. Στην Ελλάδα επιλέχθηκαν τρία σημεία στην παράκτια ζώνη της Θεσπρωτίας όπου δραστηριοποιούνται ιχθυοκαλλιέργειες. Καθώς στην περιοχή δεν υπάρχουν εκτροφεία μυδιών ή άλλων οστρακοειδών, επιλέχθηκαν επιπλέον τρία σημεία κοντά σε περιοχή εκτροφής μυδιών στο Βουθρωτό της Αλβανίας, προκειμένου να συμπεριληφθεί και αυτό το είδος υδατοκαλλιέργειας. Στην Ιταλία, επιλέχθηκαν τρία σημεία πλησίον εκτροφείων μυδιών στη λιμνοθάλασσα Sacca di Goro, στη βόρεια Αδριατική Θάλασσα και τρία σημεία στη Θάλασσα της Λιγυρίας στη Βόρεια Τυρρηνική Θάλασσα, πλησίον ιχθυοκαλλιεργειών. Στην Ισπανία, τα δείγματα συλλέχθηκαν από τρία σημεία κοντά στις εκβολές του ποταμού Ebro, στην περιοχή Sant Carles de la, όπου δραστηριοποιούνται και οι δυο τύποι υδατοκαλλιεργειών. Στη Πορτογαλία, επιλέχθηκαν τρία σημεία στην περιοχή Costa Nova, στην λιμνοθάλασσα του Aveiro. Στη Νορβηγία, επιλέχθηκαν τρία σημεία πλησίον ιχθυοκαλλιεργειών και τρία πλησίον εκτροφείων μυδιών, στη θαλάσσια περιοχή κοντά στο

Rong. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, επιλέχθηκαν τρία σημεία στην θαλάσσια περιοχή κοντά στο Exmouth, στο Νότο, όπου εκβάλλει ο ποταμός Exe και δραστηριοποιούνται υδατοκαλλιέργειες. Στο κεφάλαιο 10 γίνεται εκτενέστερη περιγραφή και απεικόνιση των σημείων δειγματοληψίας.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Χημικά, υλικά και όργανα

6.1.1 Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα

Πρότυπες ουσίες

Οι πρότυπες ουσίες των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ήταν υψηλής καθαρότητας (>97%) και προμηθεύτηκαν σε στερεά μορφή από την εταιρία Sigma Aldrich (*Darmstadt, Germany*). Οι επιλεγμένες ουσίες ήταν οι thiamethoxam, dimethoate, acetamiprid, thiacloprid, fluometuron, chlorantraniliprole, metalaxyl, diuron, boscalid, myclobutanil, linuron, S-metolachlor, prometryn, tebuirimfos, chlorpyrifos, fluazifop-p-butyl, imazalil και fenpyroximate.

Οι πρότυπες ουσίες για τα φαρμακευτικά προϊόντα ήταν επίσης υψηλής καθαρότητας (>98%) και προμηθεύτηκαν όλες σε στερεά μορφή. Συγκεκριμένα, οι paracetamol, atenolol, bezafibrate, budesonide, bupropion, carbamazepine, cimetidine, citalopram, clozapine, fenofibrate, fluoxetine, haloperidol, phenazone, risperidone και

sertraline προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich (*Darmstadt, Germany*). Οι ουσίες olanzapine, amisulpride, amitriptyline, ketoprofen, paroxetine, quetiapine και venlafaxine αγοράστηκαν από την Technology Catalysts International (*Virginia, USA*), ενώ η ουσία mirtazapine και τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα D3-olanzapine, D10-carbamazepine, D4-haloperidol, D6-amitriptyline και D5-fluoxetine αγοράστηκαν από τον οίκο Analytical Standard Solutions, A2S (*Saint Jean d'Ilac, France*).

Οι πρότυπες ουσίες των βενζοδιαζεπινών alprazolam και diazepam υπάγονται σε ελεγχόμενη διανομή/διακίνηση και η εισαγωγή τους στην Ελλάδα υπόκειται σε διαδικασίες ελέγχου ναρκωτικών ουσιών (drug control). Λόγω αδυναμίας προμήθειάς τους χωρίς ειδική άδεια, προσφέρθηκαν ως δωρεά από την εταιρία Adelco (*Μοσχάτο, Αθήνα*).

Πρότυπα διαλύματα

Τα πυκνά πρότυπα διαλύματα (stock solutions) για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση παρασκευάστηκαν ξεχωριστά, σε συγκέντρωση 2000 mg L^{-1} . Γυάλινη ογκομετρική φιάλη των 10 mL τοποθετήθηκε σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων KERN ACS 80-4N (*Balingen, Germany*) και ζυγίστηκαν περίπου 20 mg από την κάθε ένωση (σε θερμοκρασία 20°C). Προστέθηκε μεθανόλη καθαρότητας LC-MS, η φιάλη πωματίστηκε με γυάλινο πώμα και ακολούθησε πρώτα διαλυτοποίηση με μηχανική ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης Vortex IR της STARLAB, (*Hamburg, Germany*) και στη συνέχεια παραμονή για δέκα λεπτά σε συσκευή υπερήχων Elmasonic P του οίκου Elma Schmidbauer (*Singen, Germany*). Τα ομογενοποιημένα διαλύματα ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητα τους με την καταγραφή ενός φάσματος μάζας τους και τελικά μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 8 mL αεροστεγώς κλεισμένα με πώμα και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Τα αραιωμένα πρότυπα διαλύματα εργασίας (working solutions) των επιλεγμένων ενώσεων και των μειγμάτων τους (μείγμα I, φυτοπροστατευτικές ενώσεις μείγμα II, φαρμακευτικές ενώσεις) καθώς και των δευτεριωμένων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα (IS), παρασκευάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις με κατάλληλες αραιώσεις σε μεθανόλη και σε νερό/μεθανόλη (90:10 v/v) με τη χρήση γυάλινων μικροσυρίγγων χωρητικότητας 5 μL , 10 μL , 50 μL , 100 μL , 250 μL και 500 μL , της εταιρίας Innovative Labor Systeme (*Stützerbach, Germany*). Τα διαλύματα εργασίας φυλάσσονταν στους 4°C αφού οι αναλυόμενες ουσίες δεν υφίστανται ουσιαστική διάσπαση για χρονικό διάστημα τουλάχιστον έξι μηνών [224]. Ωστόσο, όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο, η σταθερότητα τους μελετήθηκε για την αποφυγή συστηματικών σφαλμάτων.

Μελέτη σταθερότητας προτύπων διαλυμάτων (stability study)

Πολλές φυτοπροστατευτικές ή φαρμακευτικές ενώσεις, μπορεί να είναι ευαίσθητες στο φως (φυσικό ή τεχνητό) καθώς και σε ακραίες συνθήκες (υγρασία, pH). Με την έκθεσή τους στο φως ή σε ακραίες συνθήκες, οι ενώσεις αυτές μπορεί να διασπώνται ή να σχηματίζουν παραπροϊόντα. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της συγκέντρωσής τους στα πρότυπα διαλύματα κατά την αποθήκευση και κατά συνέπεια τη μείωση της απόκρισης τους στον ανιχνευτή μάζας. Επομένως, τα πρότυπα διαλύματα απαιτούν προσεκτικό χειρισμό κατά την αποθήκευση και συντήρηση αλλά και τακτικό έλεγχο της σταθερότητας (stability study) με την πάροδο του χρόνου ώστε να πληρούνται κατάλληλες συνθήκες. Είναι σημαντικό ο έλεγχος να πραγματοποιείται τακτικά τόσο στα πυκνά όσο και στα αραιωμένα διαλύματα. Εξίσου σημαντική είναι η σταθερότητα των αναλυτών στα εκχυλίσματα αν αυτά δεν αναλύονται αμέσως, για αυτό και προτιμάται η διατήρησή τους στην ψύξη ή κατάψυξη, αφού σε θερμοκρασία δωματίου η απώλεια ποσοστού των αναλυτών λόγω διάσπασης είναι πιθανή, ακόμα και μετά το τέλος όλης της πειραματικής διαδικασίας (π.χ. παραμονή των φιαλιδίων υγρής χρωματογραφίας πριν την είσοδό τους στον αυτόματο δειγματολήπτη).

Στην παρούσα Διατριβή, ο έλεγχος της σταθερότητας άρα και καταλληλότητας των προτύπων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας το αναλυτικό σήμα για την κορυφή του πρόσφατου και του αποθηκευμένου διαλύματος, με βάση την Εξίσωση 6.1:

$$\left(\frac{Area_{new} - Area_{old}}{Area_{old}} \right) \times 100\% \leq 5\% \quad (6.1)$$

Τα αποτελέσματα του ελέγχου σταθερότητας έδειξαν ότι οι μελετώμενες ενώσεις δεν εμφάνισαν φαινόμενα διάσπασης κατά την αποθήκευσή τους στο σκοτάδι, στους -20°C ακόμα και μετά από τρία χρόνια. Για τα αραιωμένα διαλύματα, η αποθήκευση στους 4°C μελετήθηκε για χρονικό διάστημα ενός έτους, χωρίς να παρατηρείται αξιοσημείωτη μεταβολή στις συγκεντρώσεις.

6.1.2 Διαλύτες

Οι διαλύτες μεθανόλη (methanol, MeOH) και ακετονιτρίλιο (acetonitrile, ACN) ήταν υψηλής καθαρότητας, κατάλληλοι για ανάλυση με υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (LC-MS grade) ενώ το διχλωρομεθάνιο (methyl chloride, DCM) ήταν καθαρότητας >99,5% και προμηθεύτηκαν από τη Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Η ακετόνη (acetone)

καθαρότητας >99,5% ήταν του οίκου Honeywell (*Morris Plains, NJ, USA*). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε υπερ-καθαρό νερό (ultra-pure water) αγωγιμότητας <0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, παρεχόμενο από τη συσκευή παραγωγής υπερ-καθαρού νερού Evoqua Ultrapure Water System Ultra Clear 20 TWF EDI (*Evoqua Water Technologies, Pittsburgh, USA*) σε όλα τα στάδια, πλην αυτού της παρασκευής του εκλουστικού συστήματος για τη χρωματογραφική διάταξη, όπου χρησιμοποιήθηκε νερό καθαρότητας LC-MS. Για τον τελικό καθαρισμό των γυάλινων σκευών χρησιμοποιήθηκε ακετόνη technical grade.

6.1.3 Αντιδραστήρια

Για τη ρύθμιση του pH των δειγμάτων, των διαλυτών έκλουσης ή των εκλουστικών συστημάτων χρησιμοποιήθηκαν μυρμηκικό οξύ (formic acid, FA) καθαρότητας 98–100% και οξικό οξύ (HAc) καθαρότητας 98–100%, του οίκου Merck (*Darmstadt, Germany*). Από τον ίδιο οίκο αγοράστηκε επίσης μυρμηκικό αμμώνιο (FNH_4) καθαρότητας 98–100%, διάλυμα αμμωνίας 25% και καυστικό νάτριο (NaOH) καθαρότητας 98%.

Για τη βελτιστοποίηση και εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS χρησιμοποιήθηκαν: άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) καθαρότητας 99,5%, οξικό νάτριο (sodium acetate, NaOAc), κιτρικό νάτριο 99% (tri-sodium citrate dehydrate) του οίκου Merck (*Darmstadt, Germany*), χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, NaCl) του οίκου Riedel de Haën (*Hannover, Germany*) και σεσκιυδρίτης διβασικού κιτρικού νατρίου 99% (sodium citrate dibasic sesquihydrate) του οίκου Sigma-Aldrich (*Steinheim, Germany*).

6.1.4 Προσοφητικά υλικά

Για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα υδατικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (divinylbenzene/N-vinylpyrrolidone copolymer cartridges, 200 mg, 6 mL) του οίκου Waters Corporation (*Milford, USA*), ενώ επίσης ελέγχθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis MCX (mixed mode cation exchange, 150 mg, 6 mL) του οίκου Waters (*Milford, USA*) και μικροστήλες εκχύλισης πυριτικής βάσης Chromabond C18 Hydra (octadecyl modified silica cartridges, 200 mg, 6 mL) του οίκου Macherey-Nagel (*Düren, Germany*). Για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προσοφητικά: Πρωτοταγής Δευτεροταγής Αμίνη, (Primary Secondary Amine, PSA, 40 μm), γραφίτοποιημένος ενεργός άνθρακας (graphitized

Carbon Black, GCB) του οίκου Agilent Technologies (*Waldbronn, Germany*) και C18, LiChroprep RP-18, 40–64µm, του οίκου Merck (*Darmstadt, Germany*).

6.1.5 Υλικά και σκεύη

Για τη συλλογή των δειγμάτων νερού χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης τύπου Niskin ενώ για τη συλλογή δειγμάτων ιζήματος δειγματολήπτης βυθού τύπου Van Veen. Για την προετοιμασία των δειγμάτων νερού χρησιμοποιήθηκαν διηθητικά φίλτρα από ίνες υαλοβάμβακα (glass fiber filters) GF/B, 0.7 mm του οίκου Whatman (*Maidstone, UK*) ενώ για το κοσκίνισμα των ιζημάτων χρησιμοποιήθηκαν κόσκινα 2 mm της εταιρίας Retsch (*Haan, Germany*). Κατά την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα ιζήματα και τον καθαρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου τύπου falcon της Sarstedt (*Nümbrecht, Germany*) από πολυπροπυλένιο, χωρητικότητας 50 mL και 15 mL αντίστοιχα.

Σε όλες τις περιπτώσεις, πριν από την έγχυση στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας, τα δείγματα διηθήθηκαν σε φίλτρα σύριγγας με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), με διάμετρο πόρων 0,22 µm και 0,45 µm, του οίκου Millipore (*Cork, Ireland*) με τη βοήθεια αποστειρωμένων συριγγών μιας χρήσης όγκου 1 mL ή 2,5 mL. Για την έγχυση και ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα φιαλίδια δειγμάτων (2 mL) με βιδωτό πώμα και septa και micro-inserts (200 µL), κατάλληλα για χρωματογραφία.

Άλλα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος περιλάμβαναν φιαλίδια των 8 mL με βιδωτά πώματα, κωνικές φιάλες 250 και 500 mL, φιάλες κενού του 1 L, ποτήρια ζέσης των 100, 250, 500 και 1000 mL, ογκομετρικές φιάλες των 10 και 100 mL και βαθμονομημένα σιφώνια των 1, 2, 5 και 10 mL. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν μαγνήτες ανάδευσης διαφόρων μεγεθών, πλαστικά ακρορύγχια για αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου, μεταλλικές σπάτουλες διαφόρων μεγεθών, ταινία parafilm, διηθητικό χαρτί, αλουμινόχαρτο και πλαστικές σακούλες τύπου “freezer bag” για την αποθήκευση των στερεών δειγμάτων.

6.1.6 Συσκευές

Για τις ζυγίσεις χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων KERN ACS 80-4N (*Balingen, Germany*). Για την παραλαβή και μεταφορά διαφόρων όγκων δείγματος χρησιμοποιήθηκαν αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (2-20 µL, 20-

200 μL, 100-1000 μL και 1000-5000) μL της Eppendorf (*Vienna, Austria*). Για τη λυοφιλίωση των δειγμάτων ιζήματος χρησιμοποιήθηκε συσκευή λυοφιλίωσης του οίκου Jouan, μοντέλο LP3 (*Saint-Herblain, France*). Για την αρχική ανακίνηση τους χρησιμοποιήθηκε επιδαπέδια συσκευή συνεχούς ανακίνησης του οίκου Edmund Buhler, μοντέλο P1 (*Tubigen, Germany*) και για την φυγοκέντρισή τους συσκευή φυγοκέντρισης μέγιστης ταχύτητας περιστροφής 4000 rpm του οίκου Jouan, μοντέλο B4i (*Saint-Herblain, France*). Η ανάδευση των δειγμάτων ιζήματος πραγματοποιούνταν σε συσκευή περιδίνησης Vortex IR της STARLAB, (*Hamburg, Germany*).

Για τη μέτρηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των υδατικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν συσκευή μέτρησης pH Consort C932 (*Turnhout, Belgium*) και αγωγιμόμετρο WTW LF 325-B (*Weilheim, Germany*). Για τη διήθηση χρησιμοποιήθηκε συσκευή διήθησης Millipore (*Darmstadt, Germany*) και για την ανάδευση μαγνητικός αναδευτήρας Daihan Labtech (*Wilmington, USA*). Επίσης, για την εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (SPE) χρησιμοποιήθηκε συσκευή εκχύλισης HyperSep Glass Block 60104-243 της ThermoFisher Scientific (*Rockwood, USA*) συνδεδεμένη με αντλία κενού της Rocker Scientific (*New Taipei City, Taiwan*), ενώ για την συμπύκνωση των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε θερμαινόμενη συσκευή συμπύκνωσης υπό ήπιο ρεύμα αζώτου Techne Dri-Block DB-3D (*Staffordshire, UK*).

Τέλος, για τη φύλαξη και συντήρηση των προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ψυγεία με θερμοκρασία λειτουργίας 4–8 °C και καταψύκτες ελάχιστης θερμοκρασίας -30 °C.

6.1.7 Χρωματογραφικό σύστημα

Για το διαχωρισμό και προσδιορισμό των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) συζευγμένο με ανιχνευτή μάζας LTQ/Orbitrap FT. Το σύστημα περιλαμβάνει αυτόματο δειγματολήπτη (Accela AS autosampler model 2.1.1), αντλία αυτόματης ροής δείγματος (Accela quaternary gradient UHPLC-pump model 1.05.0900) και φασματόμετρο μάζας, LTQ Orbitrap XL 2.5.5 SP1 της εταιρίας Thermo Fisher Scientific (*Bremen, Germany*). Το τμήμα της γραμμικής παγίδας ιόντων (LTQ) του υβριδικού αναλυτή μάζας είναι εξοπλισμένο με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού, Ion Max Electrospray Ionization (ESI) που λειτουργεί σε μέθοδο θετικών ή αρνητικών ιόντων. Ο έλεγχος του οργάνου και η περαιτέρω επεξεργασία του ακριβούς

φάσματος μάζας (mass range m/z 50–2000) με υψηλή διακριτική ικανότητα (60000 FWHM) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Xcalibur v. 2.2 της εταιρίας Thermo Electron (San Jose, CA, USA). Οι επιλεγμένοι αναλύτες διαχωρίστηκαν σε αναλυτική στήλη ανάστροφης φάσης SpeedCore PFP (pentafluorophenyl) (50 mm μήκος x 2,1 mm εσωτερική διάμετρος, 2,6 μm μέγεθος σωματιδίων, της εταιρίας Fortis Technologies (Cheshire, UK), ενώ δοκιμάστηκαν επίσης οι Hypersil GOLD (50 mm x 2,1 mm, 1,9 μm) της Thermo (Bremen, Germany) και Fortis Diphenyl (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) της Fortis Technologies (Cheshire, UK).

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή η σωστή λειτουργία του οργάνου απαιτεί την εβδομαδιαία βαθμονόμηση του με τη χρήση ενός διαλύματος καφεΐνης, MRFA (πεπτίδιο) και Ultramark 1621 (πολυμερές) στην λειτουργία θετικού ιοντισμού, ενώ στη λειτουργία αρνητικού ιοντισμού η βαθμονόμηση επιτυγχάνεται με τη χρήση μείγματος sodium dodecyl sulfate, sodium taurocholate και Ultramark 1621.

6.2 Δείγματα

6.2.1 Δείγματα για την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων

Για την ανάπτυξη και την επικύρωση των μεθόδων εκχύλισης συλλέχθηκαν δείγματα από την περιοχή της Ηπείρου (Βορειοδυτική Ελλάδα). Τα δείγματα περιλάμβαναν επιφανειακά νερά και ιζήματα.

Τα δείγματα θαλασσινού νερού συλλέχθηκαν από την παράκτια ζώνη της Ηπείρου (Ιόνιο Πέλαγος) ενώ τα δείγματα ποτάμιου νερού από τον ποταμό Λούρο, σε σημεία μακριά από έντονη κτηνοτροφική και ανθρωπογενή δραστηριότητα, ώστε να είναι θεωρητικά μη επιβαρυσμένα με σημαντικό ρυπαντικό φορτίο. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε προπλυμένες γυάλινες σκουρόχρωμες φιάλες χωρητικότητας 2.5 L. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό ψύξη, αμέσως μετά την άφιξη διηθήθηκαν σε φίλτρα από ίνες υαλοβάμβακα διαμέτρου 0.7 mm και φυλάχθηκαν στους 4° C μέχρι την εκτέλεση των εκχυλίσεων.

Τα δείγματα ιζημάτων συλλέχθηκαν με δειγματολήπτη βυθού τύπου Van Veen από τα ίδια σημεία, ταυτόχρονα με τα δείγματα νερού. Κάθε δείγμα, τοποθετήθηκε σε δοχείο μιας χρήσης από αλουμίνιο, το οποίο είχε προηγουμένως πλυθεί με ακετόνη. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό ψύξη, όπως και τα δείγματα νερού. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκαν από αυτά τυχόν ξένα σώματα (πέτρες, φύκια, χόρτα κλπ.), καταψύχθηκαν στους -20 °C και ακολούθησε λυοφιλίωση σε θερμοκρασία -49 °C, υπό κενό (10^{-2} bar) για 48

ώρες. Τα λυοφιλωμένα δείγματα ομογενοποιήθηκαν, κοσκινίστηκαν (διάμετρος πόρων κόσκινου 2 mm) και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

Τα δείγματα αναμειγνύονταν ισχυρά για την εξασφάλιση της ομογενοποίησης και αντιπροσωπευτικότητας του δείγματος. Το τελικό δείγμα προς εκχύλιση, χωρίστηκε σε ίσους όγκους ή ποσότητες για τα νερά και τα ιζήματα αντίστοιχα και τα νέα δείγματα που προέκυψαν αναδεύτηκαν ή ανακινήθηκαν αντίστοιχα, εκ νέου. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη και επικύρωση των μεθόδων εκχύλισης, αναλύθηκαν προηγουμένως για να διασφαλιστεί η απουσία των προς μελέτη ενώσεων.

6.2.2 Πραγματικά δείγματα

Η μελέτη των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε δείγματα νερών και ιζημάτων που συλλέχθηκαν (α) από τους ποταμούς Λούρο και Άραχθο καθώς και (β) από περιοχές πλησίον υδατοκαλλιεργειών. Στη δεύτερη περίπτωση τα δείγματα αποτέλεσαν παράλληλη εργασία του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος “*Real-time monitoring of sea contaminants using a lab-on-a-chip biosensor*” με διάρκεια τριών ετών. Συνολικά έξι εργαστήρια από χώρες μέλη της ΕΕ, συμπεριλαμβανομένου του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, πραγματοποίησαν σημειακή δειγματοληψία σε επτά χώρες: Ελλάδα, Αλβανία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία και Ηνωμένο Βασίλειο. Η συλλογή, μεταφορά, διανομή και αποθήκευση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το προβλεπόμενο πρωτόκολλο το οποίο ακολουθεί τα πρότυπα που ορίζουν οι οδηγίες της ΕΕ.

Για τη συλλογή δειγμάτων νερού χρησιμοποιήθηκαν σκουρόχρωμες γυάλινες φιάλες και πλαστικές φιάλες PET, ενώ για τα δείγματα των ιζημάτων αποστειρωμένοι δίσκοι αλουμινίου και σακούλες από πολυαιθυλένιο. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό ψύξη, την ίδια μέρα της δειγματοληψίας, από το πεδίο δειγματοληψίας στο εκάστοτε υπεύθυνο εργαστήριο για την αποστολή των δειγμάτων στα υπόλοιπα. Κάθε δείγμα, καταχωρήθηκε με μοναδικό κωδικό για τη διασφάλιση της ιχνηλασιμότητας (traceability). Οι κωδικοποιημένες πληροφορίες περιλάμβαναν τη χώρα προέλευσης του εργαστηρίου που πραγματοποίησε τη δειγματοληψία, επομένως και χώρα προέλευσης του δείγματος, το υπόστρωμα, και τον αριθμό του δείγματος (sample replicate). Τα δείγματα αρχικά καταψύχθηκαν και έπειτα απεστάλησαν και διανεμήθηκαν με τη χρήση ξηρού πάγου, προς αποφυγή απόψυξης. Κατά την παραλαβή το υπεύθυνο εργαστήριο για την ανάλυση, καταχωρούσε το κάθε δείγμα με

το δικό του εσωτερικό κωδικό. Στην περίπτωση που τα δείγματα δεν αναλύθηκαν αμέσως μετά την παραλαβή, αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20°C) μέχρι την ανάλυσή τους.

6.2.3 Εμβολιασμός δειγμάτων

6.2.3.1 Ιζήματα

Για τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου, ποτάμια και θαλάσσια ιζήματα με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εμβολιάστηκαν χωριστά κάθε φορά με το μείγμα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών (μείγμα I) και φαρμακευτικών ενώσεων (μείγμα II), αφού πρώτα αναλύθηκαν για να διασφαλιστεί η απουσία ιχνών των αναλυτών.

Για τον εμβολιασμό, 20 mL πρότυπου μείγματος των επιλεγμένων ενώσεων προστέθηκαν σε 20 g ξηρού ιζήματος μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρου από πολυαιθυλένιο ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις στο ιζήμα να κυμαίνονται από 5 έως 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Ο χρόνος παραμονής (residence time) ελέγχθηκε σε προκαταρκτικό πείραμα και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακμάνσεις στη συγκέντρωση των επιλεγμένων ενώσεων όταν η ανάλυση πραγματοποιήθηκε 30 min, 3, 5, 7 και 12 h μετά τον εμβολιασμό. Έτσι, αφού πρώτα τα εμβολιασμένα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά στη συσκευή περιδίνησης, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στη συσκευή συνεχούς ανακίνησης, σε θερμοκρασία δωματίου για 12h, ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής αλληλεπίδραση των αναλυτών με το υπόστρωμα. Πριν την εκχύλιση, το εμβολιασμένο δείγμα παρέμεινε για λίγο ανοιχτό σε θερμοκρασία δωματίου για επιβεβαίωση της εξάτμισης όλου του διαλύτη. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε επίπεδο εμβολιασμού. Μετά το τέλος της προκατεργασίας, τα δείγματα ήταν έτοιμα για εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS.

6.2.3.2 Νερά

Για τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου, δείγματα νερού εμβολιάστηκαν με τα μείγματα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων, αφού πρώτα αναλύθηκαν για να διασφαλιστεί η απουσία ιχνών των αναλυτών. Κατάλληλος όγκος διαλύματος των επιλεγμένων ενώσεων και του μείγματος εσωτερικού προτύπου στην περίπτωση των φαρμακευτικών προστέθηκε σε 250 mL νερού ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση από 5 ng L^{-1} – 500 ng L^{-1} και στη συνέχεια τα δείγματα εκχυλίστηκαν με SPE.

6.3 Μέθοδοι

6.3.1 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Αναπτύχθηκαν δύο διαφορετικά αναλυτικά πρωτόκολλα για την εκχύλιση διά της στερεάς φάσης. Το πρώτο αφορά την εκχύλιση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και το δεύτερο των φαρμακευτικών.

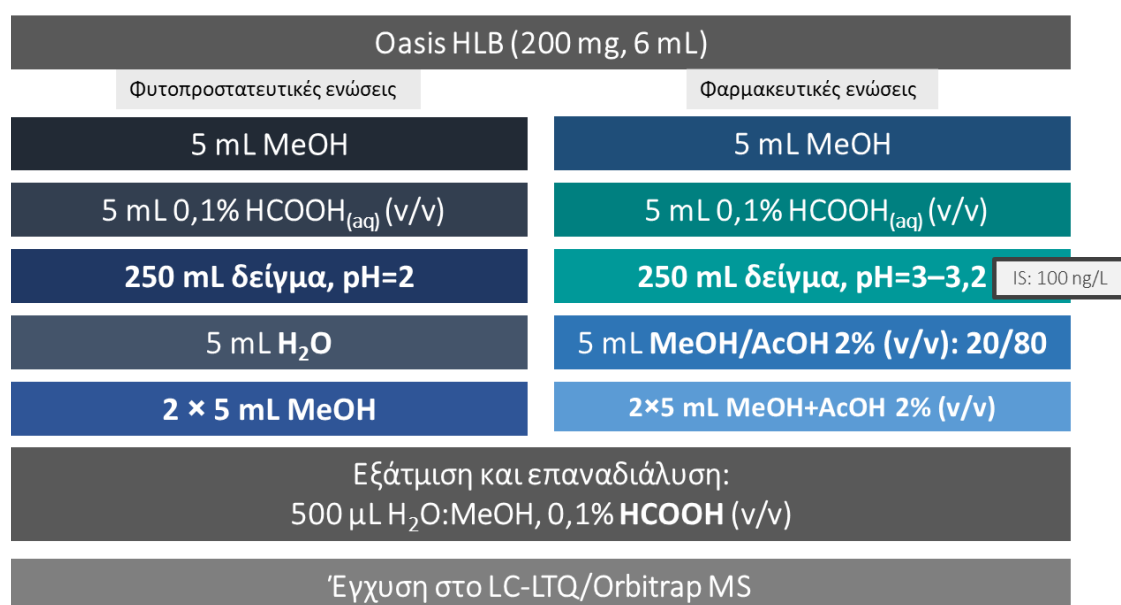
1^ο πρωτόκολλο (φυτοπροστατευτικές ενώσεις)

Οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (200 mg, 6 mL) τοποθετούνταν σε συσκευή εκχύλισης συνδεδεμένη με αντλία κενού. Η ενεργοποίηση της μικροστήλης πραγματοποιήθηκε με διαδοχική προσθήκη 5 mL μεθανόλης και 5 mL νερού LC-MS τα οποία εκλούονταν από τις μικροστήλες με εφαρμογή κενού και ρυθμό ροής $\approx 1 \text{ mL min}^{-1}$. Αμέσως μετά την ενεργοποίηση και πριν στεγνώσει το προσροφητικό υλικό, 250 mL του υδατικού δείγματος εκχυλίζονταν διερχόμενα από τις μικροστήλες με εφαρμογή κενού και ρυθμό ροής $\approx 2 \text{ mL min}^{-1}$. Στο τέλος της εκχύλισης και πριν στεγνώσουν, οι μικροστήλες εκπλένονταν με 5 mL υπερ-καθαρού νερού και αφήνονταν υπό κενό για 30 min, για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας. Ακολουθούσε έκλουση με 2x5 mL μεθανόλη, υπό κενό, με ταχύτητα ροής 2 mL min^{-1} .

2^ο πρωτόκολλο (φαρμακευτικές ενώσεις)

Τα δείγματα νερού αρχικά οξινίζονταν με μυρμηκικό οξύ (pH=3–3,2) και εμβολιάζονταν με το μείγμα των ισοτοπικά σημασμένων εσωτερικών προτύπων (IS). Οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (200 mg, 6 mL) τοποθετούνταν σε συσκευή εκχύλισης συνδεδεμένη με αντλία κενού. Η ενεργοποίηση της μικροστήλης πραγματοποιήθηκε με διαδοχική προσθήκη 5 mL μεθανόλης και 5 mL υδατικού διαλύματος 0,1% HCOOH (v/v), τα οποία εκλούονταν από τις μικροστήλες με εφαρμογή κενού και ρυθμό ροής $\approx 1 \text{ mL min}^{-1}$. Αμέσως μετά την ενεργοποίηση και πριν στεγνώσει το προσροφητικό υλικό, 250 mL του οξινισμένου υδατικού δείγματος εκχυλίζονταν διερχόμενα από τις μικροστήλες με εφαρμογή κενού και ρυθμό ροής $\approx 2 \text{ mL min}^{-1}$. Στο τέλος της εκχύλισης και πριν στεγνώσουν, οι μικροστήλες εκπλένονταν με 5 mL διαλύματος μεθανόλη/οξικό οξύ [2% (v/v)] σε αναλογία 20/80 και αφήνονταν υπό κενό για 30 min, για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας. Ακολουθούσε έκλουση με 2 x 5 mL οξινισμένης μεθανόλης [2% οξικό οξύ (v/v)], υπό κενό, με ταχύτητα ροής 2 mL min^{-1} .

Τα εκλούσματα και στις δύο περιπτώσεις συμπυκνώνονταν κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου στους 30 °C και επαναδιαλύονταν σε 500 µL 0,1% μυρμηκικό οξύ σε νερό/μεθανόλη 90/10 (v/v). Τα τελικά εκχυλίσματα λαμβάνονταν με πιπέτες pasteur και διηθούνταν μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE, 0,45 µm για να μεταφερθούν τελικά σε γυάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτά πώματα με septa teflon – σιλικόνης, συμβατά με αυτόματους δειγματολήπτες για τη χρωματογραφική ανάλυση. Η πειραματική πορεία συνοψίζεται στο Σχήμα 6.1.

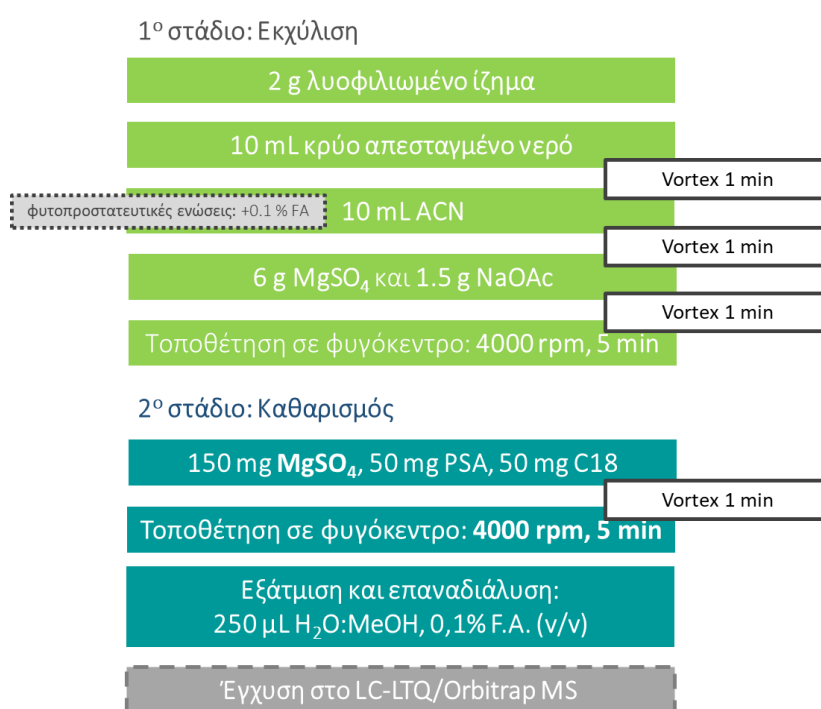


Σχήμα 6.1 Πειραματική πορεία εκχύλισης υδατικών δειγμάτων με την τεχνική SPE

6.3.2 Εκχύλιση QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

Στο πρώτο στάδιο της εκχύλισης, 2 g λυοφιλιωμένου και ομογενοποιημένου δείγματος ιζήματος ζυγίζονται και τοποθετούνται σε σωλήνες πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL. Στη συνέχεια προστίθονται 10 mL κρύου απεσταγμένου νερού, το δείγμα παρέμενε 10 min για επαρκή επανυδάτωση του ιζήματος, ανακινούνται για 1 min σε vortex και έπειτα προστίθονται 10 mL ACN με 0,1% οξικό οξύ στην περίπτωση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και ACN χωρίς οξίνιση στην περίπτωση των φαρμακευτικών. Ο δοκιμαστικός σωλήνας κλεινόταν ερμητικά και ανακινούνται 1 min σε vortex (4000 rpm). Ακολούθως προστίθονται 6 g MgSO₄ και 1,5 g NaAcetate και ο σωλήνας ανακινούνται αμέσως μετά την προσθήκη για 1 min χειροκίνητα για την παρεμπόδιση σχηματισμού κρυσταλλικών συσσωματωμάτων και για να εξασφαλιστεί επαρκής αλληλεπίδραση διαλυτή με όλο το δείγμα και 1 min στο vortex. Ακολουθούσε φυγοκέντριση για 5 min στις 4000 rpm.

Το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) διεξαγόταν με υγρή–στερεή εκχύλιση σε διασπορά (dispersive SPE). Κατά τη φάση αυτή, κλάσμα από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφερόταν σε σωλήνα φυγοκέντρισης των 15mL ο οποίος περιείχε 150 mg MgSO₄, 50 mg PSA, 50 mg C18 για κάθε mL εκχυλίσματος. Ακολουθούσε έντονη ανάδευση στο vortex για 1 min και φυγοκέντριση για 5 min στις 4000 rpm. Κάθε έκλουσμα συμπυκνωνόταν κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου, στους 30 °C, και επαναδιαλυόταν σε 200 μL 0,1% μυρμηκικό οξύ σε νερό/μεθανόλη 90/10 (v/v). Τα τελικά εκχυλίσματα λαμβάνονταν με πιπέτες pasteur και διηθούνταν μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE, 0.22 μm για να μεταφερθούν τελικά σε υάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτά πώματα με septa τεφλόν–σιλικόνης, συμβατά με αυτόματους δειγματολήπτες για τη χρωματογραφική ανάλυση. Η πειραματική πορεία συνοψίζεται στο Σχήμα 6.2.



Σχήμα 6.2 Πειραματική πορεία εκχύλισης ιζημάτων με τη μέθοδο QuEChERS

6.3.3 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας

Κατά το χρωματογραφικό διαχωρισμό, οι επιλεγμένες ενώσεις μελετήθηκαν και αναλύθηκαν σε δύο μείγματα: το μείγμα (I) περιλάμβανε τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις και το μείγμα (II) περιλάμβανε όλες τις φαρμακευτικές ενώσεις. Η χρωματογραφική ανάλυση

και στις δυο περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε με βαθμωτό πρόγραμμα έκλουσης, όπου η κινητή φάση αποτελούνταν από (Α) νερό (0,1% FA) και (Β) μεθανόλη (0,1% FA).

Για το διαχωρισμό των ενώσεων του μείγματος Ι, χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης συνολικής διάρκειας 8 λεπτών. Η αρχική σύσταση διαλυτών ήταν 90% (Α) και 10% (Β). Η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή για 0,6 min και στη συνέχεια το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε έως ότου φτάσει το 100% στα 5 min, οπότε και διατηρήθηκε σταθερή για 1,3 λεπτά. Τελικά το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Η ταχύτητα ροής (flow rate) ήταν σταθερή στα 400 $\mu\text{L min}^{-1}$ και ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) ήταν 5 μL . Η θερμοκρασία του φούρνου (oven temperature) ήταν σταθερή στους 27 $^{\circ}\text{C}$. Το βαθμωτό πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον Πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1 Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης (φυτοπροστατευτικές ενώσεις)

Χρόνος (min)	% A (H ₂ O, 0,1% FA)	% B (MeOH, 0,1% FA)	Ταχύτητα ροής ($\mu\text{L min}^{-1}$)
0	90	10	400
0,6	90	10	400
5,1	0	100	400
6,3	10	100	400
8	90	10	400
10	90	10	400

Για το διαχωρισμό των ενώσεων του μείγματος ΙΙ, χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης συνολικής διάρκειας 8 λεπτών με αρχική σύσταση διαλυτών 90% (Α), 10% (Β). Η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή για 0,5 min και στη συνέχεια το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε έως ότου φτάσει το 30% στα 2 min. Το ποσοστό μεθανόλης αυξήθηκε εκ νέου σε 100% έως τα 4 min και παρέμεινε σταθερό για άλλο 1 min. Στη συνέχεια η σύσταση επανήλθε στις αρχικές συνθήκες όπου και παρέμεινε για 1 min. Η ταχύτητα ροής ήταν σταθερή στα 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ και ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 5 μL . Η θερμοκρασία του φούρνου (oven temperature) ήταν σταθερή στους 30 $^{\circ}\text{C}$. Το βαθμωτό πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2 Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης (φαρμακευτικές ενώσεις)

Χρόνος (min)	% A (H ₂ O, 0,1% FA)	% B (MeOH, 0,1% FA)	Ταχύτητα ροής ($\mu\text{L min}^{-1}$)
0	90	10	300
0,5	90	10	300
2	30	70	300
4	0	100	300

Χρόνος (min)	% A (H ₂ O, 0,1% FA)	% B (MeOH, 0,1% FA)	Ταχύτητα ροής (μL min ⁻¹)
5	0	100	300
5,1	90	10	300
8	90	10	300

Για τον καθορισμό του χρόνου κατακράτησης των προς ανάλυση ενώσεων και την επιλογή των ιόντων (m/z) για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (full-scan mode) στη μέθοδο θετικού ιοντισμού (positive ion mode) και για εύρος μαζών από 120 έως 600. Για την ταυτοποίηση επιλέχθηκαν τα ψευδο-μοριακά ιόντα $[M+H]^+$ (με εξαίρεση την ένωση fenofibrate όπως θα σχολιαστεί παρακάτω) από το φάσμα πλήρους σάρωσης. Για την επιβεβαίωση στην περίπτωση θετικών ανιχνεύσεων χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα (data dependent, dd MS/MS) και επιλέχθηκε η τεχνική θραυσματοποίησης CID (collision induced dissociation) με εφαρμογή ενέργειας θραύσης 35%. Οι βασικές παράμετροι της φασματομετρίας μάζας μετά τη βελτιστοποίηση φαίνονται στον Πίνακα 6.3.

Πίνακας 6.3 Παράμετροι λειτουργίας στο LTQ/Orbitrap MS/MS

Παράμετροι	Τιμές
Πλήρης Σάρωση(full scan)	
Εύρος μαζών	120–600 Da
Δυναμικό ψεκασμού (spray voltage)	3,7 kV
Διακριτική ικανότητα (resolution)	60000 FWHM
Δυναμικό μεταλλικού τριχοειδούς (capillary voltage)	40 V
Δυναμικό δακτυλιοειδούς φακού (tube lens)	110 V
Ροή αερίου περιβάλλουσας ροής (sheath gas)	42 au
Ροή αερίου αποδιαλύτωσης (auxiliary gas flow)	11 au
Θερμοκρασία μεταλλικού τριχοειδούς (capillary temperature)	320 °C
Σχετικό σφάλμα μάζας m/z (mass tolerance)	<5 ppm
Automatic gain control (AGC) target	10 ⁶
Σάρωση εξαρτώμενη από δεδομένα (dd MS/MS mode)	
Τεχνική θραυσματοποίησης	Collision Induced Dissociation (CID)
Ενέργεια θραύσης (normalized collision energy, NCE)	35%
Διακριτική ικανότητα (resolution)	15000

6.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός κατά την υγρή χρωματογραφία-φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και υψηλής ακρίβειας μάζας στηρίχθηκε στα προβλεπόμενα κατά την ΕΕ κριτήρια [117, 225].

Ο (σχετικός) χρόνος κατακράτησης (retention time, t_R) της προσδιοριζόμενης ένωσης στο προς ανάλυση δείγμα, πρέπει να συμφωνεί με εκείνον του προτύπου βαθμονόμησης (το οποίο πιθανώς έχει παρασκευασθεί στο αντίστοιχο υπόστρωμα), με επίπεδο ανοχής $\pm 0,1$ min. Μεγαλύτερες αποκλίσεις από το όριο αυτό είναι αποδεκτές όταν τόσο ο χρόνος κατακράτησης όσο και το σχήμα της χρωματογραφικής κορυφής ταιριάζουν με αυτά των κατάλληλων ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων, όταν αυτά είναι διαθέσιμα και έχουν χρησιμοποιηθεί, ή όταν στοιχεία από τη διαδικασία αξιολόγησης της αναλυτική μεθόδου που χρησιμοποιείται είναι διαθέσιμα. Τα ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα αποδεικνύονται ιδιαίτερα χρήσιμα στην περίπτωση όπου κατά τη χρωματογραφική ανάλυση υπεισέρχονται μεταβολές στους χρόνους κατακράτησης ή παραμορφώσεις των κορυφών λόγω του υποστρώματος. Τέλος, επιπλέον εμβολιασμός (overspiking) του δείγματος με τον πιθανό αναλύτη (suspect analyte) που υπάρχει στο δείγμα, συνεισφέρει σημαντικά στην επιβεβαίωση ταυτοποίησης

Για να θεωρηθεί μια ανίχνευση θετική θα πρέπει:

-Να υπάρχουν στο φάσμα δυο ιόντα με ακρίβεια μάζας μικρότερη από 5 ppm ή 1 mDa στην περίπτωση που το m/z είναι μικρότερο από 200. Κατά προτίμηση, στα ιόντα αυτά να συμπεριλαμβάνονται το (πρωτονιωμένο) μοριακό ιόν στην περίπτωση θετικού ιοντισμού ή η χαρακτηριστική ένωση προσθήκης του μοριακού ιόντος (adduct ion) και ένα τουλάχιστον ιόν θραυσματοποίησης.

-Για το λόγο σήματος προς θόρυβο πρέπει να ισχύει $S/N \geq 3$. Στην περίπτωση απουσίας θορύβου, θα πρέπει να υπάρχει σήμα σε τουλάχιστον πέντε διαδοχικές σαρώσεις. Επίσης, οι κορυφές των μητρικών και των θυγατρικών ιόντων πρέπει να αλληλεπικαλύπτονται πλήρως.

-Η διακριτική ικανότητα (R) πρέπει τυπικά να είναι μεγαλύτερη από 10^4 για όλο το εύρος τιμών της μάζας με διακύμανση 10%.

Η μεταβλητότητα της ιοντικής αναλογίας στην περίπτωση της φασματομετρίας μάζας υψηλής διαχωριστικής ικανότητας/υψηλής ακρίβειας μάζας επηρεάζεται τόσο από το λόγο S/N των κορυφών στα χρωματογραφήματα επιλεγμένων ιόντων (extracted ion chromatograms, XICs) αλλά επίσης από τον τρόπο με τον οποίο παρήχθησαν τα ιοντικά θραύσματα και τη φύση του υποστρώματος. Για παράδειγμα, το εύρος των επιλεγμένων μητρικών ιόντων προς θραυσματοποίηση σε μια σάρωση ('all ions', εύρος μητρικών ιόντων

100 Da, 10 Da ή 1 Da) συνεπάγεται διαφορετικούς πληθυσμούς ιόντων του υποστρώματος στο θάλαμο θραυσματοποίησης (collision cell) με αποτέλεσμα η θραυσματοποίηση να είναι διαφορετική σε σχέση με αυτή ενός προτύπου στο διαλύτη. Επίσης, η αναλογία δυο ιόντων παραγόμενων στην ίδια θραυσματοποίηση (fragmentation scan event) τείνει να είναι σταθερότερη συγκριτικά με την αναλογία ενός μητρικού ιόντος από ένα φάσμα πλήρους σάρωσης και ένα ιόν θραυσματοποίησης από μια σάρωση θραυσματοποίησης. Για αυτό το λόγο, στην περίπτωση της φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας δεν υπάρχει προκαθορισμένη τιμή ιοντικής αναλογίας ως κριτήριο. Η πρόσθετη παράμετρος της ακριβούς μέτρησης μάζας, καθιστά λιγότερο κρίσιμη την αντιστοίχιση των ιοντικών αναλογιών. Ωστόσο, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως ενδεικτικό κριτήριο και τυχόν αποκλίσεις πέρα από το περιθώριο του 30% θα πρέπει να επανεξετάζονται.

Στην περίπτωση των θετικών ανιχνεύσεων η επιβεβαίωση πραγματοποιήθηκε με τη λήψη του φάσματος MS^2 και με τη βοήθεια εσωτερικής βάσης δεδομένων για τα ιόντα θραυσματοποίησης, η οποία είχε προηγουμένως ελεγχθεί σε σύγκριση με την on-line ελεύθερης πρόσβασης βάση δεδομένων *m/z* cloud (<https://www.mzcloud.org/>).

Για περαιτέρω επιβεβαίωση των θετικών ανιχνεύσεων, χρησιμοποιήθηκε το ισοτοπικό προφίλ της ένωσης στο φάσμα μάζας (όταν στην προσδιοριζόμενη ένωση υπήρχαν ετεροάτομα όπως Cl, Br, S κ.ά.), Για παράδειγμα, η παρουσία ενός ατόμου χλωρίου στο μόριο της προσδιοριζόμενης ένωσης, είχε ως αποτέλεσμα την παρουσία στο φάσμα μάζας του $M+2$ σε ένταση $1/3$ ως προς το $M+$, η παρουσία ενός ατόμου βρωμίου $M+2$ ισοϋψές με το $M+$ κ.ο.κ.

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των επιλεγμένων ενώσεων στα πραγματικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς με προσομοίωση υποστρώματος.

Σύμφωνα με τις Οδηγίες της ΕΕ, στην περίπτωση που η αρχική ανάλυση δεν οδηγεί σε αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση ή δεν πληροί όλα τα κριτήρια για ποσοτική ανάλυση, απαιτείται περαιτέρω επιβεβαίωση. Η επιβεβαίωση αυτή μπορεί να επιτευχθεί με επανάληψη της ανάλυσης του δείγματος, επαναλαμβάνοντας όλη τη διαδικασία. Στην περίπτωση που η συγκέντρωση στο αναλυθέν δείγμα ξεπερνά κάποιο προβλεπόμενο όριο, τότε συνιστάται να πραγματοποιηθεί επανάληψη της ανάλυσης χρησιμοποιώντας διαφορετικό κλάσμα του ίδιου δείγματος. Επίσης, επανάληψη της ανάλυσης προτείνεται σε περιπτώσεις που παρατηρούνται ασυνήθιστοι συνδυασμοί προσδιοριζόμενης ουσίας/ υποστρώματος. Αν τα αποτελέσματα δεν είναι τελικά αξιόπιστα με κανένα από τους

παραπάνω τρόπους, τότε καταφεύγουμε σε χρήση διαφορετικών τεχνικών προσδιορισμού ή επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων από ανεξάρτητα εξειδικευμένα εργαστήρια.

6.5 Επικύρωση μεθόδων

Η επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων στις εργαστηριακές συνθήκες πραγματοποιήθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα με βάση τις ισχύουσες οδηγίες 2002/657/ΕΚ, SANTE 11845/2017 και 96/23/ΕΚ.

Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε ως συνδυασμός της επί τοις εκατό ανάκτησης (% recovery, R) και της πιστότητας. Η πιστότητα είναι εκφρασμένη ως επαναληψιμότητα εντός της ίδιας ημέρας (repeatability, RSD_r) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (within-lab-reproducibility, RSD_{wr}). Μελετήθηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (method detection limits, MDL) και ποσοτικοποίησης (method quantification limits, MQL) της μεθόδου, η γραμμικότητα (linearity) και η επίδραση του υποστρώματος (matrix effect). Τέλος, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα όλης της αναλυτικής διαδικασίας (process efficiency, PE), εκφρασμένη ως %PE, συνεκτιμώντας τις ανακτήσεις και την επίδραση του υποστρώματος. Ο Πίνακας 6.4 συνοψίζει τις απαιτήσεις για την επικύρωση των μεθόδων που προορίζονται για ποσοτικό προσδιορισμό, όπως περιγράφονται στην πιο πρόσφατη Ευρωπαϊκή οδηγία: [117]

Πίνακας 6.4 Χαρακτηριστικά επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων

Παράμετρος	Τρόπος ελέγχου	Κριτήρια
Γραμμικότητα	Έλεγχος σε πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων	Απόκλιση C _{ΠΕΙΡ} , C _{ΘΕΩΡ} ≤20%
Επίδραση υποστρώματος	Σύγκριση της απόκρισης του ανιχνευτή για διαλύματα παρασκευασμένα σε διαλύτη και σε εκχύλισμα από το υπόστρωμα	ME>20%: ποσοτικοποίηση με καμπύλες αναφοράς προσομοιωμένες στο υποστρώμα
MQL	Έλεγχος αν το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού πληροί τα κριτήρια επίδοσης της μεθόδου ως προς την ακρίβεια και την πιστότητα	≤MRL (αν υπάρχει)
Ακρίβεια (ορθότητα, συστηματικό σφάλμα)	Υπολογισμός μέσης ανάκτησης για όλα τα επίπεδα εμβολιασμού	70% – 120%
Επαναληψιμότητα (εντός ίδιας ημέρας)	Υπολογισμός %RSD _r για κάθε επίπεδο εμβολιασμού που ελέγχθηκε	≤20%
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	Υπολογισμός %RSD _{wr} σε διαδοχικές ημέρες	≤20%

Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπυλών αναφοράς με προσομοίωση υποστρώματος (matrix-matched calibration curves), ενώ για τις φαρμακευτικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον τα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα (τα κριτήρια επιλογής τους περιγράφηκαν αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο). Στη μέθοδο αυτή, στα πρότυπα διαλύματα της καμπύλης αναφοράς (παρασκευασμένα σε εκχύλισμα υποστρώματος) και στα άγνωστα δείγματα προστίθεται ίδια συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου. Η συγκέντρωσή του επιλέγεται έτσι, ώστε το σήμα του να είναι παρόμοιου μεγέθους με τα αναμενόμενα άγνωστα. Μετρούνται τα εμβαδά των ενώσεων ($Area_x$) και των εσωτερικών προτύπων ($Area_{IS}$) και ο λόγος $Area_x / Area_{IS}$ χρησιμοποιείται ως το «διορθωμένο σήμα» του αγνώστου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ή/και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αγνώστου.

Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν με την πραγματοποίηση πέντε διαδοχικών εκχυλίσεων ($n=5$) δειγμάτων εμβολιασμένων σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Ταυτόχρονα εκχυλίστηκε για κάθε υπόστρωμα και ένα τυφλό δείγμα, ώστε η συγκέντρωση τυχόν αναλυτών που υπήρχαν στο δείγμα πριν τον εμβολιασμό να αφαιρεθεί από τις συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν για τα εμβολιασμένα δείγματα. Για τον υπολογισμό της % ανάκτησης συγκρίθηκε η συγκέντρωση μετά την εφαρμογή της εκχύλισης με την αρχική σύγκέντρωση εμβολιασμού, με βάση την Εξίσωση 6.1:

$$\%R = \frac{C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{τυφλού}}}{C_{\text{θεωρητική (εμβολιασμού)}}} \times 100 \quad (6.1)$$

Τα όρια ανίχνευσης προσδιορίστηκαν ως η συγκέντρωση του εμβολιασμένου δείγματος για την οποία η αναλογία του σήματος του αναλύτη προς το θόρυβο του οργάνου είναι ίση με 3 ($S/N = 3$), ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης ως η αντίστοιχη συγκέντρωση του δείγματος που αντιστοιχεί σε σήμα ίσο με 10 φορές το θόρυβο του οργάνου.

Η γραμμικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με τη βοήθεια καμπύλης εννέα σημείων η οποία κάλυπτε εύρος συγκεντρώσεων από το όριο ποσοτικοποίησης (MQL) της κάθε ένωσης έως περίπου 100 φορές την τιμή αυτή (100 MQL). Για τον έλεγχο της γραμμικότητας εξετάστηκε αν η ευθεία ακολουθεί τη γραμμική παλινδρόμηση, της οποίας οι συντελεστές υπολογίζονται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Η πιστότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε ως η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) που προκύπτει για πέντε διαδοχικές εκχυλίσεις ($n=5$) εμβολιασμένου δείγματος την ίδια ημέρα, οπότε εκφράζει την επαναληψιμότητα (repeatability, RSD_r) καθώς και για την ίδια διαδικασία σε τρεις διαφορετικές μέρες ($n=15$)

οπότε εκφράζει την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility, RSD_R). Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης που θεωρούνται αποδεκτές είναι $\leq \pm 20\%$.

Ο έλεγχος της σταθερότητας του συστήματος πραγματοποιήθηκε μέσω του εσωτερικού ποιοτικού ελέγχου (internal quality control). Για αυτό, πρότυπη καμπύλη αναφοράς με προσομοίωση υποστρώματος πέντε σημείων σε εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ των ορίων ποσοτικοποίησης και 10 φορές των ορίων ποσοτικοποίησης προετοιμαζόταν και αναλυόταν στην αρχή και στο τέλος κάθε παρτίδας δειγμάτων (batch). Η παρασκευή της καμπύλης έλαβε χώρα με εμβολιασμό προτύπου μείγματος των ενώσεων και των εσωτερικών προτύπων σε εκχυλίσματα τυφλών (blank) δειγμάτων νερού και ιζήματος, τα οποία δεν περιείχαν υπολείμματα των αναλυτών και υποβλήθηκαν στην ίδια αναλυτική διαδικασία εκχύλισης με τα δείγματα. Επίσης, γινόταν έγχυση δύο δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου (quality control, QC) τα οποία ήταν δείγματα νερού ή ιζήματος, εμβολιασμένα με συγκέντρωση ίση με το όριο ποσοτικοποίησης και 10 φορές το όριο ποσοτικοποίησης, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, αφαιρούνταν η συγκέντρωση των τυφλών δειγμάτων (αν ήταν απαραίτητο) και οι ανακτήσεις που προέκυπταν χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό των αγνώστων συγκεντρώσεων.

Σύμφωνα με την οδηγία SANTE 11813/2017 [117], τα αποδεκτά όρια για τις μεμονωμένες ανακτήσεις θα πρέπει να κυμαίνονται στο εύρος της μέσης ανάκτησης εντός περιθωρίου $\pm 2 \times RSD$. Πρακτικά, για τις μεμονωμένες ανακτήσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια «κλίμακα εξ'ορισμού» στο εύρος 60 – 140%, η οποία θα αφορά τις αναλύσεις ρουτίνας. Οι ανακτήσεις που βρίσκονται εκτός του παραπάνω ορίου, κανονικά απαιτούν να επαναληφθεί όλη η σειρά των αναλύσεων (batch), ωστόσο υπό ορισμένες δικαιολογημένες συνθήκες τα αποτελέσματα μπορεί να είναι αποδεκτά. Παρόλα αυτά, σταθερά υψηλές ανακτήσεις ή $RSDs$ εκτός του περιθωρίου του $\pm 20\%$ θα πρέπει να διερευνώνται περαιτέρω.

Στην περίπτωση των πολύ-υπολειμματικών μεθόδων ενδεχομένως δεν είναι πρακτικά εφικτό να συμπεριληφθούν όλες οι ενώσεις για τη συνολική αξιολόγηση της μεθόδου σε κάθε παρτίδα αναλύσεων. Έτσι, σε κάθε σειρά αναλύσεων, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται ενδεικτικά τουλάχιστον δέκα ενώσεις, αντιπροσωπευτικές για τα περισσότερα κρίσιμα σημεία τη μεθόδου, και θα πρέπει να εμβολιάζονται στο υπόστρωμα. Σε μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη, θα πρέπει τα χαρακτηριστικά επίδοσης να αξιολογούνται ώστε να επιτρέπουν τη συνολική αξιολόγηση του επιπέδου επίδοσης της μεθόδου, καθώς δεν διερευνάται μόνον η επίδραση του κάθε παράγοντα ξεχωριστά, αλλά και των σχετικών συνδυασμών αυτών των παραγόντων.

6.5.1 Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)

Η απόκριση των αναλυτών στο εκχύλισμα μπορεί να είναι αυξημένη (signal enhancement) ή μειωμένη (signal suppression) σε σχέση με το σήμα τους στο διαλύτη [204]. Πρόκειται για το ανεπιθύμητο φαινόμενο της «επίδρασης του υποστρώματος» (matrix effect), το οποίο δυσχεραίνει την ανάλυση και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανθεκτικότητα της μεθόδου, περιορίζοντας τελικά τη συλλογή αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

Με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας, όπου χρησιμοποιείται ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό, η επίδραση του υποστρώματος είναι αξιοσημείωτη, αφού η πηγή ιοντισμού με ψεκασμό ηλεκτρονίων (ESI) θεωρείται ιδιαίτερα επιρρεπής στο να ιονίζει άλλες ενώσεις. Η επίδραση υποστρώματος προκαλείται κυρίως από τη συνέκλυση συστατικών του υποστρώματος τα οποία επηρεάζουν την ικανότητα ιοντισμού των αναλυτών. Συγκεκριμένα, τα συστατικά του υποστρώματος ανταγωνίζονται με τους αναλύτες για την πρόσβαση στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Επίσης, έχει αναφερθεί επίδραση υποστρώματος σε περιπτώσεις όπου οι αναλύτες προσροφώνται στην περιεχόμενη οργανική ύλη των δειγμάτων, με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερα διαλυμένων ουσιών και την παρεμπόδιση της ανίχνευσής τους. Τα συστατικά του υποστρώματος μπορεί επίσης να μεταβάλλουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση του εκλούσματος της στήλης, να επηρεάσουν τον σχηματισμό σταγονιδίων και συνεπώς τη διαδικασία εξάτμισης, επηρεάζοντας έτσι τον αριθμό των φορτισμένων ιόντων. Έχει επίσης προταθεί ότι τα μη πτητικά συστατικά μπορούν να σχηματίσουν στερεά σωματίδια που συμπεριλαμβάνουν και τις αναλυόμενες ουσίες. Σε μερικές περιπτώσεις μάλιστα, τα συστατικά του υποστρώματος μπορούν να δρουν ως αντιδραστήρια σύζευξης ιόντων με ήδη ιονισμένους αναλύτες. Τέλος, η ύπαρξη διαφόρων παρεμποδιζουσών ουσιών στο αρχικό υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των χρωματογραφικών κορυφών (αύξηση της γραμμής αναφοράς, base line) και κατ' επέκταση τις λανθασμένες μετρήσεις στο εμβαδό τους. Η επίδραση του υποστρώματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο τύπος του δείγματος, η προκατεργασία που υφίσταται πριν την ανάλυση, η τεχνική εκχύλισης ή/και καθαρισμού, η σύσταση της κινητής φάσης, η γεωμετρία και ο σχεδιασμός της πηγής ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού κ.α. [226]. Έχει παρατηρηθεί ότι γενικά, τα μικρά, μετρίως πολικά μόρια όπως τα περισσότερα φαρμακευτικά και αρκετά σύγχρονα φυτοφάρμακα, είναι πιο ευαίσθητα στη μείωση του σήματος [227].

Ένας απλός τρόπος για την εξάλειψη του φαινομένου όταν χρησιμοποιείται η SPE είναι η έκπλυση των μικροσπηλών εκχύλισης με νερό ή με ασθενή οργανικά οξέα που περιέχουν μικρή αναλογία οργανικού διαλύτη, μετά την εκχύλιση των δειγμάτων, ώστε να

απομακρυνθούν άλατα και άλλες παρεμποδίζουσες ουσίες. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η εκχύλιση σε ουδέτερο pH, μειώνει σημαντικά την συνεκχύλιση των συνήθων οργανικών συστατικών παρόντων στα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τα χουμικά και τα φουλβικά οξέα. Αποτελεσματικό τρόπο αποτελεί και η αραιώση του τελικού εκχυλίσματος πριν την έγχυση (δέκα ή και περισσότερες φορές). Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή απαιτεί εξαιρετικά ευαίσθητη οργανολογία για να είναι επιτυχής χωρίς να μειωθεί σημαντικά η ευαισθησία της μεθόδου [228]. Η εφαρμογή εκτενούς καθαρισμού του δείγματος συνεισφέρει σημαντικά στη μείωση της επίδρασης του υποστρώματος. Παρόλα αυτά, ίσως έχει ως αποτέλεσμα χαμηλότερες ανακτήσεις για ορισμένες ουσίες. Επιπροσθέτως, ως αρκετά αποτελεσματικός τρόπος έχει αναφερθεί και η χρήση της τεχνικής των ισοτοπικών διαλυμάτων, με μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος και η έλλειψη διαθεσιμότητας ισοτόπων για όλες τις ουσίες. Στην παρούσα Διατριβή, εφαρμόστηκε έκπλυση των μικροστηλών εκχύλισης στην περίπτωση των υδατικών δειγμάτων, καθαρισμός του εκχυλίσματος στην περίπτωση των ιζημάτων καθώς και ποσοτικοποίηση με τη βοήθεια ισοτοπικών διαλυμάτων (isotope dilution). Επίσης, απαιτείται πολύ συχνός καθαρισμός της πηγής ιονισμού, του τριχοειδούς μεταφοράς ιόντων και πιο σπάνια του ίδιου του τετραπόλου.

Η επίδραση του υποστρώματος μπορεί να διαφέρει σημαντικά ακόμα και μεταξύ δειγμάτων που ανήκουν στο ίδιο είδος, ωστόσο τις περισσότερες φορές η επίδραση στο αναλυτικό σήμα μεταξύ δειγμάτων που ανήκουν στην ίδια κατηγορία είναι παρόμοια. Ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος, η μείωση του σήματος παρατηρείται σε διαφορετικά τμήματα του χρωματογραφήματος, για αυτό και δεν είναι πάντα ίδια για όλα τα υποστρώματα που ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία (πχ ποτάμια και θαλάσσια ύδατα) [229]. Στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, η ισχυρότερη μείωση του σήματος εμφανίζεται συνήθως στην αρχή του χρωματογραφήματος και οφείλεται κυρίως στις πολικότερες ουσίες του υποστρώματος που έχουν χαμηλό χρόνο κατακράτησης (low retained matrix compounds).

Η σύγκριση των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σε καθαρό διαλύτη με τις καμπύλες αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σε δείγματα υποστρώματος για τον υπολογισμό της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με την Εξίσωση 6.2:

$$ME (\%) = \left(\left(\frac{S_m}{S_s} \right) - 1 \right) \times 100 \quad (6.2)$$

όπου: S_m η κλίση της ευθείας στο εκχύλισμα και S_s η κλίση της ευθείας σε καθαρό διαλύτη.

Όταν η ΜΕ είναι 0% δεν υφίσταται καμία επίδραση μεταξύ υποστρώματος και αναλύτη. Όταν οι τιμές της ΜΕ είναι μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ όταν είναι μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ΜΕ% μεταξύ -20% και 20% θεωρείται πως το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος και η επίδραση θεωρείται μη σημαντική. Για τιμές μεταξύ -50% και -20% ή 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια, ενώ για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή [14, 230].

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΗPLC-LTQ/ORBITRAP MS

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ UHPLC–LTQ/ORBITRAP MS

7.1 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη πολυ-υπολειμματικών αναλυτικών μεθόδων απαιτεί προσεκτική βελτιστοποίηση σε κάθε βήμα της αναλυτικής μεθόδου, ώστε να επιτευχθεί συνολικά αποδεκτή επίδοση για όλες τις μελετώμενες ενώσεις. Η διαδικασία βελτιστοποίησης και η αναλυτική πορεία ακολουθούν την αντίστροφη σειρά, υπό την έννοια ότι το πρώτο βήμα προς βελτιστοποίηση είναι συνήθως το τελευταίο στην αναλυτική πορεία. Επομένως, η βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών και των παραμέτρων φασματομετρίας μάζας, προηγείται της βελτιστοποίησης των συνθηκών εκχύλισης του δείγματος.

Η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μιας μεθόδου LC–MS μπορεί να είναι επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία, καθώς είναι μεγάλος ο αριθμός των παραμέτρων που εμπλέκονται και επηρεάζουν με διαφορετικούς τρόπους την απόκριση του συστήματος. Ειδικά αν πρόκειται για δίδυμη φασματομετρία μάζας MS/MS ο αριθμός των παραμέτρων προς βελτιστοποίηση αυξάνεται περαιτέρω, καθώς πέρα από τη μεγιστοποίηση του σήματος του πρωτονιωμένου ή αποπρωτονιωμένου μητρικού ιόντος κατά τον ιοντισμό, πρέπει να βελτιστοποιηθούν και οι συνθήκες θραυσματοποίησης αυτών, προκειμένου να ληφθεί το βέλτιστο σήμα για τα ιόντα θραυσματοποίησης.

Αν και η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις παραμέτρους ρύθμισης του ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός κατέχει εξίσου σημαντικό ρόλο στην αναλυτική διαδικασία και πρέπει να οδηγεί σε επαρκή

διαχωρισμό, μη αλληλοεπικάλυψη, βέλτιστο σχήμα και ένταση των κορυφών. Στην υγρής χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης (UHPLC), επιτυγχάνεται αρκετά μικρός συνολικός χρόνος ανάλυσης και οι κορυφές είναι γενικά στενότερες, ενώ για την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση απαιτούνται τουλάχιστον 10-15 σημεία δεδομένων (data points) ανά κορυφή. Ωστόσο, στις υπολειμματικές μεθόδους, η διάκριση των αναλυτών-στόχων από τις πιθανές παρεμποδίσεις παραμένει απαιτητική καθώς αναμένονται χαμηλές συγκεντρώσεις άρα και μικρές κορυφές. Επιπλέον, ο συνδυασμός της UHPLC με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) συνήθως παρέχει τόσο χαμηλό θόρυβο, που μια ευρεία κορυφή είναι ικανή να τον επικαλύψει, οδηγώντας σε φαινομενικά υψηλότερα όρια ανίχνευσης μεθόδου. Από την άλλη, η μεγάλη ευαισθησία τέτοιων οργάνων μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικές ανιχνεύσεις, τα γνωστά “false positives”.

Η διαδικασία της βελτιστοποίησης χωρίζεται σε διακριτά βήματα, όπου στο καθένα η βελτιστοποίηση έχει διαφορετικά κριτήρια. Αρχικά εξασφαλίζεται ο ικανοποιητικός χρωματογραφικός διαχωρισμός. Ακολουθεί η μεγιστοποίηση της ποσότητας των ψευδομοριακών ιόντων που εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας, όπου επιδιώκεται μεγιστοποίηση του σήματος επιλεγμένων ιόντων, με βελτιστοποίηση των συνθηκών ιοντισμού στην πηγή ESI. Για την αποφυγή «συμβιβασμών» σχετικά με την ευαισθησία της μεθόδου και ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων, κατά την παρούσα Διατριβή πραγματοποιήθηκε μελέτη και αξιολόγηση των παραμέτρων LC και MS για τα δύο μείγματα των επιλεγμένων ενώσεων.

7.2 Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης

Στήλη χρωματογραφίας

Κατά τη μελέτη των συνθηκών χρωματογραφικού διαχωρισμού, πραγματοποιήθηκαν αρχικά δοκιμές για την επιλογή της καταλληλότερης αναλυτικής στήλης. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές αναλυτικές στήλες: (i) Hypersil GOLD (50 mm x 2,1 mm, 1,9 μm), (ii) Fortis Diphenyl (100 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) και (iii) Fortis SpeedCore PFP (50 x 2,1 mm, 2,6 μm), παρέχοντας και στις τρεις περιπτώσεις ικανοποιητική ευαισθησία και σχήμα κορυφών. Ωστόσο, η καλύτερη απόδοση σε επίπεδο διαχωρισμού, ταχύτητας ανάλυσης και οξειών κορυφών και για τα δύο μείγματα ενώσεων, επετεύχθη με τη στήλη PFP (PentaFluoroPhenyl, πενταφθοροφαίνυλο στατική φάση), η κατασκευή της οποίας βασίζεται στην απόδοση της κλασικής στήλης πυριτίου (C18).

Η επιλεχθείσα στήλη παρέχει εξαιρετικές κορυφές και εναλλακτική εκλεκτικότητα σε εφαρμογές αναστροφής φάσης συγκριτικά με τις στατικές φάσεις με αλυσίδες αλκυλίων. Τα παραπάνω οφείλονται στην εισαγωγή ομάδων φθορίου στη στατική φάση, επιτρέποντας περισσότερες και διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με τους αναλύτες, όπως διπόλου-διπόλου, π-π, μεταφοράς φορτίου και ιοντοανταλλαγής. Επιπλέον, η στήλη αυτή είναι κατάλληλη για τον εκλεκτικό διαχωρισμό μη αλογονομένων, πολικών ενώσεων που περιέχουν πολικές ομάδες όπως υδροξύλιο, καρβοξύλιο, νίτρο ομάδες κ.α. Ιδιαίτερα υψηλή εκλεκτικότητα εμφανίζεται όταν αυτές οι λειτουργικές ομάδες είναι προσδεμένες σε αρωματικό ή άλλο άκαμπτο σύστημα δακτυλίου. Επίσης, το μεγαλύτερο μέγεθος της διαμέτρου των πόρων στη στήλη PFP (2,6 μm) προσφέρει θεωρητικά μεγαλύτερο μέσο αριθμό θεωρητικών πλακών (N), και διευκολύνει το διαχωρισμό σε πολύπλοκα υποστρώματα, όπως τα ιζήματα, συγκριτικά με στήλες με διάμετρο πόρων μικρότερη των 2 μm.

Κινητή φάση

Για την επιλογή του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος (κινητής φάσης), επιλέχθηκαν το νερό και η μεθανόλη, καθώς σε προκαταρκτικές δοκιμές το ακετονιτρίλιο δεν παρείχε ιδιαίτερα συμμετρικές κορυφές. Επειδή όμως η κατακράτηση των αναλυτών στη στήλη δεν εξαρτάται μόνο από τους διαλύτες και της σύστασή τους, για τη βελτίωση του ιοντισμού ελέγχθηκαν δύο τροποποιητές της κινητής φάσης (modifiers): το μυρμηκικό οξύ και μυρμηκικό αμμώνιο, που αποτελούν κοινή πρακτική στη μέθοδο θετικού ιοντισμού. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε δοκιμή με τις εξής συστάσεις κινητής φάσης:

- (i) (A) νερό + μυρμηκικό οξύ 0,1 % (v/v) και (B) μεθανόλη + μυρμηκικό οξύ 0,1 % (v/v)
- (ii) (A) νερό (μυρμηκικό αμμώνιο 0,05 mM) και (B) μεθανόλη (μυρμηκικό αμμώνιο 0,05 mM).

Η προσθήκη φορμικού αμμωνίου βελτίωσε ελαφρώς το σχήμα των κορυφών των ενώσεων που εκλούνται προς το τέλος του χρωματογραφήματος, ωστόσο παρείχε ελαφρώς μειωμένο αναλυτικό σήμα για αρκετές ενώσεις, για αυτό και απορρίφθηκε. Έτσι, επιλέχθηκε τελικά το εκλουστικό σύστημα (i) και για τα δύο μείγματα. Μετά από κάθε χρήση πραγματοποιούνταν καθαρισμός των δοχείων και των καναλιών, καθώς έχει αναφερθεί ότι η χρόνια χρήση ανόργανων τροποποιητών επιβαρύνει την πηγή ιοντισμού.

Η προσθήκη του φορμικού οξέος στην κινητή φάση βελτιώνει την απόκριση των περισσότερων ενώσεων. Η παρουσία του οξέος μετατοπίζει την ισορροπία διάστασης των ιόντων προς την πρωτονιωμένη τους μορφή μέσα στο διάλυμα, διευκολύνοντας τον ιοντισμό. Επίσης, η παρουσία ιόντων H^+ ως απόρροια της προσθήκης του οξέος, αποτρέπει το

σχηματισμό ανεπιθύμητων μοριακών ιόντων με Na^+ , γιατί τα H^+ είναι σε μεγαλύτερη αφθονία και κυριαρχούν στη μεταξύ τους ανταγωνιστική δράση.

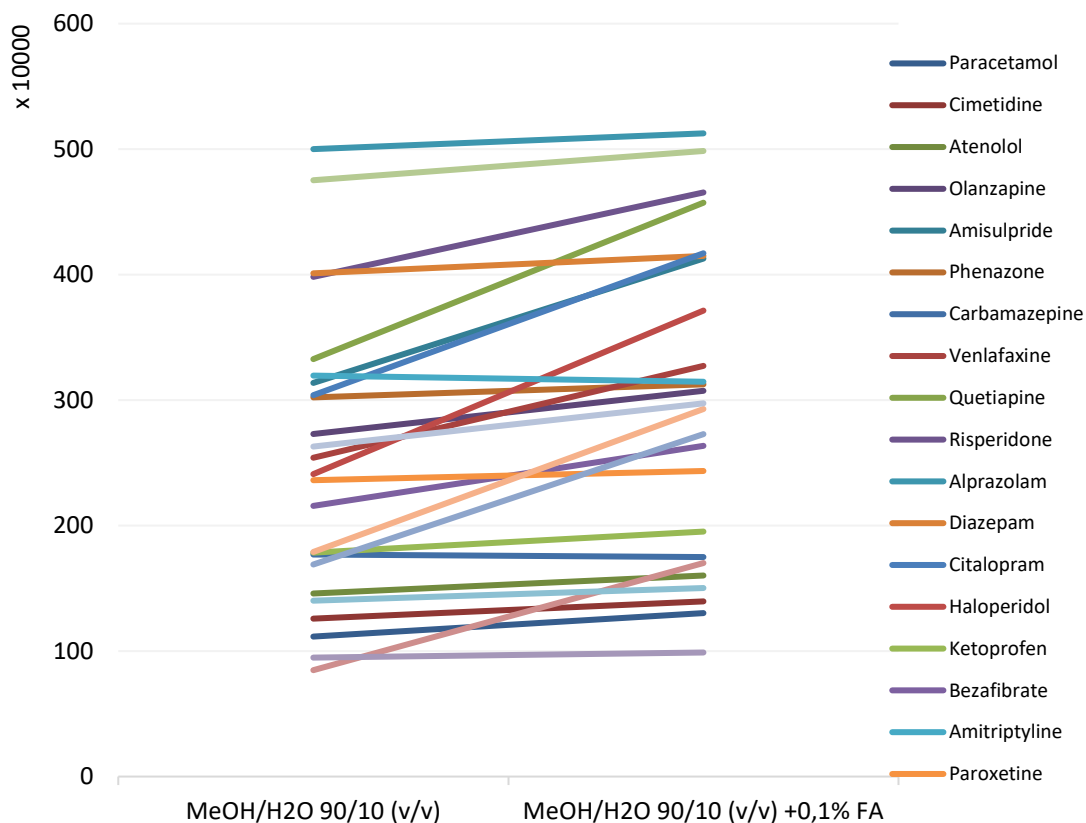
Μετά την επιλογή του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος, ακολούθησαν δοκιμές για το πρόγραμμα έκλουσης των ενώσεων. Αν και οι περισσότερες από τις επιλεγμένες ενώσεις είναι πολικές, παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη δομή, οπότε ο αποτελεσματικός διαχωρισμός τους με ισοκρατική έκλουση θα ήταν αδύνατος. Συνεπώς, η χρήση βαθμωτού εκλουστικού προγράμματος κρίθηκε αναγκαία και ελέγχθηκαν διάφορες αναλογίες όγκων ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός και η καλύτερη δυνατή μορφή κορυφών. Το εκλουστικό πρόγραμμα και για τα δύο μείγματα δόθηκε ήδη στην παράγραφο 6.3.3. Όπως ήταν αναμενόμενο βάσει της χημικής συγγένειας, εκλούστηκαν αρχικά οι πιο πολικές ενώσεις, αφού το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ξεκινά και στις δύο περιπτώσεις με τον πολικότερο διαλύτη (νερό) να βρίσκεται σε περίσσεια. Με την αύξηση του ποσοστού της μεθανόλης οι αναλύτες εκλούνται με σειρά φθίνουσας πολικότητας. Οι χρόνοι κατακράτησης των επιλεγμένων ενώσεων για το μείγμα (I) και (II) δίνονται στο τέλος του κεφαλαίου, στους Πίνακες 7.3 και 7.4, μαζί με τα δεδομένα της φασματομετρίας μάζας που προέκυψαν στο τέλος της βελτιστοποίησης.

Διαλύτης έγχυσης

Ο διαλύτης έγχυσης διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο κατά την εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα. Όπως θα περιγραφεί στο επόμενο κεφάλαιο, αμέσως μετά την εκχύλιση ο διαλύτης του εκλούσματος ήταν η μεθανόλη για τα δείγματα νερού και το ακετονιτρίλιο για τα δείγματα ιζήματος. Στην περίπτωση του ακετονιτρίλιου, οι κορυφές παρουσίασαν μορφολογική ανεπάρκεια, ειδικά για τις πιο πολικές ενώσεις, όπου παρατηρήθηκε έντονα το φαινόμενο της «ουράς» (tailing peaks). Η αναφερόμενη ασυμμετρία ήταν εμφανώς μικρότερη με διαλύτη έγχυσης τη μεθανόλη. Ωστόσο, η προσθήκη νερού στη μεθανόλη, σε διάφορες αναλογίες, ήταν καθοριστική για την εμφάνιση καλύτερα διαχωρισμένων και οξειών κορυφών, αλλά και για ελαφρά αύξηση του αναλυτικού σήματος. Τελικά, κρίθηκε ότι η αναλογία $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 10/90 (v/v) ήταν η πιο αποτελεσματική για σχεδόν όλους τους αναλύτες στα δύο μείγματα.

Τέλος, ελέγχθηκε η επίδραση της προσθήκης φορμικού οξέος (0,1 % v/v), αφενός για την επίτευξη μεγαλύτερης συγγένειας με την αρχική σύσταση του εκλουστικού συστήματος και αφετέρου για προστασία των πιο βασικών ενώσεων (όπως αρκετά φυτοφάρμακα και ψυχιατρικά φάρμακα) με τάση να δέχονται πρωτόνια άρα να ιονίζονται θετικά. Αποδείχτηκε

ότι με την προσθήκη φορμικού οξέος βελτιώθηκε ο ιοντισμός των ενώσεων και αυξήθηκε σε αρκετές περιπτώσεις το αναλυτικό σήμα. Στο Σχήμα 7.1 φαίνεται η επίδραση του διαλύτη επαναδιάλυσης (έγχυσης) στην απόκριση του ανιχνευτή για τις φαρμακευτικές ενώσεις.



Σχήμα 7.1 Επίδραση φορμικού οξέος 0,1% (v/v) στο σήμα του ανιχνευτή για τις φαρμακευτικές ενώσεις

Όγκος δείγματος

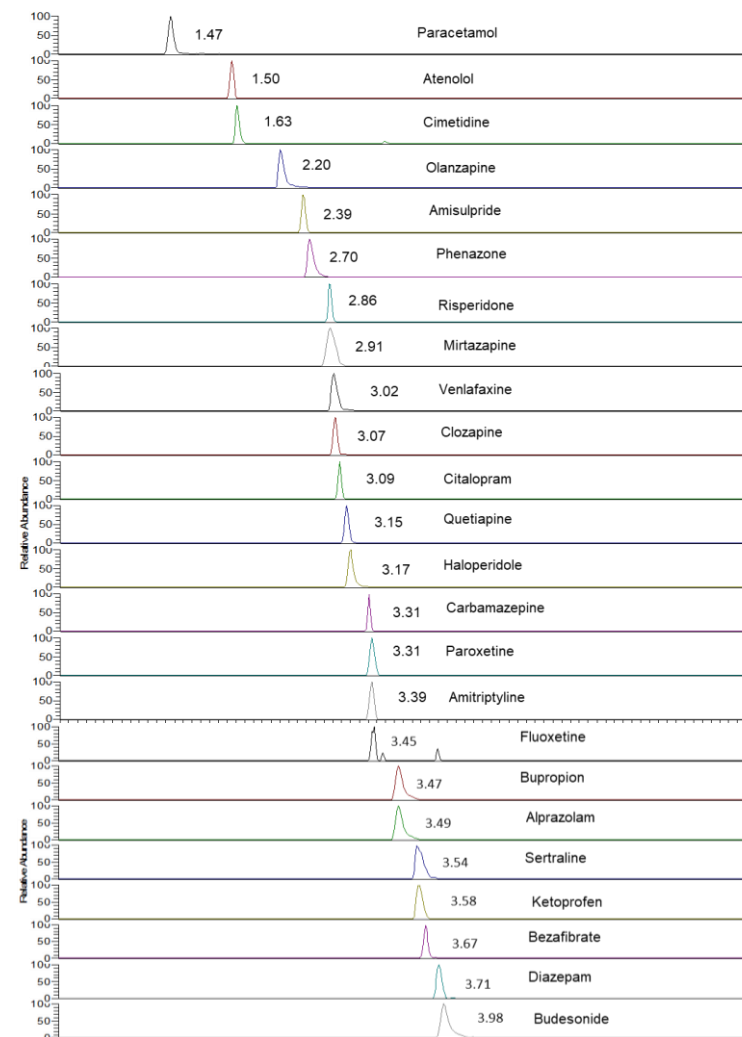
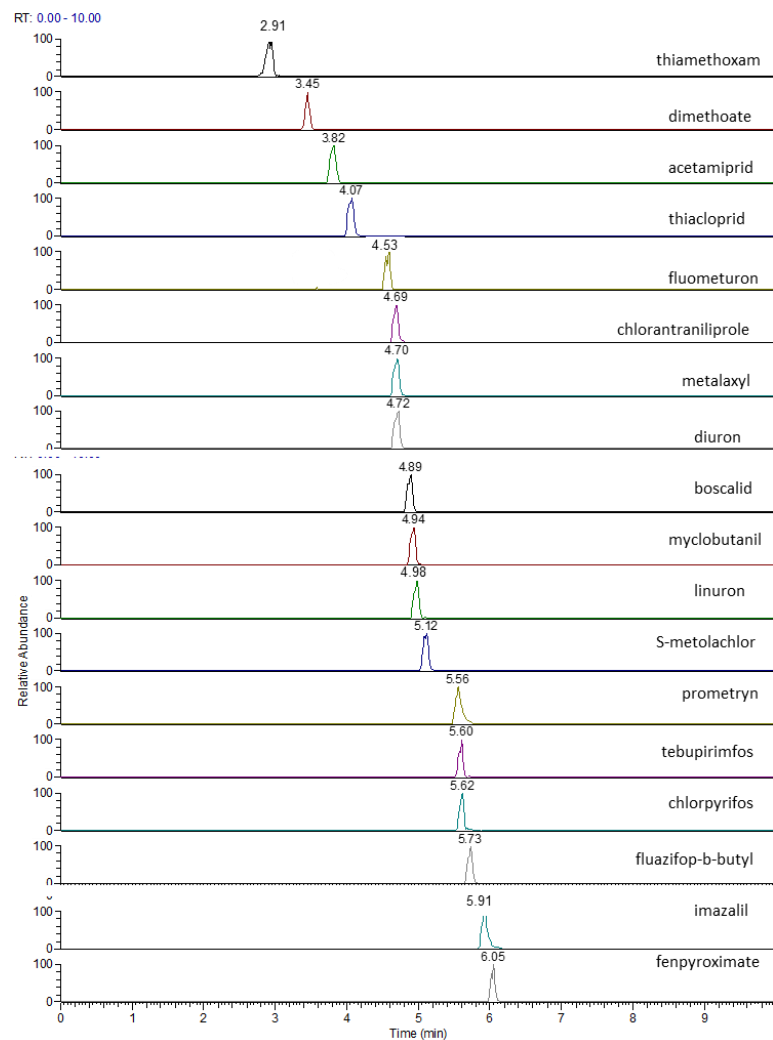
Άλλη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο όγκος έγχυσης στο χρωματογραφικό σύστημα, ο οποίος σχετίζεται άμεσα όχι μόνο με την εμφάνιση οξειών και συμμετρικών κορυφών αλλά και την ευαισθησία του συστήματος φασματομετρίας μάζας. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές εγχύσεις από το ίδιο πρότυπο μείγμα για όγκους 2,5 μL, 5 μL, 10 μL, 15 μL και 20 μL. Γενικά, η αύξηση του όγκου έγχυσης προκάλεσε αύξηση των εμβαδών κορυφών όπως ήταν αναμενόμενο, ωστόσο στους όγκους πάνω από τα 5 μL πολλές κορυφές ήταν πολύ ευρείες με κίνδυνο αλληλοεπικάλυψης. Τελικά, επιλέχθηκαν τα 5 μL, τιμή που άλλωστε συστήνεται να μην υπερβαίνεται κατά το θετικό ιοντισμό, όχι μόνο για την καλύτερη συμμετρία των κορυφών, αλλά και για την προστασία της επίδοσης της στήλης, αφού μέρος του εγχεόμενου όγκου καλύπτει τμήμα της.

Έπειτα, ελέγχθηκε η ταχύτητα ροής δείγματος, η οποία αποτελεί παράμετρο που επηρεάζει και την εκνέφωση στη φασματομετρία μάζας. Ελέγχθηκε εύρος από 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ έως 450 $\mu\text{L min}^{-1}$, με αύξηση 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ κάθε φορά και ως βέλτιστη ροή και για τα δυο μείγματα ενώσεων ορίστηκαν τα 300 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Τέλος, για τη διατήρηση της σταθερότητας του χρωματογραφικού συστήματος, υπό την έννοια της σταθερής πίεσης, σταθερών χρόνων κατακράτησης καθώς και για την αποφυγή σφαλμάτων που οφείλονται στη διάσπαση (degradation) ή εξάτμιση των προτύπων και των δειγμάτων κατά την παραμονή τους στο χώρο του δειγματολήπτη, (ιδιαίτερα κατά την ανάλυση μεγάλων παρτίδων δειγμάτων), ο εσωτερικός χώρος του αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler tray) και ο χώρος της στήλης (column oven) διατηρήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία. Η θερμοκρασία του εσωτερικού χώρου του αυτόματου δειγματολήπτη ρυθμίστηκε εξαρχής στους 10 °C, ενώ για τη θερμοκρασία του φούρνου ελέγχθηκαν οι τιμές 27 °C, 35 °C και 40 °C. Λόγων μικρών διαφοροποιήσεων της απόκρισης του ανιχνευτή για το μείγμα των φαρμακευτικών ενώσεων η θερμοκρασία ρυθμίστηκε τελικά στους 27 °C. Οι τελικές χρωματογραφικές συνθήκες για τα μείγματα (I) και (II) συνοψίζονται στον Πίνακα 7.1, ενώ στα Σχήματα 7.2 και 7.3 δίνονται τα χρωματογραφήματα επιλεγμένων ιόντων (XIC) προτύπων μειγμάτων σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Πίνακας 7.1 Τελικές χρωματογραφικές συνθήκες για τα μείγματα (I) και (II)

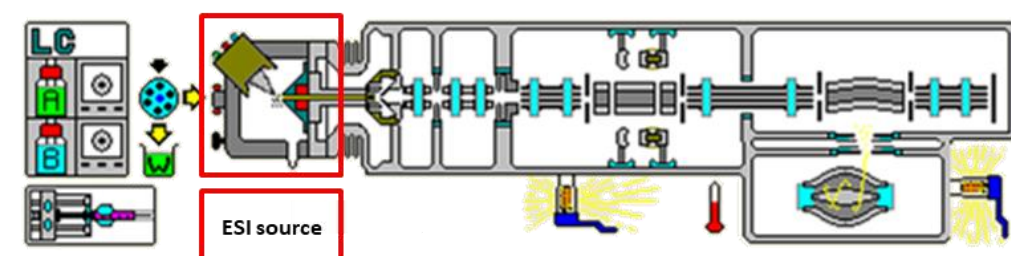
Αναλυτική στήλη (analytical column):	SpeedCore PFP (50×2.1 mm, 2,6 μm)
Κινητή φάση (mobile phase):	(A): H_2O , 0,1 % FA (v/v) (B): MeOH , 0,1 % FA (v/v)
Πίεση (pump pressure):	8000 psi
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης (flow rate):	300 $\mu\text{L min}^{-1}$
Θερμοκρασία στήλης (column oven temperature):	27 °C
Θερμοκρασία εσωτ. χώρου αυτόματου δειγμ/τη (tray temperature) :	10 °C
Διαλύτης Έγχυσης (injection solvent):	$\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 90/10+ 0,1 % FA (v/v)
Όγκος έγχυσης δείγματος (injection volume) :	5 μL



Σχήμα 7.2 Χρωματογράφημα επιλεγμένων ιόντων (Extracted Ion Chromatogram, XIC) UHPLC–LTQ/Orbitrap πρότυπου μείγματος ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) (α) φυτοπροστατευτικών (β) φαρμακευτικών ενώσεων

7.3 Μελέτη παραμέτρων πηγής ESI

Η πηγή ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure ionization, API) αποτελεί πολύ βασικό τμήμα του φασματομέτρου μάζας και στην παρούσα Διατριβή επιλέχθηκε να λειτουργεί με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) (Σχήμα 7.3), η οποία ενδείκνυται για ενώσεις με την πολικότητα και τη φύση των μελετώμενων ενώσεων. Η σωστή ρύθμιση των παραμέτρων της μπορεί να βελτιώσει αισθητά το αναλυτικό σήμα και την απόδοση της μεθόδου.

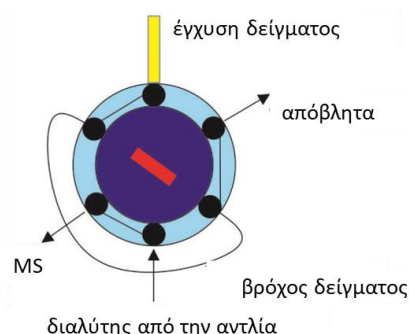


Σχήμα 7.3 Σχηματική απεικόνιση της πηγής API στο σύστημα LTQ/Orbitrap MS

Οι κρίσιμες παράμετροι που μελετήθηκαν για την πηγή ESI ήταν:

- (α) η ροή για το προστατευτικό (sheath gas) και βοηθητικό αέριο (auxiliary gas)
- (β) η ροή αερίου συμπαρασυρμού (sweep gas)
- (γ) το δυναμικό ψεκασμού πηγής (spray voltage)
- (δ) η θερμοκρασία τριχοειδούς μεταλλικού σωλήνα μεταφοράς ιόντων (capillary temperature)
- (ε) το δυναμικό τριχοειδούς μεταλλικού σωλήνα μεταφοράς ιόντων (capillary voltage)
- (στ) η γεωμετρική θέση στην οποία βρίσκεται η πηγή, η οποία μπορεί να μετακινηθεί σε τρεις άξονες: οριζόντια (0-2 μm), κατακόρυφα (A-D) και πλάγια (-1 με +1).

Για τη μελέτη του ιοντισμού των ενώσεων συνδέθηκε το σύστημα υγρής χρωματογραφίας μέσω της βαλβίδας φόρτωσης/έγχυσης του φασματομέτρου μάζας και πραγματοποιήθηκε έγχυση προτύπων μιγμάτων των προσδιοριζόμενων ενώσεων συγκέντρωσης 200 μg L⁻¹, όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.4.



Σχήμα 7.4 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε στα τμήματα αυτόματης ρύθμισης του οργάνου (tuning sections) λόγω του μεγάλου αριθμού των μελετώμενων ενώσεων. Εφαρμόσθηκε η τεχνική πλήρους σάρωσης (FS) σε εύρος μαζών m/z 120–600. Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τα εμβαδά κορυφών από τα χρωματογραφήματα επιλεγμένου ιόντος (XIC, extracted Ion Chromatogram) των μοριακών ιόντων.

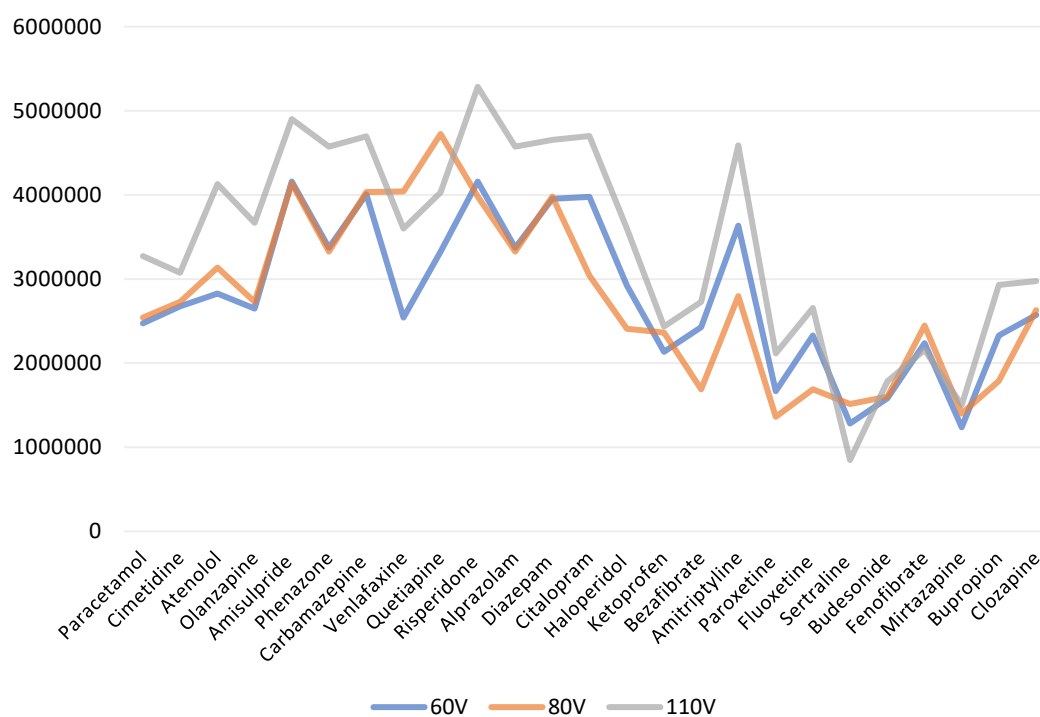
Γενικά, το δυναμικό ψεκασμού λαμβάνει τιμές μεταξύ 3–4 kV, η ταχύτητα ροής του προστατευτικού και βοηθητικού αερίου 10–60 au (arbitrary units) και 0–20 au αντίστοιχα και η θερμοκρασία του τριχοειδούς μεταλλικού σωλήνα μεταφοράς ιόντων 300–380°C. Για τη ροή αερίου συμπαρασυρμού (sweep gas) και το δυναμικό του τριχοειδούς μεταλλικού σωλήνα (capillary voltage) χρησιμοποιήθηκαν οι προεπιλεγμένες από τον κατασκευαστή τιμές [197]. Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων για τη λειτουργία της πηγής για τα μείγματα (I) και (II) δίνονται στον Πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2 Τελικές παράμετροι ρύθμισης πηγής API για το μείγμα (A) φυτοπροστατευτικών και (B) φαρμακευτικών ενώσεων

Παράμετρος	Τιμές	
	Μείγμα (I)	Μείγμα (II)
Ροή προστατευτικού αερίου (sheath gas):	42 au	30 au
Ροή βοηθητικού αερίου (auxiliary gas):	11 au	7 au
Ροή αερίου συμπαρασυρμού (sweep gas)	0 au	
Δυναμικό ψεκασμού (spray voltage):	3,7 kV	3,5 kV
Θερμοκρασία τριχοειδούς μεταλλικού σωλήνα (capillary temperature):	330 °C	330 °C
Δυναμικό τριχοειδούς μεταλλικού σωλήνα (capillary voltage):	40 V	
Δυναμικό δακτυλιοειδών φακών (tube lens) :	110 V	
Θέση πηγής:	κατακόρυφα: C οριζόντια: 2 μm πλάγια: 0	

7.4 Δυναμικό δακτυλιοειδούς φακού εστίασης

Στο τμήμα οπτικών φακών του οργάνου (ion optics) που παρεμβάλλεται μεταξύ της πηγής και της γραμμικής παγίδας ιόντων, μελετήθηκε το δυναμικό δακτυλιοειδούς φακού εστίασης (tube lens). Πρόκειται για παράμετρο η οποία βοηθά στην επιτάχυνση των ιόντων και την κατάλληλη εστίασή τους προς το άνοιγμα της παγίδας και λαμβάνει τιμές μεταξύ 0 και 250 V. Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε στην καθορισμένη κινητή φάση και ταχύτητα ροής. Ελέγχθηκαν οι τιμές 60V, 80V και 110V και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με το εμβαδό της κορυφής για κάθε ένωση. Ενδεικτικά, δίνεται το Σχήμα 7.5 για τις φαρμακευτικές ενώσεις, όπου είναι σαφές ότι η τιμή 110 V έδωσε βελτιωμένα σήματα για τις περισσότερες ενώσεις.

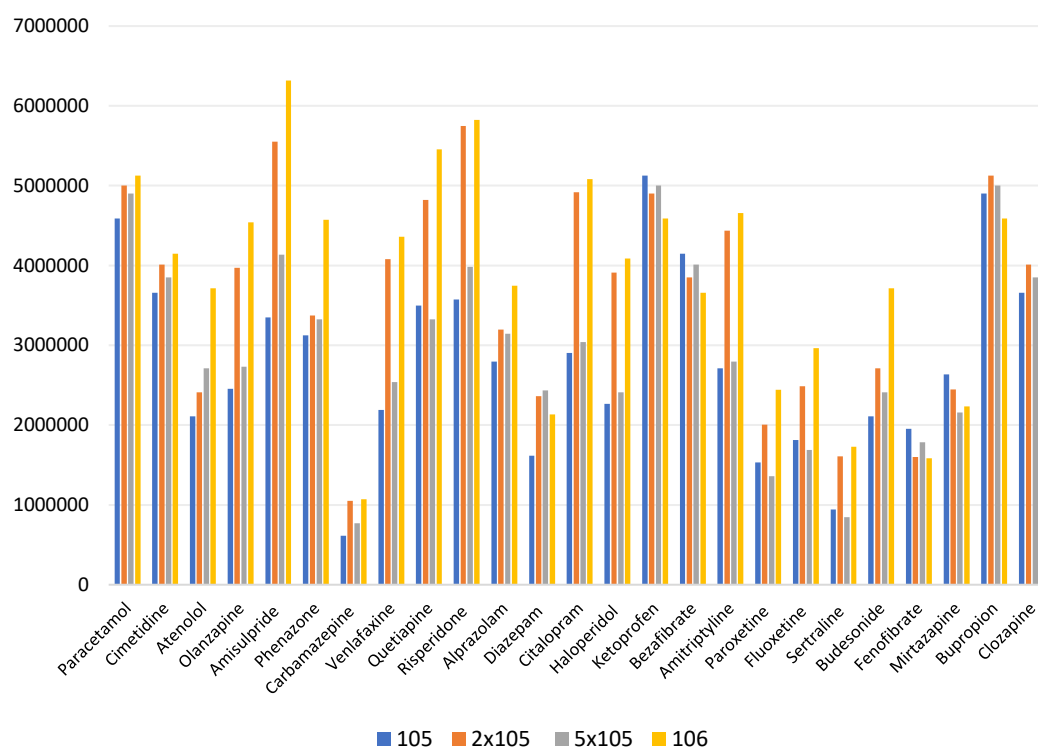


Σχήμα 7.5 Μεταβολή σήματος με την αύξηση του δυναμικού του δακτυλιοειδούς φακού για τις φαρμακευτικές ενώσεις

7.5 Άλλες παράμετροι στη φασματομετρία μάζας

Στη φασματομετρία μάζας, πραγματοποιήθηκε δοκιμή για την τιμή του συστήματος ελέγχου αυτόματης απολαβής ιόντων (automatic gain control, AGC), η οποία καθορίζει τον αριθμό των ιόντων που συλλέγονται στην παγίδα C-trap πριν από την προώθησή τους στον

τροχιακό αναλυτή. Ελέγχθηκαν οι τιμές 10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 10^6 και τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις η διαφορά ήταν αμελητέες, ενώ για τις φαρμακευτικές η τελευταία τιμή επιλέχθηκε ως η καλύτερη (Σχήμα 7.6).

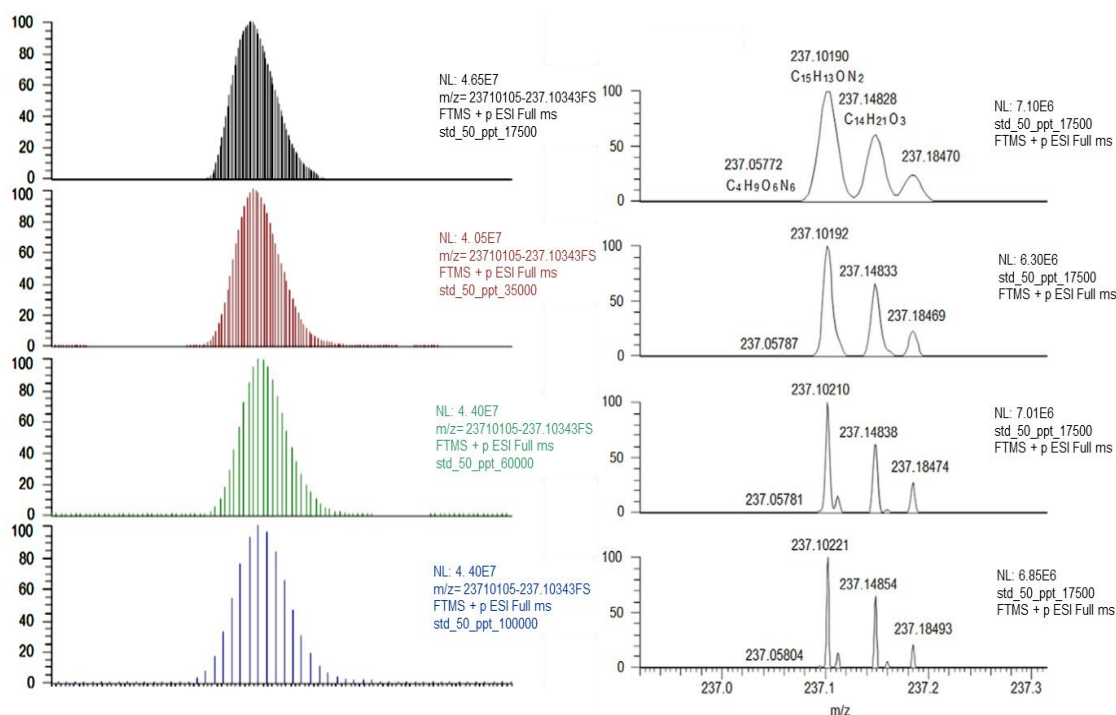


Σχήμα 7.6 Επίδραση τιμών AGC στο σήμα του ανιχνευτή για τις φαρμακευτικές ενώσεις

Για την ποσοτικοποίηση επιλέχθηκε η λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan), ως αριθμός μικροσαρώσεων το 1, ως μέγιστος χρόνος σάρωσης τα 500 ms και ως κεντρική μάζα η τιμή m/z της εκάστοτε προσδιοριζόμενης ένωσης.

Είναι γνωστό ότι η υψηλή διακριτική ικανότητα που παρέχουν οι τεχνικές HRMS είναι από τις σημαντικότερες –αν όχι η σημαντικότερη παράμετρος– για την αποφυγή ψευδών αποτελεσμάτων. Για τον υβριδικό αναλυτή μάζας Orbitrap, η διακριτική ικανότητα επηρεάζει το χρόνο λήψης φάσματος (acquisition time). Όσο υψηλότερα ρυθμιστεί η διακριτική ικανότητα, τόσο μεγαλύτερος χρόνος θα απαιτείται για την πραγματοποίηση ενός «συμβάντος σάρωσης». Η αυξημένη διακριτική ικανότητα επιφέρει υψηλότερη ακρίβεια μάζας άρα και εκλεκτικότητα, παρόλα αυτά, πολύ υψηλές τιμές (100000 FWHM ή και 140000 σε άλλα μοντέλα) μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία, ως συνέπεια του εμφανώς

μειωμένου διαθέσιμου χρόνου για τις σαρώσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα λιγότερα σημεία δεδομένων (data points) (Σχήμα 7.7).



Σχήμα 7.7 Από πάνω προς τα κάτω (Α) Χρωματογράφημα επιλεγμένου ιόντος και (Β) φάσμα μάζας για την ένωση carbamazepine (εμβολιασμένο εκχύλισμα νερού σε συγκέντρωση 50 ng L^{-1}) με ρύθμιση διακριτικής ικανότητας στα (α) 17500 FWHM, 35000 FWHM, 60000 FWHM και 100000 FWHM

Για να αποτραπεί η παρεμβολή των παρεμποδισουσών ενώσεων από το υπόστρωμα στην ανάλυση, υπολογίστηκε ότι η ρύθμιση της διακριτικής ικανότητας στα 60000 ήταν η βέλτιστη τιμή, ικανή να διακρίνονται οι προσδιοριζόμενες ενώσεις από τις παρεμποδίσεις. Η τιμή αυτή μειώνεται κατά το 1/3 στη λειτουργία MS/MS (17500 FWHM). Με την αξιοποίηση της υψηλής διακριτικής ικανότητας μπορεί να επιτευχθεί συγχρόνως βέλτιστο σχήμα και εύρος κορυφών, μικρότερη απόκλιση μάζας και αρκετά σημεία δεδομένων για τις χρωματογραφικές κορυφές. Επιπλέον, επιτυγχάνεται μείωση του χημικού θορύβου σε επιβαρυμένα υποστρώματα (π.χ. ιζήματα).

Επίσης, για τα δύο μείγματα των μελετώμενων ενώσεων, ελέγχθηκε αν το περιορισμένο εύρος μαζών (mass range) βελτίωνε σημαντικά το σχήμα των κορυφών, καθώς περιορίζεται ο αριθμός των ενώσεων που ιονίζονται στην πηγή και πραγματοποιούνται πολύ λιγότερες σαρώσεις (mass scans). Ωστόσο, στη συγκεκριμένη εργασία, το εύρος μαζών του συνόλου των μελετώμενων ενώσεων δεν είναι τόσο μεγάλο (ελαφρύτερη είναι η φαρμακευτική ένωση paracetamol με ακριβή θεωρητική μάζα 152,0706 και βαρύτερη η φυτοπροστατευτική ένωση chlorantraniliprole με 483,9758) ώστε να επιβάλλεται να

περιοριστεί σημαντικά και αποφασίστηκε πως το εύρος μαζών 120-600 ήταν ικανοποιητικό, καλύπτοντας και τα δύο μείγματα ενώσεων. Επίσης, ένα πολύ περιορισμένο εύρος μαζών θα αποτελούσε περιορισμό για την εν δυνάμει επέκταση της μεθόδου στη συνέχεια, τόσο για τον προσδιορισμό προϊόντων μετασχηματισμού όσο και για την προσθήκη νέων ενώσεων με παρεμφερείς ιδιότητες.

7.6 Φασματομετρία μάζας εξαρτώμενη από δεδομένα

Για την επιβεβαίωση των θετικών ανιχνεύσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα (data dependent scan, ddMS), μια λειτουργία σάρωσης η οποία όπως έχει αναφερθεί, χρησιμοποιεί καθορισμένα κριτήρια για να επιλέξει ένα ή περισσότερα ιόντα ενδιαφέροντος, τα οποία θα υποβάλλει σε διαδοχικές σαρώσεις. Επιλέχθηκε η δυνατότητα αυτόματης επιλογής αριθμού ιόντων θραυσματοποίησης για το εκάστοτε ψευδομοριακό ιόν. Η θραυσματοποίηση ενεργοποιήθηκε με την τεχνική διάστασης ιόντων επαγόμενης από πρόσκρουση (CID, collision-induced dissociation), όπου χρησιμοποιήθηκε από το σύστημα κανονικοποιημένη ενέργεια θραύσης (normalized collision energy, NCE) 35% για την εξαγωγή των ιδανικών μαζών ιόντων θραυσματοποίησης, δηλαδή εκείνων με την υψηλότερη ένταση. Μόνο σε περίπτωση που η ενέργεια αυτή δεν είναι ικανή να προκαλέσει θραυσματοποίηση, η τιμή της αυξάνεται βαθμιαία καταγράφοντας ταυτόχρονα την ένταση των κορυφών των σχηματιζόμενων θραυσμάτων με διαδοχικές εγχύσεις, κάτι που δεν ήταν απαραίτητο σε καμία από τις επιλεγμένες ενώσεις.

7.7 Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός

Τα κριτήρια για τον ορθό διαχωρισμό και ταυτοποίηση των ενώσεων έχουν ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 6.4. Ο χρόνος κατακράτησης (t_R) ήταν το πρώτο κριτήριο για την ταυτοποίηση των ενώσεων και στο πρώτο μείγμα κυμάνθηκε από 2,95 min (thiamethoxam) έως 6,05 min (fenpyroximate) ενώ στο δεύτερο από 1.47 min (paracetamol) έως 4.04 min (fenofibrate). Η επαναληψιμότητα του χρόνου κατακράτησης ελέγχθηκε με τρεις διαδοχικές εγχύσεις από το ίδιο πρότυπο διάλυμα και ήταν υψηλή (<8% σε όλες τις περιπτώσεις).

Οι επιλεγμένες ενώσεις ανιχνεύθηκαν στη μέθοδο θετικού ιοντισμού, στη λειτουργία πλήρους σάρωσης, σε τιμή διακριτικής ικανότητας 60000 FWHM και σχηματίζοντας σε μεγαλύτερη ένταση το ψευδομοριακό ιόν $[M+H]^+$, με εξαίρεση τη φαρμακευτική ένωση fenofibrate. Για τη φαρμακευτική ένωση fenofibrate δεν ανιχνεύθηκε ψευδομοριακό ιόν,

αλλά κυριάρχησε το m/z 319,0737 υποδηλώνοντας την απώλεια μιας μεθυλομάδας και μιας ομάδας μονοξειδίου του άνθρακα $[M-CH_2-CO+H]^+$. Η ακριβής πειραματική μάζα για τους επιλεγμένους αναλύτες εκτιμήθηκε με έγχυση προτύπων διαλυμάτων ($n=3$) σε συγκέντρωση 50 ng mL^{-1} και στη συνέχεια λήφθηκε η μέση τιμή της. Το σχετικό σφάλμα μάζας (Δ) εκφρασμένο σε μέρη στο εκατομμύριο (ppm) υπολογίστηκε αυτόματα κάθε φορά από το λογισμικό, και στο τέλος εκτιμήθηκε η μέση τιμή του (<3 ppm για όλες τις ενώσεις).

Για επιβεβαίωση των θετικών ανιχνεύσεων, χρησιμοποιήθηκε η θραυσματοποίηση στη λειτουργία ddMS², για την οποία η διακριτική ικανότητα μειώνεται στα 17500 FWHM. Η χαμηλότερη διακριτική ικανότητα σε αυτή τη λειτουργία είναι ένας συμβιβασμός στην περίπτωση όπου πολλοί αναλύτες εκλούνται σε παρόμοιους χρόνους κατακράτησης, επειδή απαιτούνται πολλαπλές ταυτόχρονες σάρωσεις, αυξάνοντας τον χρόνο πρόσκτησης για μια σάρωση και κατά συνέπεια παρέχονται λιγότερα σημεία δεδομένων ανά κορυφή.

Για τον καλύτερο συσχετισμό της ακρίβειας μάζας με την παρουσία ενδογενών ουσιών από το υπόστρωμα, τόσο στην περίπτωση των δειγμάτων νερού όσο και στο ίζημα, εκχυλισμένα δείγματα εμβολιάστηκαν με το ίδιο πρότυπο μείγμα και εγχύθηκαν σε τρεις επαναλήψεις. Από την εκάστοτε μέτρηση της ακριβούς πειραματικής μάζας και του σφάλματος μάζας (<3 ppm), αποδείχθηκε ότι η διακριτική ικανότητα 60000, η οποία έχει επιλεγεί για τη λήψη φασμάτων πλήρους σάρωσης, παρέχει μετρήσεις υψηλής ακρίβειας μάζας ακόμα και παρουσία παρεμποδισουσών ενώσεων από το υπόστρωμα. Στους Πίνακες 7.3 και 7.4 δίνονται η σύσταση του ψευδομοριακού ιόντος ή ιόντος προσθήκης (adduct ion), η ακριβής θεωρητική μάζα όπως υπολογίστηκε από το λογισμικό με βάση το μοριακό τύπο της ένωσης, η ακριβής πειραματική μάζα και το σχετικό σφάλμα μάζας (Δ) στο LTQ/Orbitrap MS/MS. Η κατώτατη συγκέντρωση του γραμμικού εύρους ταυτίζεται με το όριο ποσοτικοποίησης του οργάνου (IQL).

Η γραμμικότητα στην απόκριση του ανιχνευτή εκτιμήθηκε με την εισαγωγή και ανάλυση προτύπων μιγμάτων σε μεθανόλη, σε εύρος συγκεντρώσεων $0,05\text{--}1000 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) ήταν υψηλότεροι από 0.99 για όλες τις ενώσεις, εντός του εκάστοτε γραμμικού εύρους. Τα όρια ποσοτικοποίησης του οργάνου (instrumental quantification limits, IQLs), τα οποία είναι πρακτικά η χαμηλότερη συγκέντρωση του εύρους γραμμικής περιοχής (lowest concentration of the linear range), ορίστηκαν ως η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη για την οποία το εμβαδό της κορυφής ήταν δέκα φορές μεγαλύτερο από την τυπική απόκλιση του θορύβου της γραμμής βάσης (baseline noise), και κυμάνθηκαν μεταξύ $0,02$ και $20 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Τα πειράματα για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας του οργάνου, πραγματοποιήθηκαν σε τρία επίπεδα: $0,1 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, $1 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ και $10 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ ($n=5$ για κάθε επίπεδο)

με τις τιμές RSD να είναι κάτω από 15% για όλες τις ενώσεις. Επίσης, δεν ανιχνεύθηκε σήμα για καμία από τις προσδιοριζόμενες ενώσεις κατά την ανάλυση μεθανόλης αμέσως μετά την ανάλυση προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης $50 \mu\text{g L}^{-1}$, έχοντας μάλιστα ρυθμίσει το μέγιστο σφάλμα μάζας στα 5 ppm και την απόκλιση του χρόνου κατακράτησης (retention time drift) στα 0,2 min, καταδεικνύοντας την απουσία του φαινομένου επίδρασης εκ μεταφοράς (carry over effect).

Η ποσοτικοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια καμπυλών αναφοράς με προσομοίωση υποστρώματος. Για την κατασκευή της καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν τουλάχιστον πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων κάθε φορά, συμπεριλαμβανομένου και του μηδενός. Στην περίπτωση των φαρμακευτικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν και δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα, χρησιμοποιήθηκε ο λόγος του εμβαδού της κορυφής της προσδιοριζόμενης ένωσης προς το εμβαδό της κορυφής του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου για τον υπολογισμό της εξίσωσης ευθείας. Το δυναμικό εύρος της καμπύλης αναφοράς ήταν ανάλογο ή και μεγαλύτερο σε σχέση με το αντίστοιχο της βιβλιογραφίας. Η συγκέντρωση του μείγματος των εσωτερικών προτύπων ήταν $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Στους Πίνακες 6.6 και 6.7 δίνονται οι χρόνοι κατακράτησης (t_R), η σύσταση των ψευδομοριακών ιόντων, οι ακριβείς θεωρητικές και πειραματικές μάζες (m/z), το σχετικό σφάλμα μάζας (Δ) και τα θυγατρικά ιόντα (MS^2) των ψευδομοριακών ιόντων στο LTQ/Orbitrap MS/MS για το μείγμα I (φυτοπροστατευτικές ενώσεις) και μείγμα II (φαρμακευτικές ενώσεις) αντίστοιχα.

Πίνακας 7.3 Χρόνοι κατακράτησης, ψευδομοριακά ιόντα, ακριβής θεωρητική και πειραματική μάζα, σφάλμα μάζας, εύρος γραμμικότητας και όρια ποσοτικοποίησης οργάνου για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

	Orbitrap MS					Orbitrap MS/MS	
	t _R (min)	Ψευδομοριακό ιόν*	Ακριβής θεωρ. μάζα	Ακριβής πειρ. μάζα	Δ (ppm)	IQL (ng)**	Ιόν θραυσμ.***
Thiamethoxam	2,91	C ₈ H ₁₁ ClN ₅ O ₃ S ⁺	292,0266	292,0263	-1,027	0,1	211,0633
Dimethoate	3,45	C ₅ H ₁₃ NO ₃ PS ₂ ⁺	230,0069	230,0065	-1,739	0,2	198,9647
Acetamiprid	3,82	C ₁₀ H ₁₂ ClN ₄ ⁺	223,0745	223,0748	1,345	1,0	126,0102
Thiacloprid	4,07	C ₁₀ H ₁₀ ClN ₄ S ⁺	253,0309	253,0308	-0,395	0,1	126,0101
Fluometuron	4,53	C ₁₀ H ₁₂ F ₃ N ₂ O ⁺	233,0896	233,0903	2,145	0,5	159,0015
Chlorantraniliprole	4,69	C ₁₈ H ₁₅ BrCl ₂ N ₅ O ₂ ⁺	483,9758	483,9751	-1,446	2,0	285,9192
Metalaxyl	4,70	C ₁₅ H ₂₂ NO ₄ ⁺	280,1543	280,1544	0,357	0,5	248,1283
Diuron	4,72	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O ⁺	233,0243	233,0244	0,429	0,5	72,8813
Boscalid	4,89	C ₁₈ H ₁₃ Cl ₂ N ₂ O ⁺	343,0399	343,0398	-0,292	0,5	307,0632
Myclobutanil	4,94	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₄ ⁺	289,1215	289,1214	-0,346	0,5	220,9344
Linuron	4,98	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O ₂ ⁺	249,0192	249,0190	-0,803	0,5	182,0237
S-metolachlor	5,12	C ₁₅ H ₂₃ ClNO ₂ ⁺	284,1412	284,1413	0,352	0,1	252,1151
Prometryn	5,56	C ₁₀ H ₂₀ N ₅ S ⁺	242,1434	242,1433	-0,313	0,1	200,0965
Tebupirimfos	5,59	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O ₃ PS ⁺	319,1240	319,1234	-1,880	0,2	277,0766
Chlorpyrifos	5,62	C ₉ H ₁₂ Cl ₃ NO ₃ PS ⁺	349,9336	349,9330	-1,715	1,0	321,9016
Fluazifop-p-butyl	5,73	C ₁₉ H ₂₁ F ₃ NO ₄ ⁺	384,1417	384,1418	0,260	0,1	328,0787
Imazalil	5,91	C ₁₄ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ⁺	297,0556	297,0560	1,347	0,5	255,0086
Fenpyroximate	6,05	C ₂₄ H ₂₈ N ₃ O ₄ ⁺	422,2074	422,2072	-0,474	2,0	366,1451

*ιόντα ποσοτικοποίησης, **όριο ποσοτικοποίησης οργάνου, ***NCE 35%,

Πίνακας 7.4 Χρόνοι κατακράτησης, ψευδομοριακά ιόντα, ακριβής θεωρητική και πειραματική μάζα, σφάλμα μάζας, εύρος γραμμικότητας και όρια ποσοτικοποίησης οργάνου για τις φαρμακευτικές ενώσεις

	Orbitrap MS					Orbitrap MS/MS	
	t _R (min)	Ψευδομοριακό ιόν*	Ακριβής θεωρ. μάζα	Ακριβής πειρ. μάζα	Δ (ppm)	IQL (ng)**	Ιόν θραυσμ.***
Paracetamol	1,47	C ₈ H ₁₀ NO ₂ ⁺	152,0706	152,0702	-2,795	2,0	110,0597
Atenolol	1,50	C ₁₄ H ₂₃ N ₂ O ₃ ⁺	267,1703	267,1702	-0,558	0,5	225,1231
Cimetidine	1,63	C ₁₀ H ₁₇ N ₆ S ⁺	253,1230	253,1223	-2,852	0,5	159,0699
Olanzapine	2,20	C ₁₇ H ₂₁ N ₄ S ⁺	313,1481	313,1475	-1,992	0,25	256,0748
Amisulpride	2,39	C ₁₇ H ₂₈ N ₃ O ₄ S ⁺	370,1795	370,1790	-1,225	0,1	242,0482
Phenazone	2,70	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ⁺	189,1022	189,1023	0,478	0,05	161,1001
Risperidone	2,86	C ₂₃ H ₂₈ FN ₄ O ⁺ ₂	411,2191	411,2190	-0,148	0,1	191,1178
Mirtazapine	2,91	C ₁₇ H ₂₀ N ₃ ⁺	266,1652	266,1649	-1,03	0,1	195,1776
Venlafaxine	3,02	C ₁₇ H ₂₈ NO ₂ ⁺	278,2115	278,2112	-0,775	0,05	260,2009
Clozapine	3,07	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ Cl ⁺	327,1371	327,1374	0,914	0,05	270,0526
Citalopram	3,09	C ₂₀ H ₂₂ FN ₂ O ⁺	325,1711	325,1712	0,313	0,1	262,1027
Quetiapine	3,15	C ₂₁ H ₂₆ N ₃ O ₂ S ⁺	384,1740	384,1738	-0,584	1,0	191,1055
Haloperidol	3,17	C ₂₁ H ₂₄ ClFNO ₂ ⁺	376,1474	376,1473	-0,190	0,1	165,0711
Carbamazepine	3,31	C ₁₅ H ₁₃ N ₂ O ⁺	237,1022	237,1021	-0,462	0,05	194,0964
Paroxetine	3,31	C ₁₉ H ₂₁ FNO ₃ ⁺	330,1500	330,1498	-0,661	12,5	192,1183
Amitriptyline	3,39	C ₂₀ H ₂₄ N ⁺	278,1903	278,1903	-0,167	0,5	233,1300
Fluoxetine	3,45	C ₁₇ H ₁₉ F ₃ NO ⁺	310,1413	310,1410	-1,178	1,0	148,1120
Bupropion	3,47	C ₁₃ H ₁₉ ONCl ⁺	240,1150	240,1145	-1,951	0,5	184,0528
Alprazolam	3,49	C ₁₇ H ₁₄ ClN ₄ ⁺	309,0902	309,0898	-1,005	0,1	281,0715

	Orbitrap MS					Orbitrap MS/MS	
	t _R (min)	Ψευδομοριακό ιόν*	Ακριβής θεωρ.μάζα	Ακριβής πειρ. μάζα	Δ (ppm)	IQL (ng)**	Ιόν θραυσμ.***
Sertraline	3,54	C ₁₇ H ₁₈ Cl ₂ N ⁺	306,0811	306,0805	-1,867	0,1	158,9760
Ketoprofen	3,58	C ₁₆ H ₁₅ O ₃ ⁺	255,1016	255,1013	-1,179	1,0	209,0959
Bezafibrate	3,67	C ₁₉ H ₂₁ ClNO ₄ ⁺	362,1154	362,1147	-1,691	0,5	316,1099
Diazepam	3,71	C ₁₆ H ₁₄ ClN ₂ O ⁺	285,0789	285,0789	-0,201	1,0	257,0840
Budesonide	3,98	C ₂₅ H ₃₅ O ₆ ⁺	431,2428	431,2421	1,589	0,05	413,1075
Fenofibrate	4,04	C ₂₀ H ₂₁ ClO ₄ ⁺	319,0737*	319,0741	1,2536	1,0	233,0124

*ιόντα ποσοτικοποίησης, ** όριο ποσοτικοποίησης οργάνου, ***NCE 35%

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QuEChERS
ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΙΖΗΜΑΤΑ**



ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QuEChERS ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΙΖΗΜΑΤΑ

A. Βελτιστοποίηση

8.1. Εισαγωγή

Η εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από ιζήματα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο QuEChERS, η οποία στοχεύει στην απλή και γρήγορη εκχύλιση ακολουθούμενη από επαρκή καθαρισμό του δείγματος. Η QuEChERS είναι κατάλληλη για στερεά, ημι-στερεά, ιξώδη υγρά, και μικρούς όγκους υγρών δειγμάτων και συχνά της αποδίδεται ο όρος «προσέγγιση» (“approach”) αντί «μέθοδος», καθώς δημοσιεύονται συνεχώς παραλλαγές της προκειμένου να είναι κατάλληλη και αποτελεσματική για μεγάλο εύρος αναλυτών και υποστρωμάτων. Επίσης, χαρακτηρίζεται ως μέθοδος “just enough” καθώς οι ποσότητες των αλάτων και των προσροφητικών που χρησιμοποιεί είναι τόσες ώστε να απομακρύνονται επαρκώς οι παρεμποδίσεις με την ελάχιστη δυνατή απώλεια αναλυτών. Η μέθοδος προσφέρει ασύγκριτα μικρό χρόνο ανάλυσης, καθώς έχει υπολογιστεί ότι μια παρτίδα 25-30 δειγμάτων μπορεί να εκχυλιστεί μέσα σε 90 min, χωρίς να υπολογίζεται ο χρόνος εξάτμισης του διαλύτη.

Καθώς η QuEChERS αρχικά αναπτύχθηκε για προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά, δηλαδή υποστρώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (>75%), η

εφαρμογή της σε υποστρώματα με περιεκτικότητα νερού χαμηλότερη από 25% (ιζήματα, δημητριακά, ξηρά φρούτα, καπνός, τσάι κλπ.) επιβάλλει τροποποιήσεις [231] και βελτιστοποίηση διαφόρων παραμέτρων που την επηρεάζουν. Λόγω των ποικίλων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των επιλεγμένων ενώσεων, της πολυπλοκότητας και της επιβαρυμένης φύσης του ιζήματος, μελετήθηκαν διεξοδικά το πρώτο στάδιο της εκχύλισης και το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) με σκοπό να επιτευχθεί καλύτερη επίδοση της μεθόδου για τις ενώσεις και των δύο μειγμάτων. Η βελτίωση της επίδοσης αφορά στη βελτίωση του διαχωρισμού των χρωματογραφικών κορυφών, στην αύξηση του μετρούμενου αναλυτικού σήματος για δεδομένη συγκέντρωση αναλύτη, στην αύξηση της γραμμικής περιοχής άρα και της περιοχής χρησιμότητας, στη βελτίωση της επαναληψιμότητας και μείωση άλλων παραμέτρων, όπως τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, η επίδραση του υποστρώματος, ο χρόνος και το κόστος της ανάλυσης.

8.2 Μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την εκχύλιση QuEChERS

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση μελετήθηκαν ξεχωριστά για τα δύο μείγματα, εξετάζοντας μια μόνο παράμετρο κάθε φορά και διατηρώντας τις υπόλοιπες σταθερές σε όλη την πειραματική πορεία. Το κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης ήταν η ανάκτηση (%R) των ενώσεων. Για αυτό, «τυφλά» δείγματα ιζημάτων εμβολιάζονταν με το εκάστοτε μείγμα (I) ή (II) σε συγκέντρωση 50 ng g^{-1} , όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.2.3 και ακολουθούσε ανάλυση των δειγμάτων στο σύστημα UHPLC–LTQ/Orbitrap MS, υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 7.

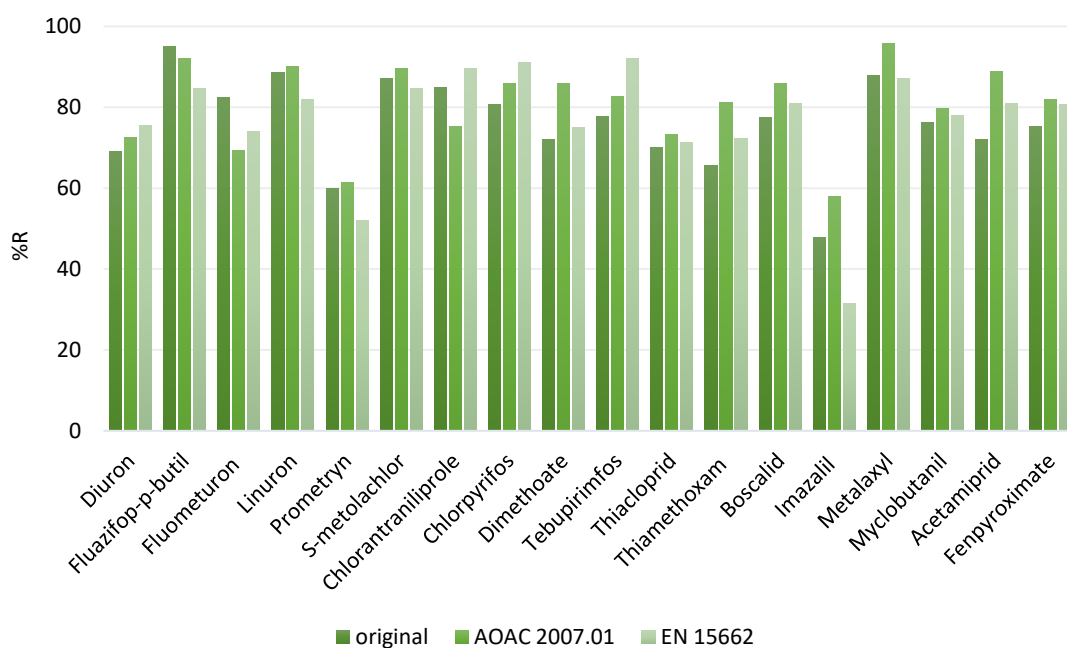
8.2.1 Άλατα εκχύλισης

Το εύρος των τιμών pK_a των επιλεγμένων ενώσεων (0,4–13,2 για τις φυτοπροστατευτικές και 0,49–18,3 για τις φαρμακευτικές ενώσεις) είναι τέτοιο που επιβάλλει τη δοκιμή διαφορετικών συνδυασμών αλάτων εκχύλισης. Έτσι, ως πρώτο βήμα για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με τους τρεις κύριους και προτεινόμενους από διεθνή πρότυπα συνδυασμούς αλάτων εκχύλισης QuEChERS, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη εκχύλισης το ακετονιτρίλιο:

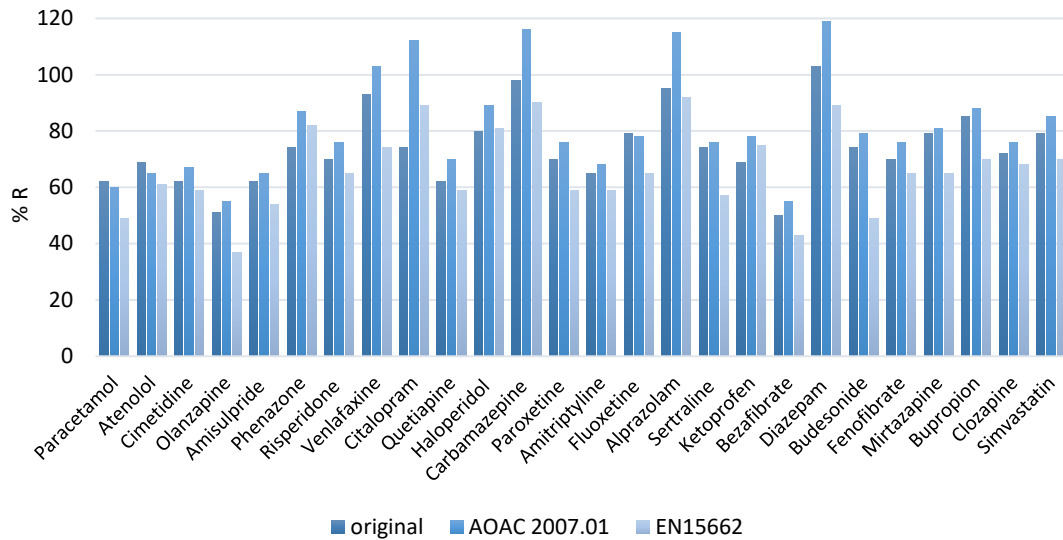
1. 4 g MgSO_4 , 1 g NaCl , για την «κλασική μέθοδο» (“original”) [138]
2. 6 g MgSO_4 , 1,5 g CH_3COONa (acetic buffer) για τη μέθοδο AOAC 2007.01 [137]

3. 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g tri-sodium citrate dihydrate, 0.5 g di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate (citrate buffer) για το πρότυπο CEN 15662 του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Τυποποίησης (Comité Européen de Normalisation) [232].

Η προσθήκη του MgSO₄ αποσκοπεί στην απομάκρυνση του νερού και την αύξηση της ιοντικής ισχύος του υδατικού μείγματος που προκύπτει, προωθώντας τον καλύτερο διαχωρισμό της οργανικής φάσης (ακετονιτρίλιο) από την υδατική. Το NaCl βοηθά στην άρση των πολικών παρεμποδίσεων και στην αποφυγή δημιουργίας γαλακτωμάτων. Η χρήση τροποποιητών (buffers) όπως το οξικό νάτριο και τα κιτρικά άλατα αποτελεί παραλλαγή της κλασικής μεθόδου και περιλαμβάνει ρύθμιση και διατήρηση του pH σταθερού στη βέλτιστη τιμή με ρυθμιστικά διαλύματα, εμποδίζοντας ταυτόχρονα τη διάσπαση των ευαίσθητων στο pH ενώσεων. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 8.1 και 8.2 οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές και συγκρίσιμες για όλες σχεδόν τις ενώσεις και με τις τρεις παραλλαγές. Ωστόσο, η χρήση της μεθόδου AOAC 2007.01 αποδείχθηκε η καλύτερη επιλογή και για τα δύο μείγματα.

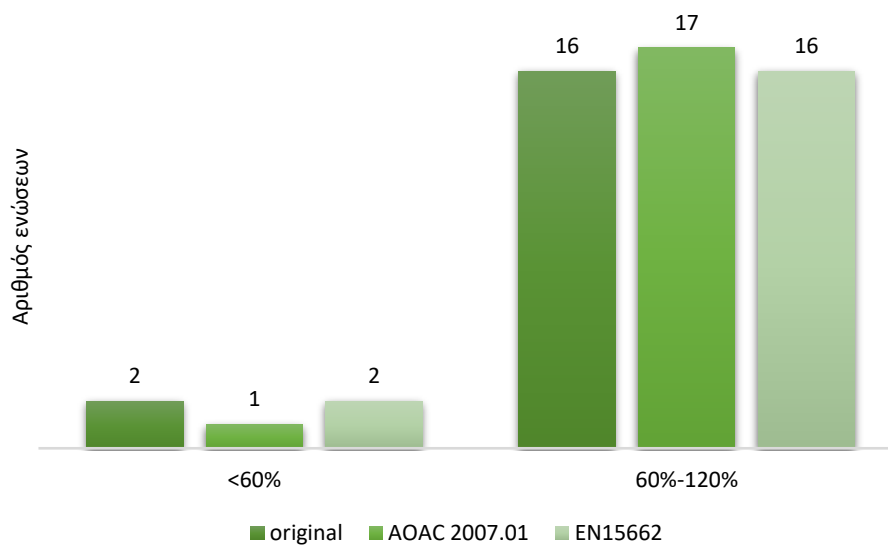


Σχήμα 8.1 Επίδραση των αλάτων εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων



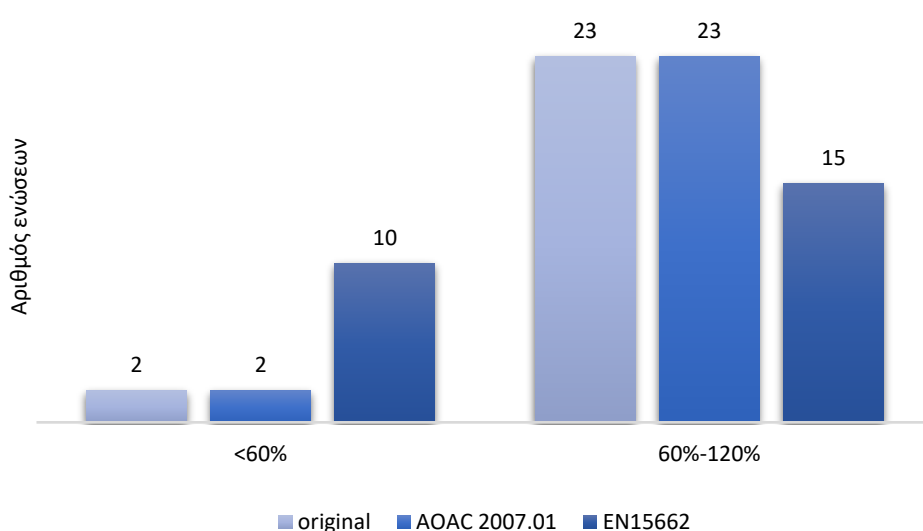
Σχήμα 8.2 Επίδραση των αλάτων εκχύλισης στις ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, η χρήση των “original” και CEN 15662 είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερες κατά μέσο όρο ανακτήσεις (76,1% και 76,8% αντίστοιχα) συγκριτικά με τη μέθοδο AOAC 2007.01 (80,5%). Επίσης, παρατηρήθηκαν ανακτήσεις εκτός των αποδεκτών ορίων (47,9% και 31,5% αντίστοιχα) για την ένωση imazalil. Στο Σχήμα 8.3 φαίνεται ο αριθμός των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις <60% και 60%-120% με την εφαρμογή των διαφορετικών αλάτων εκχύλισης.



Σχήμα 8.3 Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την εφαρμογή διαφορετικών αλάτων εκχύλισης

Για τις φαρμακευτικές ενώσεις, η χρήση των αλάτων της AOAC 2007.01 είχε ως αποτέλεσμα καλύτερες ανακτήσεις για το 88% των φαρμακευτικών ενώσεων. Ο μέσος όρος των ανακτήσεων με τη μέθοδο αυτή ήταν 84,9% έναντι 77,5% και 68,1% για την “original” και CEN 15662, αντίστοιχα. Επίσης, είναι αξιοσημείωτο πως η χρήση των κιτρικών αλάτων δεν επέφερε υψηλότερες ανακτήσεις για καμία από τις μελετώμενες ενώσεις. Στο Σχήμα 8.4 φαίνεται ο αριθμός των φαρμακευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις <60% και 60%-120% με την εφαρμογή των τριών διαφορετικών αλάτων εκχύλισης.



Σχήμα 8.4 Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων με την εφαρμογή διαφορετικών αλάτων εκχύλισης

Με τη χρήση των κιτρικών αλάτων το τελικό pH του εκχυλίσματος ακετονιτριλίου υπολογίστηκε περίπου 8 και με τη χρήση του οξικού νατρίου περίπου 5. Συνεπώς, πέρα από τις καλύτερες ανακτήσεις, η επιλογή της AOAC 2007.01 θεωρήθηκε σημαντική για την προστασία των ενώσεων που διασπώνται εύκολα σε βασικό περιβάλλον. Τέλος, η χρήση λιγότερων αντιδραστηρίων συγκριτικά με τη CEN 15662 ενέχει μικρότερες πιθανότητες εισαγωγής σφαλαμάτων αλλά και πιο καθαρά εκχυλίσματα [233].

8.2.2 Διαλύτης εκχύλισης

Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης είναι καθοριστική για να επιτευχθεί εκλεκτική και αποτελεσματική εκχύλιση των επιθυμητών ενώσεων από το υπόστρωμα. Στην εκχύλιση Q₁ChERS το ακετονιτρίλιο είναι ο συνηθέστερος διαλύτης που πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις [138, 234] καθώς μπορεί να εκχυλιστεί μεγάλο εύρος ενώσεων με μικρότερο αριθμό συνεκχυλιζόμενων συστατικών, ενώ είναι συμβατός τόσο με την υγρή όσο και την αέρια χρωματογραφία. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την εκχύλιση δειγμάτων ιζήματος, εδάφους και παρεμφερών υποστρωμάτων, το ακετονιτρίλιο αποτελεί την καλύτερη επιλογή [129, 150, 184, 235, 236]. Παρόλα αυτά, όταν κριθεί απαραίτητο ανάλογα με τις ανάγκες της εκχύλισης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη, εξάνιο ή μείγματα αυτών.

Με βάση τα παραπάνω, στην πρώτη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο και πράγματι, οι ανακτήσεις ήταν καλές για όλες τις ενώσεις. Έπειτα, δοκιμάστηκε μεθανόλη, όπου κατά το στάδιο της εξάτμισης υπήρξε στερεό υπόλειμμα, ενέχοντας τον κίνδυνο επιβάρυνσης της αναλυτικής στήλης. Για να διαπιστωθεί αν όντως το στερεό καθιζάνει κατά την επαναδιάλυση ή προϋπήρχε, το δείγμα τοποθετήθηκε σε υπερήχους και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε. Αποδείχθηκε ότι το ίζημα περνά στο μείγμα των διαλυτών, το οποίο θεωρήθηκε ακατάλληλο. Τέλος, ελέγχθηκε η χρήση μείγματος MeOH/ACN που προκάλεσε προβλήματα στην πειραματική πορεία, καθώς είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό θολού και παχύρρευστου διαλύματος. Τέλος, από τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμένων με ακετονιτρίλιο δειγμάτων ήταν προφανές πως το εκχύλισμα του ακετονιτριλίου περιέχει πολύ λιγότερες παρεμποδίζουσες ενώσεις. Επίσης, ο διαχωρισμός του από την υδατική φάση ήταν πολύ ευκολότερος.

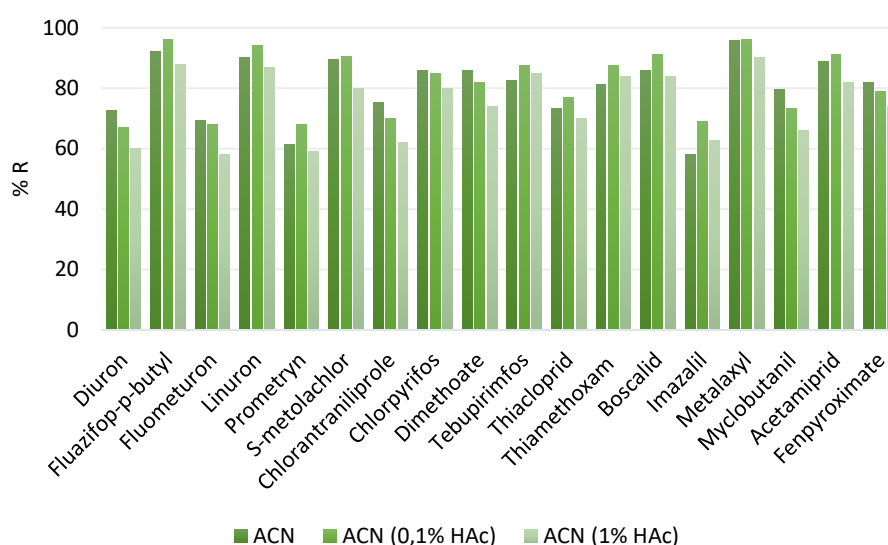
Συνεπώς, το ακετονιτρίλιο ήταν ο καταλληλότερος διαλύτης παρέχοντας διαυγή και καθαρά διαλύματα σε συνδυασμό με ικανοποιητικές κορυφές και ανακτήσεις κατά την χρωματογραφική ανάλυση των ενώσεων. Το μειονέκτημα της σχετικά αργής εξάτμισης του ακετονιτριλίου περιορίστηκε εν μέρει λόγω των μικρών όγκων εκχυλισμάτων και της υποβοηθούμενης με θέρμανση εξάτμισης.

8.2.3 pH διαλύτη εκχύλισης

Μετά τον καθορισμό του ακετονιτριλίου ως καταλληλότερου διαλύτη εκχύλισης, ελέγχθηκε η τυχόν θετική επίδραση τροποποιητών στις ανακτήσεις των ενώσεων των δύο

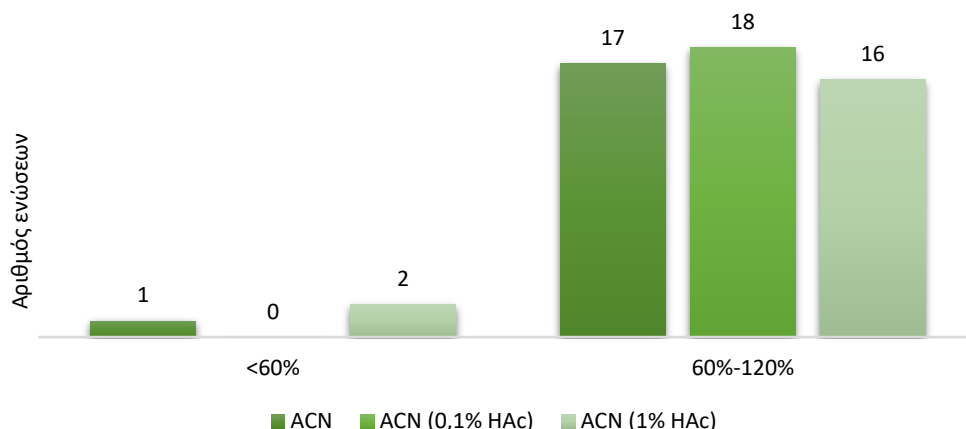
μιγμάτων. Ελέγχθηκε η χρήση οξικού οξέος σε συγκέντρωση 1 % (v/v) όπως προτείνεται στη μέθοδο AOAC 2007.01 και 0,1% (v/v), καθώς επίσης και NH₄OH 2% (v/v).

Για το μείγμα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, η προσθήκη οξικού οξέος 0,1 % (v/v) είχε τη θετικότερη επίδραση στις ανακτήσεις, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8.5. Ο συνδυασμός του οξικού οξέος με το οξικό νάτριο στα άλατα της εκχύλισης, βοήθησε στο διαχωρισμό της οργανικής από την υδατική φάση (salting out effect). Επίσης, η ομογενοποίηση του δείγματος ήταν καλύτερη και τα ιζήματα λιγότερο κολλώδη, γεγονός που είναι σύμφωνο με τη βιβλιογραφία [237].



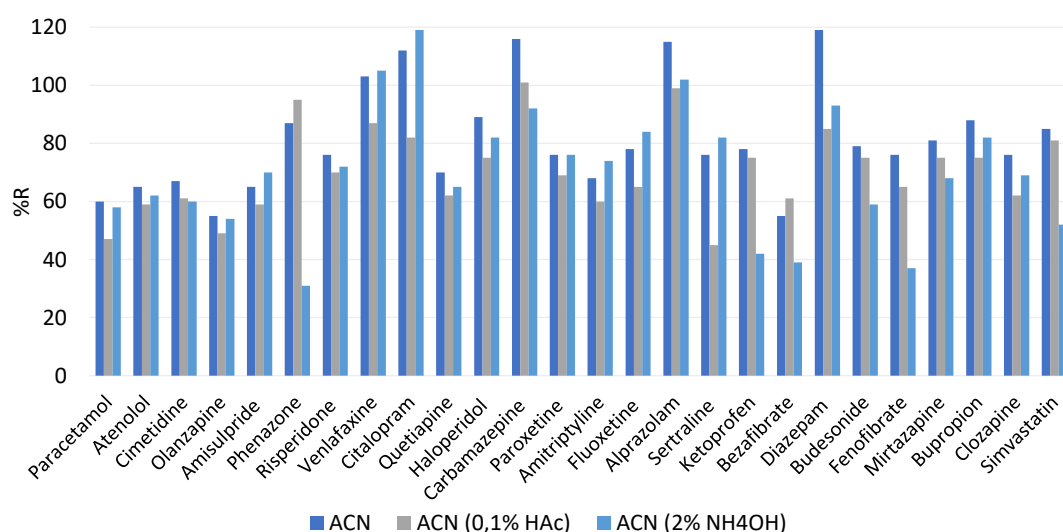
Σχήμα 8.5 Επίδραση της προσθήκης οξικού οξέος στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Γενικά, σε αυτό το στάδιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ακετονιτρίλιο χωρίς την προσθήκη του HAc, καθώς ο μέσος όρος των ανακτήσεων ήταν 80,5% και το εύρος τους ήταν μεταξύ 58% και 95,7%, που είναι αποδεκτές τιμές. Η βελτίωση που επήλθε με την προσθήκη HAc είχε ως αποτέλεσμα μέσο όρο ανακτήσεων 81,8% και 74,8% για συγκέντρωση 0,1 % (v/v) και 1% (v/v) αντίστοιχα. Ωστόσο, αποφασίστηκε η προσθήκη του καθώς είναι σύμφωνη με μεγάλο μέρος της βιβλιογραφίας, λόγω της προστασίας των ευαίσθητων σε βασικό περιβάλλον φυτοπροστατευτικών ενώσεων [184, 234] και στην αύξηση της ανάκτησης της ένωσης imazalil που παρουσιάζει επίπεδη κυκλική δομή ('planar pesticide').



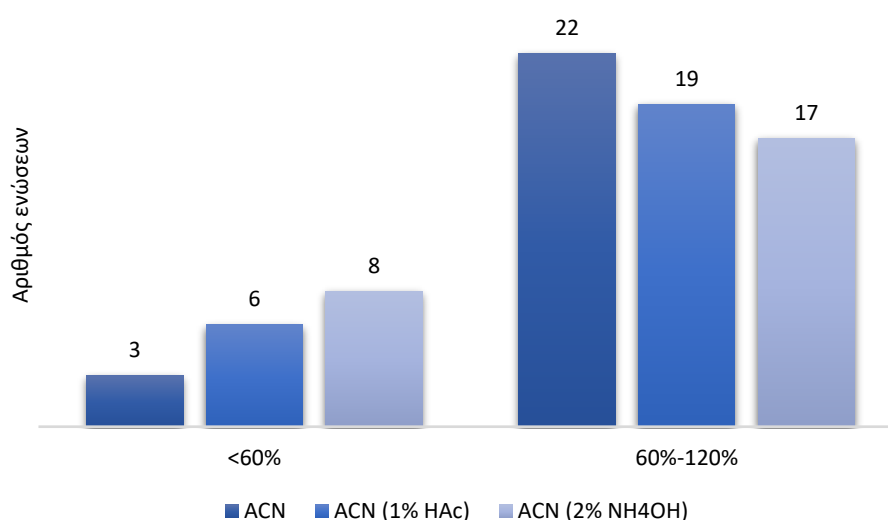
Σχήμα 8.6 Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την προσθήκη οξικού οξέος

Για το μείγμα των φαρμακευτικών ενώσεων, η προσθήκη HAc 1% (v/v) και συνεπώς η δραστική μείωση του pH δεν κρίθηκε αναγκαία βάσει των pK_a των ενώσεων, ενώ η προσθήκη οξικού οξέος 0,1% (v/v) δεν επέδρασε ιδιαίτερα θετικά στις ανακτήσεις, με εξαίρεση τις αρκετά όξινες ενώσεις (phenazone, bezafibrate, ketoprofen). Στη συνέχεια, επειδή αρκετές ενώσεις όπως τα ψυχιατρικά φάρμακα είχαν pK_a κοντά στο 9, πραγματοποιήθηκε δοκιμή με την προσθήκη NH_4OH 2% (v/v), δεδομένου ότι χρησιμοποιείται κατά την έκλυση αυτών των ενώσεων από υδατικά δείγματα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 8.7.



Σχήμα 8.7 Επίδραση της προσθήκης οξικού οξέος και NH_4OH στις ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων

Η χρήση του NH_4OH βελτίωσε τις ανακτήσεις των ενώσεων με υψηλά pK_a που είναι στην ουδέτερη μορφή τους σε υψηλότερα pH άρα έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με το ακετονιτρίλιο. Ωστόσο, οι υπόλοιπες ενώσεις εμφάνισαν ανακτήσεις κάτω από τα αποδεκτά όρια και τελικά το ακετονιτρίλιο χωρίς τροποποιητές αποδείχτηκε η καλύτερη επιλογή για να εκχυλιστούν όλες οι φαρμακευτικές ενώσεις σε ένα βήμα, με υψηλότερες ανακτήσεις για το 65% του συνόλου των ενώσεων. Στο Σχήμα 8.8 φαίνεται ο αριθμός των φαρμακευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις <60% και 60%-120% με την προσθήκη διαφορετικών τροποποιητών στο ακετονιτρίλιο.



Σχήμα 8.8 Εύρος ανακτήσεων των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων με την προσθήκη οξικού οξέος

8.2.4 Ποσότητα δείγματος

Τα αρχικά πειράματα για τον καθορισμό των αλάτων, του διαλύτη εκχύλισης και του pH διαλύτη πραγματοποιήθηκαν με 2 g λυοφιλιωμένου ιζήματος. Αφού καθορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές των παραπάνω παραμέτρων, μελετήθηκαν οι ποσότητες 1g, 5 g και 10 g ιζήματος και γενικά δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στις ανακτήσεις. Η χρήση 1 g δείγματος είχε ως αποτέλεσμα πιο διαυγή εκχυλίσματα και καθόλου επιβαρυμένα χρωματογραφήματα. Ωστόσο, η απουσία σταδίου προσυγκέντρωσης στη μέθοδο QuEChERS σε συνδυασμό με το 1 g δείγματος θα είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα όρια της μεθόδου, δυσχεραίνοντας την πολύ-υπολειμματική ανάλυση. Τα χρωματογραφήματα από τα εμβολιασμένα δείγματα των 5g και 10g ήταν ελαφρώς πιο επιβαρυμένα, με υψηλότερο

θόρυβο και πιο ευρείες κορυφές, ακόμα και όταν το εύρος της γραμμής βάσης (base-line peak width) ήταν περιορισμένο στα 25–40 s.

Η χρήση 2 g ιζήματος ως βέλτιστη ποσότητα δείγματος προς εκχύλιση παρουσιάζει και άλλα πλεονεκτήματα. Η παραλαβή σχετικά μικρού όγκου εκχυλίσματος για καθαρισμό συνεπάγεται μικρότερη κατανάλωση αντιδραστηρίων και μικρότερο κόστος για την ανάλυση, κάτι που είναι σύμφωνο με την τάση για απλοποίηση και «σμίκρυνση» (miniaturization) των μεθόδων. Επίσης, η ομογενοποίηση του δείγματος είναι καλύτερη και ευκολότερη, ενώ δε χρειάζεται κρυο-λειοτριβήση (cryo-milling) που είναι απαραίτητη για μεγαλύτερες ποσότητες. Τέλος, ακόμα και αν δε συμπυκνωθεί ο διαλύτης η προσυγκέντρωση των αναλυτών ($0,2 \text{ g mL}^{-1}$) είναι αρκετή ώστε να καθιστά τους αναλύτες ανιχνεύσιμους σε ενόργανες διατάξεις όπως το LC-LTQ/Orbitrap MS.

8.2.5 Επανυδάτωση ιζήματος πριν από την εκχύλιση

Η προσθήκη νερού στο δείγμα πριν τη διαδικασία της εκχύλισης αποσκοπεί στη μείωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναλυτών του υποστρώματος. Επίσης οι πόροι του ιζήματος είναι πιο επιδεκτικοί στην πρόσβαση του διαλύτη εκχύλισης όταν έχουν ενυδατωθεί, λόγω καλύτερης κατανομής των αναλυτών μεταξύ της υδατικής και οργανικής φάσης. [238]. Το νερό που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι κρύο, καθώς, έτσι περιορίζεται η παραγόμενη θερμότητα από την προσθήκη MgSO_4 κατά την εκχύλιση (εξώθερμη αντίδραση) και προστατεύονται οι θερμικά ευαίσθητες ενώσεις [239]. Προτιμάται τέτοιος όγκος νερού ώστε η αναλογία νερού/διαλύτη εκχύλισης να είναι 1:1, ενώ σε υποστρώματα με υψηλή υγρασία η αναλογία αυτή ταυτίζεται και με την ποσότητα νερού ανά ποσότητα δείγματος [138].

Τα αρχικά πειράματα είχαν πραγματοποιηθεί με 10 mL κρύου νερού. Έπειτα ελέγχθηκε η προσθήκη νερού σε αναλογία 1:1 με το δείγμα (2 mL) η οποία απορρίφθηκε, καθώς άμεσα όλο το νερό απορροφήθηκε από το δείγμα, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία [165]. Η επανυδάτωση του δείγματος με 15 mL νερού δεν επέφερε αξιοσημείωτη βελτίωση στις ανακτήσεις. Για αυτό και τελικά χρησιμοποιήθηκαν 10 mL νερού, τιμή που είναι σύμφωνη με άλλες εργασίες όπου εξετάστηκε η παράμετρος αυτή [233, 234, 240]. Επίσης, υπολογίστηκε ότι ο μέσος όγκος εκχυλίσματος μετά το πρώτο στάδιο της εκχύλισης είναι 8,5 mL - 10 mL, λόγω της ανάμειξης του δείγματος με τα άλατα.

8.2.6 Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση

Ψύξη δειγμάτων πριν από την εκχύλιση

Η παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη μετά την εκχύλιση και πριν από τον καθαρισμό τους δεν είχε κάποια επίδραση στις ανακτήσεις. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ψύξη του δείγματος συνιστάται όταν το υπόστρωμα είναι υψηλής περιεκτικότητας σε λίπη ή κηρούς, δηλαδή συστατικά που απομακρύνονται με την ψύξη χωρίς να παρασύρονται ταυτόχρονα τα φυτοφάρμακα [239]. Αν και η μελέτη της παραμέτρου δεν ήταν σημαντική για τη βελτίωση των ανακτήσεων, εξασφάλισε ότι σε περίπτωση που ο καθαρισμός δεν είναι εφικτός αμέσως μετά την εκχύλιση, η συντήρηση των δειγμάτων στην κατάψυξη δε θα επηρεάζει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επίσης, η εκχύλιση των δειγμάτων όταν είναι κρύα εμποδίζει την τυχόν διάσπαση των προσδιοριζόμενων ενώσεων, που μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα της εξώθερμης αντίδρασης που συντελείται με την προσθήκη του οξικού νατρίου.

Χρόνος εκχύλισης

Ο χρόνος εκχύλισης φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο την αναπαραγωγικότητα και την επαναληψιμότητα της μεθόδου, παρά την αποτελεσματικότητα της. Ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικοί χρόνοι εκχύλισης: 1 min όπως προτείνεται στην κλασική μέθοδο, 2 min και 4 min. Οι χρόνοι εκχύλισης 1 min και 2 min δεν παρουσίασαν καμία διαφορά, ενώ στα 4 min παρατηρήθηκε απώλεια για ορισμένους αναλύτες (overextraction). Επομένως, η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε 1 min, για την ελαχιστοποίηση του απαιτούμενης χρονικής διάρκειας της ανάλυσης.

Σχηματισμός συσσωματωμάτων

Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, απαιτείται έντονη ανάδευση προκειμένου να εξασφαλιστούν υψηλές ανακτήσεις και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η προσθήκη $MgSO_4$ μπορεί να προκαλέσει σχηματισμό κρυσταλλικών συσσωματωμάτων και να παρεμποδίσει την ομαλή διαδικασία της εκχύλισης, καθιστώντας αβέβαιη την αποτελεσματικότητά της. Για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων ο φυγοκεντρικός σωλήνας με το δείγμα, το νερό και το διαλύτη εκχύλισης, τοποθετήθηκε στην ελάχιστη ταχύτητα στο vortex και το μείγμα αλάτων προστέθηκε αργά και συνεχόμενα, πριν το ερμητικό κλείσιμο του σωλήνα και την έντονη ανάδευση του στη μέγιστη ταχύτητα της συσκευής.

Επίσης, για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων αποδείχθηκε σημαντική η πολύ καλή ομογενοποίηση του δείγματος και η κονιορτοποίηση του κατά την προκατεργασία, καθώς οι μικροί σε διάμετρο πόροι αυξάνουν την επιφάνεια επαφής.

8.3 Καθαρισμός εκχυλισμάτων (clean-up)

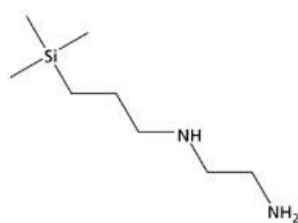
Το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) που ακολουθεί την εκχύλιση και προηγείται της ανάλυσης, είναι απαραίτητο σε πολύπλοκα και επιβαρυσμένα υποστρώματα όπως το ίζημα, για τη βελτίωση της ευαισθησίας και ανθεκτικότητας της μεθόδου, τη διευκόλυνση της ταυτοποίησης και της ποσοτικοποίησης, καθώς και για την αποφυγή της επιβάρυνσης και επιμόλυνσης των ενόργανων διατάξεων. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται με τη μείωση των παρεμποδίσεων που προέρχονται από το υπόστρωμα (λιπίδια, κηροί, λιπαρά οξέα, στερόλες, χρωστικές, χλωροφύλλες, ξανθοφύλλες, αζωτούχες πρωτεΐνες, αλκαλοειδή, υδατάνθρακες, λιγνίνες, φαινόλες, τερπένια κ.α.) και στην απελευθέρωση των αναλυτών, ώστε να ληφθεί τελικά αναλυτικό σήμα μεγαλύτερης έντασης. Οι τεχνικές καθαρισμού επωφελούνται των διαφορών μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων (πολικότητα, διαλυτότητα, μοριακή μάζα) των αναλυτών και των συστατικών του υποστρώματος.

Στις πολυ-υπολειμματικές μεθόδους, το στάδιο αυτό απαιτεί προσοχή καθώς υπάρχει πιθανότητα απώλειας αναλυτών εκτός από τις παρεμποδίζουσες ενώσεις. Για παράδειγμα, κατά την εξάτμιση του διαλύτη για την επίτευξη προσυγκέντρωσης των αναλυτών, μπορεί να καθιζάνει στερεό, το οποίο εκτός από συστατικά του υποστρώματος, ενδεχομένως περιλαμβάνει και αναλύτες. Παρομοίως, απώλεια αναλυτών μπορεί να επέλθει και κατά την επαναδιάλυση του εκχυλίσματος σε διαλύτη διαφορετικής πολικότητας, λόγω μειωμένης διαλυτότητας των πρώτων στο διαλύτη.

Στην παρούσα Διατριβή εφαρμόστηκε η πιο δημοφιλής και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική καθαρισμού που συνοδεύει την QuEChERS, η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (dispersive solid phase extraction, dSPE) και χρησιμοποιήθηκαν τα κυριότερα εμπορικά διαθέσιμα προσροφητικά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [184, 238] και τις απαιτήσεις της ανάλυσης (φύση προσδιοριζόμενων ενώσεων, φύση υποστρώματος). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν: (α) πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (primary secondary amine, PSA), (β) τροποποιημένη με οκταδέκυλιο πυριτία (C18, octadecyl silica) (γ) γραφίτοποιημένος άνθρακας (graphitized carbon black, GCB) και συνδυασμοί αυτών, με ταυτόχρονη χρήση 150 mg MgSO₄ ανά mL εκχυλίσματος σε όλες τις περιπτώσεις, το οποίο

όπως και στο στάδιο της εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση της εναπομείνουσας υγρασίας.

Η πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (Σχήμα 8.9) είναι ασθενής ανιονανταλλάκτης και χρησιμοποιείται κυρίως για την απομάκρυνση λιπαρών οξέων, οργανικών οξέων, σακχάρων, ορισμένων χρωστικών, ανθοκυανινών και άλλων συνεκλουόμενων συστατικών από το υπόστρωμα. Ταυτόχρονα όμως μπορεί να απομακρυνθούν και αναλύτες με όξινη συμπεριφορά λόγω του θετικού φορτίου του αζώτου σε $\text{pH} < 8$, κίνδυνος που δεν υπάρχει στην παρούσα εργασία καθώς τα οξέα είναι πρωτονιωμένα λόγω οξίνισης με οξικό οξύ.



Σχήμα 8.9 Δομή πρωτοταγούς δευτεροταγούς αμίνης (PSA)

Η τροποποιημένη πυριτία (C18) είναι ένα υδρόφοβο, ανάστροφης φάσης προσροφητικό με εξαιρετικά ισχυρή ικανότητα κατακράτησης των μη πολικών παρεμποδίσσεων. Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το PSA απομακρύνει επίσης πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, στερόλες και άλλες μη πολικές ενώσεις.

Ο γραφίτοποιημένος άνθρακας (graphitized carbon black, GCB) είναι ένα ισχυρό προσροφητικό ανάστροφης φάσης, αποτελεσματικό για την απομάκρυνση χρωστικών, πολυφαινολών και άλλων πολικών ενώσεων. Ωστόσο, υπάρχει κίνδυνος μαζί με τις παρεμποδίζουσες ενώσεις να κατακρατά και πολικά αρωματικά μόρια με επίπεδη κυκλική δομή (planar molecules), με αποτέλεσμα τη μείωση των ανακτήσεων.

Για τη μελέτη των προσροφητικών, η οποία πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τα μείγματα (I) και (II), χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από το ίδιο δείγμα ιζήματος (καθώς τα ιζήματα ανάλογα με την προέλευσή τους μπορεί να εμφανίσουν διαφορετικές τιμές pH και άλλων φυσικοχημικών παραμέτρων [34]), εκχυλισμένο προηγουμένως υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Το δείγμα εμβολιάστηκε με το αντίστοιχο μείγμα σε συγκέντρωση $50 \mu\text{g L}^{-1}$ και αφού χωρίστηκε σε κλάσματα του 1 mL, τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικούς σωλήνες από πολυαιθυλένιο (15 mL) οι οποίοι περιείχαν τους προς εξέταση συνδυασμούς προσροφητικών. Ο καθαρισμός περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.2. Για τον υπολογισμό

των ανακτήσεων καθαρίστηκε και ένα «τυφλό» δείγμα ώστε να συνεκτιμηθούν τυχόν συγκεντρώσεις των αναλυτών που προϋπήρχαν στο ίζημα, ενώ για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας του καθαρισμού έναντι της επίδρασης του υποστρώματος, αναλύθηκε εκχυλίσμα το οποίο δεν υποβλήθηκε σε καθαρισμό.

Για τον καθορισμό του βέλτιστου συνδυασμού, λήφθηκαν υπόψη τόσο οι ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων όσο και η επίδραση του υποστρώματος. Στις επόμενες παραγράφους, η χρήση του $MgSO_4$ σε κάθε δοκιμή για την απομάκρυνση της υγρασίας είναι δεδομένη και δεν επαναλαμβάνεται στο κείμενο και στα Σχήματα, χάριν απλούστευσης. Επίσης, οι ποσότητες των προσροφητικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 50 mg ανά mL εκχυλίσματος για το PSA, καθώς η προτεινόμενη αναλογία $MgSO_4/PSA$ όταν χρησιμοποιείται η προσέγγιση AOAC 2007.01 είναι 3/1 (200 mg προσροφητικών ανά mL εκχυλίσματος), 50 mg για το C18, αφού τα ιζήματα δε συγκαταλέγονται στα πολύ λιπαρά υποστρώματα και 25 mg GCB, εφόσον δεν πρόκειται για υπόστρωμα που περιέχει μεγάλη ποσότητα χρωστικών ενώσεων.

8.3.1 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις

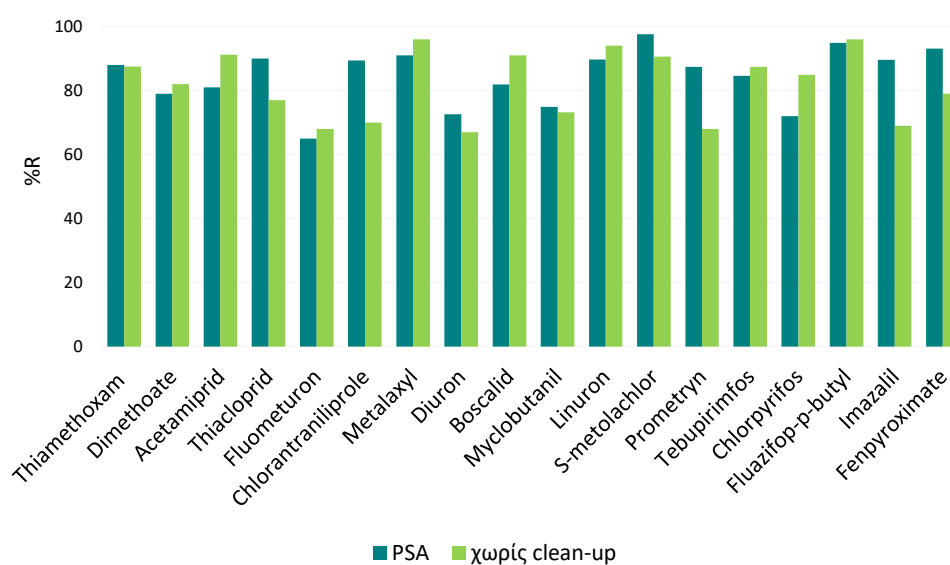
Οι ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων πριν τον καθαρισμό κυμαίνονταν μεταξύ 67% (diuron) και 96% (fluazifop-p-butyl). Η επίδραση του υποστρώματος πριν τον καθαρισμό ήταν μεταξύ -30% (thiamethoxam) και 16% (chlorpyrifos), ενώ σημαντική επίδραση υποστρώματος ($>\pm 20\%$) παρατηρήθηκε και για τις ενώσεις linuron και metolachlor. Οι ανακτήσεις (% R) και η επίδραση υποστρώματος (% ME) πριν τον καθαρισμό φαίνονται στον Πίνακα 8.1. Με έντονη γραφή σημειώνονται οι ενώσεις που εμφάνισαν σημαντική επίδραση υποστρώματος πριν τον καθαρισμό.

Πίνακας 8.1 Ανακτήσεις (% R) και επίδραση υποστρώματος (% ME) πριν τον καθαρισμό

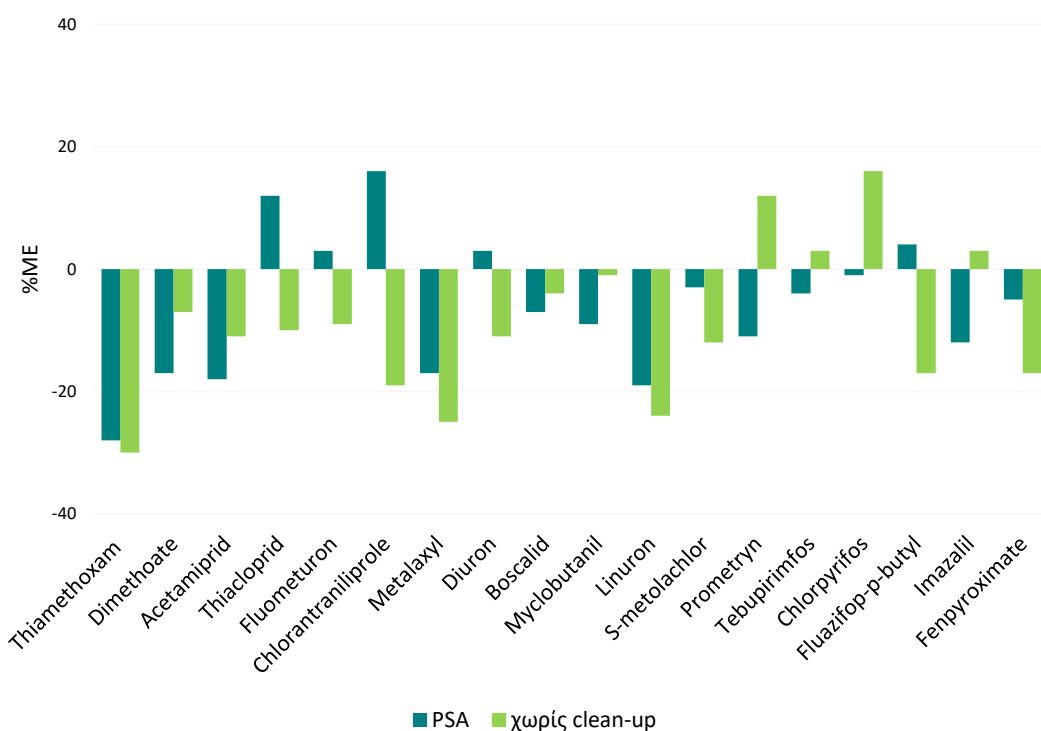
Φυτοπροστατευτική ένωση	% R	% ME
Diuron	67,0	-11
Fluazifop-p-butyl	96,0	-17
Fluometuron	68,0	-9
Linuron	94,0	-24
Prometryn	68,0	12
S-metolachlor	90,6	-12
Chlorantraniliprole	70,0	-19

Φυτοπροστατευτική ένωση	% R	% ME
Chlorpyrifos	84,9	16
Dimethoate	82,0	-7
Tebupirimfos	87,4	3
Thiacloprid	77,0	-10
Thiamethoxam	87,5	-30
Boscalid	91,0	-4
Imazalil	69,0	3
Metalaxyl	96,0	-25
Acetamiprid	91,2	-11
Fenpyroximate	79,0	-17

Η χρήση PSA οδήγησε σε αύξηση των ανακτήσεων για το 50% των επιλεγμένων ενώσεων. Οι ανακτήσεις μετά τον καθαρισμό κυμάνθηκαν μεταξύ 65% (fluometuron) και 98% (*S*-metolachlor), ενώ η μεγαλύτερη αύξηση (κατά 19,6%) σημειώθηκε για την ένωση prometryn. Όσον αφορά την επίδραση του υποστρώματος, υπολογίστηκε μεταξύ -28% (thiamethoxam) και 16% (chlorantraniliprole). Ωστόσο, για το σύνολο των ενώσεων δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μείωση. Η επίδραση του PSA στις ανακτήσεις και στην επίδραση του υποστρώματος φαίνεται στα Σχήματα 8.10 (α) και (β) αντίστοιχα.



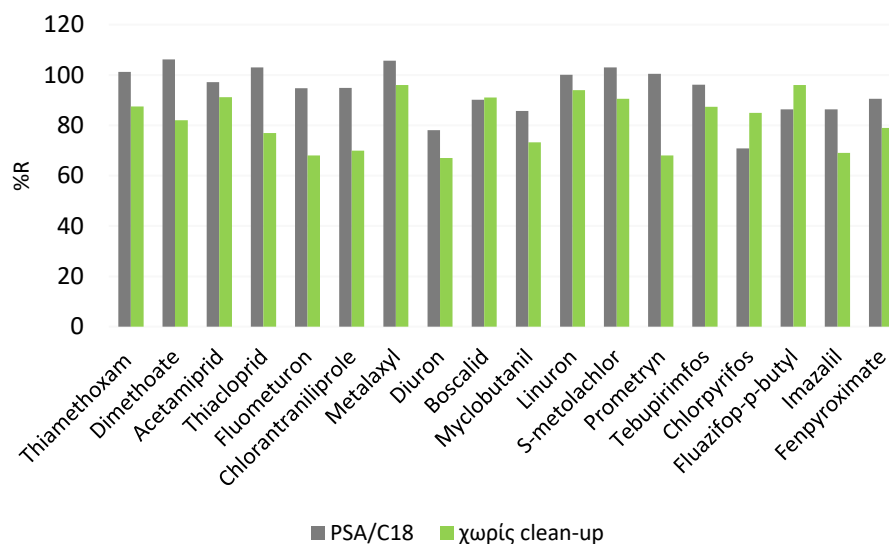
(α)



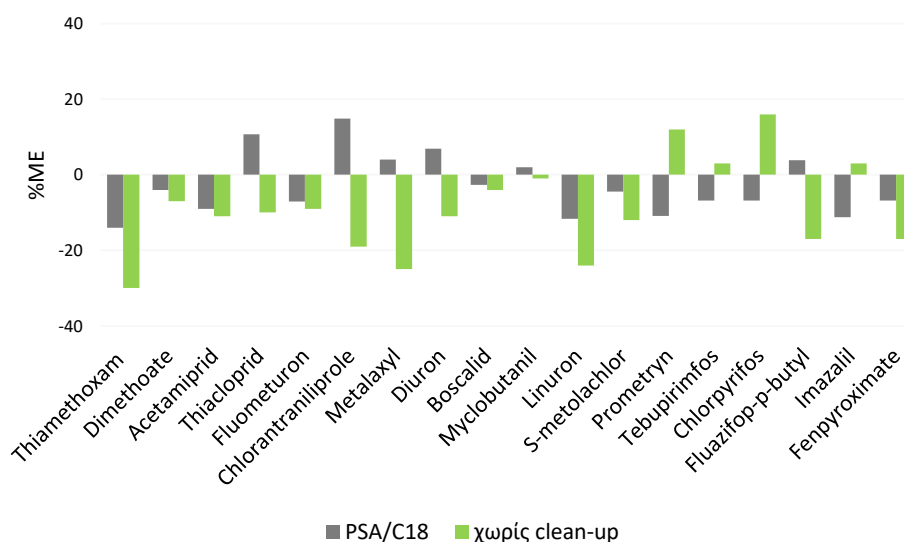
(β)

Σχήμα 8.10 Επίδραση PSA (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Ακολούθησε δοκιμή για το συνδυασμό PSA/C18 και παρατηρήθηκε αύξηση των ανακτήσεων για το 83% των αναλυτών, με τιμές >90% για 13 από τις 17 ενώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και στην περίπτωση που οι ανακτήσεις μειώθηκαν, η μεταβολή δεν ήταν σημαντική και ήταν σε όλες τις περιπτώσεις εντός των αποδεκτών ορίων, με χαμηλότερη τιμή το 71% για το chlorpyrifos. Τα εκχυλίσματα ήταν οπτικά πιο καθαρά από ότι στον καθαρισμό μόνο με PSA, γεγονός επιβεβαίωσαν οι τιμές του %ME. Πρακτικά, καμία ένωση δεν εμφάνισε επίδραση υποστρώματος. Η επίδραση των PSA/C18 στις ανακτήσεις και στην επίδραση του υποστρώματος φαίνεται στα Σχήματα 8.11 (α) και (β).



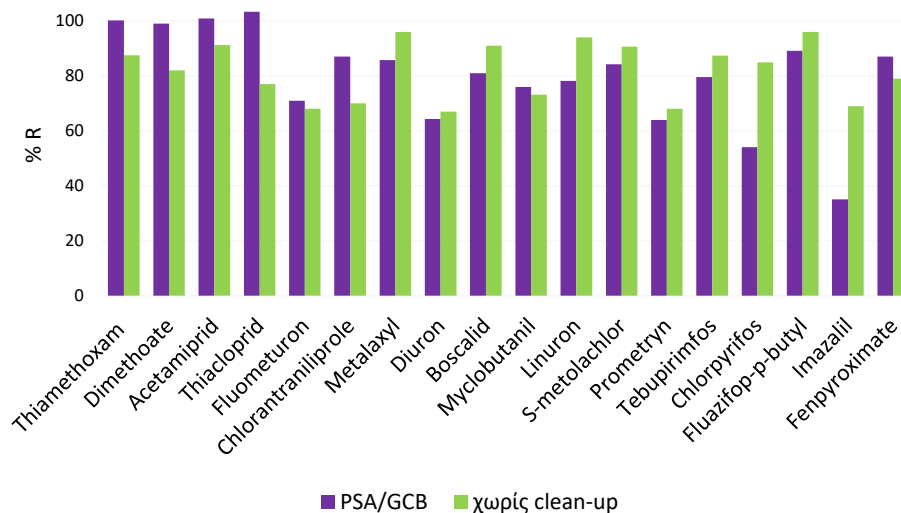
(α)



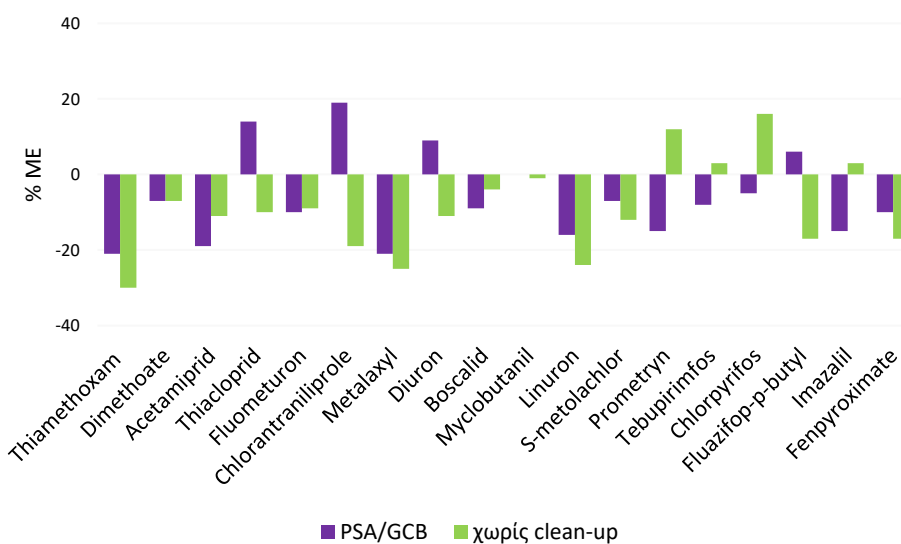
(β)

Σχήμα 8.11 Επίδραση PSA/C18 (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Η τελευταία δοκιμή, περιλάμβανε γραφίτοποιημένο άνθρακα (GCB) και κρίθηκε ακατάλληλη για αρκετούς λόγους. Πρώτον, προκάλεσε σημαντικά μειωμένες ανακτήσεις για το 60% των αναλυτών. Δεύτερον, παρατηρήθηκαν ανακτήσεις κάτω από τα αποδεκτά όρια, όπως στην περίπτωση του chlorpyrifos (54%) και imazalil (35%), του οποίου η επίπεδη δακτυλική δομή είναι αποτρεπτικός παράγοντας για τη χρήση GCB, αφού συγκρατεί ισχυρά τέτοια μόρια. Τέλος, η χρήση GCB δυσχέραινε το διαχωρισμό των φάσεων και τη λήψη καθαρού τελικού εκχυλίσματος. Η επίδραση των PSA/GCB στις ανακτήσεις φαίνεται στα Σχήματα 8.12 (α) και (β).



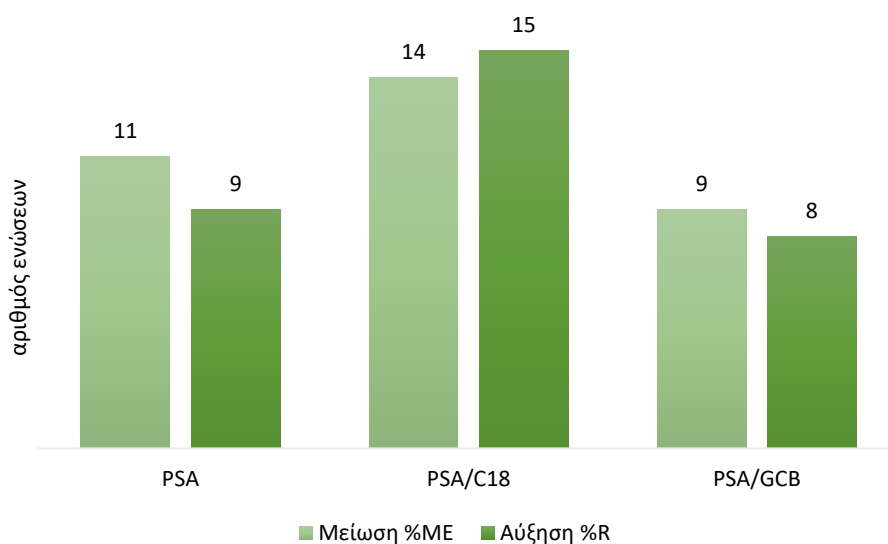
(α)



(β)

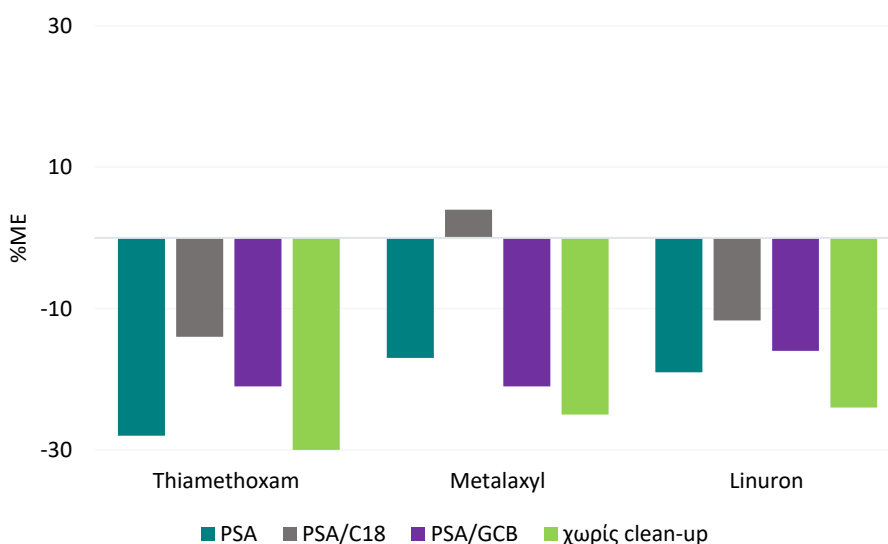
Σχήμα 8.12 Επίδραση PSA/GCB (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Από τις τιμές των ανακτήσεων είναι εμφανές ότι το PSA είναι αρκετά αποτελεσματικό για την αύξηση των ανακτήσεων, ωστόσο ο συνδυασμός του με το C18 οδηγεί στην καλύτερη απομάκρυνση παρεμποδίζουσών ουσιών, αφού παρατηρείται και μεταβολή στην επίδραση του υποστρώματος. Στο Σχήμα 8.13 φαίνεται ο αριθμός των ενώσεων για τις οποίες μειώθηκε η επίδραση από το υπόστρωμα και βελτιώθηκαν οι ανακτήσεις, για κάθε προσροφητικό/συνδυασμό προσροφητικού που μελετήθηκε.

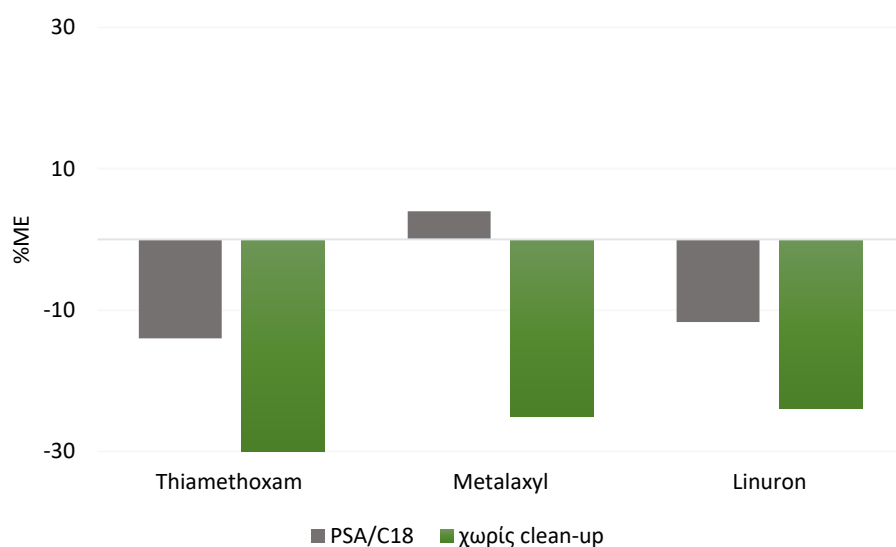


Σχήμα 8.13 Αριθμός ενώσεων με βελτιωμένες ανακτήσεις και μικρότερη επίδραση από το υπόστρωμα για κάθε προσροφητικό/συνδυασμό προσροφητικού που μελετήθηκε

Στο Σχήμα 8.14 φαίνεται η επίδραση των προσροφητικών που δοκιμάστηκαν στις ενώσεις που εμφάνισαν αρχικά σημαντική επίδραση υποστρώματος ($<\pm 20\%$) ενώ στο Σχήμα 8.15 φαίνεται η επίδραση του τελικώς επιλεγμένου προσροφητικού στις ίδιες ενώσεις.



Σχήμα 8.14 Επίδραση προσροφητικών καθαρισμού στις ενώσεις που εμφάνισαν επίδραση υποστρώματος ($>\pm 20\%$)



Σχήμα 8.15 Επίδραση υποστρώματος μετά την εφαρμογή του βέλτιστου συνδυασμού προσροφητικών για τις ενώσεις που αρχικά εμφάνισαν ME% >±20%)

8.3.2 Φαρμακευτικές ενώσεις

Οι ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων πριν τον καθαρισμό κυμαίνονταν μεταξύ 55% (olanzapine) και 119% (diazepam). Εκτός από το diazepam, ανακτήσεις μεγαλύτερες από 100% αλλά εντός των αποδεκτών τιμών, είχαν εμφανίσει οι ενώσεις alprazolam, carbamazepine, citalopram και venlafaxine, αποτελώντας συνολικά το 19% των μελετώμενων ενώσεων, προφανώς λόγω συνεκχύλισης με συστατικά από το υπόστρωμα.

Η επίδραση του υποστρώματος πριν τον καθαρισμό ήταν μεταξύ -42% (paracetamol) και 31% (venlafaxine). Σημαντική επίδραση υποστρώματος (>±20 %) παρατηρήθηκε για το 27% των ενώσεων του μείγματος (II) με τις μεγαλύτερες τιμές να υπολογίζονται για τις ενώσεις citalopram, quetiapine, carbamazepine και fluoxetine. Οι ανακτήσεις (% R) και η επίδραση υποστρώματος (% ME) πριν τον καθαρισμό φαίνονται στον Πίνακα 8.2. Με έντονη γραφή σημειώνονται οι ενώσεις όπου παρατηρήθηκε αρχικά σημαντική επίδραση υποστρώματος.

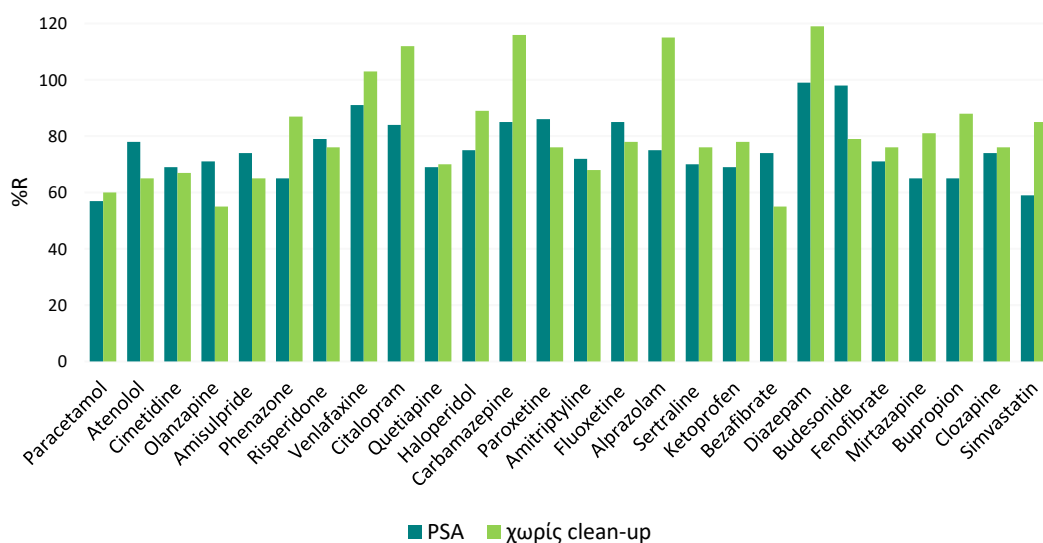
Πίνακας 8.2 Ανακτήσεις (% R) και επίδραση υποστρώματος (% ME) πριν τον καθαρισμό

Φαρμακευτική ένωση	% R	% ME
Alprazolam	115	-19
Amisulpride	65	-8
Amitriptyline	68	-2
Bupropion	88	-14
Carbamazepine	116	-26
Citalopram	112	-26

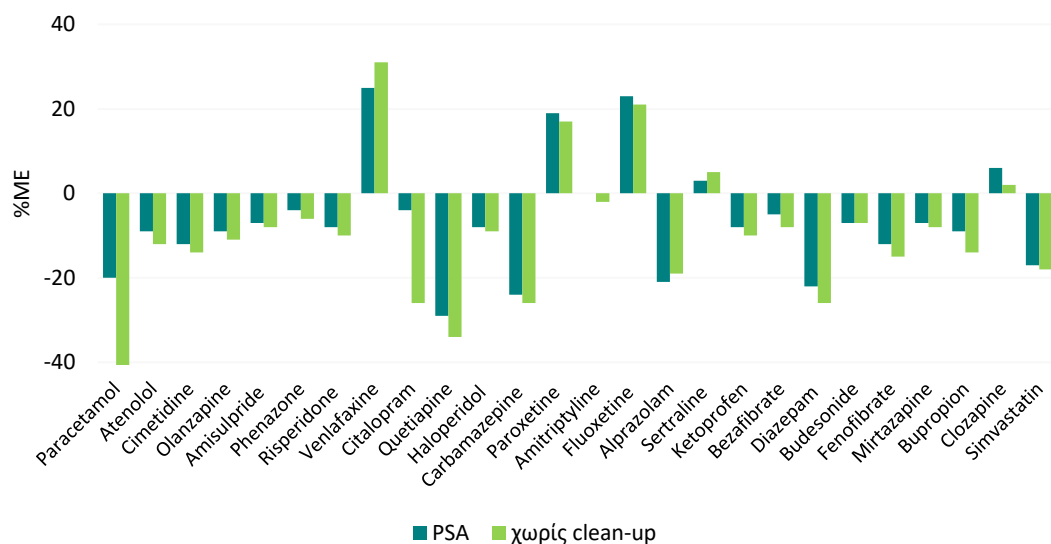
Φαρμακευτική ένωση	% R	% ME
Clozapine	76	2
Diazepam	119	-26
Fluoxetine	78	21
Haloperidol	89	-9
Mirtazapine	81	-8
Olanzapine	55	-11
Paroxetine	76	17
Quetiapine	70	-34
Risperidone	76	-10
Sertraline	76	5
Venlafaxine	103	31
Paracetamol	60	-42
Ketoprofen	78	-10
Phenazone	87	-6
Bezafibrate	55	-8
Fenofibrate	76	-15
Atenolol	65	-12
Budesonide	79	-7
Cimetidine	67	-14

Οι ενώσεις για τις οποίες παρατηρήθηκε επίδραση υποστρώματος επισημαίνονται με έντονη γραφή

Η πρώτη δοκιμή περιλάμβανε τη χρήση PSA, με τις ανακτήσεις να κυμαίνονται μεταξύ 57% (paracetamol) και 99% (diazepam) και την επίδραση του υποστρώματος μεταξύ -29% (quetiapine) και 25% (venlafaxine). Στα Σχήματα 8.16 (α) και (β) φαίνεται ότι δέκα ενώσεις εμφάνισαν αυξημένες ανακτήσεις (38 % επί του συνόλου των ενώσεων) ενώ το 81 % των ενώσεων εμφάνισε μείωση της επίδρασης του υποστρώματος.



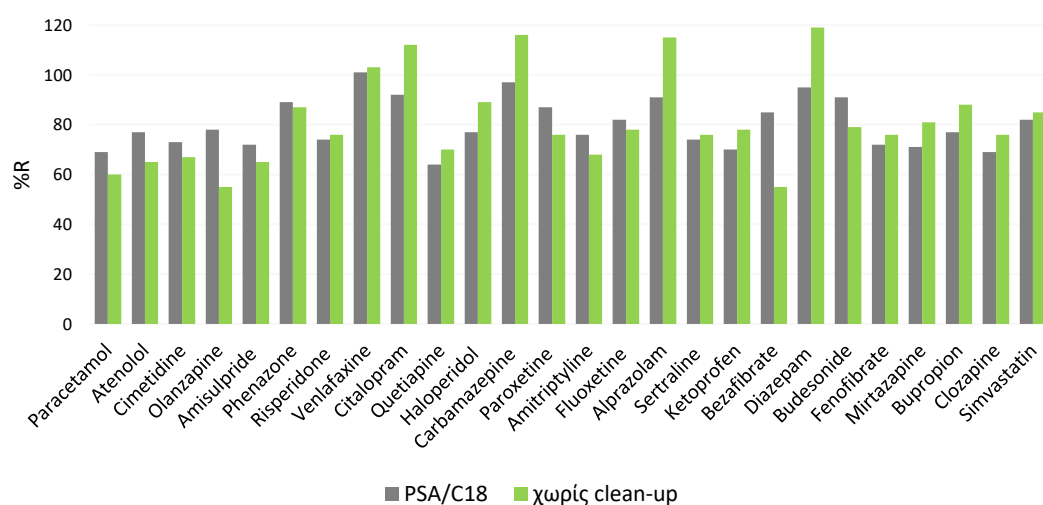
(α)



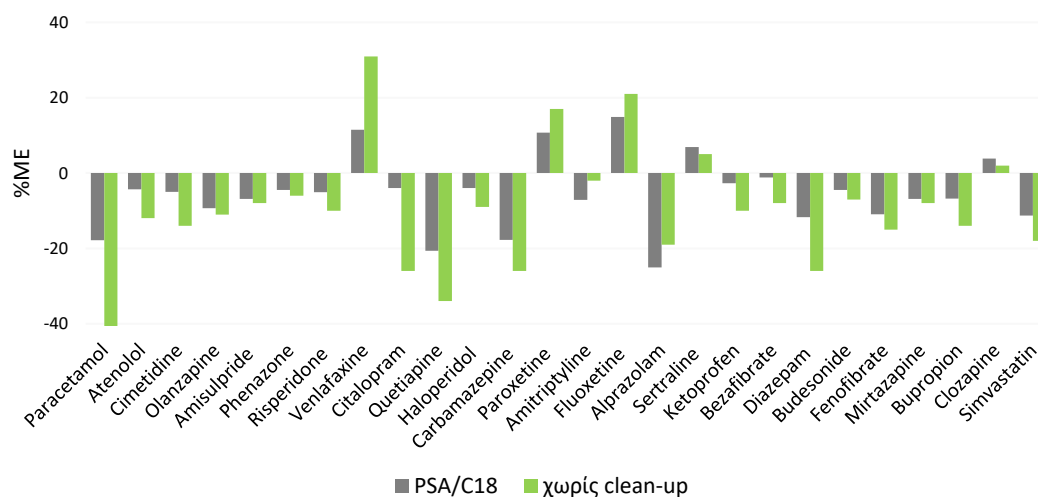
(β)

Σχήμα 8.16 Επίδραση PSA (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φαρμακευτικών ενώσεων

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το PSA είναι αποτελεσματικό για τη βελτίωση των ανακτήσεων και τη μείωση της επίδρασης του υποστρώματος ναί μεν για πολλές ενώσεις, αλλά όχι σε πολύ μεγάλο βαθμό. Για αυτό και κρίθηκε αναγκαία και η δοκιμή του σε συνδυασμό με άλλα προσροφητικά. Έτσι, ακολούθησε δοκιμή με PSA/C18, δίνοντας ανακτήσεις σε εύρος 64 % - 101 % (quetiapine και venlafaxine αντίστοιχα) και επίδραση υποστρώματος μεταξύ 15 % και -25 %. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 8.17 (α) και (β).



(α)

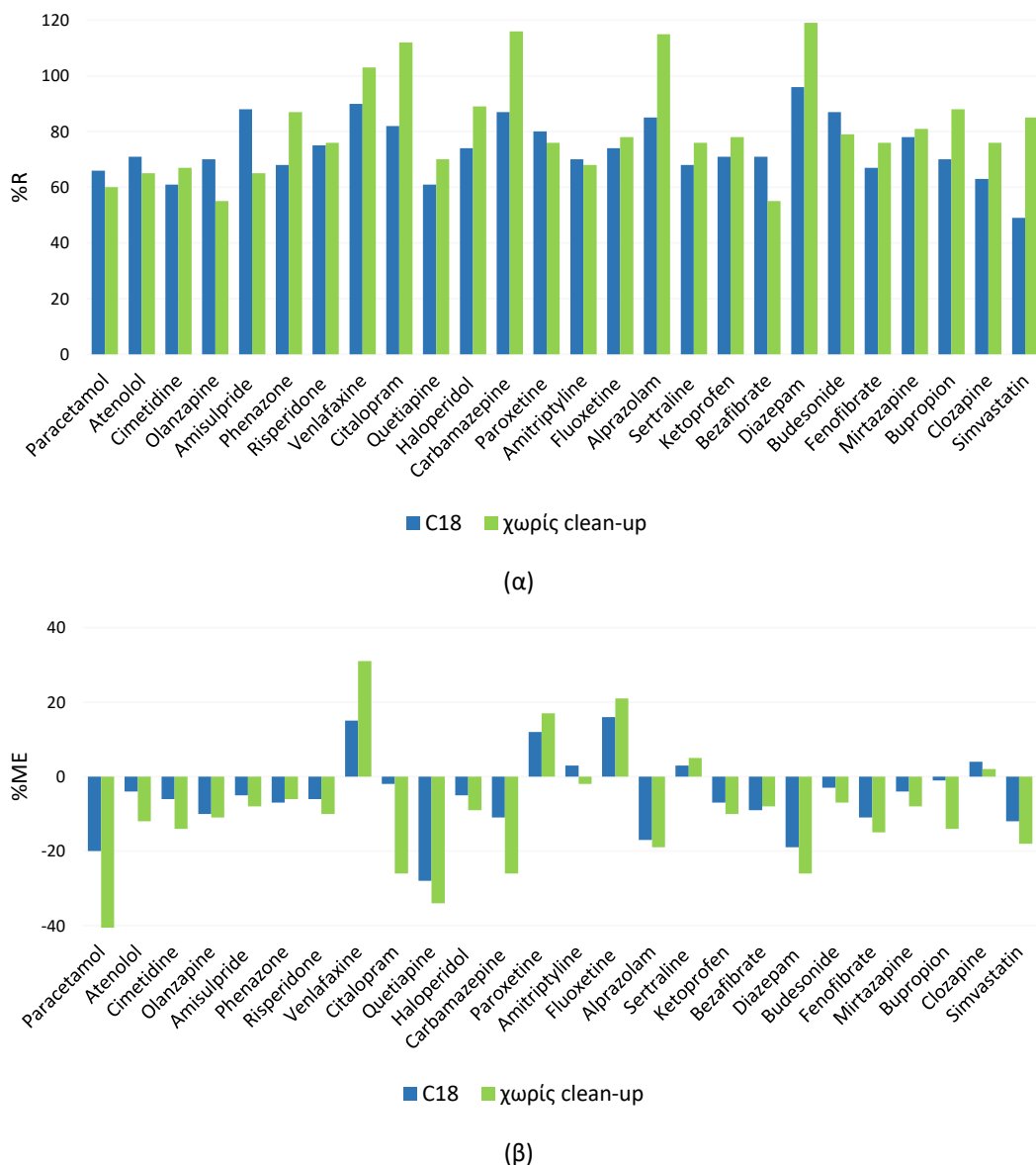


(β)

Σχήμα 8.17 Επίδραση PSA/C18 (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φαρμακευτικών ενώσεων

Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση PSA/C18 βελτίωσε τις ανακτήσεις για το 50 % των ενώσεων και μείωσε την επίδραση του υποστρώματος για το 85 % αυτών, ωστόσο είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι μόνο δύο (quetiapine και alprazolam) από τις 26 ενώσεις παρουσίασαν οριακά σημαντική επίδραση του υποστρώματος (-21 % και -25 % αντίστοιχα), επιβεβαιώνοντας πως όταν το PSA χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το C18, μπορούν να απομακρυνθούν περισσότερα λιπίδια και παρόμοιες ενώσεις.

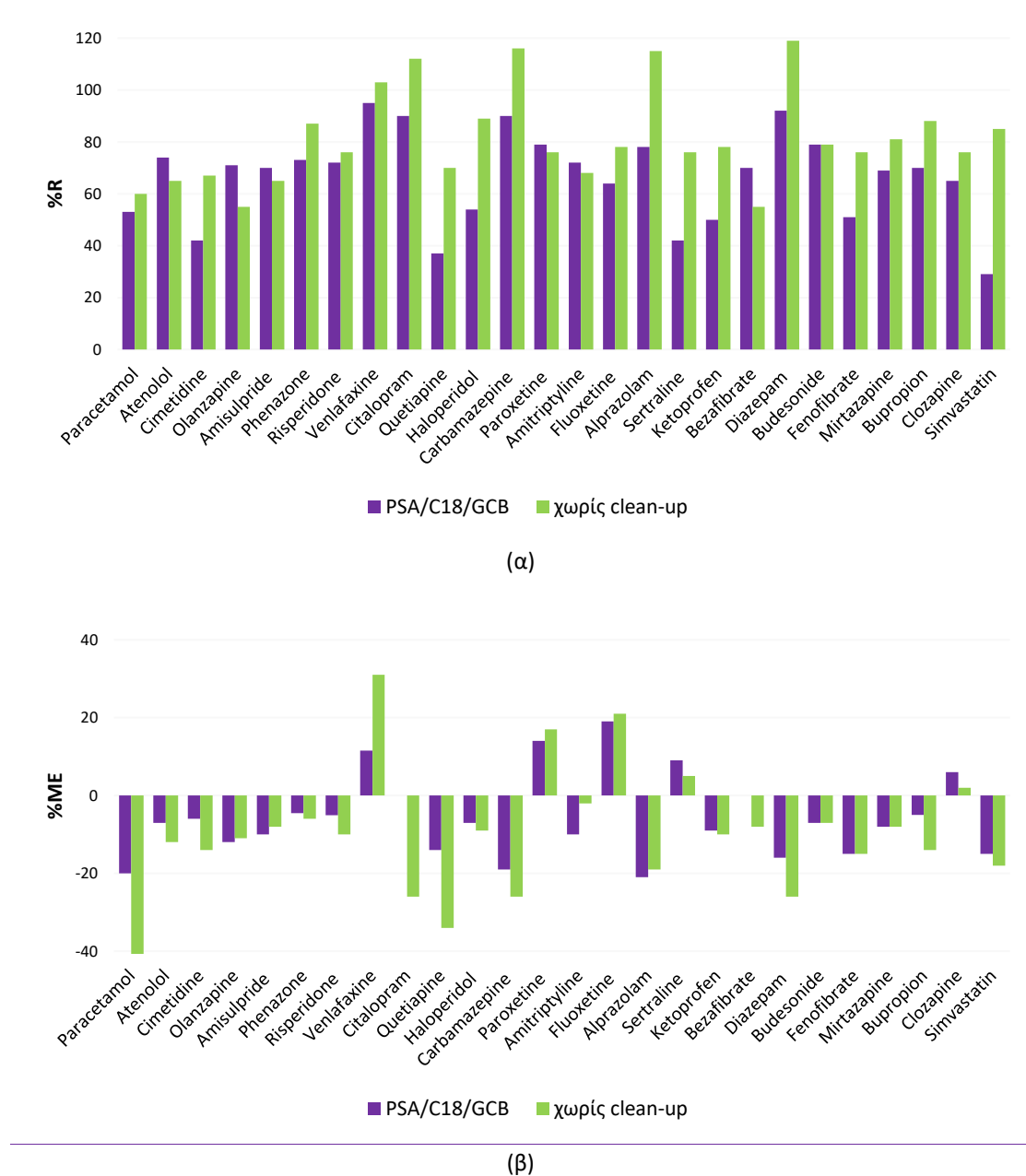
Ακολούθησε δοκιμή με τη χρήση C18 χωρίς την προσθήκη PSA δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα τόσο σε επίπεδο ανακτήσεων όσο και μείωσης της επίδρασης του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 49% (simvastatin) έως 96% (diazepam) και η επίδραση του υποστρώματος από -28% (quetiapine) έως 16% (fluoxetine). Στο σημείο αυτό θα μπορούσαμε να επιλέξουμε το C18 ως καταλληλότερο προσροφητικό, αφού η αποτελεσματικότητα του για τη μείωση της επίδρασης του υποστρώματος ήταν εξίσου καλή με αυτή από το συνδυασμό του με το PSA (85% των ενώσεων και στις δυο περιπτώσεις) και η χρήση περισσότερων αντιδραστηρίων συνήθως αποτελεί παράγοντα αύξησης των σφαλμάτων. Ωστόσο, η ανάκτηση της ένωσης simvastatin ήταν μικρότερη από 50%, και επίσης οι ανακτήσεις ήταν υψηλότερες για το 35% των ενώσεων, ελαφρώς μικρότερο ποσοστό σχετικά με αυτό από το συνδυασμό PSA/C18. Τα αποτελέσματα της επίδρασης του C18 στο στάδιο του καθαρισμού φαίνονται στα Σχήματα 8.18 (α) και (β).



Σχήμα 8.18 Επίδραση C18 (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φαρμακευτικών ενώσεων

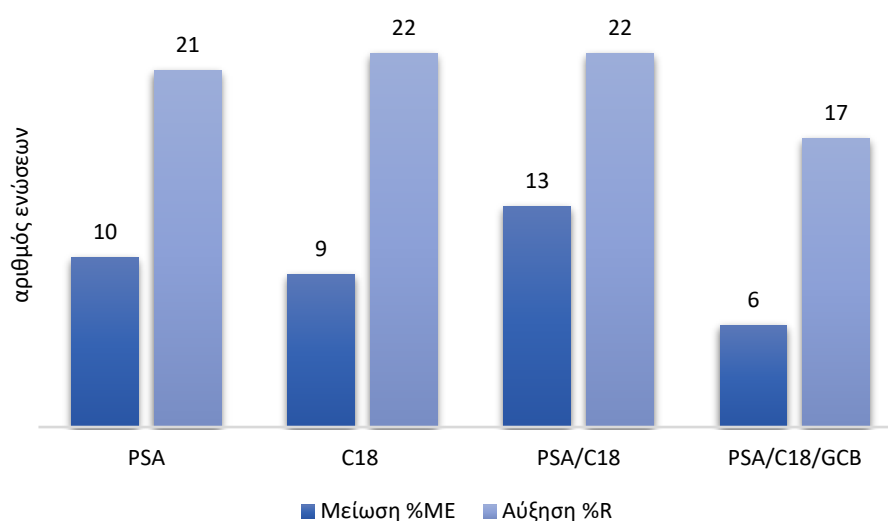
Το τελευταίο προσροφητικό που μελετήθηκε ήταν το GCB. Πραγματοποιήθηκε δοκιμή χρησιμοποιώντας τελικά ένα μείγμα PSA/C18/GCB, το οποίο φαινομενικά έδωσε πολύ καθαρά και διαυγή εκχυλίσματα, αν και η παραλαβή του τελικού υπερκείμενου διαλύματος ήταν ιδιαίτερα δύσκολη. Το GCB αποδείχτηκε ικανό να μειώσει την επίδραση του υποστρώματος για το 65% των ενώσεων, ωστόσο φαίνεται πως ήταν τόσο ισχυρό ώστε κατακράτησε και σημαντικό ποσοστό των αναλυτών, αφού οι ανακτήσεις μειώθηκαν δραματικά για περισσότερες από τις μισές ενώσεις. Αξίζει να σημειωθεί πως η παρουσία του GCB επέδρασε θετικά στις ανακτήσεις μόλις έξι ενώσεων, ενώ το 30% των μελετώμενων φαρμακευτικών παρουσίασε ανακτήσεις κάτω από 60%. Τα αποτελέσματα της επίδρασης

του GCB στις ανακτήσεις και την επίδραση του υποστρώματος φαίνονται στα Σχήματα 8.19 (α) και (β) αντίστοιχα.



Σχήμα 8.19 Επίδραση PSA/C18/GCB (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φαρμακευτικών ενώσεων

Στο Σχήμα 8.20 φαίνεται ο αριθμός των ενώσεων για τις οποίες μειώθηκε η επίδραση από το υπόστρωμα και βελτιώθηκαν οι ανακτήσεις, για κάθε προσροφητικό/συνδυασμό προσροφητικού που μελετήθηκε.



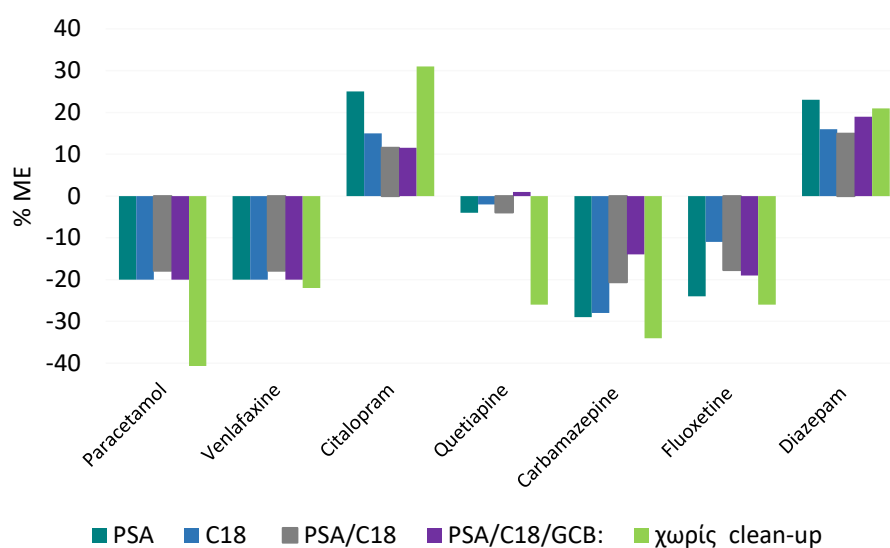
Σχήμα 8.20 Αριθμός ενώσεων με βελτιωμένες ανακτήσεις και μικρότερη επίδραση από το υποστρώμα για κάθε προσροφητικό/συνδυασμό προσροφητικού

Είναι σαφές από το παραπάνω Σχήμα ότι ο συνδυασμός PSA/C18 αποδείχτηκε ο αποτελεσματικότερος για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων. Η χηλική δράση του μορίου PSA, οφειλόμενη στην παρουσία των πρωτοταγών και κυρίως των δευτεροταγών αμινών αποδείχτηκε ικανή για επαρκή κατακράτηση παρεμποδίσεων πολικής φύσης που υπάρχουν στο ίζημα. Ταυτόχρονα, η χρήση του υδρόφοβου, ανάστροφης φάσης προσροφητικού C18 με την εξαιρετικά ισχυρή ικανότητα κατακράτησης των μη πολικών παρεμποδίσεων ικανοποίησε την ανάγκη απαλλαγής από αυτές, ενώ ταυτόχρονα ανακτήθηκαν καλύτερα αναλύτες με όξινη συμπεριφορά, για τους οποίους το PSA μόνο δε θα ήταν επαρκές.

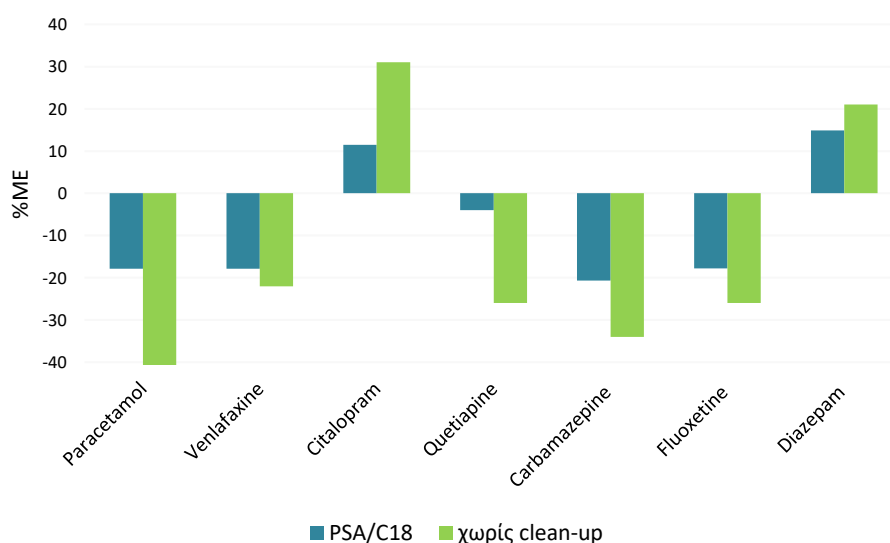
Ο βασικός στόχος του σταδίου του καθαρισμού των δειγμάτων επετεύχθη με τη βελτίωση των ανακτήσεων, ωστόσο η μείωση της επίδρασης του υποστρώματος ήταν μια ακόμα πρόκληση στην ανάπτυξη της μεθόδου. Είναι πολύ σημαντικό ότι με την εφαρμογή του επιλεγμένου clean-up, η επίδραση του υποστρώματος ήταν χαμηλότερη και για τις ενώσεις που αρχικά εμφάνισαν σημαντική επίδραση υποστρώματος. Στον Πίνακα 8.3 και στο Σχήμα 8.21 φαίνονται οι φαρμακευτικές ενώσεις οι οποίες πριν τον καθαρισμό εμφάνισαν σημαντική επίδραση υποστρώματος, καθώς και το πώς η τιμή αυτή μεταβλήθηκε με την εφαρμογή διάφορων προσροφητικών, ενώ στο Σχήμα 8.22 φαίνεται η επίδραση του τελικώς επιλεγμένου προσροφητικού στις ίδιες ενώσεις.

Πίνακας 8.3 Επίδραση προσροφητικών καθαρισμού στις ενώσεις που εμφάνισαν ME>±20%

	PSA	C18	PSA/C18	PSA/C18/GCB:	χωρίς clean-up
Paracetamol	-20	-20	-18	-20	-42
Venlafaxine	-20	-20	-18	-20	-22
Citalopram	25	15	12	12	31
Quetiapine	-4	-2	-4	1	-26
Carbamazepine	-29	-28	-21	-14	-34
Fluoxetine	-24	-11	-18	-19	-26
Diazepam	23	16	15	19	21

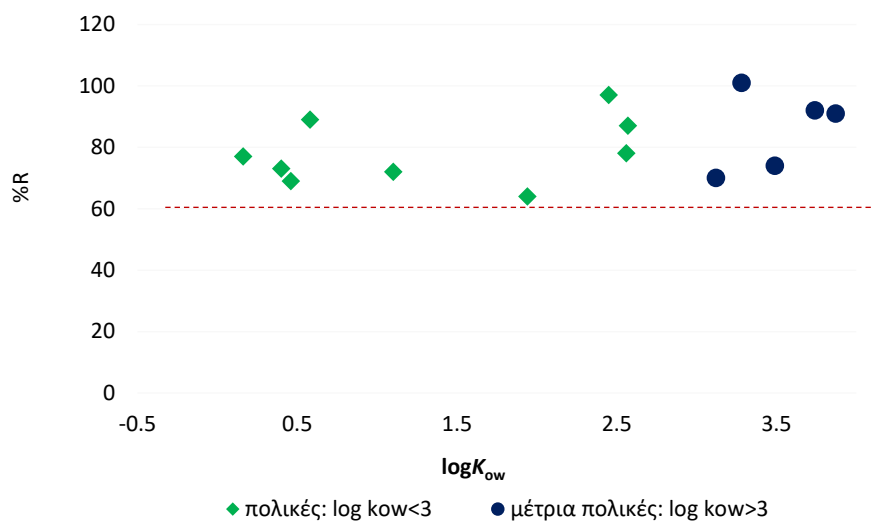


Σχήμα 8.21 Επίδραση προσροφητικών καθαρισμού στις ενώσεις που εμφάνισαν ME>±20%

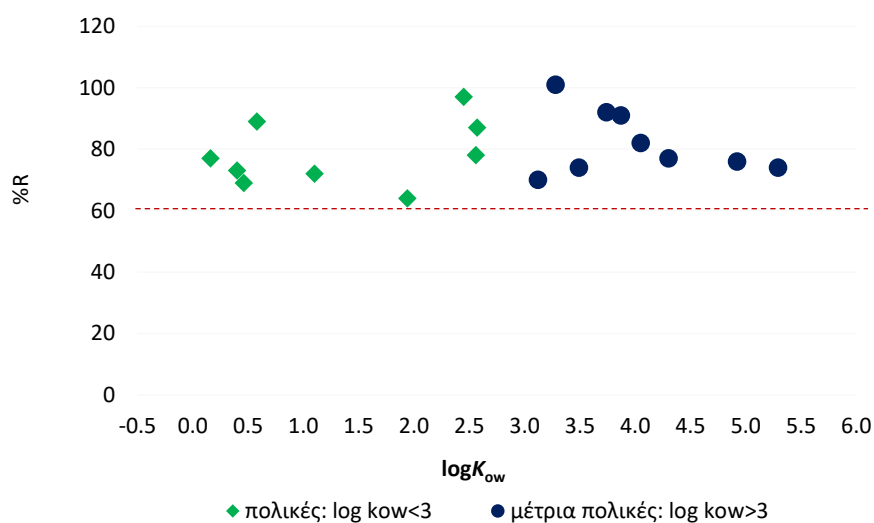


Σχήμα 8.22 Επίδραση υποστρώματος μετά την εφαρμογή του βέλτιστου συνδυασμού προσροφητικών για τις ενώσεις που αρχικά εμφάνισαν ME% >±20%

Τέλος, είναι αξιοσημείωτο να συσχετιστούν οι ανακτήσεις τις μεθόδου με την τιμή $\log K_{ow}$. Στο Σχήμα 8.23 (α) και (β) φαίνονται οι % ανακτήσεις (50 ng g^{-1}) συναρτήσει των τιμών $\log K_{ow}$ των προσδιοριζόμενων ενώσεων των μειγμάτων (I) και (II) αντίστοιχα.



(α)



(β)

Σχήμα 8.23 Διακύμανση ανακτήσεων (%R) σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng g^{-1} συναρτήσει των τιμών $\log K_{ow}$ των προσδιοριζόμενων ενώσεων (α) για τις φυτοπροστατευτικές και (β) για τις φαρμακευτικές ενώσεις

B. Επικύρωση

8.4 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

8.4.1 Ανακτήσεις

Η εκτίμηση της ακρίβειας (ορθότητας και συστηματικού σφάλματος) της μεθόδου βασίστηκε στον υπολογισμό των ανακτήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα ιζήματος. Για κάθε επίπεδο εμβολιάστηκαν πέντε δείγματα ($n=5$) τα οποία αναλύθηκαν μέσα στην ίδια μέρα, για να υπολογιστεί παράλληλα η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) και η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για τρεις διαδοχικές ημέρες ($n=15$), για να υπολογιστεί η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_{WR}), συνθέτοντας την πιστότητα της μεθόδου.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις τα επίπεδα εμβολιασμού ήταν 25 ng g^{-1} , 50 ng g^{-1} και 100 ng g^{-1} . Οι μέσες τιμές των ανακτήσεων ($n=5$) κυμάνθηκαν στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού από 66% (chlorpyrifos) έως 103,5% (linuron), στο μεσαίο από 70,8% (chlorpyrifos) έως 106,2% (dimethoate) και στο υψηλό από 79,4% έως (chlorpyrifos) 120,9% (*S*-metolachlor). Το chlorpyrifos ήταν η ένωση που παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα ανακτήσεων και για τα τρία επίπεδα εμβολιασμού, ωστόσο σε καμία περίπτωση δεν επρόκειτο για μη αποδεκτές τιμές (Πίνακας 8.4).

Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα, % RSD_r ήταν μικρότερη από 13%, κυμαινόμενη από 0,5% για το acetamiprid σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng g^{-1} έως 12,7% για το tebuconazole σε επίπεδο εμβολιασμού 25 ng g^{-1} . Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, $RSD_{WR}\%$, ήταν μικρότερη του 20% που είναι το ανώτατο αποδεκτό όριο για όλες τις περιπτώσεις, εκτός από το diuron σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng g^{-1} και κυμάνθηκε από 3,2% για το imazalil σε επίπεδο εμβολιασμού 25 ng g^{-1} έως 18,6% για το metalaxyl και 21% για το diuron σε επίπεδο εμβολιασμού 50 ng g^{-1} . Στον Πίνακα 8.4 φαίνονται οι ανακτήσεις (%R) της μεθόδου για κάθε επίπεδο, η επαναληψιμότητα (% RSD_r) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ($RSD_{WR}\%$).

Για τις φαρμακευτικές ενώσεις επιλέχθηκαν ως επίπεδα εμβολιασμού τα 5 ng g^{-1} , 50 ng g^{-1} , 100 ng g^{-1} . Οι μέσες τιμές των ανακτήσεων ($n=5$) κυμάνθηκαν στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού από 57% (quetiapine) έως 92% (venlafaxine), για το μεσαίο επίπεδο 64% έως 101% για τις ίδιες ενώσεις και στο υψηλό από 62% (olanzapine) έως 103% (venlafaxine). Το venlafaxine είναι η φαρμακευτική ένωση που παρουσίασε τις υψηλότερες ανακτήσεις και στα τρία επίπεδα.

Πίνακας 8.4 Ανακτήσεις (%R), επαναληψιμότητα (%RSD_r) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (%RSD_{WR}) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε εκχυλίσματα ιζήματος σε τρία επίπεδα εμβολιασμού

	25 ng g ⁻¹			50 ng g ⁻¹			100 ng g ⁻¹		
	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}
Diuron	69,0	3,0	3,6	78,1	18,0	21,0	81,0	7,0	8,6
Fluazifop-p-butyl	84,1	8,7	8,4	96,3	10,2	14,3	109,3	11,3	10,3
Fluometuron	87,3	5,4	10,3	94,8	4,5	11,0	93,7	7,3	7,8
Linuron	103,5	5,1	7,4	100,1	3,0	5,9	104,9	10,0	9,5
Prometryn	93,6	3,9	3,9	100,5	11,0	14,3	119,3	14,9	12,5
S-metolachlor	96,8	6,0	6,2	103,0	2,3	10,1	120,0	9,0	7,5
Chlorantraniliprole	77,9	7,0	9,1	94,9	5,2	9,9	97,0	9,5	9,8
Chlorpyrifos	66,0	3,1	6,2	70,8	4,5	8,5	79,4	4,6	5,8
Dimethoate	96,9	5,6	9,0	106,2	3,1	12,3	109,0	8,1	7,4
Tebupirimfos	99,1	12,7	12,2	96,2	5,9	9,0	88,0	5,9	6,7
Thiacloprid	83,5	5,2	11,0	103,0	9,1	15,4	100,1	4,3	4,3
Thiamethoxam	93,1	6,9	15,1	101,3	6,0	11,3	112,0	6,9	6,2
Boscalid	82,6	8,7	4,2	90,2	7,0	14,0	92,8	9,6	10,3
Imazalil	87,4	2,1	3,2	96,4	4,7	7,1	99,3	1,3	1,3
Metalaxyl	96,8	4,7	8,1	105,7	13,8	18,6	107,6	6,2	5,8
Myclobutanil	80,1	2,1	6,0	85,7	9,1	11,3	91,0	2,8	3,1
Acetamiprid	81,1	4,8	7,2	97,2	1,1	9,0	96,5	9,3	9,6
Fenpyroximate	82,6	5,1	4,6	90,6	8,1	10,6	97,6	9,9	10,1

Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα, %RSD_r ήταν μικρότερη από 14%, κυμαινόμενη από 1,1% για τα rhenazone και budesonide σε επίπεδο εμβολιασμού 25 και 50 ng g⁻¹ αντίστοιχα, έως 13,9% για το sertraline σε επίπεδο εμβολιασμού 100 ng g⁻¹. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα, RSD_{WR}%, ήταν μικρότερη του 19% για όλες τις περιπτώσεις, και κυμάνθηκε από 3,1% για το diazepam σε επίπεδο εμβολιασμού 100 ng g⁻¹ έως 19% για το sertraline στο ίδιο επίπεδο εμβολιασμού. Στον Πίνακα 8.5 φαίνονται οι ανακτήσεις (%R) της μεθόδου για κάθε επίπεδο, η επαναληψιμότητα (%RSD_r) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (RSD_{WR}%).

Πίνακας 8.5 Ανακτήσεις (%R), επαναληψιμότητα (%RSD_r) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (%RSD_{WR}) των φαρμακευτικών ενώσεων σε εκχυλίσματα ιζήματος

	5 ng g ^{-1*}			50 ng g ⁻¹			100 ng g ⁻¹		
	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}
Alprazolam	-	-	-	91,0	7,7	10,2	97,0	2,1	5,0
Amisulpride	81,0	4,9	7,1	72,0	2,8	6,0	94,0	4,3	6,9
Amitriptyline	-	-	-	76,0	10,5	17,0	80,0	7,5	16,9
Bupropion	-	-	-	77,0	5,2	10,2	84,0	4,8	6,3
Carbamazepine	90,0	4,4	11,0	97,0	6,2	10,0	98,0	2,0	6,1
Citalopram	79,0	3,8	7,2	92,0	5,4	9,3	90,0	2,2	5,0

	5 ng g ⁻¹ *			50 ng g ⁻¹			100 ng g ⁻¹		
	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}
Clozapine	62,0	4,8	8,1	69,0	4,3	6,0	74,0	6,8	10,8
Diazepam	89,0	3,4	6,3	95,0	6,3	10,0	101,0	2,0	3,1
Fluoxetine	69,0	10,1	16,1	82,0	4,9	6,9	87,0	4,6	9,2
Haloperidol	68,0	10,3	15,0	77,0	2,6	4,9	75,0	1,3	4,0
Mirtazapine	80,0	5,0	10,3	71,0	5,6	8,0	78,0	7,7	11,0
Olanzapine	57,0	12,3	16,0	78,0	5,1	9,0	62,0	4,8	9,1
Paroxetine	81,0	8,6	9,0	87,0	1,1	3,6	79,0	8,9	11,0
Quetiapine	57,0	5,3	9,0	64,0	10,9	15,0	78,0	11,5	16,0
Risperidone	-	-	-	74,0	12,2	14,5	82,0	1,2	5,0
Sertraline	74,0	8,1	12,4	74,0	6,8	9,5	72,0	13,9	19,0
Venlafaxine	92,0	3,3	8,0	101,0	8,9	11,0	103,0	3,9	8,1
Paracetamol	-	-	-	69,0	11,6	17,1	73,0	11,0	19,0
Ketoprofen	-	-	-	70,0	12,9	16,0	78,0	9,0	15,0
Phenazone	89,0	3,4	6,9	89,0	1,1	3,2	95,0	4,2	7,8
Bezafibrate	-	-	-	85,0	8,2	11,3	97,0	8,2	11,0
Fenofibrate	59,0	10,2	18,0	72,0	2,8	5,0	83,0	8,4	9,0
Atenolol	-	-	-	77,0	5,2	12,3	74,0	2,7	5,0
Budesonide	71,0	2,8	5,0	91,0	1,1	3,2	93,0	1,1	3,4
Cimetidine	-	-	-	73,0	11,0	14,0	70,0	5,7	7,0

*όπου (-) το επίπεδο εμβολιασμού ήταν <MQL

Οι χαμηλές τιμές RSD είναι σημαντικές κατά την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων όπως τα ιζήματα, πρώτον εξαιτίας δυνητικών παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα και δεύτερον εξαιτίας των περισσότερων σταδίων ανάλυσης, που συνεπάγονται μεγαλύτερη πιθανότητα εισαγωγής σφαλμάτων στην πειραματική πορεία.

8.4.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Όπως έχει αναφερθεί, με τη χρήση HRMS το χρωματογράφημα μπορεί να μην μας δώσει πληροφορίες σχετικά με το θόρυβο, δυσχεραίνοντας τον υπολογισμό του λόγου σήματος προς θόρυβο (*S/N*). Σε αυτή την περίπτωση, τα όρια υπολογίζονται με διαδοχικές εγχύσεις διαλυμάτων μειούμενων συγκεντρώσεων μέχρι το αναλυτικό σήμα που αντιστοιχεί στο ύψος της κορυφής να έχει τιμή της τάξης 10⁴ [14, 124, 241]. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 0,3 ng g⁻¹ έως 4 ng g⁻¹ και 0,8 ng g⁻¹ έως 13 ng g⁻¹ αντίστοιχα. Για τις φαρμακευτικές ενώσεις, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 0,1 ng g⁻¹ (diazepam) έως 13 ng g⁻¹ (cimetidine) και 1,3 ng g⁻¹ (citalopram) έως 46 ng g⁻¹ (paracetamol) αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα και για τα δύο μείγματα ενώσεων φαίνονται στους Πίνακες 8.6 και 8.7.

Πίνακας 8.6 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

	MDL (ng g ⁻¹)	MQL (ng g ⁻¹)
Diuron	1,0	3,0
Fluazifop-p-butyl	1,3	4,0
Fluometuron	3,0	8,0
Linuron	3,0	9,0
Prometryn	0,3	0,8
S-metolachlor	0,8	2,0
Chlorantraniliprole	1,8	5,0
Chlorpyrifos	1,5	4,2
Dimethoate	1,0	3,0
Tebupirimfos	4,0	13,0
Thiacloprid	0,7	2,3
Thiamethoxam	3,8	11,0
Boscalid	2,0	6,0
Imazalil	0,9	2,5
Metalaxyl	0,5	1,5
Myclobutanil	2,5	7,0
Acetamiprid	0,3	0,9
Fenpyroximate	1,8	5,0

Πίνακας 8.7 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για τις φαρμακευτικές ενώσεις

	MDL (ng g ⁻¹)	MQL (ng g ⁻¹)
Alprazolam	3,1	9,4
Amisulpride	0,7	2,0
Amitriptyline	5,0	17,0
Bupropion	2,0	5,5
Carbamazepine	0,5	1,5
Citalopram	0,5	1,3
Clozapine	2,0	5,0
Diazepam	0,1	3,2
Fluoxetine	0,5	2,1
Haloperidol	1,0	3,5
Mirtazapine	0,9	3,1
Olanzapine	1,0	4,0
Paroxetine	1,0	3,7
Quetiapine	1,5	4,7
Risperidone	5,0	16,0
Sertraline	1,0	3,4
Venlafaxine	1,0	3,5
Paracetamol	13,0	46,0
Ketoprofen	4,0	12,5
Phenazone	1,0	4,0
Bezafibrate	7,0	18,0
Fenofibrate	1,0	4,1
Atenolol	6,0	17,0
Budesonide	0,8	3,0
Cimetidine	13,0	47,0

8.4.3 Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με την κατασκευή καμπύλης επτά σημείων, σε εμβολιασμένα δείγματα για εύρος συγκεντρώσεων από το όριο ποσοτικοποίησης (MQL) έως περίπου $100 \times \text{MQL}$, η οποία ακολουθούσε τη γραμμική παλινδρόμηση. Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) υπολογίστηκε για τις ενώσεις και των δύο μειγμάτων να έχει τιμές μεγαλύτερες από 0,99, συνεπώς εξαιρετική γραμμικότητα για τη μέθοδο. Στους Πίνακες 8.8 και 8.9 φαίνεται το εύρος γραμμικής περιοχής και ο συντελεστής προσδιορισμού για τις μελετώμενες ενώσεις των μειγμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων αντίστοιχα.

Πίνακας 8.8 Γραμμική περιοχή και συντελεστές προσδιορισμού για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

	Γραμμική περιοχή (ng g ⁻¹)	r ²
Diuron	MQL–250	0,9982
Fluazifop-p-butyl	MQL–400	0,9934
Fluometuron	MQL–500	0,9921
Linuron	MQL–500	0,9998
Prometryn	MQL–100	0,9983
S-metolachlor	MQL–200	0,9962
Chlorantraniliprole	MQL–500	0,9996
Chlorpyrifos	MQL–250	0,9934
Dimethoate	MQL–300	0,9954
Tebupirimfos	MQL–500	0,9999
Thiacloprid	MQL–250	0,9991
Thiamethoxam	MQL–500	0,9977
Boscalid	MQL–500	0,9998
Imazalil	MQL–250	0,9968
Metalaxyl	MQL–100	0,9966
Myclobutanil	MQL–500	0,9974
Acetamiprid	MQL–100	0,9964
Fenpyroximate	MQL–100	0,9969

Πίνακας 8.9 Γραμμική περιοχή της μεθόδου και συντελεστές προσδιορισμού για τις φαρμακευτικές ενώσεις

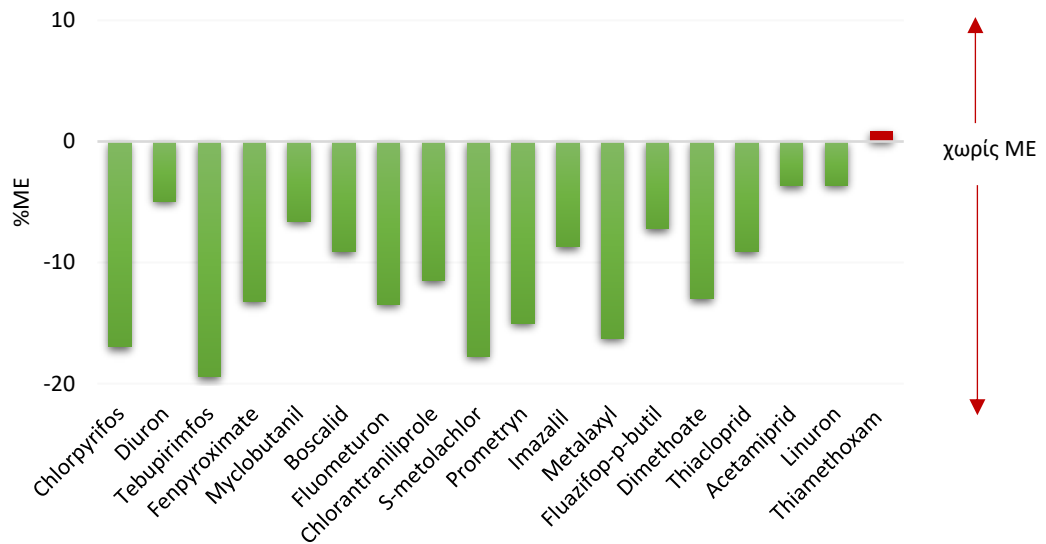
	Γραμμική περιοχή (ng g ⁻¹)	r ²
Alprazolam	MQL–250	0,9989
Amisulpride	MQL–250	0,9980
Amitriptyline	MQL–250	0,9999
Bupropion	MQL–250	0,9984
Carbamazepine	MQL–250	0,9990
Citalopram	MQL–250	0,9991
Clozapine	MQL–250	0,9998

	Γραμμική περιοχή (ng g ⁻¹)	r ²
Diazepam	MQL-250	0,9987
Fluoxetine	MQL-250	0,9987
Haloperidol	MQL-250	0,9994
Mirtazapine	MQL-250	0,9994
Paroxetine	MQL-250	0,9992
Quetiapine	MQL-250	0,9987
Olanzapine	MQL-250	0,9990
Risperidone	MQL-250	0,9990
Sertraline	MQL-250	0,9984
Venlafaxine	MQL-250	0,9997
Paracetamol	MQL-250	0,9980
Ketoprofen	MQL-250	0,9987
Phenazone	MQL-250	0,9990
Bezafibrate	MQL-250	0,9984
Fenofibrate	MQL-250	0,9987
Atenolol	MQL-250	0,9994
Budesonide	MQL-250	0,9998
Cimetidine	MQL-250	0,9980

8.5 Επίδραση υποστρώματος

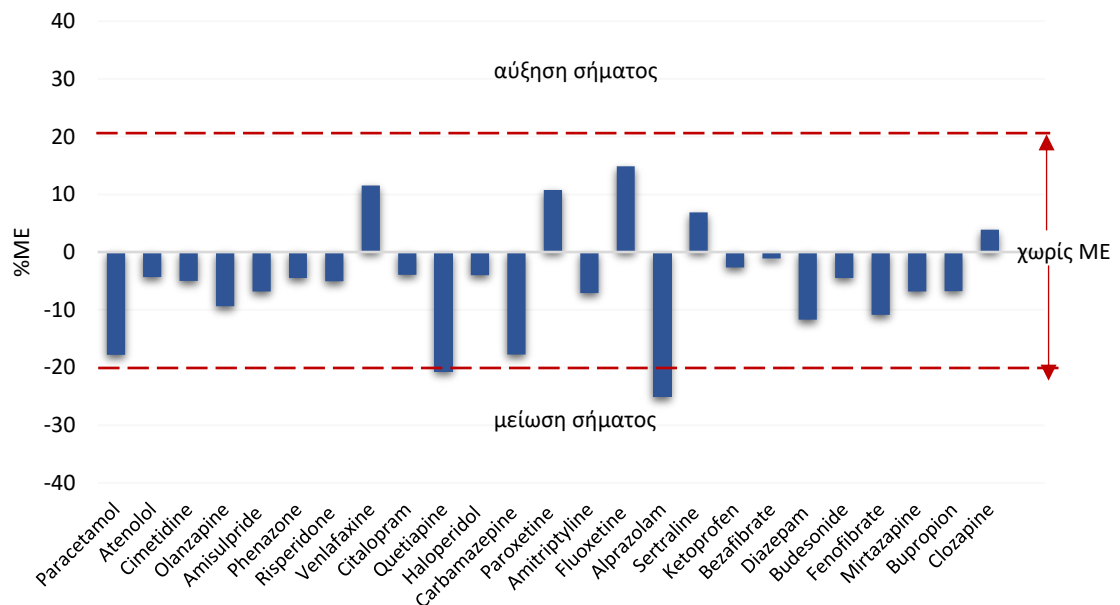
Το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος και οι πιθανοί παράγοντες στους οποίους οφείλεται έχουν ήδη περιγραφεί στο θεωρητικό μέρος. Η σημασία της μελέτης του ως αναλυτικό χαρακτηριστικό αποδίδεται στο ότι ο βαθμός στον οποίο επηρεάζεται ο ιοντισμός των ενώσεων από τυχόν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλα σφάλματα στον ποσοτικό προσδιορισμό, με αποτέλεσμα εσφαλμένα και αναληθή αποτελέσματα. Ως γνωστόν, για τιμές μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ για μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ΜΕ μεταξύ -20% και 20% θεωρείται ότι το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος. Για τιμές μεταξύ -50% και -20% ή 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια, ενώ για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή.

Οι τιμές της (%) επίδρασης του υποστρώματος υποδηλώνουν στο μείγμα (I) πολύ μικρή ενίσχυση του σήματος (<20%, αμελητέα) μόνο για το thiamethoxam (0,8%) και ελαφριά μείωση για όλες τις υπόλοιπες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, με μέγιστη τιμή -19,4% για το teburirimfos (Σχήμα 8.24).



Σχήμα 8.24 Επίδραση υποστρώματος για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Στο μείγμα (II) οι διακυμάνσεις ήταν μεγαλύτερες. Για τις περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση του σήματος, ενώ για τις ενώσεις quetiapine και alprazolam η μείωση ήταν οριακά πιο σημαντική (-21% και -25% αντίστοιχα). Ελαφριά ενίσχυση του σήματος παρατηρήθηκε για τις ενώσεις venlafaxine (12%), paroxetine (11%), fluoxetine (15%), sertraline (7%) και clozapine (4%) (Σχήμα 8.25).



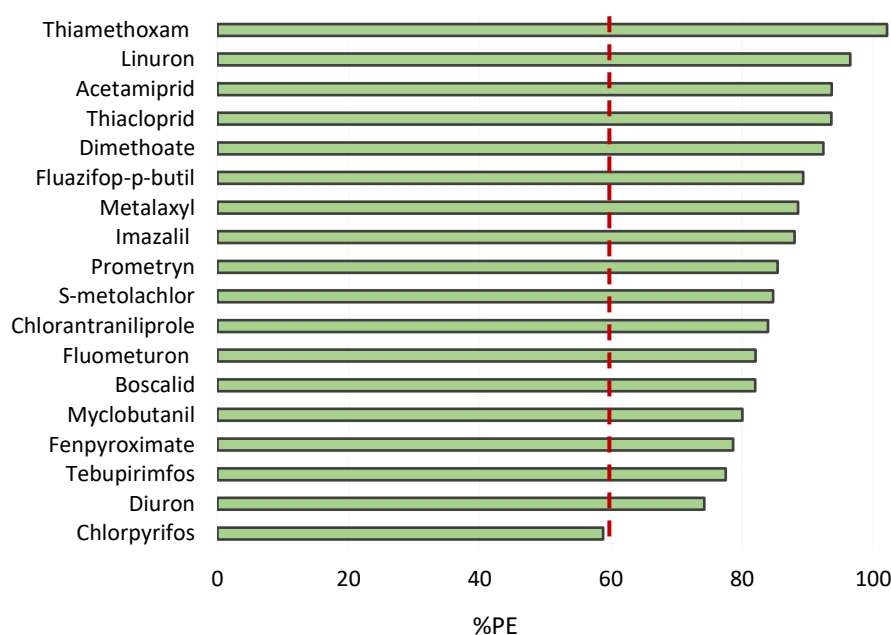
Σχήμα 8.25 Επίδραση υποστρώματος για τις φαρμακευτικές ενώσεις

Αν και δεν παρατηρήθηκε ισχυρή μείωση ή αύξηση του σήματος λόγω επίδρασης υποστρώματος για καμία ένωση, η χρήση προτύπων καμπυλών αναφοράς σε υπόστρωμα ιζήματος για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων (matrix-matched calibration curve) μειώνει την πιθανότητα εσφαλμένων αποτελεσμάτων.

8.6 Συνολική απόδοση μεθόδου

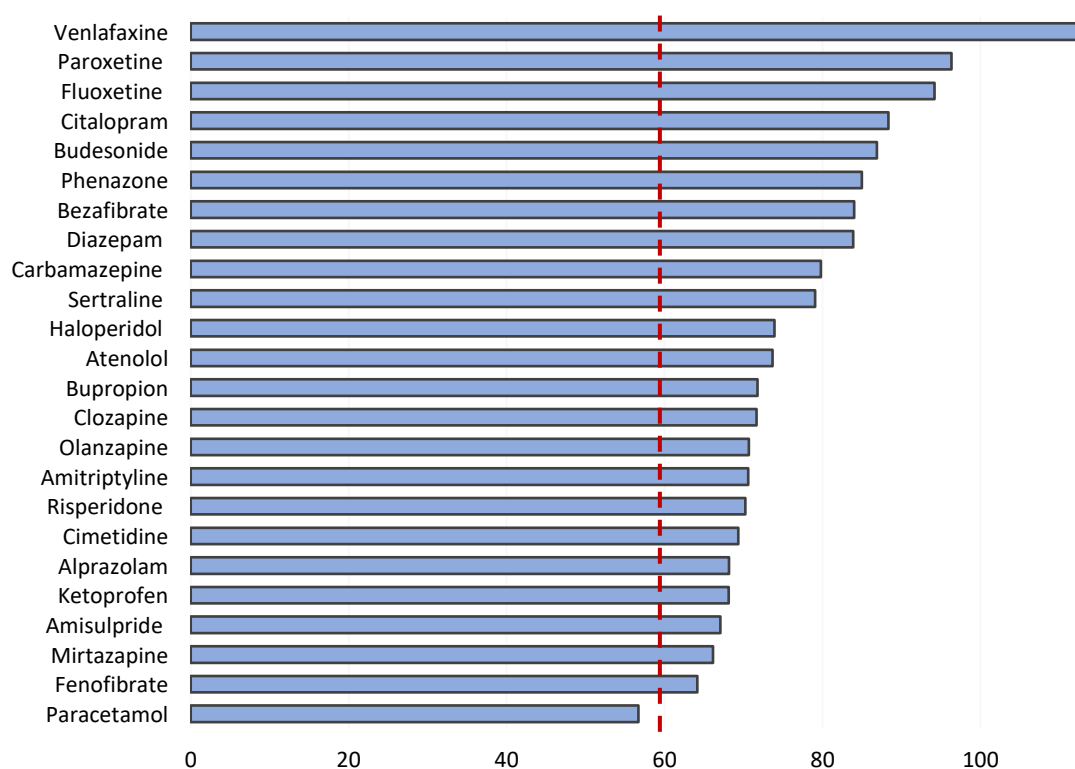
Η συνολική απόδοση της μεθόδου (%PE, process efficiency) δεν κατατάσσεται στα προβλεπόμενα από τη νομοθεσία αναλυτικά χαρακτηριστικά, ωστόσο στη βιβλιογραφία προτείνεται ως χρήσιμο εργαλείο για την αποτίμηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου [242, 243].

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, η οι τιμές της %PE κυμάνθηκαν από 58,8% (chlorpyrifos) έως 102,1% (thiamethoxam). Το chlorpyrifos είχε παρουσιάσει ελαφρώς χαμηλότερες ανακτήσεις συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις και μέτρια επίδραση υποστρώματος, γεγονός που εξηγεί την τιμή αυτή. Αντίθετα, το thiamethoxam εμφάνισε ανακτήσεις κοντά στο 100% και σχεδόν καθόλου επίδραση από το υπόστρωμα, για αυτό και η τιμή της %PE ήταν επίσης κοντά στο 100% (Σχήμα 8.26).



Σχήμα 8.26 Αποτελεσματικότητα της μεθόδου συναρτήσει της ανάκτησης και της επίδρασης υποστρώματος για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Όσον αφορά τα φαρμακευτικά, η χαμηλότερη επίδοση της μεθόδου υπολογίστηκε για την ένωση quetiapine με ποσοστό 50,8%, ανάλογο με τη χαμηλή ανάκτηση του, ενώ η υψηλότερη για την ένωση venlafaxine 112,6%, η οποία ανακτήθηκε σε υψηλά ποσοστά αλλά χωρίς να εμφανίσει σημαντική επίδραση υποστρώματος. (Σχήμα 8.27).



Σχήμα 8.27 Αποτελεσματικότητα της μεθόδου συναρτήσεως της ανάκτησης και της επίδρασης υποστρώματος για τις φαρμακευτικές ενώσεις

Όλα τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου QuEChERS και για τα δύο μείγματα ενώσεων παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στους Πίνακες 8.10 και 8.11. .

Πίνακας 8.10 Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε ιζήματα

	Ανακτήσεις			Επαναληψιμότητας			Αναπαραγωγιμότητα			Όρια μεθόδου		Γραμμικότητα		%ME	%PE
	%R (n=5)			%RSD _r (n=5)			%RSDW _R (n=5)			(ng g ⁻¹)		Γραμμική	r ²		
	25 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	25 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	25 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	MDL	MLQ	περιοχή (ng g ⁻¹)			
Diuron	69,0	78,1	81,0	3,0	10,0	8,6	3,6	21,0	15,1	1,0	3,0	3-250	0,9982	-4,9	74,3
Fluazifop-p-butyl	84,1	96,3	109,3	8,7	8,1	10,3	8,4	14,3	14,0	1,3	4,0	4-400	0,9934	-7,2	89,4
Fluometuron	87,3	94,8	93,7	5,4	2,6	7,8	10,3	11,0	9,0	3,0	8,0	8-500	0,9921	-13,4	82,1
Linuron	103,5	100,1	104,9	5,1	2,1	9,5	7,4	5,9	11,3	3,0	9,0	9-500	0,9998	-3,6	96,5
Prometryn	93,6	100,5	119,3	3,9	10,2	12,5	3,9	14,3	16,0	0,3	0,8	0,8-100	0,9983	-15,0	85,4
S-metolachlor	96,8	103,0	120,0	6,0	0,9	7,5	6,2	10,1	9,0	0,8	2,0	2-200	0,9962	-17,7	84,8
Chlorantraniliprole	77,9	94,9	97,0	7,0	4,7	9,8	9,1	9,9	11,0	1,8	5,0	5-500	0,9996	-11,5	84,0
Chlorpyrifos	66,0	70,8	79,4	3,1	3,2	5,8	6,2	8,5	9,0	1,5	4,2	4,2-250	0,9934	-16,9	58,8
Dimethoate	96,9	106,2	109,0	5,6	2,9	7,4	9,0	12,3	9,0	1,0	3,0	3-300	0,9954	-13,0	92,4
Tebupirimfos	99,1	96,2	88,0	12,7	4,6	6,7	12,2	9,0	7,9	4,0	13,0	13-500	0,9999	-19,4	77,5
Thiacloprid	83,5	103,0	100,1	5,2	8,3	4,3	11,0	15,4	7,9	0,7	2,3	2,3-250	0,9991	-9,1	93,6
Thiamethoxam	93,1	101,3	112,0	6,9	5,1	6,2	15,1	11,3	10,1	3,8	11,0	11-500	0,9977	0,8	102,1
Boscalid	82,6	90,2	92,8	8,7	6,2	10,3	4,2	14,0	12,0	2,0	6,0	6-500	0,9998	-9,1	82,0
Imazalil	87,4	96,4	99,3	2,1	3,0	1,3	3,2	7,1	6,0	0,9	2,5	2,5-250	0,9968	-8,7	88,0
Metalaxyl	96,8	105,7	107,6	4,7	8,2	5,8	8,1	18,6	9,0	0,5	1,5	1,5-100	0,9966	-16,2	88,5
Myclobutanil	80,1	85,7	91,0	2,1	8,0	3,1	6,0	11,3	8,0	2,5	7,0	7-500	0,9974	-6,6	80,0
Acetamiprid	81,1	97,2	96,5	4,8	0,5	9,6	7,2	9,0	10,1	0,3	0,9	0,9-100	0,9964	-3,6	93,7
Fenpyroximate	82,6	90,6	97,6	5,1	6,1	10,1	4,6	10,6	13,0	1,8	5,0	5-100	0,9969	-13,2	78,7

Πίνακας 8.11 Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων σε ιζήματα

	Ανακτήσεις			Επαναληψιμότητα			Αναπαραγωγιμότητα			Όρια μεθόδου		Γραμμικότητα		%ME	%PE
	%R (n=5)			%RSD _r (n=5)			%RSDW _R (n=5)			(ng g ⁻¹)		Γραμμική περιοχή	r ²		
	5 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	5 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	5 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	MDL	MLQ	(ng g ⁻¹)			
Alprazolam	-	91	97	-	7,7	2,1	-	10,2	5	3,1	9,4	10-250	0,9989	-25	68,0
Amisulpride	81	72	94	4,9	2,8	4,3	7,1	6	6,9	0,7	2,0	2-250	0,9980	-7	67,0
Amitriptyline	-	76	80	-	10,5	7,5	-	17	16,9	5,0	17,0	20-250	0,9999	-7	71,0
Bupropion	-	77	84	-	5,2	4,8	-	10,2	6,3	2,0	5,5	10-250	0,9984	-7	72,0
Carbamazepine	90	97	98	4,4	6,2	2,0	11	10	6,1	0,5	1,5	5-250	0,9990	-18	80,0
Citalopram	79	92	90	3,8	5,4	2,2	7,2	9,3	5	0,5	1,3	2-250	0,9991	-4	88,0
Clozapine	62	69	74	4,8	4,3	6,8	8,1	6	10,8	2,0	5,0	5-250	0,9998	4	72,0
Diazepam	89	95	101	3,4	6,3	2,0	6,3	10	3,1	0,1	3,2	5-250	0,9987	-12	84,0
Fluoxetine	69	82	87	10,1	4,9	4,6	16,1	6,9	9,2	0,5	2,1	5-250	0,9987	15	94,0
Haloperidol	68	77	75	10,3	2,6	1,3	15	4,9	4	1,0	3,5	5-250	0,9994	-4	74,0
Mirtazapine	80	71	78	5,0	5,6	7,7	10,3	8	11	0,9	3,1	5-250	0,9994	-7	66,0
Olanzapine	57	78	62	12,3	5,1	4,8	16	9	9,1	1,0	4,0	5-250	0,9990	-9	71,0
Paroxetine	81	87	79	8,6	1,1	8,9	9	3,6	11	1,0	3,7	5-250	0,9992	11	96,0
Quetiapine	57	64	78	5,3	10,9	11,5	9	15	16	1,5	4,7	5-250	0,9987	-21	51,0
Risperidone	-	74	82	-	12,2	1,2	-	14,5	5	5,0	16,0	20-250	0,9990	-5	70,0
Sertraline	74	74	72	8,1	6,8	13,9	12,4	9,5	19	1,0	3,4	5-250	0,9984	7	79,0
Venlafaxine	92	101	103	3,3	8,9	3,9	8	11	8,1	1,0	3,5	5-250	0,9997	12	113,0
Paracetamol	-	69	73	-	11,6	11,0	-	17,1	19	13,0	46,0	50-250	0,9980	-18	57,0
Ketoprofen	-	70	78	-	12,9	9,0	-	16	15	4,0	12,5	20-250	0,9987	-3	68,0
Phenazone	89	89	95	3,4	1,1	4,2	6,9	3,2	7,8	1,0	4,0	5-250	0,9990	-5	85,0
Bezafibrate	-	85	97	-	8,2	8,2	-	11,3	11	7,0	18,0	20-250	0,9984	-1	84,0

Πίνακας 8.11 (συνέχεια) Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων σε ιζήματα

	Ανακτήσεις			Επαναληψιμότητα			Αναπαραγωγικότητα			Όρια μεθόδου		Γραμμικότητα	%ME	%PE	
	%R (n=5)			%RSD _r (n=5)			%RSDW _R (n=5)			(ng g ⁻¹)		Γραμμική περιοχή			r ²
	5 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	5 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	5 ng g ⁻¹	50 ng g ⁻¹	100 ng g ⁻¹	MDL	MLQ	(ng g ⁻¹)			
Fenofibrate	59	72	83	10,2	2,8	8,4	18	5	9	1,0	4,1	5-250	0,9987	-11	64,0
Atenolol	-	77	74	-	5,2	2,7	-	12,3	5	6,0	17,0	20-250	0,9994	-4	74,0
Budesonide	71	91	93	2,8	1,1	1,1	5	3,2	3,4	0,8	3,0	5-250	0,9998	-4	87,0
Cimetidine	-	73	70	-	11,0	5,7	-	14	7	13,0	47,0	50-250	0,9980	-5	69,0



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ SPE ΓΙΑ ΤΗΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ SPE ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ

A. Βελτιστοποίηση

9.1. Εισαγωγή

Η χρήση της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης είναι πολύ διαδεδομένη και όλες οι παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά της έχουν εξεταστεί λεπτομερώς στη βιβλιογραφία και σε προηγούμενη εργασία της συγγραφέως [6, 13]. Έτσι, στην παρούσα Διατριβή ελέγχθηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα εκχύλισης για τα δύο μείγματα ενώσεων, τα οποία επιλέχθηκαν βάσει των ιδιοτήτων των ενώσεων και βιβλιογραφικών δεδομένων. Οι παράμετροι που διαφοροποιούνταν στα πρωτόκολλα ήταν ο διαλύτης έκλουσης ή και έκπλυσης, το προσροφητικό υλικό (μικροστήλες εκχύλισης) και το pH στο δείγμα. Το κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης ήταν η ανάκτηση (%R) των ενώσεων, μετά από εμβολιασμό δείγματος νερού (250 mL) σε συγκέντρωση 100 ng L⁻¹.

9.2 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης των φυτοπροστατευτικών ενώσεων από τα νερά

Για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των φυτοπροστατευτικών ενώσεων από τα νερά, ελέγχθηκαν τρία πρωτόκολλα εκχύλισης (Πίνακας 9.1), εκτελώντας τρεις επαναλήψεις για το κάθε ένα ($n=3$). Χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (hydrophilic lipophilic balance, 200 mg, 6 mL) καθώς είναι οι πλέον αποτελεσματικές για τα πολικά φυτοφάρμακα. Η αποτελεσματικότητα των τριών πρωτοκόλλων συγκρίθηκε υπό διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης.

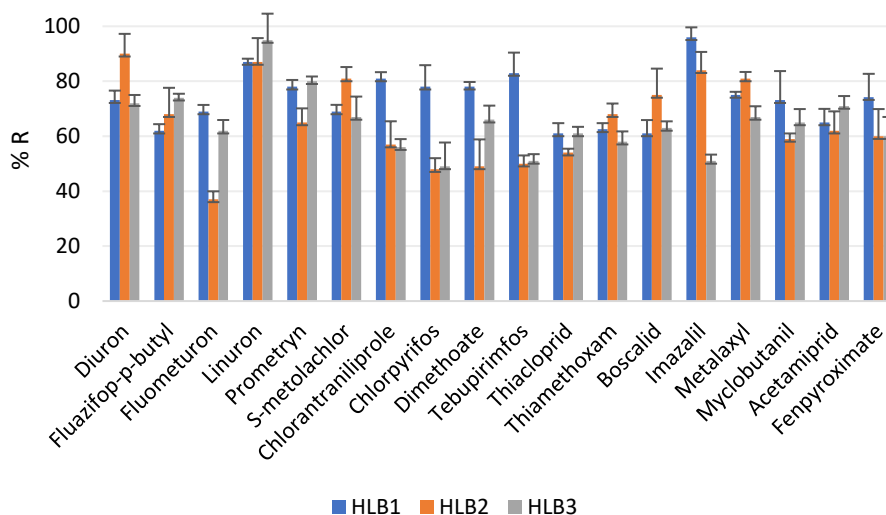
Πίνακας 9.1 Συνθήκες εκχύλισης για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις (3 πρωτόκολλα)

	Πρωτόκολλο 'HLB1'	Πρωτόκολλο 'HLB2'	Πρωτόκολλο 'HLB3'
Μικροστήλες εκχύλισης		Oasis HLB	
Ρύθμιση pH δείγματος	όχι	2-2,5	όχι
Ενεργοποίηση	5 mL MeOH, 5 mL H ₂ O	mL MeOH, 5 mL H ₂ O (pH 2-2,5)	5 mL MeOH, 5 mL H ₂ O
Έκπλυση	5 mL H ₂ O	5 mL H ₂ O	5 mL H ₂ O 3mL DCM
Έκλουση	2×5 mL MeOH	2×5 mL MeOH	3 mL Hex 3 mL Acetone

DCM: διχλωρομεθάνιο, Hex: εξάνιο, Acetone: ακετόνη

Στο πρώτο και τρίτο πρωτόκολλο, (στο εξής 'HLB1' και 'HLB3' αντίστοιχα), το pH του δείγματος δε ρυθμίστηκε πριν από την εκχύλιση, ενώ στη δεύτερη (στο εξής 'HLB 2') το δείγμα οξινίστηκε ώστε το τελικό pH να είναι 2,5–3. Στα πρωτόκολλα HLB1 και HLB3 η ενεργοποίηση και εξισορρόπηση του προσροφητικού υλικού πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη 5 mL μεθανόλης ακολουθούμενης από 5 mL νερό (καθαρότητας LC–MS). Στο πρωτόκολλο HLB2, στο στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε οξινισμένο νερό LC–MS (pH 2–2,5). Ο όγκος του διερχόμενου δείγματος ήταν και στις τρεις περιπτώσεις 250 mL και η ταχύτητα ροής σταθερή (περίπου 1-2 mL min⁻¹). Όσον αφορά την έκπλυση των μικροστηλών μετά τη φόρτωση του συνόλου του δείγματος και πριν από την έκλουση, και στις τρεις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε νερό καθαρότητας LC–MS (5 mL). Στο καθοριστικό στάδιο της έκλουσης, χρησιμοποιήθηκαν 2×5 mL MeOH στα HLB1 και HLB2, ενώ στο HLB3 χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός διαλυτών: 3 mL διχλωρομεθάνιο, 3 mL εξάνιο και 3 mL ακετόνη, διαδοχικά και με αυτή σειρά, και το έκλουσμα συγκεντρώθηκε στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα. Το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε 500 μL

H₂O/MeOH:90/10 (0,1% μυρμηκικό οξύ v/v). Στο Σχήμα 9.1 αποτυπώνονται οι ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων μετά την εφαρμογή των τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων εκχύλισης. Πιο αναλυτικά, οι ανακτήσεις για τα τρία διαφορετικά πρωτόκολλα φαίνονται στον Πίνακα 9.2.



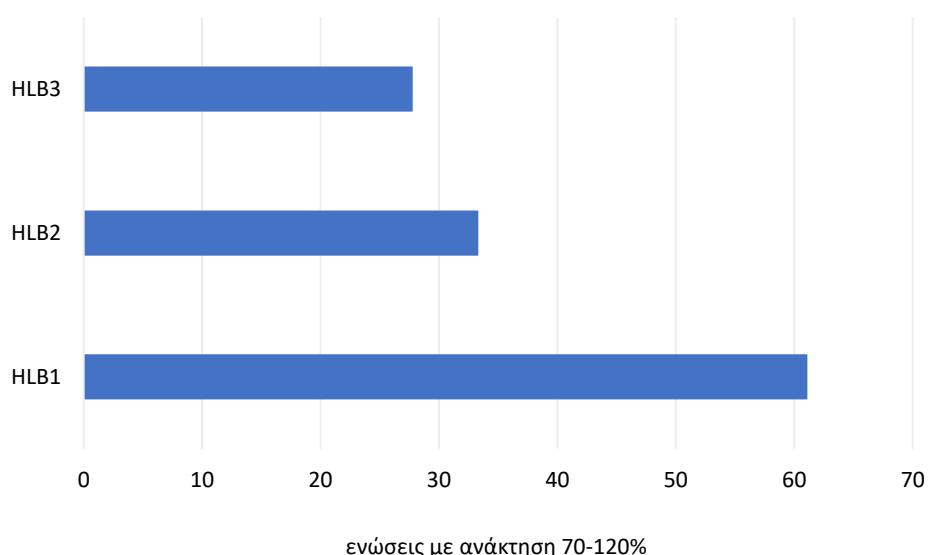
Σχήμα 9.1 Ανακτήσεις (%) φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την εφαρμογή τριών πρωτοκόλλων εκχύλισης

Πίνακας 9.2 Ανακτήσεις (%) φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την εφαρμογή τριών πρωτοκόλλων εκχύλισης (σε παρένθεση δίνεται η % σχετική τυπική απόκλιση, RSD)

		(% Ανάκτηση (%RSD))		
		HLB1	HLB2	HLB3
Ζιζανιοκτόνα	Diuron	73,1 (3)	90,0 (7)	72,0 (3)
	Fluazifop-p-butyl	62,0 (2)	68,0 (10)	74,0 (3)
	Fluometuron	69,0 (2)	37,0 (3)	62,0 (1)
	Linuron	87,0 (2)	87,0 (9)	95,0 (4)
	Prometryn	78,0 (2)	65,0 (5)	80,0 (10)
	S-metolachlor	69,0 (2)	81,0 (5)	67,0 (2)
Εντομοκτόνα	Chlorantraniliprole	81,0 (3)	57,0 (4)	56,0 (7)
	Chlorpyrifos	78,0 (2)	48,0 (8)	49,0 (3)
	Dimethoate	78,0 (8)	49,0 (4)	66,0 (9)
	Tebupirimfos	83,0 (2)	50,0 (10)	51,0 (5)
	Thiacloprid	61,0 (7)	54,0 (3)	61,0 (2)
	Thiamethoxam	62,5 (4)	68,0 (1)	58,0 (2)
Μυκητοκτόνα	Boscalid	61,0 (2)	75,0 (4)	63,0 (4)
	Imazalil	96,0 (5)	84,0 (10)	51,0 (2)
	Metalaxyl	75,0 (4)	81,0 (7)	67,0 (2)

Ακαρεοκτόνα	Myclobutanil	73,1 (1)	59,0 (2)	65,0 (4)
	Acetamiprid	65,0 (5)	62,0 (7)	71,0 (4)
	Fenpyroximate	74,2 (8))	60,0 (10)	60,0 (7)

Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν γενικά σε αποδεκτά επίπεδα για την πλειοψηφία των ενώσεων και με τα τρία πρωτόκολλα. Στο πρωτόκολλο HLB1, το εύρος των ανακτήσεων ήταν από 61% έως 96%. Με το πρωτόκολλο εκχύλισης HLB2, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα (37–87%) και αρκετές ήταν κάτω από τα αποδεκτά όρια. Στο τρίτο πρωτόκολλο, που χρησιμοποιήθηκε το μείγμα των διαλυτών έκλουσης, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 49–95%. Στο Σχήμα 9.2 δίνεται το ποσοστό των ενώσεων με ανακτήσεις από 70–120%, για κάθε πρωτόκολλο.



Σχήμα 9.2 Ποσοστό (%) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις 70-120%

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω Σχήμα, με τα πρωτόκολλα HLB2 και HLB3 το ποσοστό των ενώσεων με μη αποδεκτές ανακτήσεις ήταν αρκετά υψηλό, καθιστώντας τα ακατάλληλα για μια πολύ-υπολειμματική ανάλυση.

9.3 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης των φαρμακευτικών ενώσεων από τα νερά

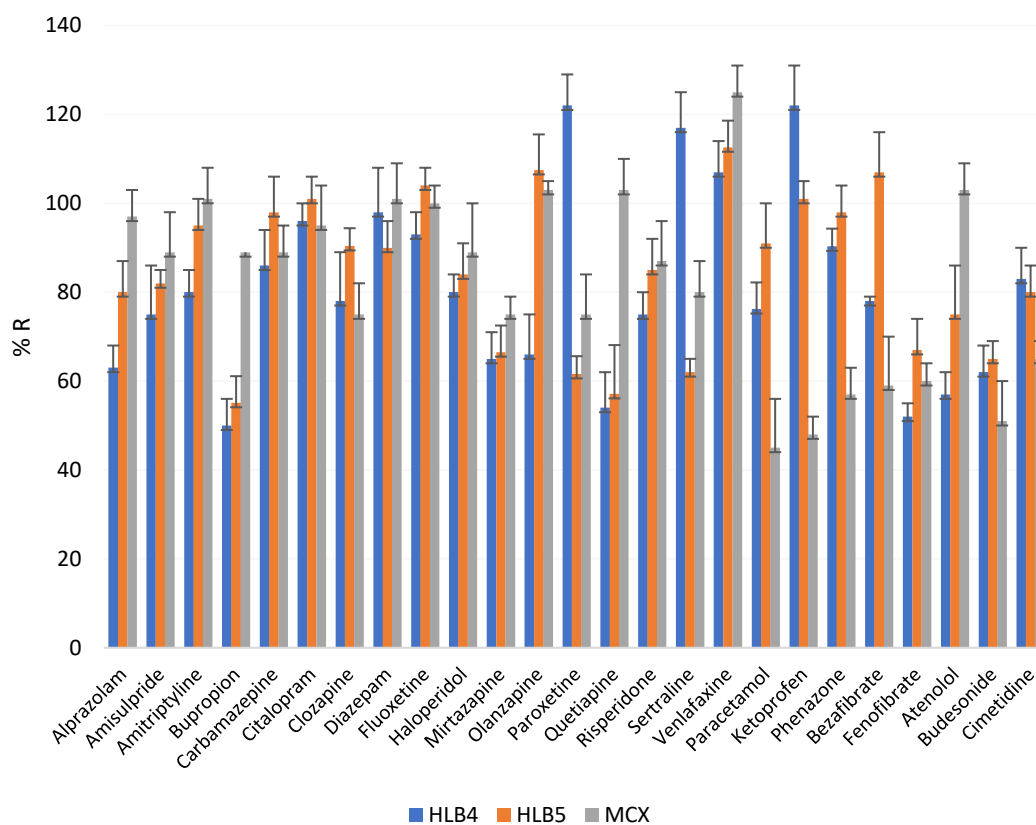
Για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των φαρμακευτικών ενώσεων, ελέγχθηκαν τρία πρωτόκολλα εκχύλισης (Πίνακας 9.2), εκτελώντας τρεις επαναλήψεις για το κάθε ένα (n=3). Στα δύο πρώτα, χρησιμοποιήθηκαν μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (hydrophilic lipophilic balance, 200 mg, 6 mL), ενώ στο τρίτο Oasis MCX (mix-mode cation exchange, 150 mg, 6 mL). Επιλέχθηκαν μόνο αυτοί οι τύποι μικροστηλών και οι ανάλογες συνθήκες εκχύλισης βάσει προηγούμενης εργασίας της συγγραφέως [6, 13] και βιβλιογραφικών δεδομένων για αυτό το είδος ενώσεων. Η δοκιμή των μικροστηλών MCX βασίστηκε στο γεγονός ότι οι συγκεκριμένες είναι αποτελεσματικές για ενώσεις με βασικές ιδιότητες, όπως αρκετά από τα μελετώμενα ψυχιατρικά [207, 244–246]. Η αποτελεσματικότητα των τριών πρωτοκόλλων συγκρίθηκε υπό διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης.

Πίνακας 9.3 Συνθήκες εκχύλισης για τις φαρμακευτικές ενώσεις (3 πρωτόκολλα)

	Πρωτόκολλο 'HLB4'	Πρωτόκολλο 'HLB5'	Πρωτόκολλο 'MCX'
Μικροστήλες εκχύλισης	Oasis HLB	Oasis HLB	Oasis MCX
Ρύθμιση pH δείγματος	όχι	3-3,2	2,5-3
Ενεργοποίηση	5 mL MeOH, 5 mL H ₂ O	5 mL MeOH, 5 mL H ₂ O	5 mL MeOH, 5 mL H ₂ O (pH 2,5-3)
Έκπλυση	5 mL H ₂ O	5 mL MeOH 20% σε 2% HAc	5 mL H ₂ O
Έκλουση	2x5 mL MeOH	2x5 mL MeOH σε 2% HAc	4mL MeOH, 4 mL MeOH σε 5% NH ₄ OH

Στην πρώτη περίπτωση (στο εξής 'HLB4'), το pH του δείγματος νερού δε ρυθμίστηκε πριν από την εκχύλιση, ενώ στη δεύτερη (στο εξής 'HLB 5') και τρίτη περίπτωση (στο εξής 'MCX'), τα δείγματα οξινίστηκαν, ώστε το τελικό pH να είναι 3-3,2 και 2,5-3 αντίστοιχα. Στα πρωτόκολλα HLB4 και HLB5 η ενεργοποίηση και η εξισορρόπηση του προσροφητικού υλικού πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη 5 mL μεθανόλης ακολουθούμενης από 5 mL νερό καθαρότητας LC–MS. Στο πρωτόκολλο MCX, στο στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε οξινισμένο νερό LC–MS (pH 2,5–3). Ο όγκος του διερχόμενου δείγματος ήταν και στις τρεις περιπτώσεις 250 mL και η ταχύτητα ροής σταθερή (περίπου 1-2 mL min⁻¹). Όσον αφορά την έκπλυση των

μικροστηλών μετά τη φόρτωση του συνόλου του δείγματος και πριν από την έκλυση, στα πρωτόκολλα HLB1 και MCX, χρησιμοποιήθηκε νερό καθαρότητας LC-MS (5 mL) ενώ στο πρωτόκολλο HLB2 χρησιμοποιήθηκαν 5 mL μεθανόλη 20% σε 2% οξικό αμμώνιο. Στο καθοριστικό στάδιο της έκλυσης, χρησιμοποιήθηκαν 2x5 mL MeOH στο HLB1, 2x5 mL οξικού οξέος (2% v/v) σε MeOH στο HLB2 και 4 mL MeOH ακολουθούμενα από 4 mL 5% NH₄OH σε μεθανόλη στο MCX. Και στις τρεις περιπτώσεις το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε 500 μL H₂O/MeOH:90/10. Στο Σχήμα 9.3 αποτυπώνονται οι ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων μετά την εφαρμογή των τριών διαφορετικών πρωτοκόλλων εκχύλισης. Πιο αναλυτικά, οι ανακτήσεις για τα τρία διαφορετικά πρωτόκολλα φαίνονται στον Πίνακα 9.4.

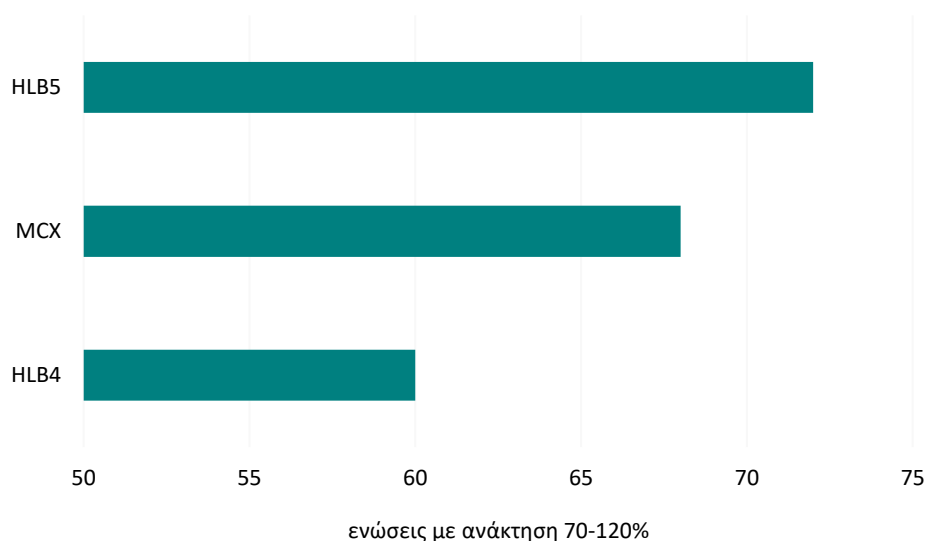


Σχήμα 9.3 Ανακτήσεις (%) φαρμακευτικών ενώσεων για τρία πρωτόκολλα εκχύλισης

Πίνακας 9.4 Ανακτήσεις (%) και σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) σε παρένθεση, για την εκχύλιση των φαρμακευτικών ενώσεων

		(% Ανακτέηση (%RSD))		
		HLB4	HLB5	MCX
Ψυχιατρικά φάρμακα	Alprazolam	63,1 (5)	80,1 (7)	97,0 (6)
	Amisulpride	75,2 (11)	82,5 (3)	89,1 (9)
	Amitriptyline	80,5 (5)	95,4 (6)	101,2 (7)
	Bupropion	50,6 (6)	55,1 (6)	89,4 (3)
	Carbamazepine	86,8 (8)	98,4 (8)	89,4 (6)
	Citalopram	96,1 (4)	101,0 (5)	95,1 (9)
	Clozapine	78,0 (11)	90,4 (4)	75,0 (7)
	Diazepam	98,1 (10)	90,8 (6)	101,3 (4)
	Fluoxetine	93,0 (5)	104,1 (7)	100,5 (8)
	Haloperidol	80,9 (4)	84,4 (6)	89,4 (4)
	Mirtazapine	65,7 (6)	66,5 (8)	75,5 (4)
	Olanzapine	66,0 (9)	107,5 (4)	103,1 (11)
	Paroxetine	122,0 (7)	61,6 (7)	75,9 (4)
	Quetiapine	54,0 (8)	57,1 (11)	103,1 (2)
	Risperidone	75,0 (5)	85,0 (7)	87,7 (9)
Αναλγητικά/ΜΣΑΦ	Sertraline	117,0 (8)	62,9 (3)	80,7 (7)
	Venlafaxine	107,0 (7)	112,6 (6)	125,1 (9)
	Paracetamol	76,2 (6)	91,7 (9)	45,1 (7)
Υπολιπιδαιμικά	Ketoprofen	122,0 (9)	101,9 (4)	48,1 (6)
	Phenazone	90,3 (4)	98,4 (6)	57,1 (10)
	Bezafibrate	78,0 (1)	107,2 (9)	59,4 (4)
Άλλα φάρμακα	Fenofibrate	52,4 (3)	67,4 (7)	60,7 (4)
	Atenolol	57,1 (6)	75,4 (11)	103,8 (6)
	Budesonide	62,2 (6)	65,4 (4)	51,7 (9)
	Cimetidine	83,4 (7)	80,1 (6)	65,7 (4)

Η χρήση των μικροστηλών MCX ήταν αποτελεσματική για τις ισχυρά βασικές ενώσεις, ωστόσο δεν ήταν ικανοποιητική για το σύνολο των ενώσεων, για αυτό και απορρίφθηκε, αφού εξίσου ικανοποιητικές ανακτήσεις σημειώθηκαν με τις μικροστήλες HLB, οι οποίες είναι αποδεδειγμένα ευρύτερης χρήσης. Με το πρωτόκολλο εκχύλισης HLB4, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 50-122%, με το HLB5 από 55,1 -122,5% και με το MCX από 45-125%. Στην τελευταία περίπτωση, το 32% των ενώσεων ανακτήθηκε σε ποσοστά κάτω από τα αποδεκτά όρια. Στο Σχήμα 9.4 δίνεται το ποσοστό των ενώσεων με ανακτήσεις από 70—120%, για κάθε πρωτόκολλο.



Σχήμα 9.4 Ποσοστό (%) των φαρμακευτικών ενώσεων που εμφάνισαν ανακτήσεις 70-120% για τα τρία πρωτόκολλα που ελέγχθηκαν

Οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές και με τα τρία πρωτόκολλα εκχύλισης, ωστόσο το πρωτόκολλο με τις μικροστήλες HLB και τη ρύθμιση του pH του δείγματος ήταν καταλληλότερο για μια πολύ-υπολειμματική ανάλυση, καθώς το 72% των ενώσεων εμφάνισε ανακτήσεις στο εύρος 70–120%. Οι ανακτήσεις για αρκετές βασικές ενώσεις όπως π.χ. τα venlafaxine, diazepam, atenolol, ήταν υψηλότερες με τη χρήση των μικροστηλών MCX, αλλά η πλειοψηφία των ενώσεων ανακτήθηκε καλύτερα με τις μικροστήλες HLB. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι στις χαμηλές τιμές pH που χρησιμοποιήθηκαν, (2,5-3), όξινες και ουδέτερες ενώσεις μπορούν να κατακρατηθούν στο πολυμερές ανάστροφης φάσης, ενώ οι βασικές είναι θετικά φορτισμένες και επομένως συγκρατούνται ισχυρά στη μικροστήλη κατιονανταλλαγής. Έτσι, αν και η χρήση των MCX βελτίωσε τις ανακτήσεις για ορισμένα ψυχιατρικά, παρατηρήθηκε σημαντική απώλεια για αρκετούς αναλύτες, η ανάκτηση των οποίων ήταν κάτω από τα αποδεικτικά όρια, και σε ορισμένες περιπτώσεις κάτω από 50% και απορρίφθηκε, καθώς είναι ιδιαίτερα εκλεκτικές για τις βασικές ενώσεις με αποτέλεσμα να δυσχεραίνουν την πολύ-υπολειμματική ανάλυση.

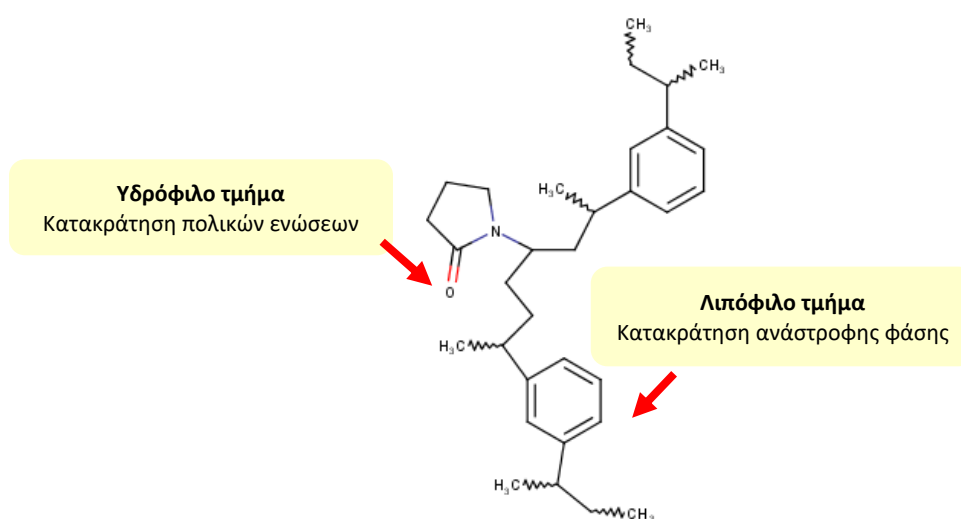
Άλλος ένας παράγοντας που συνέβαλλε στην επιλογή των μικροστηλών HLB έναντι των MCX, ήταν η απλοποίηση του πρωτοκόλλου ανάλυσης. Για τον εγκλιματισμό των μικροστηλών κατιονανταλλαγής, εκτός από οργανικό διαλύτη (συνήθως μεθανόλη) και νερό, απαιτείται επιπλέον στάδιο για εξισορρόπηση, συνήθως με κάποιο τροποποιητή (π.χ. φωσφορικά, οξικό οξύ κ.ά.).

Σε μια ανάλυση που θα στόχευε επιλεκτικά στην εκχύλιση των ψυχιατρικών ενώσεων, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το πρωτόκολλο MCX. Όμως, σκοπός της βελτιστοποίησης σε αυτή την εργασία ήταν να αναπτυχθεί μια μέθοδος που να επιτρέπει την εκχύλιση όσο το δυνατόν περισσότερων αναλυτών σε ένα βήμα.

9.4 Χαρακτηριστικά των επιλεγμένων συνθηκών εκχύλισης

Προσροφητικό υλικό πλήρωσης των μικροστηλών

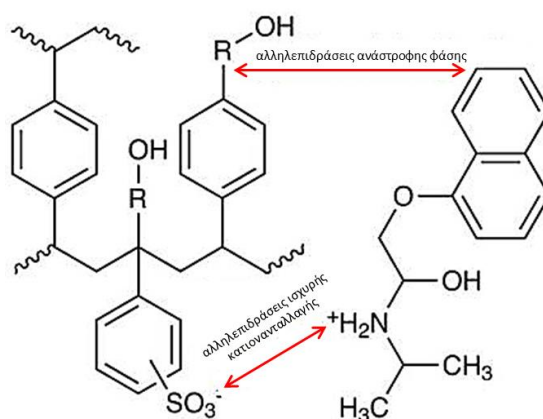
Η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού είναι σημαντική για να ελαχιστοποιηθούν τυχόν απώλειες των προσδιοριζόμενων ενώσεων, ειδικά εφόσον αυτές ανιχνεύονται στα περιβαλλοντικά δείγματα σε ίχνη. Οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB περιέχουν ένα πολυμερές προσροφητικό ανάστροφης φάσης, το οποίο αποτελείται από δύο μονομερή: την υδρόφιλη Ν-βινυλοπυρολιδόνη (N-vinylpyrrolidone) και το λιπόφιλο διβινυλοβενζόλιο (divinylbenzene) σε τέτοια αναλογία μεταξύ τους ώστε να επιτυγχάνεται υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία (hydrophilic-lipophilic balance). Το προσροφητικό υλικό είναι συνεπώς υδατικά διαβρέξιμο (Σχήμα 9.5) και μπορεί να αποφευχθεί το στάδιο της ενεργοποίησης, με την απλοποίηση του πρωτοκόλλου, χωρίς να υποβαθμιστεί η αποτελεσματικότητα του υλικού. Οι μικροστήλες αυτές είναι γενικής χρήσης και επιτρέπουν την ταυτόχρονη εκχύλιση όξινων, βασικών και ουδέτερων ενώσεων που ανιχνεύονται στα νερά, μέσω μηχανισμών ανάστροφης φάσης για ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών πολικιοτήτων, παρεμποδίζοντας της αλληλεπίδρασης με τα σιλάνια (silanol interactions).



Σχήμα 9.5 Δομή προσροφητικού υλικού HLB

Το μέγεθος πόρων είναι 80 Å, το μέγεθος σωματιδίων 30 μm και η ειδική επιφάνεια 800 m²/g. Πρόκειται για υλικό σταθερό ακόμα και σε ακραίες τιμές pH (0-14) και αποτελεσματικό χρησιμοποιώντας απλά και γενικά πρωτόκολλα εκχύλισης. Δεδομένου ότι το προσροφητικό είναι υδατικά διαβρέξιμο, διατηρεί την ικανότητα υψηλότερης κατακράτησης και προσφέρει εξαιρετικές ανακτήσεις ακόμα και αν στεγνώσει. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι δε χρειάζονται επιπλέον βήματα για τη διατήρηση των κλινών υγρών πριν από τη φόρτωση του δείγματος. Η χρήση πολυμερών υλικών βοηθά στην πληρέστερη κάλυψη της επιφάνειας και στη χωρητικότητα της στήλης (μέγιστη ποσότητα κατακρατούμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους υλικού). Η έκλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαλυτών μέσης πολικότητας ή πολικών, επειδή το πολυμερές πληρωτικό υλικό είναι σταθερό σε σχεδόν σε κάθε σύστημα διαλύτη.

Οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis MCX (mixed mode cation exchange and reversed-phase sorbent) περιέχουν προσροφητικό υλικό μικτού τρόπου δράσης που συνδυάζει μηχανισμούς προσρόφησης αντιστρόφου φάσεως και κατιονικής ιονανταλλαγής. Η χημική δομή του προσροφητικού υλικού του MCX περιέχει σουλφονικά ιόντα τα οποία αποτελούν το ισχυρό κέντρο κατιονικής ιονανταλλαγής. Επίσης περιέχουν φαινολικούς δακτυλίους οι οποίοι αποτελούν τα ενεργά κέντρα για την προσρόφηση ουσιών σχετικά λιπόφιλων με μηχανισμούς προσρόφησης αντιστρόφου φάσεως. Τα ισχυρά κατιονικής ιονανταλλαγής σουλφονικά κέντρα βρίσκονται στην επιφάνεια του πολυμερούς (divinylbenzene-co- N-vinylpyrrolidone), το οποίο περιέχει επίσης και αρκετούς φαινολικούς δακτυλίους. Το παραπάνω προσροφητικό υλικό επιδεικνύει εξαιρετική εκλεκτικότητα για βάσεις οι οποίες εύκολα μπορούν να πρωτονιωθούν.



Σχήμα 9.6 Δομή προσροφητικού υλικού MCX

Ρύθμιση pH στο δείγμα και στο διαλύτη έκλουσης

Η τιμή pH του δείγματος καθώς και του διαλύτη έκλουσης επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Οι αλληλεπιδράσεις των αναλυτών με το προσροφητικό εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό με τη μορφή στην οποία βρίσκεται ο αναλύτης κατά την εκχύλιση. Ειδικά στην περίπτωση των ιοντικών ενώσεων, ο παράγοντας του pH μπορεί να είναι ο πιο καθοριστικός για την εκχύλιση. Συγκεκριμένα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανιοντικών ενώσεων και του προσροφητικού HLB μειώνονται με την αύξηση του pH, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατιονικών ενώσεων και του ίδιου προσροφητικού εμφανίζονται αυξημένες.

Τα πληρωτικά υλικά που βασίζονται στην πυριτία (SiO_2) έχουν μία σταθερή περιοχή τιμών pH χρήσης 2–7,5. Σε τιμές εκτός αυτής της περιοχής μπορεί να παρατηρηθεί υδρόλυση της συνδεδεμένης φάσης ή διαλυτοποίηση του πυριτικού υποστρώματος. Στην περίπτωση κατά την οποία η σταθερότητα του πληρωτικού υλικού είναι κρίσιμη σε ακραίες τιμές pH, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολυμερή ή ανθρακούχα υλικά τα οποία παρουσιάζουν σταθερότητα σε περιοχή pH 1–14. Στην SPE ανάστροφης φάσης εάν είναι επιθυμητή η κατακράτηση του αναλύτη τότε το pH του δείγματος και του διαλύτη εξισορρόπησης πρέπει να ρυθμισθούν για τη βέλτιστη κατακράτηση. Εάν ο αναλύτης είναι όξινη ή βασική ένωση το pH ρυθμίζεται έτσι, ώστε αυτή να μην βρίσκεται σε ιοντισμένη μορφή αλλά σε μοριακή. Η κατακράτηση ουδέτερων ενώσεων δεν επηρεάζεται από την τιμή του pH. Για τα προσροφητικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται στην SPE ανάστροφης φάσης το pH ομοίως πρέπει να ρυθμίζεται για τη βέλτιστη κατακράτηση. Για την κατακράτηση το pH του δείγματος πρέπει να λαμβάνει τέτοια τιμή ώστε ο αναλύτης και οι δραστικές ομάδες οι οποίες είναι προσδεμένες στο πυριτικό υπόστρωμα να είναι αντιθέτως φορτισμένες.

Όταν οι μελετώμενες ενώσεις δρουν ως ασθενείς βάσεις σε υδατικά διαλύματα, επειδή τα άτομα του αζώτου που βρίσκονται στον τριαζινικό δακτύλιο είναι βασικά, σε όξινο περιβάλλον μπορούν εύκολα να πρωτονιωθούν. Μπορούν στον ίδιο βαθμό να πρωτονιωθούν όταν βρεθούν σε όξινο περιβάλλον και τα άτομα του αζώτου που είναι συζευγμένα στον τριαζινικό δακτύλιο με μορφή αμινών τα οποία επίσης συμπεριφέρονται ως βάσεις. Γενικότερα τα αλκύλια παρουσιάζουν θετικό επαγωγικό φαινόμενο κατά το οποίο τείνουν να απομακρύνουν αρνητικό φορτίο. Οι υποκαταστάτες με θετικό επαγωγικό φαινόμενο (αλκύλια) στην περίπτωση των αμινών αυξάνουν την ηλεκτρονική πυκνότητα του αζώτου, οπότε η πρόσληψη H^+ γίνεται ευκολότερα και η βασικότητα αυξάνει. Λόγω των αλκυλικών υποκαταστατών των αμινών στα μόρια, η αύξηση της πρωτονίωσης των ατόμων

του αζώτου είναι πιο έντονη όταν βρεθούν σε όξινο περιβάλλον και συνεπώς ο βασικός τους χαρακτήρας ενισχύεται.

Σε αυτό το στάδιο, η φυσικοχημική ιδιότητα των προς προσδιορισμό ουσιών που είναι χρήσιμη για την πρόβλεψη της βέλτιστης τιμής είναι η τιμή του pK_a . Η πληροφορία για το αν οι ενώσεις που θα αναλυθούν είναι όξινες ή βασικές, είναι σημαντική για να αποφανθούμε αν η εκχύλιση θα πραγματοποιηθεί υπό όξινες, ουδέτερες ή βασικές συνθήκες.

Άλλες παράμετροι

Η φύση του διαλύτη έκλουσης επιλογή του διαλύτη επηρεάζει σημαντικά την κατακράτηση του αναλύτη στο προσροφητικό και την εν συνεχεία έκλουση του. Η πολικότητα του διαλύτη καθορίζει την ικανότητά του να εκλύει τον αναλύτη από το προσροφητικό υλικό σε μικρότερο όγκο από αυτόν ενός ασθενέστερου διαλύτη. Σε αρκετές περιπτώσεις απαιτείται η χρήση μείγματος διαλυτών. Η μεθανόλη κυριαρχεί στις πολύ-υπολειμματικές μεθόδους έναντι διαλυτών όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος έχει την τάση να συγκρατεί κάποιες φορές μεγαλύτερα ποσοστά υγρασίας, με αποτέλεσμα να απαιτεί στάδιο ξήρανσης ώστε να απομακρυνθεί όλη η εναπομείνασα ποσότητα νερού με τη χρήση άλατος για την ανάλυση GC-MS ή να καθυστερεί στη συμπύκνωση.

Σημαντικός παράγοντας είναι και η ταχύτητα ροής του δείγματος και του διαλύτη έκλουσης. Απαιτείται καθορισμένος ελάχιστος χρόνος αλληλεπίδρασης αναλύτη και πληρωτικού υλικού (οι ετερογενείς χημικές ισορροπίες δεν αποκαθίστανται ακαριαίως). Συνήθεις ταχύτητες ροής για την περίπτωση όπου το πληρωτικό βρίσκεται σε μικροστήλη είναι 2-10 mL min⁻¹. Σε κάθε περίπτωση για να είναι επαναλήψιμα τα αποτελέσματα ενός διαχωρισμού (έστω και ατελούς) με SPE είναι κρίσιμο να χρησιμοποιούνται πάντοτε οι ίδιες ροές.

Άλλος παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της SPE είναι η χωρητικότητα του πληρωτικού υλικού, εκφραζόμενη συνήθως σε mmol κατακρατούμενης ουσίας ανά g υλικού. Σύμφωνα με τους κατασκευαστές, οι όγκοι εκχύλισης για τις υπό εξέταση στήλες είναι μεταξύ 75 και 250 mL προκειμένου να μην ξεπεραστεί η καθορισμένη χωρητικότητα. Για τα επιφανειακά ύδατα ο συνήθης όγκος είναι 250 mL, δεδομένου ότι οι επιλεγμένοι αναλύτες αναμένεται να ανιχνευθούν σε ίχνη και απαιτείται μεγαλύτερος παράγοντας προσυγκέντρωσης. Ειδικά όταν το δείγμα συμπυκνώνεται σε τελικό όγκο <1 mL, επιτρέπει την ασφαλή ποσοτικοποίηση αναλυτών ακόμα και σε ίχνη ενώ ταυτόχρονα περιορίζει τυχόν θέματα διαφυγής που προκύπτουν με τη χρήση μεγαλύτερων όγκων (breakthrough volume).

Επειδή ορισμένες εξαιρετικά πολικές ενώσεις παρουσίασαν προβλήματα διαφυγής, 250 mL εμβολιασμένου δείγματος νερού, φορτώθηκε σε δύο μικροστήλες συνδεδεμένες σε σειρά. Αφού και οι δύο αφέθηκαν να στεγνώσουν, ακολούθησε έκλουση με 10 mL μεθανόλης ξεχωριστά. Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν ως το 1 mL και εισήχθησαν για ανάλυση στο σύστημα LC-Orbitrap-MS. Η ανάκτηση τους ήταν χαμηλότερη από 30% και τελικά αφαιρέθηκαν από την τελική λίστα των αναλυτών που έχει δοθεί ως τώρα στη Διατριβή (amitrole: $\log K_{ow}=-0,97$, chlorsulfuron: $\log K_{ow}=-0,99$ και MCPA, $\log K_{ow}=-0,81$).

Ο απαιτούμενος όγκος μεθανόλης για την έκλουση των αναλυτών από το προσροφητικό συνήθως προτείνεται από τους κατασκευαστές. Ωστόσο, μπορεί να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω με διέλευση 10 κλασμάτων του 1 mL διαμέσου της μικροστήλης εκχύλισης, αφού προηγουμένως έχει φορτωθεί το εμβολιασμένο δείγμα. Έχει παρατηρηθεί ότι ειδικά για τις λιγότερο πολικές ενώσεις, και τα 10 mL μεθανόλης είναι απαραίτητα προκειμένου να υπερνικηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυτών και του προσροφητικού, ώστε τελικά να απελευθερωθούν οι πρώτοι και να παραληφθούν στο μεθανολικό έκλουσμα. Οι πολικές ενώσεις μένουν ανεπηρέαστες, επομένως τελικά προτιμάται η έκλουση να πραγματοποιηθεί με συνολικό όγκο διαλύτη 10 mL.

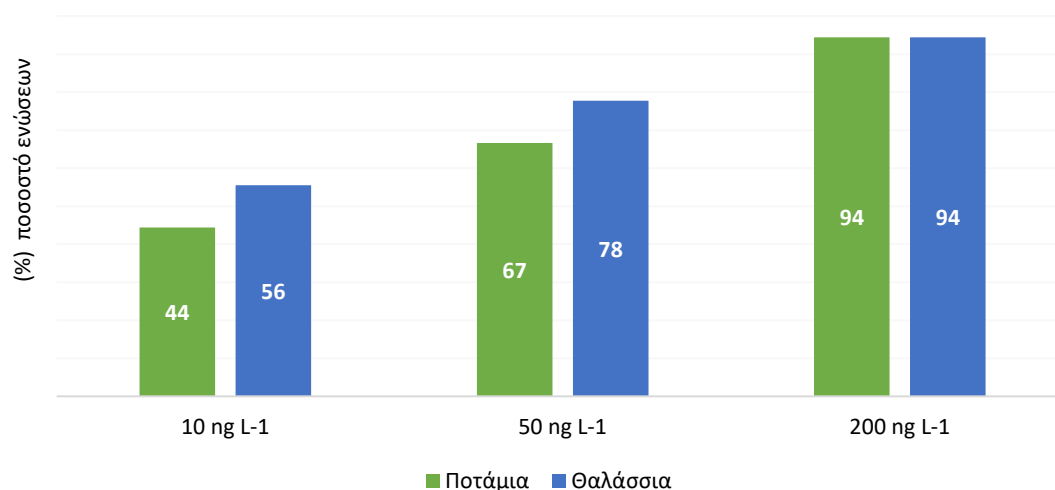
B. Επικύρωση

9.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

Η εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου βασίστηκε στον υπολογισμό των ανακτήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα νερού. Για κάθε επίπεδο εμβολιάστηκαν πέντε δείγματα ($n=5$) τα οποία αναλύθηκαν μέσα στην ίδια μέρα, για να υπολογιστεί παράλληλα η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) και σε τρεις διαδοχικές ημέρες ($n=3 \times 5=15$), για να υπολογιστεί η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (RSD_{WR}). Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα αποτελούν την πιστότητα της μεθόδου.

Τα επίπεδα εμβολιασμού τόσο για τις φυτοπροστατευτικές όσο και τις φαρμακευτικές ενώσεις ήταν 10 ng L^{-1} , 50 ng L^{-1} και 200 ng L^{-1} . Η επιλογή των επιπέδων εμβολιασμού βασίστηκε στα επίπεδα συγκεντρώσεων στα οποία απαντώνται γενικά οι επιλεγμένες ενώσεις στο περιβάλλον και συγκεκριμένα στα ποτάμια και στα παράκτια ύδατα [244]. Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας τη συγκέντρωση που υπολογίστηκε μετά την εφαρμογή της SPE στα εμβολιασμένα δείγματα, με το επίπεδο του εμβολιασμού. Τυφλά δείγματα αναλύθηκαν παράλληλα ώστε τυχόν συγκεντρώσεις των αναλυτών να συνεκτιμηθούν για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των εμβολιασμένων δειγμάτων.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων ($n=5$) στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού κυμάνθηκαν από 59% (chlorantraniliprole) έως 104%% (fluazifor-p-butyl), στο μεσαίο από 61% (thiacloprid, boscalid) έως 96% (imazalil) και στο υψηλό από 68% έως (dimethoate) 93% (fluazifor-p-butyl) για τα ποτάμια νερά. Για τα θαλάσσια νερά, οι ανακτήσεις ήταν ελαφρώς πιο αυξημένες, λόγω αύξησης της ιοντικής ισχύος αλλά και επίδρασης υποστρώματος. Στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού κυμάνθηκαν από 62% (chlorantraniliprole) έως 111%% (fluazifor-p-butyl), στο μεσαίο από 60% (thiacloprid) έως 95,4% (imazalil) και στο υψηλό από 68% έως (dimethoate) 97,2% (fluazifor-p-butyl). Στο Σχήμα 9.7 αποτυπώνεται το ποσοστό των ενώσεων με ανακτήσεις από 70- 120% για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις σε ποτάμια και θαλάσσια νερά.



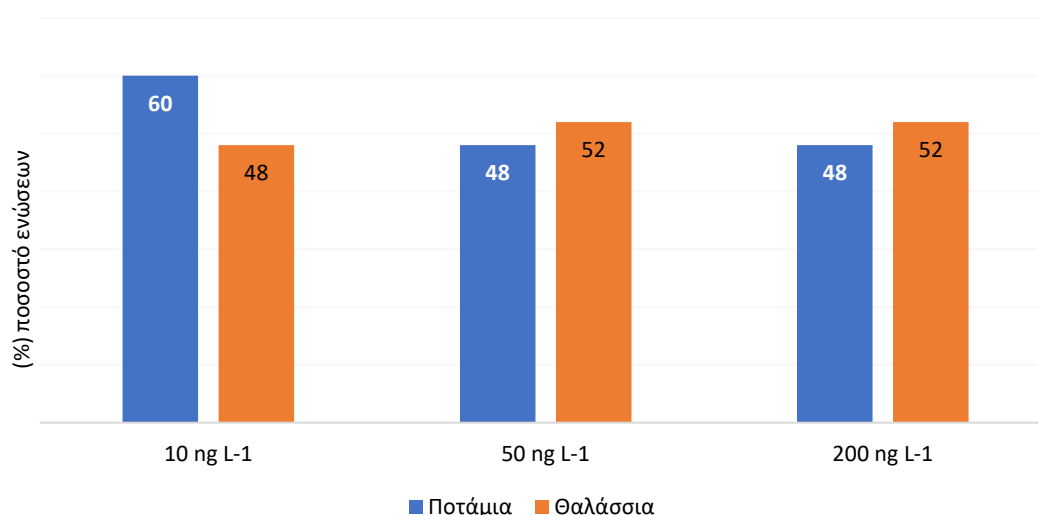
Σχήμα 9.7 Ποσοστό φυτοπροστατευτικών ενώσεων με εύρος ανακτήσεων 70-120% για τα ποτάμια και τα θαλάσσια νερά

Η επαναληψιμότητα (%RSD_r) για τις ενώσεις αυτές ήταν μικρότερη από 13% τόσο για τα ποτάμια όσο και για τα θαλάσσια νερά. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (RSD_{wr}%) ήταν μικρότερη του 15%. Υπενθυμίζεται ότι το ανώτατο αποδεκτό όριο για όλες τις περιπτώσεις είναι το 20%, το οποίο δεν υπερέβη καμία φυτοπροστατευτική ένωση. Στον Πίνακα 9.5 δίνονται οι ανακτήσεις, η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις σε τρία επίπεδα εμβολιασμού, σε ποτάμια και θαλάσσια νερά.

Οι ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων σε ποτάμια ύδατα κυμάνθηκαν στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού από 61% (bupropion) έως 100,3% (carbamazepine), για το

μεσαίο επίπεδο από 64% έως 99,6% για τις ίδιες ενώσεις και στο υψηλό από 56% (bupropion) έως 105,3% (olanzapine). Σε θαλάσσια ύδατα, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 58% (bupropion) έως 106,2% (fluoxetine) στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού, στο μεσαίο επίπεδο από 55,9% (bupropion) έως 104,2% (bezafibrate) και στο υψηλό από 62,3% (bupropion) έως 110,3% (venlafaxine).

Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα, $\%RSD_r$ και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, $RSD_{WR}\%$, ήταν μικρότερη του 15%. Στον Πίνακα 9.6 φαίνονται οι ανακτήσεις (%R) της μεθόδου για κάθε επίπεδο, η επαναληψιμότητα ($\%RSD_r$) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ($RSD_{WR}\%$). Στο Σχήμα 9.8 αποτυπώνεται το ποσοστό των φαρμακευτικών ενώσεων με εύρος ανακτήσεων από 70-120% στα ποτάμια και θαλάσσια νερά.



Σχήμα 9.8 Ποσοστό (%) φαρμακευτικών ενώσεων με εύρος ανακτήσεων 70-120% για τα ποτάμια και τα θαλάσσια νερά

Στον Πίνακα 9.6 δίνονται οι ανακτήσεις, η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου για τις φαρμακευτικές ενώσεις σε τρία επίπεδα εμβολιασμού, σε ποτάμια και θαλάσσια νερά.

Πίνακας 9.5 Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ως %RSD) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά

	Ποτάμια νερά									Θαλάσσια νερά								
	10 ng L ⁻¹			50 ng L ⁻¹			200 ng L ⁻¹			10 ng L ⁻¹			50 ng L ⁻¹			200 ng L ⁻¹		
	(%)R	(%)RSD _t	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _t	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _t	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _t	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _t	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _t	(%)RSD _R
Diuron	69,0	7,2	8,1	73,1	4,1	5,2	79,0	2,4	2,9	71,0	3,2	6,2	72,9	2,4	8,5	79,8	7,0	8,5
Fluazifop-p-butyl	104,0	9,6	9,5	82,0	3,2	6,1	93,0	6,5	8,6	111,0	4,4	4,9	84,3	4,2	6,0	97,2	8,5	8,3
Fluometuron	-	-	-	69,0	2,9	9,0	82,0	3,7	6,7	-	8,8	4,1	70,4	5,1	5,7	83,8	6,4	6,2
Linuron	-	-	-	87,0	1,1	5,2	80,0	1,3	4,9	-	2,5	3,2	88,7	4,2	6,1	86,0	6,2	8,2
Prometryn	78,0	5,1	7,7	78,0	2,6	6,2	86,0	2,3	3,2	76,0	4,9	5,1	80,0	8,5	9,9	89,1	4,2	11,5
S-metolachlor	72,0	4,2	8,6	69,0	2,9	4,2	83,0	2,4	12,2	73,0	3,2	1,3	70,9	3,2	4,4	87,5	8,5	11,9
Chlorantraniliprole	59,0	8,5	6,7	81,0	2,5	5,1	87,0	8,0	11,5	62,0	10,2	7,2	82,0	12,2	6,6	86,0	8,3	2,9
Chlorpyrifos	-	-	-	78,0	5,1	8,3	75,0	8,7	14,9	-	6,2	6,2	79,0	11,5	12,2	76,0	6,2	4,9
Dimethoate	61,0	9,8	11,2	78,0	1,3	6,2	68,0	4,4	3,2	64,0	2,5	4,2	74,8	5,1	8,8	68,0	4,2	5,3
Tebupirimfos	-	-	-	83,0	7,2	4,2	80,0	8,8	6,6	-	4,9	3,2	81,2	4,2	2,5	80,0	8,8	3,5
Thiacloprid	69,0	1,4	9,9	61,0	4,9	8,5	79,0	2,5	12,2	70,2	3,2	6,6	60,0	8,5	5,3	81,0	2,5	2,5
Thiamethoxam	77,0	3,9	4,4	62,5	3,2	4,9	75,0	5,3	11,5	75,9	4,2	9,2	63,7	12,2	8,8	77,2	4,9	6,6
Boscalid	-	-	-	61,0	6,6	7,0	85,0	3,5	4,2	-	8,5	7,7	64,8	4,9	3,2	83,8	3,2	12,2
Imazalil	75,0	6,7	7,7	96,0	3,1	6,7	81,0	2,5	8,5	78,0	8,3	8,6	95,4	3,2	6,6	84,0	6,0	8,6
Metalaxyl	84,0	2,4	8,4	75,0	1,3	2,4	82,0	12,2	7,7	86,0	4,2	6,7	76,8	4,2	3,1	82,9	5,7	8,8
Myclobutanil	-	-	-	73,1	8,3	12,1	78,0	11,5	8,4	-	8,5	3,2	74,9	5,1	6,2	78,8	4,9	5,1
Acetamiprid	71,0	7,0	7,5	65,0	6,2	9,1	80,0	2,5	6,2	80,0	3,2	6,6	65,2	8,3	4,1	82,4	5,1	4,2
Fenpyroximate	81,0	9,9	11,3	74,2	9,4	11,0	78,0	7,7	4,2	84,0	6,7	6,7	76,8	9,0	3,2	81,0	7,0	8,5

Σημειώνονται με παύλα οι ενώσεις οι οποίες είχαν όριο ποσοτικοποίησης >10 ng L⁻¹

Πίνακας 9.6 Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (ως %RSD) των φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά

	Ποτάμια νερά									Θαλάσσια νερά								
	10 ng L ⁻¹ *			50 ng L ⁻¹			200 ng L ⁻¹			10 ng L ⁻¹ *			50 ng L ⁻¹			200 ng L ⁻¹		
	(%)R	(%)RSD _f	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _f	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _f	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _f	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _f	(%)RSD _R	(%)R	(%)RSD _f	(%)RSD _R
Alprazolam	75,8	2,3	8,1	81,3	2,1	5,2	83,6	2,4	4,2	78,8	2,0	6,2	83,8	2,4	8,5	85,1	6,0	7,0
Amisulpride	76,2	3,2	9,5	74,6	1,2	6,1	82,3	6,5	8,6	79,2	2,5	4,9	82,5	4,2	6,0	85,2	7,2	8,5
Amitriptyline	90,6	4,6	10,3	91,3	3,6	9,0	92,1	9,9	8,3	91,3	12,3	4,1	94,0	5,1	5,7	94,5	6,0	6,4
Bupropion	61,0	3,5	8,6	59,0	2,5	5,2	56,0	4,4	6,0	58,0	10,8	3,2	55,9	4,2	6,1	62,3	3,0	5,2
Carbamazepine	100,3	2	7,7	99,6	6,1	6,2	100,0	2,4	5,0	101,2	5,1	5,1	100,0	8,5	9,9	101,4	2,5	2,5
Citalopram	97,0	2,5	8,6	84,6	4,6	4,2	97,6	7,1	8,2	100,3	10,8	1,3	99,0	3,2	4,4	100,6	12,3	12,2
Clozapine	95,3	12,3	6,7	91,2	6,1	5,1	93,2	5,3	6,0	97,0	6,2	7,2	93,0	12,2	6,6	94,2	10,8	11,5
Diazepam	31,6	10,8	9,9	87,6	3,2	8,3	85,0	1,8	2,0	94,3	4,2	12,3	92,7	11,5	12,2	91,8	2,3	2,5
Fluoxetine	105,3	2,3	11,2	98,3	3,0	6,2	101,8	2,8	3,0	106,2	2,5	10,8	101,0	5,1	8,8	106,1	8,2	7,7
Haloperidol	84,6	8,2	10,1	92,3	5,1	4,2	84,6	2,1	4,6	82,3	12,3	3,2	84,7	4,2	2,5	87,1	7,7	8,8
Mirtazapine	71,3	3,2	9,9	68,2	10,8	8,5	68,0	7,7	8,6	69,2	10,8	6,6	70,0	8,5	3,2	69,0	1,7	2,5
Olanzapine	98,6	2,1	4,4	102,3	6,2	4,9	105,3	1,7	10,8	101,0	2,3	9,2	104,2	12,2	5,1	108,0	5,3	4,9
Paroxetine	62,3	1,6	6,3	65,0	3,0	7,0	65,3	1,9	2,3	65,3	6,6	7,7	62,6	4,9	1,3	61,9	1,5	2,5
Quetiapine	64,7	5,3	7,7	66,0	5,1	6,7	62,3	2,0	8,2	64,9	9,2	8,6	67,2	3,2	7,2	60,0	7,3	12,2
Risperidone	84,6	1,5	8,4	84,6	3,6	2,4	88,7	2,5	2,5	87,6	4,2	6,7	88,9	4,2	6,2	85,4	9,8	11,5
Sertraline	-	-	-	65,3	4,0	12,1	69,3	11,1	11,1	-	-	-	67,9	5,1	4,2	67,1	5,7	8,5
Venlafaxine	91,0	9,8	7,5	89,3	6,2	9,1	104,3	4,2	4,2	99,0	3,2	6,6	101,0	8,3	4,1	110,3	3,5	3,2
Paracetamol	87,0	6,3	11,3	86,3	4,2	11,0	92,3	2,5	2,2	88,6	6,7	6,7	90,8	6,0	4,2	91,9	11,2	12,2
Ketoprofen	-	-	-	75,6	2,5	3,2	100,7	12,3	11,8	-	-	-	97,8	5,7	8,5	101,6	11,7	11,5
Phenazone	-	-	-	94,6	9,0	6,7	100,6	10,8	2,5	-	-	-	95,2	6,1	4,9	100,0	3,2	3,2
Bezafibrate	100,2	5,7	6,9	98,2	2,3	4,2	100,4	2,3	12,3	101,2	1,3	12,2	104,2	9,9	7,0	108,9	4,6	4,2
Fenofibrate	-	-	-	76,3	1,9	4,9	75,0	4,0	10,8	-	-	-	77,3	4,2	6,7	71,3	3,5	4,9
Atenolol	-	-	-	72,1	1,6	7,0	76,5	5,9	2,3	-	-	-	74,6	5,1	4,0	78,9	2,0	2,5
Budesonide	64,3	0,9	3,0	69,1	3,0	6,7	67,3	4,4	2,2	68,0	4,9	3,2	67,2	8,3	6,2	68,3	5,5	8,0
Cimetidine	-	-	-	82,3	4,0	4,2	80,0	6,0	4,9	-	-	-	80,4	6,2	9,0	81,9	8,2	10,0

* Σημειώνονται με (-) οι ενώσεις οι οποίες είχαν όριο ποσοτικοποίησης >10 ng L⁻¹

Ως γνωστόν, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου (MDL και MQL) αποτελούν την ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη που αντιστοιχεί σε λόγο σήματος προς θόρυβο 3 και 10 αντίστοιχα. Στην παρούσα Διατριβή, τα όρια υπολογίστηκαν ως η μέση τιμή των εμβολιασμένων δειγμάτων ποτάμιων και θαλάσσιων νερών, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία, επομένως αντιστοιχούν και στους δύο τύπους δείγματος [244]. Με τη χρήση HRMS όπου ο θόρυβος συχνά απουσιάζει από τα χρωματογραφήματα, έχει παρατηρηθεί εμπειρικά ότι οι συγκεντρώσεις στα όρια της μεθόδου αντιστοιχούν σε ύψος κορυφής περίπου 10^4 [14, 124, 241].

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ έως 30 ng L^{-1} και $1,7 \text{ ng L}^{-1}$ έως 90 ng L^{-1} . Ωστόσο, με εξαίρεση τα fluometuron, diuron, chlorpyrifos, tebuopyrimfos, boscalid και myclobutanil, τα όρια ποσοτικοποίησης ήταν αρκετά μικρότερα από 10 ng L^{-1} .

Για τις φαρμακευτικές ενώσεις τα όρια ήταν λίγο χαμηλότερα. Τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν από $0,2 \text{ ng L}^{-1}$ (venlafaxine) έως 8 ng L^{-1} (atenolol) και τα όρια ποσοτικοποίησης από $0,8 \text{ ng L}^{-1}$ (carbamazepine) έως 25 ng L^{-1} (atenolol) αντίστοιχα. Τα χαμηλά όρια της μεθόδου (εκτός μεμονωμένων περιπτώσεων) αποδεικνύουν ότι ο παράγοντας προσυγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε είναι αρκετός για την ποσοτικοποίηση ενώσεων ακόμα και σε ίχνη. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς ακόμα και με μείωση του όγκου του εκχυλιζόμενου δείγματος, η ανάλυση θα ήταν αξιόπιστη, ενώ θα μπορούσε να μειωθεί η επίδραση από το υπόστρωμα.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με την κατασκευή καμπύλης επτά σημείων, σε εμβολιασμένα δείγματα για εύρος συγκεντρώσεων από το μεταξύ MQL έως περίπου $100 \times \text{MQL}$, η οποία ακολουθούσε τη γραμμική παλινδρόμηση. Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) υπολογίστηκε για τις ενώσεις και των δύο μειγμάτων να έχει τιμές μεγαλύτερες από 0,99, συνεπώς επέδειξε εξαιρετική γραμμικότητα για τη μέθοδο. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, το γραμμικό εύρος της μεθόδου και ο συντελεστής συσχέτισης (r^2) για τις φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις, δίνονται στους Πίνακες 9.7 και 9.8.

Πίνακας 9.7 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά.

	MDL (ng L^{-1})	MQL (ng L^{-1})	Γραμμικό εύρος	r^2
Diuron	3,0	10,0	MQL–1000	0,9997
Fluazifop-p-butyl	2,0	6,0	MQL–1000	0,9987

	MDL (ng L ⁻¹)	MQL (ng L ⁻¹)	Γραμμικό εύρος	r ²
Fluometuron	30,0	90,0	MQL–1000	0,9987
Linuron	8,0	23,0	MQL–1000	0,9994
Prometryn	0,5	1,7	MQL–500	0,9992
S-metolachlor	0,7	2,3	MQL–500	0,9990
Chlorantraniliprole	1,0	3,3	MQL–1000	0,9989
Chlorpyrifos	8,4	25,6	MQL–1000	0,9991
Dimethoate	2,0	6,0	MQL–500	0,9994
Tebupirimfos	9,0	30,0	MQL–1000	0,9997
Thiacloprid	0,9	2,5	MQL–500	0,9991
Thiamethoxam	3,0	10,0	MQL–1000	0,9970
Boscalid	5,0	16,0	MQL–500	0,9991
Imazalil	2,0	6,0	MQL–500	0,9994
Metalaxyl	0,8	2,3	MQL–500	0,9984
Myclobutanil	4,0	12,0	MQL–1000	0,9987
Acetamiprid	0,9	2,5	MQL–500	0,9997
Fenpyroximate	2,0	6,0	MQL–500	0,9990

Πίνακας 9.8 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, γραμμικότητα της μεθόδου προσδιορισμού φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά

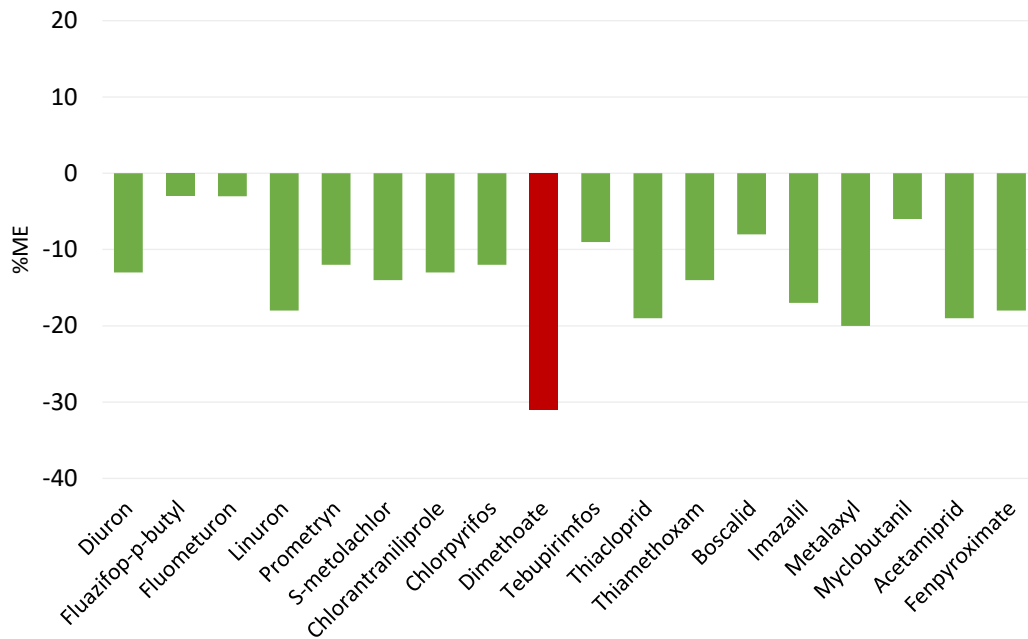
	MDL (ng L ⁻¹)	MQL (ng L ⁻¹)		
Alprazolam	2,5	7,5	MQL–500	0,9990
Amisulpride	0,7	2,0	MQL–500	0,9989
Amitriptyline	0,3	0,8	MQL–500	0,9991
Bupropion	0,5	2,3	MQL–500	0,9994
Carbamazepine	0,3	0,8	MQL–500	0,9990
Citalopram	0,5	1,9	MQL–500	0,9989
Clozapine	0,4	2,1	MQL–500	0,9991
Diazepam	0,8	2,5	MQL–500	0,9994
Fluoxetine	0,6	3,0	MQL–500	0,9997
Haloperidol	1,0	3,7	MQL–500	0,9991
Mirtazapine	0,6	3,2	MQL–1000	0,9970
Olanzapine	1,0	5,7	MQL–1000	0,9991
Paroxetine	2,5	9,2	MQL–500	0,9994
Quetiapine	1,0	3,7	MQL–500	0,9987
Risperidone	0,5	2,0	MQL–1000	0,9994

	MDL (ng L ⁻¹)	MQL (ng L ⁻¹)		
Sertraline	3,0	11,0	MQL-ζών500	0,9992
Venlafaxine	0,2	1,5	MQL-1000	0,9990
Paracetamol	4,0	10,0	MQL-1000	0,9992
Ketoprofen	6,0	20,0	MQL-1000	0,9990
Phenazone	3,0	10,0	MQL-1000	0,9989
Bezafibrate	2,5	8,0	MQL-1000	0,9994
Fenofibrate	5,0	14,0	MQL-1000	0,9997
Atenolol	8,0	25,0	MQL-1000	0,9991
Budesonide	2,0	7,0	MQL-1000	0,9970
Cimetidine	3,7	14,4	MQL-500	0,9990

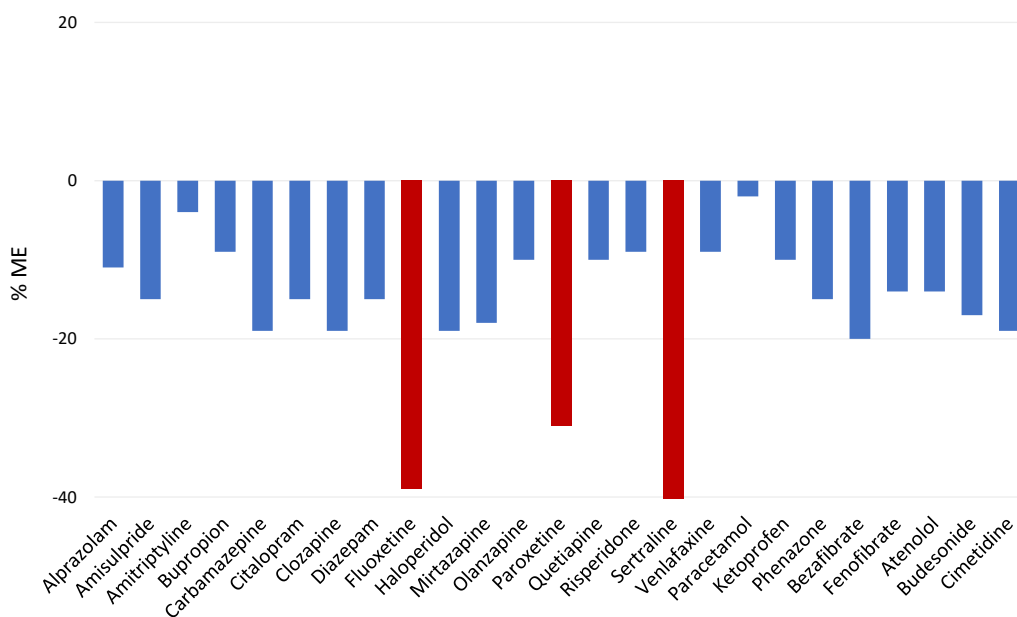
9.6 Επίδραση υποστρώματος

Η χρήση καμπυλών βαθμονόμησης με προσομοίωση υποστρώματος σε συνδυασμό με τα ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα (όταν ήταν διαθέσιμα) συνέβαλλε σημαντικά στην ελαχιστοποίηση τυχόν σφαλμάτων στους υπολογισμούς, εξαιτίας του βαθμού στον οποίο επηρεάζεται ο ιοντισμός. Η επίδραση υποστρώματος μελετήθηκε σε θαλάσσια ύδατα καθώς θεωρείται πιο επιβαρυνμένο λόγω του υψηλής αλατότητας. Στα Σχήματα 9.9 και 9.10, αποτυπώνεται η επίδραση του υποστρώματος για τις φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις αντίστοιχα.

Εμφανίστηκε μείωση του αναλυτικού σήματος για όλες τις μελετώμενες ενώσεις. Το φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος ήταν μικρότερο για γενικά για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις (<20%) εκτός από το dimethoate, για το οποίο υπολογίστηκε 31% μείωση του σήματος. Για τις φαρμακευτικές ενώσεις, παρατηρήθηκε η ίδια τάση, εκτός από τα ψυχιατρικά φάρμακα fluoxetine, paroxetine και sertraline, για τις οποίες παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση του σήματος (Σχήμα 9.10).



Σχήμα 9.9 Επίδραση υποστρώματος για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις



Σχήμα 9.10 Επίδραση υποστρώματος για τις φαρμακευτικές ενώσεις

Η μελέτη του υποστρώματος και τα αποτελέσματα που προέκυψαν, υπογραμμίζουν τη σημασία της χρήσης προσεγγίσεων για την ποσοτικοποίηση, όπως η ποσοτικοποίηση με καμπύλες προσομοιωμένες στο υπόστρωμα, η χρήση εσωτερικών προτύπων ή και ο

συνδυασμός τους κ.ά., για τη διόρθωση της επίδρασης του υποστρώματος, προκειμένου να αποφευχθεί η ανακριβής ποσοτικοποίηση (με υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση) κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΣΕ ΥΔΑΤΙΝΑ ΣΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΗΣ**



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

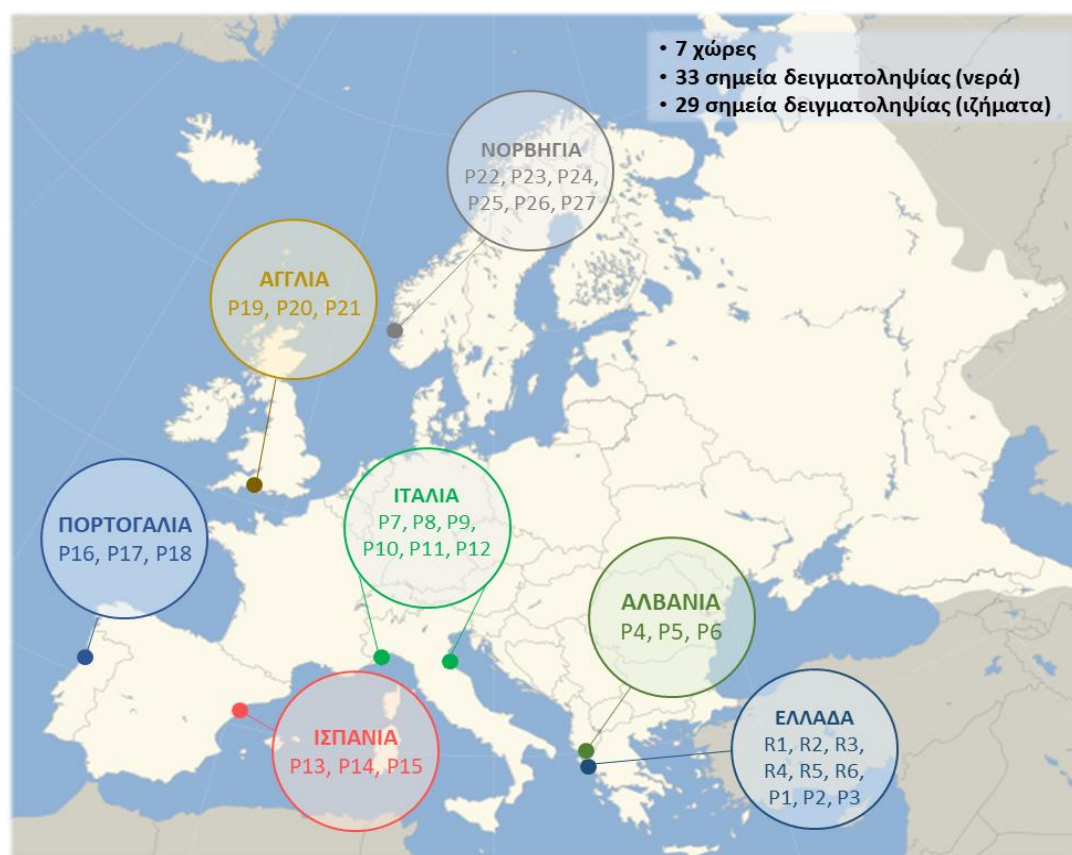
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΥΔΑΤΙΝΑ ΣΩΜΑΤΑ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΗΣ

10.1 Περιγραφή των περιοχών μελέτης

Οι αναλυτικές μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν, εφαρμόστηκαν σε μια «μελέτη περίπτωσης» (case study) στην Ελλάδα και έξι ακόμα ευρωπαϊκές χώρες (Αλβανία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Ηνωμένο Βασίλειο και Νορβηγία). Τα δείγματα συλλέχθηκαν από υδάτινα σώματα τα οποία εκτός των άλλων ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, επηρεάζονται και από τη δραστηριότητα υδατοκαλλιεργειών (συγκεκριμένα ιχθυοκαλλιεργειών ή εκτροφείων μυδιών). Αξίζει να σημειωθεί ότι πρόκειται για χώρες που κατατάσσονται στις πρώτες θέσεις παραγωγής προϊόντων ιχθυοκαλλιέργειας στην ΕΕ την τελευταία δεκαετία. Την πρώτη θέση καταλαμβάνει η Ισπανία, (51,76 τόνοι/km/χρόνο) και ακολουθούν η Νορβηγία, η Ιρλανδία, η Ιταλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ελλάδα και η Πορτογαλία [247].

Στην Ελλάδα επιλέχθηκαν σημεία από τρεις περιοχές στο υδατικό διαμέρισμα της Ηπείρου (α) η λεκάνη απορροής Αράχθου (β) η λεκάνη απορροής Λούρου, όπου λειτουργούν ιχθυοκαλλιέργειες γλυκού νερού και (γ) η Λωρίδα Σαγιάδας, ευρέως γνωστή για το μεγάλο αριθμό ιχθυοκαλλιεργειών που φιλοξενεί. Στην Αλβανία, επιλέχθηκαν σημεία στη λιμνοθάλασσα Butrint, όπου λειτουργούν εκτροφεία μυδιών. Στην Ιταλία, επιλέχθηκαν σημεία από δύο υδάτινα συστήματα: (α) η λιμνοθάλασσα Sacca di Goro, όπου λειτουργούν

εκτροφεία μυδιών και (β) η Θάλασσα της Λιγυρίας, όπου λειτουργούν ιχθυοκαλλιέργειες. Στην Ισπανία, συλλέχθηκαν δείγματα από τις εκβολές του ποταμού Ebro, στην Πορτογαλία από τη λιμνοθάλασσα του Aveiro και στο Ηνωμένο Βασίλειο, από τις εκβολές του ποταμού Exe. Στις τρεις παραπάνω χώρες βρίθουν τα εκτροφεία μυδιών. Στη Νορβηγία, τα δείγματα συλλέχθηκαν στην ευρύτερη θαλάσσια περιοχή του Rong, ωστόσο χωρίστηκαν σε δείγματα από την περιοχή όπου λειτουργούν ιχθυοκαλλιέργειες και εκτροφεία μυδιών. Από κάθε σημείο δειγματοληψίας συλλέχθηκαν τρία δείγματα νερού και ιζήματος, με εξαίρεση τέσσερα σημεία (βλ. Σχήμα 10.1: P10 στην Ιταλία και P22, P25, P26 στη Νορβηγία) όπου η συλλογή ιζήματος δεν ήταν εφικτή. Το Σχήμα 10.1 απεικονίζει τη διασπορά των σημείων στην Ευρώπη.



Σχήμα 10.1 Διασπορά των σημείων δειγματοληψίας στην Ευρώπη

Στον Πίνακα 10.1 δίνεται η περιοχή και η θέση των σημείων δειγματοληψίας, με εξαίρεση αυτά που υπόκεινται σε συμφωνία τήρησης απορρήτου και ακολουθεί ο Πίνακας 10.2, όπου δίνονται τα κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων. Για τα δείγματα νερού, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τη δειγματοληψία, στο πεδίο (on site). Για τα ιζήματα, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο.

Πίνακας 10.1 Περιοχή και γεωγραφική θέση σημείων δειγματοληψίας

Σημείο	Περιοχή	Γεωγραφική θέση
R1	Ελλάδα, γέφυρα Βλαχέρνας, λεκάνη απορροής Αράχθου	39°10'05.0"N, 21°00'26.0"E
R2	Ελλάδα, μετά τη ΜΕΥΑ Άρτας, λεκάνη απορροής Αράχθου	39°08'06.0"N, 20°59'21.9"E
R3	Ελλάδα, εκβολές Αράχθου, λεκάνη απορροής Αράχθου	39°01'46.9"N, 21°04'30.7"E
R4	Ελλάδα, φράγμα Λούρου, λεκάνη απορροής Λούρου	39°15'38.6"N, 20°50'50.6"E
R5	Ελλάδα, γέφυρα Πέτρας, λεκάνη απορροής Λούρου	39°09'52.2"N, 20°49'37.1"E
R6	Ελλάδα, εκβολές Λούρου, λεκάνη απορροής Λούρου	39° 2'42.74"N, 20°46'40.06"E
P1	Ελλάδα, Λωρίδα Σαγιάδας, εκτός ιχθυοκαλλιέργειας	απόρρητο*
P2	Ελλάδα, Λωρίδα Σαγιάδας, εντός ιχθυοκαλλιέργειας	απόρρητο*
P3	Ελλάδα, Λωρίδα Σαγιάδας, όρια ιχθυοκαλλιέργειας	απόρρητο*
P4	Αλβανία, Butrint, εκτός υδατοκαλλιέργειας	39°45'18.71"N, 20°02'27.72"E
P5	Αλβανία, Butrint, εντός υδατοκαλλιέργειας	39°45'17.26"N, 20°02'08.59"E
P6	Αλβανία, Butrint, όρια υδατοκαλλιέργειας	39°45'22.74"N, 20°02'02.08"E
P7	Ιταλία, Sacca di Goro, εκτός υδατοκαλλιέργειας	44°47'43.25"N, 12°17'40.72"E
P8	Ιταλία, Sacca di Goro, εντός υδατοκαλλιέργειας	44°47'47.99"N, 12°19'22.32"E
P9	Ιταλία, Sacca di Goro, όρια υδατοκαλλιέργειας	44°48'45.64"N, 12°18'40.08"E
P10	Ιταλία, Θάλασσα Λιγυρίας, εκτός υδατοκαλλιέργειας	απόρρητο *
P11	Ιταλία, Θάλασσα Λιγυρίας, εντός υδατοκαλλιέργειας	απόρρητο *
P12	Ιταλία, Θάλασσα Λιγυρίας, όρια υδατοκαλλιέργειας	απόρρητο *
P13	Ισπανία, εκβολές Ebro, εκτός υδατοκαλλιέργειας	40°37'18.5"N, 0°36'32.8"E
P14	Ισπανία, εκβολές Ebro, εντός υδατοκαλλιέργειας	40°37'16.4"N, 0°37'18.6"E
P15	Ισπανία, εκβολές Ebro, όρια υδατοκαλλιέργειας	40°37'31.8"N, 0°39'26.9"E
P16	Πορτογαλία, Aveiro, εκτός υδατοκαλλιέργειας	40°38'40.5"N, 8°43'59.3"W
P17	Πορτογαλία, Aveiro, εντός υδατοκαλλιέργειας	40°38'37.0"N, 8°43'55.8"W
P18	Πορτογαλία, Aveiro, όρια υδατοκαλλιέργειας	40°38'22.1"N, 8°43'46.0"W
P19	Ηνωμένο Βασίλειο, εκβολές Exe, εκτός υδατοκαλλιέργειας	50°36'45.29"N, 3°25'45.39"W
P20	Ηνωμένο Βασίλειο, εκβολές Exe, εντός υδατοκαλλιέργειας	50°36'38.63"N, 3°25'57.85"W
P21	Ηνωμένο Βασίλειο, εκβολές Exe, όρια υδατοκαλλιέργειας	50°37'46.74"N, 3°26'52.19"W
P22	Νορβηγία, Rong, εκτός ιχθυοκαλλιέργειας	60°30'43.9"N, 4°55'48.4"E
P23	Νορβηγία, Rong, εντός ιχθυοκαλλιέργειας	60°30'58.9"N, 4°55'30.0"E
P24	Νορβηγία, Rong, όρια ιχθυοκαλλιέργειας	60°31'15.5"N, 4°55'08.0"E
P25	Νορβηγία, Rong, εκτός υδατοκαλλιέργειας	60°31'03.7"N, 4°54'15.7"E
P26	Νορβηγία, Rong, εντός υδατοκαλλιέργειας	60°31'02.8"N, 4°53'59.5"E
P27	Νορβηγία, Rong, όρια υδατοκαλλιέργειας	60°30'59.0"N, 4°53'31.0"E

Πίνακας 10.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων νερού και ιζήματος

	ΝΕΡΑ				ΙΖΗΜΑΤΑ				
	Θερμοκρασία (°C)	pH	Αλατότητα (‰)	Αγωγιμότητα (mS/cm)	pH ¹	% CaCO ₃ ²	(%) οργανική ουσία	Μηχ. ανάλυση	Χαρακτηρισμός ⁵
R1	13,5	7,06	0	317				(%) άμμος: 16	
R2	22,1	7,67	0	281	8,0	89,4	2,1	(%) άργιλος: 22	ιλυοπηλώδες
R3	16,6	6,74	0	456				(%) ιλύς: 62	
R4	17,3	6,73	0	454				(%) άμμος: 19	
R5	20,0	6,94	0,2	7810	8,3	83,2	1,8	(%) άργιλος: 23	ιλυοπηλώδες
R6	24,8	7,81	9,6	8290				(%) ιλύς: 58	
P1	23,5	8,21	38,3	30150				(%) άμμος: 51	
P2	22,3	8,29	37,2	31000	8,0	17,7	1,6	(%) άργιλος: 20	αμμοπηλώδες
P3	22,8	8,19	38,1	30100				(%) ιλύς: 29	
P4	24,5	8,13	27,0	31200				(%) άμμος: 20	
P5	23,8	8,28	26,2	31800	8,4	17,9	1,6	(%) άργιλος: 24	ιλυοπηλώδες
P6	23,6	8,27	25,36	31650				(%) ιλύς: 56	
P7	19,9	8,03	22,0	38800				(%) άμμος: 14	
P8	20,9	8,08	23,2	33100	8,2	17,8	1,4	(%) άργιλος: 6	ιλυοπηλώδες
P9	21,7	8,07	20,36	29600				(%) ιλύς: 80	
P10	22,5	7,86	39,3	55700				μη διαθέσιμο δείγμα	
P11	22,3	7,94	38,2	53700				(%) άμμος: 21	
P12	21,7	7,91	39,1	53000	8,0	16,8	1,6	(%) άργιλος: 20	αμμοπηλώδες
P13	26,9	8,19	29,2	48890				(%) ιλύς: 59	
P14	25,8	8,21	30,2	32805	8,1	74,3	2,3	(%) άμμος: 70	
P15	27,7	8,29	30,0	48108				(%) άργιλος: 6	αμμοπηλώδες
P16	17,1	8,19	32,5	52815				(%) ιλύς: 24	
P17	17,8	8,21	29,8	48304	9	8,8	1,4	(%) άμμος: 68	
P18	18,2	8,29	28,9	48272				(%) άργιλος: 5	αμμοπηλώδες
								(%) ιλύς: 27	

Πίνακας 10.2 (συνέχεια) Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων νερού και ιζήματος

	ΝΕΡΑ				ΙΖΗΜΑΤΑ				
	Θερμοκρασία (°C)	pH	Αλατότητα (‰)	Αγωγιμότητα (mS/cm)	pH ¹	% CaCO ₃ ²	(%) οργανική ουσία	Μηχ. ανάλυση	Χαρακτηρισμός ⁵
P19	16,1	8,19	27,15	35006				(%) άμμος: 23 (%) άργιλος: 20 (%) ιλύς: 57	αμμοπηλώδες
P20	16,3	8,21	26,57	34477		1,6	0	(%) άμμος: 100 (%) άργιλος: 0 (%) ιλύς: 0	αμμώδες
P21	18,2	8,29	26,81	36289				μη διαθέσιμο δείγμα	
P22	9,4		31,00	32300				(%) άμμος: 100	
P23	9,4		31,00	32180	8,6	1,2	0	(%) άργιλος: 0 (%) ιλύς: 0	αμμώδες
P24	9,4		31,00	32100				μη διαθέσιμο δείγμα	
P25	9,0		32,00	32200				μη διαθέσιμο δείγμα	
P26	9,0		32,00	32000				μη διαθέσιμο δείγμα	
P27	9,0		32,00	32150	8,9	1,0	0	(%) άμμος: 100 (%) άργιλος: 0 (%) ιλύς: 0	αμμώδες

¹Προσδιορισμός pH: Αιώρημα εδάφους—νερού: 1:2,5

²Προσδιορισμός CaCO₃: Ασβεστόμετρο Bernard

³Οργανική ουσία: Μέθοδος υγρής καύσης κατά Walkley-Black

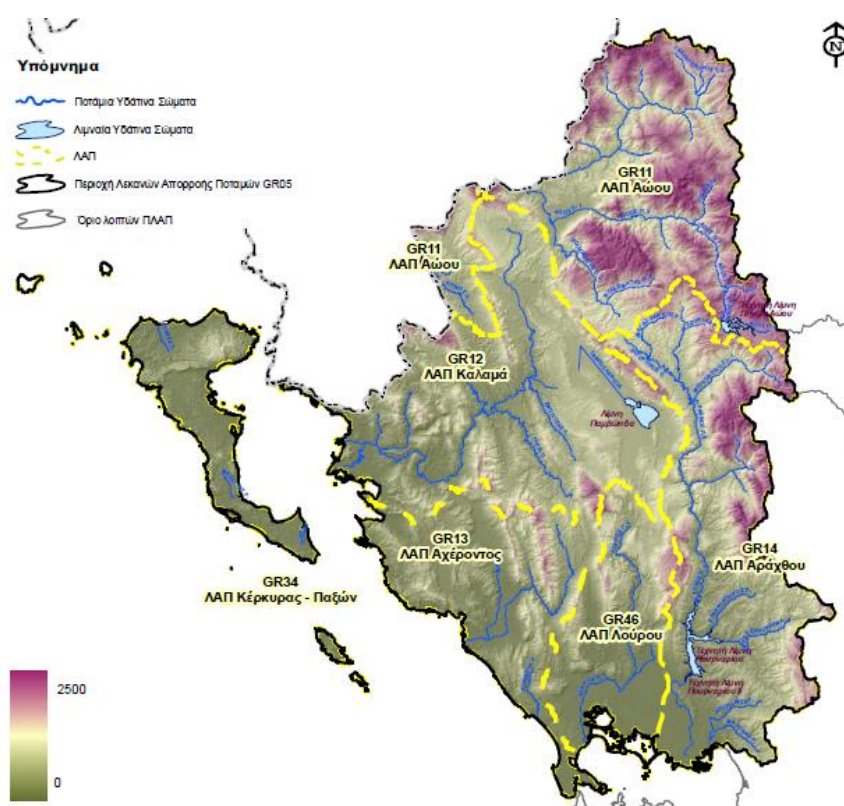
⁴Μηχανική ανάλυση με τη μέθοδο Bouyoucos

⁵Χαρακτηρισμός ιζήματος κατά Folk

10.1.1 Ελλάδα: Υδατικό διαμέρισμα Ηπείρου

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν στην Ελλάδα προέρχονται από αντιπροσωπευτικά σημεία στο υδατικό διαμέρισμα (ΥΔ) Ηπείρου, με κριτήρια τις εν δυνάμει πηγές ρύπανσης από ανθρώπινες δραστηριότητες με έμφαση στη λειτουργία ιχθυοκαλλιεργειών.

Το ΥΔ Ηπείρου έχει έκταση 9980 km² και είναι από τα πιο ορεινά διαμερίσματα της χώρας, δεδομένου ότι οι ορεινές περιοχές του καλύπτουν το 70% της συνολικής έκτασης, ενώ οι πεδινές μόνο το 15%. Τα όριά του ορίζονται νότια από τον Αμβρακικό κόλπο, ανατολικά από τους ορεινούς όγκους Βάλτου, Αθαμανικών, οροσειράς βόρειας Πίνδου, Βόιου και Γράμμου, βόρεια από τα ελληνοαλβανικά σύνορα και δυτικά από το Ιόνιο Πέλαγος (Σχήμα 10.2). Το μεγαλύτερο ποσοστό των πεδινών περιοχών του ΥΔ αντιστοιχεί στις πεδιάδες της Άρτας και της Πρέβεζας, των οποίων οι καλλιεργούμενες εκτάσεις υπολογίζονται στα 200000 m² και τις καθιστούν το μεγαλύτερο γεωργικό οικοσύστημα της Ηπείρου. Το μέσο ετήσιο ύψος βροχής κυμαίνεται από 1000 μέχρι 1200 mm στα παράλια ενώ φτάνει μέχρι 2000 mm στα ορεινά τμήματα, με μέσο όρο βροχής ανά έτος τις 70–120 ημέρες. Ο πληθυσμός του με βάση τα απογραφικά στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ για το 2011 ήταν 454928 κάτοικοι.



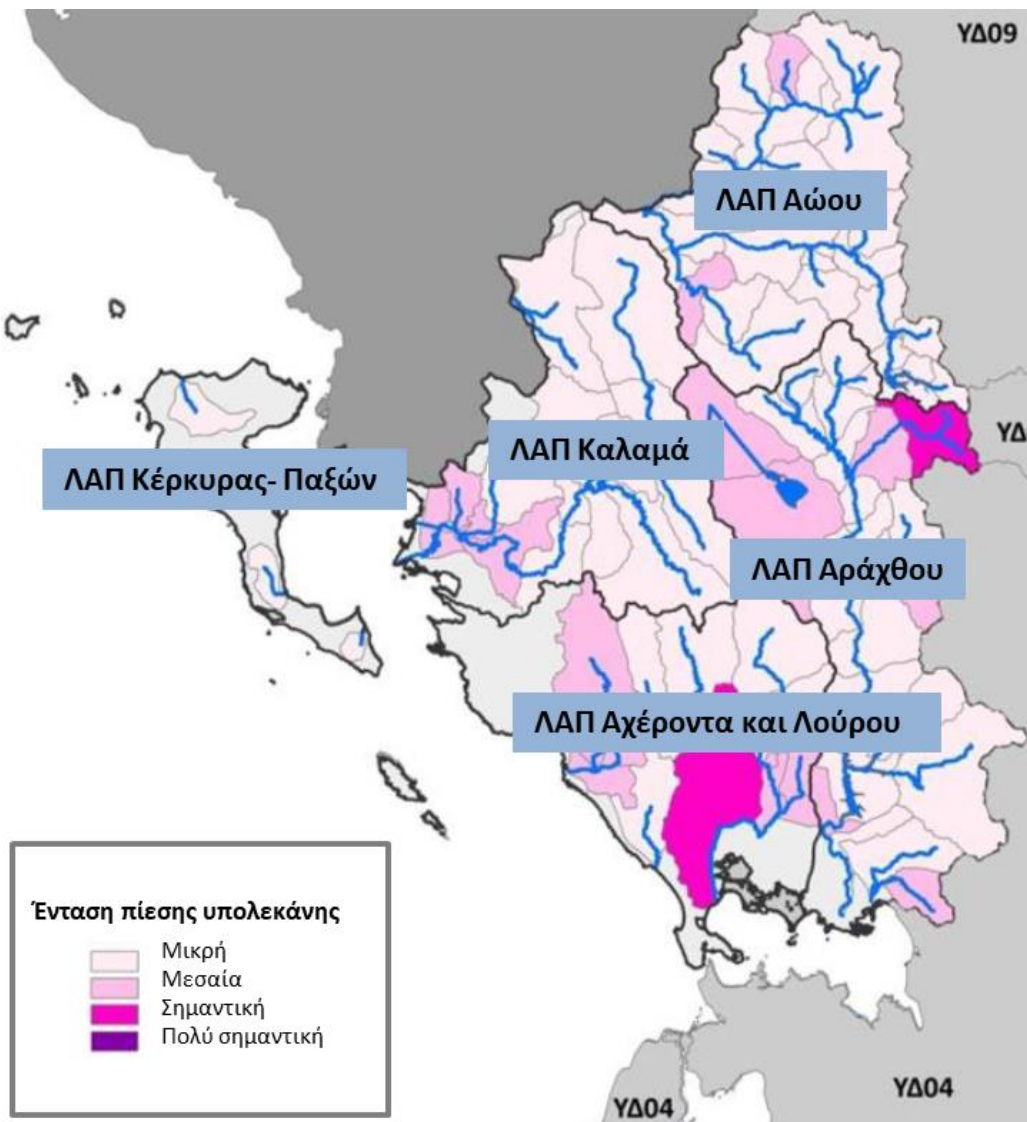
Σχήμα 10.2 Μορφολογικός χάρτης του Υδατικού Διαμερίσματος Ηπείρου [248]

Σε όλο το ΥΔ Ηπείρου λειτουργούν 14 ΜΕΥΑ που εξυπηρετούν περίπου το 78% του πληθυσμού της (ισοδύναμος πληθυσμός περίπου 300000 κάτοικοι). Αποδέκτης της ΜΕΥΑ των Ιωαννίνων, που είναι η μεγαλύτερη, είναι η λεκάνη απορροής (ΛΑΠ) Καλαμά, ενώ της ΜΕΥΑ της Ηγουμενίτσας είναι τα παράκτια ύδατα εντός της ΛΑΠ Αχέροντα και Λούρου. Η παραγόμενη σε αυτές τις ΜΕΥΑ ύλη διατίθεται σε ΧΥΤΑ ή σε χωματερές όταν η περιοχή δεν εξυπηρετείται από υγειονομική ταφή. Οι ΜΕΥΑ των Ιωαννίνων, της Άρτας αλλά και της Κέρκυρας αποτελούν τη μεγαλύτερη πίεση για τα υδάτινα συστήματα της ευρύτερης περιοχής, καθώς εκβάλλουν στις ΛΑΠ Αράχθου και Καλαμά.

Οι βιομηχανίες είναι εξαρτώμενες από τον πρωτογενή τομέα και στην πλειονότητά τους είναι μονάδες συσκευασίας–μεταποίησης αγροτικών προϊόντων. Η πλειοψηφία των μονάδων του δευτερογενή τομέα είναι μικρές και απευθύνονται κατά κύριο λόγο στις τοπικές αγορές της περιφέρειας. Στην περιοχή μελέτης λειτουργούν τρεις θεσμοθετημένες βιομηχανικές περιοχές (ΒΙΠΕ) με περιορισμένο αριθμό επιχειρήσεων. Οι περισσότερες από τις βιομηχανίες συγκεντρώνονται στις ΛΑΠ Αράχθου και Λούρου, με κύρια δραστηριότητα την παραγωγή τροφίμων και ποτών.

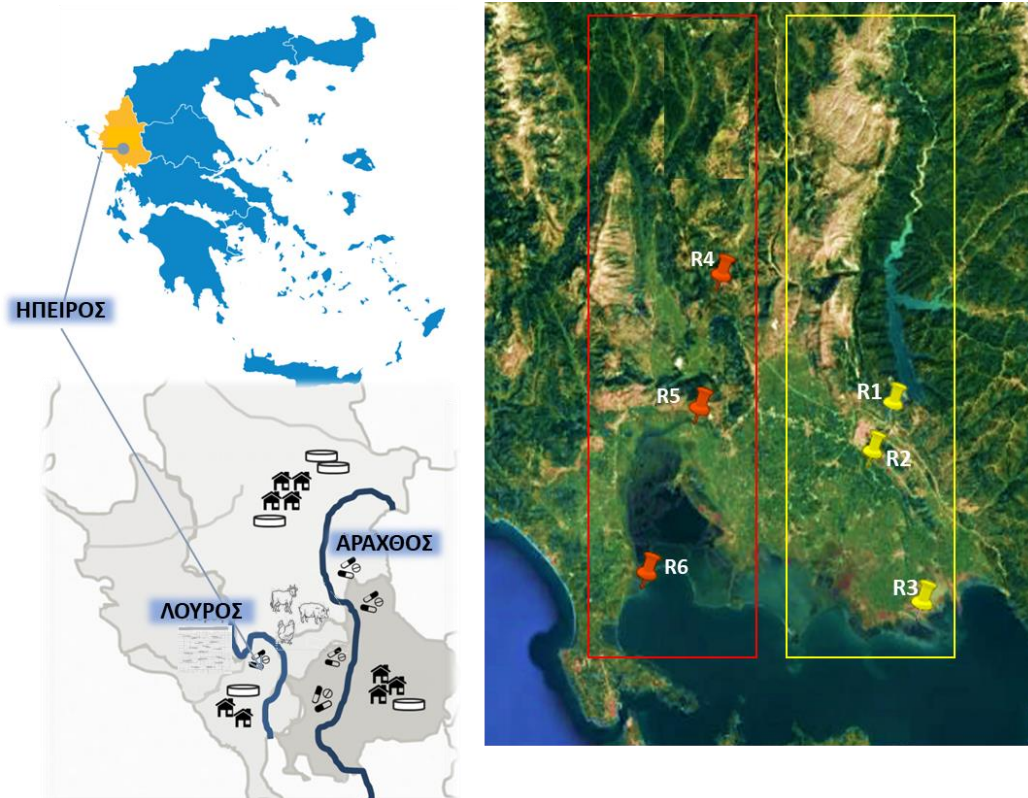
Επίσης, στο ΥΔ Ηπείρου συγκεντρώνονται 151 οργανωμένες κτηνοτροφικές μονάδες, κυρίως εκτροφής πουλερικών, ενώ λειτουργούν αρκετές μονάδες εκτροφής χοίρων και κατά περίπτωση βοοειδών. Οι περισσότερες από τις μονάδες (75%) συγκεντρώνονται στις ΛΑΠ Λούρου και Αράχθου και ακολουθεί η ΛΑΠ Καλαμά (23%). Ωστόσο, η ελεύθερη και χωρίς περιορισμούς βόσκηση των ζώων αποτελεί σημαντική διάχυτη πηγή ρύπανσης, καθώς το οργανικό φορτίο των λυμάτων των ζώων διασκορπίζεται και χωρίς επεξεργασία καταλήγει στα ύδατα της περιοχής, αυξάνοντας τις τιμές BOD (βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο). Υπολογίζεται ότι η συνεισφορά της κτηνοτροφίας (κυρίως εκτατικής μορφής) στην αύξηση του BOD στα επιφανειακά ύδατα του Αράχθου και του Λούρου ξεπερνά το 90% [249].

Στο ΥΔ Ηπείρου απαντάται σημαντικός αριθμός ιχθυοκαλλιεργειών, που συνολικά αποτελούν το 8,9% της εθνικής παραγωγής. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία σε όλο το ΥΔ είναι εγκατεστημένες 44 μονάδες αλμυρού και περίπου 60 μονάδες γλυκού νερού. Περίπου το 70% των μονάδων αλμυρού νερού απαντάται στο νομό Θεσπρωτίας (ΛΑΠ Καλαμά) και το 70% των μονάδων γλυκού νερού απαντάται στο Νομό Ιωαννίνων. Παρατηρείται υπερσυγκέντρωση των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας γλυκού νερού στον ποταμό Λούρο (περιοχή Βουλιάστας-Μουσιωτίτσας) και αναφέρεται ότι οι ανεξέλεγκτες ανθρώπινες επεμβάσεις στις όχθες και στον ρου του ποταμού έχουν αποτέλεσμα την εμφάνιση πλημμυρικών φαινομένων και την απειλή βιωσιμότητας των επιχειρήσεων και των ιδιοκτησιών. Οι διάχυτες πηγές ρύπανσης στο ΥΔ Ηπείρου σημειώνονται στο Σχήμα 10.3.



Σχήμα 10.3 Ένταση πίεσης από διάχυτες πηγές ρύπανσης στο ΥΔ Ηπείρου [249]

Δύο πολύ σημαντικοί ποταμοί που ανήκουν στο ΥΔ της Ηπείρου, είναι οι Άραχθος και Λούρος, με τις αντίστοιχες λεκάνες απορροής τους. Οι δύο ποταμοί καταλήγουν στον Αμβρακικό Κόλπο, με τις εκβολές τους να αποτελούν μεταβατικά ύδατα [249]. Εξίσου σημαντική είναι η παράκτια ζώνη της Λωρίδας Σαγιάδας, που ανήκει στη ΛΑΠ Καλαμά, στο παράκτιο σώμα «βόρειο τμήμα ανατολικών ακτών της κερκυραϊκής Θάλασσας». Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκαν στο ΥΔ Ηπείρου τρία σημεία στον ποταμό Άραχθο, τρία σημεία στον ποταμό Λούρο, και τρία σημεία στην παράκτια ζώνη της Θεσπρωτίας, σε καθοριστικά σημεία της εκάστοτε λεκάνης απορροής. Στο Σχήμα 10.4 σημειώνονται στο χάρτη τα σημεία δειγματοληψίας και στους δύο ποταμούς, ενώ αποδίδονται σχηματικά και οι εν δυνάμει πηγές ρύπανσης στην περιοχή.



Σχήμα 10.4 Σημεία δειγματοληψίας κατά μήκος των ποταμών Λούρου και Αράχθου και απεικόνιση πηγών ρύπανσης στην περιοχή (κόκκινη επισήμανση: ΛΑΠ Λούρου, Κίτρινη επισήμανση: ΛΑΠ Αράχθου)

10.1.1.1 Ο ποταμός Άραχθος και η λεκάνη απορροής του

Ο ποταμός Άραχθος είναι ο μεγαλύτερος ποταμός της Ηπείρου και ο όγδοος μεγαλύτερος ποταμός της Ελλάδας. Πηγάζει από τη Βόρεια Πίνδο, σε υψόμετρο 1700 m και η κοίτη του διαμορφώνεται με προσανατολισμό από βορρά προς νότο εκβάλλοντας τελικά στα βόρεια παράλια του Αμβρακικού κόλπου. Η ΛΑΠ Αράχθου έχει έκταση 2209 km² και περιλαμβάνει 26 ποτάμια και 3 λιμναία υδάτινα σώματα. Η κύρια κοίτη του φτάνει το μήκος των 128 km. Από τη λεκάνη απορροής του, 35000 στρέμματα αντιστοιχούν σε καλλιέργειες στην πεδιάδα της Άρτας που έχουν αποδέκτη τον ίδιο.

Ο ποταμός κινείται μέσω αδιαπέραστων σχηματισμών, γεγονός που δημιουργεί μεγάλες διακυμάνσεις στην παροχή του. Ανάντη της γέφυρας Άρτας, η συνολική έκταση της υδρολογικής λεκάνης Αράχθου είναι περίπου 2000 Km² και η μέση ετήσια απορροή περίπου 66 m³ s⁻¹. Όμως το φράγμα Πουρναρίου, με ρύθμιση ανάντη, μεταβάλλει σημαντικά το υδατικό καθεστώς του ποταμού κατάντη. Η συνολική μέση ετήσια ροή ανέρχεται στα 1686×10⁶ m³. Η ζήτηση νερού για άρδευση αντιστοιχεί σε μέση ετήσια ροή 117×10⁶ m³, ενώ η ζήτηση για πόσιμο νερό (ύδρευση και τουρισμός) στα 8 ×10⁶ m³ [248, 249]. Σε απόσταση 4

km νότια της πόλης της Άρτας εκβάλλουν στον Άραχθο τα λύματα του βιολογικού καθαρισμού της πόλης της Άρτας. Μεταξύ του φράγματος Πουρναρίου και της γέφυρας Άρτας λαμβάνει χώρα μια υπόγειος ροή με την οποία γίνεται εμπλουτισμός των υπόγειων υδροφόρων στρωμάτων της πεδιάδας.

Η λιμνοθάλασσα Ροδιά που σχηματίζεται στις εκβολές του Αράχθου αποτελεί προστατευόμενη περιοχή υδρόβιων ειδών οικονομικής σημασίας¹. Επιπλέον, στη ΛΑΠ Αράχθου περιλαμβάνονται 11 υδάτινα σώματα που χαρακτηρίζονται ως «ευαίσθητοι αποδέκτες» σε αστικά λύματα σύμφωνα με την οδηγία 91/271/ΕΟΚ [102] ενώ λειτουργεί μια βιομηχανική εγκατάσταση υπαγόμενη στην Οδηγία για τον Ολοκληρωμένο Έλεγχο και Πρόληψη της Ρύπανσης (IPPC), η οποία προβλέπει στην ελαχιστοποίηση των παραγόμενων από τις δραστηριότητες ρύπων με σκοπό το υψηλό επίπεδο προστασίας του περιβάλλοντος στο σύνολό του.

10.1.1.2 Ο ποταμός Λούρος και η λεκάνη απορροής του

Ο ποταμός Λούρος πηγάζει από το όρος Τόμαρος του νομού Ιωαννίνων, έχει μήκος 73 km και εκβάλλει στον Αμβρακικό κόλπο στο νομό Πρέβεζας. Η λεκάνη απορροής του Λούρου έχει έκταση 964 km² και περιλαμβάνει έξι ποτάμια υδάτινα σώματα με έχει μέσο μήκος 84,6 km. Αξιοσημείωτα έργα στη ΛΑΠ Λούρου είναι το υδροηλεκτρικό φράγμα στην περιοχή Αγίου Γεωργίου και τα αρδευτικά έργα στις περιοχές Κερασώνας, Παντάνασσα, Φιλιπιάδα, Καμπή και Λάμαρη. Τα αρδευτικά αυτά έργα μειώνουν σημαντικά την παροχή του ποταμού κατά την αρδευτική περίοδο. Επίσης στο Λούρο προστίθεται η αποστραγγιστική τάφρος της Βόσσας. Στις εκβολές του ποταμού σχηματίζεται δέλτα λοβοειδούς μορφής, με έκταση 150 km², το οποίο αποτελεί σύμπλεγμα πολλών υγροτόπων. Το δέλτα είναι περιορισμένης έκτασης λόγω της σχετικά μικρής προσχωματικής του ικανότητας. Η μέση ετήσια ταχύτητα ροής είναι περίπου 10,6 m³ s⁻¹ και κυμαίνεται μεταξύ 5 m³ s⁻¹ κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και 20 m³ s⁻¹ κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Η ζήτηση νερού για άρδευση αντιστοιχεί σε μέση ετήσια ροή 115×10⁶ m³, ενώ η ζήτηση για πόσιμο νερό στα 8 ×10⁶ m³ [248, 249]. Στη ΛΑΠ Λούρου, υπάρχουν δύο προστατευόμενες περιοχές υδρόβιων ειδών οικονομικής σημασίας. Η μια αφορά τμήμα του ποταμού Λούρου μήκους 32 km

¹ Προστατευόμενες περιοχές βάσει της Οδηγίας 2000/60/ΕΚ ορίζονται: (α) περιοχές που προορίζονται για την άντληση - απόληψη νερού για ανθρώπινη κατανάλωση, (β) περιοχές που προορίζονται για την προστασία υδρόβιων ειδών με οικονομική σημασία, (γ) υδάτινα σώματα που έχουν χαρακτηριστεί ως ύδατα αναψυχής, συμπεριλαμβανομένων περιοχών που έχουν χαρακτηριστεί ως ύδατα κολύμβησης, (δ) περιοχές ευαίσθητες στην παρουσία θρεπτικών ουσιών και (ε) περιοχές που προορίζονται για την προστασία οικοτόπων ή ειδών όταν η διατήρηση ή η βελτίωση της κατάστασης των υδάτων είναι σημαντική για την προστασία τους.

περίπου, με αφετηρία τις πηγές του και οι άλλοι, στις εκβολές του, τις Λιμνοθάλασσες Ροδιά, Τσουκαλιό, και Λογαρού. Στη ΛΑΠ Λούρου λειτουργεί μια βιομηχανική μονάδα που έχει υπαχθεί στην οδηγία IPCC. Κατά μήκος του ποταμού Λούρου, εκτός από γεωργική δραστηριότητα παρατηρείται και εντατική δραστηριότητα ιχθυοκαλλιέργειών γλυκού νερού, γεγονός που εξηγεί το χαρακτηρισμό του ως ο «πεστρότροφος» ποταμός της χώρας. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία του IOBE (Ίδρυμα Οικονομικών και Βιομηχανικών Ερευνών), στη χώρα μας λειτουργούν 129 καλλιέργειες ειδών γλυκού νερού (πέστροφα, χέλια, κυπρίνος, σολομός κ.ά.) και ο Λούρος χρησιμοποιείται για την υδροδότηση 22 εξ'αυτών, με την πλειοψηφία τους να δραστηριοποιείται σε περιοχές που ανήκουν στην περιφερειακή ενότητα των Ιωαννίνων [250]. Η παραγωγή πέστροφας στις μονάδες των Ιωαννίνων κυμαίνεται γύρω στους 2000 τόνους τον χρόνο, καταλαμβάνοντας το 85–90% της συνολικής παραγωγής στη χώρα.

10.1.1.3 Η Λωρίδα Σαγιάδας

Η παράκτια ζώνη της Ηπείρου ανήκει στη ΛΑΠ Καλαμά και αποτελεί προστατευόμενη περιοχή υδρόβιων ειδών οικονομικής σημασίας. Η Λωρίδα Σαγιάδας είναι τμήμα του παράκτιου σώματος «Βόρειο Τμήμα Ανατολικών Ακτών της Κερκυραϊκής Θάλασσας» που ανήκει στη ΛΑΠ του Καλαμά. Στην περιοχή παρατηρείται υπερσυγκέντρωση μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας αλμυρού νερού (55% επί του συνόλου των ιχθυοκαλλιεργειών σε όλο το ΥΔ Ηπείρου) [249]. Στο νομό Θεσπρωτίας δραστηριοποιούνται συνολικά 28 μονάδες παραγωγής και ένας ιχθυογεννητικός σταθμός, με 22 από αυτές να βρίσκονται στην περιοχή Λωρίδα Σαγιάδας και τις υπόλοιπες στα όρια του Δήμου Ηγουμενίτσας (Σχήμα 10.5) σε περιοχές οι οποίες χαρακτηρίζονται από το Χωροταξικό σχέδιο ως «Ζώνες Ιχθυοκαλλιέργειας». Αξίζει να σημειωθεί ότι η μόνο η παράκτια ζώνη της Θεσπρωτίας παράγει περίπου το 15% της ετήσιας ελληνικής παραγωγής, ενώ τεράστια ποσότητα ιχθυών εξάγεται ετησίως στο εξωτερικό. Οι κλιματικές συνθήκες της περιοχής, η σχετικά υψηλή θερμοκρασία του νερού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και η απουσία έντονων καιρικών φαινομένων καθιστούν το περιβάλλον ιδανικό για την ανάπτυξη του κλάδου. Η ετήσια ιχθυοπαραγωγή αγγίζει τους 12000 τόνους ετησίως με κύρια εκτρεφόμενα είδη την τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), το φαγκρί (*Pagrus pagrus*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), τη συναγρίδα (*Dentex Dentex*) κ. ά.

Η ΛΑΠ που συνδέεται με τη λιμνοθάλασσα έχει έκταση 128 km² και αποστραγγίζει κυρίως τα ύδατα από τη λίμνη Rreza που βρίσκεται νότια και τα αρδευτικά δίκτυα των πεδιάδων Vurgu και Vrina. Εκτιμάται ότι τα νερά από τις παραπάνω πηγές διατίθενται στη λιμνοθάλασσα με ροή 10 m³ s⁻¹ [251]. Η λιμνοθάλασσα χάνει νερό κυρίως εξαιτίας της εξάτμισης, η οποία υπολογίζεται σε 1280 mm ανά έτος, ενώ η στάθμη του νερού είναι περίπου 9 εκατοστά υψηλότερα από τη στάθμη της θάλασσας. Το νότιο τμήμα της λίμνης βρίσκεται εντός των ορίων του Εθνικού Πάρκου Βουθρωτού και έχει αναγνωριστεί ως υγρότοπος διεθνούς σημασίας με χαρακτηρισμό βάσει της Σύμβασης Ramsar. Τα τελευταία 300 χρόνια τουλάχιστον, η λιμνοθάλασσα παρουσιάζει ανοξικές συνθήκες, οι οποίες είναι εντονότερες από το 1930 και έπειτα λόγω της εντατικοποίησης της ανθρώπινης παρέμβασης. Έρευνες στην περιοχή τα έτη 2003, 2004, και 2012 κατέδειξαν ότι η διεργασία της ιζηματοποίησης στα βαθύτερα στρώματα της λιμνοθάλασσας δεν έχει μεταβληθεί επαληθεύοντας τις ανοξικές συνθήκες ακόμα και στον πυθμένα της λιμνοθάλασσας (βάθος 8 m).

Η εκτροφή μυδιών ήταν εκτεταμένη στην Αλβανία από το 1960, με τη λιμνοθάλασσα του Βουθρωτού να κατέχει με διαφορά τη σημαντικότερη θέση μεταξύ των τοποθεσιών όπου υπήρχαν μονάδες εκτροφής. Η μέση ετήσια παραγωγή κυμαίνεται από 2000 έως 5000 τόνους. Από το 1994, οπότε και επανεμφανίστηκε χολέρα στη χώρα, η ΕΕ επέβαλε την απαγόρευση κάθε είδους ιχθυρών από την Αλβανία, με αποτέλεσμα ο κλάδος της εκτροφής μυδιών στη χώρα να καταρρεύσει. Σήμερα, η εκτροφή λαμβάνει χώρα, με αυξανόμενο ρυθμό, ωστόσο η απαγόρευση εξακολουθεί να ισχύει.

10.1.2.2 Ιταλία: Λιμνοθάλασσα Sacca di Goro και Θάλασσα Λιγυρίας

Στην Ιταλία επιλέχθηκαν δύο διαφορετικά θαλάσσια συστήματα για τη συλλογή δειγμάτων. Από αυτά, το ένα βρίσκεται στη Βόρεια Αδριατική Θάλασσα και αποτελεί περιοχή με έντονη δραστηριότητα καλλιέργειας οστρακοειδών, ενώ το άλλο βρίσκεται στη Θάλασσα της Λιγυρίας, στη Βόρεια Τυρρηνική Θάλασσα κοντά σε ιχθυοκαλλιέργειες. Οι δύο επιλεγμένες περιοχές στην Ιταλία φαίνονται στο Σχήμα 10.7.



Σχήμα 10.7 Γεωγραφική θέση σημείων δειγματοληψίας στην Ιταλία

Λιμνοθάλασσα *Sacca di Goro*

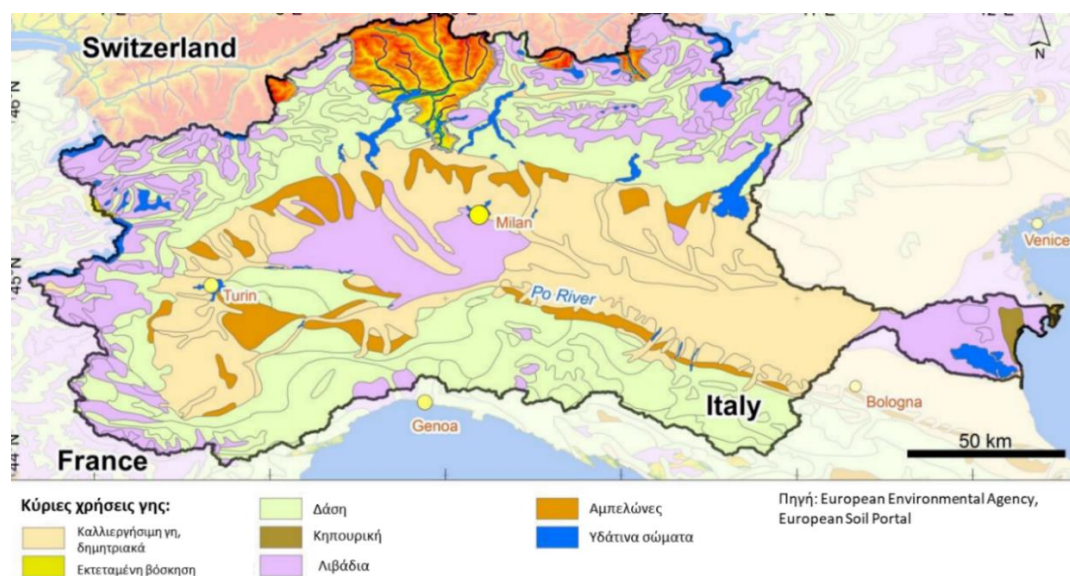
Η λιμνοθάλασσα Sacca di Goro (SG) βρίσκεται στο δέλτα του ποταμού Po (Πάδος) στην επαρχία της. Το δέλτα του ποταμού έχει συνολική επιφάνεια 730 km² και περιλαμβάνει πέντε κύριους βραχίονες και αρκετές παράκτιες λιμνοθάλασσες. Μια από αυτές, είναι η SG, η οποία έχει τριγωνικό σχήμα, επιφάνεια 26 km², μέσο βάθος περίπου 1,5 m, μέγιστο μήκος περίπου 11 km και μέγιστο πλάτος 5 km. Ο όγκος του νερού είναι περίπου 39 x 10⁶ m³ [252]. Η βασική υδροδυναμική της συνδέεται με την παλιρροϊκή δυναμική της Αδριατικής Θάλασσας με την οποία συνδέεται μέσω δύο αμμωδών εκβολών, μήκους περίπου 900 μέτρα η καθεμιά. Τα παλιρροϊκά πλάτη στη SG κυμαίνονται μέχρι 0,9 μέτρα.

Ανάλογα με τη θέση και τη μορφολογία, παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις στη θερμοκρασία και την αλατότητα των υδάτων της λιμνοθάλασσας. Ο πυθμένας της λιμνοθάλασσας είναι επίπεδος και το ίζημα είναι λασπώδες με υψηλή περιεκτικότητα σε αργίλιο, ενώ η αμμώδης λάσπη εμφανίζεται στην ανατολική περιοχή [252]. Το ανατολικό τμήμα του SG είναι προστατευμένο, ρηχό και επηρεάζεται από εισροές γλυκού νερού. Για αυτό, χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή αλατότητα και υψηλότερες θερμοκρασίες. Ο χρόνος κατακράτησης νερού, κατά μέσο όρο, κυμαίνεται μεταξύ 1 και 4 ημερών, αν και σε ορισμένες περιοχές παρατηρείται στασιμότητα νερού [252, 253].

Στην περιοχή υπάρχουν πέντε δήμοι οι οποίοι απαριθμούν περίπου 55000 κατοίκους. Η λιμνοθάλασσα είναι αποδέκτης του αποχετευτικού συστήματος της περιοχής του Goro, μιας εκ των τριών επαρχιών της περιοχής. Επιπλέον, λύματα από άλλες πόλεις της

περιοχής απορρίπτονται στο κανάλι Po di Volano. Το κανάλι Po di Volano–λιμνοθάλασσα Sacca di Goro είναι ένα μικρό υδρογραφικό σύστημα με επιφάνεια 860 km², το οποίο βρίσκεται εν μέρει νότια του δέλτα του ποταμού και αντιπροσωπεύει περίπου το 1% της συνολικής έκτασης της λεκάνης απορροής του ποταμού. Αποστραγγίζει ένα μεγάλο τμήμα της βόρειας Ιταλίας με επιφάνεια 67000 km² και πληθυσμό περίπου 17 εκατομμύρια κατοίκους.

Στη δεκαετία του '80, τα ετήσια φορτία που απορρίφθηκαν στον ποταμό κυμαίνονταν μεταξύ 82000-188000 τόνων ολικού αζώτου και 9000-23000 τόνων ολικού φωσφόρου, αντίστοιχα [254]. Το 1991, πως το συνολικό ρυπαντικό φορτίο αντιστοιχούσε σε ισοδύναμο πληθυσμού 59,5 εκατομμυρίων κατοίκων. Από αυτά, το 69% προήλθε από τη χημική βιομηχανία και βιομηχανία τροφίμων, 26% από ανθρώπινη δραστηριότητα και 5% από τη γεωργία [255]. Η κύρια οικονομική δραστηριότητα στο χερσαίο τμήμα της λεκάνης είναι η γεωργία. Περισσότερα από τα τρία τέταρτα της χερσαίας επιφάνειας της περιοχής είναι εκμεταλλεύσιμα από τη γεωργία (82% της συνολικής επιφάνειας). Η γεωργία στην περιοχή είναι κυρίως εντατική, εστιάζοντας στην καλλιέργεια αραβοσίτου, ζαχαρότευτλων, σόγιας, ρυζιού, οπωροφόρων δέντρων και λαχανικών που απαιτούν φυτοφάρμακα και οργανικά λιπάσματα με πιθανές επιπτώσεις στην ποιότητα του νερού [252]. Η μόνιμη υπερχειλίση κρατά τα φυτοφάρμακα και τα λιπάσματα εν διαλύσει και αυξάνει τον κίνδυνο ρύπανσης της λιμνοθάλασσας. Το 2014, στην επαρχία Ferrara διατέθηκαν συνολικά 4395875 kg φυτοφαρμάκων, μεταξύ των οποίων 243207 ήταν πολύ επικίνδυνα χημικά, 1464788 επικίνδυνα χημικά και 2687880 άγνωστου κινδύνου [256]. Στο Σχήμα 10.8 φαίνονται οι κύριες χρήσεις γης στην ευρύτερη περιοχή.



Σχήμα 10.8 Κύριες χρήσεις γης στη λεκάνη απορροής του ποταμού Po

Άλλες σημαντικές δραστηριότητες στην περιοχή είναι η κτηνοτροφία, η βιομηχανία τροφίμων, η αλιεία, το εμπόριο και ο τουρισμός. Επίσης, στην περιοχή της λιμνοθάλασσας υπάρχουν δύο μικρά λιμάνια που χρησιμοποιούνται από αλιευτικά σκάφη και βοηθητικά σκάφη των υδατοκαλλιιεργειών.

Στη λιμνοθάλασσα, κύρια δραστηριότητα είναι η υδατοκαλλιέργεια. Τα κύρια είδη που εκτρέφονται στις υδατοκαλλιέργειες της περιοχής είναι το κυδώνι της Ιαπωνίας (*Venerupis philippinarum*, με ετήσια παραγωγή που φθάνει περίπου 15.000 τόνους, το μεσογειακό μύδι (*Mytilus galloprovincialis*) με ετήσια παραγωγή 1500-2000 τόνους και το στρείδι Πορτογαλίας (*Crassostrea gigas*) [252]. Τα τελευταία χρόνια μέρος αυτής της δραστηριότητας έχει μεταφερθεί σε περιοχές εκτός της λιμνοθάλασσας, λόγω θανάτων μυδιών από τις υψηλές θερμοκρασίες κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και της επεισοδιακής ανοξίας. Η λεκάνη απορροής του Ρο είναι βαριά εκμετάλλευση για τη γεωργία και τη βιομηχανία, με διάφορες επικίνδυνες δραστηριότητες που απελευθερώνουν φυτοφάρμακα και άλλους επίμονους οργανικούς ρύπους στα υδάτινα συστήματα [252]. Το ανατολικό τμήμα του του Sacca di Goro αποτελεί τμήμα του Περιφερειακού Φυσικού Πάρκου του δέλτα του ποταμού Ρο και θεωρείται περιοχή με μεγάλη ποικιλία διαφορετικών οικοτόπων και βιοτόπων εθνικού και διεθνούς ενδιαφέροντος. Η λιμνοθάλασσα και οι μικρές εσωτερικές ζώνες περιλαμβάνονται επίσης στους «τόπων κοινοτικού ενδιαφέροντος της ΕΕ» της ΕΕ και στη «ζώνη ειδικής προστασίας» σύμφωνα με τις οδηγίες 92/43/ΕΟΚ [257] και 2006/105 [258] αντίστοιχα.

Θάλασσα της Λιγυρίας

Η Λιγυρία είναι μια βαθιά λεκάνη στο βορειότερο τμήμα της δυτικής Μεσογείου (Βόρεια Τυρρηνική Θάλασσα) που παρουσιάζει ιδιόμορφα υδροδυναμικά, μετεωρολογικά και ωκεανογραφικά χαρακτηριστικά. Η ακτή της Λιγυρίας έχει ιδιαίτερες φυσικές και κοινωνικοοικονομικές συνθήκες, καθώς αποτελεί ταυτόχρονα στρατηγικό σταυροδρόμι για το λιμάνι και την εμπορική κίνηση, σημείο ενδιαφέροντος για τη βιοποικιλότητα, διεθνές τουριστικό αξιοθέατο και την κατοικία σχεδόν ολόκληρου του περιφερειακού πληθυσμού.

Η θερμοκρασία του θαλασσινού νερού ακολουθεί τις εποχιακές μορφές εύκρατων ζωνών: περίπου 12-13 °C το χειμώνα και 25 °C το καλοκαίρι, με σημαντική αύξηση της μέσης μηνιαίας θερμοκρασίας των παράκτιων υδάτων την τελευταία δεκαετία [259]. Η διαφάνεια του νερού κυμαίνεται από 10 έως 25 μέτρα στη θαλάσσια παράκτια ζώνη, αν και συχνά υπάρχει εμφανίζεται θολερότητα εξαιτίας της κατάληξης ποτάμιων υδάτων στην περιοχή.

Το παράκτιο οικοσύστημα της Λιγυρίας είναι ετερογενές, σωστά δομημένο και εμφανίζει σημαντική βιοποικιλότητα, με βασικούς ρόλους στις οικοσυστημικές διεργασίες. Αυτό δικαιολογεί τον υψηλό αριθμό των τόπων κοινοτικού ενδιαφέροντος και των προστατευόμενων θαλάσσιων περιοχών οι οποίοι έχουν καθιερωθεί από την ΕΕ.

Οι ακτές της Λιγυρίας είναι από τις πλέον αστικοποιημένες και βιομηχανοποιημένες κατά μήκος των ιταλικών ακτών. Οι κύριες αιτίες των διαταραχών είναι η αστική ανάπτυξη και οι λιμενικές δραστηριότητες, η κατασκευή των παράκτιων σιδηροδρομικών δικτύων και αυτοκινητοδρόμων και οι συχνές απορρίψεις. Κατά μήκος της ακτής υπάρχουν τρία σημαντικά εμπορικά λιμάνια και 36 μαρίνες. Ο ισχυρός τουριστικός και παραθαλάσσιος προορισμός της περιοχής αυξάνει την πυκνότητα του πληθυσμού κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και προκαλεί τη δημιουργία μικρών αλιευτικών λιμένων για την ανάπτυξη εγκαταστάσεων για σκάφη αναψυχής που κάνουν τη ναυσιπλοΐα μια από τις κύριες δραστηριότητες αναψυχής [260].

Η περιοχή δειγματοληψίας βρίσκεται σε ιχθυοκαλλιέργεια στη Θάλασσα της Λιγυρίας (Βόρεια Τυρρηνική Θάλασσα) και προστατεύεται από συμφωνία τήρησης του απορρήτου. Παρομοίως, δεν παρέχονται πληροφορίες για το μέρος, αλλά μόνο για τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες και την ανθρωπογενή δραστηριότητα.

Η εν λόγω ιχθυοτροφική μονάδα είναι μια υπεράκτια καλλιέργεια που βρίσκεται σε απόσταση περίπου 1,5 χιλιομέτρου από την ακτογραμμή, αποτελείται από αρκετά μεγάλους κλωβούς (συνολικής επιφάνειας 26000 m²) με σχετικά χαμηλή πυκνότητα ψαριών (<15 kg/m²). Τα κύρια εκτρεφόμενα είδη είναι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*, *Linnaeus*). Το βάθος της θάλασσας στην περιοχή είναι περίπου 30-40 μέτρα. Δεν χρησιμοποιείται επεξεργασία νερού και τα ψάρια τροφοδοτούνται χωρίς αυξητικά πρόσθετα. Λόγω της χαμηλής πυκνότητας των ψαριών, των συχνών κτηνιατρικών ελέγχων και της βέλτιστης θέσης της μονάδας, δε χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά. Οι κλωβοί είναι κατασκευασμένοι από HDPE, δεν υφίστανται επεξεργασία με αντιρρυπαντικά προϊόντα, ενώ δεν υπάρχει αποχέτευση κοντά στο αγρόκτημα.

Στην πλησιέστερη ακτογραμμή υπάρχουν δύο μικρά αστικά κέντρα (συνολικά περίπου 40000 κάτοικοι). Επιπλέον, σε απόσταση περίπου τριών χιλιομέτρων από τους κλωβούς, υπάρχει ρεύμα που καταλήγει στη θάλασσα, το οποίο αποστραγγίζει περίπου 370 km² εδάφους, όπου καταλήγουν τα λύματα από 80 περίπου μικρά χωριά (<1000 κάτοικοι ανά χωριό). Περίπου το 73% της επικείμενης χερσαίας περιοχής καλύπτεται από δάση ενώ η υπόλοιπη έκταση χρησιμοποιείται για γεωργία.

10.1.2.3 Ισπανία: Εκβολές ποταμού Ebro

Ο ποταμός Ebro River βρίσκεται στη βορειοανατολική Ισπανία και εκβάλλει στη Μεσόγειο Θάλασσα, μετά από διαδρομή μεγαλύτερη των 900 km, σχηματίζοντας ένα δέλτα τουλάχιστον 20 km μέσα στη θάλασσα [261], που καταλαμβάνει έκταση 330 km² η οποία χωρίζεται σε δυο επιμέρους ζώνες (Baix Ebre and Montsià) με συνολικό πληθυσμό 153091 κατοίκους. Το δέλτα είναι πολύπλοκης δομής την οποία συνθέτουν μεταφερόμενα προσχωσιγενή ιζήματα του ποταμού, τα οποία οδηγούν στο σχηματισμό δυο αβαθών παράκτιων ζωνών, οι οποίες εκτείνονται και στις δύο πλευρές του στομίου του ποταμού [261]. Πρόκειται για έναν από τους σημαντικότερους υγροτόπους στη δυτική Μεσόγειο, ιδιαίτερα για τη διατήρηση ορισμένων ειδών πουλιών.

Η κύρια οικονομική δραστηριότητα στην περιοχή είναι οι γεωργία, με κυρίαρχη την καλλιέργεια ρυζιού (περίπου το 80% της καλλιεργήσιμης γης αποτελείται από ορυζώνες). Ακολουθούν οι υδατοκαλλιέργειες στα αβαθή νερά της περιοχής, στις δυο παράκτιες ζώνες που αναφέρθηκαν παραπάνω [261] που θεωρούνται οι σημαντικότερες στην Ισπανική Μεσόγειο. Στην περιοχή έχουν καταγραφεί 166 μονάδες εκτροφής μυδιών οι οποίες εκτείνονται σε σχεδίες στη διαπαλιρροιακή ζώνη και καλύπτουν συνολικά το 1,8% και 6,5% της συνολικής επιφάνειας των δυο παράκτιων ζωνών [262, 263].

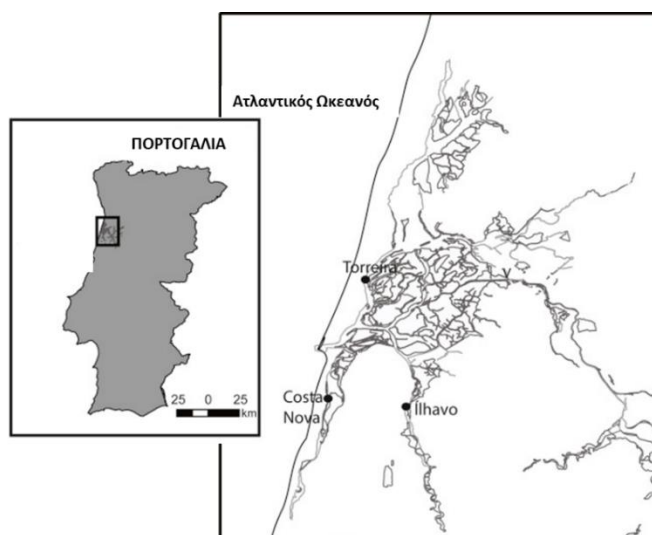
Οι πηγές ρύπανσης στην περιοχή προέρχονται κυρίως από τη γεωργία, με τα φυτοφάρμακα να επιβαρύνουν σημαντικά τα υδάτινα σώματα του δέλτα (λιμνοθάλασσες, παράκτια ύδατα, θαλάσσια ύδατα) [263]. Η εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων όλων των κατηγοριών στην περιοχή αντικατοπτρίζεται σε πλήθος δημοσιευμένων εργασιών [261–266]. Η ενδελεχής μελέτη εργασιών σχετικά με το υδάτινο σύστημα του Ebro καταδεικνύει την αλλαγή στην τάση των χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων από «επίμονα» για το περιβάλλον σε περισσότερο πολικά και διασπώμενα φυτοφάρμακα [267]. Στο Σχήμα 10.9 φαίνονται τα σημεία δειγματοληψίας κατή μήκος της περιοχής Sant Carles de la Rápita.



Σχήμα 10.9 Σημεία δειγματοληψίας στις εκβολές του ποταμού Ebro

10.1.2.4 Πορτογαλία: Λιμνοθάλασσα Aveiro

Η λιμνοθάλασσα Aveiro βρίσκεται στη βορειοδυτική Πορτογαλία, παρακείμενη στον Ατλαντικό Ωκεανό και διαθέτει ένα μεγάλο εσωτερικό κόλπο (κόλπος Laranjo) (Σχήμα 10.10). Το μήκος της είναι 45 km, το πλάτος 10 km και η επιφάνειά της 83 km² κατά την εαρινή παλίρροια, ενώ μειώνεται στα 66 km² κατά την άμπωτη. Το εκτιμώμενο παλιρροιακό πρίσμα της λιμνοθάλασσας είναι 136,7 ×10⁶ m³ για τη μέγιστη παλίρροια και 34,9 10⁶ m³ για την ελάχιστη παλίρροια. Η συνολική μέση απορροή των ποταμών που εκβάλλουν στη λιμνοθάλασσα κατά τη διάρκεια ενός παλιρροιακού κύκλου είναι μικρή (περίπου 1,8 10⁶ m³). Συνδέεται και λαμβάνει θαλασσινό νερό από τον Ατλαντικό Ωκεανό μέσω ενός μικρού τεχνητού καναλιού μήκους 1,3 m και πλάτους 350 m, ενώ είναι αποδέκτης γλυκών νερών πολλών ποταμών και ρευμάτων από διαφορετικές λεκάνες απορροής, ανάλογα με τη συχνότητα και την ένταση των κατακρημνίσεων. Είναι αντιπροσωπευτικό δείγμα αβαθούς οικοσυστήματος, με βάθος που δεν ξεπερνά το 1 m, εκτός από ορισμένα κανάλια βυθοκορήσεων όπου φτάνει τα 7 m. Χαρακτηρίζεται από ένα δίκτυο αλυκών και λασπωδών καναλιών που καταλήγει σε πολύ ακανόνιστη και πολύπλοκη γεωμετρία [268]. Επίσης, η πολύπλοκη υδροδυναμική της λιμνοθάλασσας επηρεάζει τις βιολογικές, χημικές και γεωλογικές διεργασίες σε αυτή [268]. Ο πληθυσμός της λεκάνης απορροής της λιμνοθάλασσας ανέρχεται στους 250000 κατοίκους και το μεγαλύτερο αστικό κέντρο της περιοχής είναι η πόλη Aveiro.



Σχήμα 10.10 Γεωγραφική θέση της λιμνοθάλασσας Aveiro στην Πορτογαλία

Η λιμνοθάλασσα έχει υποφέρει από ανθρωπογενείς πιέσεις, με κυριότερη τη διάθεση σε αυτή αποβλήτων εμπλουτισμένων με υδράργυρο, προερχόμενων από μια βιομηχανία παραγωγής χλωροαλκαλίων, η οποία επιβάρυνε το οικοσύστημα από τη δεκαετία του 1950 έως τα μέσα της δεκαετίας του 1990 και βρίσκεται 15 km μακριά από το Aneiro [269]. Για αυτό και μέχρι σήμερα, η προτεραιότητα του ελέγχου ρύπανσης της περιοχής αφορούσε κυρίως τα μέταλλα και τα μεταλλοειδή [270].

Σήμερα, η περιοχή ανήκει στο δίκτυο Natura 2000². Θεωρείται Ειδική Ζώνη Προστασίας (Special Protection Area, SPA ενώ στην ευρύτερη περιοχή της συγκαταλέγονται «τόποι κοινοτικής σημασίας» (Sites of Community Importance, SCI) και προστατεύεται από την οδηγία 79/109/ΕΟΚ. Αποτελεί σημαντικό βιότοπο για μεγάλο αριθμό πτηνών, δίθυρων, καρκινοειδών και ψαριών.

Στην περιοχή ανθεί ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών, εντατικού, ημι-εντατικού και εκτατικού τύπου, ο οποίος σύμφωνα με επίσημα στοιχεία του FAO, αυξήθηκε πάνω από 10000 τόνους μέσα σε μια εικοσαετία [247]. Παράγονται διάφορα είδη, όπως μύδια, βακαλάος (*Gadus*), τόνος (*Thunnus*), σαρδέλα (*Sardina pilchardus*), σκουμπρί (*Scomber scombrus*) κ.ά.

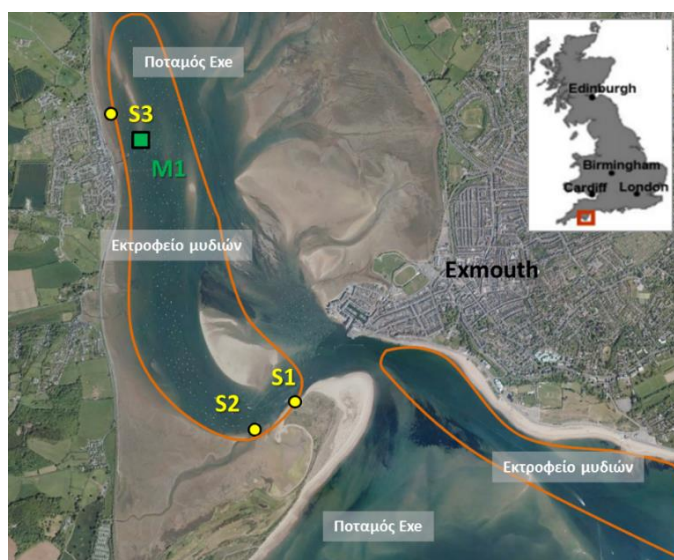
10.1.2.5 Ηνωμένο Βασίλειο: Εκβολές ποταμού Exe

Ο ποταμός Exe βρίσκεται νότια στο Ηνωμένο Βασίλειο, σε απόσταση 8,4 χιλιομέτρων από την ακτή του καναλιού του Bristol. Ρέει προς το νότο, με το μεγαλύτερο μέρος του να βρίσκεται στην περιοχή Devon. Έχει συνολικό μήκος 96 km και οι εκβολές του καταλήγουν στη νότια Αγγλική Μάγχη (ακτή του Devon). Οι εκβολές του αποτελούν σημείο εθνικού και διεθνούς ενδιαφέροντος. Οι εκβολές παρέχουν ενδιαιτήματα όπως λασπώδεις και αμμώδεις προσχωσιγενείς περιοχές, διβάρια μυδιών, καλαμιές, αμμόλοφους, αλυκές και υφάλους που προσελκύουν αριθμό αποδημητικών υδρόβιων πουλιών, τα οποία συχνά λειτουργούν ως βιοδείκτες για την καλή χημική κατάσταση του συστήματος [271].

Η ρύπανση στην περιοχή προέχεται από τη βυθοκόρηση, την αλιεία, τη γεωργία, την παράκτια ανάπτυξη στην οποία συμπεριλαμβάνεται και η κατασκευή θαλάσσιων έργων, την αλιεία και την εκτεταμένη λειτουργία υδατοκαλλιεργειών. Οι εκβολές του Exe είναι περιοχή Ramsar (υγρότοπος διεθνούς ενδιαφέροντος) και επίσης έχει χαρακτηριστεί ως περιοχή SPA. Η θαλάσσια χλωρίδα και οι τεράστιες αποικίες μυδιών, εκτός από σημαντικοί βιότοποι

² Το Δίκτυο NATURA 2000 χωρίζεται σε δύο ζώνες: α) Ειδική Ζώνη Προστασίας της ορνιθοπανίδας (Special Protection Areas - SPA), που αφορά την προστασία των άγριων πτηνών, και β) οι «Τόποι Κοινοτικής Σημασίας» (Sites of Community Importance-SCI) που ορίζονται ως τόποι οι οποίοι συνεισφέρουν σημαντικά στη διατήρηση ή αποκατάσταση φυσικών οικοτόπων.

λειτουργούν και ως σταθεροποιητές για τα οικοσυστήματα, καθώς είναι πηγή οργανικής ύλης και αποτελούν και την επιφάνεια προσκόλλησης και διαβίωσης για πολλά άλλα είδη. Στην περιοχή εκτρέφεται τεράστιος αριθμός οστρακοειδών (μύδια, χτένια, καβούρια, στρείδια, κ.ά.). Τα σημεία δειγματοληψίας στις εκβολές του ποταμού φαίνονται στο Σχήμα 10.11.



Σχήμα 10.11 Σημεία δειγματοληψίας στον ποταμό Εχε

10.1.2.6 Νορβηγία: Θαλάσσια περιοχή Rong

Στη Νορβηγία, τα δείγματα προήλθαν από ιχθυοκαλλιέργειες και μονάδες εκτροφής δίθυρων οστρακοειδών στην περιοχή του Rong, που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του φιόρδ Rongøyna. Τα κύρια εκτρεφόμενα είδη είναι το χτένι Ατλαντικού (*Pecten maximus*), το κοινό στρείδι (*Ostrea edulis*), το στρείδι Πορτογαλίας (*Crassostrea gigas*), η μαρμαροαχιβάδα (*Tapes decussata*) και το κυδώνι Ιαπωνίας (*T. semidecussata*). Επίσης, εκεί δραστηριοποιείται το μοναδικό εκκολαπτήριο δίθυρων της χώρας, ενώ υπάρχει αδειοδοτημένη μονάδα η οποία παράγει υπό πιστοποιημένες συνθήκες και εμπορεύεται φύκη. Έτσι, η περιοχή η οποία υπόκειται σε συνεχείς ελέγχους ποιότητας των υδάτων.

10.2 Επίπεδα συγκεντρώσεων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά

Στον Πίνακα 10.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά, για κάθε σημείο δειγματοληψίας.

Πίνακας 10.3 Συγκεντρώσεις (ng L⁻¹) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά νερά σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας

	Ελλάδα (ΛΑΠ Αράχθου)			Ελλάδα (ΛΑΠ Λούρου)			Ελλάδα (Λωρίδα Σαγιάδας)			Αλβανία (Butrint)			Ιταλία (Sacca di Goro)		
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
ZIZANIOKTONA															
Diuron	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.
Fluazifop-p-butyl	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluometuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Linuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Prometryn	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
S-metolachlor	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	50,8	29,1	57,9
ENTOMOKTONA															
Chlorantraniliprole	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	4,2	5,4
Chlorpyrifos	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Dimethoate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Tebupirimfos	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Thiacloprid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Thiamethoxam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ															
Boscalid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.
Imazalil	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	8,7	31,2	18,8	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Metalaxyl	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	4,2	5,4
Myclobutanil	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΑΚΑΡΕΟΚΤΟΝΑ															
Acetamiprid	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.
Fenpyroximate	κ.ο.π.	57,1	κ.ο.π.	δ.α.	31,5	9,5	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
αριθμός θ.α./σημείο	2	4	3	4	2	3	1	0	1	3	3	3	6	4	6
αριθμός θ.α./σύστημα		9			9			2			9			16	
ενώσεις/σύστημα		4			5			1			3			8	

Πίνακας 10.3 (συνέχεια) Συγκεντρώσεις (ng L⁻¹) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά νερά σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας

	Ιταλία (Ligurian Sea)			Ισπανία (Ebro)			Πορτογαλία (Aveiro)			Ηνωμένο Βασίλειο (Exe)			Νορβηγία (Rong)					
	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27
ZIZANIOKTONA																		
Diuron	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluazifop-p-butyl	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluometuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Linuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Prometryn	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
S-metolachlor	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	8,0	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ENTOMOKTONA																		
Chlorantraniliprole	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Chlorpyrifos	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Dimethoate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Tebupirimfos	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Thiacloprid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Thiamethoxam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ENTOMOKTONA																		
Boscalid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Imazalil	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	26,4	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Metalaxyl	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	6,1	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Myclobutanil	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΑΚΑΡΕΟΚΤΟΝΑ																		
Acetamiprid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fenpyroximate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
θ.α./σημείο	1	1	1	1	3	3	1	2	2	1	2	2	0	1	0	0	0	0
θ.α./σύστημα		3			7			5			5			1			0	
ενώσεις/σύστημα		1			3			3			2			1			0	

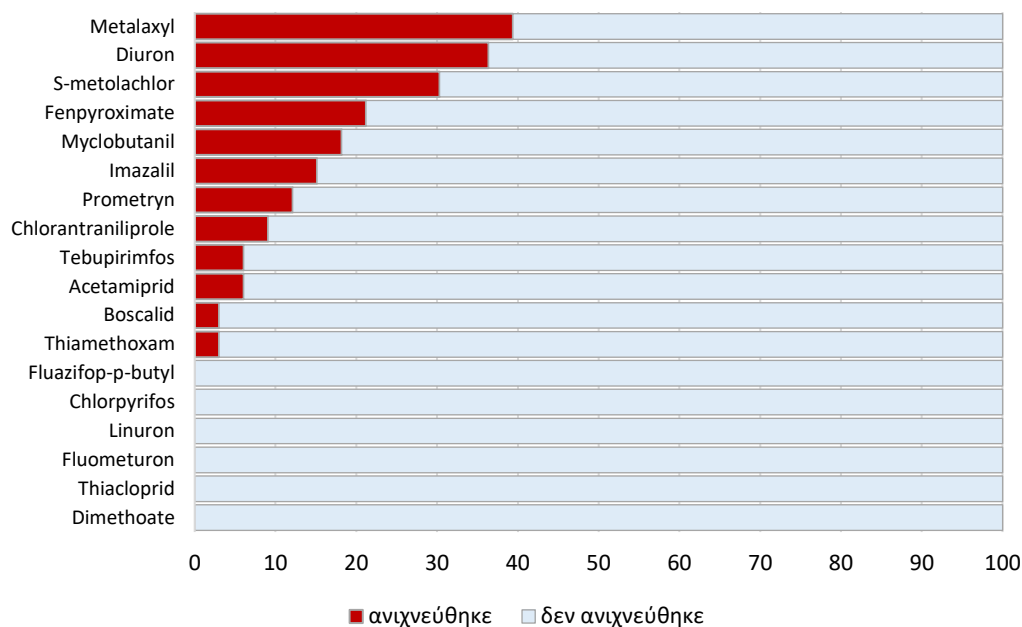
Η πλειοψηφία των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (67%) ανιχνεύθηκε τουλάχιστον μια φορά στο 75% των δειγμάτων νερού. Από τις ενώσεις αυτές, μόνο το 50% ανιχνεύθηκε σε συγκέντρωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης: chlorantraniliprole, metalaxyl, boscalid, S-metolachlor, imazalil και fenpyroximate. Οι ενώσεις thiamethoxam, acetamiprid, diuron, myclobutanil, prometryn και tebuirimfos ανιχνεύθηκαν κ.ο.π., ενώ οι dimethoate, thiacloprid, fluometuron, linuron, chlorpyrifos και fluazifop-p-butyl δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα. Στον Πίνακα 10.4 δίνεται το ποσοστό των θετικών ανιχνεύσεων επί του συνόλου των δειγμάτων νερού (n=33) και η ελάχιστη, μέγιστη, μέση και διάμεση τιμή των συγκεντρώσεων (αν υπάρχουν) για κάθε φυτοπροστατευτική ένωση. Σημειώνεται ότι σε όλες τις περιπτώσεις στατιστικών υπολογισμών για τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, η τιμή της συγκέντρωσης τους τέθηκε ίση με το μισό του ορίου ποσοτικοποίησης (MQL/2).

Πίνακας 10.4 Θετικές ανιχνεύσεις (%), εύρος συγκεντρώσεων, μέση και διάμεση τιμή για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν στα νερά

	% θ.α.	C _{min}	C _{max}	C _{mean}	C _{median}
ZIZANIOKTONA					
Diuron	36	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.
Fluazifop-p-butyl	0			-	
Fluometuron	0			-	
Linuron	0			-	
Prometryn	12	κ.ο.π.	κ.ο.π.	4,2	4,2
S-metolachlor	30	κ.ο.π.	57,9	4,2	κ.ο.α.
ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ					
Chlorantraniliprole	9	κ.ο.π.	5,4	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Chlorpyrifos	0			-	
Dimethoate	0			-	
Tebuirimfos	6	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Thiacloprid	0			-	
Thiamethoxam	3	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ					
Boscalid	3	6,4	6,4	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Imazalil	15	8,7	31,2	15,0	15,0
Metalaxyl	39	κ.ο.π.	6,1	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Myclobutanil	18	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΑΚΑΡΕΟΚΤΟΝΑ					
Acetamiprid	6	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Fenpyroximate	21	κ.ο.π.	57,1	κ.ο.π.	κ.ο.α.

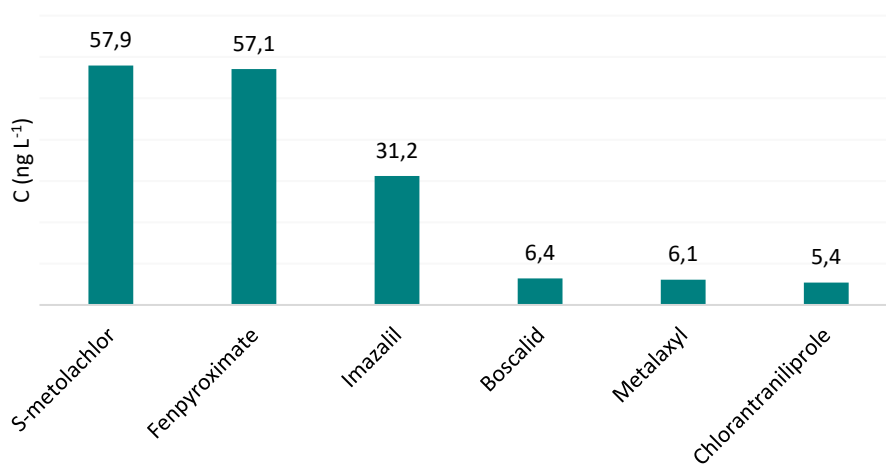
%θ.α.: % θετικές ανιχνεύσεις, κ.ο.α.: κάτω του ορίου ανίχνευσης, κ.ο.π.: κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης

Στο σύνολο των σημείων δειγματοληψίας, οι πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις ήταν οι metalaxyl (39%), diuron (36%), S-metolachlor (30%) και fenpyroximate (21%). Οι θετικές ανιχνεύσεις με φθίνουσα σειρά κατάταξης φαίνονται στο Σχήμα 10.12.



Σχήμα 10.12 Συχνότητα ανίχνευσης (%) φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν για τις ενώσεις S-metolachlor, fenpyroximate και imazalil, ενώ οι χαμηλότερες για τις boscalid, metalaxyl και chlorantraniliprole, όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.13.



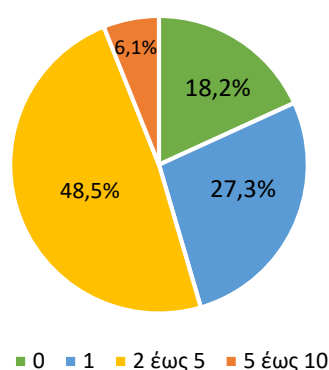
Σχήμα 10.13 Μέγιστες συγκεντρώσεις (ng L⁻¹) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά

Όσον αφορά τις κατηγορίες των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, πιο συχνά ανιχνεύθηκαν ζιζανιοκτόνα (34,8%), ακολούθησαν τα μυκητοκτόνα (25,8%) ενώ ίδιο ποσοστό θετικών ανιχνεύσεων (19,7%) εμφάνισαν τα εντομοκτόνα και τα ακαρεοκτόνα (Σχήμα 10.14).



Σχήμα 10.14 Συχνότητα ανίχνευσης φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά ανά κατηγορία

Σχετικά με τη συνύπαρξη ή μη περισσότερων από μια φυτοπροστατευτικής ένωσης ανά δείγμα νερού, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 10.15, στο 81,8% των δειγμάτων ανιχνεύθηκε τουλάχιστον μια φυτοπροστατευτική ένωση. Πιο συγκεκριμένα, στο 27,3% ανιχνεύθηκε μόνο μια φυτοπροστατευτική ένωση, στο 48,5% των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν 2 έως 5, ενώ μόλις στο 6,1% ανιχνεύθηκαν περισσότερες από 5 ενώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο στο 18,2% των δειγμάτων δεν ανιχνεύθηκε κανένα φυτοφάρμακο.



Σχήμα 10. 15 Συνύπαρξη φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά

Στον Πίνακα 10.5 δίνονται οι θετικές ανιχνεύσεις (%), το εύρος, η μέση και διάμεση τιμή των συγκεντρώσεων στο εκάστοτε υδάτινο σύστημα, μόνο για τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν.

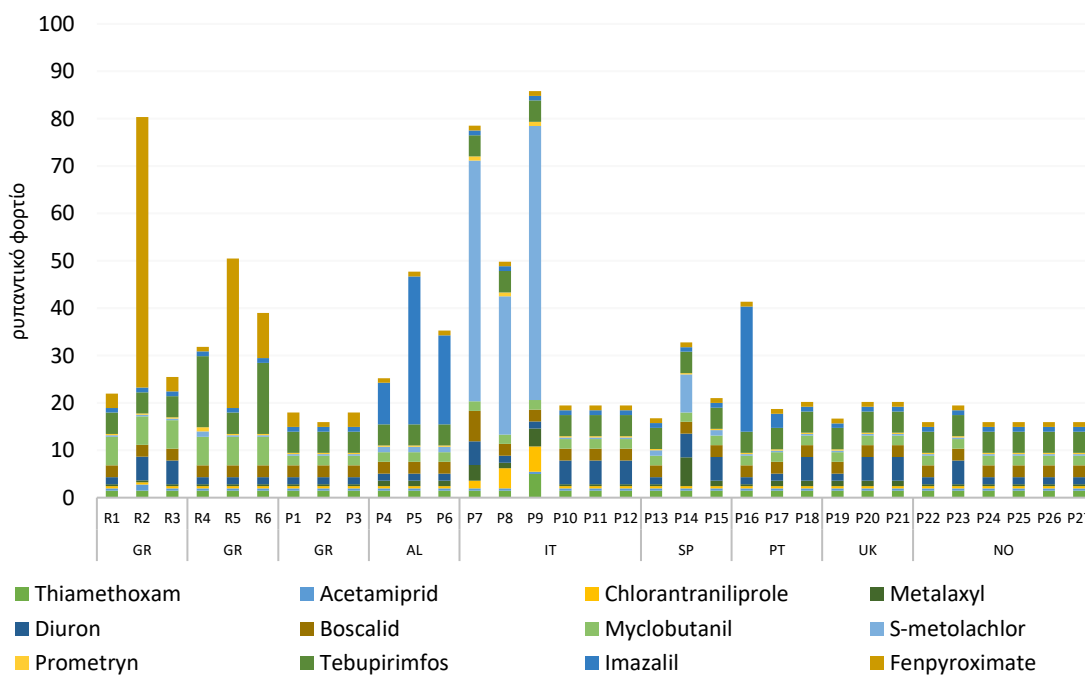
Πίνακας 10.5 Ποσοστό θετικών ανιχνεύσεων, ελάχιστη, μέγιστη, μέση και διάμεση τιμή συγκεντρώσεων (ng L^{-1}) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα νερά, ανά υδάτινο σύστημα

	%θ.α.	C _{min}	C _{max}	C _{μέση}	C _{median}
ΕΛΛΑΔΑ (ΛΑΠ Αράχθου)					
Fenpyroximate (A)	100,0	κ.ο.π	57,1	19,9	κ.ο.α.
Myclobutanil (M)	100,0	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Diuron (Z)	66,7	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Acetamiprid (A)	33,3	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΕΛΛΑΔΑ (ΛΑΠ Λούρου)					
Myclobutanil (M)	100,0	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
Fenpyroximate (A)	66,7	δ.α.	31,5	14,0	9,5
Tebupirimfos (E)	66,7	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
S-metolachlor (Z)	33,3	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Prometryn (Z)	33,3	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΕΛΛΑΔΑ (Λωρίδα Σαγιάδας)					
Fenpyroximate (A)	66,7	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
ΑΛΒΑΝΙΑ (Butrint)					
Metalaxyl (M)	100,0	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
Imazalil (M)	100,0	8,7	31,2	19,6	18,8
S-metolachlor (Z)	100,0	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
ΙΤΑΛΙΑ (Sacca di Goro)					
Chlorantraniliprole (E)	100,0	κ.ο.π	5,4	3,7	4,2
Metalaxyl (M)	100,0	κ.ο.π	3,8	2,7	3,3
Prometryn (Z)	100,0	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
S-metolachlor (Z)	100,0	29,1	57,9	46,0	50,8
Acetamiprid (A)	33,3	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Boscalid (M)	33,3	δ.α.	6,4	κ.ο.π	κ.ο.π
Diuron (Z)	33,3	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Thiamethoxam (E)	33,3	δ.α.	5,0	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΙΤΑΛΙΑ (Ligurian Sea)					
Diuron (Z)	100,0	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
ΙΣΠΑΝΙΑ (Ebro)					
S-metolachlor (Z)	100,0	κ.ο.π	8,0	3,4	κ.ο.π
Diuron (Z)	66,7	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
Metalaxyl (M)	66,7	δ.α.	6,1	2,5	κ.ο.π
ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ (Aveiro)					
Imazalil (M)	66,7	δ.α.	26,4	10,1	κ.ο.π
Metalaxyl (M)	66,7	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
Diuron (Z)	33,3	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ (Exe)					
Metalaxyl (M)	100,0	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
Diuron (Z)	66,7	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.π	κ.ο.π
ΝΟΡΒΗΓΙΑ (Rong)					
Diuron (Z)	33,3	δ.α.	κ.ο.π	κ.ο.α.	κ.ο.α.

κ.ο.α.: κάτω του ορίου ανίχνευσης, κ.ο.π.. κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης, δ.α.: δεν ανιχνεύθηκε

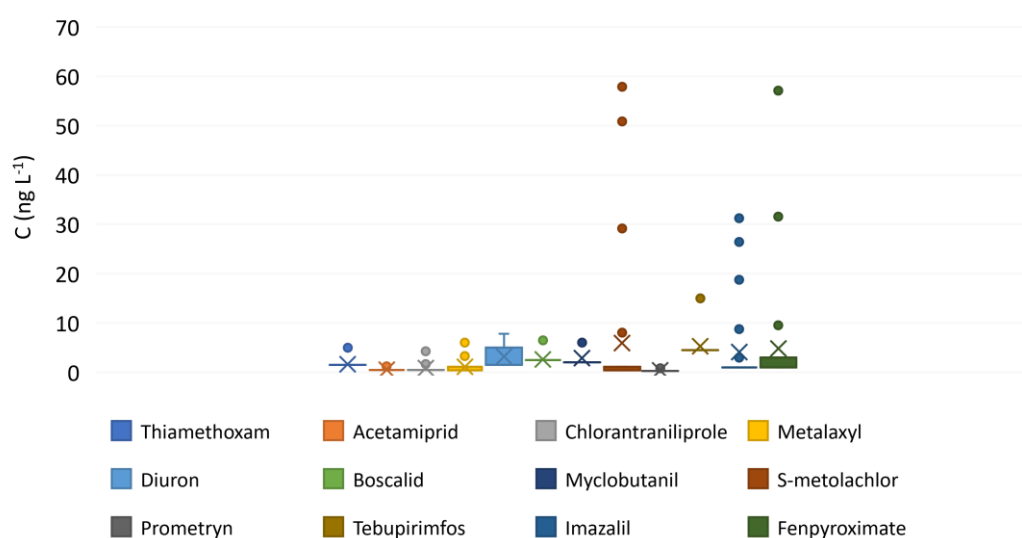
A: ακαρεοκτόνο, E: εντομοκτόνο, Z: ζιζανιοκτόνο, M: μυκητοκτόνο

Σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται πως στην Ελλάδα ανιχνεύθηκε το fenpyroximate στα υδάτινα σώματα και των τριών μελετώμενων συστημάτων. Ακολούθησε το myclobutanil το οποίο ανιχνεύθηκε στα ποτάμια ύδατα αλλά όχι κοντά στις ιχθυοκαλλιέργειες. Στην Αλβανία, σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκαν τα metalaxyl, imazalil και S-metolachlor. Στην Ιταλία, που όπως θα αναφερθεί παρακάτω ανιχνεύθηκαν οι περισσότερες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, το diuron ήταν αυτό που ανιχνεύθηκε τόσο στη Θάλασσα της Λιγυρίας (σε όλα τα δείγματα) όσο και στη λιμνοθάλασσα Sacca di Goro (στο 1/3 των δειγμάτων). Στη λιμνοθάλασσα Sacca di Goro ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα τα S-metolachlor, prometryn, chlorantraniliprole και metalaxyl Στην Ισπανία ανιχνεύθηκε επίσης το S-metolachlor σε όλα τα δείγματα, ενώ τα diuron και metalaxyl ανιχνεύθηκαν στα 2/3 των δειγμάτων. Diuron ανιχνεύθηκε επίσης στη Νορβηγία, την Πορτογαλία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Στο τελευταίο ανιχνεύθηκε επίσης metalaxyl, ενώ στην Πορτογαλία ανιχνεύθηκε επιπλέον και imazalil. Στο Σχήμα 10.16 φαίνεται η συνεισφορά των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στο ρυπαντικό φορτίο για κάθε σημείο δειγματοληψίας.



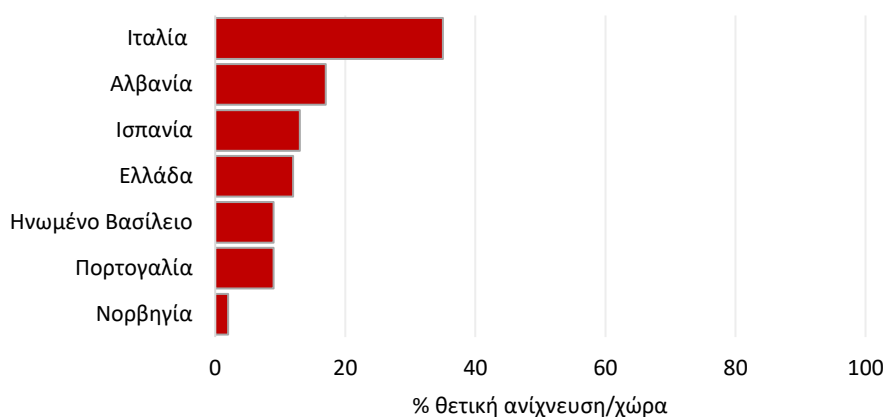
Σχήμα 10.16 Συνεισφορά των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο ρυπαντικό φορτίο κάθε σημείου

Το εύρος συγκεντρώσεων για κάθε ένωση που ανιχνεύθηκε, αποτυπώνεται στο επόμενο θηκόγραμμα Box-Whisker.



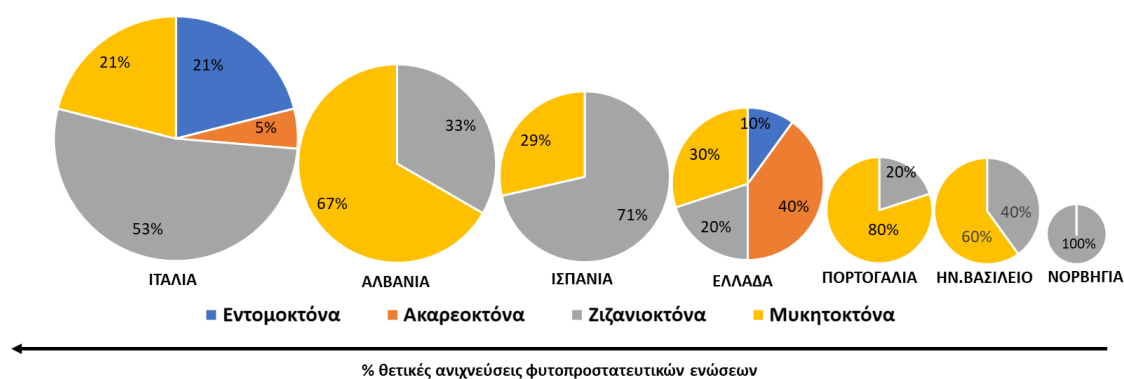
Σχήμα 10.17 Θηκόγραμμα Box-Whisker για τις συγκεντρώσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν

Η Ιταλία ήταν η χώρα με τις περισσότερες θετικές ανιχνεύσεις (35%), ακολουθούμενη από την Αλβανία (17%), την Ισπανία (13%), την Ελλάδα (12%), το Ηνωμένο Βασίλειο και την Πορτογαλία (9%) και τέλος τη Νορβηγία με μόλις 2% θετικές ανιχνεύσεις. Τα μοναδικά σημεία στα οποία δεν ανιχνεύθηκε κανένα φυτοφάρμακο, ήταν τα σημεία P22, P24, P25, P26, P27στη Νορβηγίας και το P2 στη Λωρίδα Σαγιάδας.



Σχήμα 10.18 Θετικές ανιχνεύσεις (%) φυτοπροστατευτικών ενώσεων για κάθε χώρα

Στο Σχήμα 10.19 φαίνεται η % ανίχνευση για κάθε κατηγορία φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε όλες τις χώρες που συμμετείχαν στη μελέτη περίπτωσης. Παρά τις διαφοροποιήσεις λόγω διαφορετικών αναγκών στη γεωργία κάθε χώρας, η απουσία μεγάλων αποκλίσεων ανάμεσα στις χώρες της Ευρώπης και της Μεσογείου ειδικότερα, η οποία έχει καταγραφεί και σε πολλές άλλες περιπτώσεις [53, 272, 281, 273–280], καταδεικνύουν τη χρήση παρόμοιων γεωργικών πρακτικών, παρεμφερείς καιρικές συνθήκες, και παρόμοιες αστικές δραστηριότητες που μπορούν να επηρεάσουν το υδάτινο περιβάλλον. Βάσει αυτού, τα μέτρα για τη διαχείριση των δραστηριοτήτων που αποσκοπούν στη βελτίωση της κατάστασης της ποιότητας των υδάτων και της αποκατάστασης των επιβαρουμένων οικοσυστημάτων μπορούν να έχουν κοινή βάση.



Σχήμα 10.19 Ανιχνεύσεις φυτοπροστατευτικών ενώσεων ανά κατηγορία και ανά χώρα

10.3 Επίπεδα συγκεντρώσεων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα ιζήματα

Στον Πίνακα 10.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα ιζήματα, για κάθε σημείο δειγματοληψίας. Η συχνότητα εμφάνισης των μελετώμενων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα ιζήματα ήταν αρκετά χαμηλή, ενώ και οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα (κ.ο.π.). Η μη ανίχνευση φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα ιζήματα ή οι χαμηλές συγκεντρώσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα ιζήματα, έχουν καταγραφεί σε πολλές μελέτες [115, 128, 282, 283].

Πίνακας 10.6 Συγκεντρώσεις (ng g⁻¹) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα ιζήματα σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας

	Ελλάδα (ΛΑΠ Αράχθου)			Ελλάδα (ΛΑΠ Λούρου)			Ελλάδα (Λωρίδα Σαγιάδας)			Αλβανία (Butrint)			Ιταλία (Sacca di Goro)		
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
ZIZANIOKTONA															
Diuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluazifop-p-butyl	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluometuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Linuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Prometryn	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
S-metolachlor	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ENTOMOKTONA															
Chlorantraniliprole	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Chlorpyrifos	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Dimethoate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Tebupirimfos	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Thiacloprid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Thiamethoxam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ															
Boscalid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Imazalil	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Metalaxyl	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Myclobutanil	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΑΚΑΡΕΟΚΤΟΝΑ															
Acetamiprid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fenpyroximate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
αριθμός θ.α./σημείο	2	3	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
αριθμός θ.α./σύστημα		8			7				0		0			0	
ενώσεις/σύστημα		3			3				0		0			0	

Πίνακας 10.6 (συνέχεια) Συγκεντρώσεις (ng g⁻¹) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα ιζήματα σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας

	Ιταλία (Ligurian Sea)		Ισπανία (Ebro)			Πορτογαλία (Aveiro)			Ηνωμένο Βασίλειο (Exe)			Νορβηγία (Rong)		
	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P23	P24	P27
ZIZANIOKTONA														
Diuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluazifop-p-butyl	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluometuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Linuron	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Prometryn	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
S-metolachlor	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ENTOMOKTONA														
Chlorantraniliprole	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Chlorpyrifos	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Dimethoate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Tebupirimfos	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Thiacloprid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Thiamethoxam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ														
Boscalid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Imazalil	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Metalaxyl	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Myclobutanil	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΑΚΑΡΕΟΚΤΟΝΑ														
Acetamiprid	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fenpyroximate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
θ.α./σημείο	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
θ.α./σύστημα	0			0			0			0		0		0
ενώσεις/σύστημα	0			0			0			0		0		0

Μόλις τρεις από τις 18 φυτοπροστατευτικές ενώσεις, από διαφορετική κατηγορία φυτοπροστατευτικών ενώσεων η καθεμία, ανιχνεύθηκαν: το μυκητοκτόνο metalaxyl, το ζιζανιοκτόνο S-metolachlor και το εντομοκτόνο chlorpyrifos. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση η συγκέντρωση δεν ήταν μεγαλύτερη από το όριο ποσοτικοποίησης.

Από τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν, τα chlorpyrifos και S-metolachlor βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα που προήλθαν από τα ελληνικά ποτάμια υδάτινα σώματα (n=6), ενώ το metalaxyl μόνο σε τρία από αυτά. Στον Πίνακα 10.7 φαίνονται οι θετικές ανιχνεύσεις, το εύρος των συγκεντρώσεων, η μέση και διάμεση τιμή των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα ιζήματα.

Πίνακας 10.7 Ποσοστό θετικών ανιχνεύσεων, ελάχιστη, μέγιστη, μέση και διάμεση τιμή συγκεντρώσεων (ng g^{-1}) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα ιζήματα

	% θ.α.	C _{min}	C _{max}	C _{μέση}	C _{διάμεση}
ΕΛΛΑΔΑ, ΛΑΠ Αράχθου					
Chlorpyrifos (E)	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
S-metolachlor(Z)	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Metalaxyl (M)	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΕΛΛΑΔΑ, ΛΑΠ Λούρου					
S-metolachlor (Z)	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Chlorpyrifos (E)	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Metalaxyl (M)	33,3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.

Σημειώνεται ότι ενώ στη συντριπτική πλειοψηφία των δειγμάτων (79%) δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση, στα υπόλοιπα δείγματα (21%) οι θετικές ανιχνεύσεις αφορούσαν δύο ενώσεις.

Μόνο στην Ελλάδα ανιχνεύθηκαν φυτοπροστατευτικές ενώσεις στα ιζήματα. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκαν στις ΛΑΠ Λούρου και Αράχθου, σε σημεία κοντά σε αγροκαλλιέργειες, όπως αναφέρθηκε στην περιγραφή των περιοχών μελέτης. Αν και όχι υψηλό, το ρυπαντικό φορτίο εξαιτίας της χρήσης εκτεταμένης χρήσης φυτοφαρμάκων στο υδατικό διαμέρισμα της Ηπείρου αποτελεί περιβαλλοντικό ζήτημα. Όλα τα υπόλοιπα σημεία δειγματοληψίας, στα οποία δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση, υποφέρουν λιγότερο από τη γεωργική δραστηριότητα καθώς είναι μεταβατικά ή παράκτια ύδατα, μακρύτερα από τις καλλιεργήσιμες εκτάσεις. Η μη ανίχνευση φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε θαλάσσια ιζήματα οφείλεται εν μέρει στη σύσταση του δείγματος. Σε εργασία των Palma et al., τα λιγότερο επιβαρυσμένα με φυτοφάρμακα ιζήματα ήταν αυτά που εμφανίζουν

υψηλότερα ποσοστά άμμου, καθώς φαίνεται πως υπάρχει μειωμένη χημική συγγένεια μεταξύ τους [282]. Επίσης, οι σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα νερά από τα ίδια σημεία δειγματοληψίας, επίσης εξηγεί τη μη ανίχνευση ή ανίχνευση σε τόσο χαμηλά επίπεδα των φυτοφαρμάκων στα ιζήματα. Ωστόσο, γενικά η συγκέντρωση αυτών των ενώσεων στα ιζήματα, δεν μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με αυτή στα νερά. Σύμφωνα με την Köck et al. , η μη συσχέτιση αποδίδεται στην έλλειψη αντιστοιχίας μεταξύ των ιστορικών πληροφοριών που είναι εγγενείς στα δείγματα ιζημάτων και των πληροφοριών που παρέχονται από τα δείγματα νερού που είναι πιο παροδικά, αλλά και στο γενικά μέτρια έως υψηλά πολικό χαρακτήρα των εξεταζόμενων ενώσεων και στις διακυμάνσεις των περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. ηλιοφάνεια και θερμοκρασία).

Μυκητοκτόνα

Το μυκητοκτόνο metalaxyl, παρουσίασε την υψηλότερη συχνότητα ανίχνευσης από όλες τις προσδιοριζόμενες φυτοπροστατευτικές ενώσεις στα νερά (39%) και τη δεύτερη υψηλότερη στα ιζήματα (10%). Η παρουσία του μυκητοκτόνου metalaxyl στα ελληνικά ποτάμια ήταν αναμενόμενη, καθώς αποδεδειγμένα εφαρμόζεται ευρέως στην περιοχή για τον έλεγχο μυκητησιακών επιδημιών στα οπωροκηπευτικά και σε διάφορα καρποφόρα δέντρα. Παρόλα αυτά είναι αρκετά διαλυτό στο νερό με αποτέλεσμα να μην εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα ιζήματα [284]. Η υψηλότερη συγκέντρωσή του στα νερά βρέθηκε ίση με $6,1 \text{ ng L}^{-1}$, στην Ισπανία, ενώ στα ιζήματα η συγκέντρωσή του ήταν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης. Σε μελέτη στον ίδιο ποταμό στο παρελθόν, ανιχνεύθηκε στο 14% των δειγμάτων και μάλιστα σε συγκέντρωση υψηλότερη από το EQS ($0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) [272]. Αναφέρεται επίσης η ανίχνευσή του στη λεκάνη απορροής των Dueño και Miño στην Ισπανία, με συχνότητα ανίχνευσης 6% και 4% αντίστοιχα [272]. Σε άλλη μελέτη, στο νότιο Ontario, η συγκέντρωσή του κυμάνθηκε μεταξύ $20\text{-}1330 \text{ ng L}^{-1}$ [285]. Σε άλλη εργασία, στην Αυστραλία, ανιχνεύθηκε σε μέγιστη συγκέντρωση $0,01$ στα νερά, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα ιζήματα [286].

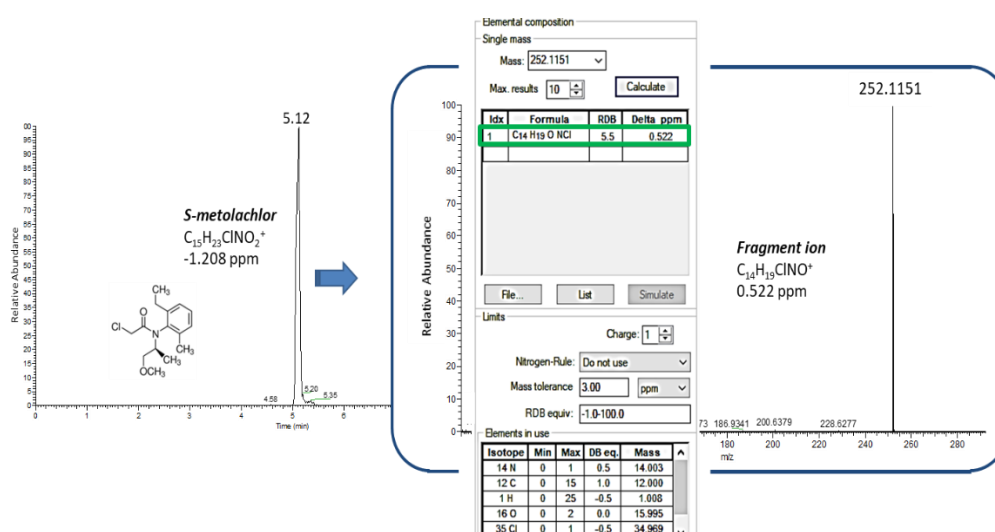
Το μυκητοκτόνο boscalid, ανιχνεύθηκε σε ένα μόνο δείγμα νερού στην Ιταλία, σε συγκέντρωση $6,4 \text{ ng L}^{-1}$ και σε κανένα από τα δείγματα ιζήματος. Υψηλότερες συγκεντρώσεις του έχουν αναφερθεί σε περιοχή με έντονη χρήση μυκητοκτόνων στις ΗΠΑ, όπου μέγιστη συγκέντρωσή του βρέθηκε ίση με $22,4 \text{ ng L}^{-1}$ και η συχνότητα ανίχνευσής του ήταν 75% [287].

Το μυκητοκτόνο myclobutanil, ανιχνεύθηκε στο 18% των δειγμάτων νερού, σε συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης. και σε κανένα από τα δείγματα ιζήματος. Σε μελέτη των Wightwick et al. είχε ανιχνευθεί στο 38% των δειγμάτων νερού και ιζήματος, εμφανίζοντας μέγιστες συγκεντρώσεις 2900 ng L^{-1} και 120 ng g^{-1} , αντίστοιχα [286].

Το μυκητοκτόνο imazalil ανιχνεύθηκε στο 15% των δειγμάτων νερού και σε κανένα από τα δείγματα ιζήματος. Η μέση συγκέντρωση στα νερά ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αρκετές άλλες ενώσεις (15 ng L^{-1}), ενώ παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση $31,2 \text{ ng L}^{-1}$, στην Ιταλία. Υψηλότερες συγκεντρώσεις ($300\text{-}1210 \text{ ng L}^{-1}$) αναφέρονται στην παράκτια λιμνοθάλασσα Albufera, στη Βαλένθια [288]. Γενικά, η χρήση του στη γεωργία δεν είναι ιδιαίτερα εκτεταμένη. Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως βιοκτόνο, γεγονός που εξηγεί εν μέρει την ανίχνευσή του σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση [289]. Έχει αναφερθεί η ανίχνευσή του στις εκροές ΜΕΥΑ στην Ελβετία, κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι κυκλοφορεί σε εμπορικό σκεύασμα με το enilconazole ως κτηνιατρικό φάρμακο, το οποίο χορηγείται τοπικά σε σκύλους, άλογα και βοοειδή ως αντιμυκητιασικό.

Ζιζανιοκτόνα

Το *S*-metolachlor ανιχνεύθηκε στο 30% των δειγμάτων νερού και στο 21% των δειγμάτων ιζήματος. Στα νερά, η μέση συγκέντρωσή του ήταν $4,2 \text{ ng L}^{-1}$ και η μέγιστη, που καταγράφηκε στην Ιταλία, $57,9 \text{ ng L}^{-1}$, αποτελώντας και την υψηλότερη συνολικά συγκέντρωση στα νερά. Στα ιζήματα οι συγκεντρώσεις ήταν σε όλες τις περιπτώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης. Σε παλαιότερη μελέτη στην περιοχή Sacca di Goro, όπου τώρα εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωσή του, ανιχνεύθηκε επίσης στα νερά και τα ιζήματα [290]. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκε μόνο σε ποτάμια ιζήματα (ΛΑΠ Λούρου και Αράχθου), πιθανόν λόγω της ευρείας χρήσης του στις καλλιέργειες ντομάτας και πατάτας στην γύρω περιοχή. Η θετική ανίχνευσή του σε άγνωστο δείγμα και η επιβεβαίωση με θραυσματοποίηση MS/MS φαίνεται στο Σχήμα 10.20.



Σχήμα 10.20 Χρωματογράφημα επιλεγμένου ιόντος και φάσμα μάζας του ιοντικού θραύσματος για την επιβεβαίωση της ανίχνευσης του *S*-metolachlor

Το *S-metolachlor* λόγω της ευρύτητας της χρήσης του και της μακροχρόνια κυκλοφορίας του, έχει μελετηθεί διεξοδικά στο περιβάλλον, Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι έχει ανιχνευθεί σε επιφανειακά νερά και ιζήματα στον ποταμό Ebro στην Ισπανία [272, 277], και στην Πορτογαλία. Σύμφωνα με τους Brown και Beinum [274] το *S-metolachlor* ανιχνεύεται κυρίως κατά την άνοιξη και το καλοκαίρι, αφού αποπλένεται εύκολα από το έδαφος μετά την εφαρμογή του σε περιόδους βροχοπτώσεων. *S-metolachlor* ανιχνεύθηκε πρόσφατα και στις λεκάνες απορροής των Orge και Seine καθώς και στην περιοχή Rhone-Alpes στη Γαλλία [273, 275].

Στα ιζήματα, η χαμηλή συγκέντρωση συμφωνεί και με άλλες μελέτες [163, 291] και μπορεί να αποδοθεί στις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Σύμφωνα με το έγγραφο καθοδήγησης της ΕΕ για την ένωση αυτή [292], η απορρόφηση του από το έδαφος και τα ιζήματα είναι μέτρια ($K_{oc} < 500 \text{ mL g}^{-1}$). Επίσης, το δυναμικό έκπλυσής του δεν είναι χαμηλό με αποτέλεσμα να υπάρχει κινητικότητα του προς τα νερά (GUS index 1,8-2,8). Επομένως τα μόρια της ένωσης δεν έχουν μεγάλη τάση να προσροφώνται ισχυρά στους πόρους του ιζήματος, ενώ είναι περισσότερο πιθανό να ανιχνευθεί στα νερά [293]. Η προσρόφηση και εκρόφησή του έχουν συσχετιστεί θετικά με την περιεχόμενη οργανική ύλη [294]. Προσροφάται ισχυρά στα μόρια εδάφους ή ιζήματος μέσω δυνάμεων van der Waals, ανταλλαγών υποκαταστάτη και ομοιοπολικών δεσμών [295]. Γενικά, παρουσιάζει υστέρηση σε εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη και άργιλο, λόγω της μη αναστρέψιμης αλληλεπίδρασης δέσμευσης με τα συστατικά του εδάφους ή αργής αναστρέψιμης χημικής προσρόφησης, που έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσής του [296].

Το *diuron* ήταν το δεύτερο συχνότερα απαντώμενο φυτοφάρμακο στα νερά (36%), εμφανίζοντας ωστόσο συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανίχνευσή του στα ιζήματα. Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωσή του στα επιφανειακά ύδατα (maximum allowed concentration, MAC) είναι $1,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ σύμφωνα με την οδηγία 2013/495 [60] και στην παρούσα Διατριβή, σε κανένα δείγμα η συγκέντρωση δεν ήταν μεγαλύτερη (το όριο ποσοτικοποίησης ήταν μικρότερο, επομένως διασφαλίζεται η σύγκριση των αποτελεσμάτων με την τιμή $1,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Πρόκειται για μια από τις πλέον μελετημένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, συγκαταλέγεται στους ρύπους προτεραιότητας της ΕΕ και στην Ελλάδα έχει αποσυρθεί από την αγορά από το 2007. Ωστόσο, εξακολουθεί να ανιχνεύεται κατά κόρον στο περιβάλλον. Στην Ευρώπη, έχει ανιχνευθεί σε 27 χώρες [276]. Ανιχνεύθηκε πολλές φορές στα υδάτινα σώματα της Ισπανίας, όπως στους ποταμούς Llobregat και Guadalquivir [280, 281] και σε άλλες περιοχές, σε διάφορες συγκεντρώσεις: κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης [297], $64\text{--}239 \text{ ng L}^{-1}$ [298], $9,5 \text{ ng L}^{-1}$

[267], 0,4–99,7 ng L⁻¹[299], 10,5–36 ng L⁻¹ [300] και έως 818 ng L⁻¹ [280]. Σε άλλες μελέτες ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκε, όπως για παράδειγμα στη Lerma (Ισπανία) [301], στη Lorraine (Γαλλία) [302], στη Χιλή [303] και στη Βραζιλία [304]. Σε πρόσφατη εποχιακή μελέτη που διεξήχθη σε ελληνικά ποτάμια ύδατα, το diuron ανιχνεύθηκε 100% των δειγμάτων στις δυο από τις τρεις δειγματοληψίες και στο 72% των δειγμάτων στην τρίτη δειγματοληψία, με το εύρος συγκεντρώσεων να κυμαίνεται μεταξύ 0,21–0,42 μg L⁻¹[305].

Το prometryn ανιχνεύθηκε μόνο στα νερά (12% των δειγμάτων) σε συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης. Σύμφωνα με αναφορά ανασκόπησης της ΕΕ σχετικά με τη δεύτερη λίστα των ρύπων προτεραιότητας [306] έχει ανιχνευθεί σε δέκα χώρες της Ευρώπης και στο 31% των δειγμάτων οι συγκεντρώσεις του ποσοτικοποιήθηκαν με μέγιστη τα 2000 ng L⁻¹. Στην Ελλάδα έχει αποσυρθεί από την αγορά από το 2014. Σε πρόσφατη μελέτη σε ελληνικά ποτάμια ύδατα, δεν ανιχνεύθηκε prometryn σε κανένα δείγμα [305], ενώ σε άλλη μελέτη στη λίμνη Βιστωνίδα ανιχνεύθηκε κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης [307].

Εντομοκτόνα

Το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο chlorpyrifos είναι ένα από τα πλέον μελετημένα φυτοφάρμακα ως προς τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις του στο περιβάλλον. Πρόκειται για τοξικό και επίμονο ρύπο και μια από τις πρώτες ενώσεις που συμπεριλήφθηκαν στη λίστα με τους ρύπους προτεραιότητας της ΕΕ [60], ενώ έχει αποτελέσει και αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών προγραμμάτων συστηματικής παρακολούθησης των επιπέδων φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον. Έτσι, η παρουσία του έχει μελετηθεί εκτενώς στα νερά, λιγότερο στα ιζήματα και σπάνια στα θαλάσσια ιζήματα [308]. Στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκε μόνο στα ιζήματα, σε ποσοστό 21%.

Οι αναφορές σχετικά με την ανίχνευσή του είναι πάρα πολλές. Το chlorpyrifos έχει ανιχνευθεί σε επιφανειακά νερά και ιζήματα στον ποταμό Ebro στην Ισπανία, από τον οποίο συλλέχθηκαν δείγματα και στην παρούσα εργασία, [272, 277] αλλά και στην Πορτογαλία, όπου το chlorpyrifos ήταν η συχνότερα απαντώμενη φυτοπροστατευτική ένωση στη λεκάνη απορροής του Alqueva [53]. Σύμφωνα με άλλη εργασία, ανιχνεύθηκε στον ποταμό Ebro, σε συγκέντρωση 66 ng g⁻¹ [115], ενώ δεν ανιχνεύθηκε στον ποταμό Guadalquivir [115]. Εκτός Ευρώπης, ανιχνεύτηκε στην Κίνα, συγκεκριμένα στο Πεκίνο, σε συγκεντρώσεις από 0,072–0,237 ng g⁻¹, στο 86% των δειγμάτων που αναλύθηκαν [309]. Παρόμοιες συγκεντρώσεις για το chlorpyrifos αναφέρθηκαν στις λεκάνες απορροής Orge και Seine καθώς και στην περιοχή Rhone-Alpes στη Γαλλία [273, 275].

Σύμφωνα με στοιχεία της EPA, το chlorpyrifos είναι το ευρύτερα και συχνότερα χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο στη γεωργία παγκοσμίως, ενώ αναφέρεται ότι είναι και το πιο κοινό εντομοκτόνο οικιακής χρήσης [310]. Τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν εν μέρει να εξηγήσουν την ανίχνευσή του σε αυτά τα σημεία δειγματοληψίας, τα οποία βρίσκονται πιο κοντά σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις και σε αστικά κέντρα, σε σχέση με τα υπόλοιπα που είναι σε παράκτιες ζώνες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με αρκετές άλλες μελέτες [115, 144, 311]. Επίσης, η σχετικά πολική φύση του ($\log P > 3$ και $K_{oc} > 4000$) υποδεικνύει μια μικρή τάση να προσροφάται στην επιφάνεια των ιζημάτων. Επίσης, αυτές του οι φυσικοχημικές ιδιότητες, συνεπάγονται σχετικά χαμηλή κινητικότητα στην υδάτινη στήλη και πιθανή βιοσυσσώρευση, η οποία μειώνεται εξαιτίας της ημίσειας ζωής του στα συστήματα νερού-ιζήματος (36 ημέρες) [312].

Το εντομοκτόνο chlorantraniliprole, ανιχνεύθηκε στο 9% των δειγμάτων νερού και σε κανένα από τα δείγματα ιζήματος. Η υψηλότερη συγκέντρωσή του ήταν στην Ιταλία, (5,4 ng L⁻¹). Υψηλότερες συγκεντρώσεις αναφέρθηκαν για το chlorantraniliprole σε μελέτη των Pereira et al. [313], όπου ανιχνεύθηκαν υπολείμματα στο 60% των δειγμάτων, με μέγιστη συγκέντρωση 4500 ng L⁻¹ στην περιοχή Lezíria do Tejo στην Πορτογαλία, η οποία βρίσκεται σε γειτνίαση με μεγάλες καλλιεργήσιμες εκτάσεις.

Το thiamethoxam, το οποίο ανιχνεύθηκε σε μόλις ένα δείγμα νερού, κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, συμπεριλαμβάνεται στη λίστα παρακολούθησης της ΕΕ. Σύμφωνα με πρόσφατη αναφορά της ΕΕ [306], το thiamethoxam έχει ανιχνευθεί σε επτά χώρες της ένωσης, με μέγιστη συγκέντρωση 3800 ng L⁻¹. Υψηλότερες συγκεντρώσεις του έχουν αναφερθεί εκτός ΕΕ (52,4 ng L⁻¹) με θετικές ανιχνεύσεις για το 73% των δειγμάτων [314] και 1 έως 225000 ng L⁻¹ [315].

Στην Ελλάδα, σε πρόσφατη μελέτη στη λίμνη Βιστωνίδα, ανιχνεύθηκε (κ.ο.π.) στο 13% των δειγμάτων, ενώ σύμφωνα με την ίδια μελέτη ανιχνεύθηκε στους ποταμούς Ασπροπόταμο, Κομπάτο, Λίσσο και Κόσυνθο της ΛΑΠ της λίμνης [307].

Άλλο εντομοκτόνο που ανιχνεύθηκε στη Διατριβή είναι το tebuirifos (6% των δειγμάτων, με μέση συγκέντρωση κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για την ανίχνευσή του στο περιβάλλον.

Ακαρεοκτόνα

Το acetamiprid, το οποίο συμπεριλαμβάνεται στη λίστα παρακολούθησης της ΕΕ, ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης, σε δύο δείγματα νερού. Για το acetamiprid έχει αναφερθεί ανίχνευση έως και στο 100% των δειγμάτων, με μέγιστη

συγκέντρωση 157 ng L⁻¹ [314]. Σε άλλη εργασία η συγκέντρωσή του κυμάνθηκε από 8 σε 44100 ng L⁻¹ [315]. Το άλλο ακαρεοκτόνο που ανιχνεύθηκε, μόνο στα νερά, ήταν το fenpyroximate (21% των δειγμάτων) με μέγιστη συγκέντρωση τα 57,1 ng L⁻¹ στον Άραχθο. Γενικά εφαρμόζεται με ψεκάσμο φυλλώματος σε εσπεριδοειδή και μηλιές.

Η ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα επιφανειακά ύδατα καταδεικνύει τις επιπτώσεις της γεωργίας στο περιβάλλον, και συγκεκριμένα τη μη εφαρμογή ορθών γεωργικών πρακτικών, εξαιτίας της χρήσης πληθώρας φυτοφαρμάκων τα οποία μέσω της απόπλυσης του εδάφους καταλήγουν στα νερά. Η ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων που έχουν απαγορευτεί ή η χρήση τους έχει αρχίσει να περιορίζεται δραστικά, μπορεί να οφείλεται είτε σε παράνομη διάθεση και χρήση είτε στην απόπλυση εδαφών στα οποία χρησιμοποιήθηκαν στον παρελθόν.

Στην Ελλάδα, αρκετές από τις μελετώμενες ενώσεις έχουν ανιχνευθεί σε παλαιότερες μελέτες. Στο Στρυμόνα, ανιχνεύθηκαν 44 φυτοπροστατευτικές ενώσεις με τα οργανοχλωριωμένα, οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα και τις τριαζίνες να ανιχνεύονται συχνότερα [316]. Παρόμοιες συγκεντρώσεις έχουν αναφερθεί σε μελέτη ανασκόπησης από τους Konstantinou et al., που κατέγραψαν τις συγκεντρώσεις και τη συμπεριφορά πλήθους φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε διάφορα ελληνικά υδάτινα σώματα [317]. Σε πιο πρόσφατη μελέτη των Nyzas et al. γίνεται αναφορά για την υδάτινη τοξικότητα από την παρουσία των επιπέδων συγκεντρώσεων φυτοφαρμάκων στη Βόρεια Ελλάδα [318].

Πίνακας 10.8 Συνολικό ποσοστό (%) θετικών ανιχνεύσεων και συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά νερά (ng L⁻¹) και στα ιζήματα (ng g⁻¹)

	NEPA (n=33)					ΙΖΗΜΑΤΑ (n=29*)				
	% θ.α.	C _{min}	C _{max}	C _{mean}	C _{median}	% θ.α.	C _{min}	C _{max}	C _{mean}	C _{median}
ZIZANIOKTONA										
Diuron	36	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	0		-		
Prometryn	12	κ.ο.π.	κ.ο.π.	4,2	4,2	0		-		
S-metolachlor	30	κ.ο.π.	57,9	4,2	κ.ο.α.	21	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ENTOMOKTONA										
Chlorantraniliprole	9	κ.ο.π.	5,4	κ.ο.α.	κ.ο.α.	0		-		
Tebupirimfos	6	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.	0		-		
Thiamethoxam	3	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.	0		-		
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ										
Boscalid	3	6,4	6,4	κ.ο.α.	κ.ο.α.	0		-		
Imazalil	15	8,7	31,2	15,0	15,0	0		-		
Metalaxyl	39	κ.ο.π.	6,1	κ.ο.α.	κ.ο.α.	10	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Myclobutanil	18	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	0		-		
ΑΚΑΡΕΟΚΤΟΝΑ										
Acetamiprid	6	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.	0		-		
Fenpyroximate	21	κ.ο.π.	57,1	κ.ο.π.	κ.ο.α.	0		-		

10.4 Επίπεδα συγκεντρώσεων φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά

Στον Πίνακα 10.9 δίνονται οι (%) θετικές ανιχνεύσεις στα δείγματα νερού (n=33) και η ελάχιστη, μέγιστη, μέση και διάμεση τιμή των συγκεντρώσεων για τα φαρμακευτικά.

Πίνακας 10.9 Θετικές ανιχνεύσεις (%), εύρος συγκεντρώσεων, μέση και διάμεση τιμή για τις φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν στα επιφανειακά νερά

	% θ.α.	C _{min}	C _{max}	C _{mean}	C _{median}
ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΑ					
Alprazolam	0		-		
Amisulpride	12	δ.α.	6,5	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Amitriptyline	12	δ.α.	3,7	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Bupropion	0		-		
Carbamazepine	48	δ.α.	11,0	1,26	κ.ο.α.
Citalopram	18	δ.α.	4,1	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Clozapine	3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Diazepam	0		-		
Fluoxetine	0		-		
Haloperidol	0		-		
Mirtazapine	0		-		
Olanzapine	6	δ.α.	6,0	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Paroxetine	0		-		
Quetiapine	0		-		
Risperidone	45	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Sertraline	0		-		
Venlafaxine	48	δ.α.	30,8	2,05	κ.ο.π.
ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΑ					
Paracetamol	39	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΜΣΑΦ					
Ketoprofen	0		-		
Phenazone	0		-		
ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΑ					
Bezafibrate	0		-		
Fenofibrate	0		-		
ΆΛΛΑ ΦΑΡΜΑΚΑ					
Atenolol	0		-		
Cimetidine	0		-		
Budesonide	0		-		

Στον Πίνακα 10.10 δίνονται όλα τα αποτελέσματα από την ανάλυση των φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά, για κάθε σημείο δειγματοληψίας. Το 36% των φαρμακευτικών ενώσεων ανιχνεύθηκε τουλάχιστον μια φορά σε κάποιο δείγμα νερού. Μόνο τα amisulpride, amitriptyline, carbamazepine, citalopram, olanzapine και venlafaxine ανιχνεύθηκαν πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης. Οι ενώσεις paracetamol, risperidone και clozapine ανιχνεύθηκαν κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης και οι υπόλοιπες δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα.

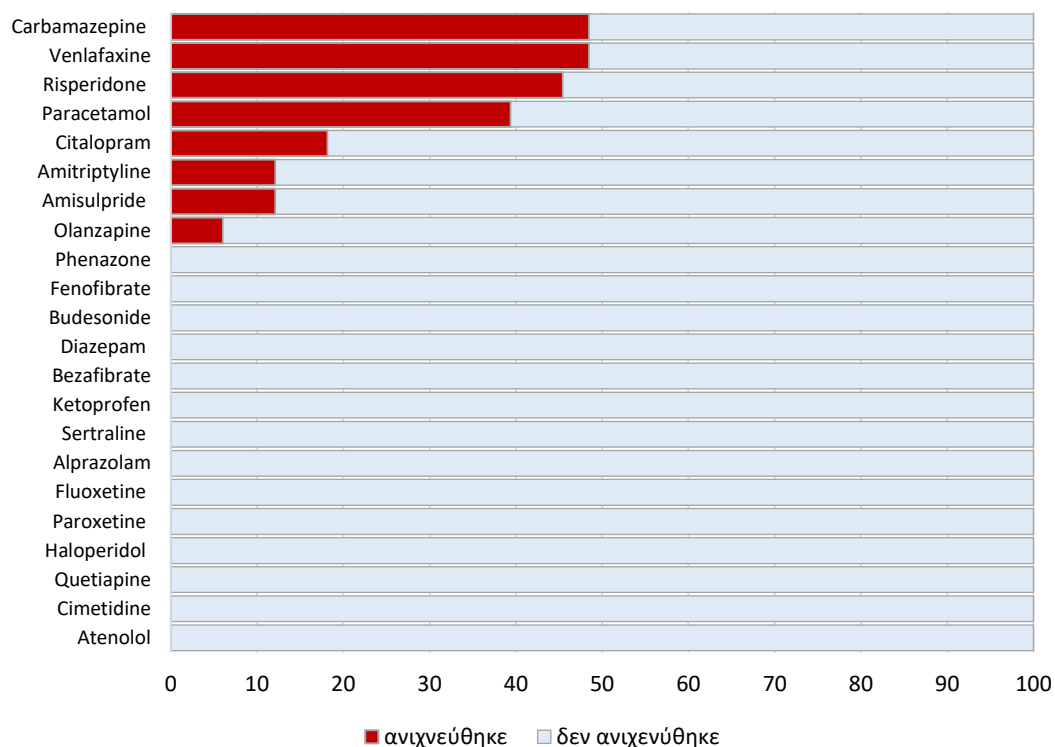
Πίνακας 10.10 Συγκεντρώσεις (ng L⁻¹) των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά νερά

	Ελλάδα (ΛΑΠ Αράχθου)			Ελλάδα (ΛΑΠ Λούρου)			Ελλάδα (Λωρίδα Σαγιάδας)			Αλβανία (Butrint)			Ιταλία (Sacca di Goro)		
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΑ															
Alprazolam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Amisulpride	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Amitriptyline	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Bupropion	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Carbamazepine	δ.α.	11,0	5,0	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	1,5	κ.ο.π.
Citalopram	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Clozapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Diazepam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluoxetine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Haloperidol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Mirtazapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Olanzapine	δ.α.	6	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Paroxetine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Quetiapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Risperidone	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Sertraline	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Venlafaxine	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	0,8	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΑΝΑΛΗΓΗΤΙΚΑ															
Paracetamol	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΜΣΑΦ															
Ketoprofen	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Phenazone	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΑ															
Bezafibrate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fenofibrate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΆΛΛΑ ΦΑΡΜΑΚΑ															
Atenolol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Cimetidine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Budesonide	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
θ.α./σημείο	0	5	4	0	1	1	1	1	1	0	0	0	2	4	4
θ.α./σύστημα		9									2				
ενώσεις/σύστημα		5									1				

Πίνακας 10.10 (συνέχεια) Συγκεντρώσεις (ng L⁻¹) των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά νερά

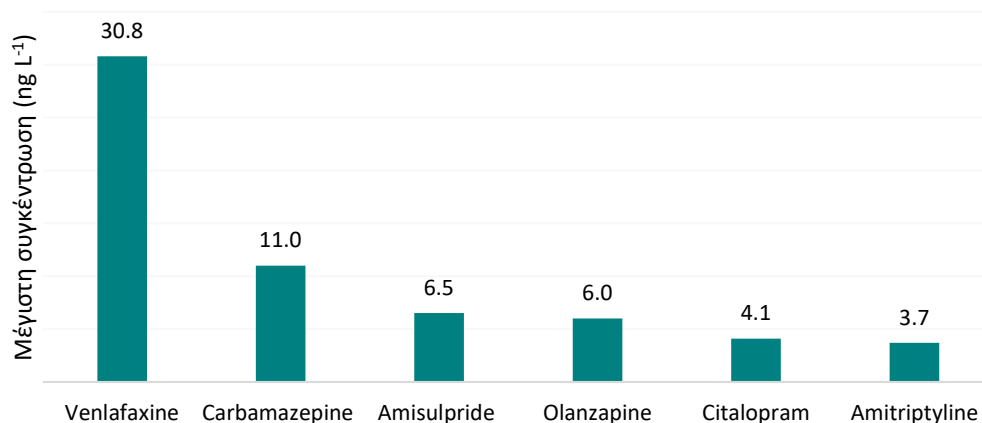
	Ιταλία (Ligurian Sea)			Ισπανία (Ebro)			Πορτογαλία (Aveiro)			Ηνωμένο Βασίλειο (Exe)				Νορβηγία (Rong)				
	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27
ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΑ																		
Alprazolam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Amisulpride	2,1	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	6,5
Amitriptyline	1,3	1,5	1,4	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	3,7
Bupropion	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Carbamazepine	5,4	4,6	5,7	2,4	2,0	3,2	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	4,2	δ.α.
Citalopram	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	4,1
Clozapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.
Diazepam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluoxetine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Haloperidol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Mirtazapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Olanzapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Paroxetine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Quetiapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Risperidone	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.
Sertraline	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Venlafaxine	4,5	6,0	4,4	1,0	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	30,8	5,8
ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΑ																		
Paracetamol	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΜΣΑΦ																		
Ketoprofen	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Phenazone	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΑ																		
Bezafibrate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fenofibrate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΆΛΛΑ ΦΑΡΜΑΚΑ																		
Atenolol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Cimetidine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Budesonide	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
θ.α./σημείο	7	7	7	4	3	2	1	1	1	2	2	1	3	4	1	0	7	1
θ.α./σύστημα		21			9			3			5			8			8	
ενώσεις/σύστημα		7			4			2			2			4			7	

Στο σύνολο των σημείων δειγματοληψίας, οι συχνότερα απαντώμενες ενώσεις ήταν οι carbamazepine και venlafaxine (48%), το risperidone (45%) και το paracetamol (39%). Οι θετικές ανιχνεύσεις με φθίνουσα σειρά κατάταξης φαίνονται στο Σχήμα 10.21.



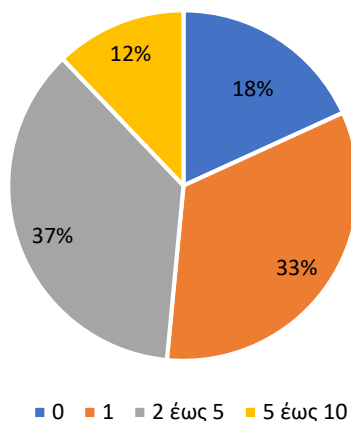
Σχήμα 10.21 Συχνότητα ανίχνευσης (%) των φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν για τις ενώσεις venlafaxine και carbamazepine, ενώ η χαμηλότερη για το amitriptyline, όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.22.



Σχήμα 10.22 Μέγιστες συγκεντρώσεις (ng L⁻¹) των φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά

Σχετικά με τη συνύπαρξη ή μη περισσότερων από μια φαρμακευτικής ένωσης ανά δείγμα νερού, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 10.23, στο 33% των δειγμάτων ανιχνεύθηκε μια φαρμακευτική ένωση, ενώ ήταν υψηλότερο το ποσοστό των δειγμάτων (37%) που ανιχνεύθηκαν από 2 έως 5 φαρμακευτικές ενώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο στο 18% των δειγμάτων δεν ανιχνεύθηκε κανένα φάρμακο.



Σχήμα 10.23 Συνύπαρξη φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά

Στον Πίνακα 10.11 δίνονται οι θετικές ανιχνεύσεις (%), το εύρος, η μέση και διάμεση τιμή των συγκεντρώσεων στο εκάστοτε υδάτινο σύστημα, μόνο για τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν.

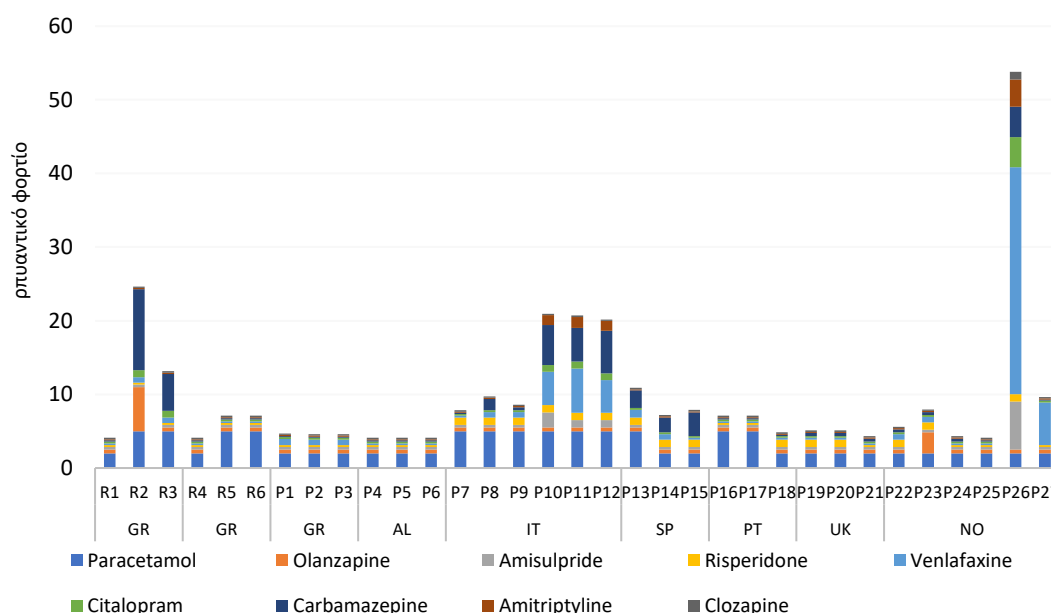
Πίνακας 10.11 Ποσοστό θετικών ανιχνεύσεων, ελάχιστη, μέγιστη, μέση και διάμεση τιμή συγκεντρώσεων ($\mu\text{g L}^{-1}$) των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα νερά, ανά υδάτινο σύστημα

	% θ.α.	C_{\min}	C_{\max}	$C_{\text{μέση}}$	$C_{\text{διάμεση}}$
ΕΛΛΑΔΑ, ΛΑΠ Αράχθου					
Carbamazepine	66,7	δ.α.	11,0	6,0	5,0
Citalopram	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Olanzapine	33,3	δ.α.	6,0	κ.ο.π.	κ.ο.α.
Paracetamol	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Venlafaxine	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΕΛΛΑΔΑ, ΛΑΠ Λούρου					
Paracetamol	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΕΛΛΑΔΑ, Λωρίδα Σαγιάδας					
Venlafaxine	100,0	κ.ο.π.	0,8	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΑΛΒΑΝΙΑ, Λιμνοθάλασσα Butrint					
Δεν ανιχνεύθηκε καμία φαρμακευτική ένωση στα νερά					
ΙΤΑΛΙΑ, Λιμνοθάλασσα Sacca di Goro					
Paracetamol	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.

	% θ.α.	C _{min}	C _{max}	C _{μέση}	C _{διάμεση}
Risperidone	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Carbamazepine	66,7	δ.α.	1,5	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Venlafaxine	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΙΤΑΛΙΑ, Θάλασσα της Λιγυρίας					
Paracetamol	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Amisulpride	100,0	κ.ο.π.	2,1	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Risperidone	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Venlafaxine	100,0	4,4	6,0	5,0	4,5
Citalopram	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Carbamazepine	100,0	4,6	5,7	5,4	5,4
Amitriptyline	100,0	1,3	1,5	1,9	1,4
ΙΣΠΑΝΙΑ, Εκβολές Ebro					
Carbamazepine	100,0	2,0	3,2	2,5	2,4
Risperidone	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Venlafaxine	66,7	δ.α.	1	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Paracetamol	33,3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΠΟΡΤΟΓΑΛΙΑ, Λιμνοθάλασσα Aveiro					
Paracetamol	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Risperidone	33,3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ, Εκβολές Exe					
Carbamazepine	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Risperidone	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΝΟΡΒΗΓΙΑ, Rong (ιχθυοκαλλιέργειες)					
Carbamazepine	100,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Risperidone	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Venlafaxine	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Olanzapine	33,3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
ΝΟΡΒΗΓΙΑ, Rong (εκτροφεία μυδιών)					
Venlafaxine	66,7	δ.α.	30,8	12,2	5,8
Amisulpride	33,3	δ.α.	6,5	2,6	κ.ο.α.
Risperidone	33,3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.
Citalopram	33,3	δ.α.	4,1	κ.ο.π.	κ.ο.α.
Carbamazepine	33,3	δ.α.	4,2	1,8	κ.ο.α.
Clozapine	33,3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.α.
Amitriptyline	33,3	δ.α.	3,7	1,6	κ.ο.α.

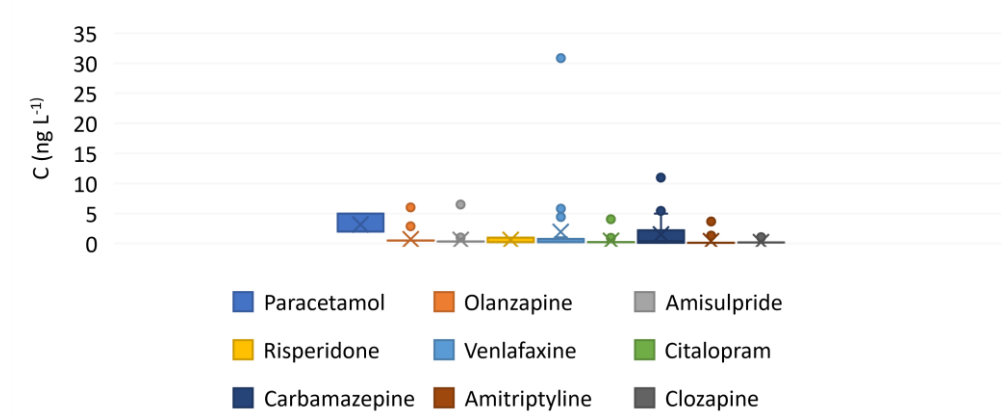
Σύμφωνα με τον παραπάνω Πίνακα, φαίνεται πως στην Ελλάδα ανιχνεύθηκε paracetamol και στα δύο μελετώμενα ποτάμια υδάτινα συστήματα. Στον Άραχθο ανιχνεύθηκαν επίσης αρκετές ψυχιατρικές ενώσεις, ενώ στη Σαγιάδα ανιχνεύθηκε το αντικαταθλιπτικό και venlafaxine σε όλα τα σημεία. Στην Αλβανία, δεν ανιχνεύθηκε κανένα φάρμακο. Στην Ιταλία, που όπως θα αναφερθεί παρακάτω ανιχνεύθηκαν οι περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις, τα paracetamol και risperidone ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα και στα δύο υδάτινα συστήματα. Υψηλή συχνότητα ανίχνευσης παρατηρήθηκε επίσης για τα

carbamazepine, venlafaxine, amisulpride, citalopram και amitriptyline, που ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα στη Θάλασσα της Λιγυρίας. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα στην Ισπανία, στην Πορτογαλία και στο Ηνωμένο Βασίλειο. Ανιχνεύθηκαν paracetamol και risperidone και στις τρεις περιπτώσεις, ενώ στην Ισπανία ανιχνεύθηκαν επίσης carbamazepine και venlafaxine. Σε αντίθεση με τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, στη Νορβηγία σημειώθηκαν αρκετές θετικές ανιχνεύσεις για τα φάρμακα, καθώς το 47% των μελετώμενων ψυχιατρικών ενώσεων ανιχνεύθηκε τουλάχιστον μια φορά. Στο Σχήμα 10.24 φαίνεται η συνεισφορά των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στο ρυπαντικό φορτίο για κάθε σημείο δειγματοληψίας.



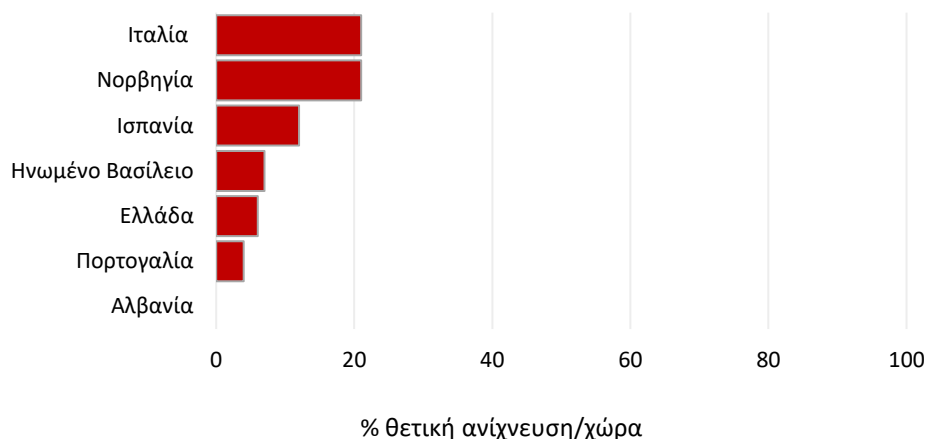
Σχήμα 10.24 Συνεισφορά των φαρμακευτικών ενώσεων στο ρυπαντικό φορτίο κάθε σημείου

Το εύρος συγκεντρώσεων για κάθε ένωση που ανιχνεύθηκε, αποτυπώνεται στο επόμενο θηκόγραμμα Box-Whisker.



Σχήμα 10.25 Θηκόγραμμα Box-Whisker για τις συγκεντρώσεις των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν

Στο Σχήμα 10.26 φαίνονται οι (%) θετικές ανιχνεύσεις των φαρμακευτικών ενώσεων για κάθε χώρα. Όπως και με τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, η Ιταλία είναι στην πρώτη θέση (21%). Ίδιο ποσοστό θετικών ανιχνεύσεων υπολογίστηκε για τη Νορβηγία (21%) και ακολούθησαν η Ισπανία (12%), το Ηνωμένο Βασίλειο (7%), η Ελλάδα (6%) και η Πορτογαλία (4%).



Σχήμα 10.26 Θετικές ανιχνεύσεις (%) φαρμακευτικών ενώσεων για κάθε χώρα

10.5 Επίπεδα συγκεντρώσεων φαρμακευτικών ενώσεων στα ιζήματα

Στον Πίνακα 10.12 δίνονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων ιζημάτων για όλα τα σημεία δειγματοληψίας.

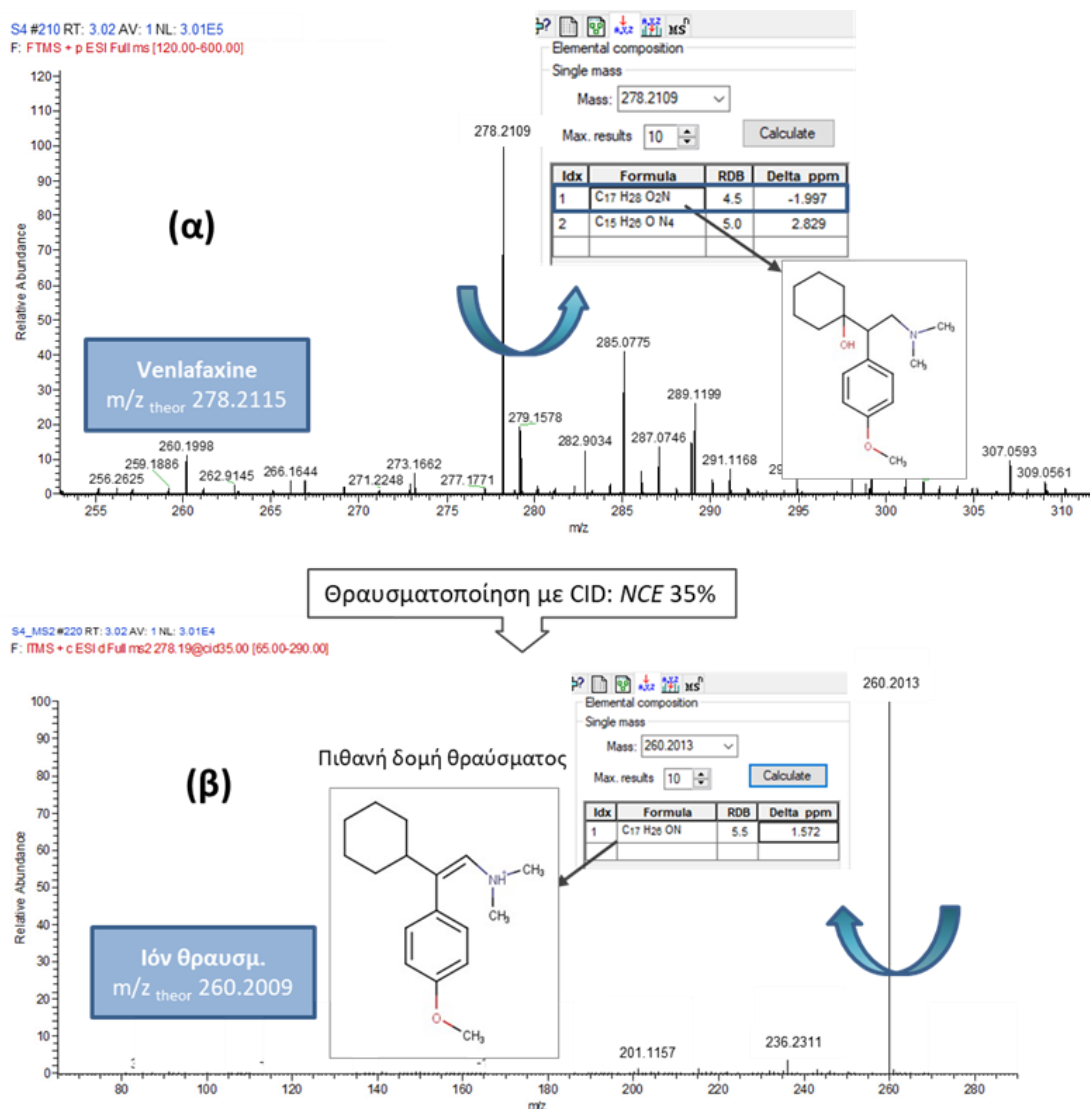
Πίνακας 10.12 Συγκεντρώσεις (ng g⁻¹) των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα ιζήματα

	Ελλάδα (ΛΑΠ Αράχθου)			Ελλάδα (ΛΑΠ Λούρου)			Ελλάδα (Λωρίδα Σαγιάδας)			Αλβανία (Butrint)			Ιταλία (Sacca di Goro)		
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΑ															
Alprazolam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Amisulpride	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Amitriptyline	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	1,6	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Bupropion	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Carbamazepine	δ.α.	δ.α.	14,7	δ.α.	δ.α.	2,5	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Citalopram	δ.α.	δ.α.	10,9	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Clozapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Diazepam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluoxetine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Haloperidol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Mirtazapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Olanzapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Paroxetine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Quetiapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Risperidone	25,7	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Sertraline	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Venlafaxine	4,9	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΑΝΑΛΗΓΗΤΙΚΑ															
Paracetamol	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΜΣΑΦ															
Ketoprofen	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Phenazone	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΑ															
Bezafibrate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fenofibrate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΆΛΙΑ ΦΑΡΜΑΚΑ															
Atenolol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Budesonide	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Cimetidine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
θ.α./σημείο	3	0	3	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
θ.α./σύστημα		6			2			1			0			0	
ενώσεις/σύστημα		5			2			1			0			0	

Πίνακας 10.12 (συνέχεια) Συγκεντρώσεις (ng g⁻¹) των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα ιζήματα

	Ιταλία (Ligurian Sea)		Ισπανία (Ebro)			Πορτογαλία (Aveiro)			Ηνωμένο Βασίλειο (Exe)			Νορβηγία (Rong)		
	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P23	P24	P27
ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΑ														
Alprazolam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Amisulpride	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Amitriptyline	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Bupropion	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Carbamazepine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Citalopram	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Clozapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Diazepam	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fluoxetine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Haloperidol	δ.α.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	κ.ο.π.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Mirtazapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Olanzapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Paroxetine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Quetiapine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Risperidone	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Sertraline	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Venlafaxine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΑ														
Paracetamol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΜΣΑΦ														
Ketoprofen	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Phenazone	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΥΠΟΛΙΠΙΔΑΙΜΙΚΑ														
Bezafibrate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Fenofibrate	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
ΆΛΛΑ ΦΑΡΜΑΚΑ														
Atenolol	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Budesonide	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
Cimetidine	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.	δ.α.
θ.α./σημείο	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
θ.α./σύστημα		0		3			0			0			0	0
ενώσεις/σύστημα				2			0			0			0	0

Στα ιζήματα ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις paracetamol, amitriptyline, carbamazepine, citalopram, haloperidol, risperidone και venlafaxine. Στο Σχήμα 10.27, απεικονίζεται η θετική ανίχνευση της ένωσης venlafaxine σε δείγμα ιζήματος, χρησιμοποιώντας αρχικά ως φίλτρο την ακριβή μοριακή μάζα της ένωσης και στη συνέχεια το ιον θραυσματοποίησης, με τη χρήση MS/MS.



Σχήμα 10.27 (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης (FS) με εφαρμογή της ακριβούς μοριακής μάζας ως φίλτρο και (β) φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης με εφαρμογή NCE 35% για το venlafaxine

Το carbamazepine και το venlafaxine ήταν οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα, και ακολούθησε το risperidone, που εμφάνισε και τη μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση. Μόνο στην Ελλάδα και στην Ισπανία ανιχνεύθηκαν φαρμακευτικές ενώσεις

στα ιζήματα και οι υπόλοιπες χώρες έχουν παραλειφθεί από τον Πίνακα. Όσον αφορά τη συνύπαρξη περισσότερων από μια φαρμακευτικές ενώσεις στα ιζήματα, από το 21% των δειγμάτων ιζήματος, στο 14% ανιχνεύθηκε μόνο μια φαρμακευτική ένωση και στο 6% από 2 έως 5. Στον Πίνακα 10.13 δίνονται οι θετικές ανιχνεύσεις, το εύρος συγκεντρώσεων, η μέση και διάμεση τιμή των συγκεντρώσεων για τις φαρμακευτικές ενώσεις στα ιζήματα σε κάθε υδάτινο σύστημα.

Πίνακας 10.13 Ποσοστό θετικών ανιχνεύσεων, ελάχιστη, μέγιστη, μέση και διάμεση τιμή συγκεντρώσεων (ng g^{-1}) των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα ιζήματα

	% θ.α.	C_{\min}	C_{\max}	$C_{\text{μέση}}$	$C_{\text{διάμεση}}$
ΕΛΛΑΔΑ, ΛΑΠ Αράχθου					
Paracetamol	66,7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.
Risperidone	33,3	δ.α.	25,7	κ.ο.π.	κ.ο.α.
Venlafaxine	33,3	δ.α.	4,9	κ.ο.π.	κ.ο.α.
Citalopram	33,3	δ.α.	10,9	4,1	κ.ο.α.
Carbamazepine	33,3	δ.α.	14,7	5,3	κ.ο.α.
ΕΛΛΑΔΑ, ΛΑΠ Λούρου					
Citalopram	33,3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Carbamazepine	33,3	δ.α.	2,5	κ.ο.π.	κ.ο.α.
ΕΛΛΑΔΑ, Λωρίδα Σαγιάδας					
Amitriptyline	33,3	δ.α.	1,6	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΙΣΠΑΝΙΑ, Εκβολές Ebro					
Haloperidol	66,7	δ.α.	2,0	κ.ο.π.	κ.ο.π.

Αναλγητικά

Η παρακεταμόλη ανιχνεύθηκε στο 39% των δειγμάτων νερού και στο 7% των δειγμάτων ιζήματος, σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης. Πρόκειται για το πιο ευρέως -και αλόγιστα- χρησιμοποιούμενο φάρμακο παγκοσμίως. Απεκκρίνεται κυρίως ως σύμπλοκο σύζευξης των μεταβολικών διεργασιών (μόλις το 5% σαν μητρική ένωση), το οποίο υφίσταται υδρόλυση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας στις ΜΕΥΑ με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της μητρικής ένωσης [77]. Η συχνή ανίχνευσή της και οι σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στα νερά οφείλονται κυρίως στον υψηλό βαθμό κατανάλωσης της, μιας και αποτελεί μη συνταγογραφούμενο φάρμακο. Η παρουσία της σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα έχει μελετηθεί εκτενώς και έχουν αναφερθεί ποικίλα εύρη συγκεντρώσεων. Παρόμοιες και υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν αναφερθεί σε ποτάμια ύδατα: $<1,5\text{-}1388 \text{ ng L}^{-1}$ [319–321], 2382 ng L^{-1} [322], δ.α.- $4,9 \text{ ng L}^{-1}$ [323]. Σε άλλη εργασία όπου μελετήθηκαν

θαλάσσια νερά σε περιοχές με διαφορετικά επίπεδα ποιότητας υδάτων, αναφέρθηκαν συγκεντρώσεις $224,6 \text{ ng L}^{-1}$, $98,6 \text{ ng L}^{-1}$, $53,2 \text{ ng L}^{-1}$, $156,3 \text{ ng L}^{-1}$, $269,7 \text{ ng L}^{-1}$, $59,4 \text{ ng L}^{-1}$ [323]. Σε προηγούμενη εργασία στο υδατικό διαμέρισμα της Ηπείρου, η παρακεταμόλη ανιχνεύθηκε στο 78% των δειγμάτων (ΛΑΠ Καλαμά) σε συγκεντρώσεις κ.ο.π. έως 146 ng L^{-1} [6]. Η ανίχνευσή της στα ιζήματα κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα, πιθανώς λόγω της υψηλής πολικότητας της. Σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις παρακεταμόλης έχουν αναφερθεί σε ιζήματα στη Νέα Ζηλανδία ($6,2\text{-}10,8 \text{ ng g}^{-1}$) [324] και αρκετά υψηλότερες στον ποταμό Umgeni στη Νότια Αφρική ($6,03\text{--}8,92 \text{ ng g}^{-1}$) [181] και στο Cadiz, στη νότια Ισπανία ($96\text{-}100 \text{ ng g}^{-1}$) [186].

Ψυχιατρικά φάρμακα

Το αντιεπιληπτικό carbamazepine ανιχνεύθηκε στο 48% των δειγμάτων νερού (μέση συγκέντρωση $1,28 \text{ ng L}^{-1}$) και σε ένα δείγμα ιζήματος. Έχει υψηλό ρυθμό μεταβολισμού και χαμηλή ταχύτητα απέκκρισης από τον ανθρώπινο οργανισμό ως μητρική ένωση, παρουσιάζοντας μεγάλη σταθερότητα στα φυσικά νερά [216, 325]. Αποτελεί μια από τις πιο συχνά ανιχνεύσιμες ουσίες σε υψηλές ποσότητες και έχει προταθεί να χρησιμοποιείται ως δείκτης αστικής ρύπανσης [216]. Σε έρευνες σε νερά ποταμού έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις $32,9\text{--}34,4 \text{ ng L}^{-1}$ [323], $<0,5\text{--}251 \text{ ng L}^{-1}$ [319–321], 684 [322]. Σε θαλάσσια ύδατα έχει αναφερθεί συγκέντρωση $28,3 \text{ ng L}^{-1}$ [323]. Σε άλλη εργασία το carbamazepine ανιχνεύθηκε στο 100% των δειγμάτων ιζήματος σε συγκεντρώσεις από $1,09\text{--}2,32 \text{ ng g}^{-1}$ [181]. Σε προηγούμενη εργασία στη ΛΑΠ Καλαμά ανιχνεύθηκε στο 37% των δειγμάτων, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις [6]. Όσον αφορά τη συγκέντρωσή του στα ιζήματα, αναφέρονται συγκεντρώσεις όπως $0,04\text{--}0,12 \text{ ng g}^{-1}$ [326], $0,2\text{--}1,1 \text{ ng g}^{-1}$ [324] και υψηλότερες όπως $1,02\text{--}2,32 \text{ ng g}^{-1}$ [181] και $9\text{--}15 \text{ ng g}^{-1}$ [186].

Από τη θεραπευτική κατηγορία των ψυχιατρικών ενώσεων, το 44% των μελετώμενων ενώσεων ανιχνεύθηκε τουλάχιστον μια φορά σε δείγμα νερού και το 37% σε κάποιο δείγμα ιζήματος, αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι ενώσεις risperidone, olanzapine, amisulpride, venlafaxine, citalopram, amitriptyline και clozapine ανιχνεύθηκαν στα νερά. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν σχετικά πρόσφατο αντικείμενο μελέτης περιβαλλοντικών εργασιών, συγκριτικά με άλλες κατηγορίες και αφορούν περισσότερο τις ΜΕΥΑ. Παρόμοια ποσοστά ανίχνευσης και επίπεδα συγκεντρώσεων ανέφεραν επίσης οι Pérez-Carrera et al. [81].

Το amitriptyline (τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό για την ανύψωση του υποβιβασμένου επιπέδου του συναισθήματος) ανιχνεύθηκε στο 12% των δειγμάτων νερού (μέγιστη συγκέντρωση $3,7 \text{ ng L}^{-1}$) και σε ένα δείγμα ιζήματος (κ.ο.π.). Για το amitriptyline, έχουν

αναφερθεί στα νερά συγκεντρώσεις $<0,5-30 \text{ ng L}^{-1}$ [246, 319–321], 72 ng L^{-1} [327] κ.ά. Σε θαλάσσια ιζήματα στο Puget Sound, Washington ανιχνεύθηκε με μέση συγκέντρωση $0,45 \text{ ng g}^{-1}$ [328].

Το αντικαταθλιπτικό venlafaxine ανιχνεύθηκε στο 48% των δειγμάτων νερού (μέγιστη συγκέντρωση $30,8 \text{ ng L}^{-1}$) και μαζί με το αντιεπιληπτικό carbamazepine αποτέλεσαν τα συχνότερα ανιχνεύσιμα φάρμακα στα νερά. Στα ιζήματα ανιχνεύθηκε σε ένα μόνο δείγμα, με συγκέντρωση $4,9 \text{ ng g}^{-1}$, κοντά στη ΜΕΥΑ Άρτας. Έχει αναφερθεί ότι έχει χαμηλό ρυθμό απομάκρυνσης από τις ΜΕΥΑ, γεγονός που δικαιολογεί την ανίχνευση του ακόμα και σε περιοχές που θεωρούνται μη επιβαρυνμένες από ρύπους ανθρώπινης δραστηριότητας [129, 329]. Το venlafaxine έχει ανιχνευθεί στα ποτάμια νερά σε συγκεντρώσεις $1,1-35 \text{ ng L}^{-1}$ [327] και σε άλλη εργασία σε τρία διαφορετικά ποτάμια στην Ισπανία ανιχνεύθηκε στα επίπεδα των $45, 13$ και 52 ng L^{-1} [244]. Σε εργασία των Comtois-Marotte et al., ανιχνεύθηκε στα επιφανειακά νερά σε συγκέντρωση $5,1 \text{ ng L}^{-1}$ ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα ιζήματα. Αναφέρεται επίσης η ανίχνευσή του στο 100% των δειγμάτων στον ποταμό Duro στην Πορτογαλία, σε συγκεντρώσεις $1,26-26,4 \text{ ng g}^{-1}$ ενώ σύμφωνα με την ίδια μελέτη δεν ανιχνεύθηκε στον ποταμό Lima [129]. Στα θαλάσσια ύδατα, σε μελέτη των Paiga et al. δεν ανιχνεύθηκε κοντά στο Porto [323] ενώ στην Ισπανία έχει ανιχνευθεί σε συγκέντρωση 85 ng L^{-1} [327].

Το αντικαταθλιπτικό citalopram ανιχνεύθηκε στο 18% των δειγμάτων νερού και στο 7% των δειγμάτων ιζήματος. με μέγιστη συγκέντρωση $4,1 \text{ ng L}^{-1}$ και $10,9$ αντίστοιχα. Στη Σουηδία, ανιχνεύθηκε στα νερά της Στοκχόλμης με μέση και μέγιστη συγκέντρωση 4 και $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ αντίστοιχα [330]. Στην Πορτογαλία έχει ανιχνευθεί σε συγκεντρώσεις έως $14,4 \text{ ng g}^{-1}$ στον ποταμό Duro, ενώ δεν ανιχνεύθηκε στον ποταμό Lima [129]. Συχνότερη είναι η ανίχνευσή του σε δίθυρα [263]. Σε άλλη εργασία σε τρία διαφορετικά ποτάμια στην Ισπανία ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις $9, 5$ και 11 ng L^{-1} αντίστοιχα [244]. Σε θαλάσσια νερά έχει ανιχνευθεί από τους Alygizakis et al. [331] στο Σαρωνικό Κόλπο στην Αττική, όπου ανιχνεύθηκε στο 50% των δειγμάτων σε συγκεντρώσεις από $0,06- 8,0 \text{ ng L}^{-1}$. Οι Gros et al. αναφέρουν ανίχνευση του σε θαλάσσια νερά στην Ισπανία σε συγκέντρωση 4 ng L^{-1} [244].

Το αντιψυχωσικό clozapine, το οποίο έχει μελετηθεί σπάνια και μη συστηματικά στα επιφανειακά νερά και ιζήματα, ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα δείγμα νερού στη Νορβηγία. Στον ποταμό Ugmeni στη Νότια Αφρική έχει αναφερθεί ανίχνευση του στο 100% των δειγμάτων νερού και ιζήματος με συγκεντρώσεις από $0,39$ έως $13,89 \text{ μg L}^{-1}$ και από $17,38$ έως $26,65 \text{ ng g}^{-1}$ αντίστοιχα [181].

Το αντιψυχωσικό risperidone εμφάνισε υψηλό ποσοστό ανίχνευσης στα νερά (45%), ενώ ανιχνεύθηκε σε ένα μόνο δείγμα ιζήματος, σε συγκέντρωση $25,7 \text{ ng g}^{-1}$. Έχει ανιχνευθεί

σε ποικίλες συγκεντρώσεις σε ποτάμια ύδατα: $<0,25 \text{ ng L}^{-1}$ [332] και γενικά οι συγκεντρώσεις του στα νερά κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα [333]. Οι πληροφορίες για την ανίχνευσή του σε θαλάσσια συστήματα είναι περιορισμένες. Δεν αναφέρεται η ανίχνευσή του σε θαλάσσια ιζήματα, ενώ έχει ανιχνευθεί σε θαλάσσια νερά στη Νότια Καλιφόρνια με μέγιστη συγκέντρωση 1 ng L^{-1} [334].

Το αντιψυχωσικό amisulpride ανιχνεύθηκε στο 12% των δειγμάτων (μέγιστη συγκέντρωση $6,5 \text{ ng L}^{-1}$) και σε κανένα από τα δείγματα ιζήματος. Έχει ανιχνευθεί σε συγκεντρώσεις $<0,2-5,5 \text{ ng L}^{-1}$ εμφανίζοντας υψηλά ποσοστά θετικών ανιχνεύσεων (77,3%).

Τέλος, το αντιψυχωσικό olanzapine ανιχνεύθηκε μόνο σε δύο δείγματα νερού. Γενικά, η συχνότητα ανίχνευσής φαίνεται να είναι χαμηλή, τόσο στα ποτάμια όσο και στα θαλάσσια ύδατα [244].

Πίνακας 10.14 Ποσοστό (%) θετικών ανιχνεύσεων και συγκεντρώσεις (ng L^{-1}) των φαρμακευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά νερά και στα ιζήματα

	ΝΕΡΑ (n=33)					% θ.α.	ΙΖΗΜΑΤΑ (n=29)			
	% θ.α.	C _{min}	C _{max}	C _{mean}	C _{median}		C _{min}	C _{max}	C _{mean}	C _{median}
ΨΥΧΙΑΤΡΙΚΑ										
Amisulpride	12	δ.α.	6,5	κ.ο.α.	κ.ο.α.	0			-	
Amitriptyline	12	δ.α.	3,7	κ.ο.π.	κ.ο.α.	3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Carbamazepine	48	δ.α.	11,0	1,28	κ.ο.α.	7	δ.α.	14,7	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Citalopram	18	δ.α.	4,1	κ.ο.α.	κ.ο.α.	7	δ.α.	10,9	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Clozapine	3	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.	0			-	
Olanzapine	6	δ.α.	6,0	κ.ο.α.	κ.ο.α.	0			-	
Risperidone	45	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	κ.ο.π.	3	δ.α.	25,7	κ.ο.α.	κ.ο.α.
Venlafaxine	48	δ.α.	30,8	2,05	κ.ο.α.	3	δ.α.	4,9	κ.ο.α.	κ.ο.α.
ΑΝΑΛΓΗΤΙΚΑ										
Paracetamol	39	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.	7	δ.α.	κ.ο.π.	κ.ο.α.	κ.ο.α.

Στον Πίνακα 10.15 συνοψίζονται τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την ανίχνευση φαρμακευτικών ενώσεων σε νερά και ιζήματα από παράκτιες περιοχές παγκοσμίως.

Πίνακας 10.15 Συγκεντρώσεις φαρμακευτικών ενώσεων σε νερά και ιζήματα παράκτιων περιοχών παγκοσμίως

	ΝΕΡΑ			ΙΖΗΜΑΤΑ		
	Συγκέντρωση (ng L ⁻¹)	Παράκτια περιοχή	Αναφορά	Συγκέντρωση (ng g ⁻¹)	Παράκτια περιοχή	Αναφορά
Atenolol	80 – 293 (50)	Coastal Harbours, Βέλγιο (C)	[335]			
	8 – 38	Μαγιόρκα, Ισπανία (C)	[111]			
	17 (0,5)	Στοκχόλμη, Σουηδία (C)	[330]			
Amitriptyline	0,6 (0,3)	San Francisco, ΗΠΑ (C)	[336]	0,45	Puget Sound, Washington (E)	[328]
Bezafibrate	5 – 18 (5)	Coastal Harbours, Βέλγιο(C)	[335]	0,1 – 0,2 (0,1)	Auckland, Νέα Ζηλανδία (E)	[324]
	6 – 11	Halifax, Καναδάς (E)	[26]			
Carbamazepine	4 – 321 (5)	Coastal Harbours, Βέλγιο(C)	[335]	0,04 – 0,12 (0,1)	Κόλπος Νότιας Καρολίνα, ΗΠΑ (C)	[326]
	1 to 6 (1)	Costa Rica (C)	[337]			
	12	Ακτές Μεσογείου, Γαλλία (C)	[338]	9 – 15 (0,5)	Cadiz, Ισπανία (C)	[186]
	2	German Bight, Γερμανία (C)	[339]			
	50 – 1400 (4)	Ιρλανδία (C)	[21]			
	<0,3 – 10,9	Σιγκαπούρη (C)	[340]			
	4 – 26 (1)	Στοκχόλμη, Σουηδία (C)	[330]			
	3,8 (2)	Νοτιοδυτική ακτή Ταϊβάν (C)	[23]			
	0,9 (5)	Νότια Καλιφόρνια, ΗΠΑ (C)	[334]			
	5,2 – 44,2 (1,4)	San Francisco, ΗΠΑ (C)	[336]			
	1,6– 12,4 (2,5)	Honfleur, Seine, Γαλλία (E)	[341]			
	23,8 – 133 (17)	Tamagawa, Ιαπωνία (E)	[342]			
	3 – 10	Oslofjord, Νορβηγία (E)	[343]			
	0,37 – 178 (0,03)	Duro, Πορτογαλία (E)	[20]			
	1,1 – 30	Chesapeake, ΗΠΑ (E)	[344]			
2,7 – 77,9 (1,0)	Jamaica Bay, Νέα Υόρκη (E)	[345]				
17 – 675	Yangtze, Κίνα(E)	[346]				
6,65 (1,6)	Pichavaram, Ινδία (E)	[347]				
Citalopram	4 (0,5)	Στοκχόλμη, Σουηδία (C)	[330]			
Diazepam	0,5 (0,3)	Στοκχόλμη, Σουηδία (C)	[330]			

	ΝΕΡΑ			ΙΖΗΜΑΤΑ		
	Συγκέντρωση (ng L ⁻¹)	Παράκτια περιοχή	Αναφορά	Συγκέντρωση (ng g ⁻¹)	Παράκτια περιοχή	Αναφορά
	3,65 (1,3)	Ποταμός Duro, Πορτογαλία (Ε)	[20]			
Cimetidine	15	Μαγιόρκα, Ισπανία (C)	[111]	0.3 – 4.5 (0.3)	Auckland, Νέα Ζηλανδία (Ε)	[324]
	0,5 – 67,2 (0,1)	Jamaica Bay, Νέα Υόρκη (Ε)	[345]			
Fluoxetine	2,6	Chesapeake, ΗΠΑ (Ε)	[344]			
	7,4 – 596	Jamaica Bay, Νέα Υόρκη (Ε)	[345]			
Paracetamol	15–1952 (15)	Costa Rica (C)	[337]	6,2– 10,8 (6,1)	Auckland, Νέα Ζηλανδία (Ε)	[324]
	2,6 – 16,7 (2)	Νοτιοδυτική ακτή Ταϊβάν (C)	[23]	96 – 100 (4)	Cadiz, Ισπανία (C)	[186]
	11 (5)	Νότια Καλιφόρνια, ΗΠΑ (C)	[334]			
	1,9–3,3	Biscayne Bay – Farallones, ΗΠΑ (C)	[344]			–
	10,2 – 18 (10)	Charleston Harbor, Νότια Καρολίνα	[348]			
	2,2	Chesapeake, ΗΠΑ (Ε)	[344]			
	3,2 – 156 (1,5)	Jamaica Bay, Νέα Υόρκη (Ε)	[345]			
Risperidone	1 (0,3)	Νότια Καλιφόρνια, ΗΠΑ (C)	[334]			
Ketoprofen	1,8 – 5(1,7)	Βόρεια Ταϊβάν	[349]			
	23,3 (3,5)	Νοτιοδυτική ακτή Ταϊβάν (C)	[23]			
	6 – 12 (11)	Halifax, Καναδάς (Ε)	[26]			
	6,2 – 33,2 (0,9)	Honfleur, Seine, Γαλλία (Ε)	[341]			
	0,6 – 29,7 (0,5)	Tamagawa, Ιαπωνία (Ε)	[342]			
Fenofibrate				1,0 – 2,3 (1,3)	Auckland, Νέα Ζηλανδία (Ε)	[324]
				0,18 – 0,2 (0,1)	Cadiz, Ισπανία (C)	[186]

*Σε παρένθεση δίνεται το όριο ποσοτικοποίησης, όπου ήταν διαθέσιμο

10.6 Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας

Για την προστασία του ανθρώπου, των υδάτινων και χερσαίων οργανισμών και του ατμοσφαιρικού αέρα από την παρουσία εν δυνάμει επιβλαβών οργανικών μικρορύπων, συστήνεται από την ΕΕ η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου (environmental risk assessment, ERA) για την οποία έχει προταθεί η μέθοδος του πηλίκου επικινδυνότητας (risk quotient, RQ) για διάφορα διαμερίσματα του περιβάλλοντος, ως εξής [350, 351]:

(α) Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας εσωτερικών υδάτων (inland risk assessment).

Αφορά τα υδάτινα οικοσυστήματα (συμπεριλαμβανομένων και τα ιζήματων), τα χερσαία οικοσυστήματα, οι ανώτεροι θηρευτές, οι μικροοργανισμοί στις ΜΕΥΑ και η ατμόσφαιρα.

(β) Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας θαλάσσιων υδάτων (marine risk assessment).

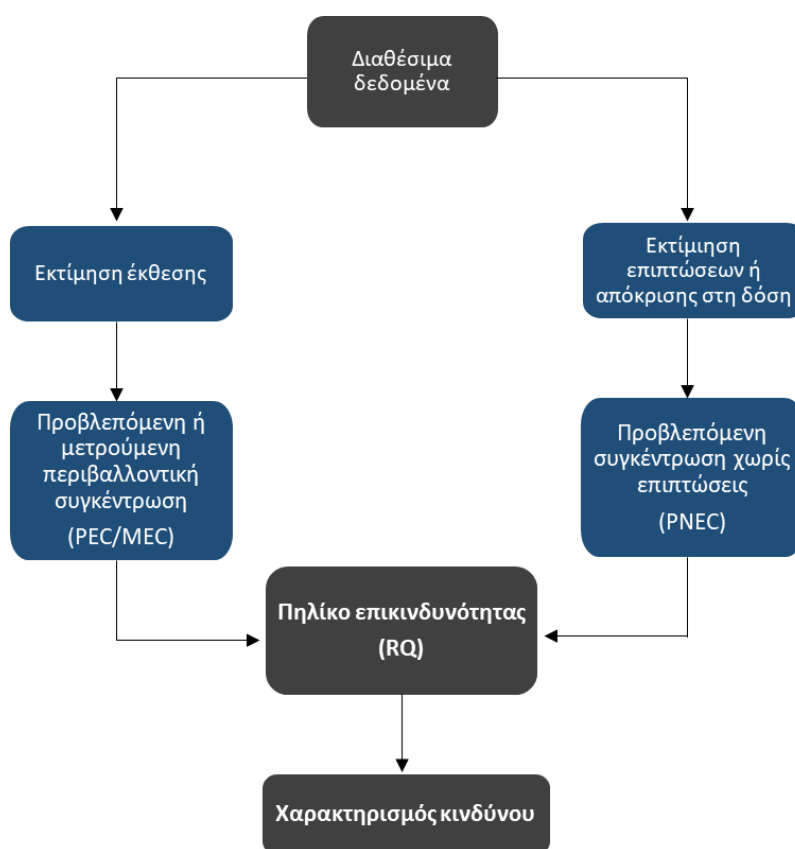
Η περίπτωση αυτή αφορά μόνο το υδάτινο οικοσύστημα (συμπεριλαμβανομένων των ιζημάτων) και τους ανώτερους θηρευτές. Η σχέση μεταξύ των διαφορετικών μελετώμενων οργανισμών για το χαρακτηρισμό του κινδύνου στα διαφορετικά τμήματα του περιβάλλοντος φαίνεται στον Πίνακα 10.16

Πίνακας 10.16 Σχέση μεταξύ διαφορετικών οργανισμών στόχων για το χαρακτηρισμό του κινδύνου σε διαφορετικά τμήματα του περιβάλλοντος

Στόχος	Μέσο έκθεσης (PEC)	PNEC
Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας		
υδάτινοι οργανισμοί	επιφανειακά ύδατα	PNEC _{water}
βενθικοί οργανισμοί	ιζήματα	PNEC _{sed}
χερσαίοι οργανισμοί	γεωργικά εδαφη	PNEC _{soil}
αμιγώς ιχθυοφάγα θηράματα	ψάρια	PNEC _{coral} από NOAEL _{avian/mammalian}
σκουληκοφάγα θηράματα	γαιοσκώληκες	PNEC _{coral} από NOAEL _{avian/mammalian}
μικροοργανισμοί	δεξαμενές αερισμού ΜΕΥΑ	PNEC _{microorganisms}
Λοιπά επιφανειακά ύδατα		
υδάτινοι οργανισμοί	θαλάσσια ύδατα	PNEC _{seawater}
βενθικοί οργανισμοί	θαλάσσια ιζήματα	PNEC _{marine sed}
αμιγώς ιχθυοφάγα θηράματα	ψάρια	PNEC _{coral predators}
ανώτεροι θηρευτές	ιχθυοφάγα θηράματα	PNEC _{coral top predators}

Σύμφωνα με το έγγραφο τεχνικής καθοδήγησης της ΕΕ [350], για τον υπολογισμό του RQ με στόχο την εκτίμηση της οξείας τοξικότητας (acute toxicity), οι απαραίτητες πληροφορίες είναι: (α) τα δεδομένα οξείας τοξικότητας (EC₅₀/LC₅₀) για τις υπό μελέτη ουσίες, που συλλέγονται από τη βιβλιογραφία ή από κατάλληλο λογισμικό (π.χ. ECOSAR), για τρεις κατηγορίες οργανισμών που ζουν στο υδάτινο περιβάλλον (π.χ. ψάρια, ζωοπλαγκτόν, φύκη)

και (β) η (μέση ή μέγιστη) μετρούμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση (measured environmental concentration, MEC) ή η προβλεπόμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση (predicted environmental concentration, PEC) του ρύπου. Σημειώνεται ότι σε περίπτωση που τα δεδομένα τοξικότητας από τη βιβλιογραφία είναι περισσότερα από ένα, επιλέγεται η χαμηλότερη τιμή ώστε να εκτιμηθεί ο περιβαλλοντικός κίνδυνος για το χειρότερο σενάριο (worst-case scenario). Η διαδικασία που ακολουθείται για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου περιγράφεται σχηματικά στο Σχήμα 10.28.



Σχήμα 10.28 Πορεία εκτίμησης περιβαλλοντικού κινδύνου

Με την ολοκλήρωση της συλλογής των παραπάνω πληροφοριών, μπορεί να πραγματοποιηθεί ο υπολογισμός του πηλίκου επικινδυνότητας (RQ). Αρχικά υπολογίζεται η προβλεπόμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση χωρίς επιπτώσεις (predicted non-effect concentration, PNEC) με βάση την Εξίσωση 10.1.

$$PNEC = \frac{EC_{50} \text{ ή } LC_{50}}{AF} \quad (10.1)$$

Ο συντελεστής αβεβαιότητας (assessment factor, AF) διαφοροποιείται ως εξής: Όταν το λιγότερο μια βραχυπρόθεσμη τιμή δεδομένων τοξικότητας $L(E)C_{50}$ από τα τρία τροφικά επίπεδα είναι διαθέσιμη εφαρμόζεται ένας συντελεστής αβεβαιότητας 1000, όταν μια μακροπρόθεσμη τιμή δεδομένων τοξικότητας NOEC είναι διαθέσιμη για κάποιο από τα τρία τροφικά επίπεδα τότε εφαρμόζεται ένας συντελεστής αβεβαιότητας 100, όταν οι μακροπρόθεσμες τιμές NOEC είναι διαθέσιμες για δύο από τα τρία τροφικά επίπεδα τότε εφαρμόζεται ένας συντελεστής αβεβαιότητας 50 και τέλος όταν και οι μακροπρόθεσμες τιμές NOEC είναι διαθέσιμες και για τα τρία τροφικά επίπεδα τότε εφαρμόζεται ένας συντελεστής αβεβαιότητας 10. Στη συνέχεια υπολογίζεται η τιμή του πηλίκου RQ: (Εξίσωση 10.2):

$$RQ = \frac{MEC \text{ ή } PEC}{PNEC} \quad (10.2)$$

Η τιμή MEC, αντιστοιχεί στη μέγιστη συγκέντρωση της ουσίας που ανιχνεύθηκε στα δείγματα νερού, με σκοπό την εκτίμηση του κινδύνου στις πιο ακραίες περιπτώσεις. Οι τιμές που προκύπτουν συγκρίνονται στη συνέχεια με τα επίπεδα ανησυχίας και όταν το πηλίκο RQ είναι μεγαλύτερο ή ίσο από τη μονάδα τότε θεωρείται ότι υπάρχει «υψηλός ή πολύ υψηλός κίνδυνος» για το συγκεκριμένο είδος ($RQ \geq 1$). Τα υπόλοιπα επίπεδα ανησυχίας αναφέρονται σε εύρος $0,01 < RQ < 0,1$, οπότε υπάρχει «χαμηλός κίνδυνος», και σε εύρος $0,1 < RQ < 1$, οπότε υπάρχει «μεσαίος κίνδυνος» [216, 350, 352].

Ο υπολογισμός της προβλεπόμενης συγκέντρωσης χωρίς περιβαλλοντικές επιπτώσεις για τη χερσαία τοξικότητα ($PNEC_{soil, terrestrial}$) των προσδιοριζόμενων ενώσεων βασίζεται στα βιβλιογραφικά δεδομένα για χερσαίους οργανισμούς. Ωστόσο, τα δεδομένα για το χερσαίο περιβάλλον είναι περιορισμένα και συνήθως υπολογίζονται οι τιμές της προβλεπόμενης συγκέντρωσης χωρίς περιβαλλοντικές επιπτώσεις για την υδάτινη τοξικότητα ($PNEC_{soil, aquatic}$) βάσει της Εξίσωσης 10.1.

10.6.1 Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας σε νερά βάσει δεδομένων για την υδάτινη οξεία τοξικότητα

Για την εκτίμηση του οικοτοξικολογικού κινδύνου που σχετίζεται με την παρουσία των ανιχνευθέντων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά, υπολογίστηκαν οι τιμές RQ χρησιμοποιώντας οικοτοξικολογικά δεδομένα οξείας τοξικότητας για τρεις κατηγορίες υδάτινων οργανισμών (ψάρια, ασπόνδυλα και φύκη), τα οποία δίνονται στον Πίνακα 10.17. Στη συνέχεια, στον Πίνακα 10.18 δίνονται οι μέγιστες περιβαλλοντικές

συγκεντρώσεις των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν, καθώς και οι τιμές των PNEC και RQ που υπολογίστηκαν για ψάρια, ασπόνδυλα και φύκη. Οι τιμές των PNEC υπολογίστηκαν με βάση τα δεδομένα τοξικότητας (LC_{50} ή EC_{50}) για τον υπολογισμό του PNEC δίνονται στον Πίνακα 10.17, ενώ για τις ενώσεις όπου η μέγιστη συγκέντρωση ήταν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, ως μέγιστη συγκέντρωση τέθηκε η τιμή MQL/2.

Πίνακας 10.17 Βιβλιογραφικά δεδομένα για την οξεία τοξικότητα για τις ανιχνευθείσες φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις

	Ψάρια			Ζωοπλαγκτόν			Φυτοπλαγκτόν		
	LC ₅₀ /EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	Οργανισμός	Αναφορά	LC ₅₀ /EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	Οργανισμός	Αναφορά	LC ₅₀ /EC ₅₀ (mg L ⁻¹)	Οργανισμός	Αναφορά
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ									
Acetamiprid ¹	-	-	-	0,05	<i>G. Pulex</i>	-	-	-	-
Chlorantraniliprole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlorpyrifos ¹	0,0008	<i>B. Plebejus</i>		0,00007			2	<i>S. Bijugatus</i>	
Diuron ¹	0,23	<i>O. Tshawytscha</i>		0,4	<i>D. Magna</i>		0,0024	<i>P. Subcapitata</i>	
Imazalil ¹	1,74	<i>O. Mykiss</i>		2,6	<i>D. Magna</i>				
Metalaxyl ¹	13,6	<i>O. Mykiss</i>		0,64	<i>A. Bahia</i>		4,828	<i>S. Capricornutum</i>	
Myclobutanil ¹	2,4	<i>L. Macrochirus</i>		0,24	<i>M. Bahia</i>		0,83	<i>S. Capricornutum</i>	
Prometryn ¹	2,067	<i>Danio Rerio</i>		1,7	<i>A. Bahia</i>		0,022	<i>Plankton</i>	
S-metolachlor ¹	2,882	<i>Poecilia reticulata</i>		4,9	<i>A. Bahia</i>		0,008	<i>S. Capricornutum</i>	
Tebupirimfos ¹	0,0348	<i>L. Macrochirus</i>		0,00663	<i>A. Bahia</i>		-		
Thiamethoxam ¹	-	-	-	0,879			-	-	
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ									
Amitriptyline		-			-		0,000086		[352]
Carbamazepine	35,4		[353]	76,3	<i>D. Magna</i>	[353]	70		[354]
Citalopram	26		[355]	2,15	<i>Daphnid</i>	[355]	1,47		[355]
Olanzapine ²	1,74	<i>O. Mykiss</i>	[356]	8	<i>D. Magna</i>	[356]	>14,1		[356]
Paracetamol	40		[354]	9,2	<i>D. Magna</i>	[354]	134	<i>P. Subcapitata</i>	[354]
Paroxetine	28,6		[355]	0,58	<i>C. Dubia</i>	[355]	0,14	-	[85]
Risperidone	61	<i>L. Macrochirus</i>	[356]	6	-	[356]	10	<i>P. subcapitata</i>	
Venlafaxine ³	100	<i>O. Mykiss</i>	[356]	38	<i>D. Magna</i>	[356]	4,8	<i>P. Subcapitata</i>	[356]

-.: Μη διαθέσιμη πληροφορία

¹ PAN Pesticide Database (<http://www.pesticideinfo.org/>)

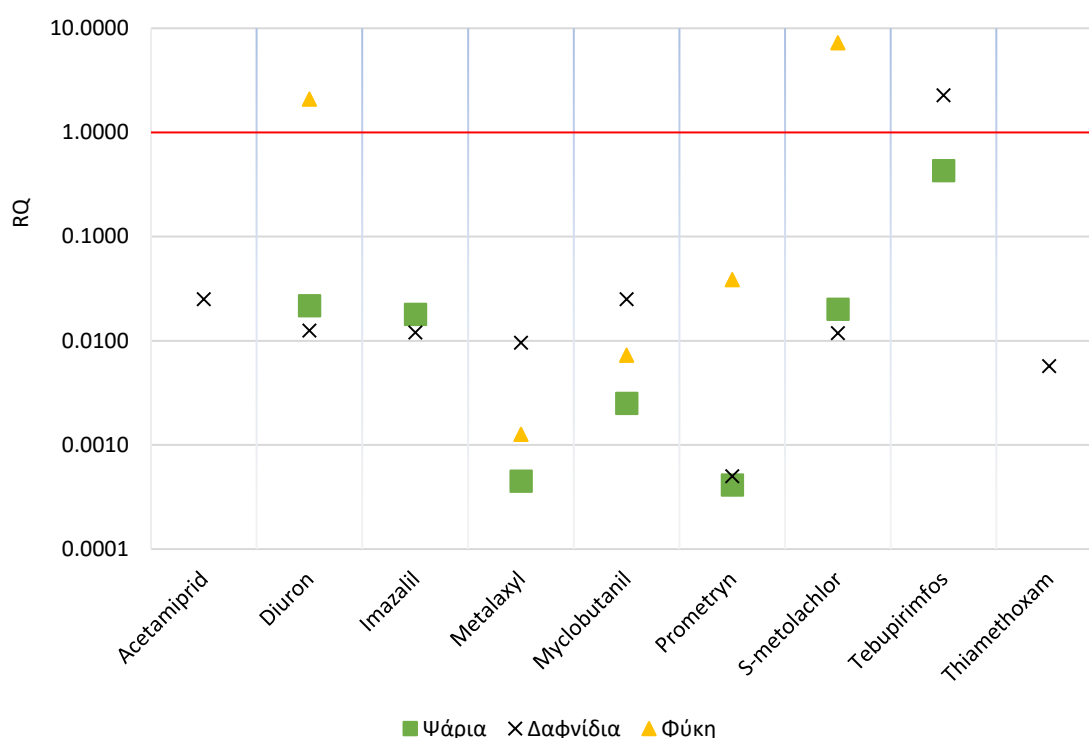
²<http://www.americanregent.com/documents/Product93MSDS.pdf>

³http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/WP00005.pdf

Πίνακας 10.18 Μέγιστες περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις (MECs) για τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν, PNECs και RQ για ψάρια, ασπόνδυλα και φύκη

	MEC (ng L ⁻¹)	Ψάρια		Ασπόνδυλα		Φύκη	
		PNEC _{fish} (ng L ⁻¹)	RQ _{fish}	PNEC _{daphnids} (ng L ⁻¹)	RQ _{daphnids}	PNEC _{algae} (ng L ⁻¹)	RQ _{algae}
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ							
Acetamiprid ¹	1,25	-	-	50,00	0,03	-	-
Chlorantraniliprole	5,40	-	-	-	-	-	-
Diuron ¹	5,00	230,00	0,02	400,00	0,01	2,40	2,08
Imazalil	31,20	1740,00	0,02	2600,00	0,01	<0,01	
Metalaxyl	6,10	13600,00	<0,01	640,00	0,01	4828,00	<0,01
Myclobutanil ¹	6,00	2400,00	<0,01	240,00	0,03	830,00	0,01
Prometryn ¹	0,85	2067,00	<0,01	1700,00	<0,01	22,00	0,04
S-metolachlor	57,90	2882,00	0,02	4900,00	0,01	8,00	7,24
Tebupirimfos ¹	15,00	34,80	0,43	6,63	2,26	-	-
Thiamethoxam ¹	5,00	-	-	879,00	0,01	-	-
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ							
Amitriptyline	3,7	0		-	-	0,086	43,02
Carbamazepine	11	35400	<0,01	76300	<0,01	70000	<0,01
Citalopram	4,1	26000	<0,01	2150	<0,01	1470	<0,01
Olanzapine	6	1740	<0,01	8000	<0,01	14100	<0,01
Paracetamol ¹	5	40000	<0,01	9200	<0,01	134000	<0,01
Risperidone ¹	1	61000	<0,01	6000	<0,01	10000	<0,01
Venlafaxine	30,8	100000	<0,01	38000	<0,01	4800	0,01

Στα Σχήματα 10.29 και 10.30 αποτυπώνεται η εκτίμηση της οξείας τοξικότητας για τις φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν, για τα τρία τροφικά επίπεδα της υδρόβιας ζωής. Οι υπολογισμοί του πηλίκου επικινδυνότητας πραγματοποιήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τη συνολικά μεγαλύτερη συγκέντρωση στην οποία ανιχνεύθηκαν οι μελετώμενες ενώσεις (worst-case-scenario). Οι ενώσεις για τις οποίες δεν υπήρχαν διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα οξείας τοξικότητας έχουν παραλειφθεί.

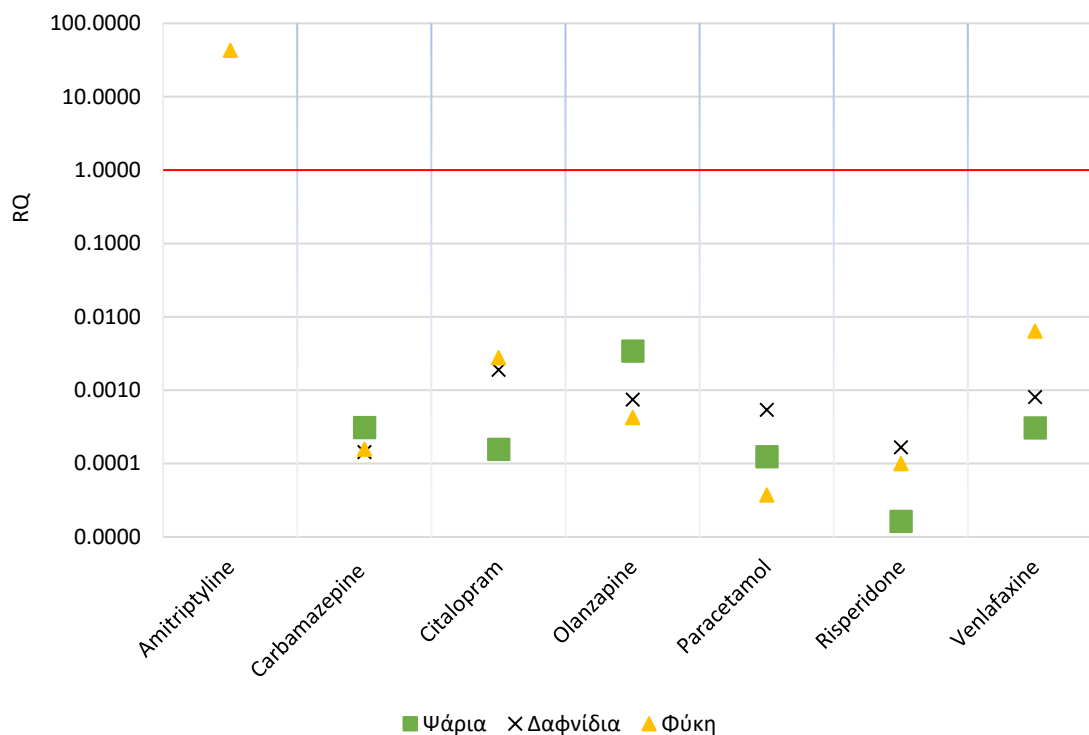


Σχήμα 10.29 RQ για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις σε ψάρια, ασπόνδυλα και φύκη

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, στα ψάρια καμία ένωση δεν εμφάνισε υψηλή τοξικότητα ($RQ < 1$). Στα ασπόνδυλα εμφάνισε υψηλή τοξικότητα μόνο το tebuirimfos ($RQ = 2,23$). Στα φύκη, εμφάνισαν υψηλή τοξικότητα τα diuron και S-metolachlor ($RQ = 2,08$ και $7,24$ αντίστοιχα). Για το tebuirimfos δεν υπάρχουν σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα για να συγκριθεί η υψηλή τιμή του, ενώ για τα diuron και S-metolachlor, έχει καταγραφεί υψηλή οξεία τοξικότητα [280, 282]. Γενικά, οι τιμές RQ ήταν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις (80%) πολύ χαμηλότερες τις μονάδας ($RQ < 0,01$), παραπέμποντας στο «χαμηλό επίπεδο κινδύνου».

Όσον αφορά στις φαρμακευτικές ενώσεις, όλες εμφάνισαν πολύ χαμηλές τιμές RQ ($< 0,01$), με εξαίρεση το ψυχιατρικό φάρμακο amitriptyline για τα φύκη, όπου το πηλίκο

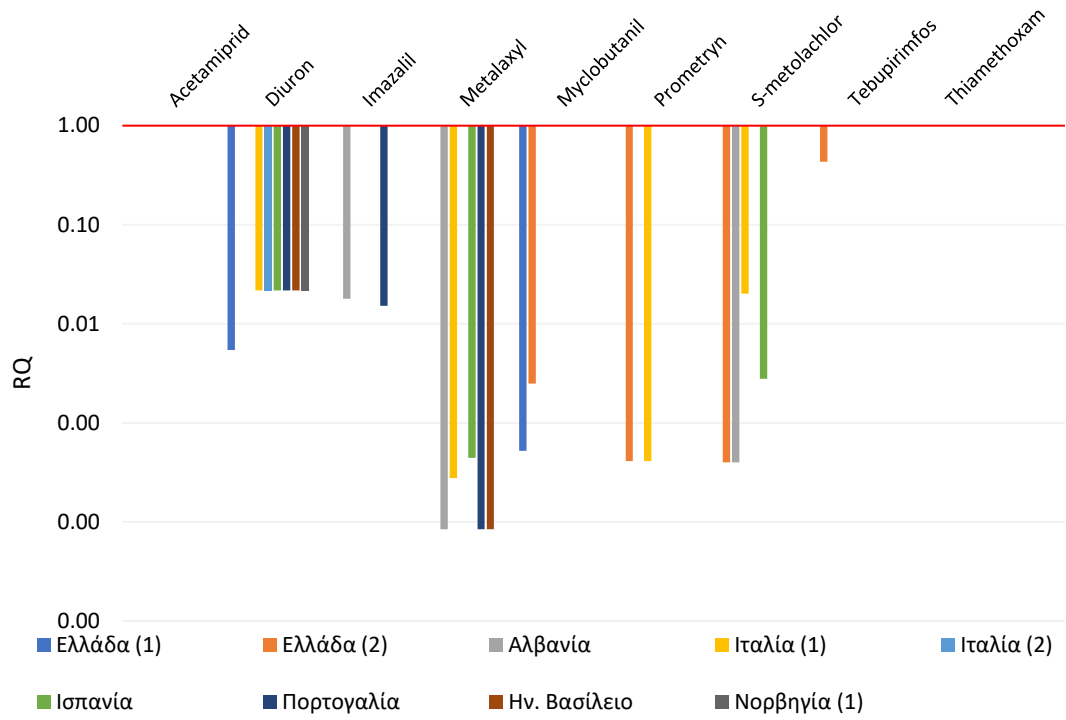
βρέθηκε ίσο με 43,02, υπερβαίνοντας κατά πολύ τη μονάδα και παραπέμποντας σε πολύ υψηλό κίνδυνο.



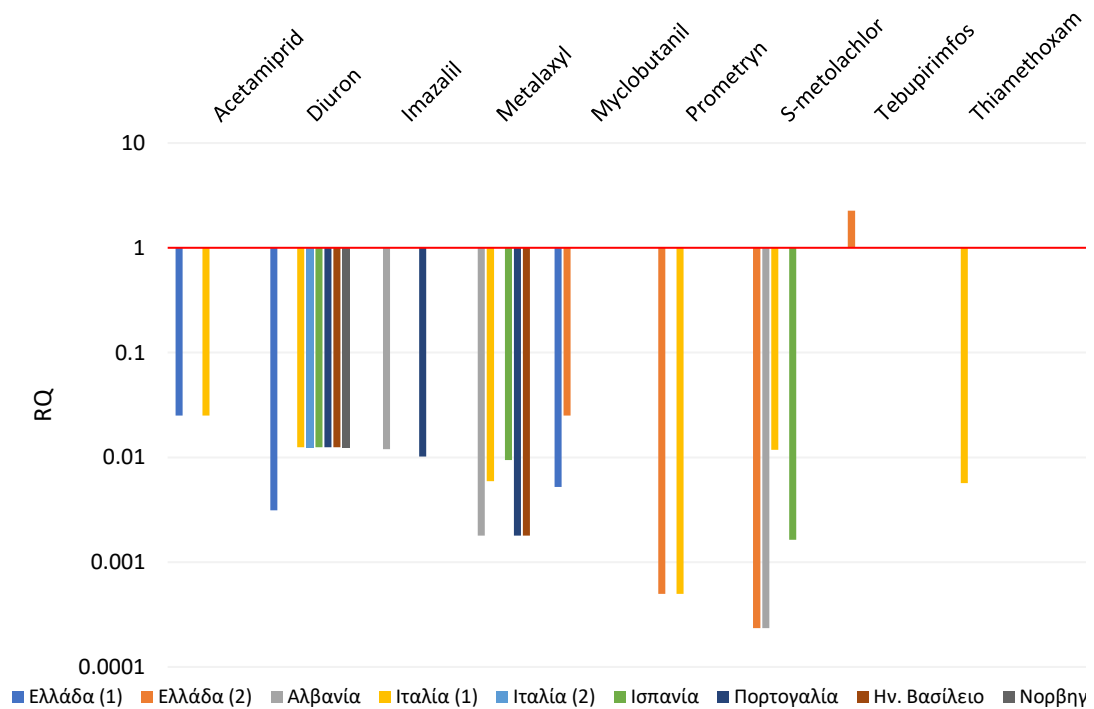
Σχήμα 10.30 RQ για τις φαρμακευτικές ενώσεις σε ψάρια, ασπόνδυλα και φύκη

Αφού πραγματοποιήθηκε μια πρώτη εκτίμηση για την εκτίμηση της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας βάσει των συνολικά υψηλότερων συγκεντρώσεων των μελετώμενων ενώσεων, η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε και για τα επιμέρους υδάτινα συστήματα που μελετήθηκαν, όταν υπήρχαν διαθέσιμα τα δεδομένα τοξικότητας, ώστε να προσδιοριστούν αυτά που διατρέχουν το μεγαλύτερο κίνδυνο. Στις περιπτώσεις όπου η μέγιστη συγκέντρωση σε κάθε υδάτινο σύστημα ήταν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, για τον υπολογισμό του πηλίκου ως MEC τέθηκε η τιμή του μισού του ορίου ποσοτικοποίησης (MQL/2). Στο Σχήμα 10.31 αποτυπώνονται τα αποτελέσματα για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις.

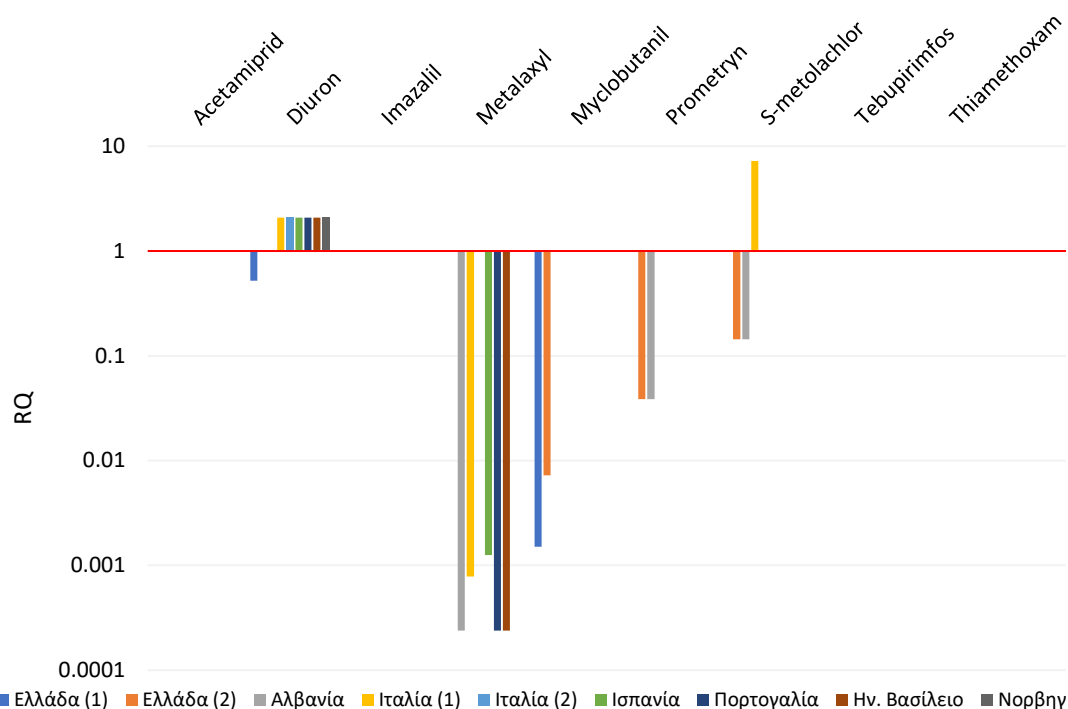
Ανίχνευση φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε υδάτινα σώματα της Ευρώπης



(α)



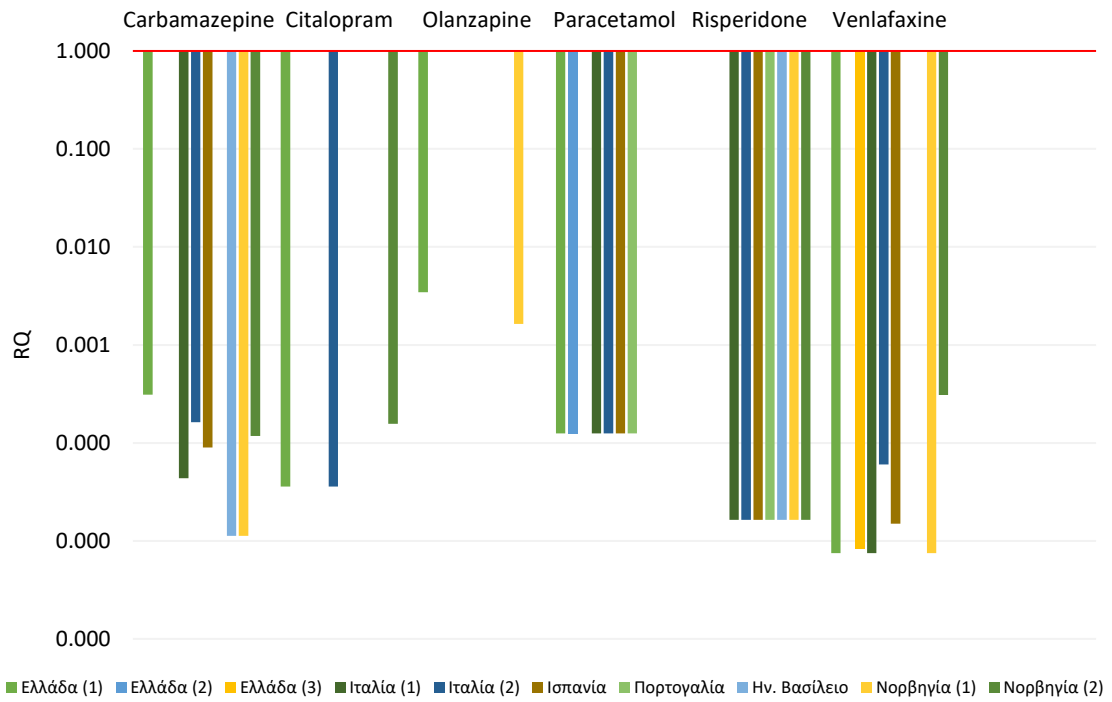
(β)



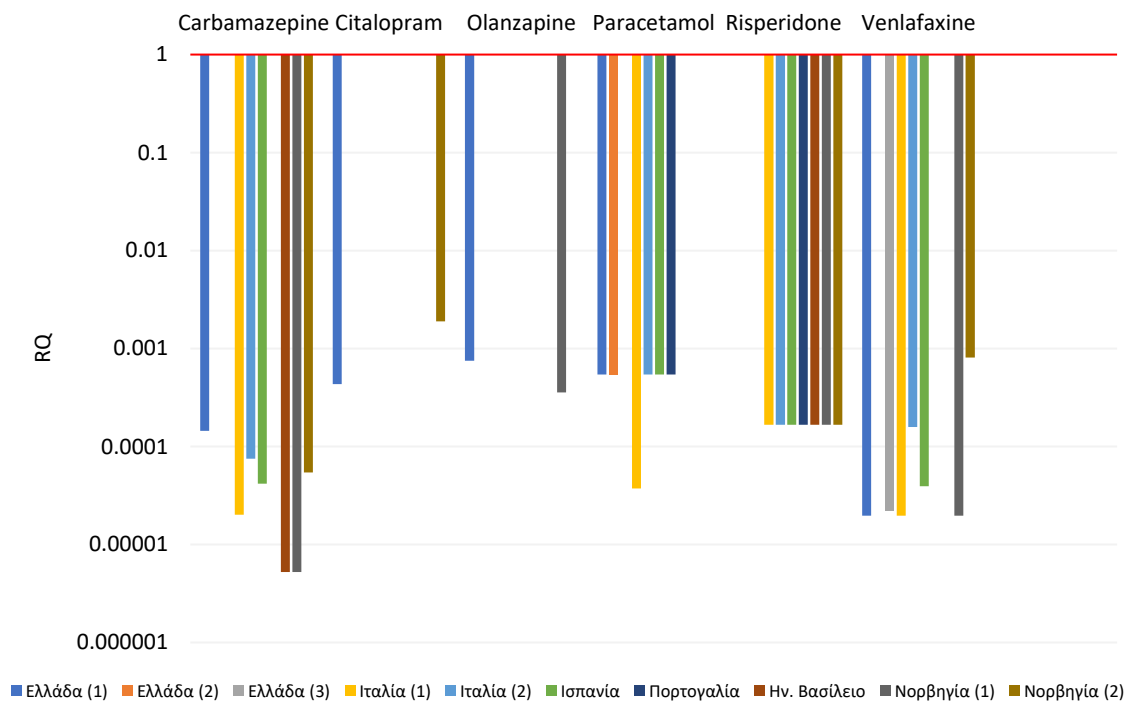
(γ)

Σχήμα 10.31 RQ φυτοπροστατευτικών ενώσεων για (α) ψάρια (β) ασπόνδυλα και (γ) φύκη
 Ελλάδα (1) = ΛΑΠ Αράχθου, Ελλάδα (2) = ΛΑΠ Λούρου, Ιταλία (1) = Sacca di Goro, Ιταλία (2) = Λιγυρία, Νορβηγία (1) = ιχθυοκαλλιέργειες

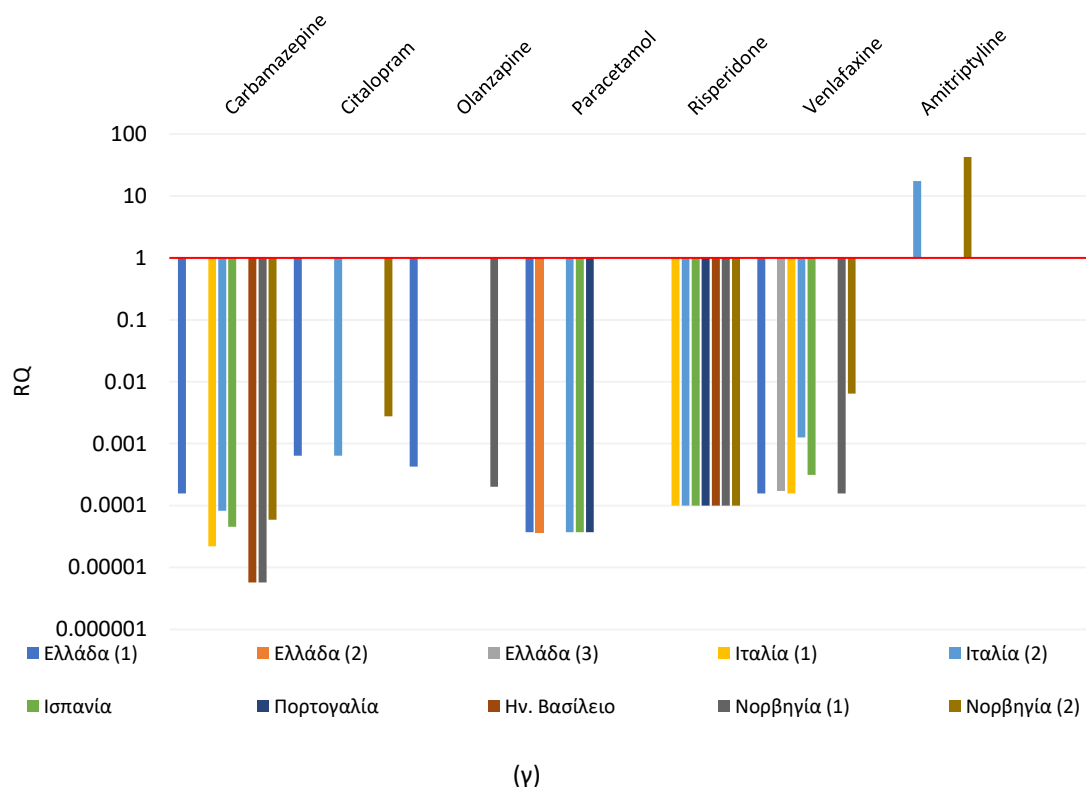
Ο χαμηλότερος κίνδυνος αφορά τα ψάρια, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές RQ ήταν μικρότερες από τη μονάδα. Καταγράφεται μια τιμή $RQ > 0,1$, για το tebuirimfos στη ΛΑΠ Λούρου, σηματοδοτώντας μεσαίο κίνδυνο. Όσον αφορά τα ασπόνδυλα, η υψηλότερη τιμή υπολογίστηκε για την ίδια ένωση, στο ίδιο υδάτινο σύστημα (υψηλός κίνδυνος). Για τα φύκη καταγράφεται υψηλός κίνδυνος εξαιτίας του diuron σε όλα τα σημεία, με εξαίρεση τη ΛΑΠ Αράχθου που ο κίνδυνος είναι μεσαίος. Ακόμα υψηλότερος κίνδυνος διατρέχεται λόγω του S-metolachlor στη λιμνοθάλασσα Sacca di Goro και μεσαίος στην Αλβανία από την ίδια ένωση. Οι τιμές που υπολογίστηκαν για την οξεία τοξικότητα σε κάθε υδάτινο σύστημα που μελετήθηκε, ακολουθούν την τάση που υπολογίστηκε αρχικά, με τις συνολικές μέγιστες συγκεντρώσεις, για όλα τα σημεία. Στο Σχήμα 10.32 αποτυπώνονται τα αποτελέσματα για τις φαρμακευτικές ενώσεις.



(α)



(β)



Σχήμα 10.32 RQ φαρμακευτικών ενώσεων για (α) ψάρια (β) ασπόνδυλα και (γ) φύκη
 Ελλάδα (1) = ΛΑΠ Αράχθου, Ελλάδα (2) = ΛΑΠ Λούρου, Ιταλία (1) = Sacca di Goro, Ιταλία (2) = Λιγυρία, Νορβηγία (1) = ιχθυοκαλλιέργειες

Για τις φαρμακευτικές ενώσεις, ο οικοτοξικολογικός κίνδυνος είναι χαμηλός στη συντριπτική πλειοψηφία των υδάτινων συστημάτων που μελετήθηκαν. Εξάιρεση αποτέλεσε η ένωση amitriptyline, για την οποία υπολογίστηκαν RQ ίσα με 17,4 στην Ιταλία και 42,8 στη Νορβηγία. Μέχρι σήμερα, στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν δεδομένα για να συγκριθούν οι τιμές αυτές στα τρία επίπεδα οργάνωσης της υδρόβιας ζωής. Ωστόσο, σύμφωνα με έρευνα που διεξήχθη από το Τμήμα Υγείας της Minnesota, για την παρουσία του στο πόσιμο νερό, επισημαίνεται ότι σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, η ανθρώπινη υγεία δε διατρέχει κίνδυνο [357].

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό δεκαοκτώ (18) φυτοπροστατευτικών και είκοσι πέντε (25) φαρμακευτικών ενώσεων σε ποτάμια και θαλάσσια νερά και ιζήματα. Στη συνέχεια, οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν στην ανάλυση νερών και ιζημάτων από την Ελλάδα, την Αλβανία, την Ιταλία, την Ισπανία, την Πορτογαλία, τη Νορβηγία και το Ηνωμένο Βασίλειο, προερχόμενων από περιοχές όπου δραστηριοποιούνται υδατοκαλλιέργειες, ενώ εκτιμήθηκε τελικώς και η περιβαλλοντική τους επικινδυνότητα.

Τα κύρια κριτήρια για την επιλογή των μελετώμενων ενώσεων ήταν η συχνότητα εφαρμογής για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις και η πώληση-κατανάλωση για τις φαρμακευτικές ενώσεις. Η αποδεδειγμένη παρουσία και εν δυνάμει τοξικότητα των ενώσεων στο περιβάλλον λήφθηκε επίσης υπόψιν, προκειμένου να συμπεριληφθούν ενώσεις που χρήζουν συστηματικής μελέτης. Επίσης, επιλέχθηκαν ενώσεις (και από τις δύο κατηγορίες) για τις οποίες οι πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη τους στο περιβάλλον είναι ανεπαρκείς, προκειμένου να τύχουν μεγαλύτερης προσοχής.

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής

διακριτικής ικανότητας (Ultra High Pressure Liquid Chromatography–High-resolution Mass Spectrometry, UHPLC–HRMS) και συγκεκριμένα με τον υβριδικό αναλυτή μάζας LTQ/Orbitrap MS.

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας του συστήματος UHPLC–LTQ/Orbitrap MS, οι επιλεγμένες ενώσεις μελετήθηκαν σε δύο διαφορετικά μείγματα (φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές) και μελετήθηκαν καθοριστικές παράμετροι στην υγρή χρωματογραφία, την πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και τη φασματομετρία μάζας. Τελικά, οι επιλεγμένες ενώσεις διαχωρίστηκαν με τη χρήση στήλης PFP (50 × 2,1 mm, 2,6 μm) και βαθμωτού προγράμματος έκλυσης (μεθανόλη/νερό, οξιτισμένα με μυρμηκικό οξύ 0,1%), η χρονική διάρκεια του οποίου ήταν 8 λεπτά για τις φυτοπροστατευτικές και 10 λεπτά για τις φαρμακευτικές ενώσεις. Στην πηγή ιοντισμού (ESI), η ροή του προστατευτικού αερίου ρυθμίστηκε (sheath gas) ρυθμίστηκε στα 42 au για τις φυτοπροστατευτικές και 30 au για τις φαρμακευτικές ενώσεις, ενώ οι αντίστοιχες τιμές για το βοηθητικό αέριο (auxiliary gas) ήταν 11 au και 7 au. Η χρήση αερίου συμπαρασυρμού (sweep gas) δεν κρίθηκε αναγκαία. Το δυναμικό ψεκασμού πηγής (spray voltage) ορίστηκε στα 3,7 kV και 3,5 kV. Η θερμοκρασία τριχοειδούς μεταλλικού σωλήνα μεταφοράς ιόντων (capillary temperature) και το δυναμικό τριχοειδούς μεταλλικού σωλήνα μεταφοράς ιόντων (capillary voltage) έλαβαν τιμές 330°C και 40 V αντίστοιχα, και για τα δύο μείγματα ενώσεων. Η γεωμετρική θέση της πηγής ρυθμίστηκε στη θέση C, στα 2 μm οριζόντια και 0 πλάγια. Στο τμήμα οπτικών φακών του οργάνου μελετήθηκε η τιμή του δυναμικού δακτυλιοειδούς φακού εστίασης (tube lens), η οποία τελικά ορίστηκε στα 110 V. Στη φασματομετρία μάζας, η διακριτική ικανότητα του αναλυτή μάζας (resolving power) ορίστηκε στα 60000 FWHM και το εύρος μαζών 120–600. Η τιμή του συστήματος ελέγχου αυτόματης απολαβής ιόντων (automatic gain control, AGC) ορίστηκε 10⁶. Για την ποσοτικοποίηση επιλέχθηκε η λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan), ως αριθμός μικροσαρώσεων το 1, ως μέγιστος χρόνος σάρωσης τα 500 ms και ως κεντρική μάζα η τιμή *m/z* της εκάστοτε προσδιοριζόμενης ένωσης. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση των θετικών ανιχνεύσεων, χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία MS/MS επιλέχθηκε η τεχνική σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα (data dependent MS/MS) ενώ η διακριτική ικανότητα μειώθηκε στα 17500 FWHM.

Η ποσοτικοποίηση σε όλες τις περιπτώσεις (βελτιστοποίηση, επικύρωση και εφαρμογή των μεθόδων) πραγματοποιήθηκε με καμπύλες αναφοράς προσομοιωμένες στο υπόστρωμα (matrix-matched calibration curves) ενώ χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα και εσωτερικά πρότυπα, για όσες ενώσεις ήταν διαθέσιμα, προκειμένου να αποφευχθεί η ανακριβής ποσοτικοποίηση (υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση πραγματικών συγκεντρώσεων).

Τα κριτήρια για τον ορθό ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό με την υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας ήταν τα προβλεπόμενα από τις οδηγίες SANTE 11813/2017 και 2002/657/ΕΚ.

Η εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα ιζήματα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο QuEChERS ακολουθούμενη από καθαρισμό με εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (dSPE), αφού προηγήθηκε βελτιστοποίηση των σημαντικότερων παραμέτρων για τα μείγματα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων. Όσον αφορά τα άλατα της εκχύλισης, και για τα δύο μείγματα επιλέχθηκαν αυτά της προσέγγισης AOAC 2007.01 (6 g MgSO₄, 1,5 g NaOAc). Ο διαλύτης της εκχύλισης ήταν το ακετονιτρίλιο (10 mL), με προσθήκη οξικού οξέος 0,1% (v/v) μόνο στην περίπτωση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Ως βέλτιστη ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος επιλέχθηκαν τα 2 g λυοφιλιωμένου ιζήματος. Ακόμη, η διερεύνηση της χρησιμότητας επανυδάτωσης του δείγματος πριν από την εκχύλιση κατέδειξε ότι η προσθήκη 10 mL νερού πριν από την εκχύλιση είναι απαραίτητη. Επίσης, η ψύξη του δείγματος δε βελτίωσε τις ανακτήσεις, όμως παράλληλα δεν προκάλεσε και προβλήματα διάσπασης, εξασφαλίζοντας ότι η συντήρηση των δειγμάτων υπό ψύξη είναι ενδεδειγμένη. Ο χρόνος της εκχύλισης ορίστηκε στο 1 min ενώ για την αποφυγή των συσσωματωμάτων, βοήθησε η έντονη ανακίνηση χειροκίνητα πριν την τοποθέτηση στο vortex. Όσον αφορά τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων, μελετήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί προσροφητικών και τελικά επιλέχθηκε αυτός του PSA/C18 (50 mg έκαστο) με ταυτόχρονη προσθήκη 150 mg MgSO₄, παρέχοντας πολύ πιο καθαρά εκχυλίσματα χωρίς να ενέχεται κίνδυνος απώλειας αναλυτών. Τα τελικά εκχυλίσματα συμπυκνώνονταν κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου στους 30 °C και επαναδιαλύονταν σε 200 μL νερό/μεθανόλη 90/10 (v/v) (με μυρμηκικό οξύ 0,1% (v/v)).

Τα αποτελέσματα από την επικύρωση της μεθόδου QuEChERS επιβεβαίωσαν την καταλληλότητα της για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων σε ιζήματα. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 70,8% έως 106,2%, τα όρια ποσοτικοποίησης ήταν κάτω από 10 ng g⁻¹ για το 89% των ενώσεων, η γραμμικότητα ήταν μεγαλύτερη από 0,9921 σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) υπολογίστηκε κάτω από 18% και 21% αντίστοιχα. Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος φανέρωσε ελαφρά μείωση του σήματος για όλες τις ενώσεις εκτός από το thiamethoxam. Η συνολική επίδοση της μεθόδου εκφρασμένη ως συνάρτηση των ανακτήσεων και της επίδρασης του υποστρώματος κυμάνθηκε από 58,8% έως 102,1%. Για τις φαρμακευτικές ενώσεις, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 64% έως 101%, τα όρια ποσοτικοποίησης από 1,3

ng g⁻¹ έως 47 ng g⁻¹ και η γραμμικότητα ήταν μεγαλύτερη από 0,998 σε όλες τις περιπτώσεις. Τα χαμηλά όρια της μεθόδου (εκτός μεμονωμένων περιπτώσεων) αποδεικνύουν ότι ο παράγοντας προσυγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε είναι αρκετός για την ποσοτικοποίηση ενώσεων ακόμα και σε ίχνη. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς ακόμα και με μείωση του όγκου του εκχυλιζόμενου δείγματος, η ανάλυση θα ήταν αξιόπιστη, ενώ θα μπορούσε να μειωθεί η επίδραση από το υπόστρωμα. Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) υπολογίστηκε κάτω από 18% και 21% αντίστοιχα. Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος φανέρωσε σε αυτή την περίπτωση μείωση του σήματος για το 50% των ενώσεων. Φαίνεται πως η χρήση των καμπυλών προσομοίωσης στο υπόστρωμα σε συνδυασμό με δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα συνεισφέρει σημαντικά στην αποφυγή εσφαλμένων μετρήσεων.

Η εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα φυσικά νερά βασίστηκε στην εφαρμογή της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Επειδή η χρήση της τεχνικής αυτής είναι η πλέον διαδεδομένη για την απομόνωση οργανικών ρύπων από τα φυσικά νερά, οι κυριότερες παράμετροι που την επηρεάζουν έχουν ήδη μελετηθεί εκτενώς. Έτσι, στο πλαίσιο της Διατριβής ελέγχθηκαν διαφορετικά αναλυτικά πρωτόκολλα για κάθε μείγμα, με διαφοροποιήσεις στο pH του δείγματος, το προσροφητικό υλικό των μικροστηλών και το διαλύτη έκπλυσης και έκλουσης του δείγματος. Οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB ήταν οι καταλληλότερες για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων. Για το μείγμα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, οι μικροστήλες ενεργοποιούνταν με 5 mL μεθανόλης και 5 mL νερού LC-MS, πριν τη διέλευση των 250 mL του υδατικού δείγματος. Το δείγμα μετά από έκπλυση με 5 mL υπερ-καθαρού, εκλούονταν με 2x5 mL μεθανόλης. Για το μείγμα των φαρμακευτικών ενώσεων, οι μικροστήλες ενεργοποιούνταν με 5 mL μεθανόλης και 5 mL 5 mL υδατικού διαλύματος 0,1% HCOOH (v/v), πριν τη διέλευση των 250 mL του δείγματος νερού το οποίο είχε προηγουμένως οξινιστεί με μυρμηκικό οξύ (pH=3-3,2). Οι μικροστήλες εκπλένονταν με 5 mL διαλύματος μεθανόλη/οξικό οξύ [2% (v/v)] και εκλούονταν με 2 x 5 mL οξινισμένης μεθανόλης [2% οξικό οξύ (v/v)]. Τα εκλούσματα συμπυκνώνονταν κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου στους 30 °C και επαναδιαλύονταν σε 500 μL 0,1% μυρμηκικό οξύ σε νερό/μεθανόλη 90/10 (v/v).

Η καταλληλότητα της SPE για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων στα φυσικά νερά επιβεβαιώθηκε από τα αναλυτικά χαρακτηριστικά που υπολογίστηκαν κατά την επικύρωση της μεθόδου. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 59% -104%, 61%-96% και 68%-93% στα ποτάμια νερά για το χαμηλό, μεσαίο και υψηλό επίπεδο εμβολιασμού αντίστοιχα. Οι ανακτήσεις ήταν ελαφρώς

υψηλότερες (60%–111%) για τα θαλάσσια νερά, λόγω αύξησης της ιοντικής ισχύος αλλά και επίδρασης υποστρώματος. Οι ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων σε ποτάμια ύδατα κυμάνθηκαν από 61% έως 105,3% και σε θαλάσσια από 55,9% έως 110,3%. Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα, %RSD_r και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, RSD_{WR}%, ήταν μικρότερη του 15%. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 1,7 ng L⁻¹ έως 90 ng L⁻¹, ενώ για τις φαρμακευτικές ενώσεις από 0,8 ng L⁻¹ έως 25 ng L⁻¹. Η γραμμικότητα ήταν εξαιρετική σε όλες τις περιπτώσεις, με το συντελεστή συσχέτισης να είναι μεγαλύτερος από 0,997 για όλες τις ενώσεις. Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος στα θαλάσσια νερά έδειξε ότι από τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις μόνο το dimethoate εμφάνισε ισχυρή μείωση σήματος, ενώ από τις φαρμακευτικές τα fluoxetine, paroxetine και sertraline.

Οι αναλυτικές μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν εφαρμόστηκαν σε μια «μελέτη περίπτωσης» (case study) στην Ελλάδα και έξι ακόμα ευρωπαϊκές χώρες (Αλβανία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Ηνωμένο Βασίλειο και Νορβηγία) σε παράκτιες περιοχές όπου δραστηριοποιούνται υδατοκαλλιέργειες.

Όσον αφορά τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις και την ανίχνευσή τους στα νερά, το 67% ανιχνεύθηκε τουλάχιστον μια φορά στο 75% των δειγμάτων, ενώ μόνο το 50% των ενώσεων αυτών ανιχνεύθηκε σε συγκέντρωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης. chlorantraniliprole, metalaxyl, boscalid, S-metolachlor, imazalil και fenpyroximate. Οι πιο συχνά απαντώμενες φυτοπροστατευτικές ενώσεις ήταν οι metalaxyl, diuron, S-metolachlor και fenpyroximate. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν για τις ενώσεις S-metolachlor, fenpyroximate και imazalil, ενώ οι χαμηλότερες για τις boscalid, metalaxyl και chlorantraniliprole. Πιο συχνά ανιχνεύθηκαν ζιζανιοκτόνα, ακολούθησαν τα μυκητοκτόνα και τέλος τα εντομοκτόνα και τα ακαρεοκτόνα. Η Ιταλία ήταν η χώρα με τις περισσότερες θετικές ανιχνεύσεις και η Νορβηγία τις λιγότερες. Στα ιζήματα, η συχνότητα ανίχνευσης φυτοπροστατευτικών ενώσεων ήταν αρκετά χαμηλή και οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν σε επίπεδα κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης.

Σχετικά με την ανίχνευση των φαρμακευτικών ενώσεων στα νερά, το 36% αυτών ανιχνεύθηκε τουλάχιστον μια φορά σε κάποιο δείγμα νερού. Οι συχνότερα απαντώμενες ενώσεις ήταν οι carbamazepine και venlafaxine (48%), το risperidone (45%) και το paracetamol (39%). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν για τις ενώσεις venlafaxine και carbamazepine, ενώ η χαμηλότερη για το amitriptyline. Όπως και με τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι περισσότερες θετικές ανιχνεύσεις παρατηρήθηκαν στην Ιταλία, όμως οι λιγότερες στην Πορτογαλία. Στα ιζήματα, ανιχνεύθηκαν με μεγαλύτερη

συχνότητα οι ενώσεις carbamazepine και venlafaxine ενώ ανιχνεύθηκαν επίσης οι paracetamol, amitriptyline, citalopram, haloperidol και risperidone, το οποίο εμφάνισε και τη μεγαλύτερη μέση συγκέντρωση.

Η εκτίμηση της επικινδυνότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του πηλίκου για τρία τροφικά επίπεδα (φύκη, ασπώνδυλα και ψάρια). Ο υπολογισμός των πηλίκων επικινδυνότητας για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις κατέδειξε ότι στα ψάρια δεν εμφανίστηκε υψηλή τοξικότητα. Στα ασπώνδυλα εμφάνισε υψηλή τοξικότητα μόνο το tebuirimfos και στα φύκη, εμφάνισαν υψηλή τοξικότητα τα diuron και S-metolachlor. Γενικά, οι τιμές RQ ήταν σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις (80%) πολύ χαμηλότερες τις μονάδας ($RQ < 0,01$), παραπέμποντας στο «χαμηλό επίπεδο κινδύνου». Από την άλλη, όλες οι φαρμακευτικές ενώσεις εμφάνισαν χαμηλή οξεία τοξικότητα, με εξαίρεση το amitriptyline για τα φύκη, το οποίο εμφάνισε $RQ=43,02$, παραπέμποντας σε πολύ υψηλό κίνδυνο. Η μέθοδος του πηλίκου αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη, υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα για περαιτέρω διερεύνηση της ύπαρξης, της έκθεσης αλλά και της τοξικολογικής συνεισφοράς των φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ουσιών στους οργανισμούς, με σκοπό την απόκτηση μιας ολοκληρωμένης εικόνας για τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον.

Εν κατακλείδι, η ολοκλήρωση της παρούσας Διατριβής οδήγησε στην ανάπτυξη τεσσάρων αναλυτικών μεθοδολογιών για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε φυσικά νερά και ιζήματα, αντίστοιχα.

Η φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, αποδεικνύεται πολύτιμο εργαλείο για την αναλυτική χημεία και την περιβαλλοντική ανάλυση. Η υψηλή διακριτική ικανότητα και υψηλή ακρίβεια μάζας προσφέρει εξαιρετικά ακριβείς και αξιόπιστες μετρήσεις, εξαλείφοντας σχεδόν την πιθανότητα ψευδών αποτελεσμάτων, ακόμα και σε πολύπλοκα υποστρώματα και μάλιστα όταν οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις αφορούν ίχνη.

Η χρήση της πλέον ενδεδειγμένης τεχνικής εκχύλισης για φυσικά νερά, SPE, παραμένει αποτελεσματική και ακριβής για την ανάλυση των φυσικών νερών. Το γεγονός ότι οι περισσότερες παράμετροι που υπεισέρχονται στη διαδικασία έχουν μελετηθεί εκτενώς, επιτρέπει την εξέταση πρωτοκόλλων εκχύλισης που θα είναι αποτελεσματικά για συγκεκριμένες κατηγορίες ενώσεων.

Η επιλογή της σχετικά πρόσφατης, απλής και φιλικής προς το περιβάλλον μεθόδου QuEChERS, αποδεικνύεται ιδανική για τα ιζήματα, Σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε είναι ο μικρός συνολικός χρόνος ανάλυσης, ο μικρός αριθμός των σταδίων, το δυναμικό εύρος των αναλυόμενων ενώσεων αλλά και η σχετική

μείωση του κόστους ανάλυσης, αφού η «οικονομική» QuEChERS εξισορροπεί το δαπανηρό αλλά αξιόπιστο υβριδικό αναλυτή μάζας Orbitrap.

Η εφαρμογή των μεθόδων που αναπτύχθηκαν για την εκτίμηση του ρυπαντικού φορτίου από τις εν λόγω ενώσεις και τα αποτελέσματα από τη μελέτη περίπτωσης έδειξαν ότι η ποιότητα των υδάτων έχει επηρεαστεί σημαντικά τόσο από τις αλλαγές στις γεωργικές πρακτικές και τη ραγδαία αύξηση της παραγωγής, όσον αφορά στις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, όσο και από την υψηλή και συχνά αλόγιστη χρήση φαρμάκων από τον άνθρωπο, θέτοντας σε μεγάλο κίνδυνο τα υδάτινα οικοσυστήματα. Ειδικά για την παρακολούθηση των φαρμακευτικών ενώσεων, η σημασία της παρακολούθησης τους υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά στο περιβάλλον από ανθρώπινες δραστηριότητες, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοναδικοί δείκτες για την εκτίμηση της έκτασης των ανθρωπογενών επιπτώσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. European Commission (2017) Potential chemical contaminants in the marine environment, An overview of main contaminant lists - Joint Research Centre Technical Reports. doi: 10.2760/337288
2. European Commission (2000) Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Off J Eur Communities 327:1–72. doi: 2004R0726 - v.7 of 05.06.2013
3. European Commission (2006) Council Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquaculture. Official J Eur Union 328:14–56. doi: 10.1111/jfd.12323
4. Cretì P, Trinchella F, Scudiero R (2010) Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. Environ Monit Assess 165:321–329. doi: 10.1007/s10661-009-0948-z
5. FAO (2016) The State of World Fisheries and Aquaculture 2016, Contributing to food security and nutrition for all. doi: 10.5860/CHOICE.50-5350
6. Nannou CI, Kosma CI, Albanis TA (2015) Occurrence of pharmaceuticals in surface waters: analytical method development and environmental risk assessment. Int J Environ Anal Chem 95:1242–1262. doi: 10.1080/03067319.2015.1085520
7. IUPAC (2003) Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the “Gold Book”). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Sci Publ Oxford. doi: 10.1351/goldbook.i03352
8. Houtman CJ (2010) Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. J Integr Environ Sci 7:271–295. doi: 10.1080/1943815X.2010.511648
9. Fatta-Kassinos D, Hapeshi E, Achilleos A, Meric S, Gros M, Petrovic M, Barcelo D (2011) Existence of Pharmaceutical Compounds in Tertiary Treated Urban Wastewater that is Utilized for Reuse Applications. Water Resour Manag 25:1183–1193. doi: 10.1007/s11269-010-9646-4
10. European Commission (2008) Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union 164:19–40. doi: 10.1016/j.biocon.2008.10.006
11. Αλμπάνης Τ (2009) Ρύπανση και τεχνολογίες προστασίας περιβάλλοντος. Εκδόσεις Τζιόλλα, Θεσσαλονίκη
12. Pinto MI, Burrows HD, Sontag G, Vale C, Noronha JP (2016) Priority pesticides in sediments of European coastal lagoons: A review. Mar Pollut Bull 112:6–16. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.101
13. Νάννου Χ (2013) Βελτιστοποίηση αναλυτικών τεχνικών προσδιορισμού φαρμακευτικών ενώσεων και εκτίμηση των επιπτώσεών τους στα φυσικά νερά, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
14. Nannou CI, Boti VI, Albanis TA (2018) Trace analysis of pesticide residues in sediments using liquid chromatography–high-resolution Orbitrap mass spectrometry. Anal

- Bioanal Chem 410:1977–1989. doi: 10.1007/s00216-018-0864-6
15. Weigel S, Kuhlmann J, Hühnerfuss H (2002) Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Sci Total Environ* 295:131–141. doi: 10.1016/S0048-9697(02)00064-5
 16. Ge L, Chen J, Wei X, Zhang S, Qiao X, Cai X, Xie Q (2010) Aquatic Photochemistry of Fluoroquinolone Antibiotics: Kinetics, Pathways, and Multivariate Effects of Main Water Constituents. *Environ Sci Technol* 44:2400–2405. doi: 10.1021/es902852v
 17. Mei Fun Choong A, Lay-Ming Teo S, Lene Leow J, Ling Koh H, Chi Lui Ho P (2006) A Preliminary Ecotoxicity Study of Pharmaceuticals in the Marine Environment. *J Toxicol Environ Heal Part A* 69:1959–1970. doi: 10.1080/15287390600751371
 18. Gaw S, Thomas K V., Hutchinson TH (2014) Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 369:20130572–20130572. doi: 10.1098/rstb.2013.0572
 19. Gulkowska A, He Y, So MK, Yeung LWY, Leung HW, Giesy JP, Lam PKS, Martin M, Richardson BJ (2007) The occurrence of selected antibiotics in Hong Kong coastal waters. *Mar Pollut Bull* 54:1287–1293. doi: 10.1016/J.MARPOLBUL.2007.04.008
 20. Madureira TV, Barreiro JC, Rocha MJ, Rocha E, Cass QB, Tiritan ME (2010) Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). *Sci Total Environ* 408:5513–20. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.07.069
 21. McEneff G, Barron L, Kelleher B, Paull B, Quinn B (2014) A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *Sci Total Environ* 476–477:317–326. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.123
 22. Zheng Q, Zhang R, Wang Y, Pan X, Tang J, Zhang G (2012) Occurrence and distribution of antibiotics in the Beibu Gulf, China: Impacts of river discharge and aquaculture activities. *Mar Environ Res* 78:26–33. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.03.007
 23. Jiang J-J, Lee C-L, Fang M-D (2014) Emerging organic contaminants in coastal waters: Anthropogenic impact, environmental release and ecological risk. *Mar Pollut Bull* 85:391–399. doi: 10.1016/J.MARPOLBUL.2013.12.045
 24. Jindal T, Singh DK, Agarwal HC (2000) Persistence, degradation and leaching of coumaphos in soil. *J Environ Sci Heal Part B* 35:309–320. doi: 10.1080/03601230009373272
 25. Lara-Martín PA, González-Mazo E, Petrovic M, Barceló D, Brownawell BJ (2014) Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY). *Mar Pollut Bull* 85:710–719. doi: 10.1016/J.MARPOLBUL.2014.01.022
 26. Comeau F, Surette C, Brun GL, Losier R (2008) The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada. *Sci Total Environ* 396:132–146. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2008.02.031
 27. Bayen S, Segovia E, Loh LL, Burger DF, Eikaas HS, Kelly BC (2014) Application of Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) to monitor emerging contaminants in tropical waters. *Sci Total Environ* 482–483:15–22. doi:

- 10.1016/j.scitotenv.2014.02.082
28. Vasskog T, Anderssen T, Pedersen-Bjergaard S, Kallenborn R, Jensen E (2008) Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *J Chromatogr A* 1185:194–205. doi: 10.1016/J.CHROMA.2008.01.063
 29. He X, Wang Z, Nie X, Yang Y, Pan D, Leung AOW, Cheng Z, Yang Y, Li K, Chen K (2012) Residues of fluoroquinolones in marine aquaculture environment of the Pearl River Delta, South China. *Environ Geochem Health* 34:323–335. doi: 10.1007/s10653-011-9420-4
 30. Jia A, Hu J, Wu X, Peng H, Wu S, Dong Z (2011) Occurrence and source apportionment of sulfonamides and their metabolites in Liaodong Bay and the adjacent Liao River basin, North China. *Environ Toxicol Chem* 30:1252–1260. doi: 10.1002/etc.508
 31. Zheng S, Qiu X, Chen B, Yu X, Liu Z, Zhong G, Li H, Chen M, Sun G, Huang H, Yu W, Freestone D (2011) Antibiotics pollution in Jiulong River estuary: Source, distribution and bacterial resistance. *Chemosphere* 84:1677–1685. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.04.076
 32. Ferguson EM, Allinson M, Allinson G, Swearer SE, Hassell KL (2013) Fluctuations in natural and synthetic estrogen concentrations in a tidal estuary in south-eastern Australia. *Water Res* 47:1604–1615. doi: 10.1016/J.WATRES.2012.12.020
 33. Gunnarsdóttir R, Jenssen PD, Erland Jensen P, Villumsen A, Kallenborn R (2013) A review of wastewater handling in the Arctic with special reference to pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and microbial pollution. *Ecol Eng* 50:76–85. doi: 10.1016/J.ECOLENG.2012.04.025
 34. Liang X, Chen B, Nie X, Shi Z, Huang X, Li X (2013) The distribution and partitioning of common antibiotics in water and sediment of the Pearl River Estuary, South China. *Chemosphere* 92:1410–1416. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.03.044
 35. Xu W, Zhang G, Zou S, Li X, Liu Y (2007) Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Environ Pollut* 145:672–679. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2006.05.038
 36. Tacon AGJ, Metian M (2008) Aquaculture feed and food safety: The role of the food and agriculture organization and the codex alimentarius. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* pp 50–59
 37. Μπότη Β (2009) Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό επιλεγμένων ενώσεων με ενδοκρινική διαταρακτική δράση (EDCs) σε φυσικά νερά, ιζήματα και τρόφιμα – Εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων, Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
 38. Ortiz-Hernández ML, Sánchez-Salinas E, Dantán-González E, Castrejón-Godínez ML (2013) Pesticide Biodegradation : Mechanisms , Genetics and Strategies to Enhance the Process. *Biodegrad - Life Sci* 251–287. doi: 10.5772/52777
 39. Ranga Rao G V., Rupela O, Rameshwar-Rao V, Reddy YVR (2007) Role of biopesticides in crop protection: present status and future prospects. *Indian J Plant Prot* 35:1–9.
 40. Ritter SK (2009) Pinpointing Trends In Pesticide Use. *Chem. Eng. News* 87:
 41. Pinstrup-Andersen P (1999) Food policy research for developing countries: emerging

- issues and unfinished business.
42. European Commission (2006) Council Decision of 14 October 2004 concerning the conclusion, on behalf of the European Community, of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Off J Eur Union L209/1-2.
 43. Waxman MF (1998) *The Agrochemical and Pesticides Safety Handbook*, CRC Press.
 44. Zhang W, Jiang F, Ou J (2011) Global pesticide consumption and pollution : with China as a focus. *Proc Int Acad Ecol Environ Sci* 1:125–144. doi: <http://dx.doi.org/10.0000/issn-2220-8860-piaees-2011-v1-0012>
 45. Sitaramaraju S, Prasad N, Chenga V, Narayana E (2014) Impact of Pesticides Used for Crop Production on the. *J Chem Pharm Sci* 75–79.
 46. Ross G (2005) Risks and benefits of DDT. *Lancet* 366:1771–1772. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67722-7
 47. Cooper J, Dobson H (2007) The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Prot* 26:1337–1348. doi: 10.1016/J.CROPRO.2007.03.022
 48. Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A (2009) Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol* 2:1–12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7
 49. Agrawal A, Pandey RS, Sharma B (2010) Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India. *J Water Resour Prot* 02:432–448. doi: 10.4236/jwarp.2010.25050
 50. Pimentel D (2009) *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process*. doi: 10.1007/978-1-4020-8992-3
 51. Stoytcheva M (2011) *Pesticides in the Modern World, Risks and Benefits*. doi: 10.5772/949
 52. Damalas CA, Eleftherohorinos IG (2011) Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health* 8:1402–1419. doi: 10.3390/ijerph8051402
 53. Palma P, Köck-Schulmeyer M, Alvarenga P, Ledo L, Barbosa IR, López de Alda M, Barceló D (2014) Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal). *Sci Total Environ* 488–489:208–219. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2014.04.088
 54. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002) Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211. doi: 10.1021/es011055j
 55. Boxall AB, Fogg LA, Blackwell PA, Kay P, Pemberton EJ, Croxford A (2004) Veterinary medicines in the environment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180:
 56. European Commission (2005) Directive 2005/396/EC of the European Parliament and the Council of 223 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. Off. J. Eur. Communities
 57. European Parliament (2012) *Pesticide legislation in the EU Towards sustainable use of plant protection products*. Libr. Eur. Parliam.

58. European Commission (2010) Special Eurobarometer 354 - Food-related risks. Spec EurobarometerTNS Opin Soc Req Eur Food Saf Auth. doi: 10.2805/51162
59. European Commission (1998) Council directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. Off J Eur Communities 330:32–54. doi: 2004R0726 - v.7 of 05.06.2013
60. European Commission (2013) Directive 2013/39/EU amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Off J Eur Union 226:1–17.
61. European Commission (2008) Directive 2008/105/EC of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/ECC, 86/280/ECC and amending Directive 2000/60/EC. Off J Eur Union L348:84–97. doi: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32008L0105>
62. European Commission (2003) Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC.
63. European Commission (2009) Directive 2009/127/EC of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 amending Directive 2006/42/EC with regard to machinery for pesticide application. 29–33.
64. European Commission (2009) Directive 2009/128/EC of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Off J Eur Communities 309:71–86. doi: 10.3000/17252555.L_2009.309
65. European Commission (2008) Commission regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of council regulation (EC) no 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and co. Off J Eur Union L 250:1–84.
66. European Commission (2009) Regulation (EC) No 1185/2009 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2009 concerning statistics on pesticides. Off J Eur Union L 324:1–22.
67. European Commission (2008) Regulation (EC) 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures. Off J Eur Union L 353/1:1355. doi: 10.1109/TGRS.2004.834800
68. European Commission (2009) Regulation 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Off J Eur Union 309:1–50.
69. International Plant Protection Convention (1992) International Plant Protection Convention. <https://www.ippc.int/en/>.
70. Stockholm Convention on persistent organic pollutants Stockholm Convention on persistent organic pollutants. <http://chm.pops.int/>.
71. OECD (2018) Agricultural Pesticide Programme.

- <http://www.oecd.org/env/ehs/pesticides-biocides/agriculturalpesticidesprogramme.htm>.
72. FAO (2002) International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides (Revised Version).
 73. FAO/WHO (2017) International Programme on Chemical Safety. <http://www.who.int/ipcs/en/>.
 74. WHO WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES). <http://www.who.int/whopes/en/>.
 75. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/jmpr/en/.
 76. European Commission (2001) Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. Off. J. Eur. Communities
 77. Κοσμά Χ (2013) Ανίχνευση, μεταφορά και φωτολυτική διάσπαση φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον, Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
 78. Μαρσέλος Μ, Αντωνίου Α, Κωνσταντή Μ, Λεονταρίτης Γ, Μανωλόπουλος Ε, Παππάς Π, Χαρκίτης Π (2015) Βιοχημική Φαρμακολογία - Μηχανισμοί δράσης των φαρμάκων, Ελληνικά Α.
 79. Pérez S, Barceló D (2007) Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment. *TrAC Trends Anal Chem* 26:494–514. doi: 10.1016/j.trac.2007.05.004
 80. Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107:907–938.
 81. Pérez-Carrera E, Hansen M, León VM, Björklund E, Krogh K a, Halling-Sørensen B, González-Mazo E (2010) Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 398:1173–84. doi: 10.1007/s00216-010-3862-x
 82. Ellis JB (2006) Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. *Environ Pollut* 144:184–9. doi: 10.1016/j.envpol.2005.12.018
 83. Cahill JD, Furlong ET, Burkhardt MR, Kolpin D, Anderson LG (2004) Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1041:171–180. doi: 10.1016/j.chroma.2004.04.005
 84. Perrodin Y, Christine B, Sylvie B, Alain D, Jean-Luc B-K, Cécile C-O, Audrey R, Elodie B (2013) A priori assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital. *Chemosphere* 90:1037–1046. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.08.049
 85. Santos LHMLM, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A, Barceló D, Montenegro MCBSM (2013) Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ* 461–462:302–316. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.077
 86. Oliveira TS, Murphy M, Mendola N, Wong V, Carlson D, Waring L (2015)

- Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Sci Total Environ* 518–519:459–478. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.02.104
87. Rozman D, Hrkal Z, Eckhardt P, Novotná E, Boukalová Z (2015) Pharmaceuticals in groundwaters: a case study of the psychiatric hospital at Horní Beřkovice, Czech Republic. *Environ Earth Sci* 73:3775–3784. doi: 10.1007/s12665-014-3663-1
 88. Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barceló D (2012) Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci Total Environ* 430:109–18. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.055
 89. Verlicchi P, Zambello E (2016) Predicted and measured concentrations of pharmaceuticals in hospital effluents. Examination of the strengths and weaknesses of the two approaches through the analysis of a case study. *Sci Total Environ* 565:82–94. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.165
 90. Herrmann M, Olsson O, Fiehn R, Herrel M, Kümmerer K (2015) The significance of different health institutions and their respective contributions of active pharmaceutical ingredients to wastewater. *Environ Int* 85:61–76. doi: 10.1016/j.envint.2015.07.020
 91. UNODC (2016) World Drug Report 2016. United Nations Publ. doi: 10.1007/s13398-014-0173-7.2
 92. van Nuijs ALN, Castiglioni S, Tarcomnicu I, Postigo C, de Alda ML, Neels H, Zuccato E, Barcelo D, Covaci A (2011) Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review. *Sci Total Environ* 409:3564–3577.
 93. IOBE (2015) Η φαρμακευτική αγορά στην Ελλάδα, Γεγονότα και Στοιχεία.
 94. Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο (2009) Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 470/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για θέσπιση κοινοτικών διαδικασιών για τον καθορισμό ορίων καταλοίπων των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης 11–22.
 95. Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (1992) Οδηγία 92/18/ΕΟΚ για την τροποποίηση του παραρτήματος της οδηγίας 81/852/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με τα αναλυτικά, φαρμακοτοξικολογικά και κλινικά πρότυπα και πρωτόκολλα στον τομέα του ελέγχου των κτηνια. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων 97:
 96. Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο (2001) Οδηγία 2001/82/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 6ης Νοεμβρίου 2001 περί κοινοτικού κώδικος για τα κτηνιατρικά φάρμακα. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων
 97. Kümmerer K (2009) Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75:417–434. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
 98. Emmanuel E, Pierre MG, Perrodin Y (2009) Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. *Environ Int* 35:718–726. doi: 10.1016/j.envint.2009.01.011
 99. Azuma T, Arima N, Tsukada A, Hirami S, Matsuoka R, Moriwake R, Ishiuchi H, Inoyama T, Teranishi Y, Yamaoka M, Mino Y, Hayashi T, Fujita Y, Masada M (2016) Detection of

- pharmaceuticals and phytochemicals together with their metabolites in hospital effluents in Japan, and their contribution to sewage treatment plant influents. *Sci Total Environ* 548–549:189–197. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.157
100. Helwig K, Hunter C, McNaughtan M, Roberts J, Pahl O (2016) Ranking prescribed pharmaceuticals in terms of environmental risk: Inclusion of hospital data and the importance of regular review. *Environ Toxicol Chem* 35:1043–1050. doi: 10.1002/etc.3302
 101. Al Aukidy M, Verlicchi P, Voulvoulis N (2014) A framework for the assessment of the environmental risk posed by pharmaceuticals originating from hospital effluents. *Sci Total Environ* 493:54–64. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.128
 102. Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (1991) Οδηγία 91/271/EOK για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων 40–52.
 103. Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (1986) Οδηγία 86/278/EOK σχετικά με την προστασία του περιβάλλοντος και ιδίως του εδάφους κατά τη χρησιμοποίηση της ύλης καθαρισμού λυμάτων στη γεωργία (86/278/EOK). Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων 6–12.
 104. Son S, Wang M, Shon J-K (2011) Satellite observations of optical and biological properties in the Korean dump site of the Yellow Sea. *Remote Sens Environ* 115:562–572. doi: 10.1016/J.RSE.2010.10.002
 105. Kookana RS, Williams M, Boxall ABA, Larsson DGJ, Gaw S, Choi K, Yamamoto H, Thatikonda S, Zhu Y-G, Carriquiriborde P (2014) Potential ecological footprints of active pharmaceutical ingredients: an examination of risk factors in low-, middle- and high-income countries. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369:
 106. Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 8:1–13. doi: 10.1016/J.ECOLIND.2007.06.002
 107. Du L, Liu W (2012) Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agron Sustain Dev* 32:309–327. doi: 10.1007/s13593-011-0062-9
 108. Grigorakis K, Rigos G (2011) Aquaculture effects on environmental and public welfare - The case of Mediterranean mariculture. *Chemosphere* 85:899–919. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.015
 109. Cabell F, Godfrey H, Tomova A, Ivanova L, Humberto D, Millanao A, Buschmann A (2013) Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ Microbiol* 15:1917–1942. doi: 10.1111/1462-2920.12134
 110. Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P, Lawrence R (2008) Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. *Environ Int* 34:1215–1226. doi: 10.1016/J.ENVINT.2008.04.009
 111. Rodriguez-Navas C, Bjorklund E, Bak SA, Hansen M, Krogh KA, Maya F, Forteza R, Cerda V (2013) Pollution pathways of pharmaceutical residues in the aquatic environment on the island of Mallorca, Spain. *Arch Environ Contam Toxicol* 65:56–66. doi: 10.1007/s00244-013-9880-x
 112. Withers PJA, Jarvie HP, Stoate C (2014) Do septic tanks pose a eutrophication risk in rural headwaters? 44:651–653.

113. Dougherty JA, Swarzenski PW, Dinicola RS, Reinhard M (2010) Occurrence of Herbicides and Pharmaceutical and Personal Care Products in Surface Water and Groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington All rights reserved. No part of this periodical may be reproduced or transmitted in any form or by any mean. *J Environ Qual* 39:1173–1180. doi: 10.2134/jeq2009.0189
114. International Maritime Organization (2003) International Convention for the Prevention of Pollution from Ships (MARPOL), Annex IV Prevention of Pollution by Sewage from Ships, <http://www.imo.org/en/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-for-the-Prevention-of-Pollution-f>.
115. Köck-Schulmeyer M, Olmos M, López de Alda M, Barceló D (2013) Development of a multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1305:176–187. doi: 10.1016/j.chroma.2013.07.036
116. Grimalt S, Dehouck P (2016) Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. *J Chromatogr A* 1433:1–23. doi: 10.1016/J.CHROMA.2015.12.076
117. European Commission (2017) SANTE/11813/2017; Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.
118. Baqar M, Sadeef Y, Ahmad SR, Mahmood A, Li J, Zhang G, Rashid S, Mahmood A, Li J, Zhang G (2018) Organochlorine pesticides across the tributaries of River Ravi , Pakistan : Human health risk assessment through dermal exposure , ecological risks , source fingerprints and spatio-temporal distribution. *Sci Total Environ* 618:291–305. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.234
119. Mac Loughlin TM, Peluso L, Marino DJG (2017) Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Sci Total Environ* 598:572–580.
120. Rodríguez-González N, Uzal-Varela R, González-Castro MJJ, Muniategui-Lorenzo S, Beceiro-González E (2017) Reliable methods for determination of triazine herbicides and their degradation products in seawater and marine sediments using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res* 24:7764–7775. doi: 10.1007/s11356-017-8389-7
121. Zhang H, Bayen SS, Kelly BC (2015) Co-extraction and simultaneous determination of multi-class hydrophobic organic contaminants in marine sediments and biota using GC-EI-MS/MS and LC-ESI-MS/MS. *Talanta* 143:7–18. doi: 10.1016/j.talanta.2015.04.084
122. Chen M, Yi Q, Hong J, Zhang L, Lin K, Yuan D (2015) Simultaneous determination of 32 antibiotics and 12 pesticides in sediment using ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Methods* 7:1896–1905.
123. Kalogridi E-C, Christophoridis C, Bizani E, Drimaropoulou G, Fytianos K (2014) Part II: temporal and spatial distribution of multiclass pesticide residues in lake sediments of northern Greece: application of an optimized MAE-LC-MS/MS pretreatment and analytical method. *Environ Sci Pollut Res* 21:7252–7262. doi: 10.1007/s11356-014-2794-y
124. Farré M, Picó Y, Barceló D (2014) Application of ultra-high pressure liquid

- chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues. *J Chromatogr A* 1328:66–79. doi: 10.1016/j.chroma.2013.12.082
125. Darwano H, Vo Duy S, Sauvé S (2014) A new protocol for the analysis of pharmaceuticals, pesticides, and hormones in sediments and suspended particulate matter from rivers and municipal wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol* 66:582–593. doi: 10.1007/s00244-014-0007-9
 126. Chiaia-Hernandez AC, Krauss M, Hollender J (2013) Screening of lake sediments for emerging contaminants by liquid chromatography atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization coupled to high-resolution mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 47:976–986. doi: 10.1021/es303888v
 127. Hellar-Kihampa H, De Wael K, Lugwisha E, Malarvannan G, Covaci A, Van Grieken R (2013) Spatial monitoring of organohalogen compounds in surface water and sediments of a rural-urban river basin in Tanzania. *Sci Total Environ* 447:186–197. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.12.083
 128. Masiá A, Campo J, Vázquez-Roig P, Blasco C, Picó Y (2013) Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). *J Hazard Mater* 263:98–104. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.09.035
 129. Santos LHMLM, Ramalhosa MJ, Ferreira M, Delerue-Matos C (2016) Development of a modified acetonitrile-based extraction procedure followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of psychiatric drugs in sediments. *J Chromatogr A* 1437:37–48. doi: 10.1016/j.chroma.2016.01.079
 130. Daniele G, Fieu M, Joachim S, Bado-Nilles A, Beaudouin R, Baudoin P, James-Casas A, Andres S, Bonnard M, Bonnard I, Geffard A, Vulliet E (2017) Determination of carbamazepine and 12 degradation products in various compartments of an outdoor aquatic mesocosm by reliable analytical methods based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res* 24:16893–16904. doi: 10.1007/s11356-017-9297-6
 131. Zhou J, Broodbank N (2014) Sediment-water interactions of pharmaceutical residues in the river environment. *Water Res* 48:61–70. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.026
 132. Da Silva BF, Jelic A, López-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, Barceló D, da Silva BF, Jelic A, López-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, Barceló D, Silva BF da, Jelic A, López-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, Barceló D, da Silva BF, Jelic A, López-Serna R, Mozeto AA, Petrovic M, Barceló D (2011) Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. *Chemosphere* 85:1331–9. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.051
 133. Mutavdžić Pavlovic D, Pinušić T, Periša M, Babić S (2012) Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments. *J Chromatogr A* 1258:1–15. doi: 10.1016/j.chroma.2012.08.025
 134. Neves M, Silva G, Brito N, Araújo K, Marques E, Silva L (2017) Aqueous Ultrasound-Assisted Extraction for the Determination of Fluoroquinolones in Mangrove Sediment by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detector. *J Braz Chem Soc*. doi: 10.21577/0103-5053.20170108
 135. Massei R, Byers H, Beckers L-M, Prothmann J, Brack W, Schulze T, Krauss M (2018) A sediment extraction and cleanup method for wide-scope multitarget screening by

- liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 410:177–188. doi: 10.1007/s00216-017-0708-9
136. Díaz A, Peña-Alvarez A (2017) A Simple Method for the Simultaneous Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in River Sediment by Ultrasound-Assisted Extraction Followed by Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J Chromatogr Sci* 55:946–953. doi: 10.1093/chromsci/bmx058
 137. AOAC Official Method 2007.01 (2007) Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. *AOAC Int*.
 138. Anastassiades M, Lehotaý SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 86:412–431. doi: 10.1371/journal.pone.0029268
 139. Miyawaki T, Tobiishi K, Takenaka S, Kadokami K (2018) A Rapid Method, Combining Microwave-Assisted Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry with a Database, for Determining Organochlorine Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Sediments. *Soil Sediment Contam An Int J* 27:31–45. doi: 10.1080/15320383.2017.1360245
 140. Ali JM, D’Souza DL, Schwarz K, Allmon LG, Singh RP, Snow DD, Bartelt-Hunt SL, Kolok AS (2018) Response and recovery of fathead minnows (*Pimephales promelas*) following early life exposure to water and sediment found within agricultural runoff from the Elkhorn River, Nebraska, USA. *Sci Total Environ* 618:1371–1381. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.259
 141. Massei R, Busch W, Wolschke H, Schinkel L, Bitsch M, Schulze T, Krauss M, Brack W (2018) Screening of Pesticide and Biocide Patterns As Risk Drivers in Sediments of Major European River Mouths: Ubiquitous or River Basin-Specific Contamination? *Environ Sci Technol* 52:2251–2260. doi: 10.1021/acs.est.7b04355
 142. Gakuba E, Moodley B, Ndungu P, Birungi G (2018) Partition distribution of selected organochlorine pesticides in water, sediment pore water and surface sediment from uMngeni River, KwaZulu-Natal, South Africa. *Water SA* 44:232. doi: 10.4314/wsa.v44i2.09
 143. Sánchez-Osorio JL, Macías-Zamora JV, Ramírez-Álvarez N, Bidleman TF (2017) Organochlorine pesticides in residential soils and sediments within two main agricultural areas of northwest Mexico: Concentrations, enantiomer compositions and potential sources. *Chemosphere* 173:275–287. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.010
 144. Etchegoyen M, Ronco A, Almada P, Abelando M, Marino D (2017) Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Parana basin. *Environ Monit Assess*. doi: 10.1007/s10661-017-5773-1
 145. Kucher S, Schwarzbauer J (2017) DDT-related compounds as non-extractable residues in submarine sediments of the Palos Verdes Shelf, California, USA. *Chemosphere* 185:529–538. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.041
 146. Rodrigues AO, de Souza LC, da Silva Rocha CC, da Costa ACG, de Alcântara Mendes R (2017) Assessment of DDT and Metabolites in Soil and Sediment of Potentially Contaminated Areas of Belém, Amazon Region, Brazil. *Bull Environ Contam Toxicol*

- 99:125–130. doi: 10.1007/s00128-017-2090-x
147. Pintado-Herrera MG, González-Mazo E, Lara-Martín PA (2016) In-cell clean-up pressurized liquid extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry determination of hydrophobic persistent and emerging organic pollutants in coastal sediments. *J Chromatogr A* 1429:107–118. doi: 10.1016/j.chroma.2015.12.040
 148. Ogbeide O, Tongo I, Ezemonye L (2016) Assessing the distribution and human health risk of organochlorine pesticide residues in sediments from selected rivers. *Chemosphere* 144:1319–1326. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.108
 149. Duodu GO, Goonetilleke A, Ayoko GA (2016) Optimization of in-cell accelerated solvent extraction technique for the determination of organochlorine pesticides in river sediments. *Talanta* 150:278–285. doi: 10.1016/j.talanta.2015.12.049
 150. Ben Salem F, Ben Said O, Duran R, Monperrus M (2016) Validation of an Adapted QuEChERS Method for the Simultaneous Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in Sediment by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol* 96:678–684. doi: 10.1007/s00128-016-1770-2
 151. Rodrigues ET, Pardal MÂ, Salgueiro-González N, Muniategui-Lorenzo S, Alpendurada MF (2016) A single-step pesticide extraction and clean-up multi-residue analytical method by selective pressurized liquid extraction followed by on-line solid phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for complex matrices. *J Chromatogr A* 1452:10–17. doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.036
 152. Liang Y, Chen G, Zeng H, Qin L, Mo L (2016) Characteristics and risk assessment of organochlorine pesticide residues in surface sediments collected at the Qingshitan Reservoir. *Toxicol Environ Chem* 98:658–668. doi: 10.1080/02772248.2015.1133384
 153. McMurry ST, Belden JB, Smith LM, Morrison SA, Daniel DW, Euliss BR, Euliss NH, Kensinger BJ, Tangen BA (2016) Land use effects on pesticides in sediments of prairie pothole wetlands in North and South Dakota. *Sci Total Environ* 565:682–689. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.209
 154. Sun D, Wei Y, Li H, Yi X, You J (2016) Insecticides in sediment cores from a rural and a suburban area in South China: A reflection of shift in application patterns. 568:11–18. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.202
 155. Cruzeiro C, Pardal MÂ, Rodrigues-Oliveira N, Castro LFC, Rocha E, Rocha MJ (2016) Multi-matrix quantification and risk assessment of pesticides in the longest river of the Iberian peninsula. *Sci Total Environ* 572:263–272. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.07.203
 156. Chiarello M, Graeff R, Minetto L, Cemin G, Schneider VE, Moura S (2016) Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC–HRMS e sua relação com o uso e a ocupação do solo. *Quim Nova*. doi: 10.21577/0100-4042.20160180
 157. Merdassa Y, Liu JF, Megersa N, Tessema M (2015) An efficient and fast microwave-assisted extraction method developed for the simultaneous determination of 18 organochlorine pesticides in sediment. *Int J Environ Anal Chem* 95:225–239. doi: 10.1080/03067319.2014.1002493
 158. Souchier M, Benali-Raclot D, Benanou D, Boireau V, Gomez E, Casellas C, Chiron S (2015) Screening triclocarban and its transformation products in river sediment using

- liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. *Sci Total Environ* 502:199–205. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.08.108
159. Net S, Rabodonirina S, Sghaier R Ben, Dumoulin D, Chbib C, Tlili I, Ouddane B (2015) Distribution of phthalates, pesticides and drug residues in the dissolved, particulate and sedimentary phases from transboundary rivers (France-Belgium). *Sci Total Environ* 521–522:152–159. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.087
160. Zhang H, Bayen S, Kelly BC (2015) Multi-residue analysis of legacy POPs and emerging organic contaminants in Singapore’s coastal waters using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Sci Total Environ* 523:219–232. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.04.012
161. Hu X, Shi W, Yu N, Jiang X, Wang S, Giesy JP, Zhang X, Wei S, Yu H (2015) Bioassay-directed identification of organic toxicants in water and sediment of Tai Lake, China. *Water Res* 73:231–241. doi: 10.1016/j.watres.2015.01.033
162. Ali N, Ali LN, Eqani SAMAS, Ismail IMI, Malarvannan G, Kadi MW, Al-badry Basahi JM, Covaci A (2015) Organohalogenated contaminants in sediments and bivalves from the Northern Arabian Gulf. *Ecotoxicol Environ Saf* 122:432–439. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.013
163. Gutowski L, Baginska E, Olsson O, Leder C, Kümmerer K (2015) Assessing the environmental fate of S-metolachlor, its commercial product Mercantor Gold® and their photoproducts using a water–sediment test and in silico methods. *Chemosphere* 138:847–855. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.013
164. Radović T, Grujić S, Petković A, Dimkić M, Laušević M (2015) Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. *Environ Monit Assess* 187:4092. doi: 10.1007/s10661-014-4092-z
165. Čonka K, Chovancová J, Stachová Sejáková Z, Dömötörövá M, Fabišiková A, Drobná B, Kočan A (2014) PCDDs, PCDFs, PCBs and OCPs in sediments from selected areas in the slovak republic. *Chemosphere* 98:37–43. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.09.068
166. Regueiro J, Matamoros V, Thibaut R, Porte C, Bayona JM (2013) Use of effect-directed analysis for the identification of organic toxicants in surface flow constructed wetland sediments. *Chemosphere* 91:1165–1175. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.023
167. Harrison R, Bull I, Michaelides K (2013) A method for the simultaneous extraction of seven pesticides from soil and sediment. *Anal Methods* 5:2053. doi: 10.1039/c3ay26413k
168. Da C, Liu G, Tang Q, Liu J (2013) Distribution, sources, and ecological risks of organochlorine pesticides in surface sediments from the Yellow River Estuary, China. *Environ Sci Process Impacts* 15:2288. doi: 10.1039/c3em00369h
169. Vichapong J, Burakham R, Srijaranai S (2013) Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid–liquid microextraction with solidification of floating organic droplet combined with HPLC for the determination of neonicotinoid pesticides. *Talanta* 117:221–228. doi: 10.1016/j.talanta.2013.08.034
170. Magnusson M, Heimann K, Ridd M, Negri AP (2013) Pesticide contamination and phytotoxicity of sediment interstitial water to tropical benthic microalgae. *Water Res* 47:5211–5221. doi: 10.1016/j.watres.2013.06.003

171. Biel-Maeso M, Corada-Fernández C, Lara-Martín PA (2017) Determining the distribution of pharmaceutically active compounds (PhACs) in soils and sediments by pressurized hot water extraction (PHWE). *Chemosphere* 185:1001–1010. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.07.094
172. Gumbi BP, Moodley B, Birungi G, Ndungu PG (2017) Assessment of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by ultrasonic-assisted extraction and GC-MS in Mgeni and Msunduzi river sediments, KwaZulu-Natal, South Africa. *Environ Sci Pollut Res* 24:20015–20028. doi: 10.1007/s11356-017-9653-6
173. Drljača D, Ašperger D, Ferenčak M, Gavranić M, Babić S, Mikac I, Ahel M (2016) Comparison of Four Extraction Methods for the Determination of Veterinary Pharmaceuticals in Sediment. *Chromatographia* 79:209–223. doi: 10.1007/s10337-015-3017-5
174. Agunbiade FO, Moodley B (2016) Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. *Environ Toxicol Chem* 35:36–46. doi: 10.1002/etc.3144
175. Golovko O, Koba O, Kodesova R, Fedorova G, Kumar V, Grabic R (2016) Development of fast and robust multiresidual LC-MS/MS method for determination of pharmaceuticals in soils. *Environ Sci Pollut Res* 23:14068–14077. doi: 10.1007/s11356-016-6487-6
176. Giebułtowicz J, Nałecz-Jawecki G (2016) Occurrence of immunosuppressive drugs and their metabolites in the sewage-impacted Vistula and Utrata Rivers and in tap water from the Warsaw region (Poland). *Chemosphere* 148:137–147. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.135
177. Lindholm-Lehto PC, Ahkola HSJ, Knuutinen JS, Herve SH (2015) Occurrence of pharmaceuticals in municipal wastewater, in the recipient water, and sedimented particles of northern Lake Päijänne. *Environ Sci Pollut Res* 22:17209–17223. doi: 10.1007/s11356-015-4908-6
178. Wagil M, Białk-Bielińska A, Maszkowska J, Stepnowski P, Kumirska J (2015) Critical points in the evaluation of analytical methods based on liquid chromatography separation for the determination of doramectin in different environmental samples. *Chemosphere* 119:S9–S15. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.137
179. Wagil M, Maszkowska J, Białk-Bielińska A, Stepnowski P, Kumirska J (2015) A comprehensive approach to the determination of two benzimidazoles in environmental samples. *Chemosphere* 119:S35–S41. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.04.106
180. Kumirska J, Migowska N, Caban M, Łukaszewicz P, Stepnowski P (2015) Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and oestrogenic hormones in environmental solid samples. *Sci Total Environ* 508:498–505. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.020
181. Matongo S, Birungi G, Moodley B, Ndungu P (2015) Occurrence of selected pharmaceuticals in water and sediment of Umgeni River, KwaZulu-Natal, South Africa. *Environ Sci Pollut Res* 22:10298–10308. doi: 10.1007/s11356-015-4217-0
182. De Sousa DNR, Grosseli GM, Mozeto AA, Carneiro RL, Fadini PS (2015) Ultrasound-assisted extraction method for the simultaneous determination of emerging contaminants in freshwater sediments. *J Sep Sci* 38:3454–3460. doi:

- 10.1002/jssc.201500644
183. Kotnik K, Kosjek T, Krajnc U, Heath E (2014) Trace analysis of benzophenone-derived compounds in surface waters and sediments using solid-phase extraction and microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 406:3179–3190. doi: 10.1007/s00216-014-7749-0
 184. Berlioz-Barbier A, Vauchez A, Wiest L, Baudot R, Vulliet E, Cren-Olivé C (2014) Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. *Anal Bioanal Chem* 406:1259–1266. doi: 10.1007/s00216-013-7450-8
 185. Carmona E, Andreu V, Picó Y (2014) Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Sci Total Environ* 484:53–63. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.085
 186. Pintado-Herrera MG, González-Mazo E, Lara-Martín PA (2013) Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction–stir bar sorptive extraction–derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405:401–411. doi: 10.1007/s00216-012-6453-1
 187. Duan Y-P, Dai C-M, Zhang Y-L, Ling-Chen (2013) Selective trace enrichment of acidic pharmaceuticals in real water and sediment samples based on solid-phase extraction using multi-templates molecularly imprinted polymers. *Anal Chim Acta* 758:93–100. doi: 10.1016/j.aca.2012.11.010
 188. Carvalho PN, Pirra A, Basto MCP, Almeida CMR (2013) Multi-family methodologies for the analysis of veterinary pharmaceutical compounds in sediment and sludge samples: comparison among extraction techniques. *Anal Methods* 5:6503. doi: 10.1039/c3ay41339j
 189. Θεοδωρίδης Γ, Γηρούση Σ, Ζώτου Γ, Α. Ζ, Σαμανίδου Β (2015) Βιοαναλυτική Χημεία. Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα
 190. Watson T, Sparkman D (2007) *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*, 4th Edition, Wiley. Wiley
 191. De Hoffmann E, Stroobant V (2007) *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition, Wiley.
 192. Μαραγκού Ν (2010) Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ενώσεων που προκαλούν ορμονικές διαταραχές με υγροχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών, Διδακτορική Διατριβή. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
 193. Κομποθέκρα-Κότσορου Β (2013) Βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης QuEChERS για τον προσδιορισμό σύγχρονων αναδυσόμενων μικρορύπων σε γαλακτοκομικά προϊόντα με τη χρήση υβριδικού αναλυτή μάζας LC/LTQ Orbitrap, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
 194. Κακλαμάνος Γ. (2009) «Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ορμονών με αυξητική δράση σε βιολογικά δείγματα με υγρή χρωματογραφία – φασματοφωτομετρία μαζών». Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
 195. Wilm M (2011) Principles of Electrospray Ionization. *Mol Cell Proteomics*. doi: 10.1074/mcp.M111.009407
 196. Thermo Fisher Scientific (2010) *TSQ Series Hardware Manual*, Revision D.

197. Thermo Fisher Scientific (2012) LTQ Orbitrap XL, Getting Started Tune Plus 2.5.5, Revision B.
198. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG, Hardman M, Cooks RG (2005) "The Orbitrap: a new mass spectrometer." *J Mass Spectrom* 40:430–443. doi: 10.1002/jms.856
199. Domon B, Aebersold R (2006) Mass spectrometry and protein analysis. *Science* (80-) 312:212–7. doi: 10.1126/science.1124619
200. Raffaelli A, Saba A (2003) Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 22:318–331. doi: 10.1002/mas.10060
201. Gallagher RT, Balogh MP, Davey P, Jackson MR, Sinclair I, Southern LJ (2003) Combined electrospray ionization-atmospheric pressure chemical ionization source for use in high-throughput LC-MS applications. *Anal Chem* 75:973–977. doi: 10.1021/ac0205457
202. Ardrey R (2003) *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*. Wiley. doi: 10.1373/clinchem.2003.021808
203. Vergeynst L, Van Langenhove H, Demeestere K, Shrivastava A, Gupta V, Rambla-alegre M, Esteve-romero J, Carda-broch S, Gros M, Petrović M, Barceló DD, Chromatography L, Mass T, Vanderford BJ, Snyder S a, Choi BK, Hercules DM, Gusev AI, Brieudes V, Lardy-Fontan S, Lalere B, Vaslin-Reimann S, Budzinski H (2015) Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography / Tandem Mass. *Anal Chem* 40:7312–7320. doi: 10.1016/S0021-9673(00)01052-9
204. Trufelli H, Palma P, Famigliani G, Cappiello A (2011) An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 30:491–509. doi: 10.1002/mas.20298
205. Sousa JCG, Ribeiro AR, Barbosa MO, Pereira MFR, Silva AMT (2018) A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *J Hazard Mater* 344:146–162. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2017.09.058
206. European Commission (2015) Commission Implementing Regulation (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. *Off J Eur Union* L78/40:20–30.
207. Gracia-Lor E, Sancho J V, Hernández F (2010) Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217:622–32. doi: 10.1016/j.chroma.2009.11.090
208. Pozo OJ, Guerrero C, Sancho J V., Ibáñez M, Pitarch E, Hogendoorn E, Hernández F (2006) Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1103:83–93. doi: 10.1016/j.chroma.2005.10.073
209. Hernández F, Sancho J V., Ibáñez M, Guerrero C (2007) Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *TrAC Trends Anal Chem* 26:466–485. doi: 10.1016/j.trac.2007.01.012
210. Li B, Zhang T, Xu Z, Fang HHP (2009) Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry. *Anal Chim Acta* 645:64–72. doi: 10.1016/j.aca.2009.04.042
211. Xiao Y, Chang H, Jia A, Hu J (2008) Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1214:100–108. doi: 10.1016/j.chroma.2008.10.090
 212. Chang H, Hu J, Asami M, Kunikane S (2008) Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1190:390–393. doi: 10.1016/j.chroma.2008.03.057
 213. Ternes TA (2001) Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC Trends Anal Chem* 20:419–434. doi: 10.1016/S0165-9936(01)00078-4
 214. Ternes T, Bonerz M, Schmidt T (2001) Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 938:175–185. doi: 10.1016/S0021-9673(01)01205-5
 215. Batt AL, Kostich MS, Lazorchak JM (2008) Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC- MS/MS. *Anal Chem* 80:5021–5030.
 216. Kosma CI, Lambropoulou DA, Albanis TA (2014) Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Sci Total Environ* 466–467:421–438. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.07.044
 217. Al-Odaini NA, Zakaria MP, Yaziz MI, Surif S (2010) Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217:6791–6806. doi: 10.1016/j.chroma.2010.08.033
 218. Martínez-Bueno MJ, Gomez MJ, Herrera S, Hernando MD, Agüera A, Fernández-Alba AR (2012) Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Environ Pollut* 164:267–73. doi: 10.1016/j.envpol.2012.01.038
 219. Heberer T (2002) Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J Hydrol* 266:175–189. doi: 10.1016/S0022-1694(02)00165-8
 220. Fent K, Weston A a, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76:122–59. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009
 221. Margiotta-Casaluci L, Owen SF, Huerta B, Rodríguez-Mozaz S, Kugathas S, Barceló D, Rand-Weaver M, Sumpter JP (2016) Internal exposure dynamics drive the Adverse Outcome Pathways of synthetic glucocorticoids in fish. *Sci Rep* 6:21978. doi: 10.1038/srep21978
 222. Χατζηϊωάννου ΠΘ, Κουππάρης ΜΑ (1997) Ενόργανη Ανάλυση.
 223. Zhang G, Ueberheide BM, Waldemarson S, Myung S, Molloy K, Eriksson J, Chait BT, Neubert TA, Fenyö D (2010) Protein Quantitation Using Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* 673:211–222. doi: 10.1007/978-1-60761-842-3_13
 224. Giri RR, Ozaki H, Ota S, Takanami R, Taniguchi S (2010) Degradation of common pharmaceuticals and personal care products in mixed solutions by advanced oxidation techniques. *Int J Environ Sci Tech* 7:251–260. doi: 10.1007/BF03326135

225. European Commission (2002) Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities* L221:8–36.
226. Stahnke H, Kittlaus S, Kempe G, Hemmerling C, Alder L (2012) The influence of electrospray ion source design on matrix effects. *J Mass Spectrom* 47:875–884. doi: 10.1002/jms.3047
227. Gómez-Ramos M del M, Rajski Ł, Lozano A, Fernández-Alba AR (2016) The evaluation of matrix effects in pesticide multi-residue methods via matrix fingerprinting using liquid chromatography electrospray high-resolution mass spectrometry. *Anal Methods* 8:4664–4673. doi: 10.1039/C6AY00436A
228. Ferrer C, Lozano A, Agüera A, Girón AJ, Fernández-Alba AR (2011) Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 1218:7634–7639. doi: 10.1016/j.chroma.2011.07.033
229. Stahnke H, Reemtsma T, Alder L (2009) Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC–MS/MS. *Anal Chem* 81:2185–2192. doi: 10.1021/ac802362s
230. Peysson W, Vulliet E (2013) Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1290:46–61. doi: 10.1016/j.chroma.2013.03.057
231. Cajka T, Sandy C, Bachanova V, Drabova L, Kalachova K, Pulkrabova J, Hajslova J (2012) Streamlining sample preparation and gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis of multiple pesticide residues in tea. *Anal Chim Acta* 743:51–60. doi: 10.1016/J.ACA.2012.06.051
232. Austrian Standards Institute (2009) European Standard EN 15662: Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method.
233. Rashid A, Nawaz S, Barker H, Ahmad I, Ashraf M (2010) Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217:2933–2939. doi: 10.1016/J.CHROMA.2010.02.060
234. Correia-Sá L, Fernandes VC, Carvalho M, Calhau C, Domingues VMF, Delerue-Matos C (2012) Optimization of QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in soils with diverse organic matter. *J Sep Sci* 35:1521–1530. doi: 10.1002/jssc.201200087
235. Kvíčalová M, Doubravová P, Jobánek R, Jokešová M, Očenášková V, Süssenbeková H, Svobodova A (2012) Application of different extraction methods for the determination of selected pesticide residues in sediments. *Bull Environ Contam Toxicol* 89:21–26. doi: 10.1007/s00128-012-0622-y
236. Carmona E, Andreu V, Picó Y (2017) Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish—Turia River as case study. *J Pharm Biomed Anal* 146:117–125. doi: 10.1016/j.jpba.2017.08.014
237. Salvia MV, Vulliet E, Wiest L, Baudot R, Cren-Olivé C (2012) Development of a multi-

- residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *J Chromatogr A* 1245:122–133. doi: 10.1016/j.chroma.2012.05.034
238. Bragança I, Plácido A, Paíga P, Domingues VF, Delerue-Matos C (2012) QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Sci Total Environ* 433:281–289. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.035
239. Lozowicka B, Rutkowska E, Jankowska M, Łozowicka B, Rutkowska E, Jankowska M (2017) Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. *Environ Sci Pollut Res* 24:7124–7138. doi: 10.1007/s11356-016-8334-1
240. Fernandes VC, Domingues VF, Mateus N, Delerue-Matos C (2012) Multiresidue pesticides analysis in soils using modified QuEChERS with disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction. *J Sep Sci* 36:376–382. doi: 10.1002/jssc.201200673
241. Padilla-Sánchez JA, Plaza-Bolaños P, Romero-González R, Grande-Martínez Á, Thurman EM, Garrido-Frenich A (2012) Innovative determination of polar organophosphonate pesticides based on high-resolution Orbitrap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 47:1458–1465. doi: 10.1002/jms.3107
242. De Oliveira Arias JL, Rombaldi C, Caldas SS, Primel EG (2014) Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1360:66–75. doi: 10.1016/j.chroma.2014.07.082
243. Michael I, Frontistis Z, Fatta-Kassinos D (2013) Removal of pharmaceuticals from environmentally relevant matrices by advanced oxidation processes (AOPs). *Compr Anal Chem*. doi: 10.1016/B978-0-444-62657-8.00011-2
244. Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D (2012) Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem. *J Chromatogr A* 1248:104–121. doi: 10.1016/j.chroma.2012.05.084
245. López-Serna R, Petrović M, Barceló D (2012) Direct analysis of pharmaceuticals, their metabolites and transformation products in environmental waters using on-line TurboFlow™ chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1252:115–29. doi: 10.1016/j.chroma.2012.06.078
246. Baker DR, Kasprzyk-Hordern B (2011) Critical evaluation of methodology commonly used in sample collection, storage and preparation for the analysis of pharmaceuticals and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:8036–59. doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.012
247. Sobral de Castro Lopes A (2016) From consumption to production – Development of fisheries and aquaculture in Portugal. Universidade Nova de Lisboa
248. Ειδική Γραμματεία Υδάτων (2013) Σχέδιο Διαχείρισης των Λεκανών Απορροής του

- Υδατικού Διαμερίσματος Ηπείρου.
249. Ειδική Γραμματεία Υδάτων (2017) 1η αναθεώρηση σχεδίου διαχείρισης των Λεκανών Απορροής Ποταμών του Υδατικού Διαμερίσματος αναθεώρηση σχεδίου διαχείρισης των Λεκανών Απορροής Ποταμών του Υδατικού Διαμερίσματος Ηπείρου (EL05).
 250. IOBE. http://iobe.gr/research_a.asp.
 251. Moisiu L, Panagiotopoulos IP, Durmishi Ç, Kapsimalis V, Anagnostou C (2016) The anoxic Butrint Lagoon, SW Albania. *Environ Earth Sci* 75:1443. doi: 10.1007/s12665-016-6259-0
 252. Viaroli P, Giordani G, Bartoli M, Naldi M, Azzoni R, Nizzoli D, Ferrari I, Comenges JMZ, Bencivelli S, Castaldelli G, Fano EA (2006) The Sacca di Goro lagoon and an arm of the Po River. *Handb Environ Chem Vol 5 Water Pollut* 5:197–232. doi: 10.1007/698-5-030
 253. Viaroli P, Bartoli M, Azzoni R, Giordani G, Mucchino C, Naldi M, Nizzoli D, Tajé L (2005) Nutrient and iron limitation to *Ulva* blooms in a eutrophic coastal lagoon (Sacca di Goro, Italy). *Hydrobiologia* 550:57–71. doi: 10.1007/s10750-005-4363-3
 254. Provini A, Crosa G, Marchetti R (1992) Nutrient export from the Po and Adige river basins over the last 20 years. *Sci. Total Environ. Suppl*: 291:
 255. Barbiero G, Carone G, Cicioni G, Puddu A, Spaziani F (1991) Valutazione dei carichi inquinanti potenziali per i principali bacini idrografici italiani: Adige, Arno, Po, Tevere. Quaderni IRSA. IRSA-CNR, Rome, Italy.
 256. Camera di Commercio di Ferrara (2014) Camera di Commercio di Ferrara. <http://www.fe.camcom.it/>.
 257. Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (1992) Οδηγία 92/43/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 21ης Μαΐου 1992 για τη διατήρηση των φυσικών οικοτόπων καθώς και της άγριας πανίδας και χλωρίδας. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων
 258. Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο (2006) Οδηγία 2006/105/ΕΚ του Συμβουλίου της 20ής Νοεμβρίου 2006 για την προσαρμογή των οδηγιών 73/239/ΕΟΚ, 74/557/ΕΟΚ και 2002/83/ΕΚ στον τομέα του περιβάλλοντος. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης
 259. Cattaneo-Vietti R, Cappanera V, Castellano M, Povero P (2015) Yield and catch changes in a Mediterranean small tuna trap: A warming change effect? *Mar Ecol* 36:155–166. doi: 10.1111/maec.12127
 260. Salmona P, Verardi D (2001) The marine protected area of Portofino, Italy: a difficult balance. *Ocean Coast Manag* 44:39–60. doi: 10.1016/S0964-5691(00)00084-3
 261. Köck M, Farré M, Martínez E, Gajda-Schranz K, Ginebreda A, Navarro A, Alda ML de (2010) Integrated ecotoxicological and chemical approach for the assessment of pesticide pollution in the Ebro River delta (Spain). *J Hydrol* 383:73–82. doi: 10.1016/J.JHYDROL.2009.12.029
 262. Postigo C, López de Alda MJ, Barceló D (2010) Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro River basin: Occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation. *Environ Int* 36:75–84. doi: 10.1016/j.envint.2009.10.004
 263. Álvarez-Muñoz D, Rodríguez-Mozaz S, Maulvault AL, Tediosi A, Fernández-Tejedor M, Van den Heuvel F, Kotterman M, Marques A, Barceló D (2015) Occurrence of

- pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environ Res* 143:56–64. doi: 10.1016/j.envres.2015.09.018
264. Kuster M, López de Alda MJ, Barata C, Raldúa D, Barceló D (2008) Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 75:390–401. doi: 10.1016/j.talanta.2007.11.027
265. Barata C, Damasio J, López MA, Kuster M, López de Alda M, Barceló D, Riva MC, Raldúa D (2007) Combined use of biomarkers and in situ bioassays in daphnia magna to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environ Toxicol Chem* 26:370. doi: 10.1897/06-209R.1
266. Santos TCR, Rocha JC, Barceló D (2000) Determination of rice herbicides, their transformation products and clofibric acid using on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with diode array and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 879:3–12. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00100-X
267. Kampioti AA, Borba da Cunha AC, López de Alda M, Barceló D (2005) Fully automated multianalyte determination of different classes of pesticides, at picogram per litre levels in water, by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 382:1815–1825. doi: 10.1007/s00216-005-3332-z
268. Martins MVA, Mane MÂ, Frontalini F, Santos JF, da Silva FS, Terroso D, Miranda P, Figueira R, Laut LLM, Bernardes C, Filho JGM, Coccioni R, Dias JMA, Rocha F (2015) Early diagenesis and clay mineral adsorption as driving factors of metal pollution in sediments: the case of Aveiro Lagoon (Portugal). *Environ Sci Pollut Res* 22:10019–10033. doi: 10.1007/s11356-015-4185-4
269. Breda S, Chiesa S, Freitas R, Figueira E, Becherini F, Gobbo L, Soares AMVM, Argese E (2018) Biogeochemical dynamics and bioaccumulation processes in Manila clam: Implications for biodiversity and ecosystem services in the Ria de Aveiro Lagoon. *Estuar Coast Shelf Sci* 209:136–148. doi: 10.1016/J.ECSS.2018.04.029
270. Abreu SN, Pereira E, Vale C, Duarte AC (2000) Accumulation of mercury in sea bass from a contaminated lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Mar Pollut Bull* 40:293–297. doi: 10.1016/S0025-326X(99)00187-3
271. Exe Estuary Management Committee (2016) Exe Estuary Management Plan 2016-2021.
272. Hildebrandt A, Guillamón M, Lacorte S, Tauler R, Barceló D (2008) Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res* 42:3315–3326. doi: 10.1016/j.watres.2008.04.009
273. Barrek S, Cren-Olivé C, Wiest L, Baudot R, Arnaudguilhem C, Grenier-Loustalot M-F (2009) Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters. *Talanta* 79:712–722. doi: 10.1016/j.talanta.2009.04.058
274. Brown CD, van Beinum W (2009) Pesticide transport via sub-surface drains in Europe. *Environ Pollut* 157:3314–3324. doi: 10.1016/j.envpol.2009.06.029

275. Gasperi J, Garnaud S, Rocher V, Moilleron R (2009) Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanised area: Case study of Paris (France). *Sci Total Environ* 407:2900–2908. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2009.01.024
276. Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G (2009) EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ Pollut* 157:561–568. doi: 10.1016/j.envpol.2008.09.020
277. Navarro-Ortega A, Tauler R, Lacorte S (2010) Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin. *J Hydrol* 383:5–17. doi: 10.1016/j.jhydrol.2009.12.031
278. Lissalde S, Mazzella N, Fauvelle V, Delmas F, Mazellier P, Legube B (2011) Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for thirty-three pesticides in natural water and comparison of performance between classical solid phase extraction and passive sampling approaches. *J Chromatogr A* 1218:1492–1502. doi: 10.1016/j.chroma.2011.01.040
279. Botta F, Fauchon N, Blanchoud H, Chevreuil M, Guery B (2012) Phyt'Eaux Cités: Application and validation of a programme to reduce surface water contamination with urban pesticides. *Chemosphere* 86:166–176. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.10.005
280. Köck-Schulmeyer M, Ginebreda A, González S, Cortina JL, de Alda ML, Barceló D (2012) Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Llobregat River Basin (NE Spain). *Chemosphere* 86:8–16. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.08.034
281. Robles-Molina J, Gilbert-López B, García-Reyes JF, Molina-Díaz A (2014) Monitoring of selected priority and emerging contaminants in the Guadalquivir River and other related surface waters in the province of Jaén, South East Spain. *Sci Total Environ* 479–480:247–257. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.121
282. Palma P, Köck-Schulmeyer M, Alvarenga P, Ledo L, de Alda ML, Barceló D (2015) Occurrence and potential risk of currently used pesticides in sediments of the Alqueva reservoir (Guadiana Basin). *Environ Sci Pollut Res* 22:7665–7675. doi: 10.1007/s11356-015-4390-1
283. Villaverde J, Hildebrandt A, Martínez E, Lacorte S, Morillo E, Maqueda C, Viana P, Barceló D (2008) Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal. *Sci Total Environ* 390:507–513. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.10.034
284. Allinson G, Zhang P, Bui AD, Allinson M, Rose G, Marshall S, Pettigrove V (2015) Pesticide and trace metal occurrence and aquatic benchmark exceedances in surface waters and sediments of urban wetlands and retention ponds in Melbourne, Australia. *Environ Sci Pollut Res* 22:10214–10226. doi: 10.1007/s11356-015-4206-3
285. Struger J, Grabuski J, Cagampan S, Sverko E, Marvin C (2016) Occurrence and Distribution of Carbamate Pesticides and Metalaxyl in Southern Ontario Surface Waters 2007–2010. *Bull Environ Contam Toxicol* 96:423–431. doi: 10.1007/s00128-015-1719-x
286. Wightwick AM, Bui AD, Zhang P, Rose G, Allinson M, Myers JH, Reichman SM, Menzies NW, Pettigrove V, Allinson G (2012) Environmental Fate of Fungicides in Surface Waters of a Horticultural-Production Catchment in Southeastern Australia. *Arch Environ Contam Toxicol* 62:380–390. doi: 10.1007/s00244-011-9710-y

287. Reilly TJ, Smalling KL, Orlando JL, Kuivila KM (2012) Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. *Chemosphere* 89:228–234. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.04.023
288. Giordano A, Fernández-Franzón M, Ruiz MJ, Font G, Picó Y (2009) Pesticide residue determination in surface waters by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 393:1733–1743. doi: 10.1007/s00216-009-2627-x
289. Kahle M, Buerge IJ, Hauser A, Müller MD, Poiger T (2008) Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters. *Environ Sci Technol* 42:7193–7200. doi: 10.1021/es8009309
290. Carafa R, Wollgast J, Canuti E, Lighthart J, Dueri S, Hanke G, Eisenreich SJ, Viaroli P, Zaldivar JM (2007) Seasonal variations of selected herbicides and related metabolites in water, sediment, seaweed and clams in the Sacca di Goro coastal lagoon (Northern Adriatic). *Chemosphere* 69:1625–1637. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.05.060
291. Lizotte RE, Shields FD, Testa S (2012) Effects of a simulated agricultural runoff event on sediment toxicity in a managed backwater wetland. *Water Air Soil Pollut* 223:5375–5389. doi: 10.1007/s11270-012-1287-1
292. European Commission (2004) S-Metolachlor, SANCO/1426/2001 - rev. 3, October 2004. *Off J Eur Communities* 6:1–25.
293. Barra Caracciolo A, Giuliano G, Grenni P, Guzzella L, Pozzoni F, Bottoni P, Fava L, Crobe A, Orrù M, Funari E (2005) Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. *Environ Pollut* 134:525–534. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2004.08.014
294. Zheng SQ, Cooper J-F (1996) Adsorption, Desorption, and Degradation of Three Pesticides in Different Soils. *Arch Environ Contam Toxicol* 30:15–20.
295. Dec J, Bollag JM (1997) Determination of covalent and noncovalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil. *Soil Sci* 162:858–874. doi: 10.1097/00010694-199712000-00002
296. Youbin S, Kazuhiro T, Akio I, Dongmei Z (2009) Adsorption, desorption and dissipation of metolachlor in surface and subsurface soils. *Pest Manag Sci* 65:956–962. doi: 10.1002/ps.1779
297. Quintana J, Martí I, Ventura F (2001) Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC–MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results. *J Chromatogr A* 938:3–13. doi: 10.1016/S0021-9673(01)01168-2
298. Rodriguez-Mozaz S, López de Alda MJ, Barceló D (2004) Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1045:85–92. doi: 10.1016/J.CHROMA.2004.06.040
299. Ricart M, Guasch H, Brix R, Conceição MH, Geiszinger A, Alda MJL de, López-Doval JC, Muñoz I, Postigo C, Romaní AM, Villagrasa M (2010) Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: Pesticide effects on biological communities. *J Hydrol* 383:52–61. doi: 10.1016/j.jhydrol.2009.08.014

300. Köck-Schulmeyer M, Ginebreda A, Postigo C, López-Serna R, Pérez S, Brix R, Llorca M, Alda ML de, Petrović M, Munné A, Tirapu L, Barceló D (2011) Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load of polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain). *Chemosphere* 82:670–678. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2010.11.005
301. Abrahao R, Sarasa J, Causape J, Garcia-Garizabal I, Ovelleiro JL (2011) Influence of irrigation on the occurrence of organic and inorganic pollutants in soil, water and sediments of a Spanish agrarian basin (Lerma). *Spanish J Agric Res* 9:124. doi: 10.5424/sjar/20110901-208-10
302. Lazartigues A, Fratta C, Baudot R, Wiest L, Feidt C, Thomas M, Cren-Olivé C (2011) Multiresidue method for the determination of 13 pesticides in three environmental matrices: water, sediments and fish muscle. *Talanta* 85:1500–1507. doi: 10.1016/j.talanta.2011.06.023
303. Fuentes E, Báez ME, Labra R (2007) Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. *J Chromatogr A* 1169:40–46. doi: 10.1016/j.chroma.2007.08.064
304. Brondi SHG, de Macedo AN, Vicente GHL, Nogueira ARA (2011) Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment. *Bull Environ Contam Toxicol* 86:18–22. doi: 10.1007/s00128-010-0176-9
305. Terzopoulou E, Voutsas D, Kaklamanos G (2014) A multi-residue method for determination of 70 organic micropollutants in surface waters by solid-phase extraction followed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res* 22:1095–1112. doi: 10.1007/s11356-014-3397-3
306. Carvalho RN, Marinov D, Loos R, Napierska D, Chirico N, Lettieri T (2016) Monitoring-based Exercise: Second Review of the Priority Substances List under the Water Framework Directive.
307. Papadakis E-N, Tsaboula A, Kotopoulou A, Kintzikoglou K, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E (2015) Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci Total Environ* 536:793–802. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2015.07.099
308. Gebremariam SY, Beutel MW, Yonge DR, Flury M, Harsh JB (2012) Adsorption and Desorption of Chlorpyrifos to Soils and Sediments. Springer, New York, NY, pp 123–175
309. Xue N, Li F, Hou H, Li B (2008) Occurrence of endocrine-disrupting pesticide residues in wetland sediments from Beijing, China. *Environ Toxicol Chem* 27:1055. doi: 10.1897/07-511.1
310. Bass JK, Ortega L, Rosales C, Petersen NJ, Philen RM (2001) What's being used at home: a household pesticide survey. *Rev Panam Salud Publica* 9:138–144.
311. Moreno-Gonzalez R, Leon VM (2017) Presence and distribution of current-use pesticides in surface marine sediments from a Mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environ Sci Pollut Res* 24:8033–8048. doi: 10.1007/s11356-017-8456-0
312. Moeder M, Carranza-Diaz O, López-Angulo G, Vega-Aviña R, Chávez-Durán FA, Jomaa S, Winkler U, Schrader S, Reemtsma T, Delgado-Vargas F (2017) Potential of vegetated ditches to manage organic pollutants derived from agricultural runoff and domestic

- sewage: A case study in Sinaloa (Mexico). *Sci Total Environ* 598:1106–1115. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.149
313. Santos Pereira A, Daam MA, Cerejeira MJ Evaluation of FOCUS surface water pesticide concentration predictions and risk assessment of field-measured pesticide mixtures-a crop-based approach under Mediterranean conditions. doi: 10.1007/s11356-017-9393-7
314. Xiong J, Wang Z, Ma X, Li H, You J (2019) Occurrence and risk of neonicotinoid insecticides in surface water in a rapidly developing region: Application of polar organic chemical integrative samplers. *Sci Total Environ* 648:1305–1312. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.256
315. Morrissey CA, Mineau P, Devries JH, Sanchez-Bayo F, Liess M, Cavallaro MC, Liber K (2015) Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environ Int* 74:291–303. doi: 10.1016/J.ENVINT.2014.10.024
316. Lekkas T, Kolokythas G, Nikolaou A, Kostopoulou M, Kotrikla A, Gatidou G, Thomaidis NS, Golfopoulos S, Makri C, Babos D, Vagi M, Stasinakis A, Petsas A, Lekkas DF Evaluation of the pollution of the surface waters of Greece from the priority compounds of List II, 76/464/EEC Directive, and other toxic compounds. doi: 10.1016/j.envint.2004.04.001
317. Konstantinou IK, Hela DG, Albanis TA (2006) The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ Pollut* 141:555–570. doi: 10.1016/j.envpol.2005.07.024
318. Vryzas Z, Alexoudis C, Vassiliou G, Galanis K, Papadopoulou-Mourkidou E (2011) Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:174–181. doi: 10.1016/j.ecoenv.2010.04.011
319. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2007) Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1161:132–145. doi: 10.1016/j.chroma.2007.05.074
320. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2008) The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–negative electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* 74:1299–1312. doi: 10.1016/j.talanta.2007.08.037
321. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2009) The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res* 43:363–380. doi: 10.1016/j.watres.2008.10.047
322. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RMRM, Guwy AJAJ (2008) Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 391:1293–308. doi: 10.1007/s00216-008-1854-x

323. Paíga P, Santos LHMLM, Delerue-Matos C (2017) Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 135:75–86. doi: 10.1016/j.jpba.2016.12.013
324. Stewart M, Olsen G, Hickey CW, Ferreira B, Jelić A, Petrović M, Barcelo D (2014) A survey of emerging contaminants in the estuarine receiving environment around Auckland, New Zealand. *Sci Total Environ* 468–469:202–210. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.08.039
325. Ternes TA (1998) Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. *Water Res* 32:3245–3260.
326. Maruya KA, Vidal-Dorsch DE, Bay SM, Kwon JW, Xia K, Armbrust KL (2012) Organic contaminants of emerging concern in sediments and flatfish collected near outfalls discharging treated wastewater effluent to the Southern California Bight. *Environ Toxicol Chem* 31:2683–2688. doi: 10.1002/etc.2003
327. Baker DR, Kasprzyk-Hordern B (2011) Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:7901–13. doi: 10.1016/j.chroma.2011.08.092
328. Silveira MAK, Caldas SS, Guilherme JR, Soares BM, Primel EG (2013) Quantification of Pharmaceuticals and Personal Care Product Residues in Surface and Drinking Water Samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. 24:1385–1395.
329. Al Qarni H, Collier P, O’Keeffe J, Akunna J (2016) Investigating the removal of some pharmaceutical compounds in hospital wastewater treatment plants operating in Saudi Arabia. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:13003–13014. doi: 10.1007/s11356-016-6389-7
330. Wahlberg C, Björlenius B, Paxéus N (2011) Fluxes of 13 selected pharmaceuticals in the water cycle of Stockholm, Sweden. *Water Sci Technol* 63:1772 LP-1780.
331. Alygizakis NA, Gago-Ferrero P, Borova VL, Pavlidou A, Hatzianestis I, Thomaidis NS (2016) Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Sci Total Environ* 541:1097–1105. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.145
332. Vanderford BJ, Snyder SA (2006) Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry †. *Environ Sci Technol* 40:7312–7320. doi: 10.1021/es0613198
333. K’oreje KO, Vergeynst L, Ombaka D, De Wispelaere P, Okoth M, Van Langenhove H, Demeestere K (2016) Occurrence patterns of pharmaceutical residues in wastewater, surface water and groundwater of Nairobi and Kisumu city, Kenya. *Chemosphere* 149:238–244. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.095
334. Vidal-Dorsch DE, Bay SM, Maruya K, Snyder SA, Trenholm RA, Vanderford BJ (2012) Contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents and marine receiving water. *Environ Toxicol Chem* 31:2674–2682. doi: 10.1002/etc.2004
335. Wille K, Noppe H, Verheyden K, Vanden Bussche J, De Wulf E, Van Caeter P, Janssen CR, De Brabander HF, Vanhaecke L (2010) Validation and application of an LC-MS/MS

- method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal Bioanal Chem* 397:1797–1808. doi: 10.1007/s00216-010-3702-z
336. Klosterhaus SL, Grace R, Hamilton MC, Yee D (2013) Method validation and reconnaissance of pharmaceuticals, personal care products, and alkylphenols in surface waters, sediments, and mussels in an urban estuary. *Environ Int* 54:92–99. doi: 10.1016/j.envint.2013.01.009
337. Spongberg AL, Witter JD, Acuña J, Vargas J, Murillo M, Umaña G, Gómez E, Perez G (2011) Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. *Water Res* 45:6709–17. doi: 10.1016/j.watres.2011.10.004
338. Munaron D, Tapie N, Budzinski H, Andral B, Gonzalez J-L (2012) Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuar Coast Shelf Sci* 114:82–92. doi: 10.1016/j.ecss.2011.09.009
339. Weigel S, Bester K, Hühnerfuss H (2001) New method for rapid solid-phase extraction of large-volume water samples and its application to non-target screening of North Sea water for organic contaminants by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 912:151–61.
340. Bayen S, Zhang H, Desai MM, Ooi SK, Kelly BC (2013) Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: Influence of hydrodynamics and physical–chemical properties. *Environ Pollut* 182:1–8. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.028
341. Togola A, Budzinski H (2007) Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Anal Bioanal Chem* 388:627–35. doi: 10.1007/s00216-007-1251-x
342. Nakada N, Kiri K, Shinohara H, Harada A, Kuroda K, Takizawa S, Takada H (2008) Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage. *Environ Sci Technol* 42:6347–53.
343. Langford K, Thomas K V. (2011) Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *J Environ Monit* 13:416–421. doi: 10.1039/C0EM00342E
344. Pait AS, Warner RA, Hartwell SI, Nelson JO, Pacheco PA, Mason AL (2006) Human use pharmaceuticals in the estuarine environment a survey of the Chesapeake Bay, Biscayne Bay and Gulf of the Farallones. *NOS NCCOS* 7. 21pp.
345. Benotti MJ, Brownawell BJ (2007) Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environ Sci Technol* 41:5795–5802. doi: 10.1021/es0629965
346. Yang Y, Fu J, Peng H, Hou L, Liu M, Zhou JLL (2011) Occurrence and phase distribution of selected pharmaceuticals in the Yangtze Estuary and its coastal zone. *J Hazard Mater* 190:588–96. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.03.092
347. Ramaswamy BR, Shanmugam G, Velu G, Rengarajan B, Larsson DGJ (2011) GC-MS analysis and ecotoxicological risk assessment of triclosan, carbamazepine and parabens in Indian rivers. *J Hazard Mater* 186:1586–93. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.037
348. Hedgespeth ML, Sapozhnikova Y, Pennington P, Clum A, Fairey A, Wirth E (2012)

- Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. *Sci Total Environ* 437:1–9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.07.076
349. Fang T-H, Nan F-H, Chin T-S, Feng H-M (2012) The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. *Mar Pollut Bull* 64:1435–1444. doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.04.008
350. European Commission (2003) Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances.
351. European Commission (1993) Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993 laying down the principles (or assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC. *Off J Eur Communities* 9–18.
352. Thomaidi VS, Stasinakis AS, Borova VL, Thomaidis NS (2016) Assessing the risk associated with the presence of emerging organic contaminants in sludge-amended soil: A country-level analysis. *Sci Total Environ* 548–549:280–288. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.01.043
353. Ginebreda A, Muñoz I, de Alda ML, Brix R, López-Doval J, Barceló D (2010) Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environ Int* 36:153–62. doi: 10.1016/j.envint.2009.10.003
354. Sanderson H (2003) Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicol Lett* 144:383–395. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00257-1
355. Roos V, Gunnarsson L, Fick J, Larsson DGJ, Rudén C (2012) Prioritising pharmaceuticals for environmental risk assessment: Towards adequate and feasible first-tier selection. *Sci Total Environ* 421–422:102–110. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2012.01.039
356. Papageorgiou M, Kosma C, Lambropoulou D (2016) Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci Total Environ* 543:547–569. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.047
357. Minnesota Department of health Amitriptyline screening profile.
358. Pugajeva I, Rusko J, Perkons I, Lundanes E, Bartkevics V (2017) Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 133:64–74. doi: 10.1016/j.jpba.2016.11.008
359. Jelić A, Petrović M, Barceló D (2009) Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Talanta* 80:363–371. doi: 10.1016/j.talanta.2009.06.077
360. Comtois-Marotte S, Chappuis T, Vo S, Gilbert N (2017) Analysis of emerging contaminants in water and solid samples using high-resolution mass spectrometry with a Q Exactive orbital ion trap and estrogenic activity with YES-assay. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.09.077

361. Thiebault T, Chassiot L, Fougère L, Destandau E, Simonneau A, Van Beek P, Souhaut M, Chapron E (2017) Record of pharmaceutical products in river sediments: A powerful tool to assess the environmental impact of urban management? *Anthropocene* 18:47–56. doi: 10.1016/j.ancene.2017.05.006
362. Petrie B, Youdan J, Barden R, Kasprzyk-Hordern B (2016) Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1431:64–78. doi: 10.1016/j.chroma.2015.12.036
363. Rovira A, Alcaraz C, Ibáñez C (2012) Spatial and temporal dynamics of suspended load at-a-cross-section: The lowermost Ebro River (Catalonia, Spain). *Water Res* 46:3671–3681. doi: 10.1016/J.WATRES.2012.04.014
364. Wang J, Hu J, Zhang S (2010) Studies on the sorption of tetracycline onto clays and marine sediment from seawater. *J Colloid Interface Sci* 349:578–582. doi: 10.1016/j.jcis.2010.04.081
365. Huerta B, Rodriguez-Mozaz S, Nannou C, Nakis L, Ruhí A, Acuña V, Sabater S, Barcelo D (2015) Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river. *Sci Total Environ* 540:241–249. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.049
366. Li WC (2014) Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ Pollut* 187:193–201. doi: 10.1016/j.envpol.2014.01.015
367. Stuart M, Lapworth D, Crane E, Hart A (2012) Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci Total Environ* 416:1–21. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2011.11.072
368. Masiá A, Blasco C, Picó Y (2014) Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography–mass spectrometry. *Trends Environ Anal Chem* 2:11–24. doi: 10.1016/j.teac.2014.03.002
369. Gómez-Ramos MDM, Rajski Ł, Heinzen H, Fernández-Alba AR (2015) Liquid chromatography Orbitrap mass spectrometry with simultaneous full scan and tandem MS/MS for highly selective pesticide residue analysis. *Anal Bioanal Chem* 407:6317–6326. doi: 10.1007/s00216-015-8709-z
370. Makarov A, Denisov E, Kholomeev A, Baischun W, Lange O, Strupat K, Horning S (2006) Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal Chem* 78:2113.
371. Rajski Ł, del Mar Gómez Ramos M, Fernández-Alba AR (2017) Evaluation of MS2 workflows in LC-Q-Orbitrap for pesticide multi-residue methods in fruits and vegetables. *Anal Bioanal Chem* 409:5389–5400. doi: 10.1007/s00216-017-0220-2
372. Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Walker S, Widmer M (2010) Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high-resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): “Where is the crossover point?” *Anal Chim Acta* 673:60–72. doi: 10.1016/J.ACA.2010.05.020
373. Bijlsma L, Emke E, Hernández F, de Voogt P (2013) Performance of the linear ion trap Orbitrap mass analyzer for qualitative and quantitative analysis of drugs of abuse and relevant metabolites in sewage water. *Anal Chim Acta* 768:102–110. doi: 10.1016/J.ACA.2013.05.020

- 10.1016/j.aca.2013.01.010
374. Hernández F, Sancho J V., Ibáñez M, Abad E, Portolés T, Mattioli L (2012) Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal Bioanal Chem* 403:1251–1264. doi: 10.1007/s00216-012-5844-7
375. Kaklamanos G, Vincent U, von Holst C, George K (2013) Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1293:60–74. doi: 10.1016/j.chroma.2013.03.078
376. Huysman S, Van Meulebroek L, Vanryckeghem F, Van Langenhove H, Demeestere K, Vanhaecke L (2017) Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatographic high-resolution Q-Orbitrap mass spectrometric method for the simultaneous determination of steroidal endocrine disrupting compounds in aquatic matrices. *Anal Chim Acta* 984:140–150. doi: 10.1016/j.aca.2017.07.001
377. European Commission (2009) Directive 2009/90/EC. *Off J Eur Union* L201:36–38.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ/ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ

Σύντμηση/ Ακρωνύμιο	Αγγλικός όρος	Απόδοση στα ελληνικά
ACN	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
ADI	Acceptable Daily Intake	Αποδεκτή Ημερήσια Δόση
AESPGP	Association Européenne des Spécialités Pharmaceutiques Grand Public	Πανευρωπαϊκή Οργάνωση για την αυτοφροντίδα
AGC	Automatic Gain Control	Σύστημα ελέγχου αυτόματης απολαβής ιόντων
AOEL	Acceptable Operator Exposure Level	Αποδεκτό Επίπεδο Έκθεσης Χειριστή
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση
API	Atmospheric Pressure Ionization	Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization	Φωτοϊοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση
ARfD	Acute Reference Dose	Οξεία Δόση Αναφοράς
ASE	Accelerated Solvent Extraction	Επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη
ATC	Anatomic, Therapeutic, Chemical classification system	Ανατομικό, Θεραπευτικό και Χημικό σύστημα ταξινόμησης
BAF	Bioaccumulation Factor	Συντελεστής βιοσυσσώρευσης
BCF	Bioconcentration Factor	Συντελεστής βιοσυγκέντρωσης
BOD	Biochemical Oxygen Demand	Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο
C18	Octadecyl silica	Οκταδέκυλο τροποποιημένη πυριτία
CE	Collision Energy	Ενέργεια διάστασης
CI	Chemical Ionization	Χημικός ιοντισμός
CID	Collision Induced Dissociation	Διάσταση ιόντων επαγόμενη από πρόσκρουση
d.w.	dry weight	Ξηρό βάρος
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων
DART	Direct Analysis in Real Time	Άμεση ανάλυση σε πραγματικό χρόνο
DCM	Dichloromethane	Διχλωρομεθάνιο
ddMS/MS	Data Dependent (Tandem) Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας εξαρτώμενη από δεδομένα
DESI	Desorption Electrospray Ionization	Ιοντισμός εκρόφησης με ηλεκτροψεκασμό
DOM	Dissolved Organic Matter	Διαλυμένη οργανική ουσία
dSPE	Dispersive Solid Phase Extraction	Εκχύλιση Στερεάς Φάσης με διασπορά

Σύντμηση/ Ακρωνύμιο	Αγγλικός όρος	Απόδοση στα ελληνικά
EC	European Commission	Ευρωπαϊκή Επιτροπή
EC₅₀	Effective Concentration 50	Συγκέντρωση που προκαλεί επιπτώσεις στο 50% του υπο δοκιμή πληθυσμού
ECs	Emerging Contaminants	Αναδυόμενοι ρύποι
ED	Electrochemical Detector	Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής
EDCs	Endocrine Disrupting Compounds	Ενδοκρινικοί διαταράκτες
EEA	European Environmental Agency	Ευρωπαϊκή Υπηρεσία Περιβάλλοντος
EFSA	European Food Safety Agency	Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EAAT)
EI	Electron (Impact) Ionization	Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων
EPRW	European Pesticides Residues Workshop	Ευρωπαϊκό συνέδριο για τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων
EQS	Environmental Quality Standard	Πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος
ERA	Environmental Risk Assessment	Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας
ESI	Electrospray Ionization	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
FA	Formic Acid	Μυρμηκικό (μυρμηκικό) οξύ
FAB	Fast-Atom Bombardment	Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Οργανισμός τροφίμων και γεωργίας του ΟΗΕ
FEPA	Food and Environment Protection Act	Αγγλικός Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος και Τροφίμων
FIA	Flow Injection Analysis	Ανάλυση με έγχυση σε ροή
FLD	Fluorescence Detector	Φθορισμομετρικός ανιχνευτής
FS	Full Scan	Πλήρης σάρωση φασμάτων μάζας
FT	Fourier Transform	Εκνέφωση
FTICR	Fourier-Transform Ion Cyclotron	Αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού
FWHM	Full Width Half Maximum	Πλήρες εύρος στο μισό του μέγιστου
GAP	Good Agricultural Practice	Ορθή Γεωργική Πρακτική
GC	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
GCB	Graphitized Carbon Black	Γραφίτιοποιημένος άνθρακας
GC-MS	Gas Chromatography–Mass spectrometry	Αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας
GESAMP	Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution	Επιστημονική Επιτροπή για τη Θάλασσα Ρύπανση

Σύντμηση/ Ακρωνύμιο	Αγγλικός όρος	Απόδοση στα ελληνικά
GMP	Good Manufacturing Practice	Ορθή Βιομηχανική Πρακτική
HCD	High Collision Induced Dissociation	Διάσπαση ιόντων επαγόμενη από πρόσκρουση υψηλής ενέργειας
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance	Υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HRMS	High-resolution Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας
IDL	Instrumental Detection Limit	Όριο Ανίχνευσης Οργάνου
IEM	Ion Evaporation Model	Μοντέλο εξάτμισης ιόντος
ILIS	Isotopically-labelled internal standard	Ισοτοπικά επισημασμένο εσωτερικό πρότυπο
IPPC	International Plant Protection Convention	Οδηγία για τον Ολοκληρωμένο Έλεγχο και Πρόληψη της Ρύπανσης
IQL	Instrumental Quantification Limit	Όριο Ποσοτικοποίησης Οργάνου
IS	Internal Standard	Εσωτερικό πρότυπο
ISP	Ionspray	Πηγή ESI με πνευματικά υποβοηθούμενη
IT	Ion Trap	Παγίδα ιόντων
LC	liquid chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
LC₅₀	Lethal Concentration 50	Θανατηφόρος συγκέντρωση για το 50% του υπό δοκιμή πληθυσμού
LC-ESI-MS	Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία–φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό
LC–MS	Liquid Chromatography–Mass spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας
LC–MS/MS	Liquid Chromatography–tandem Mass	Υγρή Χρωματογραφία σε σειρά
LD₅₀	Lethal Dose 50	Θανατηφόρος δόση για το 50% του υπό δοκιμή πληθυσμού
LLE	Liquid–Liquid extraction	Εκχύλιση Υγρού - Υγρού
LOAEL	Lowest-Observable-Adverse-Effect-Level	Χαμηλότερο επίπεδο έκθεσης που σχετίζεται με κάποια αρνητική επίδραση
LOD	Limit Of Detection	Όριο ανίχνευσης
LOQ	Limit Of Quantification	Όριο ποσοτικοποίησης
LTD	Linear Trap Quadrupole	Γραμμική Παγίδα Ιόντων
MAE	Microwave Assisted Extraction	Εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption	Ιοντισμός με εκρόφηση με τη βοήθεια

Σύντμηση/ Ακρωνύμιο	Αγγλικός όρος	Απόδοση στα ελληνικά
MCX	Mixed-mode Cation Exchange	Κατιονανταλλαγή μεικτού τρόπου δράσεως
MDL	Method Detection Limit	Όριο ανίχνευσης μεθόδου
ME	Matrix Effect	Επίδραση Υποστρώματος
MEC	Measured Environmental Concentration	Μετρούμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
MQL	Method Quantification Limit	Όριο ποσοτικοποίησης μεθόδου
M_r	Mass Relative	Σχετική μοριακή μάζα
MRM	Multiple Reaction Monitoring	Παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (μεταπτώσεων) ιόντος
MS	Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry	Φασματομετρία μάζας σε σειρά
MSFD	Marine Strategy Framework Directive	Οδηγία για τη θαλάσσια στρατηγική
MSPD	Matrix Solid-Phase Dispersion	Εκχύλιση διασποράς (προσοροφητικού υλικού) στο υπόστρωμα
NCE	Normalized Collision Energy	Κανονικοποιημένη ενέργεια διάστασης
NOAEL	Non-Observable-Adverse-Effect-Level	Επίπεδο κάτω από το οποίο δεν παρατηρείται αρνητική επίδραση
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη άρμακα
OCD	Over the Counter Drugs	Μη συνταγογραφούμενα φάρμακα
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PCPs	Personal Care Products	Προϊόντα προσωπικής φροντίδας
PDMS	Polydimethylsiloxane	Πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο
PE	Process Efficiency	Αποτελεσματικότητα μεθόδου
PEC	Predicted Environmental Concentration	Προβλεπόμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση
PFP	Pentafluorophenyl	Πενταφθοροφαίνυλο
PhACs	Pharmaceutically Active Compounds	Φαρμακευτικά ενεργές ουσίες
PLE	Pressurized Liquid Extraction	Υγρό εκχύλιση υπό πίεση
PNEC	Predicted Non-Effect Concentration	Προβλεπόμενη συγκέντρωση χωρίς επιπτώσεις
POPs	Persistent Organic Pollutants	Επίμονοι οργανικοί ρύποι
PQD	Pulsed Q dissociation	Διάσταση επαγόμενη από το τετράπολο

Σύντμηση/ Ακρωνύμιο	Αγγλικός όρος	Απόδοση στα ελληνικά
PSA	Primary Secondary Amine	Πρωτοταγής–δευτεροταγής αμίνη
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Πολυτετραφθοροαιθυλένιο
PVDF	Polyvinylidene Difluoride	Πολυβινυλιδενοδιφθορίδιο
PET	Polyethylene Terephthalate	Πολυ(τερεφθαλικός αιθυλενεστέρας)
Q	Quadrupole	Τετραπολικός αναλυτής μάζας ή απλό τετράπολο
QQQ	Triple Quadrupole	Τριπλό Τετράπολο
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	Γρήγορη, εύκολη, οικονομική, αποτελεσματική, ανθεκτική και εύκολη
RQ	Risk quotient	Πηλίκιο Επικινδυνότητας
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
RT	Retention Time	Χρόνος ανάσχεσης
S/N	Signal/Noise ratio	Λόγος σήματος προς θόρυβο
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction	Εκχύλιση με προσρόφηση σε μαγνήτη ανάδευσης
SCI	Sites of Community Importance	Τόποι κοινοτικής σημασίας
SD	Standard Deviation	Τυπική απόκλιση
SFE	Supercritical Fluid Extraction	Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού
SIM	Single Ion Monitoring	Παρακολούθηση ενός ιόντος
SPE	Solid Phase Extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης
SPME	Solid Phase Microextraction	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης
SRM	Single Reaction Monitoring	Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (μετάπτωσης) ιόντος
TDU	Thermal Desorption Unit	Μονάδα θερμικής εκρόφησης
TGD	Technical Guidance Document	Έγγραφο τεχνικής καθοδήγησης
TIC	Total Ion Chromatogram	Χρωματογράφημα συνόλου ιόντων
TLC	Thin Layer Chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
TOF	Time of Flight	Αναλυτές μάζας χρόνου πτήσης
t_R	Retention Time	Χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης
U.S.EPA	United States Environmental Protection Agency	Αρχή των Ηνωμένων Πολιτειών για την προστασία του περιβάλλοντος
UAE	Ultra-sound – assisted extraction	Εκχύλιση με υπερήχους
UHPLC	Ultra-High Pressure Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υπερύψηλης Πίεσης
UV	Ultraviolet	Υπεριώδης ακτινοβολία
w.w.	wet weight	υγρό βάρος

Σύντμηση/ Ακρωνύμιο	Αγγλικός όρος	Απόδοση στα ελληνικά
WFD	Water Framework Directive	Οδηγία–πλαίσιο για τα νερά
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
WHOCC	WHO Collaborating Centres Database	Κέντρο για τη μεθοδολογία στατιστικής φαρμάκων
XIC	Extracted Ion Chromatogram	Χρωματογράφημα επιλεγμένου ιόντος

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ/ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ

Σύντμηση/Ακρωνύμιο	Πλήρης Όρος
ΒΙΠΕ	Βιομηχανική περιοχή
δ.α	δεν ανιχνεύθηκε
ΕΑΑΤ	Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
ΕΚ	Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο
ΙΟΒΕ	Ίδρυμα Οικονομικών & Βιομηχανικών Ερευνών
κ.ο.α.	κάτω του ορίου ανίχνευσης
κ.ο.π.	κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΛΑΠ	Λεκάνη απορροής
Μ.Υ.Συ.Φα	Μη υποχρεωτικά συνταγογραφούμενα φάρμακα
ΜΕΥΑ	Μονάδα Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων
ΜΣΑΦ	Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα

ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ ΚΑΙ ΙΖΗΜΑΤΑ

Χριστίνα Ι. Νάννου
Διδακτορική Διατριβή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρουσία φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον αποτελεί σημαντικό ζήτημα και καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον έλεγχο της υπολειμματικότητάς τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα. Τα τελευταία χρόνια, ο αριθμός των μελετών παγκοσμίως που πραγματοποιούνται την ανάπτυξη και την εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων για την εκτίμηση των επιπέδων συγκεντρώσεων και την τύχη τέτοιων ξενοβιοτικών ενώσεων στο περιβάλλον αυξάνεται συνεχώς. Στην πλειονότητά τους, οι μελέτες αυτές ασχολούνται με επιφανειακά και υπόγεια νερά, με νερά από τις εισόδους και εξόδους των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων και λιγότερο με έδαφος και ιζήματα, ενώ υπάρχει σημαντική έλλειψη δεδομένων για τα παράκτια και θαλάσσια οικοσυστήματα. Ειδικότερα στην χώρα μας, αυτές οι έρευνες είναι ελάχιστες και αποσπασματικές, ενώ δεν αναφέρονται σε περιοχές με έντονη ιχθυοτροφική δραστηριότητα, που αποτελεί σημαντική εν δυνάμει πηγή θαλάσσιας ρύπανσης.

Για τη συστηματική και αξιόπιστη μελέτη υπολειμμάτων ρύπων σε ίχνη απαιτούνται ευαίσθητες αναλυτικές μέθοδοι, που θα επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου

αριθμού ενώσεων. Ωστόσο, ο μεγάλος αριθμός διαφορετικών κατηγοριών εν δυνάμει ρύπων, οι ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες τους και η πολυπλοκότητα ορισμένων υποστρωμάτων, καθιστά την πολύ-υπολειμματική ανάλυση απαιτητική και «πρόκληση» για την περιβαλλοντική αναλυτική χημεία.

Στην παρούσα Διατριβή, επιλέχθηκαν αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό 18 φυτοπροστατευτικών και 25 φαρμακευτικών ενώσεων σε νερά και ιζήματα. Οι μέθοδοι τελικά εφαρμόστηκαν σε μία περίπτωση μελέτης (case study) που αφορούσε περιοχές της Ελλάδας και της Ευρώπης, όπου εκτός των λοιπών ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, λειτουργούν και υδατοκαλλιέργειες. Κριτήρια για την επιλογή των ενώσεων ήταν η εκτεταμένη χρήση/κατανάλωσή τους, η αποδεδειγμένη παρουσία τους στο περιβάλλον και την εν δυνάμει επικινδυνότητά τους για αυτό. Συμπεριλήφθηκαν, μεταξύ άλλων, «ρύποι προτεραιότητας» και ενώσεις από τον «κατάλογο επιτήρησης ουσιών» της ΕΕ.

Για τον προσδιορισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (και συγκεκριμένα ο υβριδικός τροχιακός αναλυτής μάζας Orbitrap). Χρησιμοποιήθηκε πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, στη λειτουργία του θετικού ιοντισμού, με συνολικό χρόνο ανάλυσης κάτω από δέκα λεπτά. Τόσο στην υγρή χρωματογραφία όσο και στη φασματομετρία μάζας, μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι κρίσιμες παράμετροι. Για την ποσοτικοποίηση και τη διόρθωση της επίδρασης από το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες προσομοίωσης στο υπόστρωμα και ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα. Εκτός από την εξαιρετική ακρίβεια μάζας (<5 ppm), που παρέχεται από την τεχνολογία Orbitrap MS, η επιβεβαίωση των θετικών ανιχνεύσεων βασίστηκε επίσης σε θραυσματοποίηση MS/MS.

Για τον προσδιορισμό των υπό έρευνα ενώσεων στα ιζήματα επιλέχθηκε η σχετικά πρόσφατη, απλή και ταχεία μέθοδος εκχύλισης QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Για να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης, μελετήθηκαν ο διαλύτης εκχύλισης και το pH του, τα άλατα εκχύλισης, η ποσότητα και η επανυδάτωση του προς ανάλυση δείγματος ενώ για το στάδιο του καθαρισμού μελετήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί προσροφητικών. Στη βελτιστοποιημένη μέθοδο, οι ανακτήσεις για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις κυμάνθηκαν από 70,8% και 106,2% και για τις φαρμακευτικές από 64 έως 101%, με σχετική τυπική απόκλιση κάτω από 15% σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Τα όρια ποσοτικοποίησης ήταν κάτω από 10 ng g⁻¹ για τη συντριπτική πλειοψηφία των φυτοπροστατευτικών, ενώ για τα φαρμακευτικά υπολογίστηκαν από 1,3 έως 47 ng g⁻¹. Ο

συντελεστής γραμμικότητας ήταν πάνω από 0,992 σε όλες τις περιπτώσεις, με γραμμική περιοχή από το όριο ποσοτικοποίησης έως περίπου 100 φορές την τιμή αυτή. Η μελέτη επίδρασης υποστρώματος έδειξε ελαφρά μείωση του σήματος που μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό μετά την εφαρμογή του σταδίου καθαρισμού, για την πλειονότητα των ενώσεων.

Για την εκχύλιση των υδατικών δειγμάτων επιλέχθηκε η ευρύτατα διαδεδομένη τεχνική SPE (solid phase extraction). Για τη βελτιστοποίηση, ελέγχθηκαν διαφορετικά αναλυτικά πρωτόκολλα εξετάζοντας έτσι διαφορετικές μικροστήλες εκχύλισης, διαφορετικά pH δείγματος και διαφορετικούς διαλύτες έκπλυσης και έκλουσης. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 61%–96% στο νερό ποταμού, ενώ ήταν ελαφρώς υψηλότερα (60%–111%) για το θαλασσινό νερό. Οι ανακτήσεις για τις φαρμακευτικές ενώσεις σε ποτάμια ύδατα κυμάνθηκαν από 61% έως 105,3% και στο θαλασσινό νερό από 55,9% έως 110,3%. Σε όλες τις περιπτώσεις, η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ήταν μικρότερη από 15%. Τα όρια ποσοτικοποίησης της μεθόδου υπολογίστηκαν από 1,7 ng L⁻¹ έως 90 ng L⁻¹ και από 0,8 ng L⁻¹ έως 25 ng L⁻¹ για τις φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις αντίστοιχα. Η γραμμικότητα ήταν πολύ καλή σε όλες τις περιπτώσεις ($r^2 > 0,997$). Η επικύρωση των πολύ-υπολειμματικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν πραγματοποιήθηκε με βάση την ισχύουσα νομοθεσία της ΕΕ, όπως αυτή ορίζεται στις οδηγίες 2002/657/ΕΚ και SANTE 11813/2017.

Η εφαρμογή των μεθόδων σε δείγματα νερών και ιζημάτων από υδάτινα σώματα πλησίον υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα, την Αλβανία, την Ιταλία, την Ισπανία, την Πορτογαλία, την τη Νορβηγία και το Ηνωμένο Βασίλειο επιβεβαίωσε την παρουσία πολλών φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων κυρίως στα νερά, και λιγότερο στα ιζήματα. Συγκεκριμένα, το 67% των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων ανιχνεύθηκε στο 75% των δειγμάτων νερού, ενώ μόνο το 50% αυτών των ενώσεων ανιχνεύθηκαν σε συγκέντρωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης. Στα ιζήματα, η συχνότητα ανίχνευσης ήταν αρκετά χαμηλή και σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης. Όσον αφορά την ανίχνευση των φαρμακευτικών ενώσεων στα ύδατα, το 36% αυτών ανιχνεύθηκε τουλάχιστον μία φορά. Οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν συχνότερα τόσο στο νερό όσο και στο ίζημα ήταν το carbamazepine και το venlafaxine. Επιπλέον, εμφάνισαν την υψηλότερη συγκέντρωση σε νερό, ενώ στα ιζήματα την υψηλότερη συγκέντρωση εμφάνισε το risperidone. Η Ιταλία ήταν η χώρα με τις περισσότερες θετικές ανιχνεύσεις.

Η εκτίμηση περιβαλλοντικού κινδύνου έγινε με την εφαρμογή της μεθόδου του πηλίκου (risk quotient) για τρία τροφικά επίπεδα (φύκη, ασπόνδυλα και ψάρια). Σχεδόν σε

όλες τις περιπτώσεις οι τιμές RQ ήταν μικρότερες από 0,01, που αντιστοιχεί σε "χαμηλό κίνδυνο", με εξαίρεση μια φυτοπροστατευτική και μια φαρμακευτική ένωση. Η μέθοδος αυτή υποδεικνύει την ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση της υπολειμματικότητας τέτοιων ρύπων και της έκθεσης οργανισμών σε αυτούς, για την ολοκληρωμένη αποτίμηση της υποβάθμισης του υδάτινου περιβάλλοντος.

MODERN ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDE AND PHARMACEUTICAL RESIDUES IN NATURAL WATERS AND SEDIMENTS

Christina I. Nannou

Ph.D Thesis

SUMMARY

Among the vast array of contaminants of anthropogenic origin reaching the environment, pesticides and pharmaceuticals constitute two emerging classes raising concerns about long-term consequences on human health. Widespread contamination has been observed in the different environmental compartments such as surface, marine and ground waters, soils and sediments as well as in invertebrates and vertebrates, at concentrations from few ng L^{-1} to several mg L^{-1} . Continuous discharge into aquatic systems make the residues of those compounds ubiquitous in the environment. Several of them have been recently added to the 'priority' and 'watch list' of substances, underlining the significance to study their environmental occurrence.

Pesticides, which reach the environment through agricultural run-off, improper use, spray drift etc, are extensively studied and well-documented. Being considered as a vital component of modern farming, they play a major role in maintaining high agricultural productivity. Hence, in high-input intensive agricultural production systems, the widespread use of pesticides to manage pests has emerged as a dominant feature. However, reliance on pesticides is difficult to sustain because of unintended long-term adverse effects on the environment and human health. On the other hand, pharmaceuticals constitute a more 'recent' class of contaminants. They enter the environment through defective septic systems,

leaking underground sewage, surface run-off, but mainly inadequate degradation or removal through wastewater treatment plants (WWTPs). The rate of their usage and consumption has been increasing rapidly and so will be, due to the expanding population, inverting age structure, new target age groups, and expansion of potential markets aggravates the problem.

Over the last 20 years increasing attention has been paid to understanding the presence and impacts of pesticides and pharmaceuticals in freshwater ecosystems. However, a lack of a systematic approach to the detection of such compounds into coastal environments has led to fragmented literature of serendipitous approaches. This is a critical knowledge gap, given the significant increase in coastal human populations around the globe and the growth of coastal megacities, together with the importance of coastal aquaculture around the world. There is now widespread recognition of the need for a cradle-to-grave stewardship of pesticides and medicines for minimizing environmental exposure while improving crops or promoting human and animal health respectively. What is more, the majority of monitoring programs focus on the aqueous compartment. Studies about the presence of these compounds in sediments -let alone marine ones- are scarce. However, since sediments are the result of the integration of various processes, they tend to be a sink for many contaminants, providing not only a global estimation about the quality status of water bodies but also reliable historical contamination information.

Sensitive analytical methods to evaluate the extent of the risk for the plethora of pesticides and pharmaceuticals are required. Multi-residue methods are powerful tools, as they may provide greater knowledge about the overall contamination. Recently, the evolution of high-resolution mass spectrometry has initiated a new trend in analytical data processing. High resolving power and high mass accuracy are the 'gold' parameters, enabling the distinction between any possible interfering matrix components and target analytes, within a decimal difference, avoiding false positives. Moreover, the identification and confirmation are more selective and reliable thanks to the accurate mass measurements for each molecular ion and subsequent fragments.

The instrumentation of ion trap/Orbitrap (LTQ–Orbitrap) is a combination of two different mass spectrometer types, with excellent detection and identification ability for compounds of a range of molecular weights, even in the most complex matrices. It outweighs against the traditionally-used low-resolution methods, enabling the quantification and confirmation of a theoretically unlimited number of analytes within a single analytical run, as well as isobaric compounds that differ in the elemental composition, can be distinguished.

To keep up with this evolution in analytical strategies, generic sample preparation methodologies employing different clean-up techniques, offering reliable analysis of a large number of compounds, are needed. However, given the different classes and physicochemical properties of the analytes and the complexity of the matrices, multi-residue analysis in such matrices is a challenging issue.

Stepping towards a more comprehensive assessment of environmental exposure to contaminants, the present dissertation looks at the development and validation of analytical methods that combine efficient extraction combined with the cutting of-the-edge LC–Orbitrap/MS mass spectrometry. Following the current trend to apply cheaper, miniaturized and more ‘green’ extraction techniques with sufficiently cleaned-up extracts amenable to LC–MS analysis, the so-called QuEChERS approach followed by dispersive solid phase extraction (dSPE) clean-up was selected and modified accordingly for sediments analysis. For water analysis, the common, extensively studied and effective SPE was the method of choice.

The LC-MS crucial parameters were optimized and finally, the analysis, operated in positive ionization mode, was carried out in a short overall analysis time. Identification was based both on accurate mass and retention time. Matrix-matched calibration approach along with isotopically-labeled internal standards was employed for quantification and correction of matrix effect. Apart from mass accuracy provided by Orbitrap FT-MS technology, the confirmation of positive findings was also based on MS/MS fragmentation and isotope abundance, employed to reduce the number of possible formulas for a given mass. Afterward, the extraction methods were also optimized and validated in accordance with the European Commission requirements, while further confirmation was achieved by MS fragmentation.

Regarding QuEChERS, to obtain the optimum conditions, pH, extraction salts, sediment amount and clean-up sorbents were studied for pesticides and pharmaceuticals separately. In the optimized method, recoveries for pesticides were calculated between 70.8% and 106.2% and for pharmaceuticals between 64-101 % in the intermediate spiking level, with a relative standard deviation below 15% in almost all cases. Method quantification limits were below 10 ng g⁻¹ for the vast majority of pesticides, while for pharmaceuticals ranged from 1.3 to 47 ng g⁻¹. The linearity, expressed as a correlation coefficient, was over 0.992 in all cases, within a range from each compound’s method quantification limit to 500 ng g⁻¹. Matrix effect study revealed slight signal suppression that was decreased largely the clean-up step for the majority of compounds.

For the SPE optimization, different analytical protocols were examined for each mix of compounds, testing different cartridges, sample pH, washing and elution solvent. For

pesticides, the recovery rates ranged from 61% -96% in the river water for medium spiking level, while they were slightly higher (60% -111%) for seawater due to increased ionic strength but also substrate effect. The recoveries for pharmaceutical compounds in river waters ranged from 61% to 105.3% and in seawater from 55.9% to 110.3%. In all cases, the repeatability and intra-laboratory reproducibility was less than 15%. Method quantification limits ranged from 1.7 ng L⁻¹ to 90 ng L⁻¹ for pesticides and from 0.8 ng L⁻¹ to 25 ng L⁻¹ for pharmaceuticals. Linearity was excellent in all cases, with the correlation coefficient being greater than 0.997. Matrix effect study in seawater revealed strong signal suppression only for dimethoate, fluoxetine, paroxetine and sertraline.

The developed analytical methodologies were implemented in an EU-wide case study, including samples from coastal areas where aquaculture is active in Greece, Albania, Italy, Spain, Portugal, the United Kingdom, and Norway.

Concerning the pesticides, the study revealed the presence of 67% of the selected pesticides in 75% of the water samples, while only 50% of these compounds were detected at a concentration above the quantification limit. Metalaxyl, diuron, S-metolachlor, and fenpyroximate were the most ubiquitous pesticides. Italy was the country with the most positive findings while Norway with the fewest. In sediments, the frequency of detection was quite low and at concentrations below the quantification limit.

With regard to the detection of the pharmaceutical compounds in waters, 36% of them were detected at least once. The most frequently detected compounds both in water and sediment were carbamazepine and venlafaxine. Moreover, those exhibited the highest concentration in water, while in sediments the highest concentration was observed for risperidone. Equally to pesticides, Italy was in the first place of positive findings.

Environmental risk assessment was performed implementing the risk quotient method for three trophic levels (algae, daphnids, and fish). In almost all cases for pesticides, RQ values were much <0.01, corresponding to "low risk". Tebupirimfos showed high toxicity in daphnids as well as diuron and S-metolachlor in algae. Similar findings were observed for pharmaceuticals, with the exception of amitriptyline for algae, which showed RQ= 43.02, entailing very high toxicity. The risk quotient method is useful, indicating the need for further investigation of the presence and exposure of organisms to emerging contaminants, in order to obtain a comprehensive picture of their environmental impact.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΘΕΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. C.I. Nannou, V.I. Boti, T.A. Albanis, D. Álvarez-Muñoz, S. Rodriguez-Mozaz, N. Cáceres, S. Díaz Cruz, A. Margareto, D. Barceló, “Pharmaceuticals in seawater, sediments, and mussels from European aquaculture” (prepared for publication)
2. C.I. Nannou, V.I. Boti, and T.A. Albanis, “A modified QuEChERS approach for the analysis of pharmaceuticals in sediments by LC–Orbitrap HRMS,” *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019 (*Article in press*)
3. C.I. Nannou, V I. Boti, and T.A. Albanis, “Trace analysis of pesticide residues in sediments using liquid chromatography–high-resolution Orbitrap mass spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 7, pp. 1977–1989, Mar. 2018.
4. C.I. Kosma, C.I. Nannou, V.I. Boti, and T.A. Albanis, “Psychiatric and selected metabolites in hospital and urban wastewaters: Occurrence, removal, mass loading, seasonal influence and risk assessment,” *Sci. Total Environ.*, (accepted for publication), 2019.

ΛΟΙΠΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

5. M.d.M Gomez-Ramos, C. Nannou, H. Hamke, A. Goday, L. Rajska, A.R Fernandez-Alba “Evaluation and presence of pesticide residues in organic crops”, prepared for publication
6. A.C. Rocha, C. Camacho, E. Eljarrat, A. Peris, Y. Aminot, J.W. Readman, V. Boti, C. Nannou, A. Marques, M.L. Nunes, C.M. Almeida, “Bioaccumulation of persistent and emerging pollutants in wild sea urchin *Paracentrotus lividus*”, *Environ. Res.* 161 (2018). doi:10.1016/j.envres.2017.11.029.
7. C.I. Nannou, C.I. Kosma, T.A. Albanis, “Occurrence of pharmaceuticals in surface waters: analytical method development and environmental risk assessment”, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 95 (2015) 1242–1262. doi:10.1080/03067319.2015.1085520.
8. B. Huerta, S. Rodriguez-Mozaz, C. Nannou, L. Nakis, A. Ruhí, V. Acuna, S. Sabater, D. Barceló, “Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a waste water treatment plant-impacted river”, *Sci. Total Environ.* 540 (2015) 241–249. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.049

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΘΕΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΠΛΗΡΗ ΠΡΑΚΤΙΚΑ

1. **Christina Nannou***, Vasiliki Boti, Triantafyllos Albanis, “Multi-residue analysis of pharmaceuticals and pesticides in sediments using QuEChERS and LC-Orbitrap HRMS”, *10th European Conference on Pesticides and Related Organic Micro-pollutants in the Environment*”, September 12-14 2018, Bologna, Italy
2. **Christina Nannou***, Vasiliki Boti, Triantafyllos Albanis, “Occurrence of pesticides in marine environment: Seawater and sediment analysis by means of UHPLC/LTQ-Orbitrap MS”, *Final open technical meeting & Workshop, Sea-on-a-chip- project*, May 16-17 2017, Olhão, Portugal
3. **Ch. Nannou**, V. Boti, T. Albanis, “Accurate mass screening of pesticide residues in fresh water and sediments using LC-hybrid LTQ/Orbitrap-MS”, *SETAC Europe 27th Annual Meeting*, May 7-11 2017, Brussels, Belgium
4. **Ch. Nannou**, V. Boti, T. Albanis, “Fast and comprehensive analysis of pesticides in surface waters by uhplc-high-resolution & high mass accuracy hybrid linear ion- trap-Orbitrap mass spectrometry”, *2nd EWaS International Conference: “Efficient & Sustainable Water Systems Management toward Worth Living Development”*”, June 1-4 2016, Chania, Crete, Greece
5. **C. Nannou**, V. Boti, C. Tsoutsis, I. Konstantinou, G. Patakioutas, T. Albanis, G. Karras, “Application of hybrid linear ion trap – Orbitrap mass spectrometry for the qualitative and quantitative assessment of pesticides in NW Greece”, *14th International Conference on Environmental Science and Technology*, September 3-5 2015, Rhodes, Greece
6. **C. Nannou***, V. Boti, G. Patakioutas, G. Karras, T. Albanis, “LC-high-resolution-Orbitrap mass spectrometry for the investigation of conventional and new pesticides in Amvrakikos Gulf (N.W. Greece)”, *1st Progress Workshop, Sea-on-a-chip- project*, April 27-29 2015, Sivota, Greece
7. **Ch. Nannou**, V. Boti, C. Tsoutsis, S. Manos, I. Konstantinou, I. Ptakioutas, G. Karras, T. Albanis, “Quantitative determination of pesticide residues in surface waters using the innovative hybrid linear ion trap – Orbitrap mass spectrometry”, *8th European conference on pesticides and related organic micro-pollutants in the environment*”, September 17-21 2014, Ioannina, Greece

*προφορική παρουσίαση της ιδίας

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΘΕΜΑΤΩΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ

8. **Ch. Nannou**, V. Boti, T. Albanis, "Detection of pesticide residues in sediment using the hybrid UHPLC/LTQ-Orbitrap MS analyzer", *5th Conference of the Dept. of Chemistry, University of Ioannina, September 29-30 2017, Ioannina, Greece*
9. **Ch. Nannou***, Ch. Kosma, V. Boti, T. Albanis, "Highly sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals in surface water using UHPLC–LTQ Orbitrap HRMS", *Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications", September 17-21 2017, Heraklion, Crete, Greece*
10. **Ch. Nannou**, V. Boti, T. Albanis, "Analytical method development for the determination of emerging contaminants in sediments", *22nd Panhellenic Conference in Chemistry, December 2-4 2016, Thessaloniki, Greece*
11. A. Stergiou, **Ch. Nannou**, V. Boti, T. Albanis, "Analysis of pharmaceuticals in sediments using QuEChERS-based extraction followed by UHPLC–Orbitrap-MS", *9th European Conference on Pesticides and Related Organic Micro-pollutants in the Environment", October 4-7 2016, Santiago de Compostela, Galicia, Spain*
12. **Ch. Nannou***, V. Boti, T. Albanis, "High-resolution–Orbitrap mass spectrometry for pesticide residues analysis in natural waters and sediments: optimization and application", *9th European Conference on Pesticides and Related Organic Micro-pollutants in the Environment", October 4-7 2016, Santiago de Compostela, Galicia, Spain*
13. **Ch. Nannou**, V. Boti, T. Albanis, "Accurate mass screening of psychiatric drugs in water and sediment by UHPLC-Orbitrap mass spectrometry", *9th European Conference on Pesticides and Related Organic Micro-pollutants in the Environment", October 4-7 2016, Santiago de Compostela, Galicia, Spain*
14. **Ch. Nannou**, V. Boti, M. Tsomi, G. Patakioutas, T. Albanis, G. Karras, "Determination of various pesticides in fresh waters by means of high-resolution & high mass accuracy hybrid linear ion-trap-Orbitrap mass spectrometry", *9th International Conference on "Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications, September 21-24 2015, Kalamata, Greece*
15. V. Boti, **Ch. Nannou**, Ch. Tsoutsis, I. Konstantinou, S. Manos, G. Patakioutas, T. Albanis, G. Karras, "Emerging pesticides occurrence in fresh waters and sediments in a catchment area dominated by agriculture", *Land Use and Water Quality, September 21-24 2015, Vienna, Austria*
16. **C. Nannou**, V. Boti, C. Tsoutsis, N. Mantzos, I. Konstantinou, G. Patakioutas, G. Karras, T. Albanis, "Fast and comprehensive analysis of pesticides in surface waters by UHPLC-high-resolution & high mass accuracy hybrid linear ion- trap- Orbitrap mass spectrometry", *SETAC Europe 25th Annual Meeting, May 3 - 5 2015, Barcelona, Spain*
17. **C. Nannou**, V. Boti, C. Tsoutsis, N. Mantzos, I. Konstantinou, G. Patakioutas, G. Karras, T. Albanis, "Rapid screening of pesticides in surface waters by UHPLC coupled with high-resolution & high mass accuracy hybrid linear ion-trap-Orbitrap mass

spectrometry", 9th Aegean Analytical Chemistry Days, September 20 - October 3 2014,
Chios, Greece

Το πειραματικό μέρος της Διδακτορικής Διατριβής χρηματοδοτήθηκε εν μέρει από το 7^ο πρόγραμμα-πλαίσιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την έρευνα, τεχνολογική ανάπτυξη και επίδειξη (FP7-OCEAN-2013) βάσει της συμφωνίας επιχορήγησης Ν° 614168 και από την Πράξη «ΑΡΧΙΜΗΔΗΣ ΙΙΙ: Ενίσχυση ερευνητικών ομάδων στο ΤΕΙ Ηπείρου» που υλοποιήθηκε μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση (Ε.Π.Εκ.Δι.Βι.Μ) 2007-2013», με συγχρηματοδότηση από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και Εθνικούς πόρους μέσω του Προγράμματος Δημοσίων Επενδύσεων.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

