



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση υγρής-υγρής μικροεκχύλισης και μεθοδολογίας αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας για τον προσδιορισμό πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων με τη χρήση χημειομετρικών μεθόδων σε υδατικά δείγματα. Εκτίμηση οικοτοξικολογικού κινδύνου για την λεκάνη απορροής του ποταμού Άραχθου

ΠΕΤΡΙΔΗΣ Π. ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Μηχανικός τεχνολόγος αντιρρύπανσης MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2016

«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. : 782^A / 19-3-10

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος

Μέλη:

Σταλίκας Κωνσταντίνος

Σακκάς Βασίλειος

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 912^A/24-6-15

1. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος: Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
2. Σταλίκας Κωνσταντίνος: Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
3. Σακκάς Βασίλειος: Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
4. Βλεσσίδης Αθανάσιος: Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
5. Λεονάρδος Ιωάννης: Καθηγητής, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
6. Κωνσταντίνου Ιωάννης: Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
7. Γκιώκας Δημοσθένης: Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Έγκριση διδακτορικής διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 27-01-2016

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Λέκκα Μαρία Ελένη

Η γραμματέας του τμήματος

Βαμβέτσου Ζωή-Βαλεντίνα

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης-ΕΤΠΑ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ- ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΑΣ-ΗΠΕΙΡΟΥ 2007-2013» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ 2007- 2013)



Στη μνήμη του πατέρα μου

Παναγιώτη...

(† 13-10-2012)

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το διάστημα στο οποίο πραγματοποιήθηκε ήταν από τον Μάρτιο του 2010 έως τον Δεκέμβριο του 2015 και ο σκοπός της ήταν η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και πιστοποίηση αναλυτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε επιφανειακά υδατικά δείγματα καθώς και την εφαρμογή της στην λεκάνη απορροής του ποταμού Άραχθου. Τέλος έγινε εκτίμηση της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας (environmental risk assessment) των ουσιών αυτών σε όλο το οικοσύστημα.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας αυτής Καθηγητή και Αναπληρωτή Πρύτανη κ. Αλμπάνη Τριαντάφυλλο για τη βοήθεια που μου προσέφερε, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις χρήσιμες συμβουλές του και τις εύστοχες παρατηρήσεις του, αλλά κυρίως για την ευκαιρία που μου προσέφερε να συνεχίσω τις σπουδές μου στο εργαστήριο του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, κ. Σταλικά Κωνσταντίνο και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας κ. Σακκά Βασίλειο, που δέχθηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή και προσέφεραν πάντα τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Στον Επίκουρο Καθηγητή κ Σακκά Βασίλειο οφείλω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ για το συνεχές του ενδιαφέρον και τις ουσιαστικές υποδείξεις και παρεμβάσεις του. Τον ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία που είχαμε και τις γνώσεις που μου προσέφερε. Η συνεισφορά του στην πραγματοποίηση και στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής ήταν καταλυτική.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής και συγκεκριμένα τον Καθηγητή του τμήματος Χημείας κ. Βλεσσίδα Αθανάσιο, τον Καθηγητή του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών κ . Λεονάρδο Ιωάννη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Χημείας κ. Κωνσταντίνου Ιωάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Χημείας κ. Γκιώκα Δημοσθένη, για την αποδοχή τους να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Τσούτση Χαρούλα, στην Δρ. Μπότη Βασιλική και στην Δρ. Κοσμά Χριστίνα, οι οποίες αποτέλεσαν πολύτιμοι αρωγοί στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας τον καθένα τους για διαφορετικούς

λόγους όπως επίσης για την άριστη συνεργασία και κατανόησή τους και το ιδιαίτερα ευχάριστο κλίμα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την σύντροφο μου Καψή Μαργαρίτα που σε όλο αυτό το διάστημα στάθηκε δίπλα μου, καθώς και για την ενθάρρυνση και την ηρεμία που μου προσέφερε απλόχερα στις καλές αλλά κυρίως στις κακές στιγμές. Η συμβολή της στην συγγραφή και κυρίως η στήριξή της ήταν καθοριστική για να μπορέσει να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή.

Τέλος τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου οφείλω στη μητέρα μου Μαρία και την αδερφή μου Βαλεντίνα, για την αδιάκοπη ηθική τους συμπαράσταση και τη δύναμη που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Μακάρι να προλάβαινε και ο πατέρας μου Παναγιώτης να δει την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Είμαι σίγουρος πως θα ένιωθε πολύ περήφανος...

Πετρίδης Π. Νικόλαος

Ιωάννινα, Ιανουάριος 2016

Περιεχόμενα

A. Θεωρητικό μέρος	1
Κεφάλαιο 1^ο	1
Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	
1.1 Γενικά	1
1.2 Τρόπος σχηματισμού των ΠΑΥ	1
1.3 Κατανομή ΠΑΥ στο περιβάλλον	2
1.3.1 ΠΑΥ στην ατμόσφαιρα	3
1.3.2 ΠΑΥ στο νερό	5
1.3.3 ΠΑΥ στο έδαφος	5
1.3.4 ΠΑΥ σε ιζήματα	6
1.3.5 ΠΑΥ σε λύματα	6
1.3.6 ΠΑΥ σε εσωτερικούς χώρους	7
1.4 Επικίνδυνοι ΠΑΥ	8
1.5 Επιπτώσεις των ΠΑΥ	9
1.6 Μέγιστα επιτρεπόμενα όρια των ΠΑΥ	10
Κεφάλαιο 2^ο	13
Αναλυτικές τεχνικές	
2.1 Γενικά	13
2.2 Αναλυτικές τεχνικές εκχύλισης	14
2.2.1 Υγρή- Υγρή Εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE)	14
2.2.2 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	15
2.2.3 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)	17
2.2.4 Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (Single drop microextraction, SDME)	19
2.2.5 Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας με αιώρηση στην υπερκείμενη φάση (Headspace Single drop microextraction, HS-SDME)	20
2.2.6 Μικροεκχύλιση μεμβράνης	21
2.2.7 Υγρή-υγρή μικροεκχύλιση διασποράς (Dispersive Liquid- Liquid Microextraction, DLLME)	23
2.2.8 Μικροεκχύλιση γαλακτωματοποίησης με την χρήση υπερήχων (ultrasound-assisted emulsification-microextraction, USAEME)	24
2.2.9 Υγρή-υγρή μικροεκχύλιση με χρήση vortex (Vortex-assisted Liquid-Liquid Microextraction, VALLME)	26
2.2.10 Μικροεκχύλιση απευθείας αιωρούμενου σταγονιδίου (Directly Suspended Droplet Microextraction, DSDME)	27
2.2.11 Υγρή-υγρή μικροεκχύλιση αιωρούμενης σταγόνας σε διασπορά (Dispersive suspended microextraction, DSME)	27
2.3 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης	29
2.3.1 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)	29

2.3.1.1	Αρχή λειτουργίας αέριας χρωματογραφίας συζευγμένου με ανιχνευτή μάζας	30
2.3.2	Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)	31
2.3.2.1	Αρχή λειτουργίας υγρής χρωματογραφίας	32
Κεφάλαιο 3°		35
Σφάλματα στις μετρήσεις		
3.1	Αναλυτικό σφάλμα	35
3.2	Τύποι αναλυτικών σφαλμάτων	35
3.3	Εισαγωγική θεώρηση συστηματικών σφαλμάτων	36
3.4	Τυχαία σφάλματα	39
3.5	Αξιολόγηση μετρήσεων	39
3.6	Σημαντικά ψηφία	41
3.7	Βασικοί ορισμοί κατά ISO 5725	43
Κεφάλαιο 4°		47
Εισαγωγή στη στατιστική		
4.1	Εισαγωγή - Στατιστικές δοκιμασίες σημαντικότητας	47
4.1.1	Δοκιμασίες Student ή δοκιμασίες t-test	47
4.1.5	Σύγκριση διακυμάνσεων (δοκιμασία F)	51
4.2	Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) - Εισαγωγή	53
4.2.1	Μονόδρομη ANOVA	56
Κεφάλαιο 5°		61
Πειραματικός σχεδιασμός		
5.1	Βελτιστοποίηση μεθόδων	61
5.2	Πειραματικός σχεδιασμός (Experimental Design ή Design of Experiments - DOE)	62
5.2.1	Γενικά	62
5.2.2	Γραφική μέθοδος - Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM)	63
5.2.2.1	Επιλογή των παραμέτρων	65
5.2.2.2	Επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού	65
5.2.2.3	Κωδικοποίηση των επιπέδων των μεταβλητών	66
5.2.2.4	Μαθηματική - στατιστική επεξεργασία δεδομένων	66
5.2.2.5	Εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου	67
5.2.2.6	Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών	68
5.3	Είδη πειραματικού σχεδιασμού	69
5.3.1	Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (Full Factorial Design)	69
5.3.2	Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός (Fractional Factorial Design, FFD)	71
5.3.3	Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD)	72

B. Σκοπός και αντικείμενο της Διδακτορικής Διατριβής	77
Γ. Πειραματικό μέρος	79
Κεφάλαιο 6^ο	79
Υλικά και μέθοδοι	
6.1 Πρότυπα	79
6.2 Όργανα – Συσκευές	79
6.3 Διαλύτες	80
6.4 Υδατικά δείγματα	80
6.5 Λοιπά αντιδραστήρια	80
6.6 Συστήματα χρωματογραφίας	81
6.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός – Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	83
Κεφάλαιο 7^ο	
Ανάπτυξη και αξιολόγηση υγρής-υγρής μικροεκχύλισης αιωρούμενου διασπαρμένου σταγονιδίου	85
7.1 Διαδικασία υγρής-υγρής μικροεκχύλισης αιωρούμενου διασπαρμένου σωματιδίου	85
7.2 Προκαταρκτικά πειράματα	86
7.2.1 Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης	86
7.2.2 Επίδραση ιοντικής ισχύος	87
7.3 Πειραματικός σχεδιασμός	88
7.3.1 Στάδιο διαλογής-αξιολόγησης (Plackett–Burman design)	88
7.3.2 Στάδιο βελτιστοποίησης. Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central composite design, CCD)	91
7.4 Αξιολόγηση και επικύρωση της μεθόδου	96
7.4.1 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	97
7.4.2 Ακρίβεια	97
7.4.3 Γραμμική περιοχή	97
7.4.4 Ορθότητα	97
7.5 Η επίδραση της χουμικής ύλης στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης	100
7.6 Σύγκριση μεταξύ μεθόδων	101
Κεφάλαιο 8^ο	
Εφαρμογή στην λεκάνη απορροής του ποταμού Άραχθου	103
8.1 Περιγραφή της περιοχής δειγματοληψίας	103
8.2 Επιλογή Αράχθου ως περιοχής δειγματοληψίας	105
8.3 Φυσικοχημικές παράμετροι	108
8.4 Αποτελέσματα αναλύσεων υπολειμμάτων ΠΑΥ	110
8.5 Συμπεράσματα	118

Κεφάλαιο 9°	119
Εκτίμηση περιβαλλοντικού κινδύνου από την υπολειμματικότητα ΠΑΥ	119
9.1 Γενικά	119
9.2 Μέθοδο του πηλίκου (Risk quotient method)	120
9.3 Εκτίμηση επικινδυνότητας με βάση την υπολειμματικότητα ΠΑΥ στον Άραχθο ποταμό	122
9.4 Συμπεράσματα	126
Δ. Συμπεράσματα	129
Διεθνής βιβλιογραφία	131
Ελληνική βιβλιογραφία	145
Διαδίκτυο	149
Summary	151
Παράρτημα Ι	155
Παράρτημα ΙΙ	167

Α. Θεωρητικό μέρος

Κεφάλαιο 1°

Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

1.1 Γενικά

Οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις περιλαμβάνουν διάφορες ομάδες ενώσεων, οι οποίες έχουν δύο ή περισσότερες βενζολικές ομάδες στην δομή τους και πολλές άλλες ομάδες που μπορεί να περιέχουν διάφορα στοιχεία. Μια από τις σημαντικότερες ομάδες πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAHs). Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (στο εξής θα αναφέρονται ως ΠΑΥ για λόγους συντομίας) είναι χημικές ενώσεις που σχηματίζονται από συγχωνευμένους αρωματικούς δακτύλιους και δεν περιέχουν ετεροάτομα ή άλλους υποκατάστατες, εκτός από άτομα άνθρακα και υδρογόνου (Knutzen J. 1995).

Όταν ένα ζευγάρι ατόμων άνθρακα «μοιράζεται», τότε οι δακτύλιοι που συνεισφέρουν, θεωρούνται συγχωνευμένοι. Η τελική δομή είναι ένα μόριο, στο οποίο όλα τα άτομα άνθρακα και υδρογόνου βρίσκονται σε ένα επίπεδο. Έτσι προκύπτει μια ποικιλία ενώσεων μεταξύ του ναφθαλενίου ($C_{10}H_8$) και του κορονενίου ($C_{24}H_{12}$) (Manoli E. and Samara C. 1999). Παρόλα αυτά οι κυριότεροι ΠΑΥ είναι αυτοί που έχουν 2 έως 8 αρωματικούς δακτύλιους στο μόριο τους. Ο αριθμός και η θέση των δακτυλίων καθώς και ο αριθμός ή η θέση και η φύση των υποκατάστατων τους που υπάρχουν στο βασικό κυκλικό τους σύστημα, επηρεάζουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, την περιβαλλοντική τους συμπεριφορά καθώς επίσης τις αλληλεπιδράσεις τους με τα βιολογικά συστήματα (Αλμπάνης Τ. 2006).

Οι ΠΑΥ είναι κατά βάση λιπόφιλες ενώσεις και τα μεγαλύτερα μόρια είναι περισσότερο υδρόφοβα και λιγότερο πτητικά. Οι ΠΑΥ είναι ελαφρώς λιγότερο διαλυτοί στο νερό της θάλασσας από ότι στο γλυκό νερό.

1.2 Τρόπος σχηματισμού των ΠΑΥ

Ο σχηματισμός των ΠΑΥ στο περιβάλλον, λαμβάνει χώρα όταν ουσίες με άνθρακα και υδρογόνο θερμαίνονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των $700^{\circ}C$, όπως στις διεργασίες πυρόλυσης ή ατελούς καύσης (Manahan S.E. 1993, Σίκαλος Θ. 1999). Η ακριβής θερμοκρασία που αναπτύσσεται, επηρεάζει την σύσταση του μίγματος των ΠΑΥ που

σχηματίζεται (Wilson S.C. and Jones K.C. 1993). Ο μηχανισμός του σχηματισμού τους δεν έχει ερμηνευθεί πλήρως. Γενικά αναφέρεται ότι πρόκειται για συνδυασμό δυο ειδών αντιδράσεων, πυρόλυσης και πυροσύνθεσης. Σε υψηλές θερμοκρασίες συμβαίνει μερική διάσπαση των οργανικών ενώσεων προς μικρότερα και ασταθή προϊόντα (πυρόλυση). Αυτά τα προϊόντα, μέρος των οποίων είναι ρίζες, επανασυνδέονται για να σχηματίσουν μεγαλύτερες και σχετικά σταθερότερες ενώσεις όπως είναι οι ΠΑΥ (πυροσύνθεση) (Mastral A.M. and Callén M.S. 2000, Μανώλη Ε.Α. 1998)

1.3 Κατανομή ΠΑΥ στο περιβάλλον

Οι ΠΑΥ στο περιβάλλον προέρχονται από ανθρωπογενείς και φυσικές πηγές (Manoli E. *et al.* 2000). Διέρχονται αρχικά στην ατμόσφαιρα και από εκεί με διάφορους μηχανισμούς μεταφέρονται στα υπόλοιπα περιβαλλοντικά δείγματα (Evans W.H. *et al.* 1993, Kochany J. and Maguire R.J. 1994).

Οι συγκεντρώσεις των ΠΑΥ όπως και γενικότερα των οργανικών ενώσεων, στο περιβάλλον, εξαρτώνται από τις ποσότητες των ενώσεων που εισέρχονται σε αυτό καθώς και από την συμπεριφορά τους. Διεργασίες “μεταφοράς” όπως είναι η ρόφηση και η εξάτμιση, καθορίζουν την κατανομή των οργανικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα, στο υδάτινο περιβάλλον και στο έδαφος. Διεργασίες “μετατροπής” όπως είναι η βιοαποικοδόμηση και η φωτόλυση μέσα σε κάθε σύστημα, μεταβάλλουν χημικά τους ΠΑΥ δίνοντας μικρότερης, ισοδύναμης ή και μεγαλύτερης τοξικότητας προϊόντα. Αυτές οι διεργασίες συμβαίνουν με ταχύτητες διαφορετικές για κάθε ΠΑΥ και για κάθε οικοσύστημα. Το σύνολο αυτών των διεργασιών και οι αλληλεπιδράσεις, καθορίζουν την περιβαλλοντική συμπεριφορά των ΠΑΥ και την έκθεση των ζώντων οργανισμών σε αυτές (Βύρας Λ.Γ. 1989).

Μέχρι την αρχή του εικοστού αιώνα, υπήρχε ισορροπία μεταξύ των παραγόμενων ΠΑΥ και των ΠΑΥ που καταστρέφονταν λόγω φυσικών αιτιών, με αποτέλεσμα η ρύπανση υποβάθρου (back-ground pollution) να παραμένει μικρή και σταθερή. Η αύξηση όμως της βιομηχανικής δραστηριότητας διατάραξε αυτήν την ισορροπία με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται φαινόμενα συσσώρευσης των ΠΑΥ στο περιβάλλον (Bloemen H.J. and Burn J. 1995). Έτσι μεγάλες συγκεντρώσεις ΠΑΥ προσδιορίζονται σε δείγματα αέρα, εδάφους, νερού, ιζημάτων, ζώντων οργανισμών και σε εσωτερικούς χώρους (Wild S.R. and Jones K.C. 1995).

1.3.1 ΠΑΥ στην ατμόσφαιρα

Οι πηγές των ΠΑΥ στην ατμόσφαιρα χωρίζονται σε φυσικές και ανθρωπογενείς. Φυσικές πηγές εκπομπής ΠΑΥ αποτελούν οι πυρκαγιές, η ηφαιστειακή δραστηριότητα, η διαγένεση των ιζημάτων, η βιοαποσύνθεση διαφόρων ουσιών και η βιοσύνθεση τους από βακτήρια (Martinez E. *et al.* 2004, Nikolaou K. *et al.* 1984, Pérez S. *et al.* 2001). Στις αρχές του αιώνα η κυριότερη από αυτές τις πηγές ήταν η ηφαιστειακή δραστηριότητα, αλλά με την πάροδο των ετών η επιβάρυνση από τις πυρκαγιές των δασών, που στις περισσότερες περιπτώσεις ίσως πρέπει να αναφέρεται στις ανθρωπογενείς πηγές προέλευσης των ΠΑΥ, είναι μεγαλύτερη (Choi S.-D. 2014, Olivella M.A. *et al.* 2006).

Γενικά οι ποσότητες των ΠΑΥ που εκπέμπονται από τις φυσικές πηγές είναι πολύ μικρότερες από αυτές που εκπέμπονται από τις ανθρωπογενείς πηγές (Σίκαλος Θ. 1999). Οι ανθρωπογενείς πηγές μπορούν να χωρισθούν σε δύο κατηγορίες, τις κινητές και τις σταθερές πηγές. Στις κινητές πηγές συγκαταλέγονται τα βενζινοκίνητα και πετρελαιοκίνητα μέσα μεταφοράς (αυτοκίνητα, τρένα, πλοία, αεροπλάνα) (Borrás E. *et al.* 2009, Masiol M. and Harrison R.M. 2014, Vojtisek-Lom M. *et al.* 2012), ενώ στις σταθερές πηγές, οι βιομηχανικές δραστηριότητες, η καύση απορριμμάτων, η οικιακή θέρμανση και γενικά όλες οι διαδικασίες καύσης που σκοπό έχουν την παραγωγή ενέργειας από πρώτες ύλες (π.χ. ξύλο, κάρβουνο, πετρέλαιο, φυσικό αέριο) (Nikolaou K. *et al.* 1984, Rachwał M. *et al.* , Ribeiro J. *et al.* 2012, Μανώλη E.A. 1998).

Η παρουσία των ΠΑΥ στα εκπεμπόμενα από τις κινητές πηγές σωματίδια, οφείλεται στην σύνθεση τους από απλούστερα μόρια του καυσίμου, στο ότι προϋπάρχουν αυτούσιοι στα καύσιμα και στην διαδικασία πυρόλυσης των λιπαντικών (Baek S.O. *et al.* 1991, Vojtisek-Lom M. *et al.* 2012). Ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν το είδος και την ποσότητα των εκπεμπόμενων ΠΑΥ από τις κινητές πηγές είναι:

α) Η περιεκτικότητα των καυσίμων σε αρωματικές ενώσεις

Η αύξηση της περιεκτικότητας των καυσίμων σε ΠΑΥ, διευκολύνει την πυροσύνθεση των ΠΑΥ και οδηγεί σε αυξημένες εκπομπές. Σε μελέτες που έχουν γίνει έχει παρατηρηθεί ότι η μείωση της περιεκτικότητας της βενζίνης σε μόλυβδο συνδυάστηκε με αύξηση της περιεκτικότητας της σε αρωματικούς υδρογονάνθρακες για να διατηρηθεί ο απαιτούμενος αριθμός οκτανίων. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των εκπομπών ορισμένων ΠΑΥ,

κυρίως μικρού μοριακού βάρους, στην ατμόσφαιρα (Mi H.H. *et al.* 2000, Pedersen P.S. *et al.* 1980).

Β) Η περιεκτικότητα των καυσίμων σε θείο

Έχει βρεθεί ότι καύσιμα με μικρή περιεκτικότητα σε θείο, εκπέμπουν μεγαλύτερες ποσότητες ΠΑΥ (Guariero A.L.N. *et al.* 2014, Nikolaou K. *et al.* 1984, Μανώλη Ε.Α. 1998, Σίκαλος Θ. 1999).

Γ) Ο λόγος αέρα-καυσίμου

Έχει βρεθεί ότι όταν χρησιμοποιούνται πολύ φτωχά ή πολύ πλούσια μίγματα αέρα – καυσίμου, αυξάνονται οι εκπομπές σωματιδίων και σωματιδιακών ΠΑΥ. Ο λόγος ποσοστού αέρα προς καύσιμο επηρεάζει ακόμη και το είδος των ΠΑΥ στα σωματίδια των καυσαερίων (Pedersen P.S. *et al.* 1980, Σίκαλος Θ. 1999).

Δ) Οι συνθήκες οδήγησης του αυτοκινήτου

Από μελέτες που έχουν γίνει έχει προκύπτει ότι μεγαλύτερες ποσότητες ΠΑΥ εκπέμπονται κατά την επιτάχυνση, την επιβράδυνση ή την πορεία του αυτοκινήτου με υψηλή ταχύτητα. Οι χαμηλότερες ποσότητες εκπέμπονται κατά την πορεία με σταθερή μέση ταχύτητα (Pedersen P.S. *et al.* 1980, Σίκαλος Θ. 1999). Σημαντικό ρόλο παίζει και το φορτίο του οχήματος μια και κατά την αύξηση του αυξάνονται και οι εκπομπές των ΠΑΥ. Τέλος οι εκπομπές των ΠΑΥ αυξάνονται όταν το όχημα κινείται με κρύα μηχανή, σε συνθήκες πλούσιου μίγματος αέρα – καυσίμου και ελαχιστοποιούνται όταν η μηχανή είναι ζεστή (Βύρας Λ.Γ. 1989, Σίκαλος Θ. 1999).

Ε) Η ηλικία του οχήματος

Οι εκπομπές των ΠΑΥ αυξάνονται με την παλαιότητα του οχήματος. Η αύξηση αυτή προφανώς οφείλεται στην μεγαλύτερη κατανάλωση λαδιών καθώς και στην αύξηση των επικαθήσεων στους κυλίνδρους της μηχανής (Μανώλη Ε.Α. 1998, Σίκαλος Θ. 1999).

Στ) Ο τύπος του οχήματος

Τα βενζινοκίνητα αυτοκίνητα εκπέμπουν διαφορετικές ποσότητες ΠΑΥ από τα πετρελαιοκίνητα των οποίων τα καυσαέρια θεωρούνται περισσότερο επικίνδυνα γιατί εκπέμπουν μεγαλύτερες ποσότητες νίτρο-αρωματικών ενώσεων οι οποίες είναι πιο τοξικές από τους ΠΑΥ (Handa T. *et al.* 1984).

Z) Το χρησιμοποιούμενο λιπαντικό

Έχει βρεθεί ότι δείγματα καινούργιων λιπαντικών περιέχουν ελάχιστες ποσότητες ΠΑΥ, οι οποίες όμως αυξάνονται γραμμικά με τον χρόνο χρήσης τους (Handa T. *et al.* 1984).

1.3.2 ΠΑΥ στο νερό

Η παρουσία των ΠΑΥ στα επιφανειακά νερά και στην θάλασσα οφείλεται σε ανθρωπογενείς και φυσικές δραστηριότητες. Ανθρωπογενείς δραστηριότητες αποτελούν κυρίως οι διαρροές αργού πετρελαίου ή άλλων προϊόντων διύλισης από πετρελαιοπηγές, διυλιστήρια και δεξαμενόπλοια (Botello A.V. *et al.*), οι ατμοσφαιρικές αποθέσεις και κατακρημνίσεις (Castro-Jiménez J. *et al.* 2012), οι εκπλύσεις του εδάφους από τα νερά της βροχής (Zheng Y. *et al.* 2012), τα υγρά απόβλητα από διάφορες βιομηχανικές δραστηριότητες και τα αστικά λύματα. Φυσική πηγή ΠΑΥ αποτελεί η βιολογική αποσύνθεση μικροοργανισμών και φυτών (Μανώλη Ε.Α. 1998, Σίκαλος Θ. 1999).

1.3.3 ΠΑΥ στο έδαφος

Η ατμοσφαιρική απόθεση και η έκπλυση των εδαφών από τα νερά της βροχής, θεωρούνται ως οι πιο σημαντικές πηγές επιβάρυνσης του εδάφους με ΠΑΥ (Liu F. *et al.* 2013, Nam J.J. *et al.* 2008). Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των ΠΑΥ έχουν βρεθεί σε εδάφη που είναι κοντά σε σημειακές πηγές εκπομπής στην ατμόσφαιρα και κυρίως σε εδάφη που βρίσκονται κοντά σε αυτοκινητόδρομους μεγάλης κυκλοφορίας (Smith J.R. *et al.* 1993, Yang S.Y.N. *et al.* 1991).

Η διαρροή πετρελαιοειδών και η διάθεση των αποβλήτων στο έδαφος είναι δυο ακόμη σημαντικές πηγές ρύπανσης από ΠΑΥ. Ακόμη και ένα μεγάλο ποσοστό της λάσπης βιολογικών καθαρισμών, που πιθανόν να περιέχει ΠΑΥ, διατίθεται στο έδαφος και μερικές φορές χρησιμοποιείται και ως βελτιωτικό εδάφους (Baek S.O. *et al.* 1991). Πηγή ρύπανσης του εδάφους από ΠΑΥ αποτελεί και η διάθεση αστικών απορριμμάτων σε αυτό καθώς και η τέφρα που παράγεται κατά την αποτέφρωσή τους (Wang Y. *et al.* 2012).

Η παραγωγή αλλά και η χρήση κρεοζότου ως μέσο προστασίας και συντήρησης του ξύλου, επιβαρύνει σημαντικά το έδαφος με ΠΑΥ (Hyötyläinen T. and Oikari A. 2004). Το κρεοζότο είναι προϊόν απόσταξης της λιθανθρακόπισσας και αποτελείται από 85% ΠΑΥ, 10% φαινολικές ενώσεις και 5% ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου, θείου και οξυγόνου (Mueller J.G.

et al. 1989). Έχει υπολογιστεί ότι η χρήση κρεοζότου στην Μεγάλη Βρετανία, επιβαρύνει το έδαφος με είκοσι φορές μεγαλύτερη ποσότητα ΠΑΥ από ότι το σύνολο της ρύπανσης από ατμοσφαιρικές αποθέσεις και διάθεσης των αποβλήτων (Wild S.R. and Jones K.C. 1995).

Φυσικές πηγές προέλευσης των ΠΑΥ στο έδαφος αποτελεί η σύνθεση τους κατά τις μεταβολικές διεργασίες των φυτών και των μικροοργανισμών καθώς και ο σχηματισμός τους κατά την διαδικασία μετατροπής της βιομάζας σε πετρέλαιο (Smith D.J.T. *et al.* 1995).

1.3.4 ΠΑΥ σε ιζήματα

Μεγάλες ποσότητες ΠΑΥ έχουν ταυτοποιηθεί σε διαφόρους τύπους ιζημάτων (Yuan H. *et al.* 2014). Εκτός από τους ΠΑΥ έχει προσδιοριστεί και μεγάλος αριθμός αλκυλιωμένων παραγώγων τους. Η κατανομή μεταξύ των μητρικών ΠΑΥ και των αλκυλιωμένων παραγώγων τους έχει υποστηριχτεί ότι μπορεί να δώσει πληροφορίες για τους πιθανές πηγές προέλευσης τους (Σίκαλος Θ. 1999).

Οι ΠΑΥ είναι υδρόφοβες ενώσεις με αποτέλεσμα να ευνοείται η προσρόφησή τους στα αιωρούμενα σωματίδια και έτσι οι συγκεντρώσεις τους στα ιζήματα να εμφανίζονται αρκετά μεγαλύτερες από ότι στον περιβάλλοντα υδάτινο χώρο (Bedding N.D. *et al.* 1983, Navarro-Ortega A. *et al.* 2010). Η κυριότερη πηγή ΠΑΥ στα ιζήματα είναι η μεταφορά τους στα υδάτινα οικοσυστήματα, από εκπλύματα εδαφών που περιέχουν προσροφημένους ΠΑΥ. Αλκυλιωμένα παράγωγα των ΠΑΥ έχουν προσδιοριστεί σε ιζήματα των οποίων ο περιβάλλοντας υδάτινος χώρος έχει ρυπανθεί από παράγωγα πετρελαίου (Tolosa I. *et al.* 1996).

Η σταθερότητα των ΠΑΥ στα ιζήματα είναι μεγαλύτερη από ότι στον αέρα και στο νερό επειδή στα ιζήματα, επιβραδύνεται η φωτοξείδωση τους λόγω έλλειψης φωτός ενώ η απομάκρυνση τους από αυτά γίνεται κυρίως με βιοαποικοδόμηση, από υπάρχοντες εκεί μικροοργανισμούς (Σίκαλος Θ. 1999).

1.3.5 ΠΑΥ σε λύματα

Οι πηγές προέλευσης των ΠΑΥ στα αστικά λύματα που καταλήγουν για επεξεργασία στις διάφορες μονάδες βιολογικού καθαρισμού, είναι κυρίως οι εκπλύσεις των δρόμων, οι ατμοσφαιρικές αποθέσεις και τα υγρά βιομηχανικά απόβλητα που πολλές φορές καταλήγουν

μαζί με τα αστικά λύματα στις ίδιες μονάδες επεξεργασίας. Το ότι τα εκπλύματα των δρόμων συνεισφέρουν αρκετά στην παρουσία των ΠΑΥ στα λύματα έχει επιβεβαιωθεί από διάφορες μελέτες οι οποίες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση τους εμφανίζεται αυξημένη κατά τις ημέρες που σημειώνονται βροχοπτώσεις (Mahler B.J. *et al.* 2014).

Πηγή προέλευσης των ΠΑΥ στα αστικά λύματα, που συνήθως δεν αναφέρεται ή δεν χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, είναι τα υπολείμματα των τροφίμων και τα απόβλητα που παράγονται από τις οικιακές εργασίες (Σίκαλος Θ. 1999).

1.3.6 ΠΑΥ σε εσωτερικούς χώρους

Οι ΠΑΥ αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ρύπων της εσωτερικής ατμόσφαιρας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι ΠΑΥ γενικά σχηματίζονται από ατελείς καύσεις ή πυρολυτικές διεργασίες σε υψηλές θερμοκρασίες. Τέτοιες διεργασίες στο περιβάλλον των εσωτερικών χώρων αποτελούν κυρίως το κάπνισμα, η καύση ξύλου, κάρβουνου, ή άλλων καυσίμων για θέρμανση ή μαγείρεμα καθώς και το ψήσιμο, τηγάνισμα ή κάπνισμα των τροφών (Romagnoli P. *Et al.* 2014).

Ο αριθμός των ΠΑΥ και των αλκυλιωμένων παραγώγων τους που έχουν ταυτοποιηθεί στον καπνό του τσιγάρου υπερβαίνει τους 150 και η εκπομπή τους εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος του καπνού, του τσιγαρόχαρτου και του φίλτρου. Επίσης επηρεάζεται από το ποσοστό υγρασίας στους εσωτερικούς χώρους καθώς και την συχνότητα των εισπνοών (Evans W.H. *et al.* 1993).

Όσον αφορά την επίπτωση του μαγειρέματος στην ρύπανση των εσωτερικών χώρων από ΠΑΥ, έχει αποδειχτεί ότι το τηγάνισμα, το ψήσιμο και το κάπνισμα κρεάτων και ψαριών είναι διεργασίες που οδηγούν στο σχηματισμό ΠΑΥ σε πολύ μεγαλύτερη έκταση από άλλες μεθόδους μαγειρέματος (Motorykin O. *Et al.* 2015). Επίσης κατά το ψήσιμο των κρεάτων σε γυμνή φλόγα παράγονται μεγάλες ποσότητες ΠΑΥ λόγω πυρόλυσης του λίπους των κρεάτων.

Κατά την διεξαγωγή μελέτης για την ρύπανση των εσωτερικών χώρων στα ελληνικά σπίτια, αποδείχτηκε ότι η σημαντικότερη πηγή εκπομπής ΠΑΥ είναι το κάπνισμα. Ο καπνός του τσιγάρου κρίθηκε υπεύθυνος για το 85,9% των συνολικών συγκεντρώσεων ΠΑΥ και το μαγείρεμα για το 14,1%. Η συνεισφορά άλλων πηγών όπως η καύση πετρελαίου για θέρμανση, φάνηκε ότι έχει αμελητέα συνεισφορά (Σίκαλος Θ. 1999).

1.4 Επικίνδυνοι ΠΑΥ

Το 1964 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) εξέδωσε έναν κατάλογο με τις επιτρεπόμενες ανώτερες συγκεντρώσεις των πιο βασικών καρκινογόνων ενώσεων που περιέχονται στο πόσιμο νερό. Ανάμεσα τους υπήρχαν και ΠΑΥ, έξι από τους οποίους (Φλουορανθένιο, Βενζο[b]φλουορανθένιο, Βενζο[k]φλουορανθένιο, Βενζο[a]πυρένιο, Βενζο[g,h,i]περυλένιο καθώς και Ινδενο[1,2,3-cd]πυρένιο) χαρακτηρίστηκαν ως ιδιαίτερα επικίνδυνοι (Harrison R.M. *et al.* 1975).

Αργότερα η Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (U.S. EPA), με βάση τον κατάλογο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, χαρακτήρισε ως ρύπους άμεσης προτεραιότητας 129 ενώσεις, στηριζόμενη στην τοξικότητα τους, την συχνότητα εμφάνισης τους στο περιβάλλον και στην βιομηχανική τους παραγωγή. Μεταξύ αυτών των ενώσεων ως ρύποι άμεσης προτεραιότητας χαρακτηρίστηκαν και 16 ΠΑΥ, των οποίων η παρουσία στα περιβαλλοντικά δείγματα είναι ενδεικτική για ρύπανση από παράγωγα πετρελαίου (Πίνακας 1.1) (<http://www.epa.gov/>).

Το 2005, η επιτροπή της Ευρωπαϊκή Ένωσης (E.U. Commission) πρότεινε την συστηματική παρακολούθηση δεκαπέντε ΠΑΥ προτεραιότητα μαζί με ένα επιπρόσθετο ΠΑΥ ο οποίος προτάθηκε από την κοινή επιτροπή εμπειρογνομόνων FAO/WHO και οι οποίοι μπορεί να περιέχονται σε τρόφιμα (Πίνακας 1.1) (European U. 2005).

Πίνακας 1.1. ΠΑΥ προτεραιότητας σύμφωνα με την U.S. EPA και E.U.

16 ΠΑΥ προτεραιότητας της U.S. EPA	15+1 ΠΑΥ προτεραιότητας της E.U.
Naphthalene	Benz[a]anthracene
Acenaphthylene	Chrysene
Acenaphthene	Cyclopenta[cd]pyrene
Fluorene	Benzo[b]fluoranthene
Anthracene	Benzo[j]fluoranthene
Phenanthrene	Benzo[k]fluoranthene
Fluoranthene	Benzo[a]pyrene
Chrysene	Dibenz[a,h]anthracene
Benz[a]anthracene	Benzo[ghi]perylene
Pyrene	Indeno[1,2,3-cd]pyrene
Benzo[k]fluoranthene	Dibenzo[a,e]pyrene

Benzo[b]fluoranthene	Dibenzo[a,h]pyrene
Benzo[a]pyrene	Dibenzo[a,i]pyrene
Dibenzo[a,h]anthracene	Dibenzo[a,l]pyrene
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	5-Methylchrysene
Benzo[g,h,i]perylene	Benzo[c]fluorene

1.5 Επιπτώσεις των ΠΑΥ

Η τοξικότητα των ΠΑΥ εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από την δομή τους. Έτσι, μπορεί να μην εμφανίζουν τοξικότητα ή να είναι εξαιρετικά τοξικοί. Με βάση τις ιδιότητες και την μοριακή μάζα των ΠΑΥ, δύο βασικές κατηγορίες μπορούν να διαχωριστούν, αυτή των δύο και τριών δακτυλίων και αυτή των τεσσάρων ως και έξι δακτυλίων. Τα ΠΑΥ των δύο και τριών δακτυλίων με χαμηλή μοριακή μάζα εμφανίζουν ιδιαίτερα έντονη τοξική συμπεριφορά, ενώ κάποια από τα ΠΑΥ με υψηλή μοριακή μάζα παρουσιάζουν ανησυχητικές μεταλλακτικές και καρκινογόνους ιδιότητες (Doong R.-a. *et al.* 2000, Γούλα Γ. 2003).

Μετά από έρευνες σε πειραματόζωα έχει παρατηρηθεί πως μπορεί να προκαλέσουν διάφορες ασθένειες όπως απλαστική αναιμία, πανκυτταροπενία, μείωση των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος και παρενέργειες των κυττάρων του μυελού των οστών (Anselsietter V. and Heimpel H. 1986, Perera F.P. and Edwards S.C. 2011). Επίσης μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση στο DNA με ότι αυτό συνεπάγεται στην εμφάνιση διάφορων ασθενειών ή ανωμαλιών γενικά (Jarvis I.W.H. *et al.* 2013). Άλλες ασθένειες που σχετίζονται με τη μόλυνση από ΠΑΥ είναι διάφορες δερματολογικές και ηπατικές βλάβες, καθώς και η τύφλωση στα ψάρια (Carls M.G. *et al.* 2008). Επιδρούν επί του ανοσοποιητικού συστήματος, διαταράσσουν τα επίπεδα των ορμονών και παρεμβαίνουν στην δομή και στην λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών (Beníšek M. *et al.* 2011). Τέλος, όπως έχει προαναφερθεί, μεγάλο κίνδυνο αποτελεί και η ικανότητα των ΠΑΥ να προκαλέσουν μεταλλάξεις στα θηλαστικά και υδρόβια είδη (Knutzen J. 1995, Masiol M. *et al.* 2012, Rubio-Clemente A. *et al.* 2014).

Από παρατηρήσεις και μελέτες έχει προκύψει ότι η σημαντικότερη παθολογική συνέπεια των ΠΑΥ είναι ο καρκίνος (Degrendele C. *et al.* 2014, Okona-Mensah K.B. *et al.* 2005, Sarigiannis D.A. *et al.* 2015). Ο κύριος λόγος, δηλαδή, ανησυχίας για την ύπαρξη των ΠΑΥ στο περιβάλλον είναι το γεγονός ότι μερικά από αυτά μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων (Degrendele C. *et al.* 2014, Kamal A.

et al. 2014, Kellen E. *et al.* 2007, Liao C.-M. *et al.* 2011) . Η Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (U.S. EPA) έχει κατατάξει τους επτά πιο πιθανούς ΠΑΥ για καρκινογένεση που είναι οι: Chrysene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]anthracene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene και Indeno[1,2,3-cd]pyrene (<http://www.epa.gov/>).

Γενικά, η σχέση μεταξύ των ΠΑΥ και του καρκίνου είναι αρκετά περίπλοκη. Διάφοροι ΠΑΥ διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στην ανάπτυξη του καρκίνου, ωστόσο πάντα με την συμβολή και άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η διατροφή και η ηλικία των οργανισμών (Yang W. *et al.* 2014). Οι ίδιοι οι ΠΑΥ δεν είναι καρκινογόνοι, αλλά απαιτείται μεταβολική ενεργοποίηση σε ενεργούς ηλεκτροφιλικούς μεταβολίτες (Γούλα Γ. 2003). Ο μεταβολισμός των ΠΑΥ στον ανθρώπινο οργανισμό γίνεται με την βοήθεια ενός ενζύμου που εδρεύει στο συκώτι (Mixed Function Oxygenase –MFO). Οι μεταβολίτες που θεωρούνται υπεύθυνοι για τις αντιδράσεις με τα κυτταρικά μακρομόρια και τον σχηματισμό νεοπλασμάτων είναι τα διολ-εποξειδία του βενζολικού δακτυλίου. Τα εποξειδία αυτά ευνοούν τις χημικές αντιδράσεις με πυρηνόφιλες ομάδες των κυττάρων (RNA, DNA, πρωτεΐνες), με αποτέλεσμα να προκαλούνται μεταλλάξεις ή καρκίνοι (Manoli E. and Samara C. 1999). Πολλά υδρόβια ζώα έχουν τα ενζυμικά συστήματα για τη μεταβολική ενεργοποίηση των ΠΑΥ, ενώ τα διαφορετικά είδη οργανισμών ποικίλλουν πολύ στην ευαισθησία τους στην πρόκληση καρκινογένεσης από ΠΑΥ . Έχουν αναφερθεί αποτελέσματα δημιουργίας καρκίνου σε ψάρια με περιοδική έκθεση αυτών σε συγκεντρώσεις benzo[a]pyrene και dimethyl-benzo[a]anthracene που μπορεί να υπάρξουν σε νερά λιμνών ή ποταμών με ρυπασμένα ιζήματα ($<5\mu\text{g L}^{-1}$) (Knutzen J. 1995).

1.6 Μέγιστα επιτρεπόμενα όρια των ΠΑΥ

Εξαιτίας των υψηλών προδιαγραφών που απαιτούνται για την ανθρώπινη υγεία, έχουν καθοριστεί σ' ολόκληρο τον κόσμο χαμηλά επιτρεπτά επίπεδα συγκεντρώσεων για τους ΠΑΥ.

Στις Η.Π.Α. και στην πολιτεία του Μίσιγκαν συγκεκριμένα, στα σύνορα με τον Καναδά, αλλά και στο Νιου Τζέρσεϊ της Νέας Υόρκης, τα σχετικά επίπεδα που έχουν καθοριστεί για τα εδάφη για καθέναν από τους καρκινογόνους ΠΑΥ είναι $0,33 \text{ mg kg}^{-1}$. Ο Εθνικός Οργανισμός για την Υγιεινή και την Ασφάλεια της Εργασίας (NIOSH), έχει επίσης ορίσει

μέγιστο όριο τα 0,1 mg ΠΑΥ ανά m³ αέρα για 10 ώρες ημερήσια εργασία και 40 ώρες την εβδομάδα (<http://www.cdc.gov/niosh/>).

Όσον αφορά στην Ευρώπη, το Occupational Safety and Health Administration (OSHA) έχει καθορίσει το όριο 0,1 mg/m³ αέρα, για όλους τους ΠΑΥ (<http://www.osha.gov/>). Επίσης, σύμφωνα με τους κανόνες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (E.U. Health Regulations), το μέγιστο επιτρεπόμενο ποσοστό ΠΑΥ στο πόσιμο νερό είναι 0,2 μg/L (http://ec.europa.eu/health/index_en.htm).

Κεφάλαιο 2°

Αναλυτικές τεχνικές

2.1 Γενικά

Ο προσδιορισμός υπολειμμάτων οργανικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι απαραίτητος για την αντιμετώπιση περιβαλλοντικών και βιολογικών προβλημάτων. Οι συγκεντρώσεις των οργανικών ενώσεων στα υδατικά συστήματα είναι πολύ χαμηλές της τάξης ng L^{-1} (Albanis T.A. *et al.* 1995, Köck-Schulmeyer M. *et al.* 2012, Konstantinou I.K. *et al.* 2006) έως $\mu\text{g/L}$ (Wille K. *et al.* 2012). Γι' αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντική η ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης μεγάλης ταχύτητας, ακρίβειας, πιστότητας και ευαισθησίας (Πετρίδης Ν. 2010). Παρά τη μεγάλη τεχνολογική πρόοδο, τα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση, δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν την μήτρα των δειγμάτων απευθείας και έτσι ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της προετοιμασίας του δείγματος, είναι απαραίτητο. Το επιπλέον αυτό στάδιο, αφορά κυρίως τις εκχυλίσεις με σκοπό την απομόνωση των οργανικών ουσιών από τη μήτρα του δείγματος και την προσυγκέντρωσή τους πριν τον τελικό προσδιορισμό. Η σωστή προκατεργασία αποσκοπεί:

- Στον καθαρισμό, του προς ανάλυση δείγματος, από τυχόν παρεμποδίσεις.
- Στην απομόνωση και παραλαβή του συστατικού που μας ενδιαφέρει
- Στην προσυγκέντρωσή του.
- Στην τροποποίηση της φυτικής του κατάστασης.

Μία ιδανική τεχνική προκατεργασίας δείγματος θα πρέπει να:

- Χρησιμοποιεί όσο το δυνατόν μικρότερη ποσότητα διαλύτη.
- Είναι απλή και οικονομική.
- Είναι αποτελεσματική και εκλεκτική.
- Είναι συμβατή με μεγάλο αριθμό διαχωριστικών τεχνικών.
- Έχει μεγάλο αριθμό εφαρμογών.

- Μπορεί ταυτόχρονα να διαχωρίζει και να προσυγκεντρώνει τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.
- Μπορεί να εφαρμοστεί απ' ευθείας στο πεδίο δειγματοληψίας.
- Μπορεί να αυτοματοποιηθεί (Τσούτση Χ. 2008).

2.2 Αναλυτικές τεχνικές εκχύλισης

2.2.1 Υγρή- Υγρή Εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Η υγρή- υγρή εκχύλιση αποτελεί μία κλασσική μέθοδο προσδιορισμού οργανικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα καθώς αναφέρεται στο πρωτόκολλο των περισσότερων επίσημων αναλυτικών μεθόδων (Σχήμα 2.1). Η ευρεία χρησιμοποίησή της μεθόδου οφείλεται στο ότι είναι απλή, ευέλικτη και εφαρμόζεται σε δείγματα που περιέχουν τόσο ίχνη όσο και μεγάλες ποσότητες μίας ουσίας. Έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στο παρελθόν για την ανίχνευση ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα (Ormad P. *et al.* 1996). Η συνήθης περίπτωση διαχωρισμού με εκχύλιση, είναι η εκχύλιση ενός διαλύματος ουσιών με ένα υγρό. Η εκχύλιση με υγρούς διαλύτες βασίζεται στην κατανομή μιας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών, τα οποία πρακτικά δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους (Tankiewicz M. *et al.* 2010). Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των οργανικών ενώσεων είναι συνήθως το διχλωρομεθάνιο ή μίγματά του με ακετόνη, το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας και το ακετονιτρίλιο. Από τους διαλύτες αυτούς το διχλωρομεθάνιο χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα λόγω της υψηλής πτητικότητάς του και της δυνατότητάς του να εκχυλίζει ενώσεις με διαφορετικές πολικότητες (Λαμπροπούλου Δ. 2002). Γενικά υπάρχει τάση αντικατάστασης της κλασσικής εκχύλισης υγρού-υγρού, διότι η τεχνική παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα όπως:

- Δεν προσφέρεται για όλες τις ομάδες των ενώσεων.
- Απαιτεί κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών υψηλής καθαρότητας, που έχουν μεγάλο κόστος, είναι εύφλεκτα υλικά, έχουν μικρή εκλεκτικότητα και αποτελούν τοξικές ενώσεις για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (Silva E. *et al.* 2011).
- Υπάρχει πιθανότητα σχηματισμού γαλακτωμάτων.
- Περιλαμβάνει συνήθως πολλά στάδια κατά τα οποία είναι πιθανή η απώλεια μέρους των ενώσεων που εκχυλίζονται.

- Είναι απαραίτητη η επιμελής καθορισμός των συσκευών για την αποφυγή επιμολύνσεων.
- Είναι αρκετά χρονοβόρα μέθοδος (Tankiewicz M. *et al.* 2010).



Σχήμα 2.1 Συσκευή υγρής- υγρής εκχύλισης

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

Η τεχνική αυτή είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης (Wille K. *et al.* 2012). Αντικατέστησε την κλασσική εκχύλιση υγρού-υγρού και συνδυάζει τη δράση μίας στερεής και μίας υγρής φάσης (Καψή Μ. 2013). Υπάρχουν εκατοντάδες εργασίες στις οποίες η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για ανίχνευση ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα (Bernal J.L. *et al.* 1997, Brown J.N. and Peake B.M. 2003, Li N. and Lee H.K. 2001, Marcé R.M. and Borrull F. 2000, Oliferova L. *et al.* 2005, Sun F. *et al.* 1998). Βασίζεται στο γεγονός ότι τόσο οι

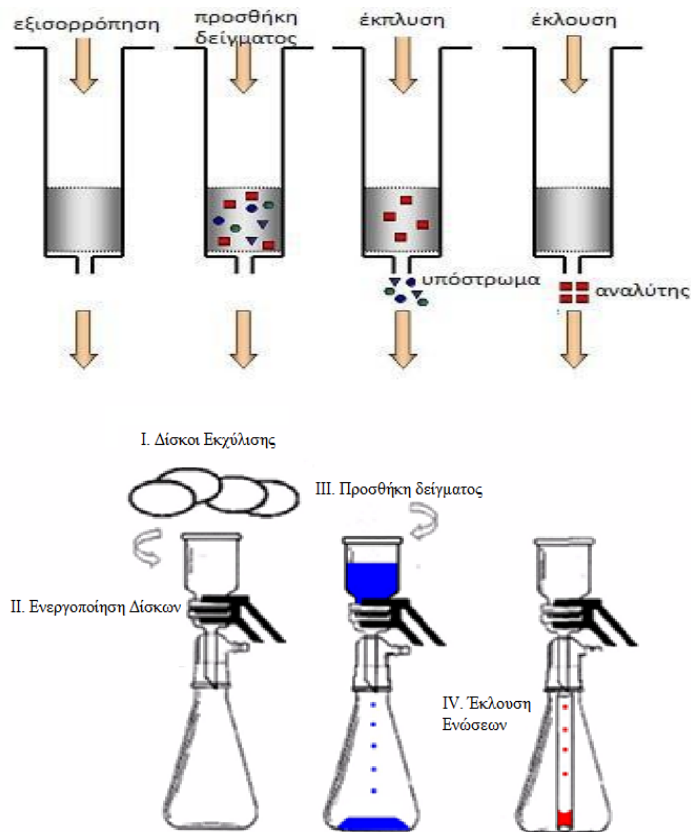
προσδιοριζόμενες ενώσεις όσο και οι παρεμποδίσεις που υπάρχουν σε ένα δείγμα, προσροφούνται σε ένα στερεό υπόστρωμα/ προσροφητικό (Σχήμα 2.2). Τα βασικά στάδια της τεχνικής είναι:

- Η ενεργοποίηση του προσροφητικού.
- Εισαγωγή του δείγματος.
- Έκπλυση του προσροφητικού υλικού με μία σειρά διαφορετικών διαλυτών για την απομάκρυνση των ενώσεων που παρεμποδίζουν.
- Παραλαβή των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν με κατάλληλο διαλύτη έκλυσης.

Ο μηχανισμός συγκράτησης των ενώσεων στο προσροφητικό υλικό, είναι ο ίδιος με εκείνο της υγρής χρωματογραφίας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων, στατικής φάσης και διαλυτών βασίζονται σε δυνάμεις Van de Waals (διπόλου-διπόλου, δεσμών υδρογόνου), ηλεκτροστατικής φύσεων και συνδυασμών μεταξύ τους (Dagnac T. *et al.* 2011). Τα προσροφητικά υλικά αποτελούνται κυρίως από σφαιρικά σωματίδια SiO_2 , Al_2O_3 ή συμπολυμερή στυρενίου-διβινυλοβενζολίου και έχουν μέγεθος από 30 έως 100 μm . Η επιφάνεια των σωματιδίων αυτών έχει τροποποιηθεί κατάλληλα με διάφορες ομάδες πολικού (νιτριλο-ομάδα, διόλη, κ.α), μη πολικού (C_8 , C_{18} , φαινυλομάδα, κ.α) ή ηλεκτροστατικού χαρακτήρα (τεταρτοταγής αμίνη, σουλφονυλο-ομάδα, κ.α) (Caquet T. *et al.* 2013).

Με την χρήση της SPE εξασφαλίζεται:

- Η απομάκρυνση των παρεμποδίζουσών ουσιών που αλλιώς θα επηρέαζαν την ανάλυση.
- Η προσυγκεντρώση τους αναλυτών σε υπολογίσιμες συγκεντρώσεις.
- Αλλαγή διαλύτη όταν χρειάζεται (Wille K. *et al.* 2012).

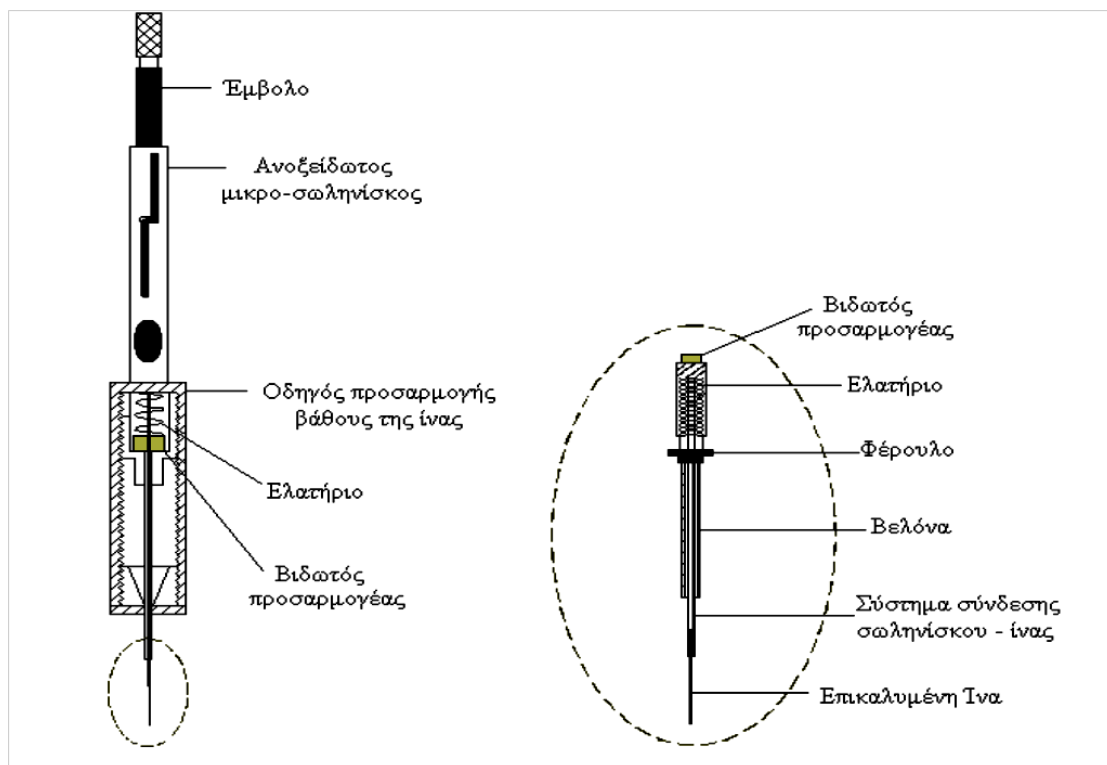


Σχήμα 2.2 Τεχνική εκχύλισης δια της στερεάς φάσης με στήλες και δίσκους αντίστοιχα.

2.2.3 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)

Η τεχνική αυτή μοιάζει με την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1990 από τον Pawliszyn. Στηρίζεται στην εφαρμογή ανοιχτών τριχοειδών στηλών ανάστροφης φάσης που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία και σημείωσαν σημαντική πρόοδο στα μέσα της δεκαετίας του 1980. Διαφέρει με την SPE στο ότι το προσροφητικό υλικό βρίσκεται στην επιφάνεια ίνας και όχι πακεταρισμένο σε στήλη ή τοποθετημένο πάνω σε επίπεδο δίσκο. Η διάταξη της ίνας αποτελείται από εξωτερικό προστατευτικό περίβλημα, βελόνα και μία εσωτερική βελόνα στην άκρη της οποίας τοποθετείται εποξική κόλλα (Σχήμα 2.3) (Σπυριδωνάκος Ν.Ε. 2011). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αέρια και στερεά δείγματα (Kaifer A.E. 1992). Έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά στην ανίχνευση ΠΑΥ από υδατικά δείγματα (Djozan D. and Assadi Y. 1999, Doong R.-a. *et al.* 2000, Eisert R. and Levsen K. 1996, King A.J. *et al.* 2004, Popp P. *et al.* 2000). Η τεχνική αυτή εκχύλισης, βασίζεται στον διαχωρισμό του αναλύτη, σε ακινητοποιημένη φάση εκχύλισης. Η διεργασία της SPME μπορεί να συνοψιστεί σε δύο στάδια:

Οι χημικές ενώσεις εκχυλίζονται από το μητρικό δείγμα, με άμεση έκθεση της ίνας στο υδατικό δείγμα ή με αραίωσή της στην υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος και οι αναλυόμενες ενώσεις κατανέμονται πάνω σε αυτή, μετά από συγκεκριμένο χρόνο παραμονής της ίνας στο δείγμα.



Σχήμα 2.3 Συσκευή μικροεκχύλισης δια της στερεάς φάσης

Η ίνα απομακρύνεται από το δείγμα και οι κατανεμημένες σε αυτήν ενώσεις εκκροφούνται θερμικά με την έγχυση του δείγματος σε Αέριο Χρωματογράφο (GC) ή Υγρό χρωματογράφο Υψηλής Απόδοσης, ώστε να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν.

Αυτό σημαίνει ότι όταν το σύστημα φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας η εκχυλιζόμενη ποσότητα είναι σταθερή, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και δεν αλλάζει πλέον με την πάροδο του χρόνου.

Η αποτελεσματικότητα της μικροεκχύλισης δια της στερεάς φάσης επηρεάζεται από:

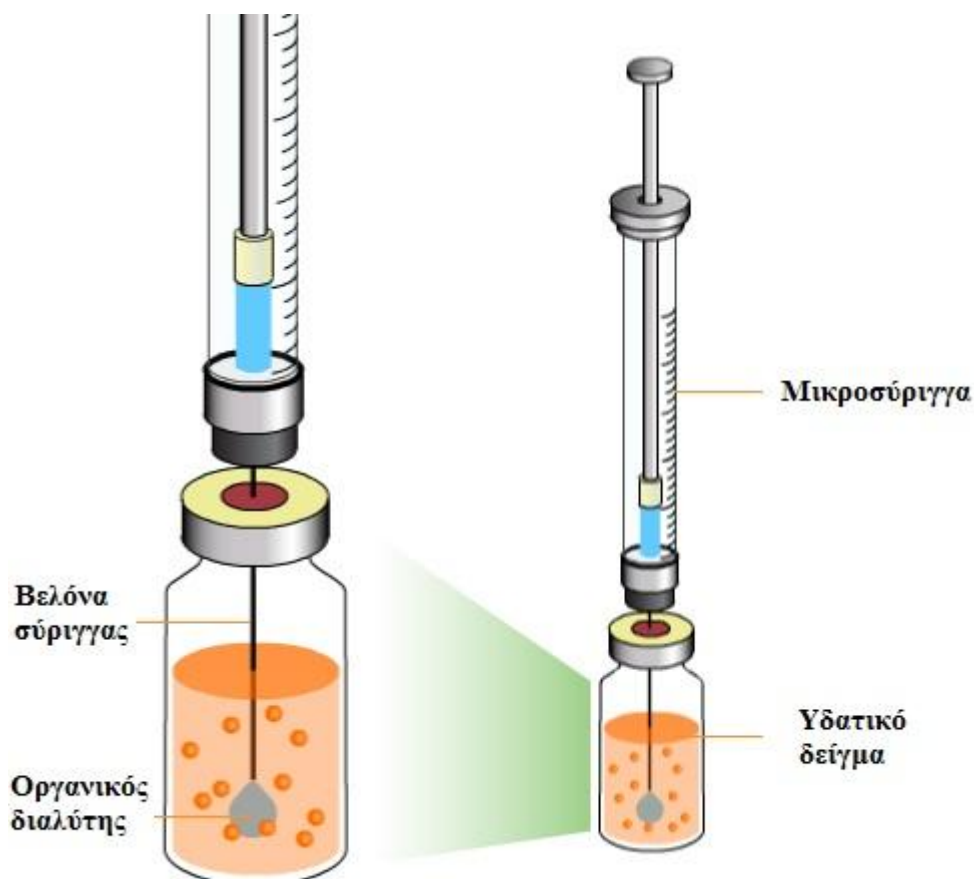
- Το καλυπτικό υλικό της ίνας. (Ανάλογα με το επιλεγμένο μίγμα ενώσεων που επιθυμούμε να αναλύσουμε, διότι επηρεάζει την εκλεκτικότητα, την επαναληψιμότητα και την ανάκτηση των επιλεχθέντων ενώσεων).

- Την αλατότητα.
- Την τιμή του pH.
- Τον χρόνο εκχύλισης.
- Τον ρυθμό ανάδευσης.
- Τον όγκο του δείγματος και τον όγκο αέριας φάσης.

Γενικά, η SPME μειώνει το χρόνο, το κόστος εργασίας και την επίδραση της μήτρας, αλλά η ευαισθησία και η ακρίβεια δεν είναι τόσο καλή όσο στην εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Wille K. *et al.* 2012).

2.2.4 Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (Single drop microextraction, SDME)

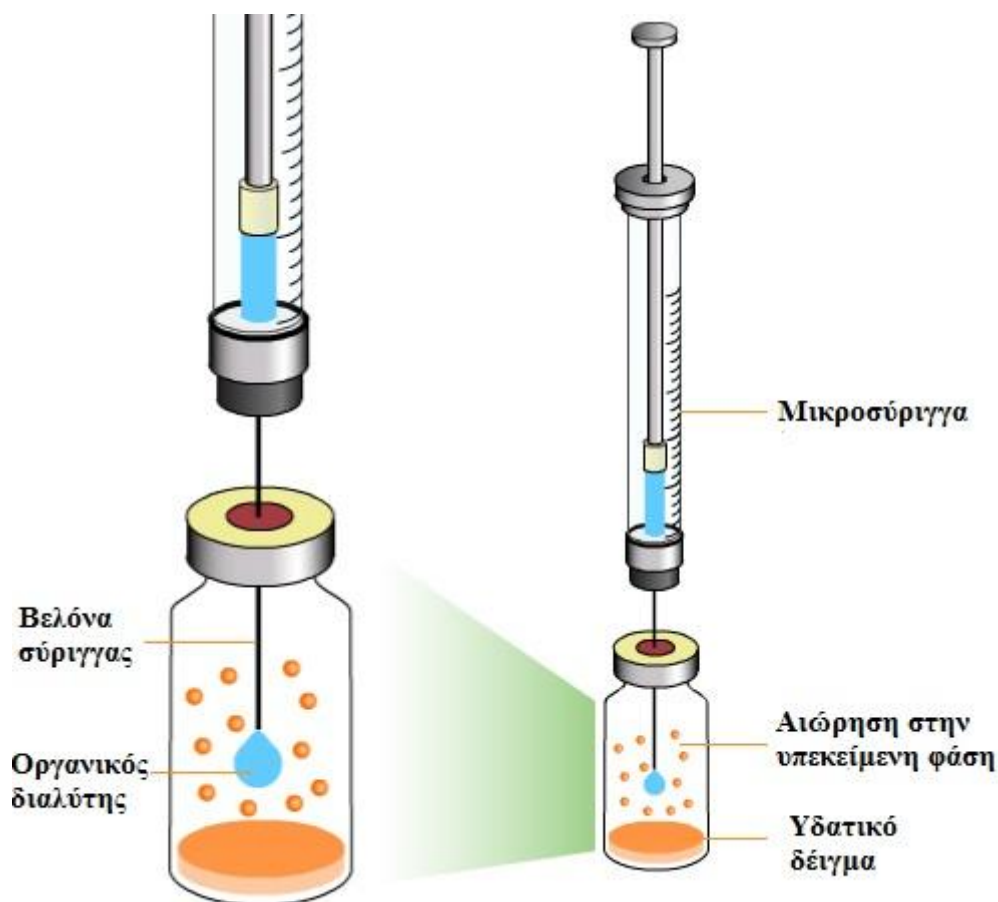
Μια σημαντική μέθοδος που αναπτύχθηκε από την μικροεκχύλιση με διαλύτη είναι η μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (SDME), όπου το ρόλο του δέκτη έχει μια μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη, μη αναμίξιμου με το νερό, η οποία κρέμεται πάνω από υδατικό διάλυμα. Αυτό είναι το σύστημα δύο φάσεων (Σχήμα 2.4). Όταν η μικροσταγόνα έρθει σε επαφή με το υδατικό δείγμα, οι οργανικές ενώσεις μεταφέρονται στην φάση του οργανικού και έτσι επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των ουσιών προς ανάλυση. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, το οποίο έχει καθοριστεί κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, η μικρο-σταγόνα αποσύρεται μέσα στην μικροσύριγγα και μεταφέρεται στον θάλαμο εισαγωγής δειγμάτων ενός GC ή HPLC για ανάλυση. Η τεχνική SDME, αν και είναι μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος εκχύλισης, ωστόσο σημαντικό μειονέκτημά της είναι ότι εφαρμογή εκτεταμένων χρόνων δειγματοληψίας και μεγάλων ταχυτήτων ανάδευσης έχουν ως αποτέλεσμα πιθανή μετατόπιση και απώλεια της μικροσταγόνας (Lambropoulou D.A. and Albanis T.A. 2007).



Σχήμα 2.4 Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου SDME.

2.2.5 Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας με αιώρηση στην υπερκείμενη φάση (Headspace Single drop microextraction, HS-SDME)

Η HS-SDME παρουσιάστηκε πρώτη φορά από τον Theis και την ομάδα του (Theis A.L. *et al.* 2001). Είναι μια τεχνική προκατεργασίας δείγματος η οποία επιτρέπει την εκχύλιση και προσυγκέντρωση πτητικών και ημιπτητικών ουσιών σε μια μικροσταγόνα που εκτίθεται στην υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος (Σχήμα 2.5). Η μικροεκχύλιση, προσυγκέντρωση και παραγωγοποίηση σε μια σταγόνα μπορεί να πραγματοποιηθεί εκθέτοντας μια επικρεμάμενη σταγόνα που περιέχει το μέσο παραγωγοποίησης στην αέρια φάση (Fiamegos Y.C. and Stalikas C.D. 2007). Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση υπολειμμάτων ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα (Wu Y. *et al.* 2008).



Σχήμα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου HS-SDME.

2.2.6 Μικροεκχύλιση μεμβράνης

Μια άλλη εκδοχή της μικρό-LLE είναι η μικροεκχύλιση με μεμβράνη. Οι τεχνικές που αναπτύχθηκαν από αυτή την εκδοχή μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες:

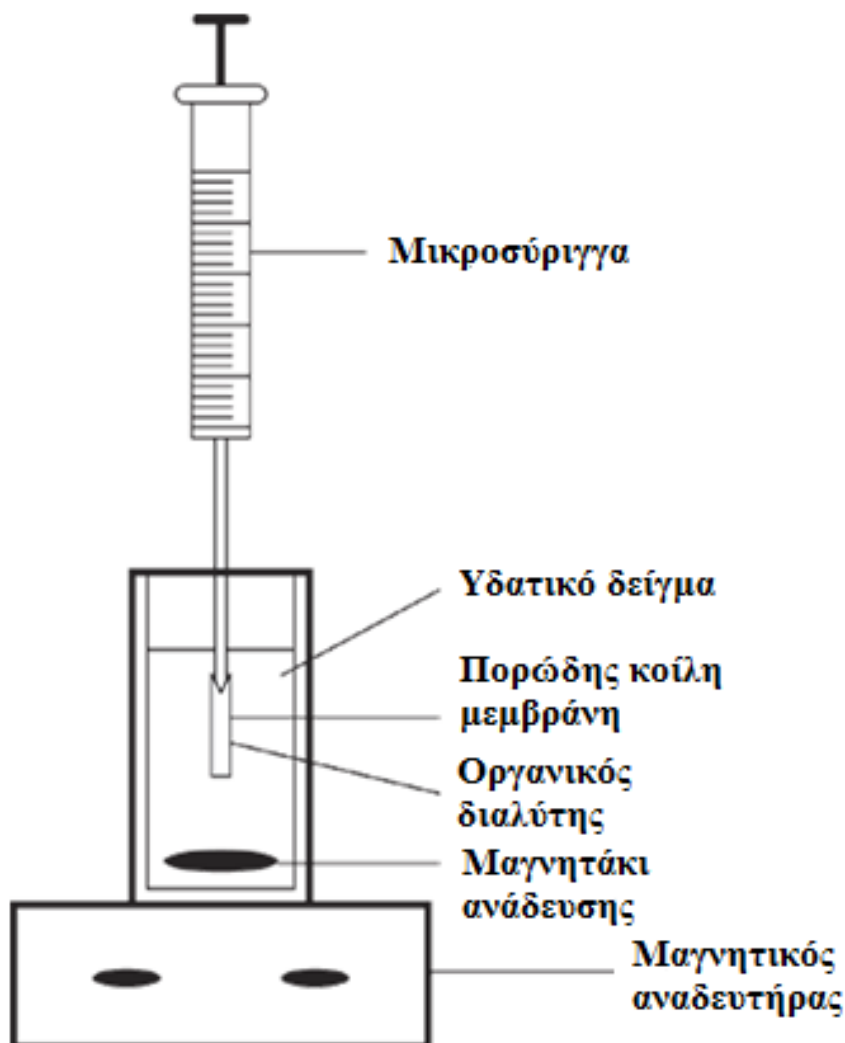
- Τεχνικές πορώδους μεμβράνης, που τα δύο διαλύματα (δότης και δέκτης) βρίσκονται και στις δύο πλευρές της μεμβράνης και είναι σε επαφή μέσω των πόρων της μεμβράνης και
- Τεχνικές μη πορώδους μεμβράνης, όπου η μεμβράνη σχηματίζει μια ξεχωριστή φάση (πολυμερική ή υγρή) ανάμεσα στα διαλύματα δότη και δέκτη.

Μία από τις τεχνικές μη πορώδους μεμβράνης που προέκυψαν, καλείται, τεχνική υποστηριζόμενης υγρής μεμβράνης (supported liquid membrane, SLM) (Sandahl M. *et al.* 2000) και στηρίζεται στην χρήση των πόρων πολυμερικής μεμβράνης ως στήριγμα στον

οργανικό διαλύτη, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.6 . Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σύστημα τριών φάσεων και το στρώμα του οργανικού διαλύτη βρίσκεται ανάμεσα στα διαλύματα δότη και δέκτη. Έχει χρησιμοποιηθεί για ανάλυση υπολειμμάτων ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα (Hsieh Y.-N. *et al.* 2006).

Στην περίπτωση που μια από τις φάσεις (συνήθως ο δέκτης) είναι επίσης οργανικός διαλύτης, θεωρούμε ότι έχουμε σύστημα δύο φάσεων και η τεχνική είναι γνωστή ως υγρή-υγρή εκχύλιση με μεμβράνη μικροπόρων (microporous membrane liquid-liquid extraction, MMLLE) (Bedendo G.C. *et al.* 2012). Η MMLLE μπορεί να συνδεθεί και on-line με αναλυτικά όργανα (Norberg J. *et al.* 2000).

Η χρήση μεμβρανών παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή εκλεκτικότητα, σχηματισμό καθαρού εκχυλίσματος και υψηλό βαθμό εμπλουτισμού.

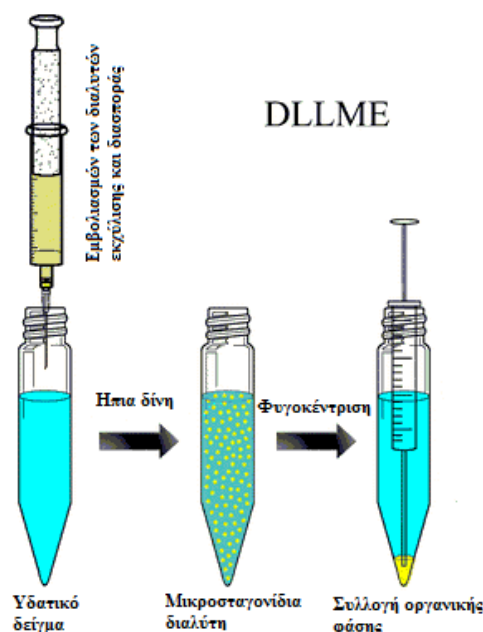


Σχήμα 2.6 Συσκευή για μικροεκχύλιση με κοίλη μεμβράνη.

Η ανάλυση ιχνοποσοτήτων διευκολύνεται περαιτέρω από την μείωση της κατανάλωσης διαλυτών. Οι μονάδες της πολυμερικής μεμβράνης μπορεί να είναι επίπεδες ή να έχουν την μορφή κοίλης ίνας και στις περισσότερες τεχνικές γίνεται άμεση σύνδεση των μεμβρανών εκχύλισης με όργανα ανάλυσης. Αν και είναι πολλά τα πλεονεκτήματα του αυτοματισμού, επειδή έχουν αναφερθεί προβλήματα μνήμης λόγω της απευθείας σύνδεσης με όργανα ανάλυσης, τελευταία έχουν αναπτυχθεί μερικές τεχνικές χωρίς να βρίσκονται σε on-line διάταξη.

2.2.7 Υγρή-υγρή μικροεκχύλιση διασποράς (Dispersive Liquid- Liquid Microextraction, DLLME)

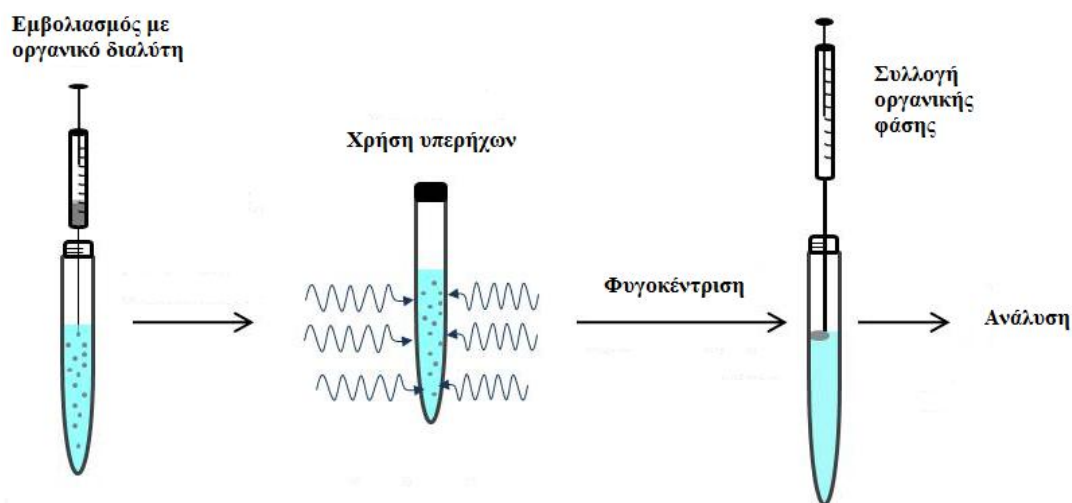
Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε το 2006 από τον Rezaee και την ομάδα του και βασίζεται σε ένα τριαδικό σύστημα διαλυτών (Σχήμα 2.7) (Alder L. *et al.* 2006, Τσούτση Χ. 2008). Η αποτελεσματικότητά της στηρίζεται στην επιλογή κατάλληλων διαλυτών εκχύλισης και διασποράς. Απαραίτητη προϋπόθεση στην επιλογή του διαλύτη εκχύλισης είναι να έχει πυκνότητα μεγαλύτερη από αυτή του νερού ενώ ο διαλύτης διασποράς να είναι αναμίξιμος με τον διαλύτη εκχύλισης και το υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια οι διαλύτες εκχύλισης και διασποράς αναμειγνύονται και εμβολιάζονται απευθείας εντός του υδατικού διαλύματος μέσω μίας σύριγγας. Το μίγμα αναδεύεται, σχηματίζοντας πλήθος μικρών σταγόνων (θόλωμα) οι οποίες διασπείρονται σε όλη την επιφάνεια του υδατικού διαλύματος. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται, με τον διαλύτη εκχύλισης να καταβυθίζεται και να απομακρύνεται με τη βοήθεια μίας σύριγγας. Το επόμενο βήμα είναι η έγχυση του δείγματος σε σύστημα χρωματογραφίας (Kuster M. *et al.* 2009, Rezaee M. *et al.* 2006, Wells M.J.M. and Yu L.Z. 2000). Είναι ίσως η τεχνική που χρησιμοποιείται περισσότερο τα τελευταία χρόνια για την ανίχνευση ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα (Fernández M. *et al.* 2015, Guo L. *et al.* 2016, Rezaee M. *et al.* 2006, Rezaee M. *et al.* 2010, Tseng W.-C. *et al.* 2014).



Σχήμα 2.7 Σχηματική αναπαράσταση της υγρής-υγρής μικροεκχύλισης διασποράς

2.2.8 Μικροεκχύλιση γαλακτωματοποίησης με την χρήση υπερήχων (ultrasound-assisted emulsification-microextraction, USAEME)

Μια νέα τεχνική εκχύλισης που ονομάστηκε μικροεκχύλιση γαλακτωματοποίησης με την χρήση υπερήχων (ultrasound-assisted emulsification-microextraction, USAEME) αναπτύχθηκε από τον Regueiro και την ομάδα του. (Regueiro J. *et al.* 2008). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μικροεκχύλιση με την χρήση υπερήχων (Σχήμα 2.8). Ειδικότερα μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη (μL) προστίθεται σε υδατικό δείγμα (mL). Στη συνέχεια αυτό τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων όπου και γίνεται η εκχύλιση των οργανικών ενώσεων από την υδατική στην οργανική φάση. Τέλος φυγοκεντρείται και η οργανική φάση απομακρύνεται με την χρήση σύριγγας ώστε να οδηγηθεί για ανάλυση σε σύστημα χρωματογραφίας (Ozcan S. *et al.* 2010). Δεν υπάρχουν αρκετές εργασίες στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση ΠΑΥ από υδατικά δείγματα με τη συγκεκριμένη τεχνική (Ahmadvand M. *et al.* 2015, Cheng J. *et al.* 2011, Ozcan S. *et al.* 2010, Saleh A. *et al.* 2009).

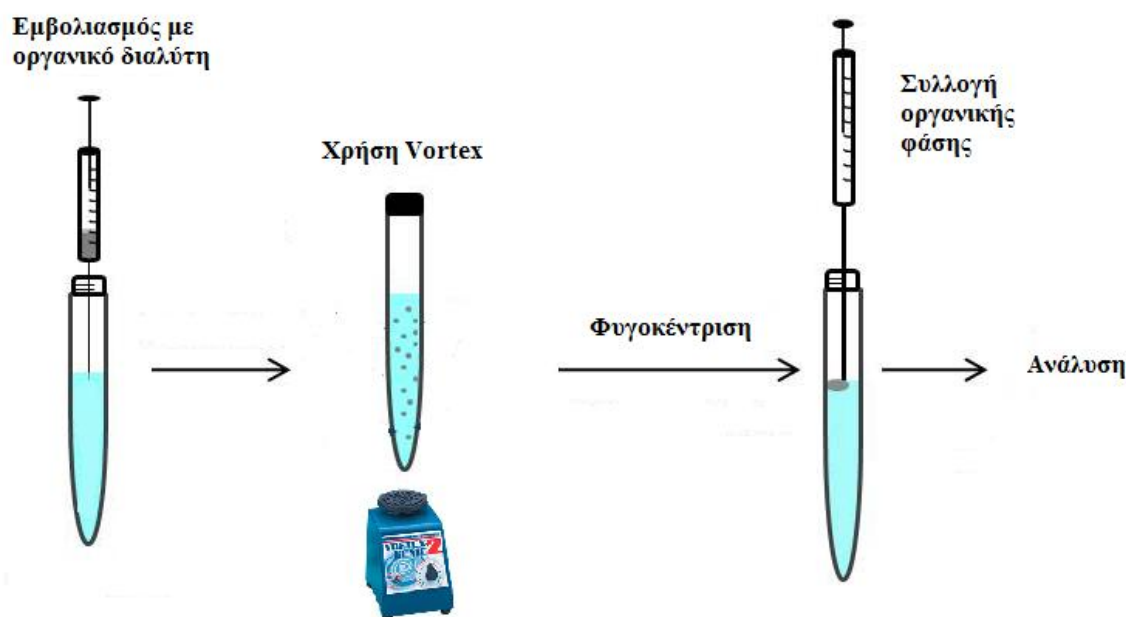


Σχήμα 2.8 Σχηματική αναπαράσταση της USAEME

Η χρήση υπερήχων είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την επιτάχυνση των διαφόρων σταδίων μικροεκχύλισης στην αναλυτική διαδικασία είτε για στερεά είτε για υγρά δείγματα (Priego-López E. and Luque de Castro M.D. 2003). Στα περιβαλλοντικά δείγματα κυρίως αυτό το είδος της ενέργειας βοηθάει πολύ στην εκχύλιση των οργανικών ενώσεων από την υδατική στην οργανική φάση. Επιπροσθέτως, η χρήση υπερήχων προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα, καθιστώντας το ιδανική μέθοδο για την προ-κατεργασία μεγάλου φάσματος δειγμάτων. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται η υψηλή απόδοση της εκχύλισης, το χαμηλότερο κόστος του εξοπλισμού, η ευκολία στη διαδικασία και η χαμηλότερη θερμοκρασία εκχύλισης. Ως εκ τούτου, η χρήση υπερήχων χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στην αναλυτική χημεία ιδίως στο πλαίσιο της προετοιμασίας του δείγματος. Στην USAEME, η εφαρμογή υπερηχητικής ακτινοβολίας διευκολύνει το φαινόμενο γαλακτωματοποίησης και επιταχύνει τη διαδικασία μεταφοράς μάζας μεταξύ δύο αναμίξιμων φάσεων. Αυτό βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης σε μικρότερο χρόνο (Luque de Castro M.D. and Priego-Capote F. 2007). Παρ' όλα αυτά, το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η δυσκολία στην αυτοματοποίηση της.

2.2.9 Υγρή-υγρή μικροεκχύλιση με χρήση vortex (Vortex-assisted Liquid-Liquid Microextraction, VALLME)

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ταχείας μικροεκχύλισης, που ονομάζεται υγρή-υγρή μικροεκχύλιση με χρήση vortex (Vortex-assisted Liquid-Liquid Microextraction VALLME) (Σχήμα 2.9)

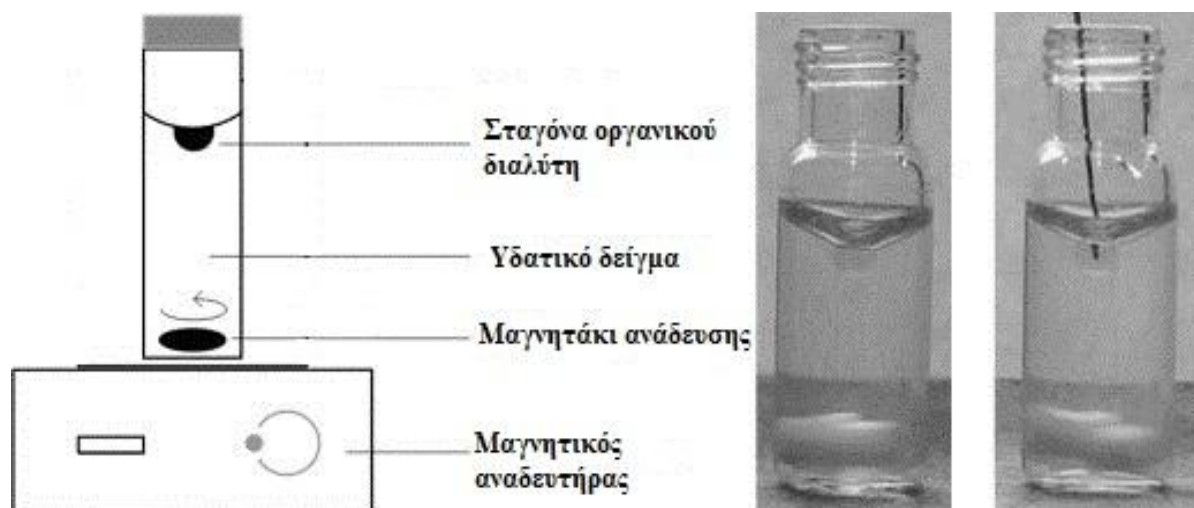


Σχήμα 2.9 Σχηματική αναπαράσταση της VALLME

Στην τεχνική αυτή μικροποσότητα οργανικού διαλύτη (μL) χαμηλότερης πυκνότητας σε σχέση με το νερό διασπείρεται σε ένα υδατικό δείγμα με την χρήση vortex δημιουργώντας μια ήπια διαδικασία γαλακτωματοποίησης (Yiantzi E. *et al.* 2010). Τα λεπτά σταγονίδια που σχηματίζονται μπορούν να εκχυλίσουν τις ουσίες στόχους ανάμεσα στις δυο φάσεις ταχύτερα λόγω της μικρότερης απόστασης διάχυσης και της μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας. Ακολουθεί φυγοκέντρωση όπου η οργανική φάση διαχωρίζεται στο αρχικό ενιαίο σχήμα πάνω από την επιφάνεια του υδατικού διαλύματος από όπου και μπορεί εξαχθεί ώστε να αναλυθεί σε σύστημα χρωματογραφίας. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνεται η υψηλή απόδοση της εκχύλισης, το χαμηλότερο κόστος του εξοπλισμού και η ευκολία στη διαδικασία. Το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής ωστόσο είναι ότι δεν μπορεί να αυτοματοποιηθεί (Papadopoulou A. *et al.* 2011).

2.2.10 Μικροεκχύλιση απευθείας αιωρούμενου σταγονιδίου (Directly Suspended Droplet Microextraction, DSDME)

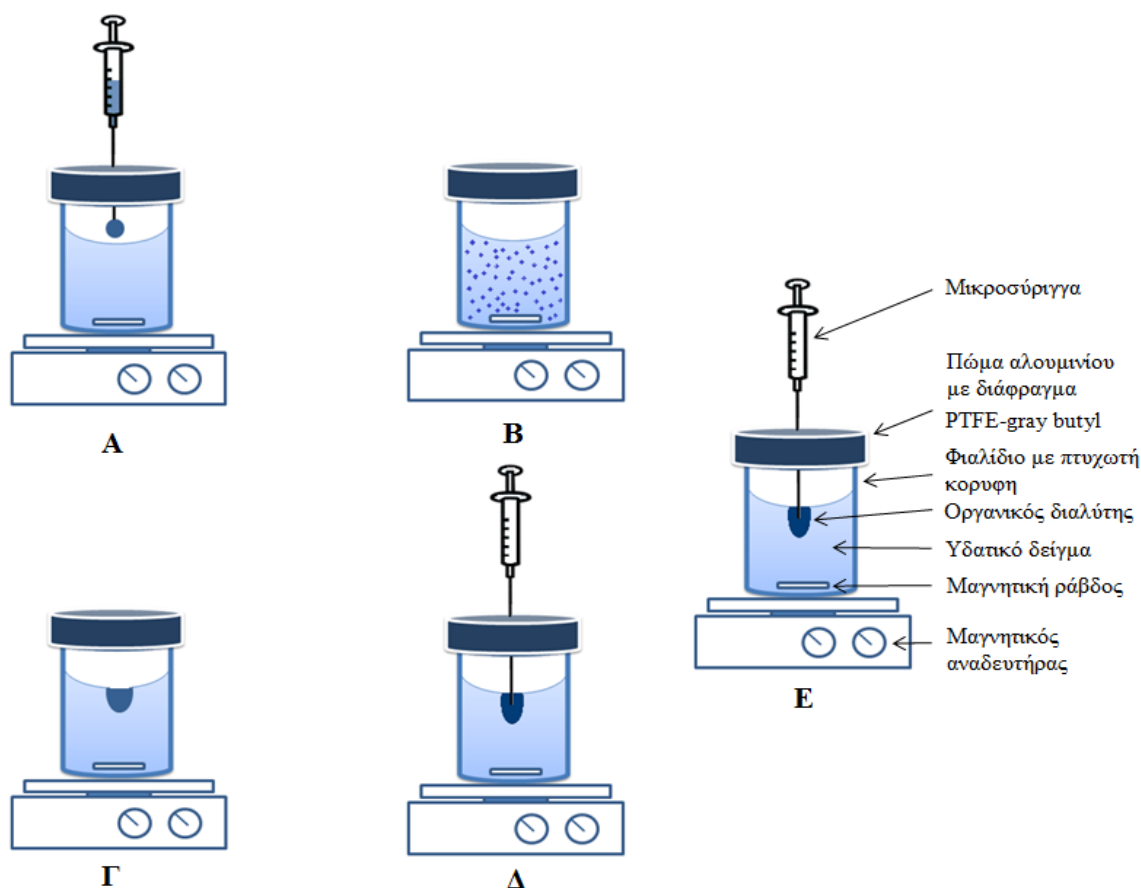
Το 2006 αναπτύχθηκε από τον Yangcheng και την ομάδα του μια νέα μέθοδος η οποία ονομάστηκε μικροεκχύλιση απευθείας αιωρούμενου σταγονιδίου (directly suspended droplet microextraction, DSDME) (Σχήμα 2.10), όπου η ανάδευση του μίγματος που περιέχει το υδατικό δείγμα και την οργανική φάση δέκτη παράγει ένα συμμετρικά περιστρεφόμενο πεδίο γύρω από τον συμμετρικό άξονα του μικροσταγονιδίου (Yangcheng L. *et al.* 2006). Παρά το γεγονός ότι η μικροσταγόνα αφήνεται ελεύθερη, εξακολουθεί να υφίσταται στη μορφή μονής σταγόνας (Pena-Pereira F. *et al.* 2012a). Με την παρέλευση ενός προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος η οργανική φάση δέκτης απομακρύνεται με τη βοήθεια μικροσύριγγας και στη συνέχεια χρησιμοποιείται για χρωματογραφική ανάλυση. Έχει χρησιμοποιηθεί ελάχιστα για την ανίχνευση ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα (Pena-Pereira F. *et al.* 2012b).



Σχήμα 2.10 Μικροεκχύλιση απευθείας αιωρούμενου σταγονιδίου

2.2.11 Υγρή-υγρή μικροεκχύλιση αιωρούμενης σταγόνας σε διασπορά (Dispersive suspended microextraction, DSME).

Το 2011, ο Yang με τους συνεργάτες του (Yang Z.H. *et al.* 2011) ανέπτυξαν μια νέα μέθοδο εκχύλισης που ονομάζεται υγρή-υγρή μικροεκχύλιση αιωρούμενης σταγόνας σε διασπορά (DSME) (Σχήμα 2.11).



Σχήμα 2.11 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας DSME. Α) στήσιμο, Β) στάδιο εκχύλισης, Γ) στάδιο αποκατάστασης, Δ) ανάκτηση διαλύτη για ανάλυση, Ε) επιμέρους τμήματα

Η μέθοδος βασίζεται στην υψηλή ταχύτητα ανάδευσης μιας μικρής ποσότητας οργανικού διαλύτη με ένα υδατικό δείγμα. Σε αυτή τη μέθοδο λαμβάνουν χώρα δύο κρίσιμα βήματα: το στάδιο της εκχύλισης και το στάδιο της αποκατάστασης. Κατά το στάδιο της εκχύλισης, οι αναλύτες εκχυλίζονται εντός του οργανικού διαλύτη, ενώ κατά τη διάρκεια του σταδίου αποκατάστασης, η οργανική φάση διαχωρίζεται από την υδατική. Μετά το διαχωρισμό των δύο φάσεων, οι αναλύτες εγχέονται σε σύστημα χρωματογραφίας για περαιτέρω ανάλυση. Λόγω της υψηλής ταχύτητας της μαγνητικής ράβδου ανάδευσης στο στάδιο εκχύλισης, ο οργανικός διαλύτης παίρνει την μορφή λεπτών σταγονιδίων. Αυτό μπορεί να αυξήσει σημαντικά την επιφάνεια επαφής μεταξύ των δύο φάσεων και την ελαχιστοποίηση του χρόνου εκχύλισης. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αποκατάστασης τα σταγονίδια οργανικού διαλύτη ενώνονται σε μια ενιαία σταγόνα. Λόγω της χαμηλότερης πυκνότητας του οργανικού διαλύτη από την υδατική φάση, η σταγόνα που έχει δημιουργηθεί βρίσκεται στο κέντρο της

κορυφή της δίνης και έτσι μπορεί να συλλεχθεί με μια μικροσύριγγα (Petridis N.P. *et al.* 2014). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει λύσει αρκετά από τα μειονεκτήματα των άλλων μεθόδων υγρής-υγρής μικροεκχύλισης, ενώ διατηρεί πολλά από τα πλεονεκτήματά τους (Yang Z.H. *et al.* 2011). Στην παρούσα διατριβή για πρώτη φορά η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκε για την ανίχνευση ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα μικροσύριγγα (Petridis N.P. *et al.* 2014).

2.3 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης

2.3.1 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι είναι πλέον χρησιμοποιούμενες για το διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ποσοτική ανάλυση υπολειμμάτων οργανικών ενώσεων. Τόσο η αέρια όσο και η υγρή χρωματογραφία κατέχει την πρώτη θέση στην ανάλυση. Η αέρια χρωματογραφία είναι μία τεχνική διαχωρισμού πτητικών συστατικών ενός δείγματος. Ο διαχωρισμός κάθε επιμέρους πτητικού συστατικού επιτυγχάνεται λόγω των διαφόρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών του μίγματος, του υλικού πληρώσεως και κάλυψης της στήλης και τη ροή του φέροντος αερίου (Παπαδογιάννης Ι. and Σαμανίδου Β. 2001). Οι ανιχνευτές που συνήθως συνδυάζονται με την Αέρια χρωματογραφία είναι ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ο οποίος χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενώσεων που περιέχουν αλογόνα (οργανοχλωριωμένα, τριαζίνες, καρβαμιδικά, φαινυλourίες) και ο ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (NPD) ο οποίος χρησιμοποιείται για την ανάλυση οργανοφωσφορικών, τριαζινών, αλλά και άλλων οργανικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο. Οι παραπάνω ανιχνευτές δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων στην περιοχή συγκεντρώσεων ppm-ppb, αλλά μειονεκτούν στην ταυτοποίηση αυτών. Για την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιείται ο φασματογράφος μάζας (MS) (Σχήμα 2.12). Οι ανιχνευτές μάζας που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι ο τετραπολικός (quadrupole) και ο ανιχνευτής παγίδευσης ιόντων (Ion trap). Ο χρωματογραφικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με τριχοειδής κυρίως στήλες (capillary columns), οι οποίες αντικατέστησαν τις πακεταρισμένες (packed columns), καθώς εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού και ευαισθησία. Οι συνήθεις χρησιμοποιούμενες είναι οι DB-1, DB-5 και Carbowax, οι οποίες χρησιμοποιούν πολυσιλοξάνιο ως πληρωτικό υλικό (Σπυριδωνάκος Ν.Ε. 2011). Η αέρια χρωματογραφία είναι μία τεχνική που βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση του

συνόλου σχεδόν των οργανικών ρύπων π.χ. φυτοφάρμακα, φαρμακευτικά, διαλύτες, πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, διοξίνες, τριαλομεθάνια (Τσούτση Χ. 2008).

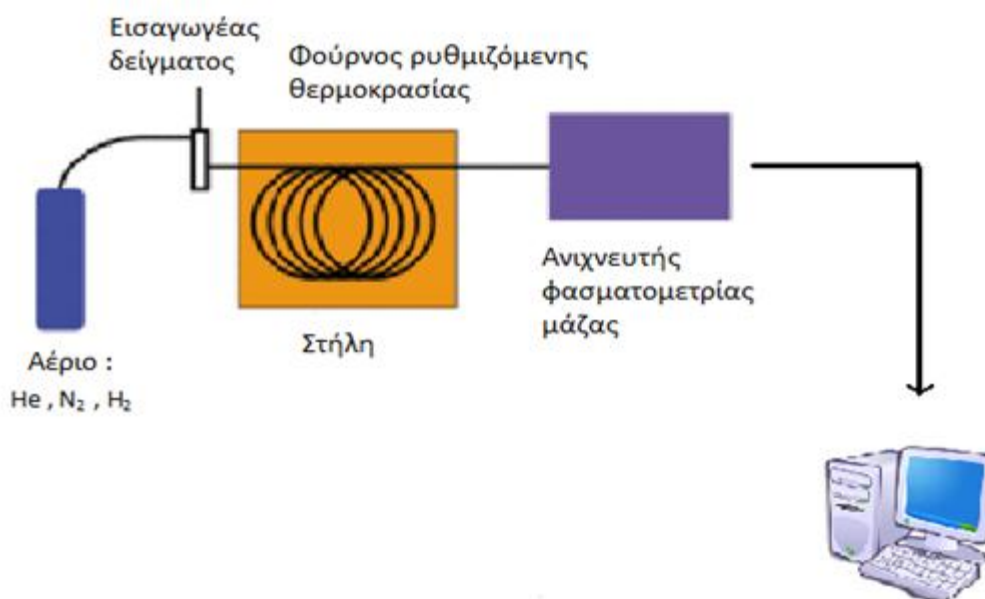


Σχήμα 2.12 Ενόργανη διάταξη αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με ανιχνευτή μάζας

2.3.1.1 Αρχή λειτουργίας αέριας χρωματογραφίας συζευγμένου με ανιχνευτή μάζας

Μετά την έγχυση του δείγματος στην βαλβίδα έγχυσης, τα μόρια των χημικών ενώσεων διαχωρίζονται εντός της χρωματογραφικής στήλης και εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας. Το φασματόμετρο μάζας αποτελείται από την πηγή ιόντων, έναν μαγνήτη και ένα σύστημα συλλογής ιόντων. Στην πηγή ιόντων τα μόρια (που βρίσκονται πλέον στην αέρια κατάσταση) βομβαρδίζονται με ηλεκτρόνια (ion source) παράγοντας θραύσματα ιόντων. Αυτά διερχόμενα από το μαγνητικό πεδίο, εκτρέπονται. Η τροχιά τους εξαρτάται από την ιοντική μάζα, την τάση στην πηγή ιόντων και το ιοντικό φορτίο. Το παραγόμενο φάσμα κάθε ιοντικού θραύσματος είναι χαρακτηριστικό του αρχικού μορίου της ένωσης από όπου προήλθε

κάνοντας δυνατό τον προσδιορισμό του. Στο σχήμα 2.13 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η σχηματική διάταξη ενός οργάνου GC-MS.



Σχήμα 2.13 Σχηματική διάταξη αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με ανιχνευτή μάζας

2.3.2 Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)

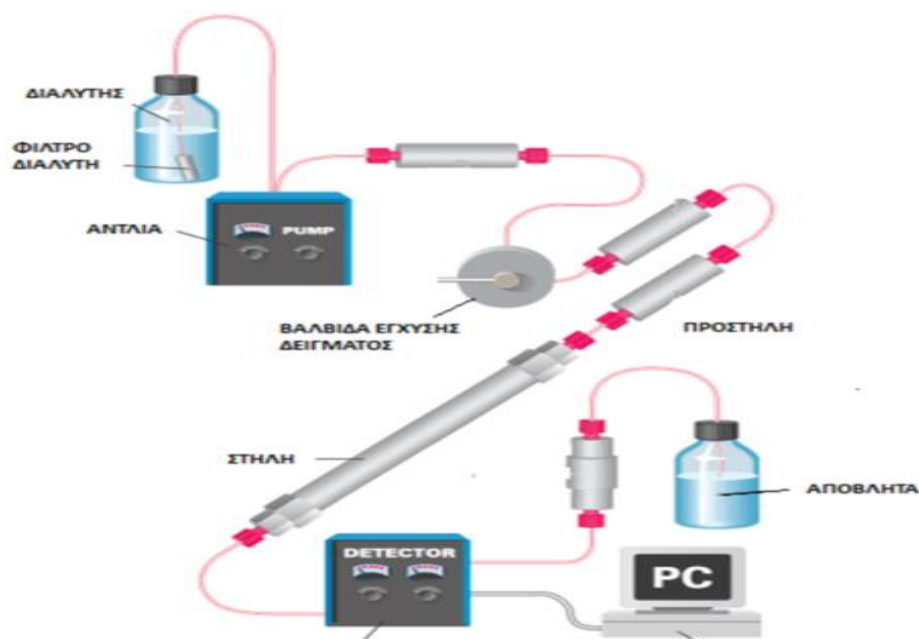
Με την υγρή χρωματογραφία είναι δυνατός ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός πολικών, μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ενώσεων οι οποίες δεν μπορούν να αναλυθούν απευθείας με την αέρια χρωματογραφία. (Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα με μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν (Τολικά Ε. 2011). Σημαντική θέση στην υγρή χρωματογραφία κατέχει η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) καθώς επίσης και η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοσκοπία μάζας (LC-MS) (Σχήμα 2.14). Βασικά πλεονεκτήματα της HPLC είναι η ταχύτητα, η εξειδίκευση, η υψηλή ευαισθησία και η ικανότητα ανίχνευσης χαμηλών συγκεντρώσεων. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής για την HPLC είναι ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας με διάταξη συστοιχίας διόδων-λυχνιών (HPLC-UV/DAD) που επιτρέπει τη σάρωση του φάσματος απορρόφησης της ουσίας που περνά από την κυψελίδα του ανιχνευτή σε όλη την περιοχή του υπεριώδους φάσματος (Κοσμά Χ. 2007).



Σχήμα 2.14: Ενόργανη διάταξη υγρού χρωματογράφου συζευγμένου με ανιχνευτή μάζας

2.3.2.1 Αρχή λειτουργίας υγρής χρωματογραφίας

Η υγρή χρωματογραφία είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μίας στατικής και μίας κινητής φάσης.



Σχήμα 2.15 Σχηματική διάταξη υγρής χρωματογραφίας

Το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, οι προς ανάλυση ουσίες μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα στη στήλη και κατανέμονται

μεταξύ της στατικής και της υγρής κινητής φάσης (Σχήμα 2.15). Τελικά εκκλύονται η μία μετά την άλλη.

Κεφάλαιο 3°

Σφάλματα στις μετρήσεις

3.1. Αναλυτικό σφάλμα

Κάθε μέτρηση μιας φυσικής ή χημικής ποσότητας υπόκειται σε σφάλματα, τα οποία προσδίδουν στο αποτέλεσμα μια αβεβαιότητα. Η αβεβαιότητα μπορεί να εκτιμηθεί, μπορεί να ελαχιστοποιηθεί, αλλά ποτέ δεν μπορεί να μηδενιστεί.

Το **σφάλμα** (error) E παρέχεται από τη σχέση:

$$E = x_i - \mu \quad (\text{Εξ 3.1})$$

όπου x_i είναι η πειραματική τιμή και μ η πραγματική τιμή.

Το **σχετικό σφάλμα** (relative error) E_r παρέχεται από τη σχέση:

$$E_r = \frac{E}{\mu} = \frac{(x_i - \mu)}{\mu} \quad (\text{Εξ 3.2})$$

και συνήθως εκφράζεται ως **σχετικό σφάλμα επί τοις εκατό** (relative error per cent), $E_r\%$:

$$E_r\% = E_r \times 100 \quad (\text{Εξ 3.3})$$

3.2. Τύποι αναλυτικών σφαλμάτων

Υπάρχουν δύο τύποι αναλυτικών σφαλμάτων:

Τα **συστηματικά** (systematic) ή **καθορισμένα** (determinate), που οφείλονται σε ένα ή περισσότερους λόγους γνωστής προέλευσης (π.χ. ακαθαρσίες αντιδραστηρίων, προσωπικά σφάλματα, οργανολογικά προβλήματα, ατέλεια της χρησιμοποιούμενης αναλυτικής τεχνικής).

Τα **τυχαία** (random) ή **ακαθόριστα** (indeterminate) σφάλματα, που οφείλονται σε απροσδιόριστα αίτια και στο "στατιστικό" θόρυβο που ενυπάρχει σε κάθε διαδικασία μέτρησης.

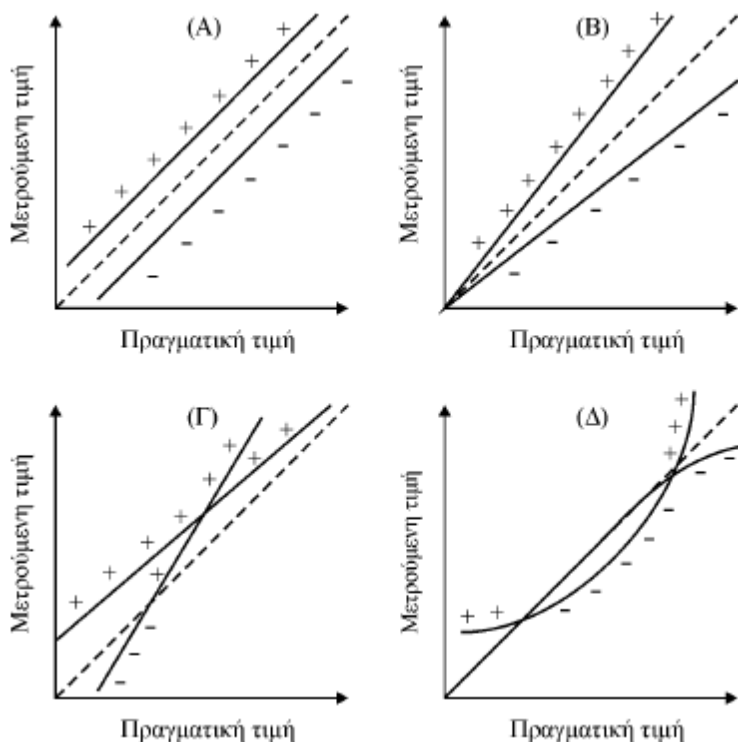
Η σύγχρονη παρουσία συστηματικών και τυχαίων σφαλμάτων, που είναι πάντοτε ανεξάρτητα μεταξύ τους, είναι μία σχετικά συνήθης περίπτωση, οπότε το ολικό αναλυτικό σφάλμα μπορεί να αναλυθεί σε δύο συστατικά σύμφωνα με την εξίσωση:

Ολικό αναλυτικό σφάλμα = συστηματικό σφάλμα + τυχαίο σφάλμα (Εξ 3.4)

3.3. Εισαγωγική θεώρηση συστηματικών σφαλμάτων

Η εξακρίβωση αρχικά της παρουσίας και στη συνέχεια του τύπου του συστηματικού σφάλματος είναι τα πρώτα βήματα που θα οδηγήσουν στην ανεύρεση της πηγής του. Μόλις βρεθεί η πηγή, εξετάζεται το κατά πόσο είναι δυνατόν αυτή να εκλείψει. Εάν τούτο είναι αδύνατον εξ αιτίας παραγόντων όπως η φύση της μεθόδου, η χρησιμοποιούμενη τεχνική, ο τύπος του δείγματος, ή κάποιου συνδυασμού των παραγόντων αυτών, εξετάζεται (ως ύστατη λύση) η έμμεση διόρθωση με μαθηματική επέμβαση στο αποτέλεσμα.

Η μαθηματική επέμβαση πραγματοποιείται αφού προηγουμένως εξακριβωθεί πλήρως ο τύπος του συστηματικού σφάλματος και διερευνηθούν προσεκτικά τα μαθηματικά του χαρακτηριστικά και οι τυχόν εξαρτήσεις του (π.χ. από τη φύση του δείγματος, των υπόλοιπων συστατικών). Εάν η μαθηματική επέμβαση είναι εφικτή, τότε αυτή καθίσταται μέρος της μεθόδου. Εάν ούτε αυτή είναι εφικτή πρέπει να αρχίσει πλέον η αναζήτηση άλλης αναλυτικής μεθόδου.



Σχήμα 3.1 Διαγράμματα συσχέτισης για τον καθορισμό του τύπου του συστηματικού σφάλματος μιας αναλυτικής μεθόδου (οι καμπύλες με διακεκομμένη γραμμή αποδίδουν την ιδανική

συσχέτιση). (Α) σταθερό σφάλμα, (Β) αναλογικό σφάλμα, (Γ) σύνθετο σφάλμα, (Δ) περίπλοκο/μικτό σφάλμα.

Ο προσδιορισμός του είδους του συστηματικού σφάλματος πραγματοποιείται με θεώρηση του **διαγράμματος συσχέτισης** (correlation plot) πραγματικών - μετρούμενων τιμών χημικών μονάδων (συγκέντρωσης ή μάζας) και τυπικές μορφές τους δείχνονται στο Σχήμα 3.1. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη χάραξη ενός διαγράμματος συσχέτισης είναι η μέτρηση ικανού αριθμού δειγμάτων με γνωστή συγκέντρωση ή ποσότητα του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Τα δείγματα αυτά είτε παρασκευάζονται (συνθετικά), είτε είναι φυσικά και έχουν προηγουμένως μετρηθεί με τεχνική γνωστής αξιοπιστίας και απαλλαγμένη από συστηματικά σφάλματα.

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των διαγραμμάτων συσχέτισης πρέπει να καλύπτουν ευρεία περιοχή τιμών περιεκτικότητας ή συγκέντρωσης. Ιδανικά πρέπει να καλύπτουν ολόκληρη την περιοχή των αναμενόμενων τιμών. Σημεία των διαγραμμάτων που ομαδοποιούνται σε περιοχές εκτός της καμπύλης συσχέτισης, συνήθως αποκαλύπτουν ειδικού τύπου παρεμποδίσεις της εξεταζόμενης μεθόδου.

Τα συστηματικά σφάλματα ταξινομούνται στις ακόλουθες κατηγορίες, ανάλογα με τη μορφή της καμπύλης του διαγράμματος συσχέτισης:

1. **Σταθερό σφάλμα** (constant error): Αποδίδεται από τις καμπύλες του διαγράμματος συσχέτισης (σχήμα 1.1.Α). Η καμπύλη συσχέτισης είναι παράλληλη προς την ιδανική και δεν διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Οδηγεί σε μονοκατευθυνόμενο (θετικό ή αρνητικό) αναλυτικό σφάλμα (π.χ. με πρόσημα σφαλμάτων του τύπου +++++ ή - - - - -). Είναι προφανές ότι το σχετικό σφάλμα είναι μεγαλύτερο στα "χαμηλά" δείγματα. Η διαπίστωση ικανοποιητικής ανάκτησης (recovery) κατά τον έλεγχο της μεθόδου δεν αποκαλύπτει την παρουσία σταθερού σφάλματος.

Εάν δεν είναι δυνατή η εξάλειψη του σταθερού συστηματικού σφάλματος, μπορεί απλά να διαπιστωθεί το μέγεθός του και εφόσον είναι σταθερό σε όλα τα δείγματα τα αποτελέσματα μπορούν να υποστούν μαθηματική διόρθωση. Είναι προφανές ότι τούτο δεν ισχύει, όταν το

σταθερό σφάλμα οφείλεται σε παρεμποδίζουσες ουσίες των οποίων η συγκέντρωση ποικίλει από δείγμα σε δείγμα.

Η σύγχρονη παρουσία σταθερού συστηματικού σφάλματος και έντονου τυχαίου σφάλματος περιορίζει σημαντικά τη δυνατότητα μετρήσεων χαμηλών συγκεντρώσεων ή ποσοτήτων, αφού αυξάνεται σημαντικά η αβεβαιότητα του αποτελέσματος.

Η παρουσία σταθερού αλλά άγνωστου σε τιμή συστηματικού σφάλματος (τυφλή μέτρηση διαφορετική του μηδενός) στο στάδιο της μέτρησης (μόνο) αποκλείει τη γνωστή προσθήκη (standard known addition) ως τεχνική ποσοτικοποίησης.

2. Αναλογικό σφάλμα (proportional error). Αποδίδεται από τις καμπύλες του διαγράμματος συσχέτισης (σχήμα 1.1.B). Η καμπύλη συσχέτισης διέρχεται από την αρχή των αξόνων (σημείο 0,0). Οδηγεί σε μονοκατευθυνόμενο αναλυτικό σφάλμα (π.χ. +++++ ή - - - -) με αυξανόμενο μέγεθος, όσο αυξάνει η περιεκτικότητα του δείγματος στο προσδιοριζόμενο συστατικό, ενώ το σχετικό σφάλμα διατηρείται σταθερό. Διαπιστώνεται εύκολα με πειράματα ανάκτησης, η οποία εμφανίζεται συστηματικά μεγαλύτερη ή μικρότερη του 100%.

Η τεχνική της γνωστής προσθήκης δεν επηρεάζεται από αυτό το αναλογικό σφάλμα και αποτελεί την πλέον ενδεδειγμένη τεχνική ποσοτικοποίησης, εάν δεν είναι δυνατή η εξάλειψη της αιτίας αυτού του σφάλματος και εφόσον το σφάλμα αυτό υπεισέρχεται στο τελικό στάδιο της μέτρησης (π.χ. κατά τη φωτομέτρηση του επεξεργασμένου δείγματος).

3. Συνδυασμός σταθερού - αναλογικού σφάλματος (combined error). Αποδίδεται από τις καμπύλες του διαγράμματος συσχέτισης (σχήμα 1.1.Γ). Οδηγεί σε σφάλματα μονοκατευθυνόμενα ή με μία μόνο χαρακτηριστική αλλαγή προσήμου του σφάλματος (π.χ. +++++ ή +++ - - - -). Εάν υπεισέρχεται μόνο στο στάδιο της τελικής μέτρησης δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί παρά μόνο με χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς ως τεχνικής ποσοτικοποίησης.

4. Περίπλοκο/μικτό σφάλμα. Αποτελεί μερική περίπτωση του προηγούμενου τύπου και αποδίδεται από μη ευθύγραμμες καμπύλες συσχέτισης. Συνήθως οφείλεται στη χημεία της μέτρησης (π.χ. μικρές σταθερές ισορροπίας, βραδεία αποκατάσταση ισορροπίας) και σε οργανολογικά προβλήματα. Τα σφάλματα μπορεί να είναι μονοκατευθυνόμενα ή ομαδοποιούνται σε περιορισμένο αριθμό ομάδων με το ίδιο πρόσημο (π.χ. +++ ----++). Το τελευταίο αυτό χαρακτηριστικό καθιστά το είδος αυτό του σφάλματος ως το πλέον "ύπουλο", αφού μπορεί (συμπτωματικά) να υπάρχουν περιοχές πρακτικά μηδενικού σφάλματος, ή μίας

“καθησυχαστικής” εναλλαγής των προσήμων του σφάλματος. Εάν σφάλμα αυτού του είδους υπεισέρχεται μόνο στο στάδιο της μέτρησης, δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί παρά μόνο με χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς ως τεχνικής ποσοτικοποίησης, όπου τα πρότυπα θα πρέπει να έχουν υπόβαθρο περιεχόμενο παραπλήσιο των δειγμάτων.

3.4. Τυχαία σφάλματα

Μετρήσεις με αποκλειστικώς τυχαία σφάλματα χαρακτηρίζονται από τυχειότητα στη συχνότητα και αλληλουχία του πρόσημου του σφάλματος (π.χ. ++++ ---+---+). Τα μικρά (απολύτως) σφάλματα είναι περισσότερο πιθανά από τα μεγάλα και γενικά χαρακτηρίζονται από κάποιο μέτρο της **διασποράς** (dispersion ή scattering) των λαμβανόμενων τιμών (π.χ. εύρος τιμών, τυπική απόκλιση). Το μέτρο διασποράς επιλέγεται ανάλογα με το είδος της στατιστικής κατανομής τους.

Εξ ορισμού τα τυχαία σφάλματα έχουν ως πραγματική μέση τιμή το μηδέν και ως εκ τούτου αποτελεσματική μείωσή τους μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση του αριθμού των μετρήσεων. Τούτο βέβαια δεν είναι πάντοτε εφικτό λαμβανομένων υπόψη παραγόντων, όπως η ποσότητα του διατιθέμενου δείγματος, το κόστος, ο χρόνος και ο φόρτος εργασίας. Σε αντίθεση με τα τυχαία σφάλματα, τα συστηματικά σφάλματα δεν μειώνονται με αύξηση του αριθμού μετρήσεων.

3.5. Αξιολόγηση μετρήσεων

Οι επόμενοι όροι χαρακτηρίζουν μία αναλυτική τεχνική, αλλά και τη γενικότερη απόδοση ενός εργαστηρίου, όπως και την προσωπική ικανότητα του αναλυτή:

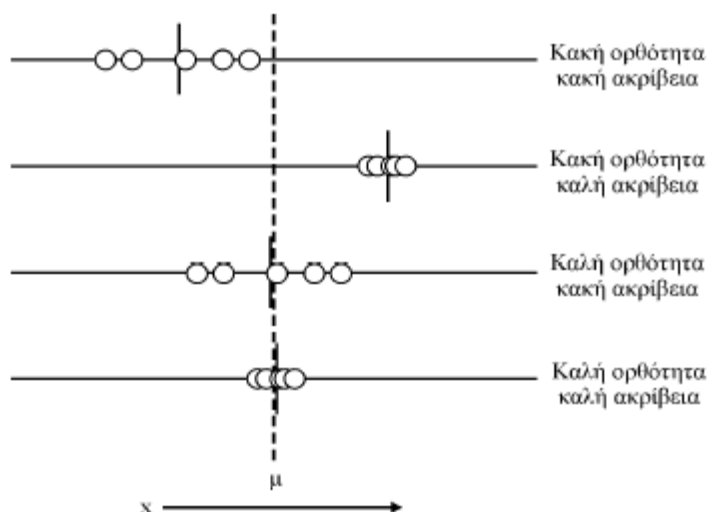
1. **Ορθότητα** (accuracy). Είναι μέτρο της εγγύτητας της μετρούμενης τιμής προς την πραγματική και αποδίδεται αποκλειστικά από το σφάλμα (εξίσωση 1-1) ή τη μέση τιμή των απόλυτων τιμών του σφάλματος (ή του σχετικού σφάλματος) σε περίπτωση γενικής αξιολόγησης πολλών μετρήσεων σε πολλά δείγματα.

2. **Ακρίβεια** (precision). Είναι το μέτρο της διασποράς μιας σειράς μετρήσεων από **μέτρηση σε μέτρηση** και μέσα στην **ίδια σειρά μετρήσεων** (within-run precision) και εκφράζεται με κάποιο στατιστικό μέτρο της διασποράς (π.χ. με την τυπική απόκλιση).

Όροι που σχετίζονται με την ακρίβεια είναι η **επαναληψιμότητα** (repeatability) και η **αναπαραγωγιμότητα** (reproducibility). Γενικά, η επαναληψιμότητα αποτελεί μέτρο της

διασποράς ομοειδών μετρήσεων που εκτελούνται στο ίδιο εργαστήριο και από το ίδιο προσωπικό, ενώ η αναπαραγωγιμότητα αποτελεί ανάλογο μέτρο της διασποράς ομοειδών μετρήσεων, που έχουν ληφθεί σε διάφορα εργαστήρια.

Στα σημειογράμματα του σχήματος 3.2 δείχνονται τυπικές περιπτώσεις συνδυασμών ορθότητας και ακρίβειας.

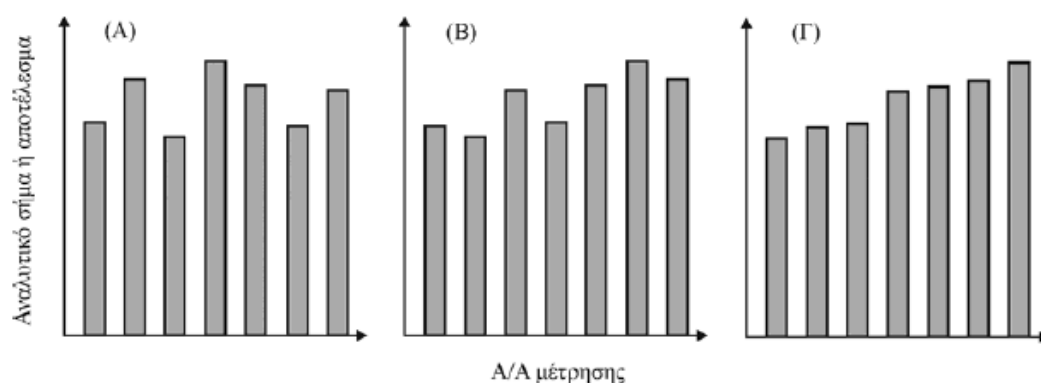


Σχήμα 3.2. Σημειογράμματα αξιολόγησης της ορθότητας και ακρίβειας μετρήσεων.

3. Τάση (trend). Εκφράζει τον τρόπο κατά τον οποίο εξαρτάται το αποτέλεσμα της μέτρησης ενός μεγέθους από την προηγούμενη μέτρηση του ίδιου μεγέθους (στο ίδιο δείγμα) και επομένως εμπεριέχει τη διάσταση του χρόνου. Ιδανικά δεν πρέπει να υπάρχει καμία εξάρτηση, άσχετα από το είδος του ενυπάρχοντος σφάλματος (συστηματικού ή τυχαίου). Ή δεν θα πρέπει να υπάρχει διαφορά (μηδενικό ή αποκλειστικά συστηματικό σφάλμα) ή το εκάστοτε αποτέλεσμα θα πρέπει να εμφανίζεται τυχαία μεγαλύτερο ή μικρότερο από το προηγούμενο. Εάν διαπιστωθεί συστηματική εμφάνιση συνεχώς αυξανόμενων ή μειούμενων τιμών, τότε υπάρχει τάση (ή ολίσθηση) τιμών (Σχήμα 3.3).

Η τάση συχνά παραβλέπεται ως παράγοντας αξιολόγησης σειρά μετρήσεων και δεν ελέγχεται η ύπαρξή της. Παρ' όλα αυτά μπορεί να ανιχνευθεί με σχετικά απλές στατιστικές δοκιμασίες, οι οποίες επιβάλλεται να προηγηθούν από κάθε άλλη στατιστική δοκιμασία αξιολόγησης της ορθότητας και της ακρίβειας της εξεταζόμενης μεθόδου. Ένας απλός τρόπος ανίχνευσης τάσης βασίζεται στην εξέταση της τυπικής απόκλισης (s_a) της κλίσης a της ευθείας που

περιγράφει το αποτέλεσμα κάθε μέτρησης (Y) ως συνάρτηση του αύξοντα αριθμού της (i), όπως λαμβάνεται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων ($Y = ai + b$). Εάν η κλίση a βρεθεί σημαντικά διαφορετική από το μηδέν (π.χ. με τη δοκιμασία Student's t), τότε θεωρείται ότι υπάρχει τάση στο δεδομένο επίπεδο εμπιστοσύνης.



Σχήμα 3.3. Τάση μετρήσεων: (Α) απουσία συγκεκριμένης τάσης, (Β) ενδείξεις αυξητικής τάσης, (Γ) σαφής ύπαρξη αυξητικής τάσης.

Η ύπαρξη τάσης (γενικά) είναι "ό,τι χειρότερο" μπορεί να συμβεί σε μία μέτρηση, αφού φέρει την όλη διαδικασία **εκτός ελέγχου** (out of control). Η οποιαδήποτε αξιολόγηση ως προς την ορθότητα ή ακρίβεια, οσωνδήποτε μετρήσεων με τάση, δεν έχει νόημα. Η τάση καθιστά αδύνατο τον υπολογισμό οποιουδήποτε στατιστικού στοιχείου (ακόμη και της μέσης τιμής) και διορθώνεται μόνο με δραστικό έλεγχο της χημείας (π.χ. αστάθεια κάποιου αντιδραστηρίου) και των χρησιμοποιούμενων οργάνων (π.χ. σωρευτική μόλυνση ή ρύπανση ενός ανιχνευτή, θερμική αστάθεια).

Η τεχνική του **εσωτερικού προτύπου** (internal standard), ως τεχνική ποσοτικοποίησης, πολλές φορές διορθώνει τα αποτελέσματα και εφαρμόζεται, όπου είναι δυνατόν (ιδιαίτερα στις χρωματογραφικές τεχνικές). Τυπικά η τεχνική αυτή εφαρμόζεται, εφόσον έχουμε τη δυνατότητα σύγχρονης μέτρησης δύο αναλυτικών σημάτων, δηλ. της μετρούμενης ουσίας και του εσωτερικού προτύπου.

3.6. Σημαντικά ψηφία

Όταν ένας υπολογίζεται σε πειραματικά δεδομένα, το σφάλμα ή η αβεβαιότητα του τελικού αποτελέσματος υπολογίζεται με βάση κανόνες διαδόσεως σφαλμάτων. Ένας τρόπος για να δώσουμε χονδρικά την αβεβαιότητα είναι η χρησιμοποίηση **σημαντικών ψηφίων**. Σημαντικά

ψηφία θεωρούνται τα ψηφία ενός αριθμού, που είναι γνωστά με βεβαιότητα και ένα ψηφίο επιπλέον. Γενικά το τελευταίο ψηφίο ενός αριθμού θεωρείται ότι έχει αβεβαιότητα ίση με ± 1 , εκτός εάν παρέχονται πληροφορίες για τη ύπαρξη μεγαλύτερης αβεβαιότητας, όπως π.χ. εάν είναι γνωστή η τυπική απόκλιση του μέσου όρου, οπότε η αβεβαιότητα του αριθμού καθορίζεται απ' αυτή. Τα μηδενικά, που υπάρχουν στην αρχή ενός αριθμού, καθορίζουν την θέση της υποδιαστολής και δεν είναι σημαντικά ψηφία. Μηδενικά στο τέλος ενός αριθμού θεωρούνται ως σημαντικά ψηφία, γι αυτό όσα είναι αβέβαια απαλείφονται και ο αριθμός γράφεται ως δύναμη του δέκα.

Όταν γράφουμε το τελικό αποτέλεσμα μιας ανάλυσης (και γενικότερα μιας σειράς αριθμητικών πράξεων), πρέπει να διατηρούμε τα απαραίτητα σημαντικά ψηφία, ώστε η ακρίβεια του τελικού αποτελέσματος να είναι της ίδια τάξης μεγέθους προς την ακρίβεια εκείνου του αριθμού (πειραματικού μεγέθους), που είναι ο λιγότερο ακριβής. Αυτό είναι επιτακτικότερο σήμερα, που με τις ηλεκτρονικές αριθμομηχανές τα αποτελέσματα των αριθμητικών πράξεων δίνονται με δέκα ή περισσότερα ψηφία. Ειδικότερα, οι διάφοροι υπολογισμοί εκτελούνται ως εξής:

1. Απαλείφονται τα μη σημαντικά ψηφία του αποτελέσματος, και, εάν το πρώτο απαλειφόμενο ψηφίο είναι μεγαλύτερο ή μικρότερο από το πέντε, το ψηφίο που βρίσκεται πριν από αυτό, αυξάνεται κατά μια μονάδα ή παραμένει όπως είναι, αντίστοιχα. Εάν το πρώτο απαλειφόμενο ψηφίο είναι πέντε, τότε ανάλογα με το αν το ψηφίο που βρίσκεται πριν από αυτό, είναι άρτιος ή περιττός αριθμός, αυτό παραμένει όπως είναι ή αυξάνεται κατά μια μονάδα, αντίστοιχα. Για να έχουμε μεγαλύτερη αντικειμενικότητα κατά τους υπολογισμούς, πολλές φορές διατηρούμε στα ενδιάμεσα στάδια ένα ή και δυο ψηφία παραπάνω από τα αιτούμενα και στο τελικό αποτέλεσμα απαλείφουμε όλα τα αβέβαια ψηφία εκτός από ένα.
2. Κατά την πρόσθεση ή αφαίρεση αριθμών, το άθροισμα ή η διαφορά πρέπει να έχει απόλυτη αβεβαιότητα της ίδιας τάξης με τον πλέον αβέβαιο αριθμό. Γι' αυτό το αποτέλεσμα δεν πρέπει να έχει περισσότερα δεκαδικά ψηφία από τον αριθμό που έχει τα λιγότερα δεκαδικά ψηφία.
Εάν σε μια πρόσθεση ή αφαίρεση περιλαμβάνονται αριθμοί με τη μορφή δυνάμεων, στην αρχή γράφονται όλοι οι αριθμοί ως δυνάμεις με τον ίδιο εκθέτη.
3. Στον πολλαπλασιασμό την διαίρεση ο αριθμός των σημαντικών ψηφίων στο γινόμενο ή το πηλίκο εξαρτάται από την σχετική αβεβαιότητα των πολλαπλασιασμένων ή

διαιρούμενων αριθμών και πρέπει η σχετική αβεβαιότητα του εξαγόμενου να είναι της ίδιας τάξεως μεγέθους προς την αβεβαιότητα του αριθμού με τη μικρότερη σχετική ακρίβεια. Αυτό συνήθως σημαίνει, ότι η σχετική αβεβαιότητα του εξαγόμενου βρίσκεται στην περιοχή $0,2x - 2x$, όπου x είναι η μέγιστη από τις σχετικές αβεβαιότητες των αριθμών.

4. Το χαρακτηριστικό των λογαρίθμων, δηλαδή το ψηφίο πριν την υποδιαστολή, δεν θεωρείται σημαντικό. Έτσι λογαριθμικοί αριθμοί, π.χ. pH, pM, κατά κανόνα πρέπει να περιέχουν δεξιά της υποδιαστολής τον ίδιο αριθμό ψηφίων με τον αρχικό αριθμό. Όμοια, ο αντιλογάριθμος δεν πρέπει να περιέχει περισσότερα ψηφία από τον αριθμό των δεκαδικών ψηφίων του λογαρίθμου.

Όταν σε μια ανάλυση μπορεί να υπολογιστεί η τυπική απόκλιση του μέσου όρου, s_x , τότε ο αριθμός των ψηφίων του αποτελέσματος καθορίζεται απ' αυτήν και γράφεται ως $\bar{x} \pm s_x$. Π.χ. εάν το αποτέλεσμα της εκατοστιαίας περιεκτικότητας μιας ανάλυσης υπολογίσθηκε σε $\bar{x}\% = 32,682982781$ και $s_x = 0,15$, τότε $\bar{x}\% = 32,7$ γιατί υπάρχει αβεβαιότητα στο πρώτο δεκαδικό ψηφίο (Χατζηιωάννου Θ.Π. and Κουμπάρη Μ.Α. 1990).

3.7. Βασικοί ορισμοί κατά ISO 5725

Ο Διεθνής Οργανισμός Προτυποποίησης (International Organization for Standardization)

στην έκδοση του 5725 με τίτλο “Accuracy (Trueness and Precision) of measurement methods and results” καθιερώνει ένα πρότυπο τρόπο προσδιορισμού της ορθότητας και ακρίβειας νέων επίσημων αναλυτικών μεθόδων ελέγχου, μέσω **διεργαστηριακών** (interlaboratory) αναλύσεων προτύπων δειγμάτων. Στην πρώτη ενότητα (5725-1) του προτύπου αυτού παρέχονται ορισμένοι βασικοί ορισμοί ως οι ακόλουθοι:

- **Παρατηρούμενη τιμή** (observed value): η τιμή του χαρακτηριστικού που λαμβάνεται ως αποτέλεσμα μιας παρατήρησης.
- **Αποτέλεσμα δοκιμασίας** (test result): η τιμή ενός χαρακτηριστικού που λαμβάνεται με εκτέλεση μιας καθορισμένης μεθόδου δοκιμασίας. Η μέθοδος δοκιμασίας πρέπει να καθορίζει τον αριθμό των πραγματοποιούμενων παρατηρήσεων και τον τρόπο με το οποίο από τις παρατηρήσεις προκύπτει και πώς παρουσιάζεται το αποτέλεσμα (με λήψη μέσης τιμής, διάμεσης τιμής, υπολογισμό τυπικής απόκλισης κ.λπ.). Μπορεί επιπλέον να

απαιτούνται κάποιες τυπικές διορθώσεις (π.χ. ως προς πίεση και θερμοκρασία σε περιπτώσεις τιμών όγκου αερίων). Η τιμή μπορεί να υπολογισθεί από κάποιο αριθμό παρατηρήσεων και στην απλούστερη περίπτωση μόνο από μία.

- **Επίπεδο δοκιμασίας σε πείραμα επαναληψιμότητας** (level of the test in a precision experiment): Η γενική μέση τιμή (general average) των αποτελεσμάτων δοκιμασίας από όλα τα εργαστήρια για ένα συγκεκριμένο δοκιμαζόμενο υλικό ή δείγμα.
- **Στοιχείο σε πείραμα επαναληψιμότητας** (cell in a precision experiment): Τα αποτελέσματα δοκιμασίας σε απλό επίπεδο δοκιμασίας που λαμβάνονται από ένα εργαστήριο.
- **Αποδεκτή τιμή αναφοράς** (accepted reference value): Μια τιμή που εξυπηρετεί ως “έκσυμφωνίας” αναφορά για σύγκριση και η οποία προκύπτει ως:
 - α) **Θεωρητική ή καθιερωμένη** τιμή με βάση επιστημονικές αρχές.
 - β) **Αποδιδόμενη** (assigned) ή διακριβωμένη (certified) τιμή με βάση πειραματική εργασία ενός εθνικού ή διεθνούς οργανισμού.
 - γ) **Εκ συγκατάθεσης** (consensus) ή διακριβωμένη τιμή βασιζόμενη σε πειραματική συνεργασία υπό την γενική επίβλεψη μιας επιστημονικής ή τεχνικής ομάδας.
 - δ) Σε περίπτωση που δεν υπάρχουν τα α), β) και γ), η **αναμενόμενη τιμή** (expected value) της (μετρούμενης) ποσότητας, δηλ. η μέση τιμή ενός καθορισμένου πληθυσμού μετρήσεων.
- **Ορθότητα** (accuracy): Η εγγύτητα (closeness) της συμφωνίας μεταξύ του αποτελέσματος δοκιμασίας και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Ο όρος αυτός, όταν εφαρμόζεται σε μια ομάδα (set) αποτελεσμάτων δοκιμασίας, περιλαμβάνει συνδυασμό τυχαίων συστατικών και ένα κοινό συστηματικό σφάλμα ή συστατικό συστηματικού σφάλματος.
- **Αληθότητα** (trueness): Η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ της μέσης τιμής που λαμβάνεται από μια μεγάλη σειρά αποτελεσμάτων δοκιμασίας και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Το συστηματικό σφάλμα αποτελεί συνήθως το μέτρο της ορθότητας. Η αληθότητα έχει αναφερθεί και ως “ορθότητα της μέσης τιμής” αλλά δεν συνιστάται η χρήση αυτού του όρου.
- **Συστηματικό σφάλμα** (bias): Η διαφορά μεταξύ της αναμενόμενης τιμής μιας σειράς αποτελεσμάτων δοκιμασίας και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Το συστηματικό σφάλμα αποτελεί ουσιαστικά το “ολικό συστηματικό σφάλμα” σε αντίθεση με το τυχαίο σφάλμα. Μπορεί να υπάρχουν ένα ή περισσότερα συστατικά που συνεισφέρουν στο συστηματικό

σφάλμα. Μία μεγαλύτερη συστηματική διαφορά από την αποδεκτή τιμή αναφοράς απεικονίζεται από μια αντίστοιχα μεγαλύτερη τιμή συστηματικού σφάλματος.

- **Συστηματικό σφάλμα (ή μεροληψία) εργαστηρίου** (laboratory bias): Η διαφορά μεταξύ της αναμενόμενης τιμής μιας σειράς αποτελεσμάτων δοκιμασίας ενός συγκεκριμένου εργαστηρίου και της αποδεκτής τιμής αναφοράς.
- **Συστηματικό σφάλμα μεθόδου μέτρησης** (bias of the measurement method): Η διαφορά μεταξύ της αναμενόμενης τιμής μιας σειράς αποτελεσμάτων δοκιμασίας από όλα τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν τη μέθοδο αυτή και της αποδεκτής τιμής αναφοράς.
- **Συστατικό συστηματικού σφάλματος εργαστηρίου** (laboratory component of bias): Η διαφορά μεταξύ του συστηματικού σφάλματος του εργαστηρίου και του συστηματικού σφάλματος μεθόδου μέτρησης.
- **Ακρίβεια** (precision): Η εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ των ανεξάρτητων αποτελεσμάτων δοκιμασίας που λαμβάνονται κάτω από αυστηρά ‘επιβαλλόμενες’ (stipulated) συνθήκες. Η ακρίβεια εξαρτάται από την κατανομή των τυχαίων λαθών και δεν σχετίζεται με την αληθή τιμή ή την καθορισμένη τιμή. Η ακρίβεια μπορεί να εκφραστεί και ως ανακρίβεια (imprecision) και υπολογίζεται ως η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων δοκιμασίας. Όσο μικρότερη είναι η ακρίβεια, τόσο μεγαλύτερη είναι τυπική απόκλιση. Ο όρος “ανεξάρτητα αποτελέσματα δοκιμασίας” υποδηλώνει αποτελέσματα που ελήφθησαν κατά τρόπο που δεν επηρεάζεται από ένα προηγούμενο αποτέλεσμα πάνω στο ίδιο το δοκιμαζόμενο αντικείμενο. Τα μέτρα της ακρίβειας εξαρτώνται κρίσιμα από τις επιβαλλόμενες συνθήκες.
- **Επαναληψιμότητα** (repeatability): Η ακρίβεια κάτω από συνθήκες ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.
- **Συνθήκες επαναληψιμότητας** (repeatability conditions): Συνθήκες κάτω από τις οποίες λαμβάνονται ανεξάρτητα αποτελέσματα δοκιμασιών με την ίδια μέθοδο, επάνω στα ίδια δείγματα, στο ίδιο εργαστήριο, από τον ίδιο αναλυτή, με τα ίδια σκεύη και μεταξύ σύντομων χρονικών διαστημάτων.
- **Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας** (repeatability standard deviation): Η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων δοκιμασίας που λαμβάνονται κάτω από συνθήκες επαναληψιμότητας. Αποτελεί μέτρο της διασποράς κάτω από συνθήκες επαναληψιμότητας. Αντίστοιχα θα μπορούσαν να ορισθούν οι όροι “διακύμανση επαναληψιμότητας” (repeatability variance) και “συντελεστής διακύμανσης επαναληψιμότητας” (repeatability

coefficient of variation), ως μέτρα της διασποράς κάτω από συνθήκες ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας.

- **Όριο επαναληψιμότητας** (repeatability limit): Τιμή ως προς την οποία η διαφορά δύο αποτελεσμάτων δοκιμασιών κάτω από συνθήκες επαναληψιμότητας αναμένεται να είναι ίση ή μικρότερη στο 95% των περιπτώσεων.
- **Αναπαραγωγιμότητα** (reproducibility): Ακρίβεια κάτω από συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.
- **Συνθήκες αναπαραγωγιμότητας** (reproducibility conditions): Συνθήκες κάτω από τις οποίες λαμβάνονται αποτελέσματα δοκιμασιών με την ίδια μέθοδο, επάνω στα ίδια δείγματα σε διαφορετικά εργαστήρια, από διαφορετικούς αναλυτές, που χρησιμοποιούν διαφορετικά σκεύη.
- **Τυπική απόκλιση αναπαραγωγιμότητας** (reproducibility standard deviation): Η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων δοκιμασίας που λαμβάνονται κάτω από συνθήκες αναπαραγωγιμότητας. Αποτελεί μέτρο της διασποράς κάτω από συνθήκες αναπαραγωγιμότητας. Αντίστοιχα θα μπορούσαν να ορισθούν οι όροι “διακύμανση αναπαραγωγιμότητας” (reproducibility variance) και “συντελεστής διακύμανσης αναπαραγωγιμότητας” (reproducibility coefficient of variation), ως μέτρα της διασποράς κάτω από συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.
- **Όριο αναπαραγωγιμότητας** (reproducibility limit): Τιμή προς την οποία η διαφορά δύο αποτελεσμάτων δοκιμασιών κάτω από συνθήκες αναπαραγωγιμότητας αναμένεται να είναι ίση ή μικρότερη στο 95% των περιπτώσεων.
- **Έκτροπη τιμή ή μέτρηση** (outlier): Μέλος ομάδας τιμών το οποίο είναι ασυνεπές ως προς τα άλλα μέλη της ομάδας. Στο ISO 5725-2 καθορίζονται οι στατιστικές δοκιμασίες και το επίπεδο σημαντικότητας που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό εκτρόπων τιμών σε πειράματα ορθότητας και ακρίβειας.

Κεφάλαιο 4°

Εισαγωγή στη στατιστική

4.1 Εισαγωγή - Στατιστικές δοκιμασίες σημαντικότητας

Τα πειραματικά δεδομένα μιας μέτρησης σπάνια συμφωνούν απόλυτα με τα αναμενόμενα, τα οποία βασίζονται σε κάποιο θεωρητικό μοντέλο. Επιπλέον, όταν συγκρίνονται δύο ομάδες μετρήσεων της ίδιας ποσότητας οι τιμές πολύ σπάνια βρίσκονται σε συμφωνία. Σε αυτές τις περιπτώσεις η αριθμητική διαφορά μεταξύ των τιμών μπορεί να αποδοθεί είτε σε συστηματικά σφάλματα, οπότε η διαφορά κρίνεται ως **σημαντική** (significant), ή σε τυχαία και μόνο σφάλματα. Ο έλεγχος της σημαντικότητας των διαφορών που προκύπτουν πραγματοποιείται με ειδικές στατιστικές δοκιμασίες γνωστές ως **δοκιμασίες σημαντικότητας** (significance-tests).

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η λέξη σημαντικός (significant) στη στατιστική δεν έχει την καθημερινή έννοια του “μεγάλου”, “υπέρμετρου”, “σοβαρού” κ.λπ., αλλά την έννοια της ιδιαίτερης σημασίας. Έτσι, π.χ., σημαντική διαφορά σε κάποια αναλυτικά αποτελέσματα δεν σημαίνει “μεγάλη διαφορά”, αλλά διαφορά που σε καθορισμένα πλαίσια πιθανοτήτων (επίπεδο εμπιστοσύνης), οφείλεται σε παρουσία συστηματικού σφάλματος, διαφορετικά δείγματα, διαφορετική επιδεξιότητα των αναλυτών ή άλλους λόγους, όχι όμως σε τυχαίες και μόνο διαφορές (Ευσταθίου Κ.Η.).

4.1.1 Δοκιμασίες Student ή δοκιμασίες t-test

Οι δοκιμασίες του Student βασίζονται στην ομώνυμη κατανομή (Student's t distribution) και απαιτούν μόνο εκτίμηση της τυπικής απόκλισης (s) (από μικρό πληθυσμιακό δείγμα) και όχι την πραγματική τιμή της τυπικής απόκλισης (σ). Υποτίθεται πάντοτε ότι οι πληθυσμοί είναι κανονικοί. Η ομάδα των δοκιμασιών αυτού του τύπου, γνωστές και ως t-tests είναι από τις πλέον απλές στατιστικές δοκιμασίες και συγχρόνως είναι οι πλέον συνηθισμένες στην αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων και μετρήσεων. Με τις δοκιμασίες αυτές παρέχονται στατιστικώς αντικειμενικές απαντήσεις σε ερωτήματα όπως:

- Η μέση τιμή μιας σειράς μετρήσεων διαφέρει σημαντικά από την αποδεκτή (ή πραγματική) τιμή του δείγματος.

- Οι μέσες τιμές δύο σειρών μετρήσεων διαφέρουν σημαντικά.

Σύγκριση πειραματικής μέσης τιμής ($\bar{x}$) και πραγματικής τιμής (μ). Η δοκιμασία της αξιοπιστίας μιας αναλυτικής μεθόδου ξεκινάει συνήθως με πολλαπλές μετρήσεις σε ένα δείγμα γνωστής περιεκτικότητας και σύγκριση της μέσης τιμής των αποτελεσμάτων με την πραγματική τιμή. Υπολογίζεται η πειραματική τιμή του στατιστικού στοιχείου t (t_{exp}), από την ακόλουθη σχέση 4.1:

$$t_{exp} = \frac{|\mu - \bar{x}| \sqrt{N}}{s} \quad (\text{Εξ. 4.1})$$

όπου μ είναι η πραγματική (αποδεκτή) μέση τιμή (ή η γνωστή τιμή σε συνθετικό δείγμα), $\bar{x}$ η πειραματική μέση τιμή που υπολογίστηκε από N μετρήσεις και s η τυπική απόκλιση των μετρήσεων που υπολογίστηκε με ν βαθμούς ελευθερίας (π.χ. $\nu = N-1$ εάν έχει υπολογιστεί από τις N μετρήσεις).

Εάν είναι $t_{exp} \geq t_{theor}$ τότε η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται στη δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης, δηλαδή η μέση τιμή θεωρείται σημαντικά διαφορετική από την πραγματική (ή αποδεκτή τιμή) και τούτο μπορεί να αποδοθεί σε ανεπάρκεια (συστηματικό σφάλμα) της εξεταζόμενης μεθόδου. Σε αντίθετη περίπτωση, οι όποιες διαφορές θεωρούνται απλώς τυχαίες.

Οι θεωρητικές τιμές του t (t_{theor}) σε διάφορες στάθμες εμπιστοσύνης και βαθμούς ελευθερίας μέτρησης της s δίνονται στον Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1 Θεωρητικές τιμές t (“δύο άκρων”) σε διάφορους βαθμούς ελευθερίας και στάθμες εμπιστοσύνης

Βαθμοί ελευθερίας	Στάθμη εμπιστοσύνης			
$\nu = N-1$	80%	90%	95%	99%
1	3,078	6,314	12,706	63,657
2	1,886	2,920	4,303	9,925
3	1,638	2,353	3,182	5,841
4	1,533	2,132	2,776	4,604

5	1,476	2,015	2,571	4,032
6	1,440	1,943	2,447	3,707
7	1,415	1,895	2,365	3,500
8	1,397	1,860	2,306	3,355
9	1,383	1,833	2,262	3,250
10	1,372	1,812	2,228	3,169
11	1,363	1,796	2,201	3,106
12	1,356	1,782	2,179	3,055
15	1,341	1,753	2,131	2,947
20	1,325	1,725	2,086	2,845
30	1,310	1,697	2,042	2,787
∞^*	1,282	1,645	1,960	2,576

(*) Όταν οι βαθμοί ελευθερίας καταστούν άπειροι, οι κρίσιμες τιμές t ουσιαστικά καθίστανται ίσες προς τις προβλεπόμενες από την κανονική κατανομή, η οποία είναι η οριακή κατανομή της κατανομής Student.

Σύγκριση δύο πειραματικών μέσων τιμών. Συχνά απαιτείται σύγκριση των τιμών δύο διαφορετικών μεθόδων (με ανάλυση του ίδιου δείγματος) ή σύγκριση δύο δειγμάτων (αναλυόμενων με την ίδια μέθοδο). Η σύγκριση γίνεται για να διαπιστωθεί αν υπάρχει σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ των δύο αναλυτικών μεθόδων ή αν τα εξεταζόμενα δείγματα είναι διαφορετικά ή όχι, αντίστοιχα. Γενικά, η στατιστική σύγκριση δύο μέσων τιμών αναφέρεται ως **μη κατά ζεύγη δοκιμασία t** (unpaired t -test).

Η δοκιμασία βασίζεται στον υπολογισμό της πειραματικής τιμής t_{exp} , που παρέχεται από την παρακάτω σχέση 4.2:

$$t_{\text{ext}} = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{s_{A,B} \sqrt{\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}}} \quad (\text{εξ. 4.2})$$

όπου $s_{A,B}$ είναι η **συνδυασμένη τυπική απόκλιση** (pooled ή combined standard deviation), που υπολογίζεται και από τις δύο ομάδες δεδομένων και παρέχεται από παρακάτω τη σχέση 4.3:

$$s_{A,B} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_A} (\bar{x}_A - x_{i,A})^2 + \sum_{i=1}^{N_B} (\bar{x}_B - x_{i,B})^2}{N_A + N_B - 2}} \quad (\text{εξ. 4.3})$$

όπου $\bar{x}_A$ η μέση τιμή της πρώτης σειράς μετρήσεων ($x_{1,A}, x_{2,A}, \dots, x_{N_A,A}$) και $\bar{x}_B$ η μέση τιμή της δεύτερης σειράς μετρήσεων ($x_{1,B}, x_{2,B}, \dots, x_{N_B,B}$).

Η t_{exp} συγκρίνεται με τη θεωρητική τιμή t_{theor} (για $N_A + N_B - 2$ βαθμούς ελευθερίας) (τιμές Πίνακα 3.3) και εάν $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{theor}}$ η μηδενική υπόθεση θεωρείται ότι ισχύει.

Βασική προϋπόθεση εφαρμογής των δοκιμασιών t , σε περιπτώσεις σύγκρισης πειραματικών μέσων τιμών είναι η ομοσκεδαστικότητα των μετρήσεων, δηλ. δεν πρέπει να υπάρχει σημαντική διαφορά στις τυπικές αποκλίσεις των ομάδων μετρήσεων. Ο στατιστικός έλεγχος πραγματοποιείται με τη δοκιμασία F (Snedecor's F test) “δύο άκρων” που περιγράφεται αμέσως μετά τις δοκιμασίες Student.

Δοκιμασία t για παρατηρήσεις κατά ζεύγη. Κατά τη σύγκριση της ισοδυναμίας δύο αναλυτικών μεθόδων συχνά αναλύεται μια σειρά δειγμάτων, που καλύπτουν μία σχετικώς ευρεία περιοχή τιμών, οπότε διατίθεται μια σειρά “ζευγών” αναλυτικών αποτελεσμάτων. Περιπτώσεις όπως αυτές που αναφέρονται στη συνέχεια ουσιαστικά υποχρεώνουν τον αναλυτή σε στατιστική δοκιμασία κατά ζεύγη:

- Η ποσότητα των διατιθέμενων δειγμάτων δεν επιτρέπει παρά μόνο ένα προσδιορισμό με κάθε μέθοδο.
- Οι μέθοδοι συγκρίνονται με ποικιλία δειγμάτων διαφόρων προελεύσεων και ευρείας περιοχής συγκεντρώσεων.
- Χρησιμοποιούνται αποτελέσματα που ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, κάτω από διαφορετικές εργαστηριακές συνθήκες.

Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με μία δοκιμασία t που είναι γνωστή και ως **κατά ζεύγη δοκιμασία t** (paired t -test). Η τιμή t_{exp} παρέχεται από την παρακάτω σχέση 4.4:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\sqrt{\frac{N(N-1)}{\sum_{i=1}^N (d_i - \bar{d})^2}}} \quad (\text{εξ. 4.4})$$

Όπου $\bar{x}_A, \bar{x}_B$ οι μέσες τιμές των δύο ομάδων μετρήσεων (με τη μέθοδο Α και Β), N ο αριθμός των ζευγών, d_i η θετική ή αρνητική διαφορά $x_{iA} - x_{iB}$ και $\bar{d}$ η μέση τιμή των διαφορών αυτών.

Η εξίσωση 4.5 γράφεται και ως:

$$t_{exp} = \frac{\overline{|d|} \sqrt{N}}{s_d} \quad (\text{εξ. 4.5})$$

όπου s_d είναι η τυπική απόκλιση της διαφοράς των τιμών.

Η τιμή t_{exp} συγκρίνεται, όπως και στις προηγούμενες δοκιμασίες t , με τη θεωρητική τιμή t_{theor} που αντιστοιχεί σε $v=N-1$ βαθμούς ελευθερίας (Ευσταθίου Κ.Η.).

4.1.2 Σύγκριση διακυμάνσεων (δοκιμασία F)

Η δοκιμασία F (F του Snedecor) χρησιμοποιείται για να εξαχθούν συμπεράσματα ως προς το αν οι διακυμάνσεις δύο πληθυσμών είναι ίδιες ή όχι. Το συμπέρασμα θα εξαχθεί με εξέταση των διακυμάνσεων πληθυσμιακών δειγμάτων. Στη χημική ανάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση της επαναληψιμότητας δύο αναλυτικών μεθόδων ή δύο διαφορετικών αναλυτών, όταν εργάζονται με την ίδια μέθοδο κ.λπ. Εάνδειχθεί ότι στη δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης υπάρχει σημαντική διαφορά, τότε οι επιμέρους μέσες τιμές δεν μπορούν να συγκριθούν με τη δοκιμασία t .

Το στατιστικό στοιχείο που χρησιμοποιείται και στις δύο περιπτώσεις είναι η πειραματική τιμή F_{exp} , που ορίζεται ως :

$$F_{exp} = \frac{s_A^2}{s_B^2} \quad (\text{εξ. 4.6})$$

όπου s_A και s_B είναι οι τυπικές αποκλίσεις των δύο ομάδων τιμών (πάντοτε πρέπει να είναι $s_A \geq s_B$, ώστε αντιστοίχως να είναι $F_{exp} \geq 1$). Οι θεωρητικές τιμές F (F_{theor}) παρέχονται από πίνακες (Πίνακας 4.2) για διάφορους βαθμούς ελευθερίας (V_A και V_B) προσδιορισμού των επιμέρους τυπικών αποκλίσεων και στάθμες εμπιστοσύνης. Όταν $F_{exp} > F_{theor}$ τότε στη δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης συμπεραίνουμε ότι οι διακυμάνσεις (ή οι ακρίβειες) των δύο μεθόδων διαφέρουν.

Είναι χαρακτηριστικό το ότι για άπειρους βαθμούς ελευθερίας και για τις δύο διακυμάνσεις, η θεωρητική τιμή F είναι ακριβώς 1 για οποιαδήποτε στάθμη εμπιστοσύνης. Τούτο θα έπρεπε να είναι αναμενόμενο, εφόσον οι άπειρες μετρήσεις παρέχουν τις πραγματικές αποκλίσεις (σ) και εφόσον αυτές ταυτίζονται ($\sigma_A = \sigma_B$) θα πρέπει να είναι ακριβώς $F=1$.

Πίνακας 4.2 Θεωρητικές τιμές F σε διάφορους βαθμούς ελευθερίας και στάθμες εμπιστοσύνης⁽¹⁾.

$v_A \backslash v_B$								Στάθμη εμπιστοσύνης δοκιμασίας:	
	2	3	4	5	6	10	$\infty^{(2)}$	ενός άκρου	δύο άκρων
2	9,00	9,16	9,24	9,29	9,33	9,39	9,49	90%	80%
	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,37	19,50	95%	90%
	39,00	39,17	39,25	39,30	39,33	39,40	39,50	97,5%	95%
	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,50	99%	98%
3	5,46	5,39	5,34	5,31	5,28	5,23	5,13	90%	80%
	9,55	9,28	9,12	9,01	8,98	8,78	8,53	95%	90%
	16,04	15,44	15,10	14,88	14,73	14,42	13,90	97,5%	95%
	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,23	26,12	99%	98%
4	4,32	4,19	4,11	4,05	4,01	3,92	3,76	90%	80%
	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	5,96	5,63	95%	90%
	10,65	9,98	9,60	9,36	9,20	8,84	8,26	97,5%	95%
	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,54	13,46	99%	98%
5	3,78	3,62	3,52	3,45	3,40	3,30	3,10	90%	80%
	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,74	4,36	95%	90%
	8,43	7,76	7,39	7,15	6,98	6,61	6,02	97,5%	95%
	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,05	9,02	99%	98%
6	3,46	3,29	3,18	3,11	3,05	2,94	2,72	90%	80%
	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,06	3,67	95%	90%

	7,26	6,60	6,23	5,99	5,82	5,46	4,85	97,5%	95%
	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	7,87	6,88	99%	98%
10	2,92	2,73	2,61	2,52	2,46	2,32	2,06	90%	80%
	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	2,97	2,54	95%	90%
	5,46	4,83	4,47	4,24	4,07	3,72	3,08	97,5%	95%
	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	4,85	3,91	99%	98%
15	2,70	2,49	2,36	2,27	2,21	2,06	1,76	90%	80%
	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,54	2,07	95%	90%
	4,77	4,15	3,80	3,58	3,41	3,06	2,40	97,5%	95%
	6,36	5,42	4,89	4,36	4,32	3,80	2,87	99%	98%
$\infty^{(2)}$	2,30	2,08	1,94	1,85	1,77	1,60	1,00	90%	80%
	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	1,83	1,00	95%	90%
	3,69	3,12	2,79	2,57	2,41	2,05	1,00	97,5%	95%
	4,61	3,78	3,32	3,02	2,80	2,32	1,00	99%	98%

(1) v_A, v_B : οι βαθμοί ελευθερίας διακύμανσης αριθμητή και παρανομαστή, αντίστοιχα.

(2) Οι τιμές αυτές θα χρησιμοποιηθούν για σύγκριση μιας πειραματικής τιμής τυπικής απόκλισης (s_A ή s_B) με την πραγματικές τιμές τυπικής απόκλισης (σ_B και σ_A , αντιστοίχως), εάν βέβαια οι τελευταίες είναι γνωστές (Ευσταθίου Κ.Η.).

4.2 Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) – Εισαγωγή

Πολύ συχνά παρουσιάζεται η ανάγκη σύγκρισης των μέσων τιμών αναλυτικών αποτελεσμάτων για ανεύρεση σημαντικής διαφοράς (σε κάποια δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης) μεταξύ ομάδων μετρήσεων. Τυπικές περιπτώσεις:

α) Σύγκριση μέσων τιμών μετρήσεων που ελήφθησαν από το ίδιο δείγμα αλλά με διαφορετικές αναλυτικές τεχνικές.

β) Σύγκριση μέσων τιμών μετρήσεων από διαφορετικά δείγματα με την ίδια αναλυτική τεχνική, προκειμένου να διαπιστωθεί ότι τα δείγματα διαφέρουν ή όχι ως προς την περιεκτικότητα του μετρούμενου συστατικού.

Υπενθυμίζεται ότι εάν οι ομάδες μετρήσεων είναι μόνο δύο (με n_1 και n_2 μετρήσεις και αντίστοιχες μέσες τιμές $\bar{x}_1$ και $\bar{x}_2$) και με την προϋπόθεση ότι οι διακυμάνσεις των μετρήσεων δεν διαφέρουν σημαντικά (τούτο διαπιστώνεται με την δοκιμασία F και είναι πολύ πιθανό να μην ισχύει ιδιαίτερα στην (α) περίπτωση), τότε εφαρμόζεται η αντίστοιχη t-δοκιμασία: Υπολογίζεται η **συνδυασμένη τυπική απόκλιση** s_{1-2} (pooled standard deviation) από τη σχέση:

$$s_{1-2}^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2} \quad (\text{Εξ.4.7})$$

στη συνέχεια υπολογίζεται η πειραματική τιμή t_{exp} από τη σχέση:

$$t_{exp} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{1-2} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (\text{Εξ.4.8})$$

η οποία συγκρίνεται κατά τα γνωστά με την θεωρητική τιμή t_{theor} για τη δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης και $n_1 + n_2 - 2$ βαθμούς ελευθερίας.

Η κατάσταση φαίνεται πιο πολύπλοκη εάν πρόκειται να συγκριθούν μεταξύ τους μέσες τιμές περισσότερων από δύο ομάδων μετρήσεων. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται μία πανίσχυρη γενική στατιστική δοκιμασία (στην πραγματικότητα οικογένεια δοκιμασιών) γνωστή ως **ανάλυση διακύμανσης** (Analysis Of Variance), γνωστότερη ως **ANOVA**. Γενικός σκοπός της ANOVA είναι η ανεύρεση και η στατιστική σύγκριση των επιμέρους πηγών διακύμανσης (ή αβεβαιότητας), που συνεισφέρουν στην ολική διακύμανση (ή αβεβαιότητα) αποτελέσματος το οποίο προκύπτει από συνδυασμό ομάδων μετρήσεων.

Η ANOVA θα απαντήσει στο ερώτημα: "Εάν δεχτούμε ότι όλες οι μετρήσεις προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό, τότε η διακύμανση που παρατηρείται μεταξύ των μέσων τιμών των επιμέρους ομάδων μετρήσεων είναι η στατιστικώς αναμενόμενη με βάση τις διακυμάνσεις των μετρήσεων σε κάθε ομάδα ή μήπως είναι μεγαλύτερη;" Είναι προφανές ότι εάν η διακύμανση των μέσων τιμών είναι μεγαλύτερη, τότε η παραδοχή ότι όλες οι μετρήσεις προέρχονται από τον ίδιο πληθυσμό δεν ισχύει και επομένως υπάρχει κάποιος παράγοντας που διαφοροποιεί τις μετρήσεις από ομάδα σε ομάδα.

Τυπικές περιπτώσεις εφαρμογής της ANOVA:

- Σύγκριση μέσων συγκεντρώσεων ενός συστατικού σε διάφορα δείγματα.
- Σύγκριση μέσων συγκεντρώσεων ενός συστατικού από ομάδες μετρήσεων που ελήφθησαν από διαφορετικούς αναλυτές ή από διάφορα εργαστήρια (αλλά με την ίδια τεχνική).
- Σύγκριση μέσων συγκεντρώσεων ενός συστατικού σε δείγμα που υπέστη διάφορους τρόπους συντήρησης ή προεπεξεργασίας πριν από το στάδιο της μέτρησης.

Σε όλες τις περιπτώσεις δεχόμαστε ότι οι πηγές που συνεισφέρουν στη διακύμανση των μετρούμενων μέσων τιμών είναι:

- Τα **τυχαία σφάλματα** κατά τη συνολική διαδικασία των μετρήσεων.
- Οι **ελεγχόμενοι** (controlled) ή **καθορισμένου αποτελέσματος** (fixed-effect) παράγοντες (factors).

Η πρώτη πηγή είναι η βασική αιτία που προκαλεί τις διαφοροποιήσεις των μετρήσεων στην ίδια ομάδα μετρήσεων και είναι πάντοτε παρούσα. Η δεύτερη πηγή είναι εκείνη που εξετάζεται εάν υπάρχει και επιδρά σημαντικά στις λαμβανόμενες μέσες τιμές, δηλαδή εάν διαφοροποιεί πληθυσμιακά το σύνολο των μετρήσεων. Στις προηγούμενες τυπικές περιπτώσεις εφαρμογής της ANOVA, οι ελεγχόμενοι παράγοντες μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι:

- Η διαφορετικότητα των δειγμάτων οφειλόμενη π.χ. σε δείγματα που ελήφθησαν από ανομοιογενές υλικό ή από διαφορετικές ημερομηνίες παραγωγής.
- Σε διαφορές της ικανότητας κάθε αναλυτή ή στο γενικό πρωτόκολλο ανάλυσης που ακολουθεί κάθε εργαστήριο.
- Ο τρόπος προεπεξεργασίας ή συντήρησης του δείγματος πριν από την ανάλυση.

Είναι προφανές ότι ο ελεγχόμενος παράγοντας δεν είναι κατ' ανάγκη αριθμήσιμος (π.χ. τυπικοί μη αριθμήσιμοι παράγοντες είναι: ο αναλυτής, το εργαστήριο, η χρησιμοποιούμενη μέθοδος, ενώ τυπικοί αριθμήσιμοι παράγοντες είναι: η θερμοκρασία φύλαξης ή ο χρόνος ζωής ενός αντιδραστήριου, το βάθος λήψης δείγματος).

Η ANOVA επιτρέπει τη διάκριση της διακύμανσης, που οφείλεται στον ελεγχόμενο παράγοντα, από εκείνη που προέρχεται από καθαρά τυχαία σφάλματα. Ακόμη επιτρέπει τη

διαπίστωση του εάν μια διαφοροποίηση στον κάθε ελεγχόμενο παράγοντα επιφέρει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των λαμβανόμενων μέσων τιμών.

Η τεχνική ANOVA μπορεί να επεκταθεί και σε περιπτώσεις που υπάρχει πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων αυτών, π.χ. διαφορετικός τρόπος συντήρησης δείγματος, σε συνδυασμό με τον τρόπο προεπεξεργασίας του δείγματος και τις συνθέσεις ενός ή περισσότερων από τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια. Η τεχνική που ακολουθείται στις περιπτώσεις αυτές ονομάζεται **παραγοντική ανάλυση** (factorial analysis).

Εάν κάθε φορά υπάρχει μόνο ένας ελεγχόμενος παράγοντας η τεχνική ονομάζεται **μονόδρομη** (one-way) ANOVA και αποτελεί την απλούστερη μορφή της δοκιμασίας (Ευσταθίου Κ.Η.).

4.2.1 Μονόδρομη ANOVA

Η απλούστερη περίπτωση εφαρμογής ANOVA αφορά σύγκριση m μέσων τιμών που προκύπτουν από m ομάδες μετρήσεων (ή δείγματα) κάθε μία των οποίων αποτελείται από n_j επιμέρους μετρήσεις (ο αριθμός μετρήσεων n_j μπορεί να είναι διαφορετικός σε κάθε ομάδα, δηλ. η 1η ομάδα (δείγμα) μπορεί να αποτελείται από 5 μετρήσεις, η 2η ομάδα από 3 μετρήσεις κλπ.) όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 4.3:

Πίνακας 4.3 Μονόδρομη ANOVA

	Ομάδα μέτρησης				
	1	2	...	...	m
Μέτρηση 1	x_{11}	x_{12}	...	...	x_{1m}
Μέτρηση 2	x_{12}	x_{22}	...	...	x_{2m}
...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...
...	...	...	...	...	...
Μέτρηση n_j	x_{nj1}	x_{nj2}	...	...	x_{njm}

Η μηδενική υπόθεση είναι:

$$H_o : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_m \quad (\text{Εξ. 4.9})$$

δηλαδή: τα αποτελέσματα όλων των ομάδων μετρήσεων συμπίπτουν και ο ελεγχόμενος παράγοντας που διαφοροποιεί τη μία ομάδα μετρήσεων από την άλλη, δεν διαφοροποιεί σημαντικά τις μέσες τιμές (οι όποιες παρατηρούμενες διαφορές οφείλονται καθαρά και μόνο στα τυχαία σφάλματα κατά τις μετρήσεις).

Η εναλλακτική υπόθεση είναι:

$$H_a : \mu_1 \neq \mu_2 = \mu_3 = \dots \mu_m$$

$$\mu_1 = \mu_2 \neq \mu_3 \neq \dots \mu_m \quad \text{ή (κ.λ.π.)}$$

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \dots \mu_m \quad (\text{Εξ. 4.10})$$

δηλαδή υπάρχει τουλάχιστον μία διαφοροποίηση στις μέσες τιμές, η οποία οφείλεται σε επίδραση του ελεγχόμενου παράγοντα.

Η σύγκριση των μέσων τιμών ανά ζεύγη με δοκιμασία t είναι εφικτή αλλά επίπονη (απαιτούνται συνολικά $(m-1) \times m / 2$ δοκιμασίες t) και επιπλέον δεν θα παρείχε την πληρότητα των απαντήσεων που παρέχει η μονόδρομη ANOVA. Η τελευταία πραγματοποιείται "μια και έξω" στο σύνολο των ως άνω μετρήσεων και διαπιστώνει άμεσα την αποδοχή ή όχι της μηδενικής υπόθεσης (και όχι μόνο).

Δοθέντων των αποτελεσμάτων υπό την μορφή του ως άνω πίνακα $m \times n$ (όχι κατ' ανάγκη πλήρους) υπολογίζονται οι ακόλουθες ποσότητες που ομαδοποιούνται ως εξής:

- Παράμετροι που αφορούν κάθε ομάδα μετρήσεων
- Παράμετροι που αφορούν το σύνολο των μετρήσεων και είναι οι ακόλουθες:
-

A) ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΟΜΑΔΑ n_j ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ($1 \leq j \leq m$)

1) Το **άθροισμα** (sum) των μετρήσεων:

$$A_j = \sum_{i=1}^{n_j} x_i \quad (\text{Εξ. 4.11})$$

2) Η **μέση τιμή της ομάδας** (group average):

$$\bar{x}_j = \frac{A_j}{n_j} \quad (\text{Εξ. 4.12})$$

3) Η διακύμανση της ομάδας (group variance):

$$v_j = s_j^2 = \sum_{i=1}^{n_j} \frac{(\bar{x}_j - x_i)^2}{n_j - 1} \quad (\text{Εξ. 4.13})$$

4) Το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων (sum of squared residuals):

$$\sum_{i=1}^{n_j} r_i^2 = \sum_{i=1}^{n_j} (\bar{x}_j - x_i)^2 = v_j(n_j - 1) \quad (\text{Εξ. 4.14})$$

Β) ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ

1) Ο συνολικός αριθμός μετρήσεων:

$$N = n_1 + n_2 + \dots + n_m \quad (\text{Εξ. 4.15})$$

2) Το μεγάλο άθροισμα (grand sum):

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_m \quad (\text{Εξ. 4.16})$$

3) Η μεγάλη μέση τιμή (grand average):

$$\bar{x} = \frac{A}{N} \quad (\text{Εξ. 4.17})$$

4) Το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων (sum of squared residuals):

$$S_1 = \sum_{i=1}^{n_{j1}} r_1^2 + \sum_{i=1}^{n_{j2}} r_2^2 + \dots + \sum_{i=1}^{n_{jm}} r_m^2 = \sum_{k=1}^m (\sum_{i=1}^{n_k} r_i^2) \quad (\text{Εξ. 4.18})$$

5) Το άθροισμα των ζυγισμένων τετραγώνων (sum of weighted squares):

$$S_2 = n_1 (\bar{x} - \bar{x}_1)^2 + n_2 (\bar{x} - \bar{x}_2)^2 + \dots + n_m (\bar{x} - \bar{x}_m)^2 = \sum_{k=1}^m n_k (\bar{x} - \bar{x}_k)^2 \quad (\text{Εξ. 4.19})$$

6) Το ολικό άθροισμα τετραγώνων (total sum of squares)

$$S_r = S_1 + S_2 \quad (\text{Εξ. 4.20})$$

Το ολικό άθροισμα των τετραγώνων συμπίπτει και θα μπορούσε να υπολογιστεί με άθροιση των τετραγώνων των διαφορών όλων τιμών x (N τιμές) από την μεγάλη μέση τιμή ($\bar{x}$), τούτο όμως δεν είναι απαραίτητο, αφού ήδη είναι στη διάθεσή μας (για τις ανάγκες της δοκιμασίας) οι μερικές τιμές S_1 και S_2 .

Γ) ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΟΒΑ

Συμπληρώνεται ο ακόλουθος πίνακας ANOVA :

Πίνακας 4.5 Βασικές υπολογιζόμενες παράμετροι μονόδρομης ANOVA

Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Διακύμανση	Πηγή διακύμανσης - Ονοματολογία
S_1	$f_1 = N - m$	$V_1 = \frac{S_1}{F_1}$	Ενδοδειγματική διακύμανση (within-sample variance)
S_2	$f_2 = m - 1$	$V_2 = \frac{S_2}{F_2}$	Διαδειγματική διακύμανση (between-sample variance)
$S_r = S_1 + S_2$	$f_r = N - 1$	$V_r = \frac{S_r}{F_r}$	Ολική διακύμανση (total variance)

Στη συνέχεια εξετάζεται η ισχύς της μηδενικής υπόθεσης με αναζήτηση στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ της **ενδοδειγματικής** (within sample) διακύμανσης V_1 και της **διαδειγματικής** (between samples) διακύμανσης V_2 .

Η δοκιμασία γίνεται κατά τα γνωστά (δοκιμασία Snedecor ή δοκιμασία F) σε μία στάθμη εμπιστοσύνης (συνήθως 95%) (ή -ισοδύναμα- με πιθανότητα P σφάλματος 1ου είδους 0,05). Η πειραματική τιμή F (λόγος V_2/V_1) συγκρίνεται με τη θεωρητική τιμή F με δοκιμασία “ενός άκρου” (one tailed F-test). Η δοκιμασία F “ενός άκρου” (και όχι της συνήθους δοκιμής “δύο άκρων”) επιβάλλεται, επειδή εξετάζεται το εάν η διαδειγματική διακύμανση είναι σημαντικά μεγαλύτερη (και όχι απλώς διαφορετική) από την ενδοδειγματική διακύμανση ή εάν οι δύο διακυμάνσεις είναι ίσες (και οι όποιες διαφορές μπορούν να θεωρηθούν μόνο τυχαίες) (Ευσταθίου Κ.Η.).

Κεφάλαιο 5^ο

Πειραματικός σχεδιασμός

5.1 Βελτιστοποίηση μεθόδων

Με τον όρο *βελτιστοποίηση της μεθόδου (optimization)*, ορίζεται η διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών και επιπέδων των πειραματικών παραγόντων στην απόδοση μιας διαδικασίας, (ενός συστήματος ή ενός προϊόντος), με σκοπό να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερη απόκριση, ποιότητα και λειτουργία (Κοσμά Χ. 2013). Σε μια τέτοια διαδικασία, η βέλτιστη απόκριση ή τουλάχιστον η απόκριση κοντά στη βέλτιστη περιοχή, επιθυμείται να επιτυγχάνεται αρχικά με το μικρότερο δυνατό αριθμό πειραματικών σταδίων και με κύριους στόχους: (α) την εύρεση όλων των παραγόντων που επηρεάζουν την απόκριση του συστήματος, (β) τον προσδιορισμό και την κατηγοριοποίηση των παραγόντων που έχουν κύρια (main effect) και μερική (little effect) επίδραση στην απόκριση και (γ) το συνυπολογισμό των πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των παραγόντων στον προσδιορισμό της βέλτιστης απόκρισης (Castillo E.D. 2007)

Ο συνήθης τρόπος προσδιορισμού των βέλτιστων συνθηκών μιας διεργασίας, όπως π.χ. είναι η φωτοκατάλυση, περιλαμβάνει τη μέθοδο γνωστή και ως «μεταβολή της μιας μεταβλητής τη φορά» (Changing One Single variable or factor at a Time, COST ή One Factor/Variable At a Time, OFAT/OVAT). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, πραγματοποιείται διερεύνηση σε διάφορα επίπεδα της βέλτιστης τιμής ενός παράγοντα τη φορά, ενώ παραμένουν σταθεροί όλοι οι υπόλοιποι (Montgomery D.C. 2005). Μερικά από τα μειονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι ότι αφενός απαιτούν μεγάλο αριθμό πειραμάτων συνεπώς περισσότερο χρόνο και μεγαλύτερη κατανάλωση αντιδραστηρίων, χωρίς να διασφαλίζουν ότι η τελική επιλογή είναι και η βέλτιστη και αφετέρου ότι δεν περιλαμβάνουν τις διαδραστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων που μελετώνται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην αποδίδουν τις ολοκληρωμένες και πραγματικές αλληλεπιδράσεις μιας παραμέτρου στην συνολική απόκριση του συστήματος (Antony J. 2003). Ο τρόπος αυτός αποτελούσε και τη μόνη επιστημονικά αποδεκτή μέθοδο βελτιστοποίησης, ως κλασσική μέθοδο σχεδιασμού πειραμάτων, η οποία συνεχίζει ακόμη και σήμερα να εφαρμόζεται σε πολλούς τομείς.

Μετέπειτα, για την αντιμετώπιση των περιορισμών που προέρχονταν από τη χρήση των παραδοσιακών μεθόδων σχεδιασμού, αναπτύχθηκαν οι συστηματικές μέθοδοι

βελτιστοποίησης (όπως ο στατιστικός πειραματικός σχεδιασμός). Βασιζόμενες στη στατιστική και τα μαθηματικά, αποτελούν ένα εργαλείο για την εύρεση της βέλτιστης τιμής μιας συγκεκριμένης απόκρισης (ή αποκρίσεων) ή του καλύτερου δυνατού συμβιβασμού μεταξύ των πλησιέστερα στις βέλτιστες αποδεκτές τιμές συνδυασμών, των εξεταζόμενων παραμέτρων. Σε αυτές τις μεθόδους, τα μαθηματικά της στατιστικής και των πιθανοτήτων καθώς επίσης και η λογική του πειραματισμού, συνδυάζονται για να εξάγουν μια εν γένει αποδεκτή σχέση αιτίας αποτελέσματος. Η πορεία για την εύρεση της βέλτιστης τιμής, περιλαμβάνει την ταυτόχρονη εναλλαγή όλων των επιλεγμένων, προς βελτιστοποίηση παραγόντων, σύμφωνα με ένα προκαθορισμένο πειραματικό σχέδιο (Antony J. 2003, Montgomery D.C. 2009). Τα κύρια βήματα που πρέπει να καθοριστούν προκειμένου να εφαρμοστεί μια συστηματική μέθοδο βελτιστοποίησης είναι τα εξής (Montgomery D.C. 2005):

- I. Καθορισμός του προβλήματος
- II. Επιλογή των παραγόντων βελτιστοποίησης
- III. Επιλογή των επιπέδων εξέτασης
- IV. Επιλογή των αποκρίσεων
- V. Επιλογή του κατάλληλου τύπου πειραματικού σχεδιασμού
- VI. Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του σχεδιασμού

5.2 Πειραματικός σχεδιασμός (Experimental Design ή Design of Experiments - DOE)

5.2.1 Γενικά

Με τον όρο «πειραματικός σχεδιασμός», ορίζεται η συστηματική μέθοδος βελτιστοποίησης κατά την οποία συνδέονται ορθολογιστικά επιλεγμένοι αριθμοί πειραμάτων με στόχο την απόκτηση πολύτιμων πληροφοριών (Montgomery D.C. 2005). Στόχος είναι να εντοπιστούν οι σημαντικές επιδράσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εξεταζόμενων παραγόντων. Συγκεκριμένα, προσδιορίζονται οι παράγοντες (ποσοτικοί ή ποιοτικοί), τα επίπεδά τους (με βάση προϋπάρχουσες μελέτες), καθώς επίσης μελετάται ο κατάλληλος συνδυασμός των επιπέδων και ο αριθμός των πειραμάτων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι οι μελέτες που κάνουν χρήση πειραματικού σχεδιασμού υπερτερούν έναντι των συμβατικών μεθόδων καθώς είναι πιο αποτελεσματικές (effective), πιο αποδοτικές (efficient) και πιο οικονομικές (economical) από τις παραδοσιακές μεθόδους (Montgomery D.C. 2005).

Κάθε πειραματικός σχεδιασμός διέπεται από τρεις βασικές αρχές (Antony J. 2003, Montgomery D.C. 2005):

1. Επανάληψη (Replication)

Χρησιμοποιείται σε ένα συγκεκριμένο πειραματικό συνδυασμό:

- Για να υπολογιστεί η τυχαία διακύμανση των πειραματικών αποτελεσμάτων (επαναλήψιμο αποτέλεσμα).
- Για την αποφυγή απρόβλεπτων σφαλμάτων στο τελικό αποτέλεσμα.
- Για την εκτίμηση του πειραματικού σφάλματος.

2. Λήψη πλήρως τυχαιοποιημένων δεδομένων (Randomization)

Πρόκειται για τον τυχαίο προσδιορισμό πειραματικών συνδυασμών των επιπέδων των παραγόντων πριν την έναρξη του πειράματος, έτσι ώστε να αποφευχθούν τα συστηματικά σφάλματα και να επιτευχθεί η έγκυρη ερμηνεία της απόκρισης, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για στατιστικές δοκιμές σημαντικότητας.

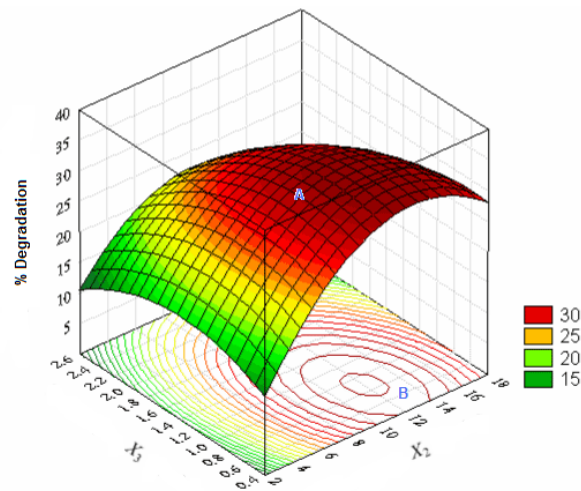
3. Πειράματα σε μπλοκ (Blocking)

Με την ομαδοποίηση του πειραματικού υλικού, που είναι περισσότερο ομοιογενείς από το σύνολο, αυξάνεται η ακρίβεια των πειραμάτων. Ομάδες με ομοειδή δεδομένα (blocks), δημιουργούνται όταν οι επαναλήψεις των μετρήσεων δεν μπορούν να διεξαχθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες (όπως διαφορετικές ημέρες) ή το υλικό δεν επαρκεί για όλες τις επαναλήψεις. Έτσι αναπτύσσεται το πλήρες τυχαιοποιημένο σχέδιο σε μπλοκ (randomized block design) (Hanrahan G. *et al.* 2005).

5.2.2 Γραφική μέθοδος - Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM)

Η μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM) βασίζεται στην εφαρμογή της πολυωνυμικής εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα. Είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος πειραματικού σχεδιασμού, η οποία ενσωματώνει μαθηματικές και στατιστικές τεχνικές. Η επιφάνεια απόκρισης (response surface) αποτελεί την τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση των αποκρίσεων συναρτήσει δύο ανεξάρτητων παραγόντων (Antony J. 2003) και μπορεί επίσης να περιγραφεί με τη χρήση ισομετρικών διαγραμμάτων. Ως ισομετρικό διάγραμμα (contour plot) ονομάζεται η γεωμετρική απεικόνιση μιας απόκρισης, που προέρχεται από τη σχεδίαση της μεταβολής δύο μόνο παραγόντων, ενώ το μέγεθος της απόκρισης και οι μεταβολές των υπόλοιπων παραγόντων παραμένουν σταθερές. Τα ισομετρικά διαγράμματα αποτελούν τομές

δυο διαστάσεων των αντιστοίχων επιφανειών απόκρισης. Στο σχήμα 5.1 δίνεται ένα τυπικό διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης και ισομετρικών καμπυλών.



Σχήμα 5.1 Α) Επιφάνεια απόκρισης και Β) ισομετρικές καμπύλες

Η μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης περιλαμβάνει τους εξής όρους-κλειδιά (Bezerra M.A. *et al.* 2008):

- *Πειραματική περιοχή (experimental domain)*, είναι το εύρος των τιμών που θα διερευνηθούν και προσδιορίζεται από τα μέγιστα και τα ελάχιστα όρια των πειραματικών μεταβλητών που θα μελετηθούν.
- *Πειραματικός σχεδιασμός (experimental design)*, είναι ένα συγκεκριμένο σύνολο πειραμάτων που απεικονίζεται σε έναν πίνακα και αποτελείται από συνδυασμό διαφορετικών επιπέδων των μεταβλητών που μελετώνται.
- *Παράγοντες ή ανεξάρτητες μεταβλητές (factors or independent variables)*, είναι οι πειραματικές μεταβλητές-συνθήκες που μπορούν να μεταβάλλονται χωρίς να επηρεάζει η μία την άλλη. Τέτοιες μεταβλητές μπορεί να είναι το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, ο χρόνος ακτινοβολήσης κ.α.
- *Επίπεδα των μεταβλητών (levels of variables)*, είναι οι διαφορετικές τιμές των μεταβλητών κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Για παράδειγμα, η τιμή του pH, μπορεί να μελετηθεί σε πέντε επίπεδα: 4, 5, 6, 7, και 8 κατά τη βελτιστοποίηση μιας φασματοφωτομετρικής μεθόδου.
- *Αποκρίσεις ή εξαρτημένες μεταβλητές (responses or dependent variables)*, είναι οι μετρούμενες τιμές που προκύπτουν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων (όπως το αναλυτικό σήμα, οι ανακτήσεις μιας ουσίας κ.α.).

- *Residual (υπόλοιπο)*, είναι η διαφορά μεταξύ της προβλεπόμενης και της πειραματικής τιμής για καθορισμένο σύνολο συνθηκών. Μικρές τιμές υπολοίπων υποδεικνύουν ένα καλό μαθηματικό μοντέλο που παρουσιάζει πολύ καλή προσαρμοστικότητα (fitting) των πειραματικών δεδομένων.

Τα συνήθη βήματα που ακολουθούνται κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφανειακής απόκρισης ως τεχνική βελτιστοποίησης είναι τα εξής (Bezerra M.A. *et al.* 2008):

- Επιλογή των ανεξάρτητων μεταβλητών, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά το σύστημα (screening studies), καθώς και την πειραματική περιοχή, με βάση το σκοπό της έρευνας και την εμπειρία του ερευνητή.
- Επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού, καθορισμός και πραγματοποίηση των πειραμάτων.
- Μαθηματική-στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων που προκύπτουν από τη χρήση της πολυωνυμικής εξίσωσης.
- Εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου.
- Εκτίμηση της αναγκαιότητας ή/και της δυνατότητας πραγματοποίησης αντικατάστασης στην κατεύθυνση της βέλτιστης περιοχής.
- Ορισμός των βέλτιστων τιμών για κάθε μελετώμενη μεταβλητή.

5.2.2.1 Επιλογή των παραμέτρων

Πληθώρα παραμέτρων, επηρεάζει την απόκριση του κάθε συστήματος που μελετάται, με αποτέλεσμα να είναι πρακτικά αδύνατο να ελεγχθεί η μικρή επίδραση της κάθε μιας. Γι' αυτό και κρίνεται αναγκαία η επιλογή των παραμέτρων με τη μεγαλύτερη επίδραση. Οι σημαντικότεροι παράμετροι, προσδιορίζονται έπειτα από πειράματα διαλογής-αξιολόγησης (screening experiments). Οι πλήρεις ή οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί (full or fractional two level factorial design) δύο επιπέδων χρησιμοποιούνται κυρίως σε αυτές τις περιπτώσεις καθώς θεωρούνται αποτελεσματικοί και οικονομικοί (Bezerra M.A. *et al.* 2008).

5.2.2.2 Επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού

Το απλούστερο μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης, βασίζεται στην εξίσωση πρώτου βαθμού. Η εφαρμογή του προϋποθέτει την

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (\text{εξ. 5.1})$$

Όπου, y είναι η απόκριση, k ο αριθμός των παραγόντων, β_0 μια σταθερά, β_i οι συντελεστές των γραμμικών παραγόντων x_i , x_i οι ανεξάρτητες μεταβλητές και ε το σφάλμα των πειραμάτων. Το μοντέλο πρώτου βαθμού συμπεριλαμβάνει μόνο τις κύριες επιδράσεις των μεταβλητών. Σε περίπτωση που κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών και της εκτίμησης της καμπυλότητας, η παραπάνω εξίσωση παίρνει τη μορφή:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 < i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{εξ. 5.2})$$

Όπου, β_{ij} οι συντελεστές των αλληλεπιδράσεων των μεταβλητών.

Για να προσδιοριστεί το κρίσιμο σημείο (critical point) (μέγιστο, ελάχιστο, σαγματικό), είναι απαραίτητο να περιλαμβάνονται δευτεροβάθμιοι όροι σύμφωνα με την εξίσωση:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 < i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{εξ. 5.3})$$

Όπου, β_{ij} οι συντελεστές των μεταβλητών υψωμένων στο τετράγωνο (Bezerra M.A. *et al.* 2008), (Stalikas C. *et al.* 2009).

5.2.2.3 Κωδικοποίηση των επιπέδων των μεταβλητών

Η κωδικοποίηση των παραμέτρων (η μετατροπή των πραγματικών τιμών σε αδιάστατες), γίνεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$x_i = \left(\frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \right) \beta_d \quad (\text{εξ. 5.4})$$

Όπου, x_i η κωδικοποιημένη τιμή, Z_i η πραγματική τιμή, ΔZ_i η διαφορά μεταξύ πραγματικής τιμής στο κεντρικό σημείο (Z^0) και πραγματικής τιμής στο ελάχιστο ή στο μέγιστο επίπεδο μιας μεταβλητής και β_d είναι η μέγιστη κωδικοποιημένη οριακή τιμή στον πίνακα για κάθε μεταβλητή (Bezerra M.A. *et al.* 2008).

5.2.2.4 Μαθηματική - στατιστική επεξεργασία δεδομένων

Προκειμένου να περιγραφεί η συμπεριφορά της απόκρισης με βάση τα επίπεδα των μεταβλητών που μελετήθηκαν, είναι απαραίτητη η προσαρμογή μιας μαθηματικής εξίσωσης. Θα πρέπει δηλαδή, να γίνει εκτίμηση των β συντελεστών των εξισώσεων 5.1-5.3, οι οποίες αναπαρίσταται ως εξής:

$$y_m X_i = X_{mXn} b_{nX1} + e_{mX1} \quad (\text{εξ. 5.5})$$

Όπου, y η διανυσματική απόκριση, X ο πίνακας του πειραματικού σχεδιασμού, b το διάνυσμα των παραμέτρων της εξίσωσης, e το σφάλμα και m και n ο αριθμός των γραμμών και των στηλών του πίνακα, αντίστοιχα (Bezerra M.A. *et al.* 2008).

5.2.2.5 Εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου

Η εφαρμογή της Ανάλυσης Διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA) η οποία και αναλύθηκε εκτενώς στο κεφάλαιο 4.2 είναι ένας αξιόπιστος τρόπος για την εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου. Ελέγχει την επάρκεια του μοντέλου, μέσω της έλλειψης προσαρμογής (Lack of Fit, LOF) και της σημαντικότητας των μεταβλητών. Κεντρική της ιδέα θεωρείται η σύγκριση της διακύμανσης από την επεξεργασία (εναλλαγή στο συνδυασμό των επιπέδων των μεταβλητών), με τη διακύμανση του τυχαίου σφάλματος που προέρχεται από τις μετρήσεις των αποκρίσεων. Μέσω αυτής της σύγκρισης, εκτιμάται η σημαντικότητα της παλινδρόμησης του μοντέλου, που χρησιμοποιείται για τις προβλεπόμενες αποκρίσεις, λαμβάνοντας υπόψη και τις τιμές της πειραματικής διακύμανσης (Bezerra M.A. *et al.* 2008, Stalikas C. *et al.* 2009).

Ο έλεγχος της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit test) χρησιμοποιείται επίσης για την εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου. Όταν το μαθηματικό μοντέλο προσαρμόζεται στα πειραματικά δεδομένα, τότε ο μέσος όρος των τετραγώνων της έλλειψης προσαρμογής (MS_{lof}) πρέπει να εκφράζει μόνο τα τυχαία σφάλματα. Επίσης, ο μέσος όρος των τετραγώνων του καθαρού σφάλματος (MS_{pe}) αποτελεί εκτίμηση των τυχαίων σφαλμάτων και θεωρείται ότι οι δύο αυτές τιμές δε διαφέρουν στατιστικά. Η στατιστική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο τιμών εκτιμάται με τη χρήση της κατανομής F .

$$\frac{MS_{lof}}{MS_{pe}} \approx F_{V_{lof}, V_{pe}} \quad (\text{εξ. 5.6})$$

Όπου, V_{lof} και V_{pe} , οι βαθμοί ελευθερίας της έλλειψης προσαρμογής και του καθαρού σφάλματος αντίστοιχα. Όταν η τιμή του παραπάνω πηλίκου είναι μεγαλύτερη από την τιμή F , τότε υπάρχει έλλειψη προσαρμογής και το μοντέλο πρέπει να βελτιωθεί. Αντίθετα, για τιμή μικρότερη από την τιμή F , τότε η προσαρμογή του μοντέλου είναι ικανοποιητική. Για την εφαρμογή του ελέγχου έλλειψης προσαρμογής απαιτείται πειραματικός σχεδιασμός με επαναλήψεις του κεντρικού σημείου. Εν ολίγοις, όταν παρουσιάζεται σημαντική παλινδρόμηση (significant regression) ή μη σημαντική έλλειψη προσαρμογής (non-significant lack of fit), τότε το μοντέλο είναι προσαρμοσμένο στα πειραματικά δεδομένα (Bezerra M.A. *et al.* 2008).

Επιπροσθέτως, η συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των προβλεπόμενων αποκρίσεων μετριέται ποιοτικά με το τετράγωνο του συντελεστή προσδιορισμού (R^2). Όταν η γραμμή παλινδρόμησης αντιστοιχεί τέλεια με τα δεδομένα τότε η τιμή του R^2 ισούται με τη μονάδα. Ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού (adjusted R^2) αποτελεί τροποποίηση του R^2 και είναι πάντα $\leq R^2$. Στην περίπτωση που στο μοντέλο έχουν συμπεριληφθεί μη σημαντικές παράμετροι, οι τιμές των δύο συντελεστών διαφέρουν σημαντικά.

Τέλος, η επεξεργασία των γραφικών παραστάσεων των υπολοίπων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την καταλληλότητα του μοντέλου. Έτσι, όταν το μαθηματικό μοντέλο είναι καλά προσαρμοσμένο τότε η γραφική παράσταση των υπολοίπων παρουσιάζει συμπεριφορά κανονικής κατανομής. Όταν το μοντέλο παρουσιάζει μεγάλα υπόλοιπα, τότε προκύπτουν προβλήματα στην εξαγωγή συμπερασμάτων για τα δεδομένα της πειραματικής περιοχής (Bezerra M.A. *et al.* 2008), (Stalikas C. *et al.* 2009).

5.2.2.6 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών

Η βελτιστοποίηση μίας ή περισσότερων αποκρίσεων μπορεί να επιτευχθεί είτε με τη χρήση μαθηματικών μεθόδων (συνάρτηση επιθυμίας, ελαχιστοποίηση της Ευκλείδειας απόστασης, γενετικοί αλγόριθμοι κ.ά.), είτε με τη χρήση γραφικών μεθόδων (επιφάνειες απόκρισης, ισομετρικά διαγράμματα) (Montgomery D.C. 2005).

Στην περίπτωση της ανάλυσης επιφανειών απόκρισης (response surface analysis) ή ανάλυσης ισομετρικών καμπύλων (contour curves analysis), τα πειραματικά σημεία είναι κατανομημένα έτσι ώστε να καλύπτουν την ευρύτερη δυνατή περιοχή μεταβολών των ανεξάρτητων παραγόντων, προκειμένου: α) να δώσουν πληροφορίες σχετικά με το βέλτιστο προσαρμογής της επιφάνειας και β) να καθορίσουν τα επίπεδα των μελετώμενων παραγόντων που δίνουν το βέλτιστο εύρος απόκρισης. Στην περίπτωση αδυναμίας εφαρμογής των γραφικών μεθόδων, χρησιμοποιούνται οι μαθηματικές μέθοδοι βελτιστοποίησης (πχ. στις περιπτώσεις ταυτόχρονης βελτιστοποίησης πολλαπλών αποκρίσεων). Η συνάρτηση επιθυμίας κατά Derringer (desirability function, D), είναι μία από τις πιο ευρέως διαδεδομένες μαθηματικές τεχνικές βελτιστοποίησης. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, ορίζεται μια μερική συνάρτηση επιθυμίας (partial desirability function) σε κάθε απόκριση, βάσει της οποίας υπολογίζεται η τιμή της ολικής συνάρτησης επιθυμίας. Όταν η τιμή της ολικής συνάρτησης επιθυμίας είναι ίση με τη μονάδα, τότε οι τιμές των αποκρίσεων είναι οι βέλτιστες, ενώ αν οι

αποκρίσεις λαμβάνουν τιμές εκτός στόχου η συνάρτηση γίνεται μηδέν. Η ελαχιστοποίηση της Ευκλείδειας απόστασης μεταξύ των πειραματικά μετρούμενων και των θεωρητικά υπολογισμένων τιμών των αποκρίσεων, αποτελεί μια εναλλακτική μαθηματική μέθοδος βελτιστοποίησης (Hanrahan G. *et al.* 2005).

5.3 Είδη πειραματικού σχεδιασμού

Η επιλογή ενός πειραματικού σχεδιασμού βασίζεται στους στόχους που επιδιώκονται και τον αριθμό των υπό έλεγχο παραγόντων. Διακρίνονται τρεις βασικές κατηγορίες πειραματικών σχεδιασμών:

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

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

Μερικοί από τους κυριότερους πειραματικούς σχεδιασμούς είναι (Hanrahan G. *et al.* 2005):

- το πλήρως παραγοντικό σχέδιο (full factorial design)
- το κλασματικό παραγοντικό σχέδιο (fractional factorial design)
- το σχέδιο Plackett – Burman
- τα Λατινικά και Έλληνο – Λατινικά τετράγωνα (Latin – Latin/Grec squares)
- τα σχέδια επιφανειών απόκρισης (response surface design)
 - i. Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (central composite design)
 - ii. Box – Behnken design)
- τα ειδικά σχέδια
 - i. D – optimal design
 - ii. μικτά σχέδια
- τα πλήρως ένθετα ή ιεραρχικά σχέδια (fully nested / hierarchical designs)

5.3.1 Πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (Full Factorial Design)

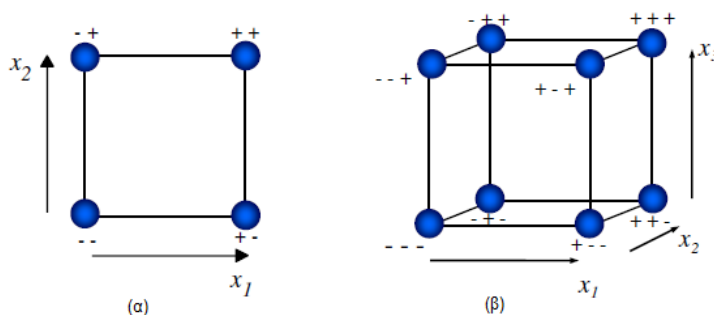
Όταν από ένα αριθμό πειραμάτων, όλα τα επίπεδα ενός παράγοντα συνδυάζονται με όλα τα επίπεδα των άλλων παραγόντων, εφαρμόζεται πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός. Ένα τέτοιο σχέδιο περιγράφεται ως A^k , όπου A είναι ο αριθμός των επιπέδων των παραγόντων και k ο

αριθμός των παραγόντων που μελετώνται σε αριθμό πειραμάτων ίσο με $N=A^k$. Στο απλούστερο πειραματικό σχέδιο όπου υπάρχουν δύο παράγοντες που μεταβάλλονται σε δύο επίπεδα, διεξάγονται $2^2=4$ πειράματα. Για το σχεδιασμό αυτό (σχεδιασμός δύο επιπέδων-two level full factorial design), αλλά και για οποιοδήποτε άλλο το χαμηλό επίπεδο συμβολίζεται με το πρόσημο “-” ή “-1”, ενώ το υψηλό με το πρόσημο “+” ή “+1”.

Συνεπώς, οι πειραματικές δοκιμές έχουν ως εξής:

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

Το χαμηλό και το υψηλό επίπεδο των παραγόντων αποτελούν το κατώτατο και το ανώτατο όριο αντίστοιχα της περιοχής μελέτης, της μεταβολής του κάθε παράγοντα. Το κεντρικό σημείο συμβολίζεται με “0”, στην περίπτωση που ο σχεδιασμός προβλέπει τη μελέτη τριών επιπέδων των παραγόντων. Η γραφική αναπαράσταση στο χώρο ενός πλήρους παραγοντικού σχεδίου δύο παραγόντων σε δύο επίπεδα είναι ένα τετράγωνο, ενώ η γραφική αναπαράσταση ενός πλήρους παραγοντικού σχεδίου τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα ορίζεται ως ένας κύβος (σχήμα 5.2).



Σχήμα 5.2 Πλήρες παραγοντικό σχέδιο (α) δύο παραγόντων σε δύο επίπεδα ($2^2=4$ πειράματα) και (β) τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα ($2^3=8$ πειράματα) (Lundstedt T. et al. 1998)

Το πλήρες παραγοντικό σχέδιο επιτρέπει την εκτίμηση της επίδρασης ενός παράγοντα ανεξάρτητα από όλες τις άλλες επιδράσεις. Η επίδραση (effect) ενός παράγοντα είναι η μεταβολή στην απόκριση λόγω της μεταβολής στο επίπεδό του. Κατά τη μελέτη ενός παράγοντα μόνο σε δύο επίπεδα, η κύρια επίδραση (main effect) του παράγοντα είναι η

διαφορά μεταξύ της μέσης απόκρισης όλων των δοκιμών που γίνονται στο χαμηλό (-1) και στο υψηλό επίπεδο (+1). Αλληλεπίδραση (interaction) μεταξύ των παραγόντων υπάρχει, αν η επίδραση ενός παράγοντα είναι διαφορετική σε διαφορετικά επίπεδα ενός άλλου παράγοντα (Σταμάτης Ν. 2012).

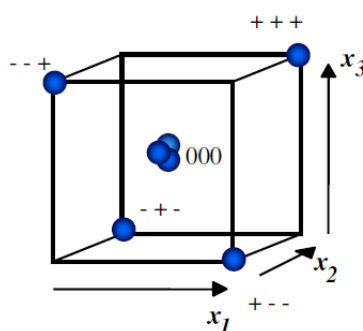
5.3.2 Κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός (Fractional Factorial Design, FFD)

Η αύξηση του αριθμού των παραγόντων σε έναν 2^k παραγοντικό σχεδιασμό, οδηγεί στην αύξηση των πειραμάτων που απαιτούνται για μια πλήρη επανάληψη του σχεδιασμού. Για παράδειγμα, μια πλήρης επανάληψη ενός 2^6 σχεδιασμού απαιτεί 64 πειράματα. Ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός, χρησιμοποιείται στην περίπτωση που ορισμένες υψηλής τάξης αλληλεπιδράσεις θεωρηθούν ότι είναι αμελητέες, μπορεί να δοθεί πληροφορία για τις κύριες επιδράσεις και τις αλληλεπιδράσεις χαμηλής τάξης, με την εκτέλεση μόνο ενός κλάσματος του πλήρους παραγοντικού πειράματος. Ο σχεδιασμός αυτός, αποτελεί ένα αντιπροσωπευτικό υποσύνολο ενός πλήρους παραγοντικού σχεδίου.

Σε αυτό το σχέδιο, ο αριθμός των πειραμάτων μειώνεται κατά έναν αριθμό p , δηλαδή αριθμούνται σε 2^{k-p} , ενώ συνήθως χρησιμοποιείται το ένα-δεύτερο ($1/2$) κλασματικό σχέδιο στο οποίο τα πειράματα μειώνονται ακριβώς στο μισό ($p=1$).

Ο κλασματικός σχεδιασμός χρησιμοποιείται κυρίως σε πειράματα διαλογής-αξιολόγησης (screening experiments), όπου μετέχουν πολλοί παράγοντες με σκοπό την αναγνώριση εκείνων των παραγόντων που έχουν μεγάλες επιδράσεις. Τα πειράματα διαλογής-αξιολόγησης συνήθως χρησιμοποιούνται, όταν είναι πολύ πιθανό πολλοί από τους αρχικούς παράγοντες να έχουν μικρή ή μηδενική επίδραση στην απόκριση, στα πρώτα στάδια μιας έρευνας. Οι σημαντικοί παράγοντες, ερευνώνται περεταίρω σε επόμενα πειράματα.

Το γεγονός ότι δεν μπορεί να εκτιμηθεί η ανεξάρτητη επίδραση ορισμένων παραγόντων, αποτελεί το κύριο μειονέκτημα του κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού (Χριστοφοράκη Ε. 2012).



Σχήμα 5.3 Κλασματικό παραγοντικό σχέδιο τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα ($2^{3-1}=4$ πειράματα) ((Lundstedt T. et al. 1998))

Το κριτήριο της διακριτικής ικανότητας ή ευκρίνειας (*resolution*) είναι ένα από τα βασικότερα κριτήρια για την επιλογή του καταλληλότερου κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού είναι. Ο προηγούμενος 2^{3-1} σχεδιασμός, ονομάζεται σχεδιασμός διακριτικής ικανότητας III όπου οι κύριες επιδράσεις είναι ταυτόσημες με αλληλεπιδράσεις δύο παραγόντων. Γενικά, αν καμία επίδραση p-παραγόντων δεν είναι ταυτόσημη με άλλη επίδραση που περιέχει λιγότερους από R-p παράγοντες τότε ο σχεδιασμός έχει διακριτική ικανότητα R. Για διακριτική ικανότητα ενός σχεδιασμού συνήθως χρησιμοποιείται σαν υποσημείωση ο συμβολισμός της Ρωμαϊκής αρίθμησης. Οι σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας III, IV και V ορίζονται ως εξής (Lundstedt T. et al. 1998):

- Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας III. Σχεδιασμοί στους οποίους καμία κύρια επίδραση δεν είναι ταυτόσημη με οποιαδήποτε άλλη κύρια επίδραση, αλλά οι κύριες επιδράσεις είναι ταυτόσημες με αλληλεπιδράσεις δυο παραγόντων και οι αλληλεπιδράσεις δύο παραγόντων ενδεχομένως να είναι μεταξύ τους ταυτόσημες.
- Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας IV. Σχεδιασμοί στους οποίους καμία κύρια επίδραση δεν είναι ταυτόσημη με οποιαδήποτε άλλη κύρια επίδραση, ή με οποιαδήποτε αλληλεπίδραση δυο παραγόντων, αλλά αλληλεπιδράσεις δυο παραγόντων είναι ταυτόσημες με άλλες αλληλεπιδράσεις δυο ή περισσότερων παραγόντων.
- Σχεδιασμοί διακριτικής ικανότητας V. Σχεδιασμοί στους οποίους καμία κύρια επίδραση ή αλληλεπίδραση δυο παραγόντων δεν είναι ταυτόσημη με οποιαδήποτε άλλη κύρια επίδραση ή αλληλεπίδραση δυο παραγόντων, αλλά αλληλεπιδράσεις δυο παραγόντων είναι ταυτόσημες με αλληλεπιδράσεις τριών παραγόντων.

5.3.3 Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite Design, CCD)

Ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCD) είναι ένας από τους πιο ευρέως διαδεδομένους σχεδιασμούς. Επιτρέπει τη λεπτομερή διερεύνηση της καμπυλότητας των επιφανειών απόκρισης. Σύμφωνα με τους Box et al. (2005), ο CCD αποτελείται από τα ακόλουθα μέρη:

- ένα πλήρως ή κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό,

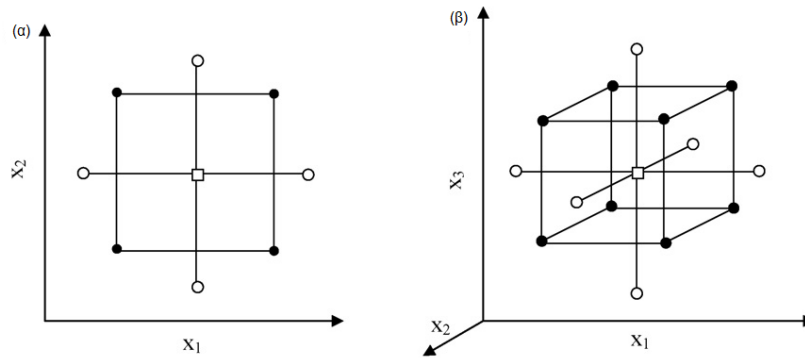
- έναν πρόσθετο σχεδιασμό, όπου τα σημεία που προκύπτουν από τα πειράματα βρίσκονται σε απόσταση α από τα κέντρο τους και
- ένα κεντρικό σημείο (central point).

Τα κύρια χαρακτηριστικά που εμφανίζει ο πλήρης κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός είναι τα παρακάτω:

- Απαιτείται ένας αριθμός πειραμάτων που δίνεται από τη σχέση: $N=2^k+2k+C_p$, όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και (C_p) ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κεντρικού σημείου.
- Οι τιμές του α εξαρτώνται από τον αριθμό των μεταβλητών και μπορούν να υπολογιστούν από τη σχέση: $\alpha=[2^k]^{1/4}$. Οι τιμές που παίρνει το α είναι: 1,41, 1,68 και 2,00 για δύο, τρεις και τέσσερις μελετώμενες μεταβλητές αντίστοιχα.
- Όλοι οι παράγοντες μελετώνται σε πέντε επίπεδα ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$).

Για να πραγματοποιηθεί ένας κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός θα πρέπει να οριστούν ο αριθμός των πειραμάτων που θα πραγματοποιηθούν, οι τιμές του α και τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού.

Τα κεντρικά και αξονικά σημεία επιτρέπουν την εκτίμηση της καμπυλότητας (curvature) και εγκαθιστούν νέες τιμές ακραίων επιπέδων των υπό μελέτη παραγόντων. Συνήθως, πραγματοποιούνται επαναλήψεις των μετρήσεων του κεντρικού σημείου που αποσκοπούν αφενός μεν να προσφέρουν μία μέτρηση ενός καθαρού λάθους, αφετέρου δε να σταθεροποιήσουν τη διακύμανση της προβλεπόμενης απόκρισης. Έτσι, για τη σταθεροποίηση της διακύμανσης χρειάζονται τρεις με πέντε μετρήσεις όταν η τιμή του α είναι κοντά στο $k^{1/2}$ και μία ή δύο μετρήσεις όταν η τιμή του α είναι κοντά στο ένα. Μεταξύ των ακραίων τιμών του α , προτείνονται δύο με τέσσερις επαναλήψεις του κεντρικού σημείου (S. L. C. Ferreira *et al.* 2007). Στο σχήμα 5.4 παρουσιάζεται ένας πλήρης κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός.



Σχήμα 5.4 Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός για τη βελτιστοποίηση (α) δύο παραγόντων ($=1,41$) και (β) τριών παραγόντων ($=1,68$). Όπου, (•) τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού (points of factorial design), (o) τα αξονικά σημεία (axial points) και (□) το κεντρικό σημείο (central point) (Bezerra M.A. et al. 2008)

Γενικότερα, ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός διακρίνεται (σχήμα 5.5)

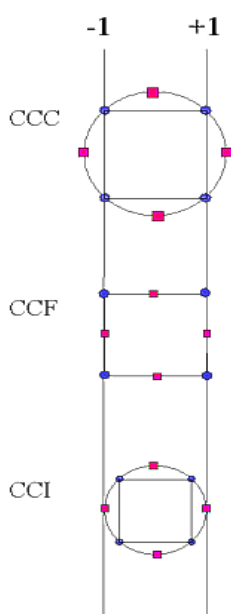
1. Στον περιγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (circumscribed design – CCC)

Ο σχεδιασμός αποτελεί την κλασική μορφή των κεντρικών σύνθετων σχεδιασμών. Συγκεκριμένα στο σχεδιασμό αυτό, τα αξονικά σημεία ανήκουν σε ένα κύκλο περιγεγραμμένο στο τετράγωνο του σχεδιαστικού χώρου. Τα αξονικά σημεία (axial ή star points) ισοαπέχουν σε απόσταση $\pm a$ από το κέντρο του σχεδιασμού (με $|a| \geq 1$) καθιστώντας έτσι τους σχεδιασμούς αυτού του είδους περιστροφικούς. Η απόσταση των αξονικών σημείων εξαρτάται τόσο από τον αριθμό των παραγόντων όσο και τις επιθυμητές ιδιότητες του σχεδιασμού. Κριτήριο για την επιλογή της τιμής του a αποτελεί η περιστροφικότητα (rotatability) και οι τιμές του κυμαίνονται από 1 έως $k^{1/2}$, σύμφωνα με τους (Box G.E.P. et al. 2005). Όταν ένας σχεδιασμός είναι σε θέση να παράγει δεδομένα το ίδιο αξιόπιστα προς όλες τις κατευθύνσεις (όταν δηλαδή όταν η μεταβλητότητα της προβλεπόμενης απόκρισης είναι η ίδια για όλα τα σημεία που ισαπέχουν από το κέντρο του σχεδιαστικού χώρου), καλείται περιστροφικός σχεδιασμός. Κάθε παράγοντας έχει στον άξονά του δύο τέτοια σημεία (Box G.E.P. et al. 2005, Hanrahan G. et al. 2005, S. L. C. Ferreira et al. 2007). Οι CCC σχεδιασμοί εμφανίζουν κυκλική, σφαιρική και υπερσφαιρική συμμετρία. Εάν $a=1$, τα αξονικά σημεία στο σχεδιασμό κεντρικής σύνθεσης δύο μεταβλητών τοποθετούνται στα μέσα των πλευρών του τετραγώνου, ενώ στο σχεδιασμό τριών μεταβλητών βρίσκονται στα μέσα των πλευρών του κύβου. Εάν $a=k^{1/2}$, τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού και τα αξονικά σημεία βρίσκονται στην ανώτερη επιφάνεια μίας ανώτερης σφαίρας και έτσι ο σχεδιασμός λέγεται σφαιρικός. Στην περίπτωση όπου όλα τα

περιφερειακά σημεία τοποθετούνται στην περιφέρεια ενός κύκλου, ο σχεδιασμός καλείται κεντρικής σύνθεσης με δύο μεταβλητές. Για τη διεξαγωγή τους απαιτούνται 5 επίπεδα από κάθε παράγοντα (2 παραγοντικά – ένα υψηλό και ένα χαμηλό, 2 αξονικά και ένα κεντρικό) (Hanrahan G. *et al.* 2005).

2. Στον εδροκεντρωμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (face-centered cube design -FCC) Στην περίπτωση αυτή τα αξονικά σημεία είναι στο κέντρο κάθε πλευράς του παραγοντικού χώρου, δηλαδή το $\alpha = \pm 1$. Για τη διεξαγωγή τους απαιτούνται τρία επίπεδα από κάθε παράγοντα (δύο παραγοντικά – ένα υψηλό και ένα χαμηλό – καθώς και ένα αξονικό που συμπίπτει με το κεντρικό). Οι σχεδιασμοί αυτού του τύπου δεν είναι περιστροφικοί και η διακριτική τους ικανότητα είναι τύπου V (Hanrahan G. *et al.* 2005).

3. Στον εγγεγραμμένο κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (inscribed - ICC) Στις περιπτώσεις όπου η υπέρβαση των επιβαλλομένων από των ερευνητή επιπέδων (± 1) είναι αδύνατη, εφαρμόζεται ο εγγεγραμμένος κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός. Σ' αυτές τις περιπτώσεις τα όρια των παραγόντων γίνονται πιο στενά και τα αξονικά σημεία παίρνουν τις τιμές ± 1 . Για τη διεξαγωγή τους απαιτούνται 5 επίπεδα από κάθε παράγοντα (2 παραγοντικά – ένα υψηλό και ένα χαμηλό, αξονικά και ένα κεντρικό) (Hanrahan G. *et al.* 2005). Όπως και στην περίπτωση του CCC σχεδιασμού, ο ICC είναι περιστροφικός σχεδιασμός.



Σχήμα 5.5 Σύγκριση των τριών ειδών σχεδιασμού κεντρικής σύνθεσης

B. Σκοπός και αντικείμενο της Διδακτορικής Διατριβής

Η εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής πραγματεύεται την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και πιστοποίηση αναλυτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε επιφανειακά υδατικά δείγματα καθώς και την εφαρμογή της στην λεκάνη απορροής του ποταμού Άραχθου.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει η ανάγκη ανάπτυξης νέων αναλυτικών τεχνικών οι οποίες είναι φιλικότερες προς το περιβάλλον. Νέες τεχνικές μικροεκχύλισης αναπτύσσονται καθημερινά καθώς χρησιμοποιούν μικρότερες ποσότητες οργανικών και ενίοτε μη τοξικούς διαλύτες σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους εκχύλισης. Για αυτό το λόγο η ανάπτυξη μιας αναλυτικής τεχνικής η οποία θα πληρούσε αυτό το κριτήριο κρίθηκε επιβεβλημένη.

Επίσης η χρήση χημειομετρικών μεθόδων διαπερνά όλο τον κορμό της ερευνητικής εργασίας σε μια προσπάθεια εφαρμογής τους τόσο για τη βελτιστοποίηση των αναλυτικών τεχνικών όσο και για την εκτίμηση του βαθμού της σχετιζόμενης με την ανάκτηση αβεβαιότητας αυτών. Έτσι στην παρούσα διατριβή γίνεται χρήση δυο πειραματικών σχεδιασμών.

Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκε να αναπτυχθεί υγρή-υγρή μικροεκχύλιση αιωρούμενου διασπαρμένου σταγονιδίου. Η συγκεκριμένη τεχνική δεν είχε ποτέ πριν βρει εφαρμογή για ανίχνευση υπολειμμάτων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Για την βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν χημειομετρικές μέθοδοι. Συγκεκριμένα έλαβαν χώρα ένα στάδιο διαλογής-αξιολόγησης (Plackett–Burman design) καθώς και ένα στάδιο βελτιστοποίησης κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (central composite design, CCD).

Αφού έγινε η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και πιστοποίηση της αναλυτικής τεχνικής έγινε εφαρμογή της στη λεκάνη απορροής του ποταμού Άραχθου για τυχόν υπολείμματα ΠΑΥ. Το συγκεκριμένο οικοσύστημα επιλέχθηκε γιατί τον Ιούνιο του 2010 απειλήθηκε με οικολογική καταστροφή τόσο ο Άραχθος ποταμός όσο και όλο το οικοσύστημα του Αμβρακικού μετά τη διαρροή 2 τόνων μαζούτ από δεξαμενή εργοστασίου το οποίο δεν λειτουργεί.

Τέλος έγινε εκτίμηση της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας (environmental risk assessment) των ουσιών αυτών σε όλο το οικοσύστημα, για τρεις βιοκοινότητες (ψάρια, ζωοπλαγκτόν, φυτοπλαγκτόν) με τη χρήση του πηλίκου επικινδυνότητας (risk quotient).

Γ. Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο 6°

Υλικά και μέθοδοι

6.1 Πρότυπα

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων οι ουσίες ναφθαλίνιο, ακεναφθυλένιο, ακεναφθένιο, φλουορένιο, ανθρακένιο, φαινανθρένιο, φλουορανθένιο, χρυσένιο, βενζο[α]ανθρακένιο και πυρένιο προμηθεύτηκαν με την μορφή σκόνης από την εταιρία Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA). Τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης κάθε δραστικής παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 1000 mg L^{-1} και σε διαλύτη μεθανόλη: διχλωρομεθάνιο και αναλογία 1:1 και φυλάχθηκαν σε γυάλινα αεροστεγώς κλεισμένα φιαλίδια των 10 mL στους -20°C . Από αυτά τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκε ένα πρότυπο μίγμα το οποίο περιείχε και τους δέκα ΠΑΥ σε συγκέντρωση 1000 μg L^{-1} επίσης σε διαλύτη μεθανόλη: διχλωρομεθάνιο και αναλογία 1:1 το οποίο επίσης και φυλάχθηκε σε γυάλινο αεροστεγώς κλεισμένο φιαλίδιο των 10 mL στους -20°C . Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας των μιγμάτων παρασκευάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις με κατάλληλες αραιώσεις σε μεθανόλη: διχλωρομεθάνιο (1:1). Όλα τα διαλύματα εργασίας φυλάσσονταν στους 4°C σε σκουρόχρωμη φιάλη των 10 mL ώστε να διασφαλιστεί ότι οι αναλυόμενες ουσίες δεν υφίστανται ουσιαστική διάσπαση.

6.2 Όργανα – Συσκευές

Κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και συσκευές:

- Σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή μάζας Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Austin, Texas, USA).
- Συσκευή μέτρησης του pH μοντέλο C932, του οίκου Consort.
- Αγωγιμόμετρο του οίκου Consort. Μοντέλο ηλεκτροδίου CC9.
- Λουτρό υπερήχων μοντέλο S30H, του οίκου Elmasonic.

- Μαγνητικός αναδευτήρας μοντέλο LMS-1007 του οίκου Labtech

6.3 Διαλύτες

- Τολουόλιο, καθαρότητας 99,8% της Lab-Scan (Dublin, Ireland).
- Ισοοκτάνιο, καθαρότητας 99,5% της Lab-Scan (Dublin, Ireland).
- Εξάνιο, καθαρότητας 95% της Lab-Scan (Dublin, Ireland).
- p-Ξυλένιο, καθαρότητας 95% της Lab-Scan (Dublin, Ireland).
- Μεθανόλη, καθαρότητας 95% της Lab-Scan (Dublin, Ireland).
- Διχλωρομεθάνιο, καθαρότητας 95% της Lab-Scan (Dublin, Ireland).
- Βενζόλιο, καθαρότητας 95% της Merck (Darmstadt, Germany).

6.4 Υδατικά δείγματα

Το νερό που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση της αναλυτικής τεχνικής συλλέχθηκε από τις πηγές του ποταμού Λούρου και δεν περιείχε υπολείμματα ΠΑΥ πάνω από το όριο ανίχνευσης (τεχνική ελέγχου SPE, (Πετρίδης Ν. 2010)).

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του προσδιορίστηκαν και απεικονίζονται στο πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1 Φυσικοχημικές παράμετροι υδατικού δείγματος προερχόμενο από τις πηγές του ποταμού Λούρο.

Παράμετρος	Τιμή
pH	7,53
Αγωγιμότητα (μS/cm)	302
Αιωρούμενα σωματίδια (mg L ⁻¹)	340
Αλατότητα (‰)	0

6.5 Λοιπά αντιδραστήρια

- NaCl καθαρότητας 99,8%, της Riedel de Haen (Hanover, Germany)
- Χουμικά, της Fluka (Buchs, Switzerland)

6.6 Συστήματα χρωματογραφίας

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας έναν αέριο χρωματογράφο Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Austin, Texas, USA) συζευγμένο με ανιχνευτή μάζας ISQ και αυτόματο δειγματολήπτη AI/AS 3000. Το σύστημα ελέγχονταν από υπολογιστή με λογισμικό Xcalibur. Ο διαχωρισμός διεξήχθη χρησιμοποιώντας τριχοειδή στήλη πυριτίου TR-5 με πάχος φιλμ 0,25 μm και διαστάσεις 30m×0,25mm, (Thermo Fisher Scientific, Austin, Texas, USA). Το φέρον αέριο ήταν ήλιο (καθαρότητα > 99,999%, Air Liquide, Ελλάδα) με ρυθμό ροής 1 mL min⁻¹. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αέριου χρωματογράφου φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 6.2:

Πίνακας 6.2 Θερμοκρασιακό πρόγραμμα αέριου χρωματογράφου

Ρυθμός αύξησης (°C min ⁻¹)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (λεπτά)
	60	1
6	175	4
3	235	0
8	300	7

Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ορίστηκε στους 220 °C σε λειτουργία splitless. Οι θερμοκρασίες της πηγής ιόντων και του interface ορίστηκαν στους 220 °C και 250 °C αντίστοιχα. Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν στα 70 eV.

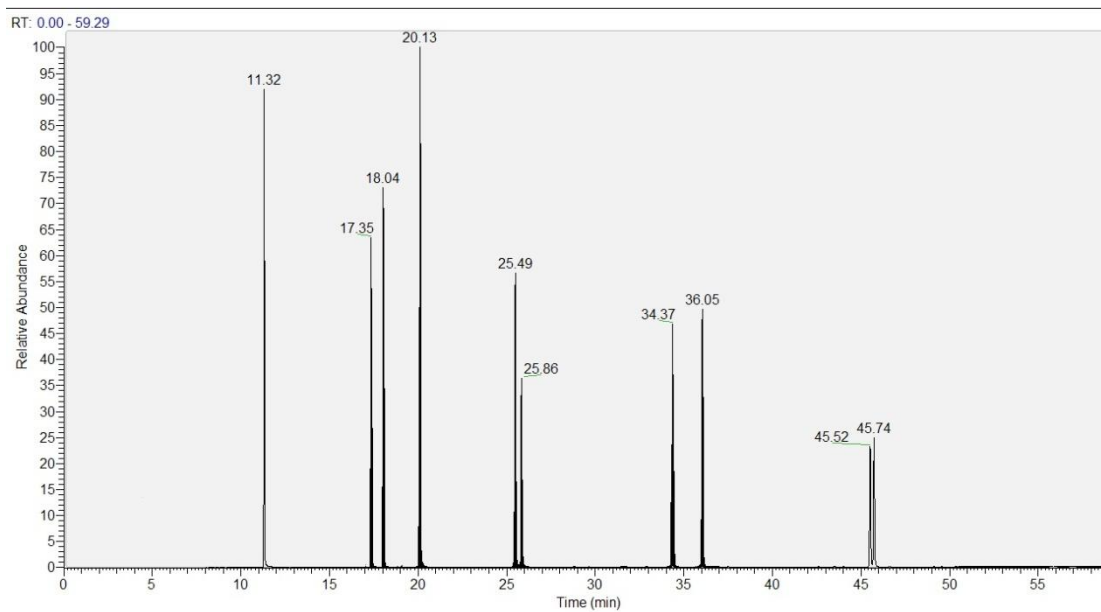
Για τον προσδιορισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM).. Τρία ιόντα από κάθε αναλύτη επιλέχθηκαν σύμφωνα με τα φάσματα μάζας τους, τα οποία και ελήφθησαν σε λειτουργία full-scan και σε σύγκρισης με τη βιβλιοθήκη NIST. Τα ποιοτικά κριτήρια που υιοθετήθηκαν για τους χρόνους κατακράτησης των αναλυτών, καθώς και τις σχετικές εντάσεις των επιλεγμένων ιόντων ήταν εντός των ορίων ανοχής που καθορίζονται από την οδηγία 2002/657/EK της Ευρωπαϊκής Επιτροπής σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι

χρόνοι κατακράτησης, καθώς και τα ιόντα ταυτοποίησης και ποσοτικοποίηση που επιλέχθηκαν για τις ενώσεις παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 6.3.

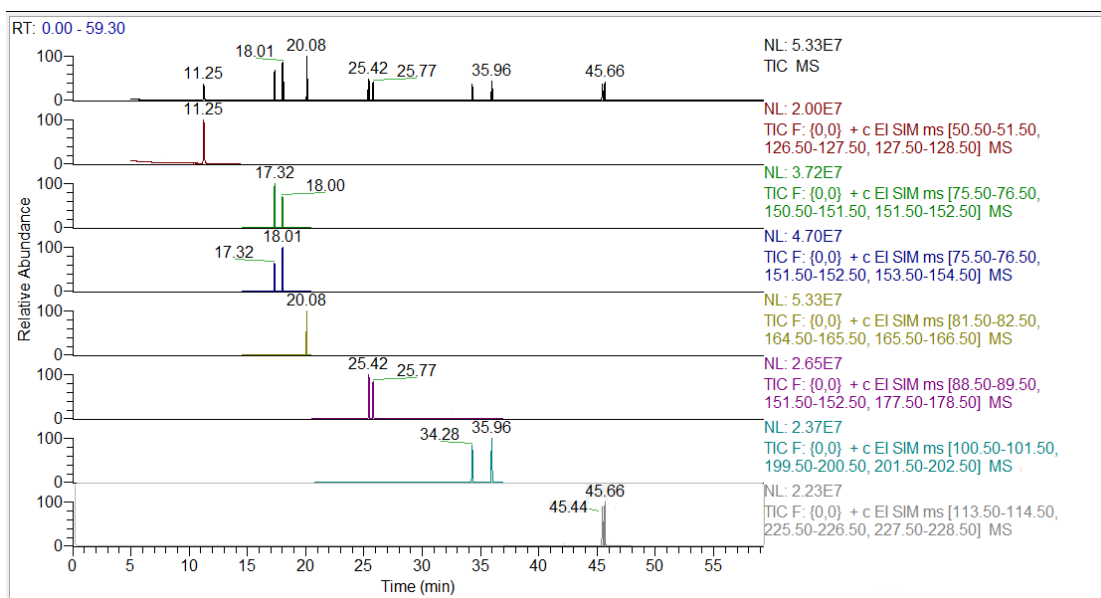
Πίνακας 6.3 Χρόνοι κατακράτησης, μοριακά βάρη και ιόντα των ενώσεων

Ένωση	Χρονικό παράθυρο (λεπτά)	Χρόνος κατακράτησης (λεπτά)	Μοριακό βάρος (g mol ⁻¹)	Ιόντα ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης (m/z)
Naphthalene	5-14,5	11,32	128,18	128 , 127, 51
Acenaphthylene	14,5-20,5	17,35	152,19	152 , 76, 151
Acenaphthene		18,04	154,21	154 , 152, 76
Fluorene		20,13	166,22	166 , 165, 82
Phenanthrene	20,5-37	25,49	178,22	178 , 152, 89
Anthracene		25,86	178,22	178 , 152, 89
Fluoranthrene		34,37	202,26	202 , 200, 101
Pyrene		36,05	202,26	202 , 200, 101
Benz[a]anthracene	37-57,3	45,52	228,29	228 , 226, 114
Crysene		45,74	228,29	228 , 226, 114

Τέλος στο σχήμα 6.1 απεικονίζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα με τη μέθοδο DSME / GC-MS το οποίο και προήλθε από εμβολιασμένο δείγμα νερού σε συγκέντρωση 10 µg L⁻¹. Ενώ στο σχήμα 6.2 παρουσιάζεται το ολικό χρωματογράφημα GC-MS καθώς και τα διαφορετικά χρωματογραφήματα των σει ιόντων που ελήφθησαν από πρότυπο διάλυμα μίγματος συγκέντρωσης (500 µg L⁻¹).



Σχήμα 6.1 Τυπικό χρωματογράφημα με τη μέθοδο DSME / GC-MS



Σχήμα 6.2 Ολικό χρωματογράφημα και χρωματογραφήματα των επιμέρους σκευασμάτων από πρότυπο διάλυμα μίγματος.

6.7 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός – Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Ο ποιοτικός προσδιορισμός γίνεται με την παρατήρηση της κορυφής των τριών παραγόμενων ιόντων που παρουσιάζεται στο αντίστοιχο χρόνο έκλυσης. Ο χρόνος έκλυσης της κορυφής

στο άγνωστο δείγμα θα πρέπει να συμπίπτει με τους χρόνους έκλουσης που παρουσιάζονται στον προηγούμενο πίνακα με ανοχή (tolerance) $\pm 0,5\%$. Κατά την σύγκριση αυτή η αναλογία των επιλεγμένων ιόντων σε σχέση με το κύριο ιόν (εκφρασμένη επί τοις εκατό) θα πρέπει να ακολουθεί τις παραπάνω ανοχές.

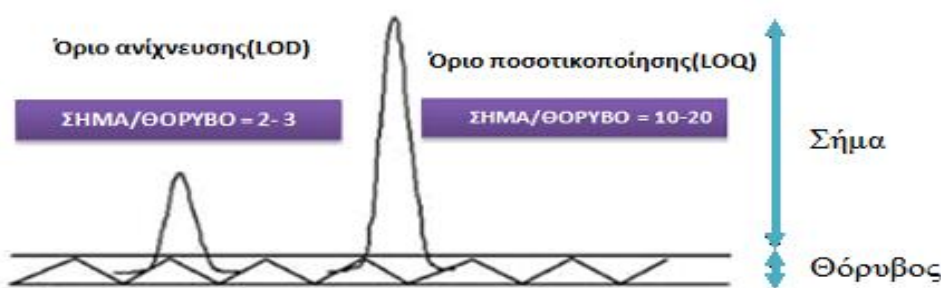
Έτσι ταυτοποίηση βασίστηκε:

- Στο χρόνο κατακράτησης των ουσιών (με βάση το χρόνο κατακράτησης των ενώσεων και με απόκλιση έως 1% σε σχέση με το χρόνο κατακράτησης των προτύπων ουσιών),
- Στα ιόντα κάθε ουσίας και
- Στη NIST βιβλιοθήκη του χρωματογράφου (με πιθανότητα ταυτοποίησης $> 70\%$).

Τα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, έπειτα από βελτιστοποίηση των παραμέτρων που επηρεάζουν τη διεργασία της εκχύλισης. Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε από επτά πρότυπα διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης. Η ανάλυση για το κάθε επίπεδο συγκέντρωσης έγινε 3 φορές.

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD), εκφράζει την απόκριση του ανιχνευτή στη μικρότερη ποσότητα δείγματος που μπορεί να ανιχνευθεί. Πρακτικά ως όριο ανίχνευσης θεωρείται η ποσότητα εκείνη του συστατικού, που δίνει σήμα τριπλάσιο από το σήμα του θορύβου σε τυφλό δείγμα.

Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantitation, LOQ), ορίζεται η ποσότητα εκείνη του συστατικού που δίνει σήμα δεκαπλάσιο από το σήμα του θορύβου. Το εμβαδόν της καμπύλης κάθε φορά είναι ανάλογο με την ποσότητα του συστατικού που εκλύεται και είναι ευκολότερο να αποτιμηθούν σωστά καμπύλες με μεγάλο ύψος και μικρό εύρος, από καμπύλες ίσου εμβαδού, αλλά με μικρό ύψος και μεγάλο εύρος.



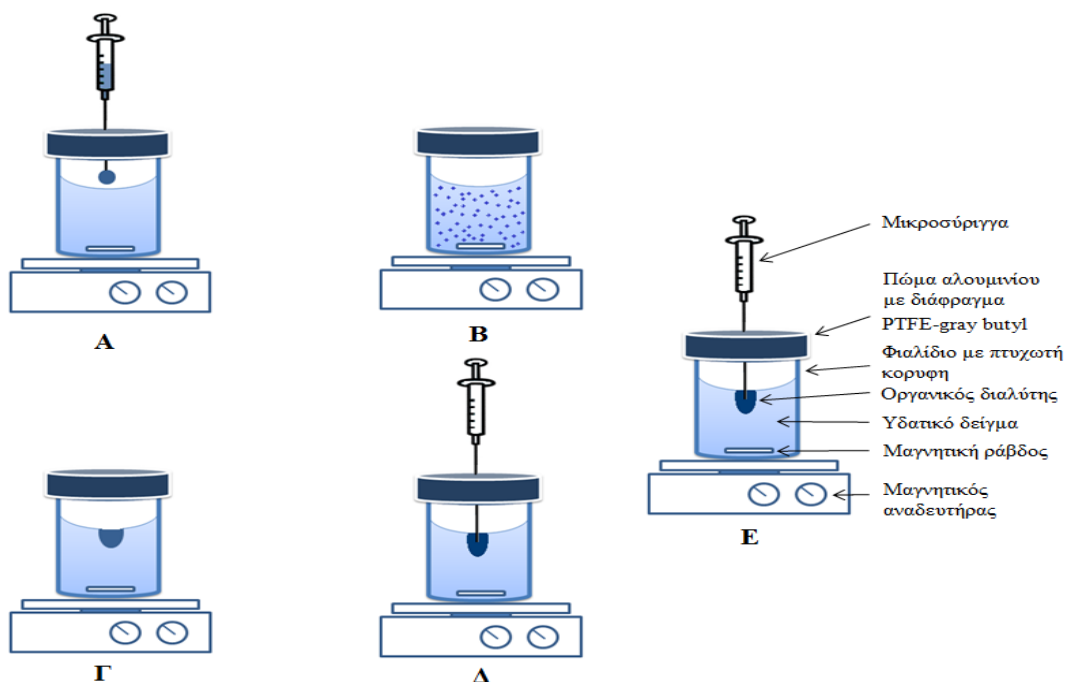
Σχήμα 6.3 Τρόπος εύρεσης ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Κεφάλαιο 7°

Ανάπτυξη και αξιολόγηση υγρής-υγρής μικροεκχύλισης αιωρούμενης σταγόνας σε διασπορά

7.1 Διαδικασία υγρής-υγρής μικροεκχύλισης αιωρούμενης σταγόνας σε διασπορά

Για την υγρή-υγρή μικροεκχύλιση αιωρούμενης σταγόνας σε διασπορά (dispersive suspended microextraction, στο εξής θα αναφέρεται ως DSME για λόγους συντομίας) (Σχήμα 7.1), 4,3 mL υδατικού δείγματος τοποθετούνται σε ένα γυάλινο φιαλίδιο των 10 mL με πτυχωτή κορυφή το οποίο σφραγίζεται με πώμα από αλουμίνιο. Το πώμα είναι ανοιχτό στο κέντρο του, όπου και τοποθετείται διάφραγμα PTFE-gray butyl. Σε ορισμένες περιπτώσεις το υδατικό δείγμα είχε πρώτα εμβολιαστεί με τους αναλύτες στόχους ώστε να προκύψει η επιθυμητή τελική συγκέντρωση στο διάλυμα για κάθε αναλύτη. Μια μικρομαγνητική ράβδος ανάδευσης (10 mm × 3 mm od, VWR, Arlington Heights, Illinois, USA) είχε τοποθετηθεί στον πυθμένα του φιαλιδίου. Ακολούθως στην επιφάνεια του υδατικού δείγματος προστίθεται ο διαλύτης εκχύλισης (93 μL) με μια αυτόματη πιπέτα των 100 μL (Gilson, Middleton, Wisconsin, USA, σφάλμα πιπέτας ≤ 0.8 μL). Τέλος το φιαλίδιο τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα για την ανάδευση του δείγματος.



Σχήμα 7.1 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας DSME. Α) στήσιμο, Β) στάδιο εκχύλισης, Γ) στάδιο αποκατάστασης, Δ) ανάκτηση διαλύτη για ανάλυση, Ε) επιμέρους τμήματα

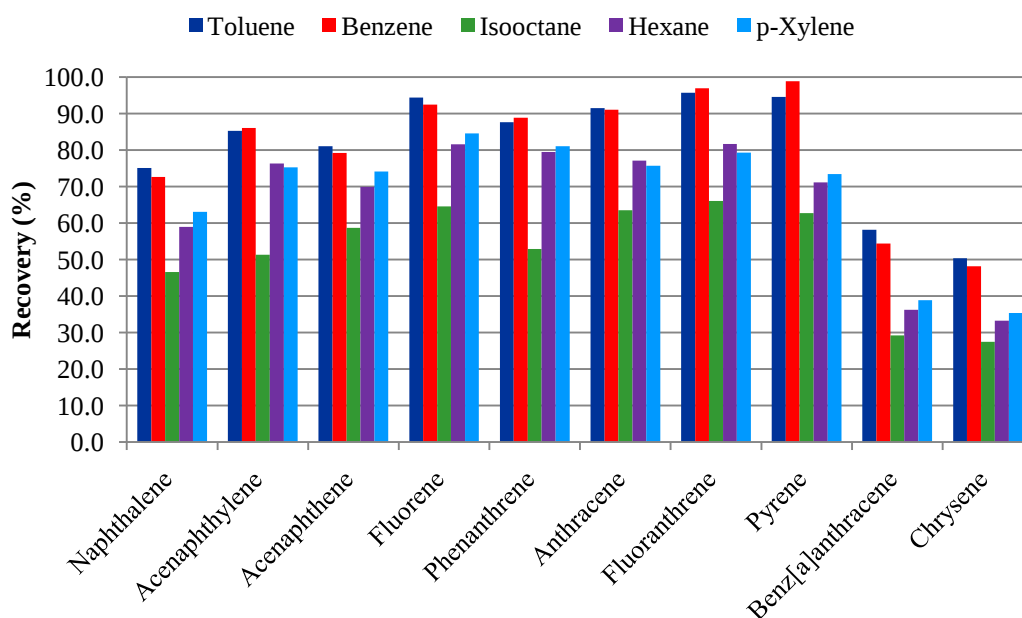
Κατά την εφαρμογή της διαδικασίας DSME λαμβάνουν μέρος δυο κρίσιμα στάδια. Αρχικά έχουμε το στάδιο εκχύλισης το οποίο ακολουθείται από το στάδιο αποκατάστασης. Πιο συγκεκριμένα, η ταχύτητα ανάδευσης ρυθμίζεται στις 1500 στροφές ανά λεπτό (ταχύτητα εκχύλισης) για 104 δευτερόλεπτα (χρόνος εκχύλισης) και στη συνέχεια μειώνεται στις 800 στροφές ανά λεπτό (ταχύτητα αποκατάστασης). Κατά το στάδιο της εκχύλισης σχηματίζεται ένα θολό διάλυμα και οι αναλύτες στο δείγμα νερού εκχυλίζονται στα μικροσκοπικά σταγονίδια του διαλύτη εκχύλισης. Αφού περάσει ο χρόνος εκχύλισης (104 δευτερόλεπτα) η ταχύτητα ανάδευσης ρυθμίζεται στις 800 στροφές ανά λεπτό και ξεκινάει το στάδιο αποκατάστασης. Σε αυτή την ταχύτητα ανάδευσης σχηματίζεται μία ήπια περιδίνηση και τα σταγονίδια του διαλύτη εκχύλισης αρχίζουν να συγχωνεύονται και πάλι προς τον σχηματισμό μιας ενιαίας σταγόνας. Μετά από 10 λεπτά (χρόνος αποκατάστασης), ο οργανικός διαλύτης έχει διαχωριστεί πλήρως από την υδατική φάση και έχει σχηματιστεί μια σταγόνα του διαλύτη εκχύλισης στο κέντρο του κάτω μέρους του στροβίλου. Τέλος, μετά το στάδιο αποκατάστασης, 1.5 μL της οργανικής φάσης συλλέγεται με μια μικροσύριγγα των 10 μL (Hamilton, Reno, Nevada, USA) η οποία είναι εφοδιασμένη με αποσπώμενη βελόνα (26s gauge, 2 in, point style 2) και εγχέεται στο σύστημα αέριας χρωματογραφίας συζευγμένο με ανιχνευτή μάζας (GC-MS) για περαιτέρω ανάλυση.

7.2 Προκαταρκτικά πειράματα

7.2.1 Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης

Αρχικά έπρεπε να επιλεγθεί ο κατάλληλος διαλύτης εκχύλισης για την τεχνική DSME ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ανάκτηση για τις ενώσεις που μελετήθηκαν. Ήταν σημαντικό ο διαλύτης εκχύλισης να πληροί τα ακόλουθα κριτήρια: (i) να είναι αδιάλυτος στο νερό για να σχηματίζει δύο διαφορετικές φάσεις στο διάλυμα ώστε να είναι εύκολος ο διαχωρισμός των φάσεων, (ii) να έχει μικρότερη πυκνότητα από ότι το νερό ώστε να βρίσκεται πάνω από την υδατική φάση, (iii) να έχει υψηλή ικανότητα εκχύλισης προς τους αναλύτες στόχους και (iv) για να εμφανιστεί καλή αεριοχρωματογραφική συμπεριφορά. Οι διαλύτες που μελετήθηκαν και πληρούν τα απαραίτητα αυτά κριτήρια ήταν το τολουόλιο, το εξάνιο, το ισοοκτάνιο, το π-ξυλόλιο και το βενζόλιο. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι το τολουόλιο και το βενζόλιο

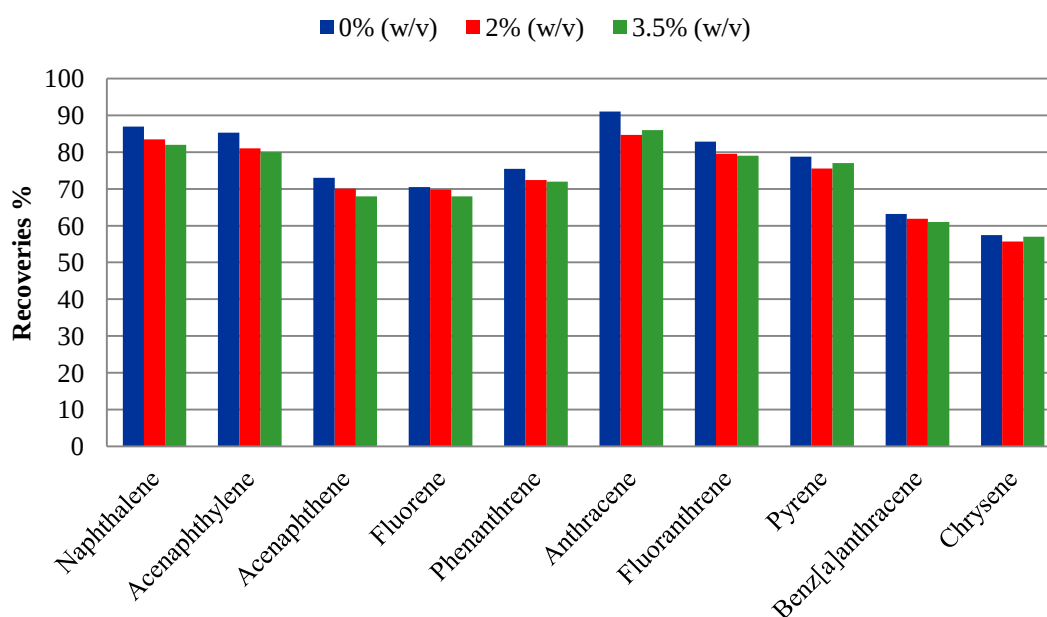
έχουν την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης (εκφραζόμενη ως ανακτήσεις %) σε σύγκριση με τους άλλους διαλύτες που μελετήθηκαν (Σχήμα 7.2), επομένως και επελέγησαν για περαιτέρω εξέταση στο πειραματικό σχεδιασμό.



Σχήμα 7.2 Απόδοση εκχύλισης με διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης

7.2.2 Επίδραση ιοντικής ισχύος

Τέλος μελετήθηκε και η επίδραση της ιοντικής ισχύος στην αποτελεσματικότητα της DSME και αξιολογήθηκε με την προσθήκη NaCl σε συγκεντρώσεις από 0 έως 3,5% βάρος κατ' όγκο(w/v). Παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση της ιοντικής ισχύος οι ανακτήσεις όλων των αναλυτών μειωνόταν ελαφρώς (Σχήμα 7.3). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο σχηματισμό ενός φυσικού φραγμού ανάμεσα στην υδατική και την οργανική φάση, ο οποίος αποτρέπει τη μεταφορά μάζας των αναλυτών στον διαλύτη εκχύλισης (Yang Z.H. *et al.* 2011). Ως εκ τούτου η επίδραση της ιοντικής ισχύος δεν μελετήθηκε περαιτέρω στον πειραματικό σχεδιασμό.



Σχήμα 7.3 Απόδοση εκχύλισης ως προς την ιοντική ισχύ

7.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Για την αξιολόγηση των κυρίων παραγόντων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου DSME χρησιμοποιήθηκε ένας σχεδιασμός με δύο στάδια (διαλογή-αξιολόγηση και βελτιστοποίηση) ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν: i) ο όγκος του δείγματος, ii) ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, iii) ο χρόνος εκχύλισης, iv) ο χρόνος αποκατάστασης και v) ο διαλύτης εκχύλισης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATISTICA7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) για την παραγωγή της πειραματικής μήτρας και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

7.3.1 Στάδιο διαλογής-αξιολόγησης (Plackett–Burman design)

Στο πρώτο στάδιο του πειραματικού σχεδιασμού, δηλαδή το στάδιο διαλογής-αξιολόγησης, αναπτύχθηκε ένα πειραματικό σχέδιο Plackett-Burman για να προσδιορίσει τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης (εκφρασμένη ως ανακτήσεις). Αυτό το σχέδιο εφαρμόστηκε για να εκτιμηθούν οι σημαντικές επιπτώσεις πέντε πραγματικών παραγόντων συν δύο ψευδομεταβλητών. Οι πέντε αυτοί πραγματικοί παράγοντες είναι: ο όγκος του δείγματος (V_s), ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης (V_d), ο χρόνος εκχύλισης (T_{ext}), ο

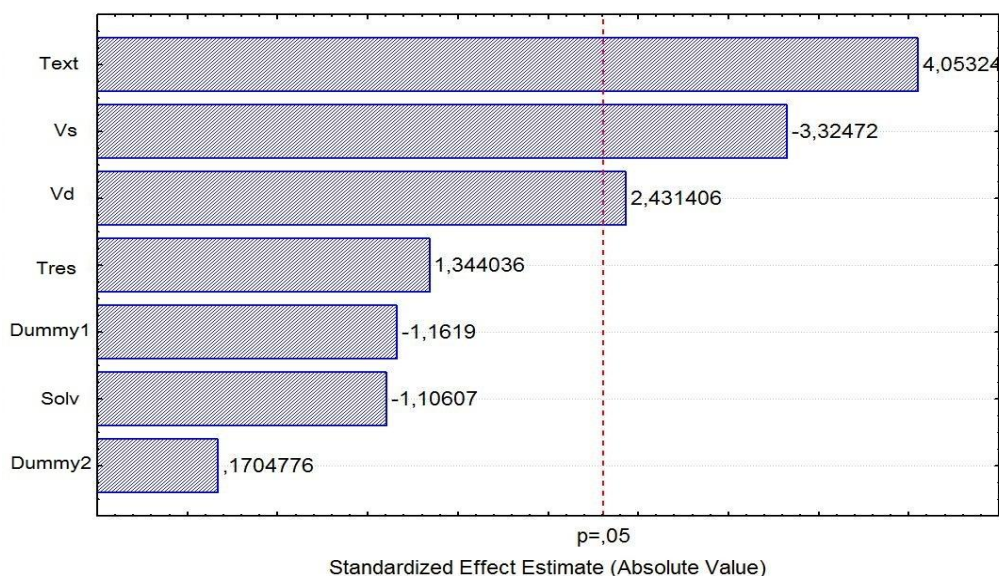
χρόνος αποκατάστασης (Tres) και ο διαλύτης εκχύλισης (Solv). Συνολικά, το σχέδιο Plackett-Burman περιελάμβανε οκτώ πειράματα με μια επανάληψη για το καθένα, δηλαδή διεξήχθησαν 16 πειράματα (Πίνακας 7.1).

Πίνακας 7.1 Πειράματα που διενεργήθηκαν με το σχέδιο Plackett – Burman.

Παράγοντες	Επίπεδα	
	Χαμηλό (-1)	Υψηλό(+1)
(Vs) Όγκος δείγματος (mL)	6	9
(Vd) Όγκος διαλύτη εκχύλισης (μL)	30	90
(Text) Χρόνος εκχύλισης (s)	30	180
(Tres) Χρόνος αποκατάστασης (min)	5	15
(Solv) Οργανικός διαλύτης	Τολουόλιο	Βενζόλιο
(Dum1) Ψευδοπαράγοντας 1	-	-
(Dum2) Ψευδοπαράγοντας 2	-	-

Πείραμα	Vs	Vd	Text	Tres	Solv	Dum1	Dum2
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
2	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
14	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για να εξετάσει κατά πόσον οι μελετηθείς πειραματικά παράγοντες ήταν σημαντικοί κατά την εκτέλεση της προτεινόμενης μεθόδου. Μια επίδραση θεωρείται σημαντική όταν είναι πάνω από το τυπικό σφάλμα σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($p < 0,05$). Σύμφωνα με το διάγραμμα Pareto και την ανάλυση της διακύμανσης, τρεις παράγοντες ήταν σημαντικοί και αξιολογήθηκαν στο κεντρικό σύνθετο σχέδιο για περαιτέρω ανάλυση (Σχήμα 7.4). Ειδικότερα, ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης ($p=0,041$) και ο χρόνος εκχύλισης ($p=0,004$) είχαν θετική επίδραση, ενώ ο όγκος του δείγματος ($p=0,011$) είχε αρνητική επίδραση. Από την άλλη και σύμφωνα με τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τα πειράματα ο χρόνος αποκατάστασης ($p = 0,215$) και ο διαλύτης ($p = 0,301$) δεν είχαν σημαντική επίδραση στην απόδοση της εκχύλισης και ως εκ τούτου διατηρήθηκαν σταθεροί στην περαιτέρω ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, το τολουόλιο επελέγη ως διαλύτης εκχύλισης, επειδή διαχωρίζει ταχύτερα από το νερό και ανακτάται πιο γρήγορα σε σύγκριση με το βενζόλιο. Επιπλέον, ο χρόνος αποκατάστασης επιλέχθηκε να είναι 10 λεπτά, διότι σε αυτό το χρόνο η οργανική φάση έχει διαχωριστεί πλήρως από την υδατική φάση. Ο διαχωρισμός της φάσης του τολουολίου θα μπορούσε να επιτευχθεί και σε χαμηλότερο χρόνο αποκατάστασης, όμως ο ανακτημένος όγκος οργανικής φάσης εμφανίζει υψηλότερη μεταβλητότητα.



Σχήμα 7.4 Διάγραμμα Pareto για το σχεδιασμό Plackett-Burman. Η κάθετη γραμμή στο διάγραμμα ορίζει το επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

7.3.2 Στάδιο βελτιστοποίησης. Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central composite design, CCD)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προηγούμενου σχεδίου, το επόμενο βήμα ήταν να βελτιστοποιηθεί η αναλυτική μέθοδος για τους εναπομείναντες τρεις παράγοντες με την χρησιμοποίηση ενός κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (CCD). Συνολικά δεκαεπτά πειράματα διεξήχθησαν σε αυτόν τον σχεδιασμό στα οποία περιέχονταν τρία πειράματα με κεντρικά σημεία. Οι επί μέρους τιμές κάθε παράγοντα για κάθε πείραμα παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2 Πειράματα που διενεργήθηκαν με τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCD).

Παράγοντες	Επίπεδα			Star point ($\alpha = 1.682$)	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- α	+ α
(x_1) Όγκος δείγματος (mL)	4.25	4.5	4.75	4.08	4.92
(x_2) Όγκος δ/τη εκχύλισης(μL)	72	80	88	66.5	93.5
(x_3) Χρόνος εκχύλισης (s)	85	100	115	75	125

Πείραμα	x_1	x_2	x_3	Μέση απόδοση της εκχύλισης (R%)
1	-1	-1	-1	56.9
2	-1	-1	+1	86.4
3	-1	+1	-1	77.3
4	-1	+1	+1	86.9
5	+1	-1	-1	80.6
6	+1	-1	+1	91.8
7	+1	+1	-1	96.1
8	+1	+1	+1	78.2
9	- α	0	0	79.9
10	+ α	0	0	86.7
11	0	- α	0	69.3
12	0	+ α	0	67.2

13	0	0	-α	82.2
14	0	0	+α	91.8
15	0	0	0	65.6
16	0	0	0	82.9
17	0	0	0	79.5

Οι γραμμικές επιδράσεις, οι αλληλεπιδράσεις καθώς και οι τετραγωνικές επιδράσεις αξιολογήθηκαν μέσω της ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) σε εμβολιασμένα δείγματα συγκέντρωσης 0,01 mg L⁻¹. Ο έλεγχος της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit), η όποια δείχνει την αποτυχία του μοντέλου να προσαρμοστεί στα πειραματικά δεδομένα (Rallis G.N. *et al.* 2012), επίσης αξιολογήθηκε και έδειξε ότι δεν είναι σημαντική (p= 0.057), υποδεικνύοντας την καλή απόκριση του μοντέλου. Μια σύνοψη της ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) παρουσιάζεται στον πίνακα 7.3.

Πίνακας 7.3 Ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού

	SS	df	MS	F	p
(1)V _s (L)	854.510	1	854.5096	9875.798	0.000101
V _s (Q)	416.762	1	416.7619	4816.629	0.000208
(2)V _d (L)	136.616	1	136.6164	1578.913	0.000633
V _d (Q)	1.700	1	1.7004	19.652	0.047304
(3)Ext-time(L)	25.846	1	25.8456	298.704	0.003331
Ext-time(Q)	40.637	1	40.6372	469.656	0.002122
1L by 2L	173.358	1	173.3583	2003.549	0.000499
1L by 3L	30.641	1	30.6414	354.131	0.002812
2L by 3L	40.542	1	40.5420	468.555	0.002127
Lack of Fit	7.295	5	1.4589	16.861	0.056930
Pure Error	0.173	2	0.0865		
Total SS	1712.590	16			

Όπου: V_s είναι ο όγκος του δείγματος

V_d είναι ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης

Text είναι ο χρόνος εκχύλισης.

SS είναι το άθροισμα των τετραγώνων (Sum of Squares)

df είναι οι βαθμοί ελευθερίας (Degrees of freedom)

MS είναι ο μέσος όρος των τετραγώνων (Mean Squares)

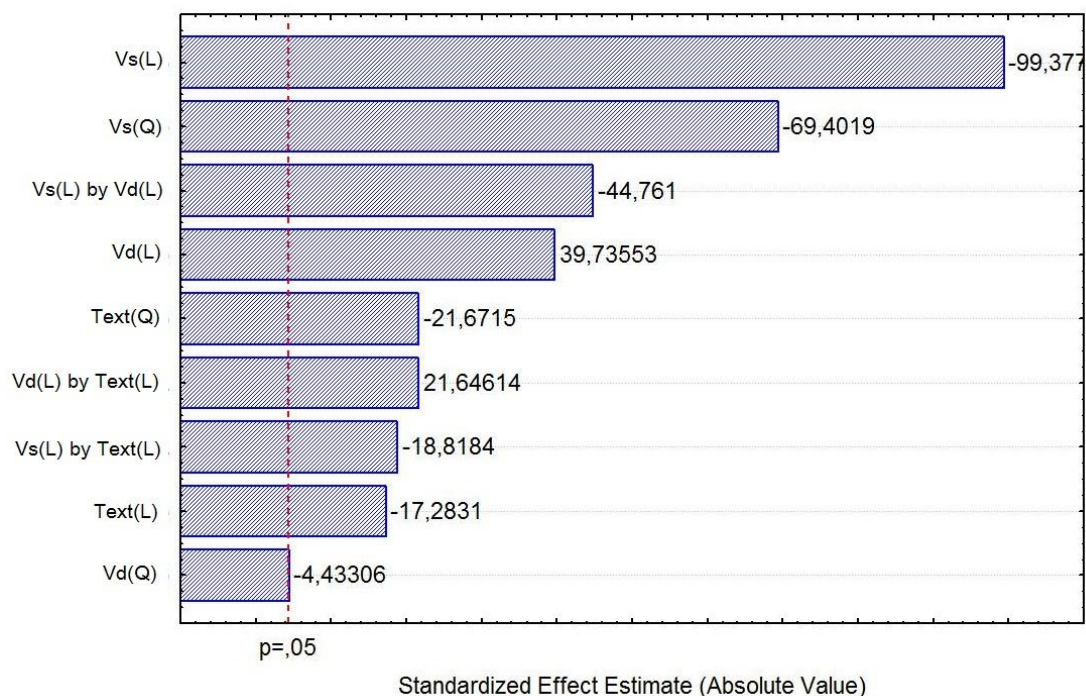
F είναι η τιμή F (F-value)

p είναι η τιμή p (p-value)

Από το διάγραμμα Pareto (Σχήμα 7.5), παρατηρείται ότι όλες οι γραμμικές και τετραγωνικές επιδράσεις καθώς και οι αλληλεπιδράσεις, είναι σημαντικές. Η ανάλυση των δεδομένων σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% οδήγησε στην δημιουργία της παρακάτω εξίσωσης (Εξ.7.1) στην οποία ορίζονται σε όρους οι σημαντικοί κωδικοποιημένοι παράγοντες:

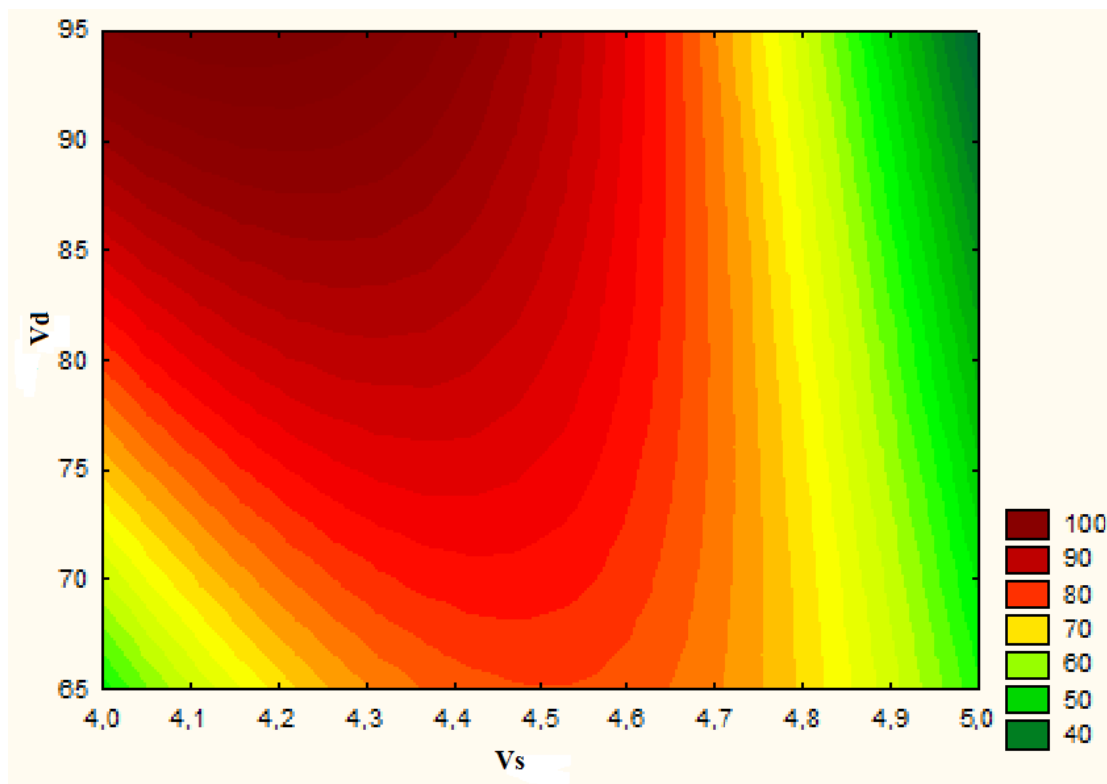
$$Y (R\%) = 86,69 - 7,91_{Vs} - 6,09^2_{Vs} + 3,16_{Vd} - 0,39^2_{Vd} - 1,38_{Text} - 1,39^2_{Text} \\ - 4,66_{Vs \times Vd} - 1,96_{Vs \times Text} + 2,25_{Vd \times Text}$$

όπου Vs είναι ο όγκος του δείγματος, Vd είναι ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης και Text είναι ο χρόνος εκχύλισης.



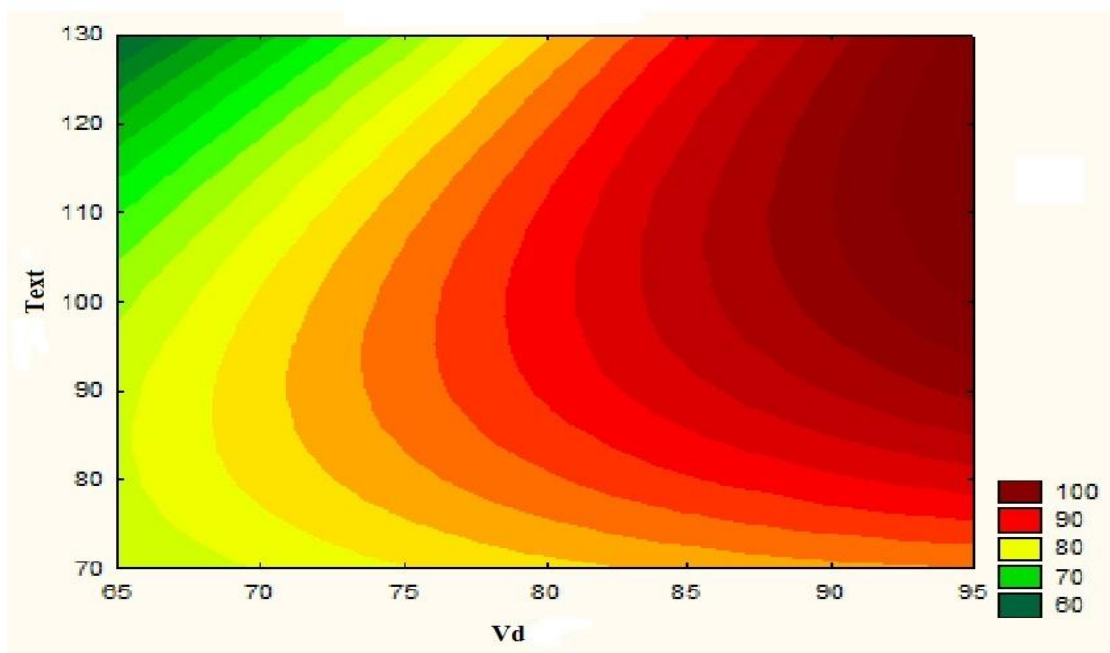
Σχήμα 7.5 Διάγραμμα Pareto το οποίο προήλθε από την ανάλυση των αποτελεσμάτων του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του όγκου του δείγματος και του όγκου διαλύτη εκχύλισης (τολουόλιο) η οποία φαίνεται στο διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης (Σχήμα 7.6), έδειξε ότι η υψηλότερη απόδοση της εκχύλισης (εκφρασμένη σαν ανάκτηση) ελήφθη σε όγκο δείγματος 4.1 έως 4.4 mL (V_s) και στον υψηλότερο όγκο τολουολίου (V_d). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο διαλύτης εκχύλισης (τολουόλιο) μπορεί να διασπαρθεί πιο αποτελεσματικά στο υδατικό διάλυμα (με αποτέλεσμα την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης των αναλυτών) και στη συνέχεια να αποκατασταθεί για να σχηματισθεί η σταγόνα του οργανικού διαλύτη. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε επίσης από το γεγονός ότι η ίδια ποσότητα τολουολίου (85-87 L) ανακτήθηκε στο τέλος της διαδικασίας διαχωρισμού φάσης, ανεξάρτητα από τον όγκο του δείγματος.



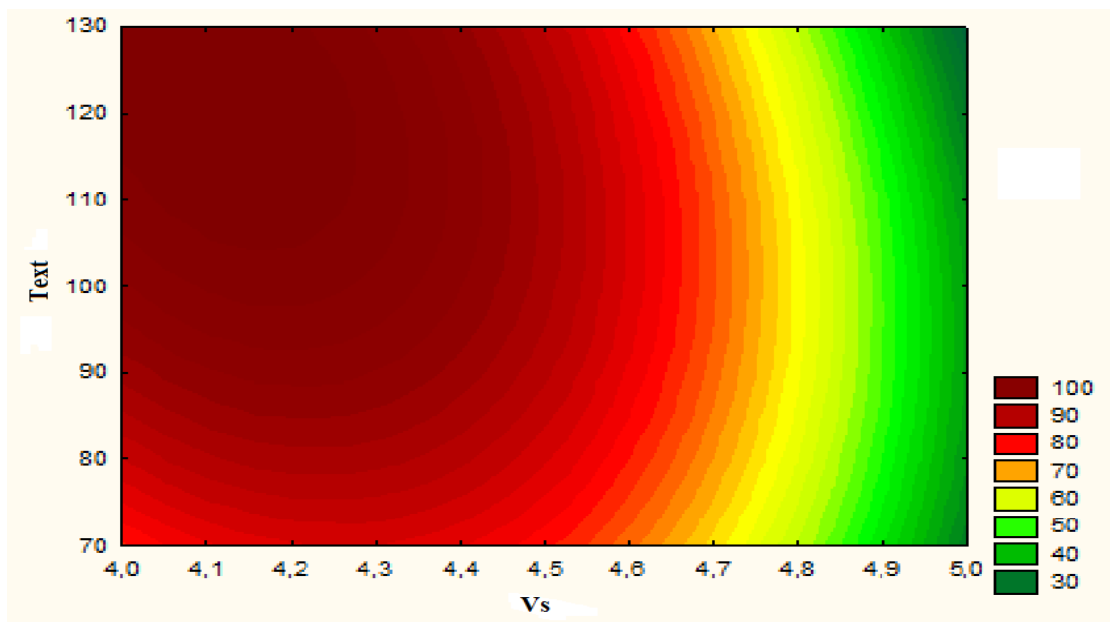
Σχήμα 7.6 Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης μεταξύ του όγκου δείγματος (V_s) και του όγκου διαλύτη εκχύλισης (V_d).

Λαμβάνοντας υπόψη την αλληλεπίδραση μεταξύ του όγκου τολουολίου (V_d) και του χρόνου εκχύλισης, όταν χρησιμοποιείται μεγάλος όγκος εκχύλισης, απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος εκχύλισης (Σχήμα 7.7).



Σχήμα 7.7 Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης μεταξύ του όγκου διαλύτη εκχύλισης (V_d) και του χρόνου εκχύλισης ($Text$).

Ωστόσο, για σταθερό V_d , ένας όγκος δείγματος κοντά στο 4.3 mL και ένα χρόνο εκχύλισης πάνω από 100 s παρήγαγε τις υψηλότερες αποδόσεις εκχύλισης (Σχήμα 7.8).



Σχήμα 7.8 Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης μεταξύ του όγκου δείγματος (V_s) και του χρόνου εκχύλισης ($Text$).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι χρόνοι εκχύλισης μεγαλύτεροι από 110 δευτερόλεπτα ήταν ανεπαρκείς λόγω της αδυναμίας του τολουολίου να αποκατασταθεί γρήγορα σε μια ενιαία σταγόνα μετά την εκχύλιση.

Οι συνολικές βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης υπολογίστηκαν από το λογισμικό αφού λύθηκε η πολυονυμική εξίσωση 7.1 (μέση ανάκτηση των αναλυτών στόχου 99,9%) και ήταν αναλυτικά:

- όγκος δείγματος 4,3 mL
- όγκος οργανικού διαλύτη 93 μ L
- χρόνος εκχύλισης 104 δευτερόλεπτα,
- τολουόλιο ως οργανικός διαλύτης
- χρόνος αποκατάστασης 10 λεπτά.

Ο παράγοντας εμπλουτισμού (enrichment factor, EFS) χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η απόδοση της εκχύλισης κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες. Ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης του αναλύτη στον οργανικό διαλύτη μετά τη διαδικασία εκχύλισης και της συγκέντρωσης του αναλύτη στο νερό πριν από τη διαδικασία εκχύλισης. Βρέθηκε να είναι της τάξης του 35-55.

7.4 Αξιολόγηση και επικύρωση της μεθόδου

Η αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου DSME/GC-MS, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την (2002/657/EC 2002) απόφαση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για εφαρμογή της οδηγίας σχετικά με την επίδραση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (limits of detection, LODs) και ποσοτικοποίησης (limits of quantification, LOQs), η ακρίβεια της μεθόδου μέσω του υπολογισμού της επαναληψιμότητας (repeatability, RSD_r) και της αναπαραγωγιμότητας (reproducibility, RSD_R), η ορθότητα της μεθόδου εκφρασμένη ως τις επί τοις εκατό ανακτήσεις (recoveries %, R%) και τέλος γραμμική περιοχή (linear range) για να αξιολογηθεί η αναλυτική απόδοση της μεθόδου κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης τις οποίες μας έδωσε το υπολογιστικό μοντέλο.

7.4.1 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Τα όρια ανίχνευσης (LODs) και τα όρια του ποσοτικού προσδιορισμού (LOQs) της προτεινόμενης μεθόδου βασίστηκαν στον λόγο σήματος προς θόρυβο ≥ 3 ($S/N \geq 3$) και 10 ($S/N \geq 10$), αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμάνθηκαν 8 έως 46 ng L⁻¹, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν μεταξύ 24 και 138 ng L⁻¹ (Πίνακας 7.4).

7.4.2 Ακρίβεια

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας διενεργήθηκαν πειράματα με 5 επαναλήψεις εντός της ημέρας (RSD_r%, n=5) ενώ για τον υπολογισμό της αναπαραγωγιμότητας διενεργήθηκαν πειράματα με πέντε επαναλήψεις σε 3 διαφορετικές ημέρες (RSD_R%, n = 5 × 3 ημέρες) και εκφράστηκαν με τον υπολογισμό της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD%). Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν εμβολιαστεί με συγκέντρωση 10 μg L⁻¹. Η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας κυμάνθηκε μεταξύ 3,7 και 10,6%, ενώ η επαναληψιμότητα μεταξύ των ημερών κυμάνθηκε από 3,3 έως 10,9% (Πίνακας 7.4).

7.4.3 Γραμμική περιοχή

Για να διερευνηθεί η γραμμικότητα της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσαις εμβολιασμένων δειγμάτων σε επτά επίπεδα συγκεντρώσεων. Κάθε μια από τις εκχυλίσαις εγχύθηκε εις τριπλούν στον αέριο χρωματογράφο (GC-MS). Οι γραμμικότητα κυμάνθηκε μεταξύ 0,993 και 0,999 ενώ η γραμμική περιοχή για κάθε ένωση που φαίνεται στον πίνακα 7.4.

7.4.4 Ορθότητα

Η ορθότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό των ανακτήσεων των ενώσεων. Για να υπολογιστεί οι ανακτήσεις χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Ανακτήσεις \%} = \frac{C \text{ αναλύτη που βρέθηκε}}{C \text{ αναλύτη που προστέθηκε}} \times 100\%$$

όπου C αναλύτη που βρέθηκε είναι η συγκέντρωση του αναλύτη που μετρήθηκε στο εμβολιασμένο δείγμα νερού μετά από ανάλυση στον GC-MS, και C αναλύτη που προστέθηκε είναι η θεωρητική συγκέντρωση του αναλύτη με την οποία εμβολιάστηκε το δείγμα.

Τα δείγματα νερού που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των ανακτήσεων δεν περιείχαν ίχνη υπολειμμάτων ΠΑΥ πάνω από το όριο ανίχνευσης. Οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλυτών και συγκεκριμένα στις συγκεντρώσεις της τάξης του LOQ, 5×LOQ και 10×LOQ για κάθε ένωση. Στον πίνακα 7.4 φαίνονται οι ανακτήσεις που πάρθηκαν στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. .

Πίνακας 7.4 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου.

Ένωση	R ²	RSD _r %	RSD _R %	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	Γραμμική περιοχή (ng L ⁻¹)	Ανακτήσεις % C=LOQ	Ανακτήσεις % C=5xLOQ	Ανακτήσεις % C=10xLOQ
Naphthalene	0,993	7,3	6,7	8	24	25 - 500	106	108	107
Acenaphthylene	0,998	5,0	4,6	13	39	50-750	104	105	104
Acenaphthene	0,999	3,7	3,3	12	36	50-750	89	97	98
Fluorene	0,998	4,3	5	13	39	50-750	86	93	94
Phenanthrene	0,996	5,1	4,7	18	54	75-1000	92	97	96
Anthracene	0,998	10,6	10,9	24	72	75-1000	111	113	114
Fluoranthrene	0,995	6,5	6,7	16	48	50-750	101	103	105
Pyrene	0,996	4,5	4,7	14	42	50-750	96	102	93
Benz[a]anthracene	0,998	6,5	8,2	46	138	150-1500	77	92	90
Chrysene	0,999	5,2	3,8	41	123	150-1500	70	89	91

7.5 Η επίδραση της χουμικής ύλης στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης

Η ύπαρξη χουμικής ύλης μπορεί να μειώσει την ποσότητα των εκχυλιζόμενων οργανικών ενώσεων και να παρέμβει στην ανάλυσή τους. Για αυτό το λόγο ήταν απαραίτητη η διερεύνηση της επίδρασης της χουμικής ύλης στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των αναλυτών στόχων (εκφρασμένη ως ανακτήσεις). Υδατικά δείγματα εμβολιάστηκαν με τους αναλύτες σε συγκέντρωση ίση με το όριο ποσοτικοποίησης για κάθε έναν αντίστοιχα. Ακολούθως εμπλουτίστηκαν με τρία επίπεδα συγκεντρώσεων χουμικού οξέως και συγκεκριμένα 12.5, 25 και 50 mg L⁻¹ και προσδιορίστηκαν με τη διαδικασία DSME/GC-MS. Στον πίνακα 7.5 φαίνονται οι ανακτήσεις που ελήφθησαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χουμικών οξέων για τις ουσίες που μελετήθηκαν. Για την πλειονότητα των αναλυτών, παρόμοιες ανακτήσεις ελήφθησαν παρουσία χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων χουμικών οξέων. Αυτό υποδηλώνει ότι η παρουσία της οργανικής ύλης έχει μικρή επίδραση στην ανίχνευση των αναλυτών.

Πίνακας 7.5 Ανακτήσεις αναλυτών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χουμικής ύλης

Ένωση	Ανακτήσεις %			
	Συγκέντρωση χουμικού οξέως (mg L ⁻¹)			
	0	12.5	25	50
Naphthalene	106	101	102	99
Acenaphthylene	104	101	99	100
Acenaphthene	89	87	88	85
Fluorene	86	85	83	86
Phenanthrene	92	89	90	87
Anthracene	111	105	102	101
Fluoranthrene	101	99	97	97
Pyrene	96	95	95	93
Benz[a]anthracene	77	75	73	74
Chrysene	70	71	73	70

7.6 Σύγκριση μεταξύ μεθόδων

Διεξήχθη μια στατιστική σύγκριση της αναπτυγμένης μεθόδου DSME με μια μέθοδο DLLME (Rezaee M. *et al.* 2006) για να ελεγχθεί η συμφωνία των αποτελεσμάτων σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ($n = 5$). Για λόγους ευκολίας θεωρήθηκε ότι η διακύμανση είναι σταθερή μεταξύ των διαφόρων δειγμάτων. Τα δείγματα εμβολιάστηκαν με συγκέντρωση 250 ng L⁻¹ για κάθε ΠΑΥ. Τόσο το F-test όσο και το T-test έδειξαν ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Επίσης η προτεινόμενη μέθοδος συγκρίθηκε και με άλλες μεθόδους μικροεκχύλισης όσον αφορά την προσδιορισμό ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα (Πίνακας 7.6). Η σύγκριση έδειξε ότι η DSME είναι σαφώς ταχύτερη από τις SPME (King A.J. *et al.* 2004) και HSPME (Djozan D. and Assadi Y. 1999) αφού η όλη διαδικασία δεν διαρκεί περισσότερο από 12 λεπτά. Παρόλο που η DSME έχει σχεδόν την ίδια ευαισθησία με την DLLME (Rezaee M. *et al.* 2006) το μειονέκτημα τους είναι η χρήση τοξικών διαλυτών εκχύλισης. Τέλος μόλις πρόσφατα ο Tseng *et al.* (Tseng W.-C. *et al.* 2014), ανέπτυξε δυο νέες βιώσιμες εναλλακτικές τεχνικές (UDSA-DLLME και WLSEME) όσον αφορά τις επιδόσεις και την ταχύτητα με μικρές περιορισμούς στην ευαισθησία.

Πίνακας 7.6 Σύγκριση μεταξύ μεθόδων μικροεκχύλισης

Μέθοδος	Διαλύτης εκχύλισης (μL)	Χρόνος εκχύλισης	LODs (μg/L)
SPME	- (Iva)	45 λεπτά	0.001-0.03
HSPME	- (Iva)	30 λεπτά	0.03-0.3
DLLME	Tetrachloroethylene (8 μL)	Μερικά δευτερόλεπτα	0.007-0.03
UDSA- DLLME	heptanol (14 μL)	3 λεπτά	0.02-0.06
WLSEME	Nonanol (9 μL)	Μερικά δευτερόλεπτα	0.02-0.13
DSME	Toluene (93 μL)	Μερικά δευτερόλεπτα	0.008-0.05

Κεφάλαιο 8°

Εφαρμογή στην λεκάνη απορροής του ποταμού Άραχθου

8.1 Περιγραφή της περιοχής δειγματοληψίας

Η περιοχή της Ηπείρου καταλαμβάνει το βορειοδυτικό τμήμα της Ελλάδας. Δυτικά βρέχεται από το Ιόνιο πέλαγος, ενώ Ανατολικά συνορεύει με τη Μακεδονία και τη Θεσσαλία. Νότια επεκτείνεται μέχρι τον κόλπο του Αμβρακικού και το νομαρχιακό διαμέρισμα της Αιτωλοακαρνανίας. Η περιοχή της Ηπείρου αποτελείται από τα νομαρχιακά διαμερίσματα της Άρτας, της Θεσπρωτίας, των Ιωαννίνων και της Πρέβεζας (Σχήμα 8.1). Η Ήπειρος είναι κυρίως ορεινή περιοχή επειδή αποτελείται κατά ένα μεγάλο μέρος από την οροσειρά της Πίνδου. Παρόλα ταύτα, η περιοχή της Ηπείρου έχει μερικά σημαντικά υδατικά συστήματα όπως οι ποταμοί Άραχθος, Καλαμάς, Λούρος και η λίμνη Παμβώτιδα.

Συγκεκριμένα ο Άραχθος είναι ο μεγαλύτερος ποταμός της Ηπείρου και διασχίζει ολόκληρο το νομό Άρτας και ένα κομμάτι του νομού Ιωαννίνων. Πηγάζει από τη Βόρεια Πίνδο από το όρος Λάκμωνα, στη θέση Οξυά Δεσπότη, σε υψόμετρο 1.700 m. Το μήκος του κυρίως ποταμού είναι περίπου 110 km.

Οι σημαντικότεροι παραπόταμοι του είναι: ο Ζαγορίτικος, ο Βάρδας, ο Μετσοβίτικος, ο Καλαρίτικος, ο Σαραντάπορος και ο Καλεντίνης.

Συνολικά η λεκάνη απορροής του Αράχθου μέχρι τις εκβολές του στον Αμβρακικό κόλπο καλύπτει, 2.005 km². Το κλίμα της περιοχής, χαρακτηρίζεται σαν ήπιο, μεσογειακού τύπου. Παρουσιάζει θερμό και ξηρό καλοκαίρι και υγρό, ήπια ψυχρό χειμώνα, με μέσο θερμομετρικό εύρος 16°C έως 18°C.

Στην αρχαιότητα ο ποταμός Άραχθος ονομαζόταν Ίναχος και ήταν πλωτός μέχρι την πόλη Αμβρακία. Το όνομα Ίναχος το οφείλει στον μυθικό αρχαίο βασιλέα του Άργους Ίναχο, γιος του Ωκεανού και της Τηθύος.

Το μεγαλύτερο τμήμα της λεκάνης καλύπτεται από αδιαπέρατους σχηματισμούς του φλύσχη. Συνοπτικά τα πετρώματα της λεκάνης απορροής του Αράχθου διακρίνονται σε αλλούβια, πλευρικά κορήματα, σκληρούς ασβεστόλιθους, μάργες και ψαμμιτικό φλύσχη (<http://www.ecoflow.gr/>).



Σχήμα 8.1 Χάρτης της περιοχής της Ηπείρου

Ανάμεσα από την πόλη της Άρτας και τον ορεινό όγκο των Τζουμέρκων και σε υψόμετρο 140μ βρίσκεται η λίμνη Πουρναρίου. Είναι μια τεχνητή λίμνη, 8η κατά σειρά στον κατάλογο των τεχνητών λιμνών της Ελλάδας, που δημιουργήθηκε από την συλλογή των νερών του ποταμού Άραχθου και την κατασκευή φράγματος κοντά στον οικισμό Πουρνάρι από όπου πήρε, την ονομασία, το φράγμα και η λίμνη.

Το φράγμα δόθηκε σε λειτουργία το 1981, έχει 450 μέτρα πλάτος στη βάση του, 580 μέτρα μέγιστο μήκος και 107 μέτρα ύψος. Αποτελεί το δεύτερο μεγαλύτερο φράγμα στην Ελλάδα

(μετά από αυτό του Μόρνου) και συγκρατεί τα νερά του Άραχθου ελέγχοντας και τη ροή του ποταμού, ο οποίος και περνά μέσα από την πόλη της Άρτας. Η λίμνη έχει επιφάνεια 18.3 τ.χλμ., μέγιστο μήκος τα 17.7 χλμ. και μέγιστο πλάτος τα 7.3 χλμ. Επίσημες αναφορές για το βάθος της λίμνης δεν υπάρχουν (<http://www.myvillage.gr/odoiporika/limni-pournariou-arta>).

Η λίμνη φιλοξενεί πολλές ποικιλίες ψαριών, όπως κυπρίνους, μπριάνες, άγρια πέστροφα, χέλι. Καταφύγιο βρίσκουν και πολλά πτηνά όπως πρασινοκέφαλες πάπιες αλκυόνες, ποταμοσφυριχτές κ.α.

Ως προς τις χρήσεις γης, στην ευρύτερη περιοχή καλλιεργούνται κυρίως τα εσπεριδοειδή (πορτοκάλια), οι ελιές, το καλαμπόκι, η μηδική, οι διάφοροι σανοί και τα κηπευτικά. Το Δέλτα του Αράχθου αποτελεί ένα από τα καλύτερα διατηρημένα οικοσυστήματα, τόσο σε εθνικό όσο και σε διεθνές επίπεδο ενώ διατηρεί όλα τα χαρακτηριστικά ενός τυπικού μεσογειακού δέλτα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη περιοχή αυτή εντοπίζεται ένα από τα πιο εντυπωσιακά πουλιά, το φοινικόπτερο ή φλαμίνγκο (*Phoenicopterus ruber*)

8.2 Επιλογή Αράχθου ως περιοχής δειγματοληψίας

Το συγκεκριμένο οικοσύστημα επιλέχθηκε γιατί τον Ιούνιο του 2010 απειλήθηκε με οικολογική καταστροφή τόσο ο Άραχθος ποταμός όσο και όλο το οικοσύστημα του Αμβρακικού μετά τη διαρροή 2 τόνων μαζούτ (Σχήμα 8.2). Η διαρροή έγινε από το χυμοποιείο πορτοκαλιών “Εσπερίδα”, το οποίο εδώ και 13 χρόνια δεν λειτουργεί, παραμένει όμως άγνωστο γιατί οι ιδιοκτήτες του δεν είχαν απομακρύνει τις δεξαμενές με μαζούτ.

Για την αποφυγή περαιτέρω μόλυνσης η ΔΕΗ η διέκοψε για 24 ώρες τη λειτουργία του υδροηλεκτρικού σταθμού που βρίσκεται λίγο πριν από το σημείο του ατυχήματος, προκειμένου να σταματήσει η ροή του νερού στο ποτάμι και να μη φύγει το μαζούτ στον Αμβρακικό Κόλπο, οπότε και δεν θα μπορούσε να ελεγχθεί και να συλλεχθεί (<http://greekriverfriends.blogspot.gr/2010/06/blog-post.html>).



Σχήμα 8.2 Η πετρελαιοκηλίδα που σχηματίστηκε στην περιοχή του ατυχήματος

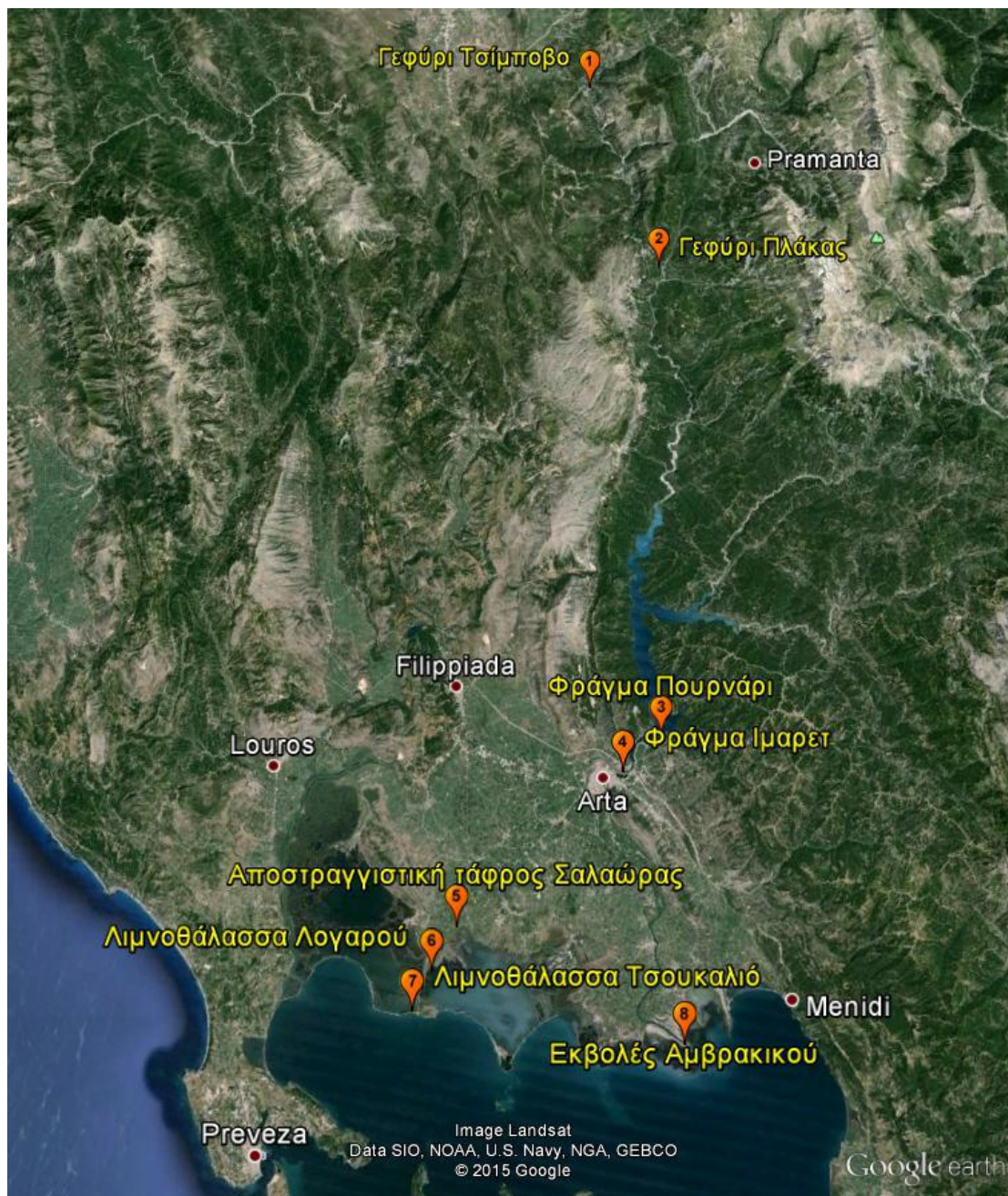
Έτσι το συγκεκριμένο οικοσύστημα κρίθηκε το πλέον κατάλληλο ώστε να ελεγχτεί για τυχόν υπολείμματα ΠΑΥ τόσο πριν αλλά κυρίως στο σημείο του ατυχήματος και μετά από αυτό μέχρι τον Αμβρακικό κόλπο.

Συνολικά επιλέχθηκαν οχτώ σημεία δειγματοληψίας πέντε εκ των οποίων κατά μήκος της ροής του ποταμού Αράχθου, μια αποστραγγιστική τάφρος και δυο σημεία σε δυο από τις λιμνοθάλασσες του Αμβρακικού κόλπου τα οποία και φαίνονται στην σχήμα 8.3.

Αναλυτικά τα σημεία δειγματοληψίας (στη συνέχεια θα αναφέρονται ως ΣΔ1, ΣΔ2 κ.ο.κ. για πρακτικούς λόγους συγγραφής) ήταν τα εξής:

- ΣΔ1 Γεφύρι Τσίμποβο
- ΣΔ2 Γεφύρι πλάκας
- ΣΔ3 Φράγμα Πουρνάρι
- ΣΔ4 Φράγμα Ιμαρετ
- ΣΔ5 Αποστραγγιστική τάφρος Σαλαώρας
- ΣΔ6 Λιμνοθάλασσα Λογαρού
- ΣΔ7 Λιμνοθάλασσα Τσουκαλιό
- ΣΔ8 Εκβολές Αμβρακικού ποταμού.

Οι δειγματοληψίες έγιναν από την άνοιξη του 2012 έως και τον χειμώνα του 2013. Συνολικά έγιναν τέσσερις δειγματοληψίες σε εποχιακή βάση. Δυόμιση λίτρα νερού συλλέγονταν από κάθε σημείο δειγματοληψίας σε σκουρόχρωμη φιάλη με πώμα τα οποία και έφταναν αυθημερόν στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων όπου και αποθηκεύονταν στο ψυγείο μέχρι να εκχυλιστούν.



Σήμα 8.3 Σημεία δειγματοληψίας.

8.3 Φυσικοχημικές παράμετροι

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων για τη μελέτη της υπολειμματικότητας των ΠΑΥ, προσδιορίστηκαν οι ακόλουθες φυσικοχημικές παράμετροι: pH, αιωρούμενα σωματίδια, αγωγιμότητα και αλατότητα,. Στον πίνακα 8.1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι φυσικοχημικοί παράμετροι των εν' λόγω δειγμάτων.

Πίνακας 8.1 Φυσικοχημικές παράμετροι ανά σταθμό και περίοδο δειγματοληψίας.

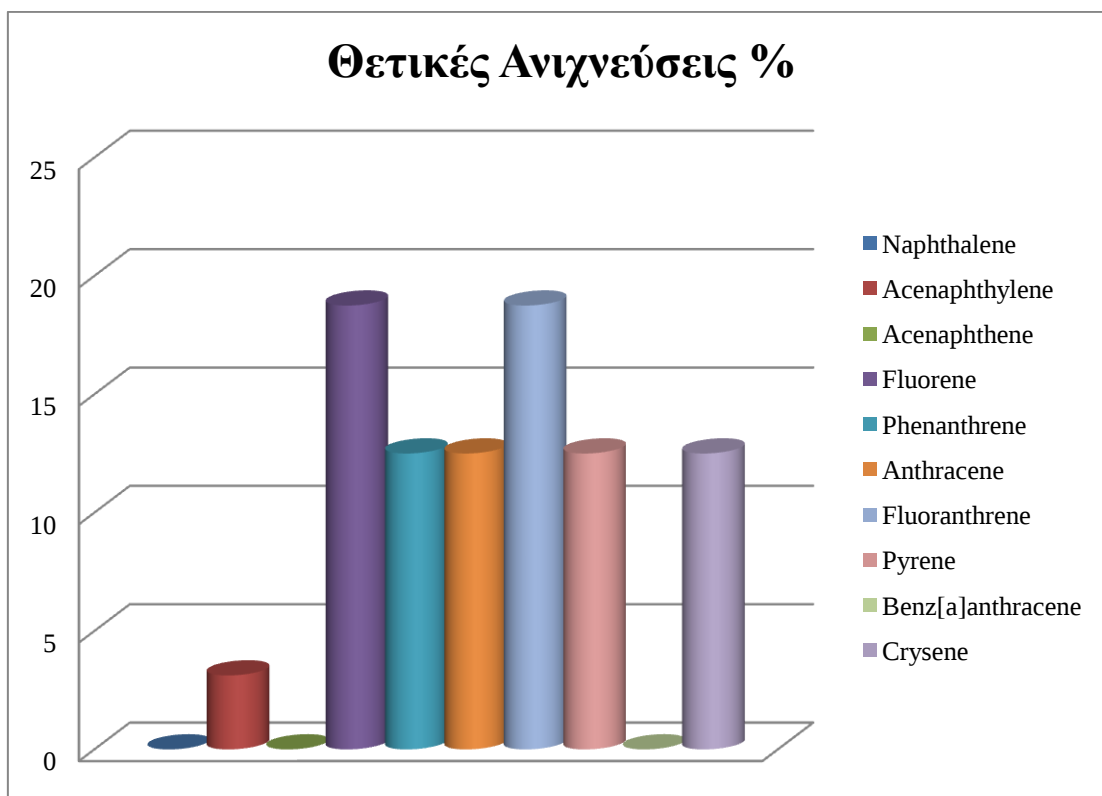
		pH	Αιωρούμενα σωματίδια mg L ⁻¹	Αγωγιμότητα μS cm ⁻¹	Αλατότητα ‰
Άνοιξη 2012	ΣΔ1	7,53	321	308	0
	ΣΔ2	7,68	358	324	0
	ΣΔ3	7,64	341	329	0
	ΣΔ4	7,74	374	387	0
	ΣΔ5	7,81	812	1850	0,9
	ΣΔ6	7,74	8540	26100	17,6
	ΣΔ7	7,82	9320	25400	17,4
	ΣΔ8	7,77	721	2340	1,2
Καλοκαίρι 2012	ΣΔ1	7,42	341	322	0
	ΣΔ2	7,58	352	339	0
	ΣΔ3	7,56	361	341	0
	ΣΔ4	7,63	388	393	0
	ΣΔ5	7,74	854	3560	1,2
	ΣΔ6	7,78	8320	33200	23,6
	ΣΔ7	7,88	8960	34500	24,1
	ΣΔ8	7,73	765	3250	1,8
Φθινόπωρο 2012	ΣΔ1	7,35	459	311	0
	ΣΔ2	7,45	489	329	0
	ΣΔ3	7,48	382	308	0
	ΣΔ4	7,56	462	349	0
	ΣΔ5	7,48	1025	1580	0,6
	ΣΔ6	7,69	11250	21600	15,5
	ΣΔ7	7,75	10690	23200	16,9
	ΣΔ8	7,59	1256	2020	1,0

Χειμώνας 2013	ΣΔ1	7,46	432	329	0
	ΣΔ2	7,53	469	305	0
	ΣΔ3	7,48	425	315	0
	ΣΔ4	7,62	439	336	0
	ΣΔ5	7,69	985	1750	0,8
	ΣΔ6	7,74	12560	22800	16,5
	ΣΔ7	7,89	12370	21900	15,9
	ΣΔ8	7,69	1360	1230	0,3

Όλες οι φυσικοχημικές παράμετροι κυμάνθηκαν σε φυσιολογικές τιμές. Οι αυξημένες τιμές αγωγιμότητας στους σταθμούς δειγματοληψίας 5 έως 8 εξηγούνται γιατί το νερό δεν είναι γλυκό. Έτσι παρατηρείται αυξημένη τιμή της αγωγιμότητας η οποία όμως θεωρείται φυσιολογική.

8.4 Αποτελέσματα αναλύσεων υπολειμμάτων ΠΑΥ

Από τους δέκα ΠΑΥ που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν στο υδάτινο οικοσύστημα του ποταμού Άραχθου – Αμβρακικού κόλπου, ανιχνεύθηκαν επτά στα αναλυόμενα δείγματα (Σχήμα 8.4). Οι θετικές ανιχνεύσεις των ΠΑΥ έγιναν σε μόλις τρία από τα επιλεγμένα σημεία δειγματοληψίας. Πιο συγκεκριμένα 24 από τις 29 θετικές ανιχνεύσεις το οποίο αντιστοιχεί σε ποσοστό 82.75% παρατηρήθηκαν στο ΣΔ4, το οποίο ήταν και το σημείο στο οποίο έγινε το ατύχημα. Τα υπόλοιπα σημεία στα οποία βρέθηκαν ΠΑΥ ήταν τα ΣΔ3 και ΣΔ5 με τις θετικές ανιχνεύσεις να είναι τέσσερις και μία ή 13,8% και 4,45% αντίστοιχα.



Σχήμα 8.4 Ποσοστά θετικών ανιχνεύσεων επί τοις εκατό.

Στον πίνακα 8.2 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις για κάθε ΠΑΥ ανά σημείο και εποχή δειγματοληψίας. Οι επιλεγμένοι ΠΑΥ για πρακτικούς λόγους συγγραφής θα εμφανίζονται με τα σύντομα ονόματα τους που είναι τα εξής:

- Naphthalene - Nap
- Acenaphthylene - Acel
- Acenaphthene - Ace
- Fluorene - Flu
- Phenanthrene - Phe
- Anthracene - Ant
- Fluoranthrene - Fla
- Pyrene - Pyr
- Benz[a]anthracene - Baa
- Crysene- Chr
-

Πίνακας 8.2 Συγκεντρώσεις ΠΑΥ εκφρασμένες σε ng/L

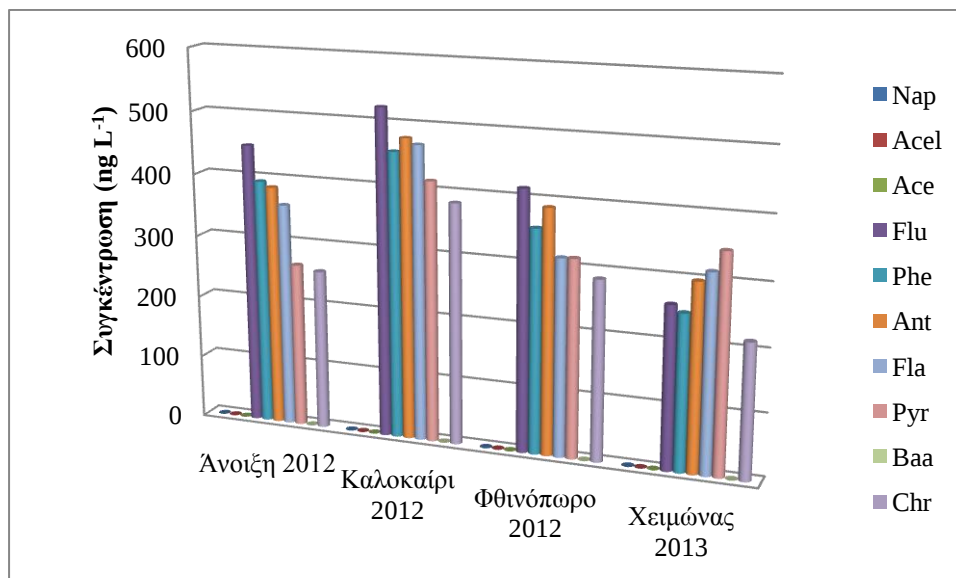
		Nap	Acel	Ace	Flu	Phe	Ant	Fla	Pyr	Baa	Chr
Ανοιξη 2012	ΣΔ1	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ2	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ3	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	443	Δ.Α.	Δ.Α.	359	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ4	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	449	393	385	358	263	Δ.Α.	256
	ΣΔ5	Δ.Α.	357	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ6	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ7	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ8	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
Καλοκαίρι 2012	ΣΔ1	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ2	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ3	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	489	Δ.Α.	Δ.Α.	423	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ4	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	523	456	478	469	415	Δ.Α.	384
	ΣΔ5	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ6	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ7	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ8	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
Φθινόπωρο 2012	ΣΔ1	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ2	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ3	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ4	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	415	356	389	314	315	Δ.Α.	287
	ΣΔ5	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ6	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ7	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ8	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.

Πίνακας 8.2 Συγκεντρώσεις ΠΑΥ εκφρασμένες σε ng/L (Συνέχεια)

		Nap	Acel	Ace	Flu	Phe	Ant	Fla	Pyr	Baa	Chr
Χειμώνας 2013	ΣΔ1	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ2	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ3	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ4	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	259	248	298	314	347	Δ.Α.	215
	ΣΔ5	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ6	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ7	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
	ΣΔ8	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.

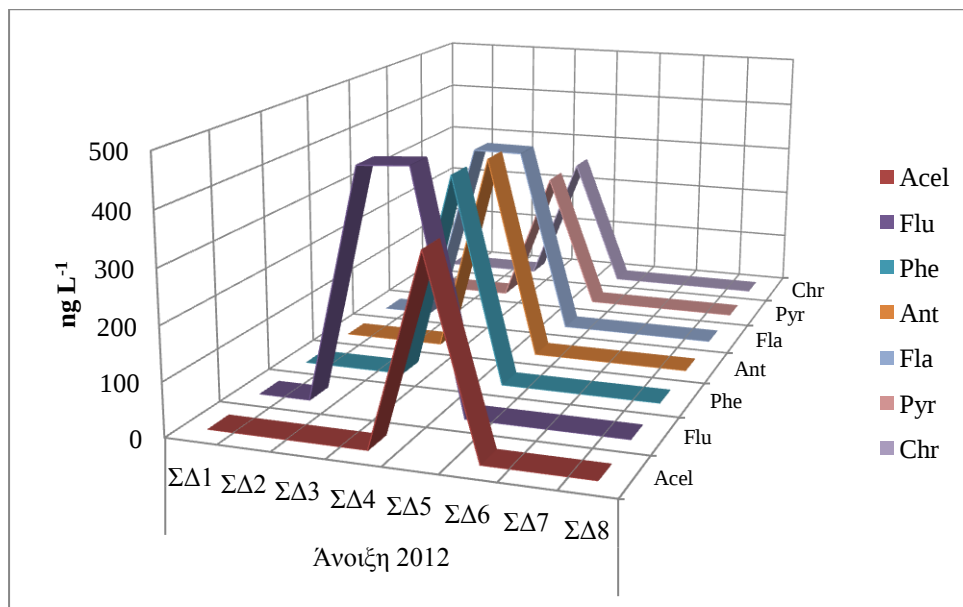
όπου Δ.Α.= δεν ανιχνεύθηκε

Παρακάτω παρουσιάζονται γραφικά οι ανιχνευθείσες συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων ΠΑΥ στο ΣΔ4 γιατί όπως έχει ήδη αναφερθεί ήταν το σημείο στο οποίο και έγινε το ατύχημα με τη διαρροή μαζούτ και επίσης βρέθηκαν οι περισσότερες θετικές ανιχνεύσεις (Σχήμα 8.5).

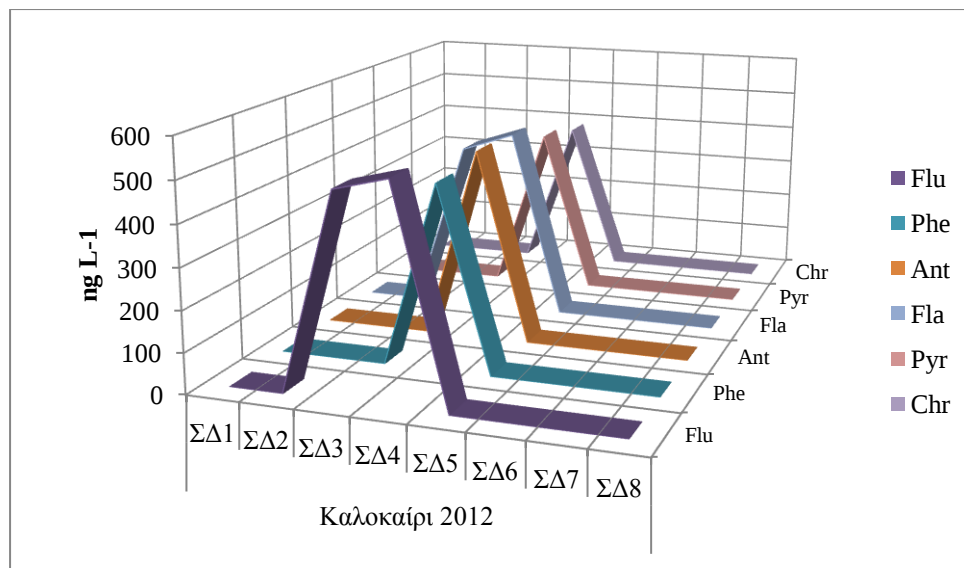


Σχήμα 8.5 Εποχιακή διακύμανση ΠΑΥ στο ΣΔ4

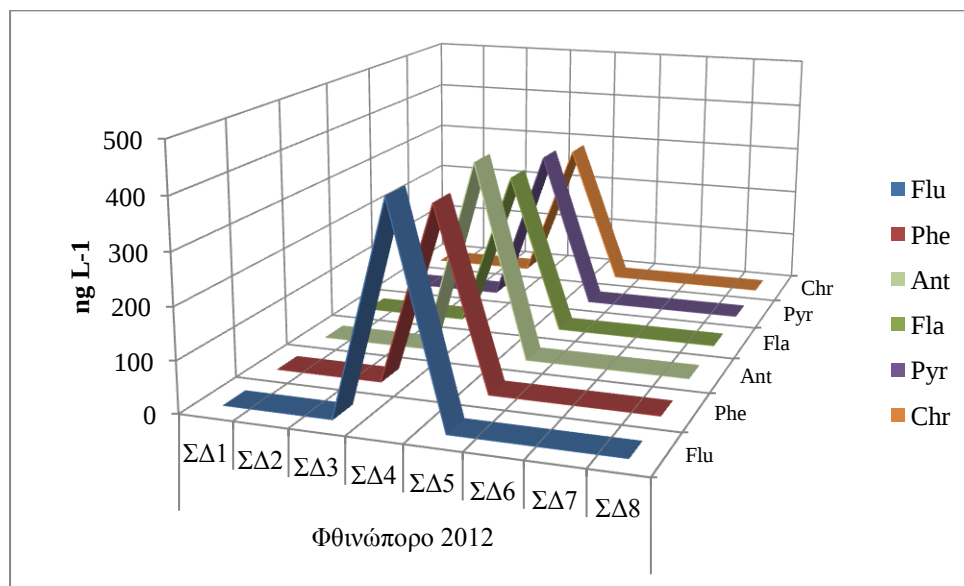
Επίσης στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται γραφικά οι διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των ανιχνευθέντων ΠΑΥ από σημείο σε σημείο.



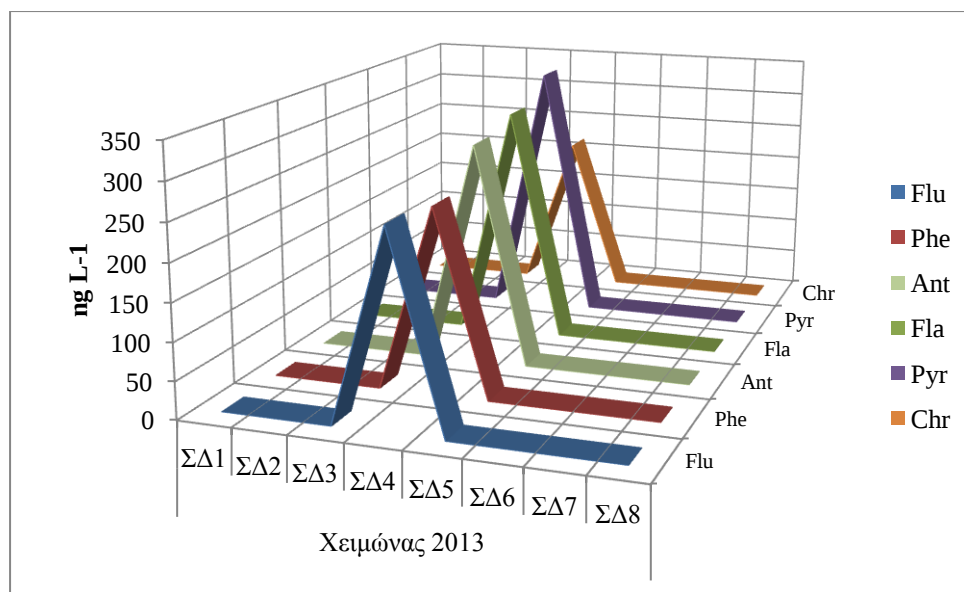
Σχήμα 8.6 Διακυμάνσεις συγκεντρώσεων ΠΑΥ από σημείο σε σημείο στη δειγματοληψία της Άνοιξης του 2012



Σχήμα 8.7 Διακυμάνσεις συγκεντρώσεων ΠΑΥ από σημείο σε σημείο στη δειγματοληψία του Καλοκαιριού του 2012



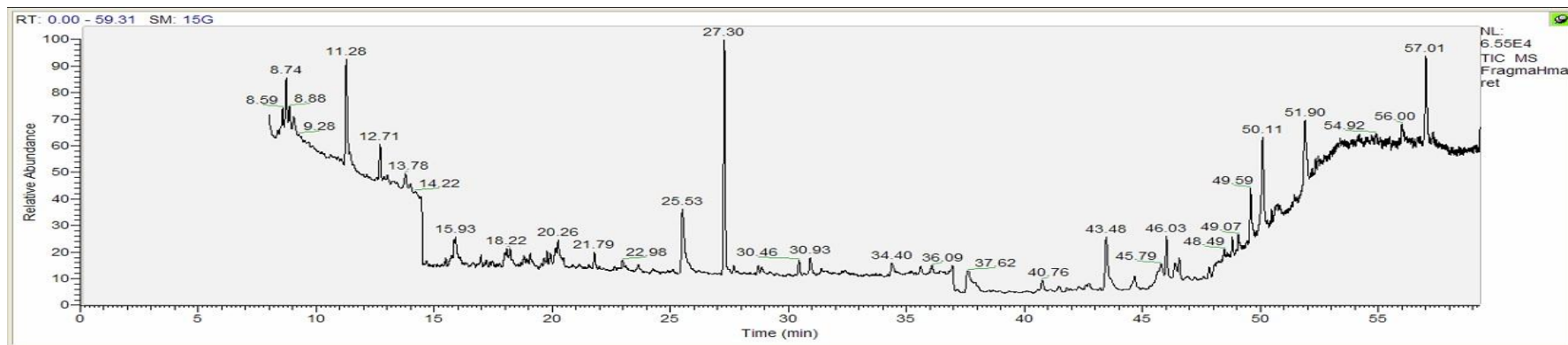
Σχήμα 8.7 Διακυμάνσεις συγκεντρώσεων ΠΑΥ από σημείο σε σημείο στη δειγματοληψία του Φθινοπώρου του 2012



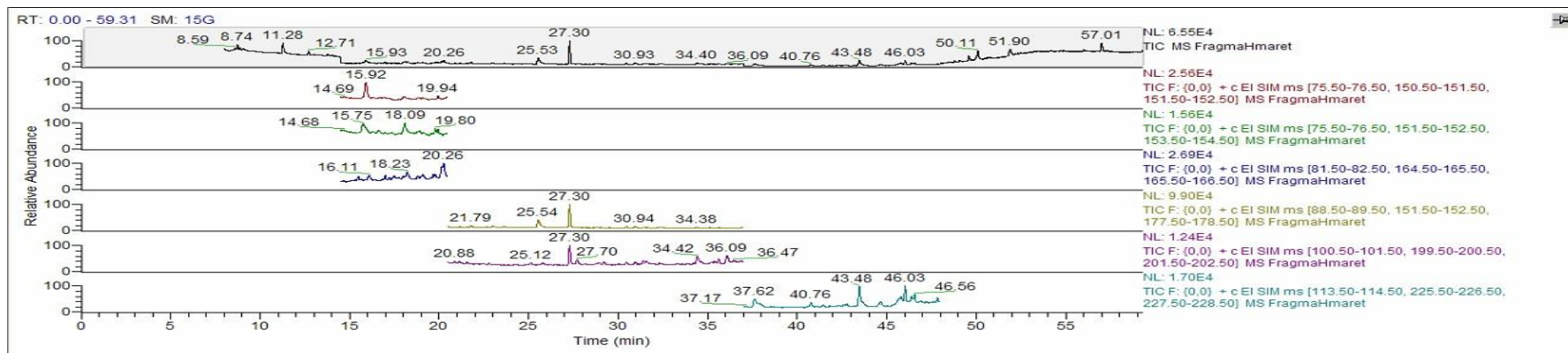
Σχήμα 8.7 Διακυμάνσεις συγκεντρώσεων ΠΑΥ από σημείο σε σημείο στη δειγματοληψία του Χειμώνα του 2013

Γενικά παρατηρείται μια ελαφριά αύξηση των συγκεντρώσεων την άνοιξη και κυρίως το καλοκαίρι σε σχέση με τις συγκεντρώσεις κατά τον χειμώνα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η στάθμη των υδάτων του ποταμού πέφτει κατά τους θερινούς μήνες. Από τη άλλη η κατακόρυφη αύξηση τόσο των θετικών ανιχνεύσεων όσο και των συγκεντρώσεων υπολειμμάτων ΠΑΥ στο σημείο αυτό υποδηλώνει ότι το πρόβλημα είναι σημειακό αφού δεν παρατηρείται ούτε πριν αλλά ούτε και μετά από αυτό το σημείο. Το πιθανότερο είναι τα υπολείμματα ΠΑΥ να ξεπλένονται από τα γύρω ιζήματα τα οποία είχαν επιβαρυνθεί σημαντικά μετά από την διαρροή μαζούτ. Το ανησυχητικό είναι όμως ότι τόσοι μετά το ατύχημα ανιχνεύονται ακόμη συγκεντρώσεις ΠΑΥ πράγμα που σημαίνει ότι ίσως να υπάρχουν ακόμη κάποιες ποσότητες μαζούτ στα ιζήματα οι οποίες και ξεπλένονται σιγά σιγά.

Όσων αφορά τα άλλα δυο σημεία, στα οποία βρέθηκαν ΠΑΥ, οι θετικές ανιχνεύσεις όπως προαναφέρθηκε ήταν κατά πολύ μικρότερες. Πιο συγκεκριμένα στο ΣΔ3 ανιχνεύθηκαν οι ΠΑΥ fluorene και fluoranthrene μόνο κατά την δειγματοληψία της άνοιξης και του καλοκαιριού. Τέλος στο ΣΔ5 βρέθηκε acenaphthylene μόνο κατά την δειγματοληψία της άνοιξης. Ο συγκεκριμένος ΠΑΥ δεν ανιχνεύθηκε τόσο σε κανένα άλλο σημείο δειγματοληψίας όσο και εποχή.



Σχήμα 8.6 Χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος στο Σ.Δ.4 (φράγμα Ιμαρέτ)



Σχήμα 8.7 Χρωματογράφημα των επί μέρους σει ιόντων πραγματικού δείγματος στο Σ.Δ.4 (φράγμα Ιμαρέτ)

8.5 Συμπεράσματα

Στον παρακάτω πίνακα 8.3 φαίνονται οι οργανικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν, το ποσοστό ανίχνευσης, η μέση τιμή και η διακύμανση των συγκεντρώσεων σε δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των 6 μηνών.

Ανιχνεύθηκαν υπολείμματα 7 ΠΑΥ από το σύνολο των 10 αναλυθέντων. Οι ΠΑΥ Fluorene και Fluoranthrene ήταν αυτοί με το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών ανιχνεύσεων (18,75%). Από την άλλη το Acenaphthylene ήταν ο ΠΑΥ με το χαμηλότερο ποσοστό ανιχνεύσεων (3,125%) αφού και ανιχνεύθηκε σε μόλις ένα δείγμα.

Όλες οι ανιχνευθείσες συγκεντρώσεις ΠΑΥ βρέθηκαν να ξεπερνούν, έστω και οριακά σε κάποιες περιπτώσεις, τα μέγιστα επιτρεπτά όρια που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για το πόσιμο νερό ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$). Ωστόσο, τα επίπεδα συγκεντρώσεων δεν θεωρούνται ιδιαίτερα υψηλά για επιφανειακά νερά.

Πίνακας 8.3 Θετικές ανιχνεύσεις %, μέση τιμή και διακύμανση συγκεντρώσεων

Ένωση	Θετικές Ανιχνεύσεις % (N=32)	Μέση τιμή (ng L^{-1})	Διακύμανση (ng L^{-1})
Naphthalene	0		Δ.Α.
Acenaphthylene	3,125	357	Δ.Α. - 357
Acenaphthene	0		Δ.Α.
Fluorene	18,75	430	Δ.Α. - 523
Phenanthrene	12,5	363	Δ.Α. - 456
Anthracene	12,5	388	Δ.Α. - 478
Fluoranthrene	18,75	373	Δ.Α. - 469
Pyrene	12,5	335	Δ.Α. - 415
Benz[a]anthracene	0		Δ.Α.
Crysene	12,5	286	Δ.Α. - 384

όπου Δ.Α.= δεν ανιχνεύθηκε

Κεφάλαιο 9^ο

Εκτίμηση περιβαλλοντικού κινδύνου από την υπολειμματικότητα ΠΑΥ

9.1 Γενικά

Η ρύπανση από την υπολειμματικότητα των ΠΑΥ είναι ένα θέμα που εγείρει μεγάλη ανησυχία σε όλες τις αρχές διασφάλισης της ποιότητας των φυσικών υδάτων σε παγκόσμιο επίπεδο λόγω κυρίως των επιπτώσεων στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και στους έμβιους οργανισμούς. Είναι μια ανησυχία δικαιολογημένη, αναλογιζόμενοι το μεγάλο ποσοστό των οργανικών ενώσεων που επιβαρύνουν τα φυσικά ύδατα, το έδαφος αλλά και κατ' επέκταση τα οικοσυστήματά τους.

Ο μεγάλος όγκος επιστημονικών ερευνών που αφορούν την παρακολούθηση, καταγραφή, ερμηνεία και έκθεση των αποτελεσμάτων της υπολειμματικότητας των ΠΑΥ, είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για να εξαχθούν κάποια πολύ σημαντικά συμπεράσματα (Bandowe B.A.M. *et al.* 2014, Guillén D. *et al.* 2012, Yang D. *et al.* 2013). Τα συμπεράσματα αναφέρονται στην ύπαρξη επιβλαβών-τοξικών ενώσεων στο περιβάλλον που επηρεάζουν τους φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς άμεσα ή έμμεσα. Άμεσα, προκαλώντας διαταραχές στους οργανισμούς όπως μεταβολές στην συμπεριφορά, στις μεταβολικές διαδικασίες, σε κυτταρικό επίπεδο, στην αύξηση του πληθυσμού ενός οργανισμού και τέλος επιφέροντας μέχρι και τον θάνατο. Έμμεσα, προκαλώντας μεταβολές στο περιβάλλον ενός οργανισμού με αποτέλεσμα να κινδυνεύει η επιβίωση του.

Επομένως, η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου είναι απαραίτητο εργαλείο για να εκτιμηθούν τα αρνητικά αποτελέσματα της υπολειμματικότητας των οργανικών ενώσεων στα οικοσυστήματα. Η διαδικασία εκτίμησης της επικινδυνότητας μπορεί να αναπτυχθεί μέσω τριών βημάτων: α) εκτίμηση της έκθεσης του περιβάλλοντος σε ΠΑΥ β) εκτίμηση των τοξικών επιδράσεων στους υδρόβιους οργανισμούς γ) εκτίμηση της πιθανότητας για ανεπιθύμητα αποτελέσματα (Qin N. *et al.* 2013).

9.2 Μέθοδο του πηλίκου (Risk quotient method)

Προκειμένου να βρεθεί το επίπεδο τοξικότητας για κάθε οργανισμό, πρέπει να χρησιμοποιηθούν κάποιες τοξικές τιμές αναφοράς TVR (toxic reference values) που αντικατοπτρίζουν τις επιδράσεις των οργανικών ενώσεων σε αντιπροσωπευτικούς οργανισμούς. Αυτές οι τοξικές τιμές αναφοράς TVR είναι: η θανατηφόρος δόση LD₅₀ (Lethal Dose) σε mg ουσίας ανά kg σώματος, όταν η τοξική ουσία χορηγείται διά στόματος ή η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας LC₅₀ (Lethal Concentration) σε ppm στο περιβάλλον, που επιφέρει το θάνατο στο 50 % των ατόμων της ομάδας που εκτίθενται για συγκεκριμένο χρόνο (24 ή 48 ή 96 ώρες) στην ουσία (Μπαρέλος Δ. 2006).

Η μέθοδος του πηλίκου είναι ο πιο απλός τρόπος να εκτιμηθεί ο περιβαλλοντικός κίνδυνος για συγκεκριμένες ενώσεις και οργανισμούς. Η κάθε επιβλαβής ουσία συμβάλει στην ολική τοξικότητα και η συνεισφορά της δίνεται από τη τιμή του πηλίκου, το οποίο εκφράζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$RQ = \frac{\text{έκθεση στην ουσία}}{\text{τοξικότητα της ουσίας}} = \frac{\text{συγκέντρωση της ουσίας στο νερό ή το ίζημα}}{LC_{50} \text{ or } EC_{50}}$$

Το άθροισμα όλων των τοξικών πηλίκων των ανιχνευθέντων οργανικών ενώσεων μας δίνουν μια εκτίμηση της ολικής τοξικότητας του δείγματος. Η εκτίμηση της επικινδυνότητας πρόκειται για ένα μέτρο προστασίας και πρέπει να βασίζεται στο χειρότερο δυνατό σενάριο. Επομένως, στους υπολογισμούς χρησιμοποιούνται οι μέγιστες τιμές των συγκεντρώσεων και οι μέσες τιμές από τις τοξικές τιμές αναφοράς για μια συγκεκριμένη ταξονομική ομάδα. Οι τοξικές τιμές αναφοράς TVR βρίσκονται από βιβλιογραφικά δεδομένα και από βάσεις δεδομένων (<http://ec.europa.eu/jrc/> , www.env.go.jp/en/chemi , www.sigmaaldrich.com , www.usepa.com) (Πίνακας 9.1).

Πίνακας 9.1 Τοξικές τιμές αναφοράς (TVR) για υδρόβιους οργανισμούς (μg/L).

Ένωση	Φυτοπλαγκτόν (96h, EC ₅₀) <i>Algae</i>	Ζωοπλαγκτόν (48h, EC ₅₀) <i>Daphnia Magna</i>	Ψάρια (96h, LC ₅₀) <i>Oncorhynchus mykiss</i>
Naphthalene	190-400	1000-3400	900-9800
Acenaphthylene	↔	↔	↔
Acenaphthene	520-530	1270-3450	670
Fluorene	760	730	760
Phenanthrene	410	380	3200
Anthracene	3,1	81-112	1
Fluoranthrene	5400	5-10	7,7
Pyrene	2400	1600	2000
Benz[a]anthracene	↔	4,2	1,8
Chrysene	0,63	3,97	↔

Όπου ↔ :Δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία

Για την κατανόηση και την καλύτερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων υπάρχουν κάποια αποδεδειγμένα μέσω της βιβλιογραφίας όρια ανησυχίας όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 9.2:

Πίνακας 9.2 Επίπεδα κινδύνου οξείας τοξικότητας με βάση το πηλίκο επικινδυνότητας

Χαμηλό	RQ<0.01
Χαμηλό-Μεσαίο	0.01<RQ<0.1
Μεσαίο	RQ=0.1
Μεσαίο-Υψηλό	0.1<RQ<1
Πολύ υψηλό	RQ≥1

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα δεδομένα, έγινε μια προσπάθεια να δοθεί μια πρώτη εκτίμηση για την σοβαρότητα του περιβαλλοντικού κινδύνου από την υπολειμματικότητα των ΠΑΥ, που μπορεί να ελλοχεύει για τους υδρόβιους οργανισμούς του μελετώμενου συστήματος.

9.3 Εκτίμηση επικινδυνότητας με βάση την υπολειμματικότητα ΠΑΥ στον Αραχθο ποταμό

Στους παρακάτω πίνακες δίνεται μια συνολική άποψη για τα επίπεδα επικινδυνότητας σε κάθε ταξονομική ομάδα (φυτοπλαγκτόν, ζωοπλαγκτόν και ψάρια) του επιλεχθέντος συστήματος, με βάση τα σημεία δειγματοληψίας. Εκτίμηση επικινδυνότητας έγινε μόνο για τα ΣΔ3 και ΣΔ4. Για το ΣΔ5, στο οποίο βρέθηκε Acenaphthylene κατά την δειγματοληψία της άνοιξης, δεν έγινε εκτίμηση επικινδυνότητας αφού δεν βρέθηκαν διαθέσιμες τοξικές τιμές αναφοράς για τον συγκεκριμένο ΠΑΥ. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ότι όλες οι ανιχνευθείσες ουσίες κατατάσσονται στην κατηγορία χαμηλής επικινδυνότητας για το φυτοπλαγκτόν. Εξαιρέση αποτελούν τα Anthracene και Chrysene το οποίο κατατάσσεται στην κατηγορία μεσαίου-υψηλού κινδύνου για το σημεία ΣΔ4.

Πίνακας 9.3 Εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου για το φυτοπλαγκτόν (οργανισμός δείκτης: *Algae*) με βάση τις ανιχνευθείσες συγκεντρώσεις

Επίπεδο κινδύνου (Από οξεία τοξικότητα)					
Φυτοπλαγκτόν	Χαμηλό (RQ<0.01)	Χαμηλό-Μεσαίο (0.01<RQ<0.1)	Μεσαίο (RQ=0.1)	Μεσαίο-Υψηλό (0.1< RQ <1)	Πολύ υψηλό (RQ≥1)
ΣΔ3	Fluorene				
	Fluoranthrene				
ΣΔ4	Fluorene				
	Phenanthrene				
	Fluoranthrene				
	Pyrene			Anthracene	
	Chrysene			Chrysene	

Σε αντίθεση με το φυτοπλαγκτόν, το ζωοπλαγκτόν φαίνεται να δέχεται μικρότερες πιέσεις από την παρουσία ΠΑΥ αφού καμία από τις ανιχνευθείσες ουσίες δεν ανήκει στην κατηγορία μεσαίου-υψηλού κινδύνου. Ομοίως και εδώ φαίνεται ότι όλες οι όλες οι ανιχνευθείσες ουσίες για το φυτοπλαγκτόν κατατάσσονται στην κατηγορία χαμηλής επικινδυνότητας όπως για το φυτοπλαγκτόν. Εξαιρέση αποτελούν τα Fluoranthrene και Chrysene. Όσον αφορά το Fluoranthrene κατατάσσεται στην κατηγορία χαμηλού-μεσαίου κινδύνου και για τα δυο σημεία δειγματοληψίας ενώ το Chrysene κατατάσσεται στην κατηγορία χαμηλού-μεσαίου κινδύνου μόνο για το ΣΔ4.

Πίνακας 9.4 Εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου για το ζωοπλαγκτόν (οργανισμός δείκτης: *Daphnia Magna*) με βάση τις ανιχνευθείσες συγκεντρώσεις

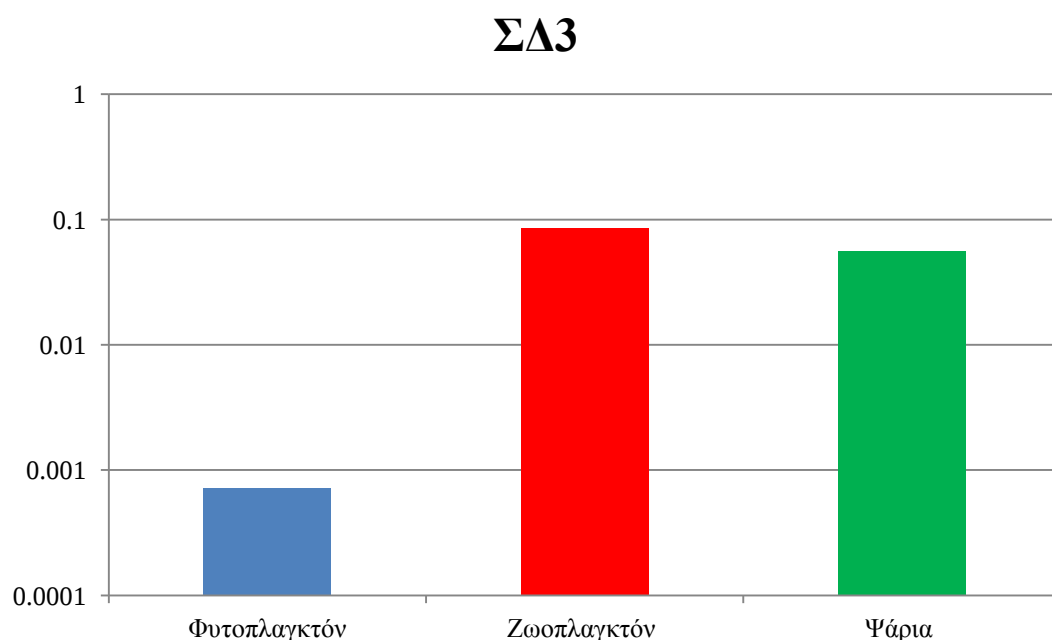
Επίπεδο κινδύνου (Από οξεία τοξικότητα)					
Ζωοπλαγκτόν	Χαμηλό	Χαμηλό-Μεσαίο	Μεσαίο	Μεσαίο-Υψηλό	Πολύ υψηλό
	(RQ<0.01)	(0.01<RQ<0.1)	(RQ=0.1)	(0.1< RQ <1)	(RQ≥1)
ΣΔ3	Fluorene	Fluoranthrene			
ΣΔ4	Fluorene				
	Phenanthrene	Fluoranthrene			
	Anthracene	Chrysene			
	Pyrene				

Τέλος όσον αφορά τα ψάρια, οι περισσότερες ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία του χαμηλού κινδύνου. Εξαιρέση αποτελεί το Fluoranthrene το οποίο κατατάσσεται στην κατηγορία χαμηλού-μεσαίου κινδύνου και για τα δυο σημεία δειγματοληψίας. Τις εντονότερες πιέσεις στα ψάρια φέρεται ότι προέρχονται από το Anthracene αφού στο ΣΔ4 κατατάσσεται στην κατηγορία μεσαίου-υψηλού κινδύνου.

Πίνακας 9.5 Εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου για τα ψάρια (οργανισμός δείκτης: *Oncorhynchus mykiss*) με βάση τις ανιχνευθείσες συγκεντρώσεις

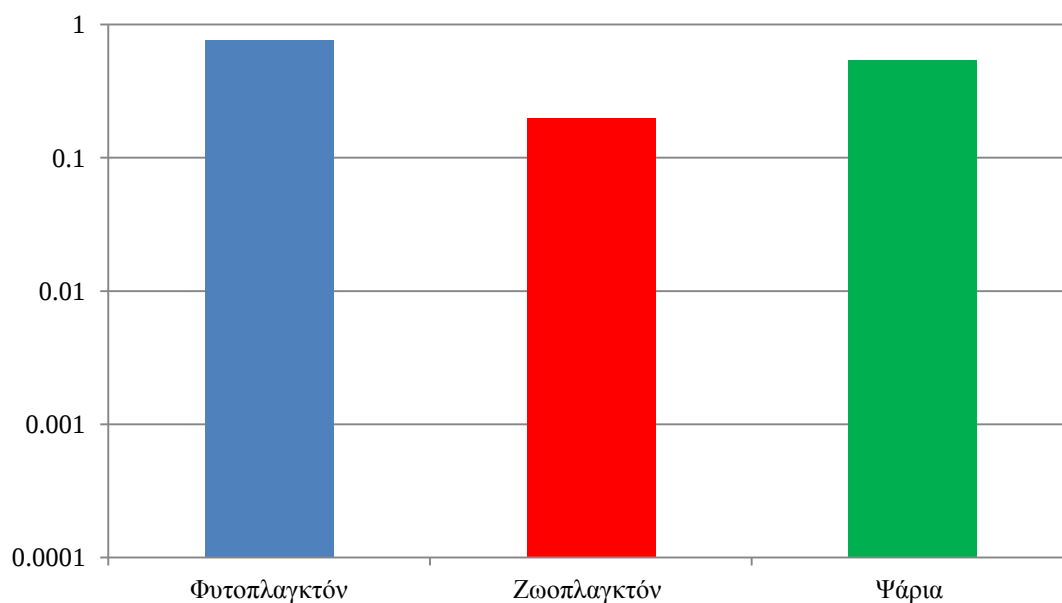
Ψάρια	Επίπεδο κινδύνου (Από οξεία τοξικότητα)				Πολύ υψηλό ($RQ \geq 1$)
	Χαμηλό ($RQ < 0.01$)	Χαμηλό-Μεσαίο ($0.01 < RQ < 0.1$)	Μεσαίο ($RQ = 0.1$)	Μεσαίο-Υψηλό ($0.1 < RQ < 1$)	
ΣΔ3	Fluorene	Fluoranthrene			
	Fluorene				
ΣΔ4	Phenanthrene	Fluoranthrene		Anthracene	
	Pyrene				

Στα διαγράμματα που ακολουθούν για το ΣΔ3 (Σχήμα 9.1) και ΣΔ4 (Σχήμα 9.2) φαίνονται οι επιπτώσεις που δέχεται ο εκάστοτε οργανισμός δείκτης. Όπως φαίνεται οι σημαντικότερες ενδεχόμενες επιπτώσεις μεταξύ των δυο σημείων δειγματοληψίας υπάρχουν στο ΣΔ4 όπου και όλοι οι οργανισμοί δέχονται υψηλή τοξικότητα.



Σχήμα 9.1 Εκτίμηση επικινδυνότητας για τρεις βιοκοινότητες στο ΣΔ3.

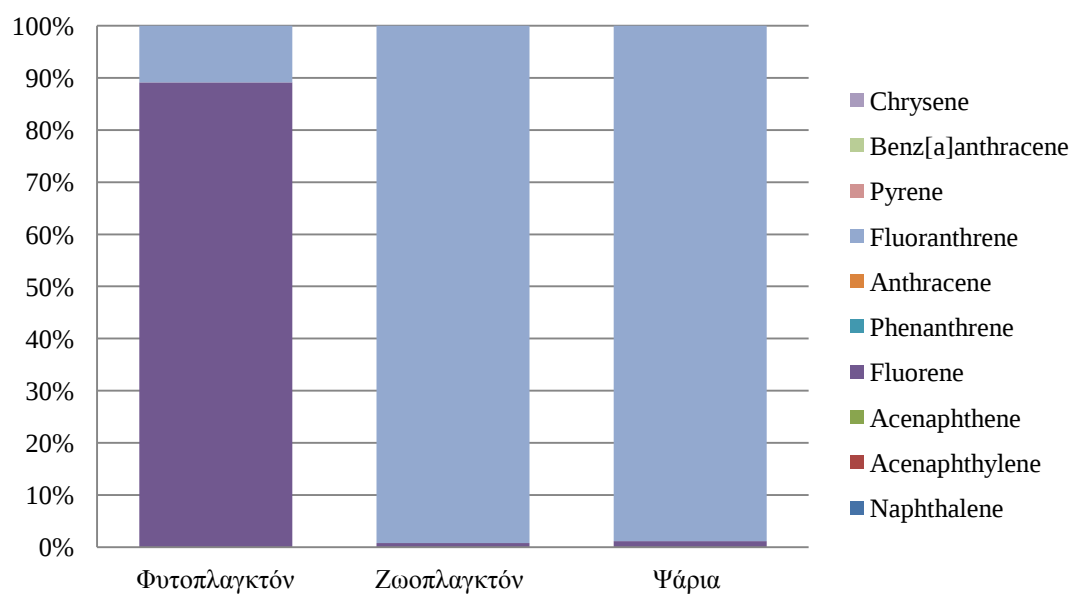
ΣΔ4



Σχήμα 9.2 Εκτίμηση επικινδυνότητας για τρεις βιοκοινότητες στο ΣΔ4.

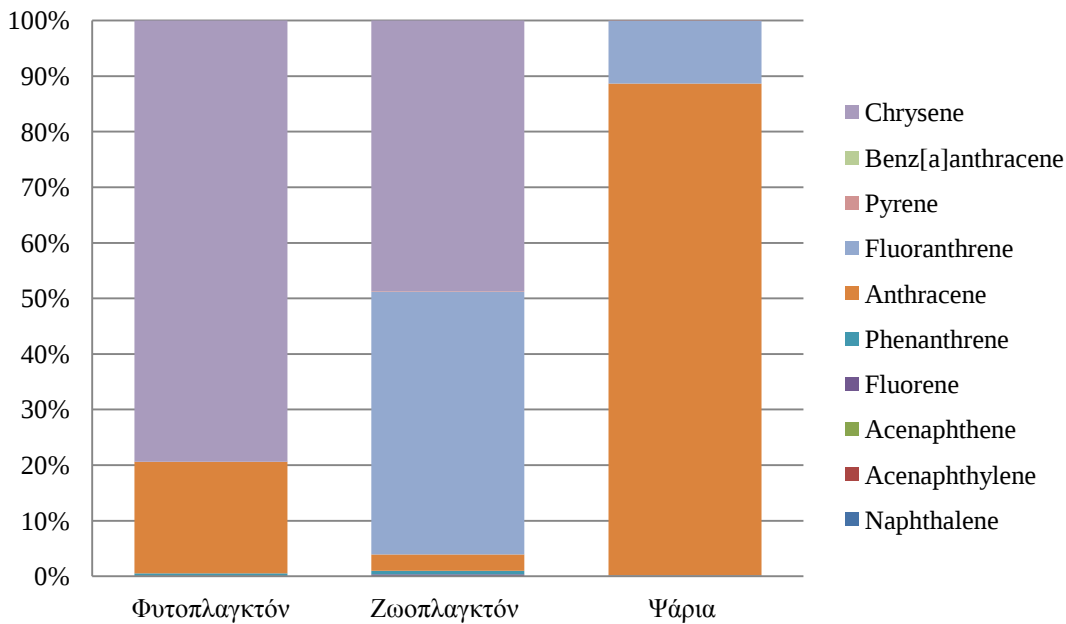
Τέλος στα ακόλουθα γραφήματα φαίνεται η εκατοστιαία συνεισφορά του κάθε ΠΑΥ στην ολική τοξικότητα για τις τρεις βιοκοινότητες.

ΣΔ3



Σχήμα 9.3 Επί τοις εκατό συνεισφορά του κάθε ΠΑΥ για το ΣΔ3

ΣΔ4



Σχήμα 9.4 Επί τοις εκατό συνεισφορά του κάθε ΠΑΥ για το ΣΔ3

9.4 Συμπεράσματα

Μέσα από την παράθεση των αποτελεσμάτων είναι εμφανές ότι η υπολειμματικότητα των ΠΑΥ έχει επιπτώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς του ποταμού Άραχθου. Και οι τρεις οργανισμοί δείκτες δέχονται σχεδόν το ίδιο ποσοστό επιβάρυνσης.

Αυξημένα επίπεδα τοξικότητας αναφορικά και με τρεις βιοκοινότητες βρέθηκαν στο σημείο δειγματοληψίας ΣΔ4. Αυτό ήταν αναμενόμενο λόγω των συγκεντρώσεων των ΠΑΥ που ανιχνεύθηκαν που ήταν αποτέλεσμα του ατυχήματος με τη διαρροή μαζούτ.

Εν κατακλείδι, ο προσδιορισμός του πηλίκου επικινδυνότητας αποτελεί μια απλή, γρήγορη και εύχρηστη μέθοδο, για να δοθεί μια εμπειριστατωμένη εκτίμηση του κινδύνου που διατρέχουν οι υδρόβιοι οργανισμοί από την υπολειμματικότητα των οργανικών ενώσεων. Ωστόσο, η μέθοδος είναι συντηρητική και δεν λαμβάνει υπόψη τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που μπορεί να επιδρούν στην τοξικότητα των ΠΑΥ όπως η θερμοκρασία ή ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας, αλλά και τις τυχόν συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές δράσεις των εξεταζόμενων ενώσεων. Ο συνδυασμός της μεθόδου του πηλίκου με άλλες μεθόδους εκτίμησης της επικινδυνότητας όπως η

μέθοδος των πιθανοτήτων αλλά και περισσότερα δεδομένα, θα ήταν ο καλύτερος τρόπος για να για να επιτευχθεί το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα όσο αφορά τη πρόβλεψη των περιβαλλοντικών κινδύνων.

Δ. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε μια απλή αναλυτική μέθοδος, για τον προσδιορισμό δέκα πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε υδατικά δείγματα. Επίσης, έγινε εφαρμογή της στη λεκάνη απορροής του ποταμού Άραχθου και εκτιμήθηκε η περιβαλλοντική τους επικινδυνότητα. Η μέθοδος βασίστηκε στην εφαρμογή της υγρής-υγρής μικροεκχύλισης αιωρούμενου διασπαρμένου σταγονιδίου (dispersive suspended microextraction, DSME) σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS).

Για πρώτη φορά η συγκεκριμένη τεχνική μικροεκχύλισης (DSME) εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης βασίστηκε σε χημειομετρικές μεθόδους. Συγκεκριμένα έλαβαν χώρα ένα στάδιο διαλογής-αξιολόγησης (Plackett–Burman design) καθώς και ένα στάδιο βελτιστοποίησης κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού (central composite design, CCD).

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε φέρεται να πληροί όλα τα αναλυτικά κριτήρια επικύρωσης. Η ευαισθησία και η γραμμική δυναμική περιοχή ήταν χαμηλές, επιτρέποντας ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων νερού. Έτσι επετεύχθη ακριβής μέτρηση των ενώσεων στόχων στα επιφανειακά ύδατα.

Στην συγκεκριμένη έρευνα, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε εποχιακή βάση σε 8 σημεία στο υδάτινο οικοσύστημα του ποταμού Άραχθου – Αμβρακικού κόλπου από την Άνοιξη του 2012 έως τον χειμώνα του 2012. Από τους δέκα ΠΑΥ που επιλέχτηκαν για να μελετηθούν, ανιχνεύθηκαν επτά στα αναλυόμενα δείγματα. Οι θετικές ανιχνεύσεις των ΠΑΥ έγιναν σε μόλις τρία από τα επιλεγμένα σημεία δειγματοληψίας. Το μεγαλύτερο πρόβλημα ωστόσο φέρεται να υπάρχει στο σημείο δειγματοληψίας 4 αφού εκεί παρατηρήθηκαν οι 24 από τις 29 θετικές ανιχνεύσεις το οποίο αντιστοιχεί σε ποσοστό 82.75%. Αυτό ήταν λίγο πολύ αναμενόμενο αφού τον Ιούνιο του 2010 έγινε διαρροή δυο τόνων μαζούτ στο σημείο αυτό. Το ανησυχητικό όμως είναι ότι δυο χρόνια μετά την διαρροή ανιχνεύονται ακόμη υπολείμματα ΠΑΥ.

Με βάση τις συγκεντρώσεις των ΠΑΥ που προσδιορίστηκαν, έγινε εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από την παρουσία των συγκεκριμένων ενώσεων σε τρεις κατηγορίες οργανισμών (φυτοπλαγκτόν, ζωοπλαγκτόν, ψάρια). Μέσα από την παράθεση των αποτελεσμάτων είναι εμφανές ότι η υπολειμματικότητα των ΠΑΥ έχει επιπτώσεις στους

υδρόβιους οργανισμούς του ποταμού Άραχθου. Και οι τρεις οργανισμοί δείκτες δέχονται σχεδόν το ίδιο ποσοστό επιβάρυνσης. Ο προσδιορισμός όμως των έμμεσων επιπτώσεων της τοξικότητας των ΠΑΥ (λόγω και των μεταλλαξιογόνων και καρκινογόνων ιδιοτήτων τους) είναι εξαιρετικά πολύπλοκος, μιας και απαιτείται η άριστη γνώση των βιολογικών διεργασιών που διέπουν τα υδροτοπικά οικοσυστήματα, τη συμπεριφορά των ενώσεων και την κατάλληλη προσαρμογή τους στις συνθήκες της συγκεκριμένης περιοχής μελέτης. Είναι όμως δεδομένο το πέρασμα των ενώσεων στην τροφική αλυσίδα με τις όποιες επιπτώσεις συνεπάγεται το γεγονός αυτό. Θα πρέπει λοιπόν η εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων να συμπεριλαμβάνει και οργανισμούς έξω από το υδάτινο οικοσύστημα που δεν επηρεάζονται άμεσα αλλά έμμεσα.

Τέλος, η παρούσα εργασία ολοκληρώθηκε δημιουργώντας νέα θέματα για περαιτέρω μελέτη. Συγκεκριμένα θα πρέπει να γίνει συλλογή δειγμάτων ιζημάτων σε όλο το οικοσύστημα για να είναι πλήρης η εικόνα για αυτό το ποτάμιο σύστημα.

Διεθνής βιβλιογραφία

2002/657/EC, Commission Decision 12 August 2002, Off. J. Eur. Commun., L221, 2002, 8–36.

Ahmadvand M., Sereshti H. and Parastar H., *"Chemometric-Based Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous Samples Using Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction Combined to Gas Chromatography–Mass Spectrometry"*, Journal of Chromatography A, 1413, 2015, 117-126.

Albanis T.A., Danis T.G. and Hela D.G., *"Transportation of Pesticides in Estuaries of Louros and Arachthos Rivers (Amvrakikos Gulf, N. W. Greece)"*, Science of the Total Environment, 171 (1–3), 1995, 85-93.

Alder L., Greulich K., Kempe G. and Vieth B., *"Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by Gc-MS or Lc-MS/MS?"*, Mass Spectrometry Reviews, 25 (6), 2006, 838-865.

Anselsietter V. and Heimpel H., *"Acute Hematotoxicity of Oral Benzo(a)Pyrene: The Role of the Ah Locus"*, Acta Haematologica, 76 (4), 1986, 217-223.

Antony J., *"Design of Experiments for Engineers and Scientists"*, 2003, Elsevier Science & Technology Books.

Baek S.O., Field R.A., Goldstone M.E., Kirk P.W., Lester J.N. and Perry R., *"A Review of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Fate and Behavior"*, Water, Air, and Soil Pollution, 60 (3-4), 1991, 279-300.

Bandowe B.A.M., Bigalke M., Boamah L., Nyarko E., Saalia F.K. and Wilcke W., *"Polycyclic Aromatic Compounds (Pahs and Oxygenated Pahs) and Trace Metals in Fish Species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and Health Risk Assessment"*, Environment International, 65 (0), 2014, 135-146.

Bedding N.D., McIntyre A.E. and Lester J.N., *"Organic Contaminants in the Aquatic Environment Iii. Public Health Aspects, Quality Standards and Legislation"*, Science of the Total Environment, 27 (2–3), 1983, 163-200.

Bedendo G.C., Jardim I.C.S.F. and Carasek E., *"Multiresidue Determination of Pesticides in Industrial and Fresh Orange Juice by Hollow Fiber Microporous Membrane Liquid–Liquid Extraction and Detection by Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry"*, *Talanta*, 88 (0), 2012, 573-580.

Beníšek M., Kubincová P., Bláha L. and Hilscherová K., *"The Effects of Pahs and N-Pahs on Retinoid Signaling and Oct-4 Expression in Vitro"*, *Toxicology Letters*, 200 (3), 2011, 169-175.

Bernal J.L., Nozal M.J., Toribio L., Serna M.L., Borrull F., Marce' R.M. and Pocurull E., *"Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Waters by Use of Supercritical Fluid Chromatography Coupled on-Line to Solid-Phase Extraction with Disks"*, *Journal of Chromatography A*, 778 (1–2), 1997, 321-328.

Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S. and Escaleira L.A., *"Response Surface Methodology (Rsm) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry"*, *Talanta*, 76 (5), 2008, 965-977.

Bloemen H.J. and Burn J., *"Chemistry and Analysis of Volatile Organic Compounds in the Environment"*, *Journal of Chemical Education*, 72 (3), 1995, A73.

Borrás E., Tortajada-Genaro L.A., Vázquez M. and Zielinska B., *"Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exhaust Emissions from Different Reformulated Diesel Fuels and Engine Operating Conditions"*, *Atmospheric Environment*, 43 (37), 2009, 5944-5952.

Botello A.V., Soto L.A., Ponce-Vélez G. and Villanueva F S., *"Baseline for Pahs and Metals in Nw Gulf of Mexico Related to the Deepwater Horizon Oil Spill"*, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, (0),

Box G.E.P., Hunter J.S. and Hunter W.G., *"Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery"*, 2005, 2nd edition, Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey, USA.

Brown J.N. and Peake B.M., *"Determination of Colloidally-Associated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Fresh Water Using C18 Solid Phase Extraction Disks"*, *Analytica Chimica Acta*, 486 (2), 2003, 159-169.

Caquet T., Roucaute M., Mazzella N., Delmas F., Madigou C., Farcy E., Burgeot T., Allenou J.P. and Gabellec R., *"Risk Assessment of Herbicides and Booster Biocides Along Estuarine Continuums in the Bay of Vilaine Area (Brittany, France)"*, Environ Sci Pollut Res Int, 20 (2), 2013, 651-666.

Carls M.G., Holland L., Larsen M., Collier T.K., Scholz N.L. and Incardona J.P., *"Fish Embryos Are Damaged by Dissolved Pahs, Not Oil Particles"*, Aquatic Toxicology, 88 (2), 2008, 121-127.

Castillo E.D., *"Process Optimization: A Statistical Approach"*, 2007, Springer Verlag, New York, USA.

Castro-Jiménez J., Berrojalbiz N., Wollgast J. and Dachs J., *"Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in the Mediterranean Sea: Atmospheric Occurrence, Deposition and Decoupling with Settling Fluxes in the Water Column"*, Environmental Pollution, 166 (0), 2012, 40-47.

Cheng J., Matsadiq G., Liu L., Zhou Y.-W. and Chen G., *"Development of a Novel Ultrasound-Assisted Surfactant-Enhanced Emulsification Microextraction Method and Its Application to the Analysis of Eleven Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Trace Levels in Water"*, Journal of Chromatography A, 1218 (18), 2011, 2476-2482.

Choi S.-D., *"Time Trends in the Levels and Patterns of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Pine Bark, Litter, and Soil after a Forest Fire"*, Science of the Total Environment, 470-471 (0), 2014, 1441-1449.

Dagnac T., García-Chao M., Fernández-Álvarez M., Castro-Insua J., García-Pomar M.I. and Llompart M., *"Study of the Presence of Priority Pesticides in Surface Water of River Basins Located in Two Areas of Intensive Dairy Farming in the Nw Spain (Galicia)"*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 92 (8), 2011, 995-1011.

Degrendele C., Okonski K., Melymuk L., Landlová L., Kukučka P., Čupr P. and Klánová J., *"Size Specific Distribution of the Atmospheric Particulate Pcdd/Fs, Dl-Pcbs and Pahs on a Seasonal Scale: Implications for Cancer Risks from Inhalation"*, Atmospheric Environment, 98 (0), 2014, 410-416.

- Djozan D. and Assadi Y.**, *"Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Capillary Gas Chromatography"*, Microchemical Journal, 63 (2), 1999, 276-284.
- Doong R.-a., Chang S.-m. and Sun Y.-c.**, *"Solid-Phase Microextraction for Determining the Distribution of Sixteen Us Environmental Protection Agency Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples"*, Journal of Chromatography A, 879 (2), 2000, 177-188.
- Eisert R. and Levsen K.**, *"Solid-Phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography: A New Method for the Analysis of Organics in Water"*, Journal of Chromatography A, 733 (1–2), 1996, 143-157.
- European U.**, *"Comission Recommendation 2005/108/Ec"*, J. Eur. Comm, L34, 2005, 43.
- Evans W.H., Thomas N.C., Boardman M.C. and Nash S.J.**, *"Relationships of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Yields with Particulate Matter (Water and Nicotine Free) Yields in Mainstream and Sidestream Cigarette Smoke"*, Science of the Total Environment, 136 (1–2), 1993, 101-109.
- Fernández M., Clavijo S., Forteza R. and Cerdà V.**, *"Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Lab on Valve Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled to High Performance Chromatography"*, Talanta, 138, 2015, 190-195.
- Fiamegos Y.C. and Stalikas C.D.**, *"Theoretical Analysis and Experimental Evaluation of Headspace in-Drop Derivatisation Single-Drop Microextraction Using Aldehydes as Model Analytes"*, Analytica Chimica Acta, 599 (1), 2007, 76-83.
- Guariero A.L.N., Santos J.V.d.S., Eiguren-Fernandez A., Torres E.A., da Rocha G.O. and de Andrade J.B.**, *"Redox Activity and Pah Content in Size-Classified Nanoparticles Emitted by a Diesel Engine Fuelled with Biodiesel and Diesel Blends"*, Fuel, 116 (0), 2014, 490-497.
- Guillén D., Ginebreda A., Farré M., Darbra R.M., Petrovic M., Gros M. and Barceló D.**, *"Prioritization of Chemicals in the Aquatic Environment Based on Risk Assessment: Analytical, Modeling and Regulatory Perspective"*, Science of the Total Environment, 440 (0), 2012, 236-252.

Guo L.,Tan S.,Li X. and Lee H.K., *"Fast Automated Dual-Syringe Based Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Coupled with Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Water Samples"*, Journal of Chromatography A, 1438, 2016, 1-9.

Handa T.,Yamauchi T.,Sawai K.,Yamamura T.,Koseki Y. and Ishii T., *"In Situ Emission Levels of Carcinogenic and Mutagenic Compounds from Diesel and Gasoline Engine Vehicles on an Expressway"*, Environmental Science & Technology, 18 (12), 1984, 895-902.

Hanrahan G.,Zhu J.,Gibani S. and Patil D.G., *"Experimental Design, Chemometrics and Statistics"*, 2005, Elsevier Ltd.

Harrison R.M.,Perry R. and Wellings R.A., *"Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Raw, Potable and Waste Waters"*, Water Research, 9 (4), 1975, 331-346.

Hsieh Y.-N.,Huang P.-C.,Sun I.W.,Whang T.-J.,Hsu C.-Y.,Huang H.-H. and Kuei C.-H., *"Nafion Membrane-Supported Ionic Liquid–Solid Phase Microextraction for Analyzing Ultra Trace Pahs in Water Samples"*, Analytica Chimica Acta, 557 (1–2), 2006, 321-328.

Hyötyläinen T. and Oikari A., *"Bioaccumulation of Pahs from Creosote-Contaminated Sediment in a Laboratory-Exposed Freshwater Oligochaete, Lumbriculus Variegatus"*, Chemosphere, 57 (2), 2004, 159-164.

Jarvis I.W.H.,Bergvall C.,Bottai M.,Westerholm R.,Stenius U. and Dreij K., *"Persistent Activation of DNA Damage Signaling in Response to Complex Mixtures of Pahs in Air Particulate Matter"*, Toxicology and Applied Pharmacology, 266 (3), 2013, 408-418.

Kaifer A.E., *"Fundamentals of Analytical Chemistry. Sixth Edition (Skoog, Douglas A.; West, Donald M.; Hollar, James F.)"*, Journal of Chemical Education, 69 (11), 1992, A305.

Kamal A.,Malik R.N.,Martellini T. and Cincinelli A., *"Cancer Risk Evaluation of Brick Kiln Workers Exposed to Dust Bound Pahs in Punjab Province (Pakistan)"*, Science of the Total Environment, 493 (0), 2014, 562-570.

Kellen E.,Zeegers M.,Paulussen A.,Vlietinck R.,Vlem E.V.,Veulemans H. and Buntinx F., *"Does Occupational Exposure to Pahs, Diesel and Aromatic Amines Interact with Smoking and Metabolic Genetic Polymorphisms to Increase the Risk on Bladder Cancer?; the Belgian Case Control Study on Bladder Cancer Risk"*, Cancer Letters, 245 (1–2), 2007, 51-60.

King A.J., Readman J.W. and Zhou J.L., *"Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by Solid-Phase Microextraction–Gas Chromatography–Mass Spectrometry"*, *Analytica Chimica Acta*, 523 (2), 2004, 259-267.

Knutzen J., *"Effects on Marine Organisms from Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pah) and Other Constituents of Waste Water from Aluminium Smelters with Examples from Norway"*, *Science of the Total Environment*, 163 (1–3), 1995, 107-122.

Kochany J. and Maguire R.J., *"Abiotic Transformations of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons and Polynuclear Aromatic Nitrogen Heterocycles in Aquatic Environments"*, *Science of the Total Environment*, 144 (1–3), 1994, 17-31.

Köck-Schulmeyer M., Ginebreda A., González S., Cortina J.L., de Alda M.L. and Barceló D., *"Analysis of the Occurrence and Risk Assessment of Polar Pesticides in the Llobregat River Basin (Ne Spain)"*, *Chemosphere*, 86 (1), 2012, 8-16.

Konstantinou I.K., Hela D.G. and Albanis T.A., *"The Status of Pesticide Pollution in Surface Waters (Rivers and Lakes) of Greece. Part I. Review on Occurrence and Levels"*, *Environmental Pollution*, 141 (3), 2006, 555-570.

Kuster M., López de Alda M. and Barceló D., *"Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometric Analysis and Regulatory Issues of Polar Pesticides in Natural and Treated Waters"*, *Journal of Chromatography A*, 1216 (3), 2009, 520-529.

Lambropoulou D.A. and Albanis T.A., *"Liquid-Phase Micro-Extraction Techniques in Pesticide Residue Analysis"*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2), 2007, 195-228.

Li N. and Lee H.K., *"Solid-Phase Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Water: Negative Effect of Humic Acid"*, *Journal of Chromatography A*, 921 (2), 2001, 255-263.

Liao C.-M., Chio C.-P., Chen W.-Y., Ju Y.-R., Li W.-H., Cheng Y.-H., Liao V.H.-C., Chen S.-C. and Ling M.-P., *"Lung Cancer Risk in Relation to Traffic-Related Nano/Ultrafine Particle-Bound Pahs Exposure: A Preliminary Probabilistic Assessment"*, *Journal of Hazardous materials*, 190 (1–3), 2011, 150-158.

- Liu F., Xu Y., Liu J., Liu D., Li J., Zhang G., Li X., Zou S. and Lai S.,** *"Atmospheric Deposition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) to a Coastal Site of Hong Kong, South China"*, *Atmospheric Environment*, 69 (0), 2013, 265-272.
- Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nyström A., Pettersen J. and Bergman R.,** *"Experimental Design and Optimization"*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42 (1-2), 1998, 3-40.
- Luque de Castro M.D. and Priego-Capote F.,** *"Ultrasound-Assisted Preparation of Liquid Samples"*, *Talanta*, 72 (2), 2007, 321-334.
- Mahler B.J., Van Metre P.C. and Foreman W.T.,** *"Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) and Azaarenes in Runoff from Coal-Tar- and Asphalt-Sealcoated Pavement"*, *Environmental Pollution*, 188 (0), 2014, 81-87.
- Manahan S.E.,** *"Fundamentals of Environmental Chemistry"*, 1993, Lewis Publishers.
- Manoli E. and Samara C.,** *"Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Natural Waters: Sources, Occurrence and Analysis"*, *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 18 (6), 1999, 417-428.
- Manoli E., Samara C., Konstantinou I. and Albanis T.,** *"Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Bulk Precipitation and Surface Waters of Northern Greece"*, *Chemosphere*, 41 (12), 2000, 1845-1855.
- Marcé R.M. and Borrull F.,** *"Solid-Phase Extraction of Polycyclic Aromatic Compounds"*, *Journal of Chromatography A*, 885 (1-2), 2000, 273-290.
- Martinez E., Gros M., Lacorte S. and Barceló D.,** *"Simplified Procedures for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water, Sediments and Mussels"*, *Journal of Chromatography A*, 1047 (2), 2004, 181-188.
- Masiol M. and Harrison R.M.,** *"Aircraft Engine Exhaust Emissions and Other Airport-Related Contributions to Ambient Air Pollution: A Review"*, *Atmospheric Environment*, 95 (0), 2014, 409-455.
- Masiol M., Hofer A., Squizzato S., Piazza R., Rampazzo G. and Pavoni B.,** *"Carcinogenic and Mutagenic Risk Associated to Airborne Particle-Phase Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Source Apportionment"*, *Atmospheric Environment*, 60 (0), 2012, 375-382.

Mastral A.M. and Callén M.S., "A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (Pah) Emissions from Energy Generation", *Environmental Science & Technology*, 34 (15), 2000, 3051-3057.

Mi H.H.,Lee W.-J.,Chen C.-B.,Yang H.-H. and Wu S.-J., "Effect of Fuel Aromatic Content on Pah Emission from a Heavy-Duty Diesel Engine", *Chemosphere*, 41 (11), 2000, 1783-1790.

Montgomery D.C., "Design and Analysis of Experiments", 2005, 6th edition, John Wiley & Sons Inc, New Jersey, USA.

Montgomery D.C., "Introduction to Statistical Quality Control", 2009, 6th edition, John Wiley & Sons, New York, USA.

Motorykin O.,Schrlau J.,Jia Y.,Harper B.,Harris S.,Harding A.,Stone D.,Kile M.,Sudakin D. and Massey Simonich S.L., "Determination of Parent and Hydroxy Pahs in Personal Pm2.5 and Urine Samples Collected During Native American Fish Smoking Activities", *Science of the Total Environment*, 505 (0), 2015, 694-703.

Mueller J.G.,Chapman P.J. and Pritchard P.H., "Creosote-Contaminated Sites. Their Potential for Bioremediation", *Environmental Science & Technology*, 23 (10), 1989, 1197-1201.

Nam J.J.,Thomas G.O.,Jaward F.M.,Steinnes E.,Gustafsson O. and Jones K.C., "Pahs in Background Soils from Western Europe: Influence of Atmospheric Deposition and Soil Organic Matter", *Chemosphere*, 70 (9), 2008, 1596-1602.

Navarro-Ortega A.,Tauler R.,Lacorte S. and Barceló D., "Occurrence and Transport of Pahs, Pesticides and Alkylphenols in Sediment Samples Along the Ebro River Basin", *Journal of Hydrology*, 383 (1-2), 2010, 5-17.

Nikolaou K.,Masclét P. and Mouvier G., "Sources and Chemical Reactivity of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the Atmosphere — a Critical Review", *Science of the Total Environment*, 32 (2), 1984, 103-132.

Norberg J.,Thordarson E.,Mathiasson L. and Jönsson J.Å., "Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction Coupled on-Line with Normal-Phase Liquid Chromatography for the Determination of Cationic Surfactants in River and Waste Water", *Journal of Chromatography A*, 869 (1-2), 2000, 523-529.

Okona-Mensah K.B., Battershill J., Boobis A. and Fielder R., *"An Approach to Investigating the Importance of High Potency Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in the Induction of Lung Cancer by Air Pollution"*, Food and Chemical Toxicology, 43 (7), 2005, 1103-1116.

Oliferova L., Statkus M., Tsyisin G., Shpigun O. and Zolotov Y., *"On-Line Solid-Phase Extraction and Hplc Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Using Fluorocarbon Polymer Sorbents"*, Analytica Chimica Acta, 538 (1-2), 2005, 35-40.

Olivella M.A., Ribalta T.G., de Febrer A.R., Mollet J.M. and de las Heras F.X.C., *"Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Riverine Waters after Mediterranean Forest Fires"*, Science of the Total Environment, 355 (1-3), 2006, 156-166.

Ormad P., Cortés S., Sarasa J., Martín A., Puig A. and Ovelleiro J.L., *"Characterization of Organic Micropollutants in the River Cinca (Spain) by Using Granular Activated Carbon and Liquid-Liquid Extraction"*, Journal of Chromatography A, 733 (1-2), 1996, 159-169.

Ozcan S., Tor A. and Aydin M.E., *"Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Waters by Ultrasound-Assisted Emulsification-Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry"*, Analytica Chimica Acta, 665 (2), 2010, 193-199.

Papadopoulou A., Román I.P., Canals A., Tyrovola K. and Psillakis E., *"Fast Screening of Perfluorooctane Sulfonate in Water Using Vortex-Assisted Liquid–Liquid Microextraction Coupled to Liquid Chromatography–Mass Spectrometry"*, Analytica Chimica Acta, 691 (1-2), 2011, 56-61.

Pedersen P.S., Ingwersen J., Nielsen T. and Larsen E., *"Effects of Fuel, Lubricant, and Engine Operating Parameters on the Emission of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons"*, Environmental Science & Technology, 14 (1), 1980, 71-79.

Pena-Pereira F., Costas-Mora I., Lavilla I. and Bendicho C., *"Rapid Screening of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Waters by Directly Suspended Droplet Microextraction-Microvolume Fluorospectrometry"*, Talanta, 89 (0), 2012, 217-222.

Perera F.P. and Edwards S.C. 2011. *"Prenatal Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs)"*, Nriagu, J.O., *Encyclopedia of Environmental Health*. Burlington: Elsevier, 659-668.

Pérez S., Farré M.I., García M.J. and Barceló D., *"Occurrence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sewage Sludge and Their Contribution to Its Toxicity in the Toxalert® 100 Bioassay"*, Chemosphere, 45 (6–7), 2001, 705-712.

Petridis N.P., Sakkas V.A. and Albanis T.A., *"Chemometric Optimization of Dispersive Suspended Microextraction Followed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Natural Waters"*, Journal of Chromatography A, 1355 (0), 2014, 46-52.

Popp P., Bauer C., Möder M. and Paschke A., *"Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Waste Water by Off-Line Coupling of Solid-Phase Microextraction with Column Liquid Chromatography"*, Journal of Chromatography A, 897 (1–2), 2000, 153-159.

Priego-López E. and Luque de Castro M.D., *"Ultrasound-Assisted Derivatization of Phenolic Compounds in Spiked Water Samples before Pervaporation, Gas Chromatographic Separation, and Flame Ionization Detection"*, Chromatographia, 57 (7-8), 2003, 513-518.

Qin N., He W., Kong X.-Z., Liu W.-X., He Q.-S., Yang B., Ouyang H.-L., Wang Q.-M. and Xu F.-L., *"Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in the Water from a Large Chinese Lake Based on Multiple Indicators"*, Ecological Indicators, 24 (0), 2013, 599-608.

Rachwal M., Magiera T. and Wawer M., *"Coke Industry and Steel Metallurgy as the Source of Soil Contamination by Technogenic Magnetic Particles, Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons"*, Chemosphere, (0),

Rallis G.N., Sakkas V.A., Boumba V.A., Vougiouklakis T. and Albanis T.A., *"Determination of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Post-Mortem Human Lung by Matrix Solid-Phase Dispersion with the Aid of Response Surface Methodology and Desirability Function"*, Journal of Chromatography A, 1227 (0), 2012, 1-9.

Regueiro J., Llompарт M., Garcia-Jares C., Garcia-Monteagudo J.C. and Cela R., *"Ultrasound-Assisted Emulsification–Microextraction of Emergent Contaminants and Pesticides in Environmental Waters"*, Journal of Chromatography A, 1190 (1–2), 2008, 27-38.

- Rezaee M.,Assadi Y.,Milani Hosseini M.-R.,Aghaee E.,Ahmadi F. and Berijani S.,** *"Determination of Organic Compounds in Water Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction"*, Journal of Chromatography A, 1116 (1–2), 2006, 1-9.
- Rezaee M.,Yamini Y.,Khanchi A.,Faraji M. and Saleh A.,** *"A Simple and Rapid New Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop Combined with Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry for Preconcentration and Determination of Aluminium in Water Samples"*, Journal of Hazardous materials, 178 (1–3), 2010, 766-770.
- Ribeiro J.,Silva T.,Filho J.G.M. and Flores D.,** *"Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Burning and Non-Burning Coal Waste Piles"*, Journal of Hazardous materials, 199–200 (0), 2012, 105-110.
- Romagnoli P.,Balducci C.,Perilli M.,Gherardi M.,Gordiani A.,Gariazzo C.,Gatto M.P. and Cecinato A.,** *"Indoor Pahs at Schools, Homes and Offices in Rome, Italy"*, Atmospheric Environment, 92 (0), 2014, 51-59.
- Rubio-Clemente A.,Torres-Palma R.A. and Peñuela G.A.,** *"Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous Environment by Chemical Treatments: A Review"*, Science of the Total Environment, 478 (0), 2014, 201-225.
- S. L. C. Ferreira,R. E. Bruns,H. S. Ferreira,G. D. Matos,J. M. David,G. C. Brandão,E. G. P. da Silva,L. A. Portugal,P. S. dos Reis,A. S. Souza and W. N. L. dos Santos,** *"Box-Behnken Design: An Alternative for the Optimization of Analytical Methods"*, Analytica Chimica Acta, 597 (2), 2007, 179-186.
- Saleh A.,Yamini Y.,Faraji M.,Rezaee M. and Ghambarian M.,** *"Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction Method Based on Applying Low Density Organic Solvents Followed by Gas Chromatography Analysis for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples"*, Journal of Chromatography A, 1216 (39), 2009, 6673-6679.

Sandahl M., Mathiasson L. and Jönsson J.Å., *"Determination of Thiophanate-Methyl and Its Metabolites at Trace Level in Spiked Natural Water Using the Supported Liquid Membrane Extraction and the Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction Techniques Combined on-Line with High-Performance Liquid Chromatography"*, Journal of Chromatography A, 893 (1), 2000, 123-131.

Sarigiannis D.A., Karakitsios S.P., Zikopoulos D., Nikolaki S. and Kermenidou M., *"Lung Cancer Risk from Paks Emitted from Biomass Combustion"*, Environmental Research, 137 (0), 2015, 147-156.

Silva E., Mendes M.P., Ribeiro L. and Cerejeira M.J., *"Exposure Assessment of Pesticides in a Shallow Groundwater of the Tagus Vulnerable Zone (Portugal): A Multivariate Statistical Approach (Jca)"*, Environ Sci Pollut Res Int, 19 (7), 2011, 2667-2680.

Smith D.J.T., Edelhauser E.C. and Harrison R.M., *"Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Concentrations in Road Dust and Soil Samples Collected in the United Kingdom and Pakistan"*, Environmental Technology, 16 (1), 1995, 45-53.

Smith J.R., Neuhauser E.F., Middleton A.C., Cunningham J.J., Weightman R.L. and Linz D.G., *"Treatment of Organically Contaminated Groundwaters in Municipal Activated Sludge Systems"*, Water Environment Research, 65 (7), 1993, 804-818.

Stalikas C., Fiamegos Y., Sakkas V. and Albanis T., *"Developments on Chemometric Approaches to Optimize and Evaluate Microextraction"*, Journal of Chromatography A, 1216 (2), 2009, 175-189.

Sun F., Littlejohn D. and David Gibson M., *"Ultrasonication Extraction and Solid Phase Extraction Clean-up for Determination of Us Epa 16 Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorption Detection1"*, Analytica Chimica Acta, 364 (1-3), 1998, 1-11.

Tankiewicz M., Fenik J. and Biziuk M., *"Determination of Organophosphorus and Organonitrogen Pesticides in Water Samples"*, TRAC Trends in Analytical Chemistry, 29 (9), 2010, 1050-1063.

Theis A.L., Waldack A.J., Hansen S.M. and Jeannot M.A., *"Headspace Solvent Microextraction"*, Analytical Chemistry, 73 (23), 2001, 5651-5654.

Tolosa I., Bayona J.M. and Albaigés J., *"Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Sulfur/Oxygen Derivatives in Northwestern Mediterranean Sediments: Spatial and Temporal Variability, Fluxes, and Budgets"*, Environmental Science & Technology, 30 (8), 1996, 2495-2503.

Tseng W.-C., Chen P.-S. and Huang S.-D., *"Optimization of Two Different Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Methods Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Determination for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) Analysis in Water"*, Talanta, 120, 2014, 425-432.

Vojtisek-Lom M., Czerwinski J., Leníček J., Sekyra M. and Topinka J., *"Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Exhaust Emissions from Diesel Engines Powered by Rapeseed Oil Methyl ester and Heated Non-Esterified Rapeseed Oil"*, Atmospheric Environment, 60 (0), 2012, 253-261.

Wang Y., Tian Z., Zhu H., Cheng Z., Kang M., Luo C., Li J. and Zhang G., *"Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Soils and Vegetation near an E-Waste Recycling Site in South China: Concentration, Distribution, Source, and Risk Assessment"*, Science of the Total Environment, 439 (0), 2012, 187-193.

Wells M.J.M. and Yu L.Z., *"Solid-Phase Extraction of Acidic Herbicides"*, Journal of Chromatography A, 885 (1-2), 2000, 237-250.

Wild S.R. and Jones K.C., *"Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the United Kingdom Environment: A Preliminary Source Inventory and Budget"*, Environmental Pollution, 88 (1), 1995, 91-108.

Wille K., De Brabander H.F., Vanhaecke L., De Wulf E., Van Caeter P. and Janssen C.R., *"Coupled Chromatographic and Mass-Spectrometric Techniques for the Analysis of Emerging Pollutants in the Aquatic Environment"*, TRAC Trends in Analytical Chemistry, 35 (0), 2012, 87-108.

Wilson S.C. and Jones K.C., *"Bioremediation of Soil Contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (Pahs): A Review"*, Environmental Pollution, 81 (3), 1993, 229-249.

Wu Y., Xia L., Chen R. and Hu B., *"Headspace Single Drop Microextraction Combined with Hplc for the Determination of Trace Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Environmental Samples"*, Talanta, 74 (4), 2008, 470-477.

Yang D.,Qi S.,Zhang Y.,Xing X.,Liu H.,Qu C.,Liu J. and Li F., *"Levels, Sources and Potential Risks of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Multimedia Environment Along the Jinjiang River Mainstream to Quanzhou Bay, China"*, Marine Pollution Bulletin, 76 (1–2), 2013, 298-306.

Yang S.Y.N.,Connell D.W.,Hawker D.W. and Kayal S.I., *"Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air, Soil and Vegetation in the Vicinity of an Urban Roadway"*, Science of the Total Environment, 102 (0), 1991, 229-240.

Yang W.,Lang Y. and Li G., *"Cancer Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in the Soils from Jiaozhou Bay Wetland"*, Chemosphere, 112 (0), 2014, 289-295.

Yang Z.H.,Liu Y.,Lu Y.L.,Wu T.,Zhou Z.Q. and Liu D.H., *"Dispersive Suspended Microextraction"*, Analytica Chimica Acta, 706 (2), 2011, 268-274.

Yangcheng L.,Quan L.,Guangsheng L. and Youyuan D., *"Directly Suspended Droplet Microextraction"*, Analytica Chimica Acta, 566 (2), 2006, 259-264.

Yiantzi E.,Psillakis E.,Tyrovola K. and Kalogerakis N., *"Vortex-Assisted Liquid–Liquid Microextraction of Octylphenol, Nonylphenol and Bisphenol-A"*, Talanta, 80 (5), 2010, 2057-2062.

Yuan H.,Li T.,Ding X.,Zhao G. and Ye S., *"Distribution, Sources and Potential Toxicological Significance of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) in Surface Soils of the Yellow River Delta, China"*, Marine Pollution Bulletin, 83 (1), 2014, 258-264.

Zheng Y.,Luo X.,Zhang W.,Wu B.,Han F.,Lin Z. and Wang X., *"Enrichment Behavior and Transport Mechanism of Soil-Bound Pahs During Rainfall-Runoff Events"*, Environmental Pollution, 171 (0), 2012, 85-92.

Ελληνική βιβλιογραφία

Αλμπάνης Τ., *"Ρύπανση Και Τεχνολογία Προστασίας Περιβάλλοντος"*, 2006, Δ' Έκδοση, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Βύρας Α.Γ., *"Παρακολούθηση Της Ατμοσφαιρικής Ρύπανσης Της Ευρύτερης Περιοχής Των Αθηνών Από Πολυκυκλικούς Αρωματικούς Υδρογονάνθρακες"*, 1989, Διδακτορική διατριβή, Εθνικόν και Καποδιστριακόν Πανεπιστήμιον Αθηνών.

Γούλα Γ., *"Αποικοδόμηση Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων (Pahs) Με Χρήση Υπερήχων Και Προσδιορισμός Αυτών Με Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Spmc) Και Gc/Ms Σε Υδατικά Διαλύματα"*, 2003, Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Ευσταθίου Κ.Η., *"Στατιστική Επεξεργασία Αναλυτικών Αποτελεσμάτων"*, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Καψή Μ., *"Βελτιστοποίηση Αναλυτικών Τεχνικών Προσδιορισμού Συγχρονων Φυτοφαρμάκων Και Εκτίμηση Των Επιπτώσεων Τους Στη Λεκανη Απορροή Του Λουρου Ποταμού Και Τον Αμβρακικό Κόλπο"*, 2013, Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Κοσμά Χ., *"Ανίχνευση, Μεταφορά Και Φωτολυτική Διασπαση Φαρμακευτικών Ενώσεων Στο Περιβάλλον"*, 2013, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Κοσμά Χ., *"Συστηματικός Έλεγχος Υπολειμμάτων Φαρμακευτικών Ουσιών Σε Επιφανειακά Υδατα, Αστικά Και Νοσοκομειακά Υγρά Απόβλητα, Ιζήματα Και Ιλύες"*, 2007, Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Λαμπροπούλου Δ., *"Εφαρμογή Της Τεχνικής Της Μικροεκχύλισης Δια Της Στερεάς Φάσης (Spmc) Για Τον Προσδιορισμό Υπολειμμάτων Φυτοφαρμάκων Σε Περιβαλλοντικά Συστήματα"*, 2002, Διδακτορική διατριβή Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Μανώλη Ε.Α., *"Μελέτη Της Παρουσίας Των Πολυκυκλικών Υδρογονανθράκων (Παν), Στα Αστικά Λύματα Με Τη Μέθοδο Της Ενεργού Ιλύος"*, 1998, Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Μπαρέλος Δ., "Προσδιορισμός Επιπέδων Υπολειμμάτων Φυτοφαρμάκων Σε Επιφανειακά Νερά & Ιζήματα Του Υδάτινου Συστήματος Αράχθου Ποταμού –Αμβρακικού Κόλπου & Των Αιμνοθαλασσών Ροδιάς – Τσουκαλιου – Λογαρού, Ιωάννινα: Π.Μ.Σ. Αγροχημεία & Βιολογικές Καλλιέργειες", 2006, Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης, ΠΜΣ Αγροχημείας & Βιολογικών Καλλιεργειών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα

Παπαδογιάννης Ι. and Σαμανίδου Β., "Ενόργανη Ανάλυση", 2001, Εκδόσεις Πήγασος Θεσσαλονίκη.

Πετρίδης Ν., "Ανάπτυξη Αναλυτικής Μεθοδολογίας Προσδιορισμού Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων Και Εφαρμογή Στα Φυσικά Νερά Της Λεκάνης Απορροής Του Νέστου Ποταμού", 2010, Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Σίκαλος Θ., "Προσδιορισμός Πολυπυρηνικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων Σε Περιβαλλοντικά Δείγματα Με Υγρή Χρωματογραφία – Μια Εφαρμογή Στον Αέρα Και Το Έδαφος Της Περιοχής Των Ιωαννίνων", 1999, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Σπυριδωνάκος Ν.Ε., "Προσδιορισμός Υπολειμμάτων Φυτοφαρμάκων Στη Λεκάνη Απορροής Του Λούρου Ποταμού", 2011, Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Σταμάτης Ν., "Προσδιορισμός Παρασιτοκτόνων Και Φαρμακευτικών Ουσιών Στο Υδατικό Σύστημα Του Ποταμού Αχελώου Και Μελέτη Της Φωτολυτικής Και Φωτοκαταλυτικής Διάσπασης Επιλεγμένων Ρύπων", 2012, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Αγρίνιο.

Τολίκα Ε., "Ανάπτυξη Και Επικύρωση Μεθόδων Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης Για Τον Προσδιορισμό Σουλφοναμιδίων Σε Τρόφιμα Ζωικής Προέλευσης", 2011, Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

Τσούτση Χ., "Ανάπτυξη Της Αναλυτικής Τεχνικής Μικροεκχύλισης Δια Της Στερεάς Φάσης (Spmc) Για Τον Προσδιορισμό Υπολειμμάτων Φυτοφαρμάκων Σε Φυτικά Προϊόντα", 2008, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Χατζιωάννου Θ.Π. and Κουμπάρη Μ.Α., "Ενόργανη Ανάλυση", 1990, Αθήνα.

Χριστοφοράκη Ε., *"Μελέτη Κλασματικών Παραγοντικών Σχεδιασμών Και Στατιστική Ανάλυση Υπερκορεσμένων Σχεδιασμών"*, 2012, Διδακτορική διατριβή, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Τομέας Μαθηματικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Διαδίκτυο

http://ec.europa.eu/health/index_en.htm

<http://ec.europa.eu/jrc/>

<http://greekriverfriends.blogspot.gr/2010/06/blog-post.html>

<http://www.cdc.gov/niosh/>

<http://www.ecoflow.gr/>

<http://www.epa.gov/>

<http://www.myvillage.gr/odoiporika/limni-pournariou-arta>

<http://www.osha.gov/>

www.env.go.jp/en/chemi

www.sigmaaldrich.com

www.usepa.com



Development, optimization and validation of a liquid-liquid microextraction and GC methodology coupled with mass spectrometry to determine PAH residues using chemometrics methods in aqueous samples. Ecotoxicological risk assessment for the basin of the River Arachthos

Petridis P. Nikolaos

PhD Thesis

SUMMARY

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are organic compounds that belong to a huge family of molecules containing two or more aromatic rings. PAH residues can be found in natural water samples, in the atmosphere (outdoor and indoor), in soils and in many other matrices because of their wide distribution throughout the environment. Additionally, PAHs can be found in living organisms, as well as sediments, which work as natural filters in the sea. PAHs are of special concern because they present toxic, carcinogenic and mutagenic properties.

In 2011, Yang et al. developed a new extraction method called dispersive suspended microextraction (DSME). The method is based on high speed agitation of a small amount of organic solvent with an aqueous sample. In this method, two critical steps are involved: the extraction step and the restoration step. During the extraction step, target analytes are extracted into the extraction solvent, while during the restoration step, the organic and aqueous phases are separated. After the separation of the two phases, the target analytes are injected into GC–MS for further analysis. Because of the high speed of the magnetic stirring bar in the extraction step, the extraction solvent forms fine droplets. This can significantly increase the contact surface between the two phases and minimize the extraction time. The organic phase forms in the top-center position of the vortex and it can be collected because it has a lower density than the

aqueous phase. Dispersive suspended microextraction has overcome several of the disadvantages of other liquid-phase microextraction methods while retaining many of their advantages.

Most of the studies dealing with analytical methods make use of the traditional one-factor-at-a-time (OFAT) approach by examining the effect of each parameter individually while holding all others constant. However, the results of this univariate analysis show inadequate optimization toward response(s). Moreover, OFAT approach is costly in the sense of time and reagents, and not that efficient. There is now increasing recognition that hereditary malpractice ought to be replaced by sound chemometric methods such as response surface methodology (RSM) based on statistical design of experiments (DOE). Such statistical analyses are more efficient, since they account for interaction effects between the studied variables and determine more accurately the combination of levels that produces the optimum of the analytical method.

With the above in mind, the aim of this study is three-fold. The first is to exploit the analytical utility of DSME for the determination of PAHs in natural water samples, according to our knowledge for the first time, followed by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). The second is to evaluate and optimize the method with the aid of response surface methodology and experimental design. For this reason a Plackett–Burman factorial design, as well as a central composite design (CCD) were employed for the determination of the optimized experimental conditions for the DSME extraction of analytes from natural water samples. And finally the third is to calculate the potential ecological risk of the PAH residues.

For the DSME procedure, 4.3 mL of aqueous sample was placed in a 10-mL crimp-top glass vial sealed with an open centered aluminum cap and with a PTFE-gray butyl septum. When needed, the sample was fortified with a solution of target compounds to obtain the desired final concentration ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). A 93 μL aliquot of toluene, taken with a 100 μL single channel pipette (Gilson, Middleton, Wisconsin, USA, accuracy $\leq 0.8 \mu\text{L}$), was added as the extraction solvent to the surface of the aqueous sample. A magnetic micro stirring bar (10 mm $\times$ 3 mm o.d., VWR, Arlington Heights, Illinois,

USA) was placed at the bottom of the vial. The sample vial was placed on a magnetic stirrer to stir the sample.

The DSME procedure first involved an extraction step, followed by a restoration step. In particular, the stirring speed was set at 1500 rpm (extraction speed) for 104 s (extraction time) and then was reduced to 800 rpm (restoration speed). In the extraction step, a cloudy solution was formed, and the analytes in the water sample were extracted into fine toluene droplets. When the stirring speed was adjusted to 800 rpm, the restoration step began. At this stirring speed, a gentle vortex was formed and the toluene droplets began to coalesce. After 10 min (restoration time), the toluene had separated from the aqueous phase, and an organic droplet (85–87 μL) was formed in the bottom center of the vortex. Finally, after the restoration step, 1.5 μL of the organic phase was collected with a 10 μL micro syringe (Hamilton, Reno, Nevada, USA) with a small hub removable needle (26s gauge, 2 in, point style 2) and injected into the GC–MS for further analysis.

The proposed method was applied to real water sample analysis. Different types of water samples obtained from eight sample stations were used, including river and lagoon sources. Among the target analytes, seven PAHs were detected in three of a total of eight sample stations. Specifically, six PAHs were detected in one sample station, while five sample stations were totally free from PAH residues.

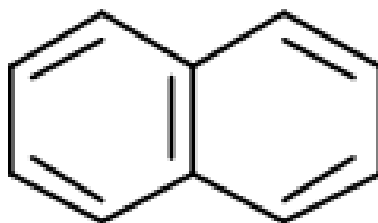
To conclude, in the present study, for the first time, directly suspended microextraction (DSME) coupled with GC–MS was evaluated for the simultaneous determination of PAH residues in real water samples. This simple, rapid and inexpensive extraction method fulfilled analytical validation criteria. The sensitivity and linear dynamic range were relevant to environmental water analysis, and accurate measurement of the compounds of interest in surface waters was achieved.

Παράρτημα Ι

Φυσικοχημικές ιδιότητες επιλεγμένων πολυκυκλικών
υδρογονανθράκων

Naphthalene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{10}H_8$

Μοριακό βάρος

128,18

Φυσική μορφή

Λευκοί στερεοί κρύσταλλοι ή νιφάδες

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

11

Log K_{ow}

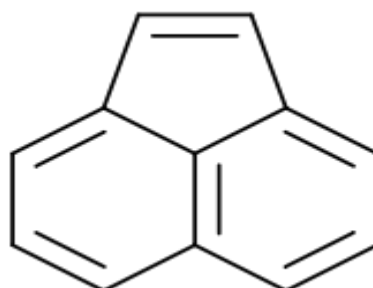
3,30

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

31,6 mg*L⁻¹Σταθερά Henry, K_H 0,425 L*atm*mol⁻¹

Acenaphthylene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{12}H_{10}$

Μοριακό βάρος

152,20

Φυσική μορφή

Κίτρινοι στερεοί κρύσταλλοι

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

0,3

Log K_{ow}

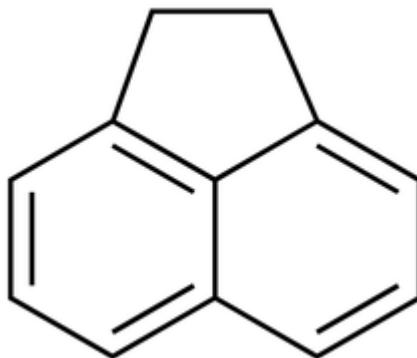
3,92

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

3,93 mg*L⁻¹Σταθερά Henry, K_H $1,14 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1}$

Acenaphthene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{12}H_{10}$

Μοριακό βάρος

154,21

Φυσική μορφή

Λευκή ή ωχροκίτρινη κρυσταλλική σκόνη

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

0,3

Log K_{ow}

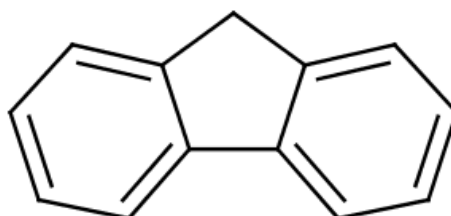
3,92

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

3,90 mg*L⁻¹Σταθερά Henry, K_H 1,48*10⁻² L*atm*mol⁻¹

Fluorene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{13}H_{10}$

Μοριακό βάρος

166,22

Φυσική μορφή

Λευκοί στερεοί κρύσταλλοι

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

1,98

Log K_{ow}

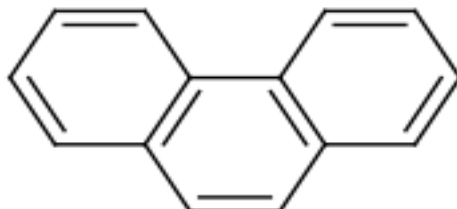
4,18

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

1,99 mg*L⁻¹Σταθερά Henry, K_H 1,01*10⁻² L*atm*mol⁻¹

Phenanthrene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{14}H_{10}$

Μοριακό βάρος

178,22

Φυσική μορφή

Άχρωμοι κρύσταλλοι

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

0,11

 $\text{Log } K_{ow}$

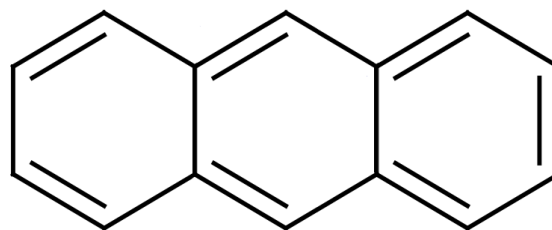
4,46

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

 $1,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Σταθερά Henry, K_H $3,98 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1}$

Anthracene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{14}H_{10}$

Μοριακό βάρος

178,23

Φυσική μορφή

Άχρωμοι κρύσταλλοι

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

0,08

Log K_{ow}

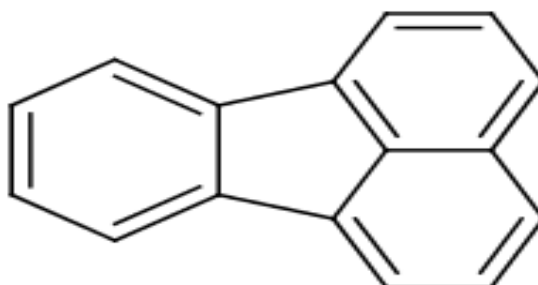
4,56

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

0,044 mg*L⁻¹Σταθερά Henry, K_H $7,3 \cdot 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1}$

Fluoranthrene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{16}H_{10}$

Μοριακό βάρος

202,56

Φυσική μορφή

Κίτρινοι στερεοί κρύσταλλοι

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

0,09

Log K_{ow}

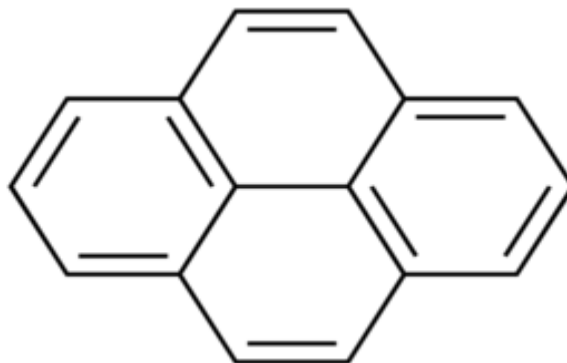
5,16

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

0,26 mg*L⁻¹Σταθερά Henry, K_H 6,5*10⁻⁴ L*atm*mol⁻¹

Pyrene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{16}H_{10}$

Μοριακό βάρος

202,25

Φυσική μορφή

Αχρωμοι κρύσταλλοι

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

0,08

 $\log K_{ow}$

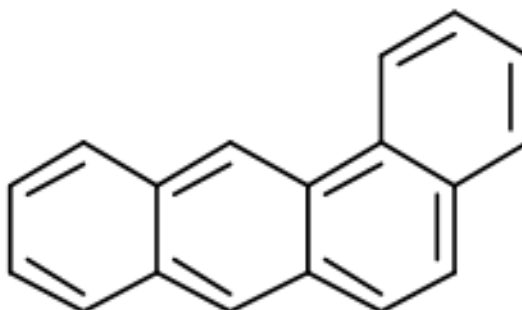
4,88

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

 $0,135 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Σταθερά Henry, K_H $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1}$

Benz[a]anthracene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{18}H_{12}$

Μοριακό βάρος

228,29

Φυσική μορφή

Ανοιχτοί κίτρινοι κρύσταλλοι ή νιφάδες

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

0,07

Log K_{ow}

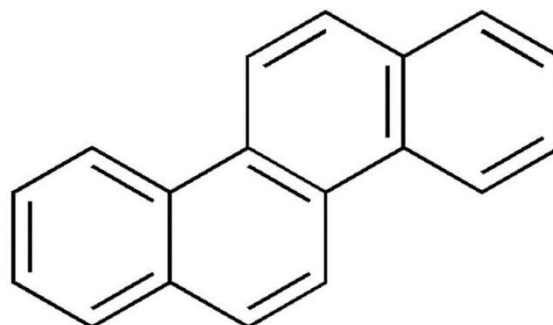
5,79

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

0,014 mg*L⁻¹Σταθερά Henry, K_H $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ L} \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1}$

Crysene

Δομή



Μοριακός τύπος

 $C_{18}H_{12}$

Μοριακό βάρος

228,29

Φυσική μορφή

Μπεζ κρύσταλλοι ή σκόνη

Τάση ατμών, P_a (25 °C)

0,09

 $\text{Log } K_{ow}$

5,73

Διαλυτότητα στο νερό (25 °C)

 $0,002 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Σταθερά Henry, K_H $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{atm} \cdot \text{mol}^{-1}$

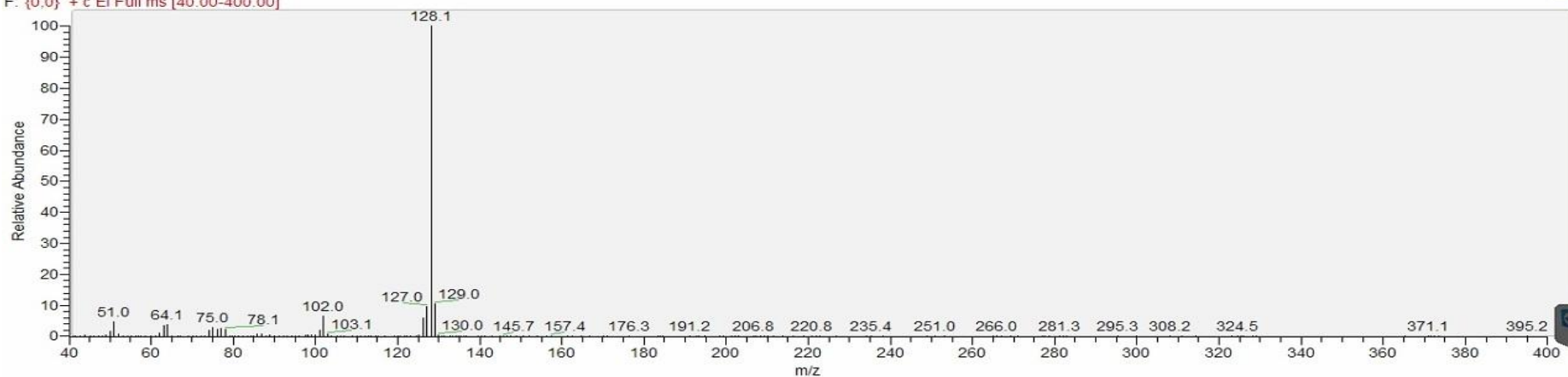
Παράρτημα II

Φάσματα μάζας των επιλεγμένων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων με τη μέθοδο πλήρους σάρωσης (full-scan) και τη μέθοδο επιλεγμένων ιόντων (SIM) στο GC-MS

Naphthalene

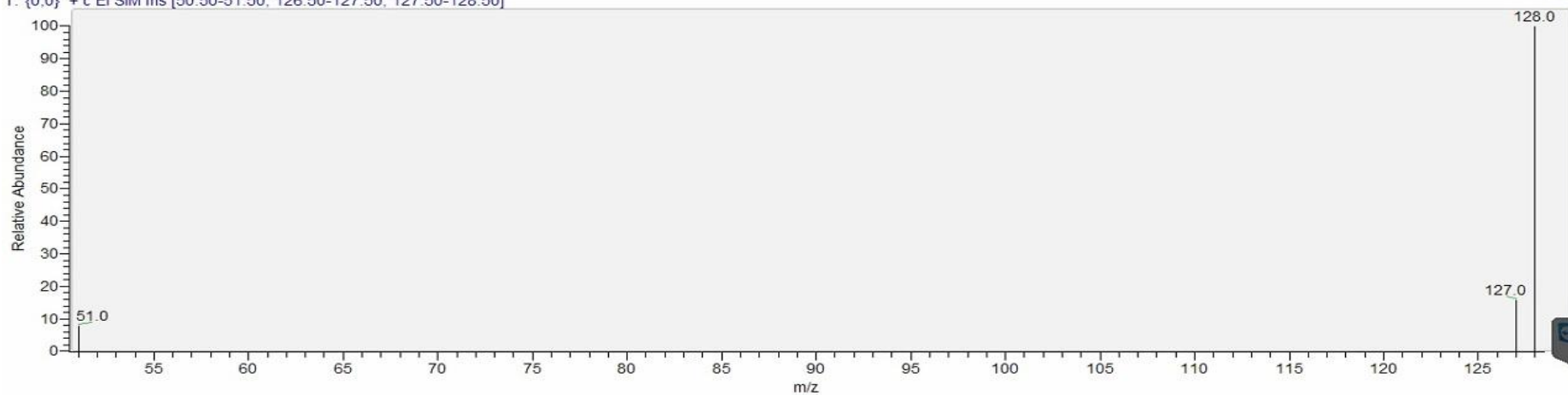
Full-scan

RT: 11.25 AV: 1 NL: 5.11E7
F: {0,0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



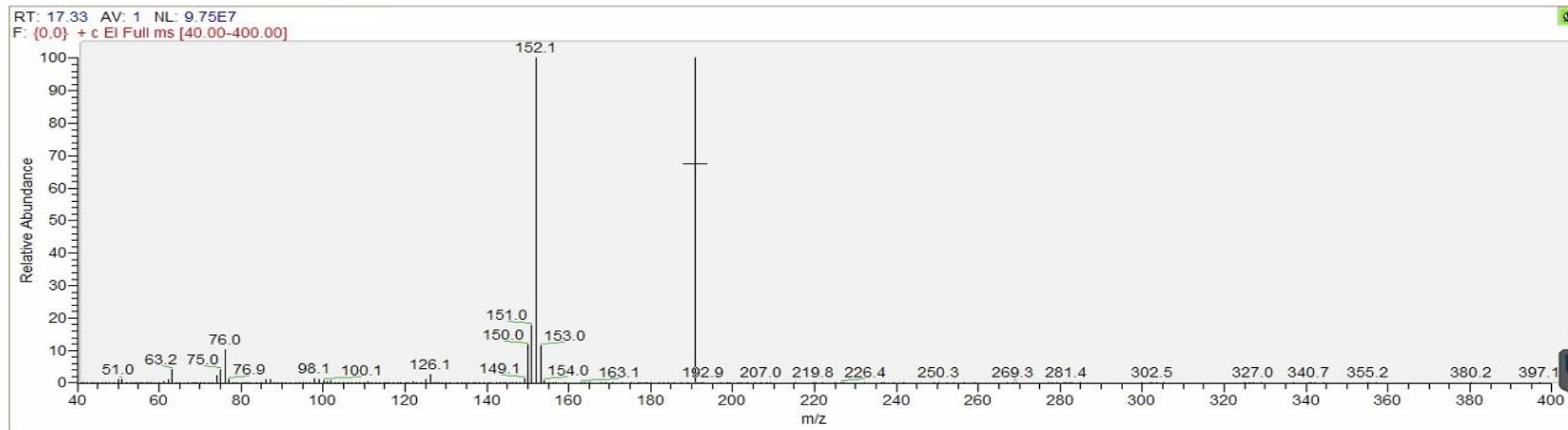
SIM

RT: 11.30 AV: 1 NL: 5.40E7
T: {0,0} + c EI SIM ms [50.50-51.50, 126.50-127.50, 127.50-128.50]

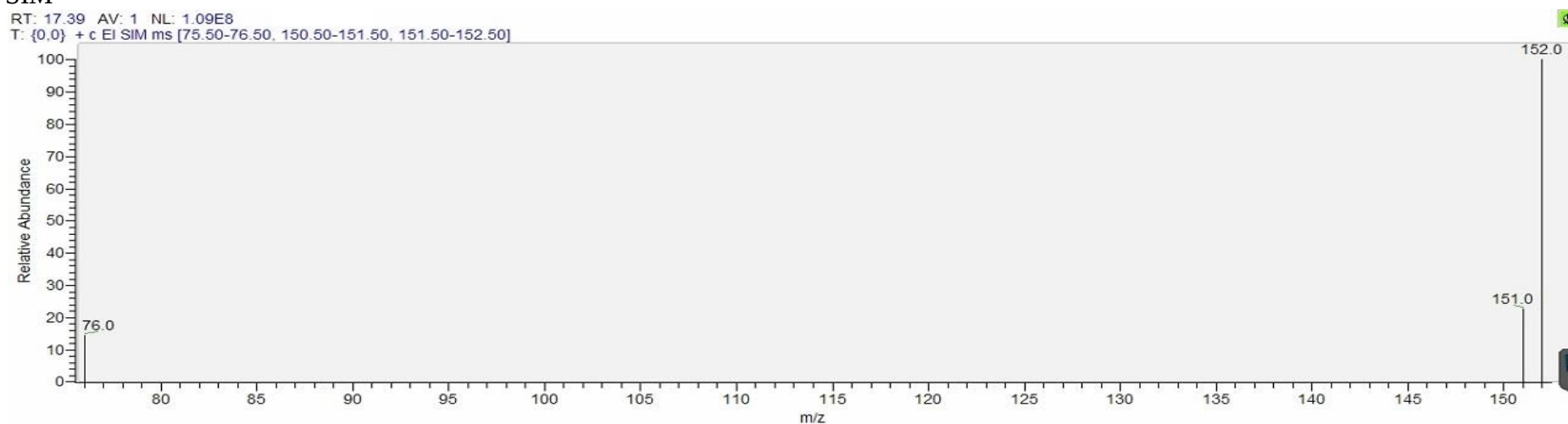


Acenaphthylene

Full-scan

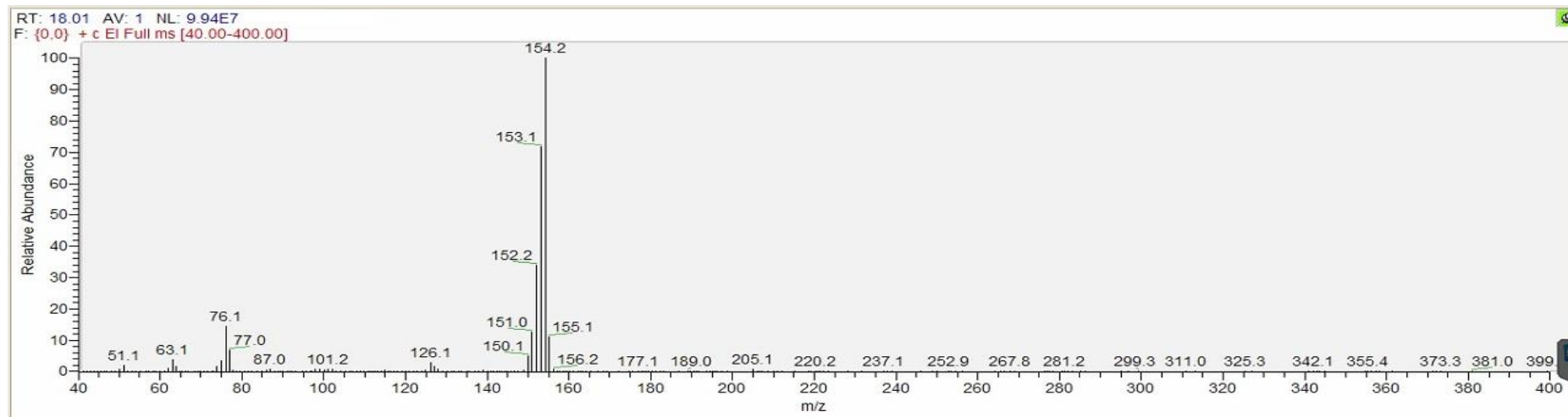


SIM

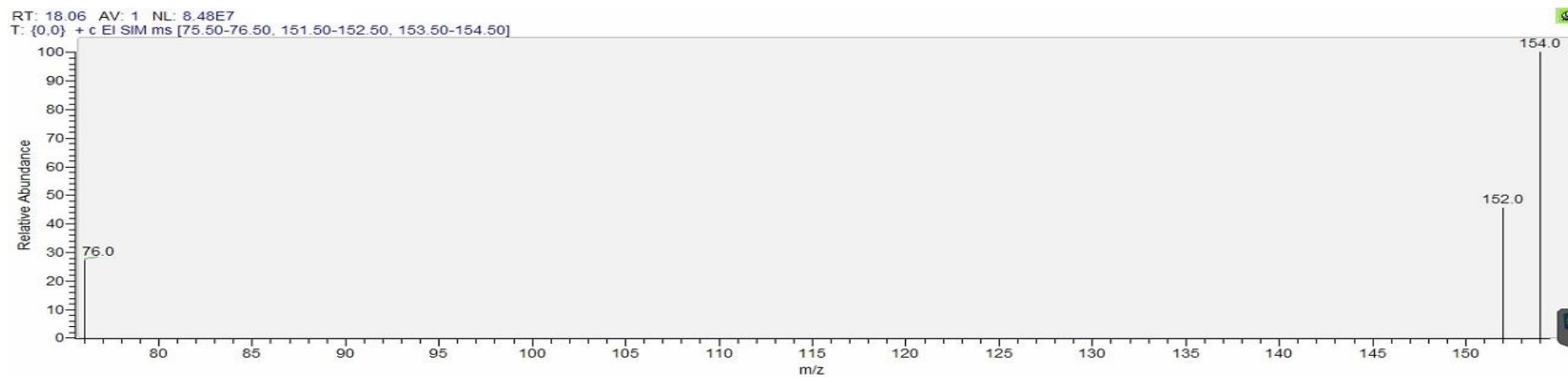


Acenaphthene

Full-scan



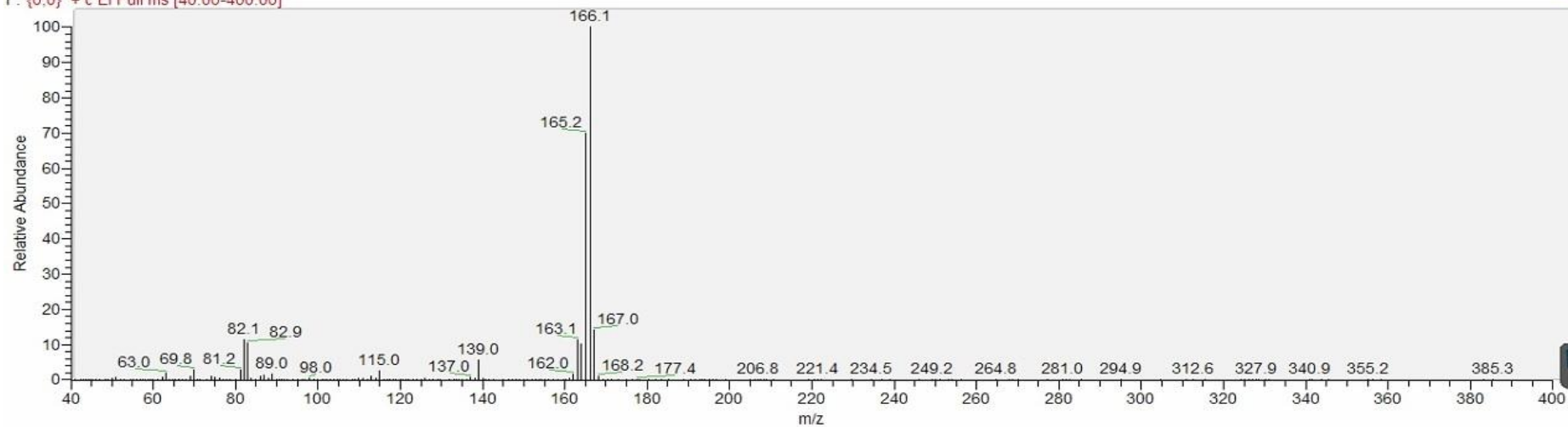
SIM



Fluorene

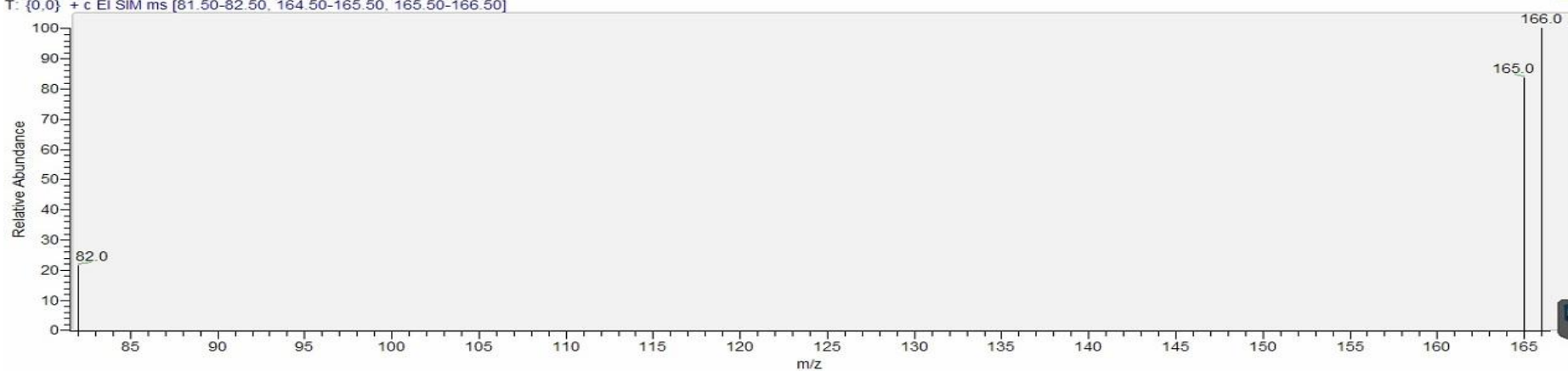
Full-scan

RT: 20.10 AV: 1 NL: 9.12E7
F: {0.0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



SIM

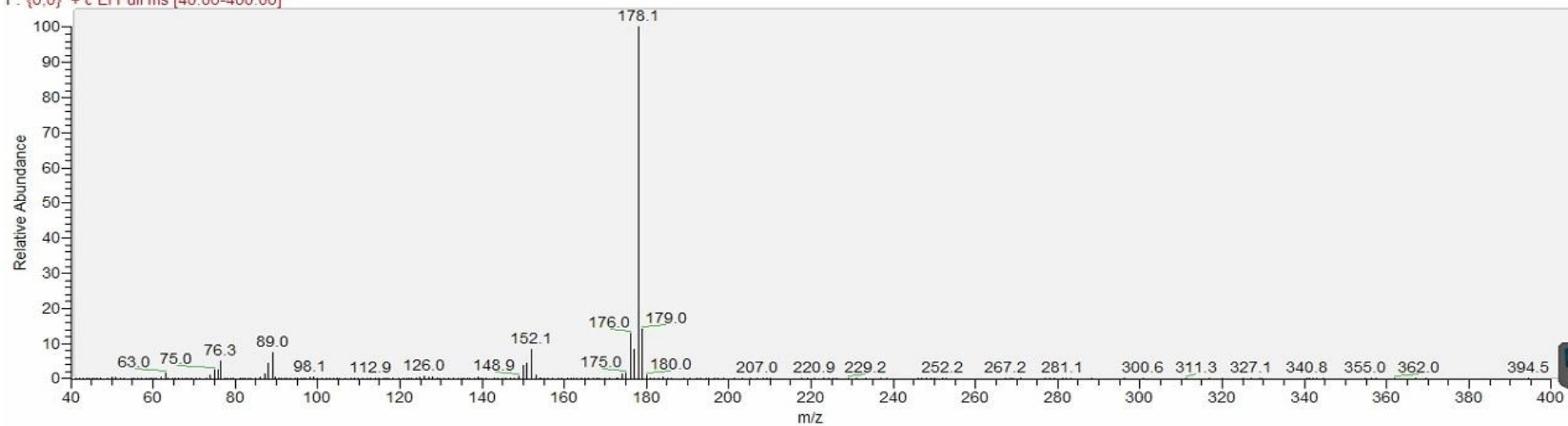
RT: 20.14 AV: 1 NL: 1.12E8
T: {0.0} + c EI SIM ms [81.50-82.50, 164.50-165.50, 165.50-166.50]



Phenanthrene

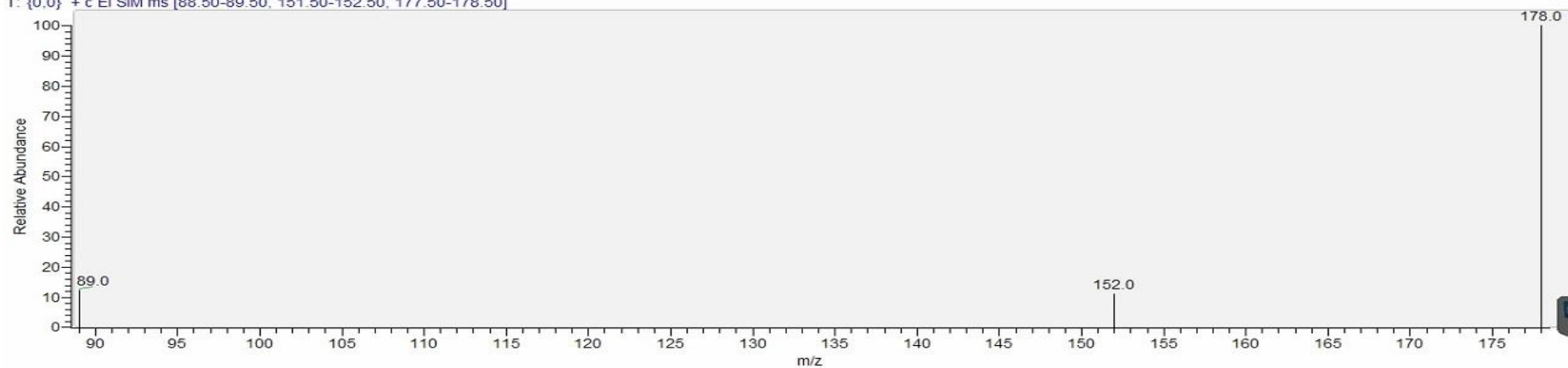
Full-scan

RT: 25.43 AV: 1 NL: 8.85E7
F: {0.0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



SIM

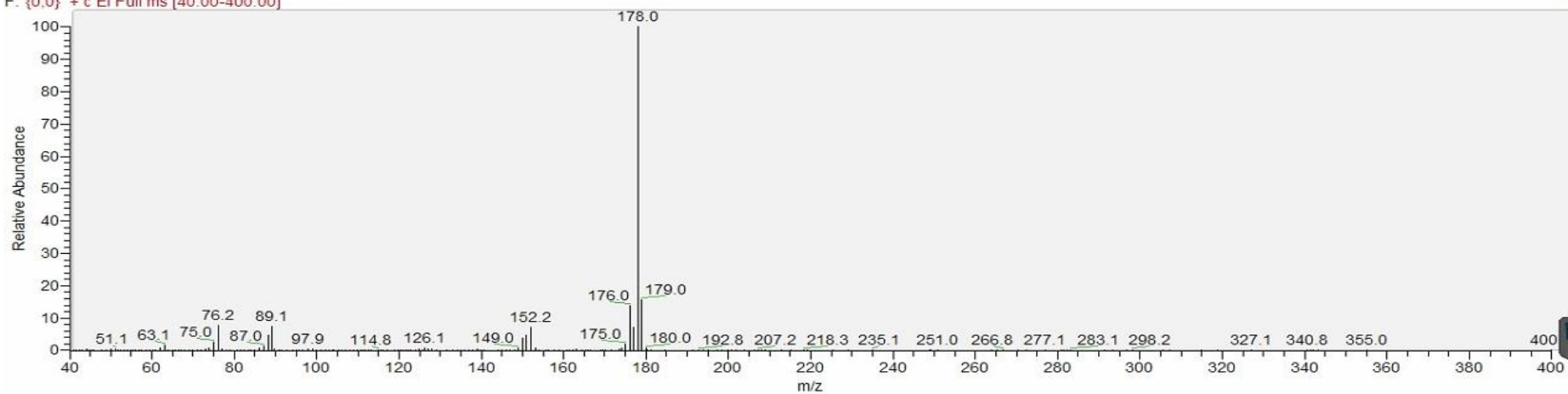
RT: 25.52 AV: 1 NL: 1.03E8
T: {0.0} + c EI SIM ms [88.50-89.50, 151.50-152.50, 177.50-178.50]



Anthracene

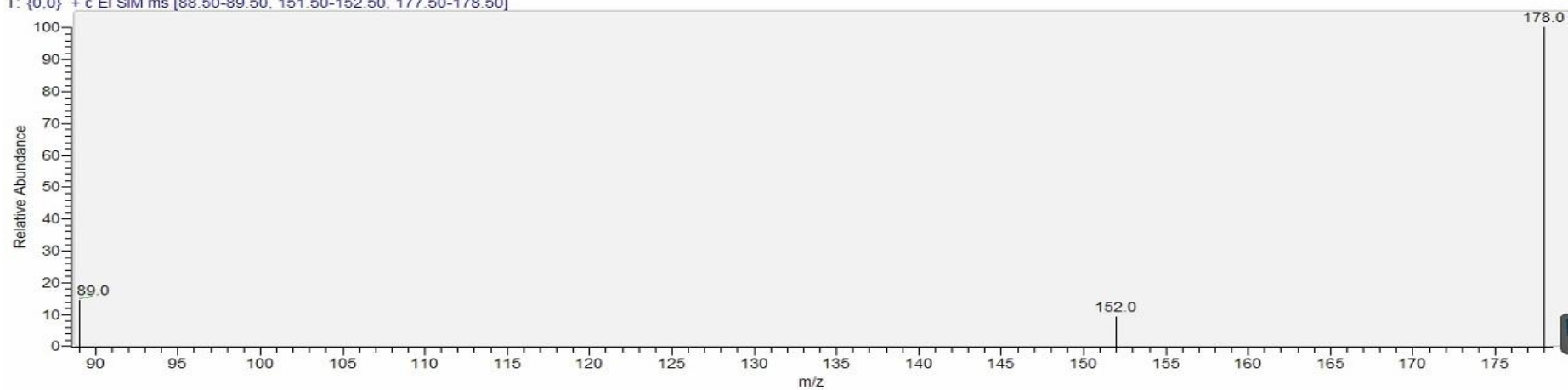
Full-scan

RT: 25.80 AV: 1 NL: 3.13E7
F: {0,0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



SIM

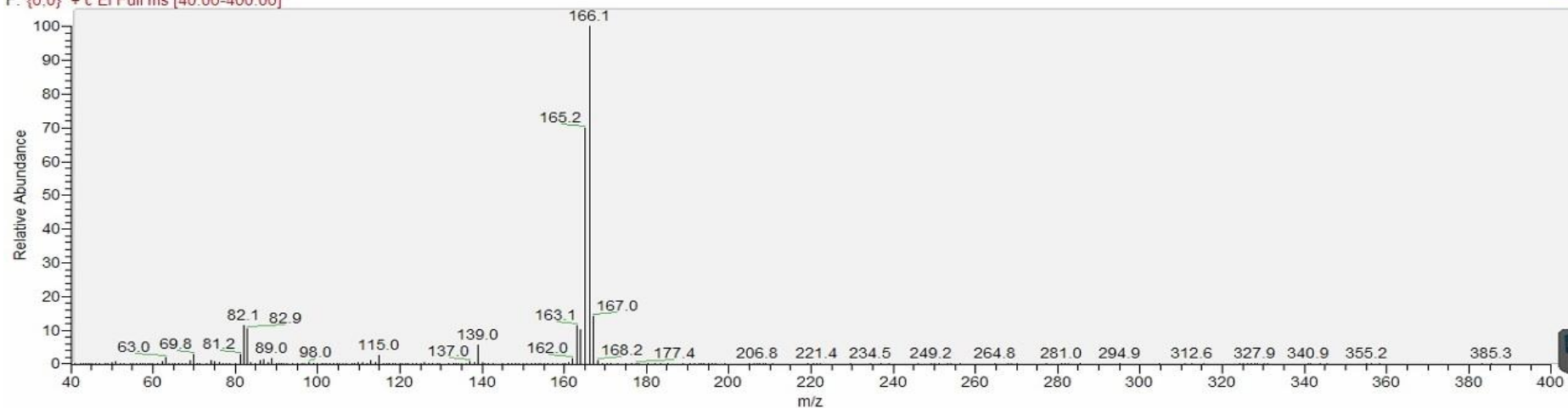
RT: 25.87 AV: 1 NL: 4.04E7
T: {0,0} + c EI SIM ms [88.50-89.50, 151.50-152.50, 177.50-178.50]



Fluoranthrene

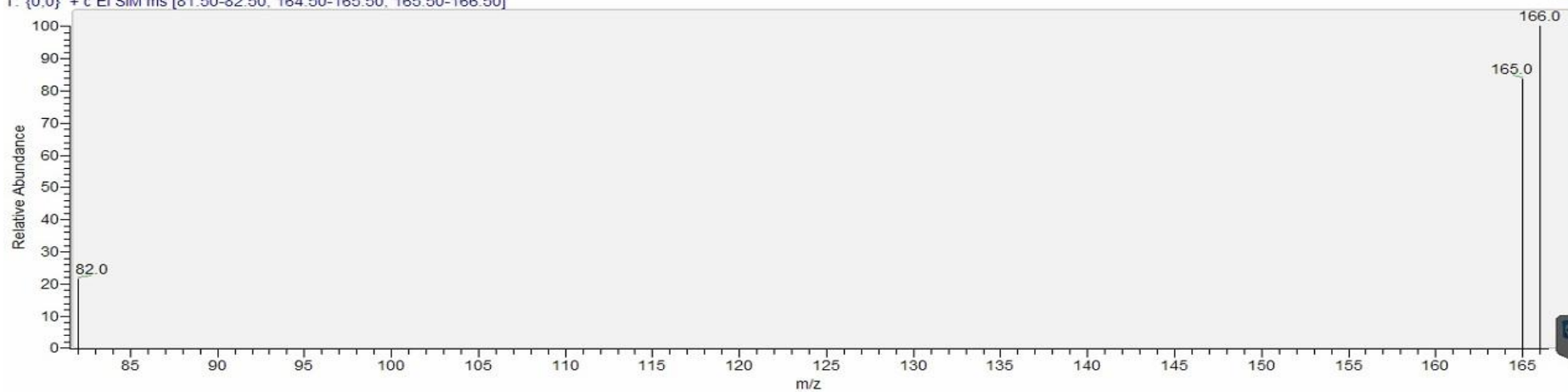
Full-scan

RT: 20.10 AV: 1 NL: 9.12E7
F: {0,0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



SIM

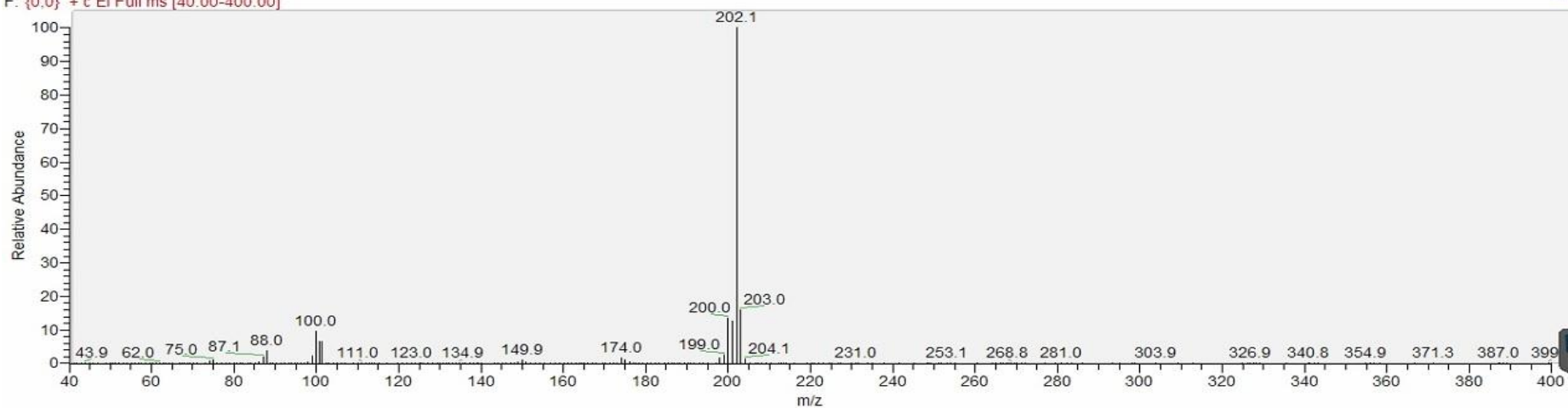
RT: 20.14 AV: 1 NL: 1.12E8
T: {0,0} + c EI SIM ms [81.50-82.50, 164.50-165.50, 165.50-166.50]



Pyrene

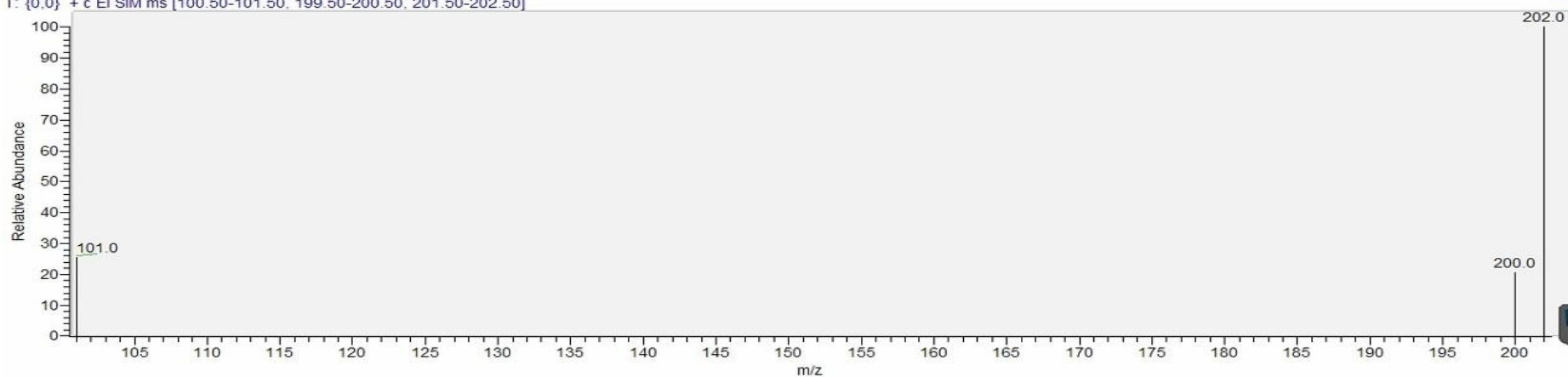
Full-scan

RT: 35.99 AV: 1 NL: 7.65E7
F: {0,0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



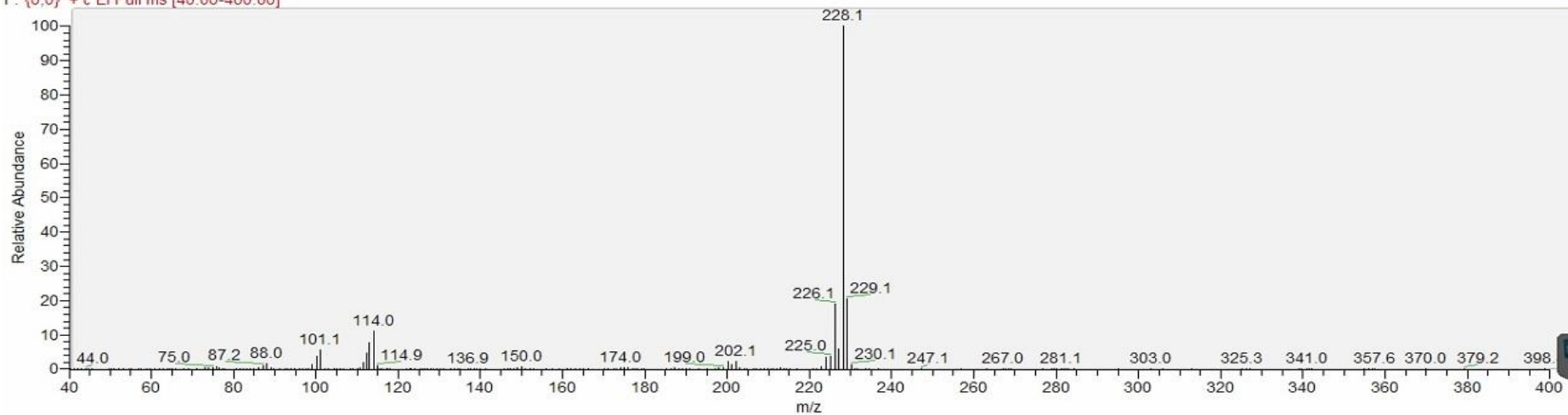
SIM

RT: 36.07 AV: 1 NL: 8.88E7
T: {0,0} + c EI SIM ms [100.50-101.50, 199.50-200.50, 201.50-202.50]

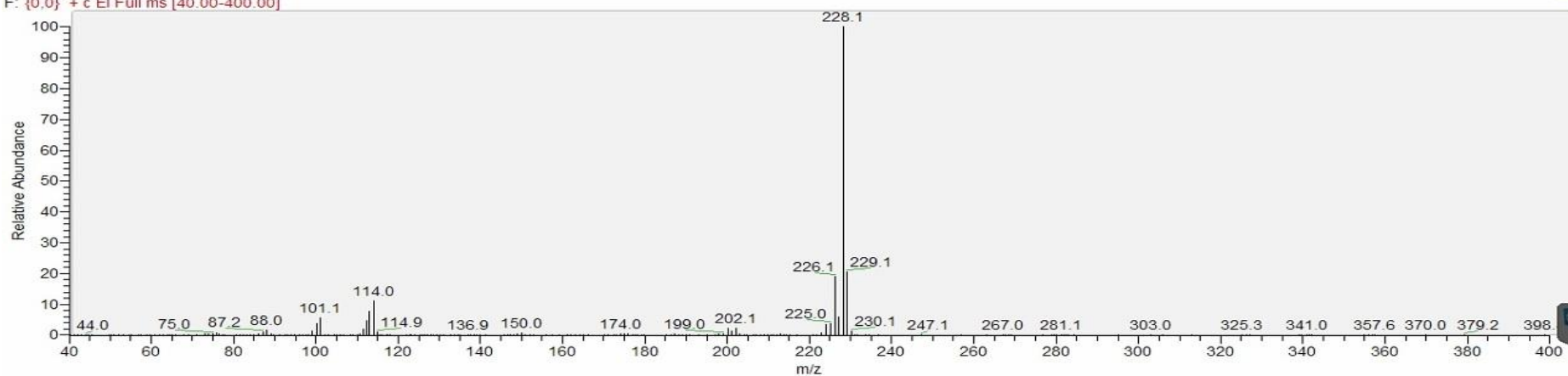


Benz[a]anthracene**Full-scan**

RT: 45.47 AV: 1 NL: 4.92E7
F: {0,0} + c EI Full ms [40.00-400.00]

**SIM**

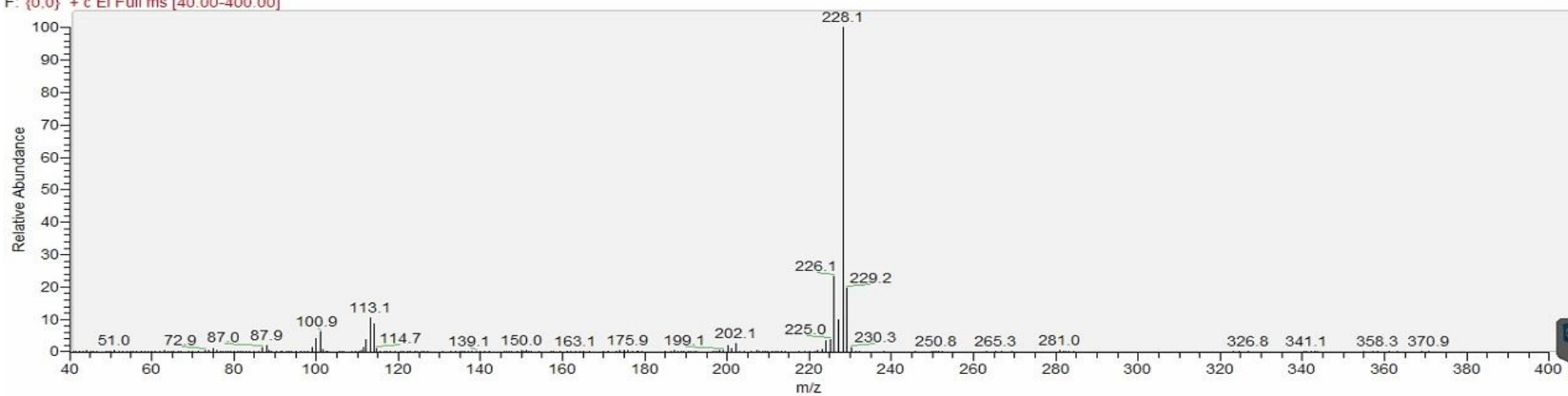
RT: 45.47 AV: 1 NL: 4.92E7
F: {0,0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



Chrysene

Full-scan

RT: 45.69 AV: 1 NL: 5.10E7
F: {0.0} + c EI Full ms [40.00-400.00]



SIM

RT: 45.75 AV: 1 NL: 7.68E7
T: {0.0} + c EI SIM ms [113.50-114.50, 225.50-226.50, 227.50-228.50]

