



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Βασιλική Ι. Μπότη

MSc. Χημικός

**Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό επιλεγμένων ενώσεων
με ενδοκρινική διαταρακτική δράση (EDCs) σε φυσικά νερά,
ιζήματα και τρόφιμα – Εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων**

Διδακτορική Διατριβή

Στη μνήμη του πατέρα μου

Γιάννη

(† 09-11-2008)

*Καλότυχοι οι νεκροί που λησμονάνε
την πίκρα της ζωής ...*

Μην τους κλαις, ο καημός σου όσος και νά 'ναι ...

Τους ζωντανούς τα μάτια σου ας θρηνήσουν:

θέλουν, μα δεν βολεί να λησμονήσουν.

(Λ. Μαβίλης, Αθήνη)



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	VII
----------------	-----

A. Θεωρητικό Μέρος.....	1
-------------------------	---

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ (<i>Endocrine Disrupting Compounds, EDCs</i>). 1	
---	--

1.1 Γενικά.....	1
-----------------	---

1.2 Το ενδοκρινικό σύστημα.....	2
---------------------------------	---

1.3 Μηχανισμοί δράσης των Ενδοκρινικών Διαταρακτών.....	4
---	---

1.4 Αποτελέσματα της έκθεσης σε Ενδοκρινικούς Διαταράκτες	8
---	---

1.5 Κατηγορίες Ενδοκρινικών Διαταρακτών.....	10
--	----

1.6 Περιβαλλοντική σημασία των Ενδοκρινικών Διαταρακτών	12
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ - ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΕΣ ΟΥΡΙΕΣ	15
---	----

2.1 Εισαγωγή.....	15
-------------------	----

2.2 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά των φυτοφαρμάκων	16
--	----

2.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την τύχη των φυτοφαρμάκων	19
---	----

2.2.2 Διεργασίες μεταφοράς και μετατροπής.....	21
--	----

2.3 Σημασία των προϊόντων μετατροπής των φυτοφαρμάκων.....	25
--	----

2.4 Αρχές τοξικολογίας και εκτίμηση επικινδυνότητας των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων.....	27
---	----

2.5 Ισχύουσα νομοθεσία για τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων.....	31
---	----

2.6 Κατηγορίες και χρήση των φυτοφαρμάκων	33
---	----

2.7 Η κατηγορία των ζιζανιοκτόνων.....	37
--	----

2.8 Υποκατεστημένες ουρίες (Δομή - Τρόπος δράσης)	39
---	----

2.9 Linuron, diuron και οι μεταβολίτες τους	42
---	----

2.9.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες	42
2.9.2 Τοξικότητα.....	44
2.9.3 Ενδοκρινική δράση	46
2.9.4 Περιβαλλοντική σημασία	48

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ, ΙΖΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ - ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

3.1 Εισαγωγή.....	53
3.2 Δειγματοληψία	54
3.3 Εκχύλιση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων	55
3.3.1 Υγρό υπόστρωμα	55
3.3.2 Στερεό υπόστρωμα	57
3.3.3 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction – SPE) ..	59
3.3.4 Μέθοδος διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση (Matrix Solid Phase Dispersion – MSPD).....	65
3.4 Καθαρισμός.....	69
3.5 Χρωματογραφικός προσδιορισμός	70
3.6 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας.....	71
3.6.1 Γενικά περί αβεβαιότητας.....	73
3.6.2 Εκτιμώντας την αβεβαιότητα	75
3.6.3 Αβεβαιότητα μέτρησης και μελέτες επικύρωσης.....	78
3.6.4 Εκτίμηση της αβεβαιότητας με «εσωτερική» (in-house) μελέτη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας μεθόδου	81
3.6.5 Αβεβαιότητα μέτρησης προερχόμενη από την ορθότητα (trueness) μιας αναλυτικής μεθόδου	82
3.6.6 Ανάκτηση αναλυτικής μεθόδου και υπολογισμός της αβεβαιότητας	85

3.6.6.1 Πρακτική εκτίμηση των συστατικών της αβεβαιότητας	88
3.6.6.2 Αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης, $u(\bar{R}_m)$	90

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	93
------------------------------	----

4.1 Γενικά	93
------------------	----

4.2 Βασική στατιστική: κάποιες έννοιες	95
--	----

4.2.1 Δοκιμασία Student, t (t-Test)	95
---	----

4.2.2. Δοκιμασία F (F-test)	96
-----------------------------------	----

4.2.3. Ανάλυση διακύμανσης (ANalysis Of VAriance, ANOVA)	97
--	----

4.3 Πειραματικός σχεδιασμός (Experimental Design, DoE)	100
--	-----

4.3.1 Εισαγωγή	100
----------------------	-----

4.3.2 Χρήση παραγοντικών πειραματικών σχεδιασμών για τη βελτιστοποίηση πειραματικών συνθηκών	103
--	-----

4.3.3 Πλήρως παραγοντικό σχέδιο	104
---------------------------------------	-----

4.3.4 Κλασματικό παραγοντικό σχέδιο	107
---	-----

4.3.5 Πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο ή ιεραρχικό	107
--	-----

4.4 Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks, ANNs)	109
---	-----

4.4.1 Ορισμός	109
---------------------	-----

4.4.2 Από τα βιολογικά στα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα	109
---	-----

4.4.3 Βασικές αρχές τεχνητών νευρωνικών δικτύων	111
---	-----

4.4.4 Εκπαίδευση – Γενίκευση	113
------------------------------------	-----

4.4.5 Το Πολυεπίπεδο Perceptron (Multi layer Perceptron, MLP)	115
---	-----

4.4.6 Εφαρμογές των ΤΝΔ στη χημεία	117
--	-----

Β. Σκοπός και αντικείμενο της Διδακτορικής Διατριβής	121
--	-----

Γ. Πειραματικό Μέρος	125
----------------------------	-----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	125
5.1 Πρότυπες ενώσεις και διαλύματα αυτών	125
5.2 Διαλύτες-Αντιδραστήρια.....	126
5.3 Όργανα-Συσκευές	126
5.4 Υλικά	127
5.5 Δείγματα	127
5.5.1 Δείγματα ιζημάτων	127
5.5.2 Δείγματα νερών	128
5.5.3 Δείγματα τροφίμων.....	128
5.6 Εμβολιασμός Δειγμάτων	130
5.6.1. Ιζήματα	130
5.6.2 Νερά.....	131
5.6.2 Τρόφιμα	132
5.7 Μέθοδοι εκχύλισης των δειγμάτων.....	133
5.7.1 Ιζήματα-Μέθοδος υπερήχων	133
5.7.2 Νερά-Μέθοδος εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (SPE)	133
5.7.3 Τρόφιμα-Μέθοδος εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD).....	134
5.8 Συστήματα χρωματογραφίας.....	135
5.8.1 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, σειριακό φωτοδιόδων (HPLC-UV/DAD)	135
5.9 Στατιστικά πακέτα επεξεργασίας.....	136
Γ. Αποτελέσματα-συζήτηση	137

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Η ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΙΖΗΜΑΤΩΝ..... 137

6.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός και ποσοτικοποίηση 137

6.2 Επικύρωση της μεθόδου 140

6.2.1 Εύρος γραμμικότητας, ευαισθησία και πιστότητα (precision)..... 140

6.2.2 Εκτίμηση της ορθότητας (trueness) και προσδιορισμός της αβεβαιότητας της μεθόδου 141

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Η ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (SPE) ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ..... 153

7.1 Παράμετροι βελτιστοποίησης της μεθόδου εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (SPE)..... 153

7.1.1 Επίδραση της ιονικής ισχύος..... 157

7.1.2 Επίδραση των χουμικών οξέων 158

7.2 Επικύρωση της μεθόδου εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (SPE)..... 160

7.2.1 Εύρος γραμμικότητας, ευαισθησία και πιστότητα (precision)..... 160

7.2.2 Εκτίμηση της ορθότητας και προσδιορισμός της αβεβαιότητας της μεθόδου..... 162

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ EDCs ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MSPD-ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΜΕ ΤΕΧΝΗΤΑ ΝΕΥΡΩΝΙΚΑ ΔΙΚΤΥΑ - ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ 171

8.1 Βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD).....	171
8.1.1 Μέθοδος αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά (One Factor At-a-Time, OFAT).....	171
8.1.2 Πολυπαραγοντική Μέθοδος (Multivariable method).....	176
8.2 Απόδοση της μεθόδου εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD)	195
8.3 Εκτίμηση της αβεβαιότητας της μεθόδου MSPD σε διαφορετικά είδη τροφίμων βάσει ανακτήσεων	198
8.4 Εφαρμογή της μεθόδου MSPD σε δείγματα τροφίμων, εμβολιασμένα με το μίγμα των επιλεγμένων ενώσεων	207
8.5 Εφαρμογή της μεθόδου MSPD σε πραγματικά δείγματα τροφίμων	209
8.6 Εκτίμηση επικινδυνότητας.....	227
Δ. Συμπεράσματα	241
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	241
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	255
Summary	i
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	ix
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	xv
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ	xvii
Σύντομο Βιογραφικό σημείωμα	xxi

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Τριαντάφυλλου Αλμπάνη, τον οποίο επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την συνεχή καθοδήγηση και παρακολούθηση της πορείας της εργασίας μου, τις ουσιαστικές και καθοριστικές υποδείξεις και συμβουλές του καθώς και την ηθική στήριξη και συμπαράστασή του καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής αυτής της Διατριβής.

* * *

Ως γνωστόν, μία από τις ερευνητικές δραστηριότητες του Εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας είναι ο έλεγχος των επιπέδων και της περιβαλλοντικής συμπεριφοράς τοξικών μικρορυπαντών τόσο σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα όσο και κατά την είσοδό τους στην τροφική αλυσίδα. Σε αυτά τα πλαίσια εντάσσεται και η εκπόνηση της παρούσας Διατριβής, η οποία πραγματεύεται την υπολειμματικότητα δύο επιλεγμένων φυτοφαρμάκων καθώς και των κοινών τους μεταβολιτών σε ορισμένα είδη τροφίμων που συμπεριλαμβάνονται στο κοινώς λεγόμενο “καλάθι της νοικοκυράς”. Το ενδιαφέρον της εστιάζεται ιδιαίτερα στη βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των παραπάνω ενώσεων σε διάφορους τύπους υδάτων, σε ιζήματα ποικίλης προέλευσης και σε επιλεγμένα φρούτα και λαχανικά. Τα δύο πρώτα υποστρώματα αποτελούν προέκταση της ερευνητικής εργασίας που είχαμε πραγματοποιήσει στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης στο ίδιο εργαστήριο και υπό την εποπτεία πάντα του Καθηγητή κ. Τριαντάφυλλου Αλμπάνη. Η χρήση χημειομετρικών μεθόδων διαπερνά όλο τον κορμό της εργασίας μας σε μια προσπάθεια εφαρμογής τους τόσο για τη

βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων όσο και για την εκτίμηση του βαθμού της σχετιζόμενης με την ανάκτηση αβεβαιότητας αυτών. Έτσι γίνεται χρήση δύο διαφορετικών πειραματικών σχεδιασμών και επιπλέον επιχειρείται συνδυασμός με υπολογιστικά μοντέλα που ανήκουν στον κλάδο της Τεχνητής Νοημοσύνης, τα Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα. Τέλος, γίνεται προσπάθεια αξιολόγησης του κινδύνου των καταναλωτών των επιλεγμένων τροφίμων λόγω της υπολειμματικότητας των δύο φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους.

Το πειραματικό μέρος της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής χρηματοδοτήθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) στα πλαίσια του Προγράμματος ΠΕΝΕΔ-2003 με τίτλο «Ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών ολοκληρωμένου ελέγχου & προχωρημένων οξειδωτικών διεργασιών για την απομάκρυνση οργανικών τοξικών-ενδοκρινικών διαταρακτών από τα φυσικά νερά & τα επεξεργασμένα λύματα».

* * *

Στο τέρμα της προσπάθειάς μου θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέδραμαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στην ολοκλήρωση αυτής της Διατριβής και ειδικότερα:

Στα άλλα δύο μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Σταλικά και την Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Οργάνωσης και Διαχείρισης Αγροτικών Εκμεταλλεύσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Δήμητρα Χελά, για τις εύστοχες υποδείξεις τους και την εποικοδομητική κριτική τους.

Στον Λέκτορα κ. Βασίλειο Σακκά για τις πολύτιμες συμβουλές και παρεμβάσεις του, τις χρήσιμες επιστημονικές συζητήσεις μας, την άριστη συνεργασία και την αμέριστη υπομονή και συμπαράστασή του.

Τον κ. Γεώργιο Πιταράκη, MSc, Υπεύθυνο Χημείου στη Δ.Ε.Υ.Α. της Λάρισας, για τη συνδρομή του στον προσδιορισμό του ολικού οργανικού άνθρακα (T.O.C.) στα δείγματα φυσικών υδάτων.

Τον κ. Azharul Islam, υποψήφιο Διδάκτορα, για την πολύτιμη βοήθειά του, την ανταλλαγή χρήσιμων επιστημονικών απόψεων και για την άψογη συνεργασία μας.

Στις συναδέλφους και συνεργάτιδες Δήμητρα Λαμπροπούλου, Λέκτορα· Αικατερίνη Δήμου, Δρα· Χαρούλα Τσούτση, Δρα· Βασιλική Βαλσαμάκη, Δρα· Ελπινίκη Αμβράζη, Δρα· και Άννα Καρρά, MSc, για τη συναδελφική κατανόηση και τη συνεισφορά τους στη δημιουργία γόνιμου ερευνητικού κλίματος και ευχάριστου και φιλικού εργασιακού περιβάλλοντος.

Και σε όλους τους συναδέλφους, μέλη του Εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας, για το καλό κλίμα, την κατανόηση και τη φιλική συνεργασία.

Τέλος ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους γονείς μου Γιάννη και Ιουλία και τον αδερφό μου Γιώργο για την υπομονή, την κατανόηση και την αδιάλειπτη ηθική και υλική συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια της προσπάθειάς μου. Στάθηκαν πολύτιμοι συνοδοιπόροι και ανεκτίμητοι αρωγοί στον αγώνα μου για την πραγμάτωση των ονείρων μου. Είναι πολύ κρίμα που ο πατέρας μου δεν πρόλαβε να δει και να χαρεί την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας...

Βασιλική Ι. Μπότη

Ιωάννινα, Μάρτιος 2009

Α. Θεωρητικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟΙ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΕΣ

(*Endocrine Disrupting Compounds, EDCs*)

1.1 Γενικά

Αν και ο άνθρωπος αποτελεί ένα από τα πολλά έμβια όντα πάνω στη γη, έχει τη μοναδική ικανότητα να μεταβάλλει το περιβάλλον του ταχύτατα μέσω της τεχνολογίας, είτε αρνητικά είτε θετικά. Είναι πλέον φανερό ότι η χρήση χημικών ενώσεων σε γεωργικές, βιομηχανικές και οικιακές δραστηριότητες έχει επηρεάσει την υγεία του οικοσυστήματος συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Σε πολλές περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί μεταβολές που αφορούν στην επιβίωση, στη βιοποικιλότητα καθώς στη γενετική παραλλαγή των πληθυσμών. Στις μέρες μας λοιπόν, όλο και πιο επιτακτικά, απευθύνεται στην επιστημονική κοινότητα το καίριο ερώτημα που αφορά στη δυνατότητα των ρύπων, οι οποίοι απελευθερώνονται στο περιβάλλον από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, να θέτουν κινδύνους για την υγεία του οικοσυστήματος αφού σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες έχει αποδειχθεί ότι οι ρυπαντές μπορούν να μεταβάλλουν το χημικό σήμα ανάμεσα στα κύτταρα των οργανισμών. Μετά τη δημοσίευση του βιβλίου «Our stolen future» (Colborn,

Dumanoski et al. 1997) με την χρηματοδότηση της WWF (*World Wildlife Fund*), αυτή η αρχικά υποτιθέμενη υποψία μετατράπηκε σε σοβαρό θέμα επιστημονικών συζητήσεων.

Τις τελευταίες δεκαετίες, το γεγονός της συσσώρευσης στο περιβάλλον διαφόρων χημικών ενώσεων σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις σχετικά με τις αναπαραγωγικές και αναπτυξιακές δυσλειτουργίες κυρίως στα είδη του ζωικού βασιλείου και σε μικρότερο εύρος στον άνθρωπο, έχει οδηγήσει στην παραδοχή της θεωρίας ότι οι χημικές ενώσεις που απελευθερώνονται στο περιβάλλον χημικά μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και την επιβίωση των οργανισμών, επιδρώντας στη φυσιολογική λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος. Το ενδοκρινικό είναι ένα από τα συστήματα του σώματος, το οποίο συντονίζει τα περισσότερα από τα λοιπά συστήματα και το οποίο φαίνεται να είναι ο πρωταρχικός στόχος πολλών χημικών ενώσεων. Έχει παρατηρηθεί ότι αυτές οι χημικές ενώσεις, μιμούνται τη δομή των φυσικών ορμονών που παράγει το σώμα, όπως για παράδειγμα τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα, δρουν ως αντί-ορμόνες και επεμβαίνουν στη σύνθεση και την αποικοδόμηση αυτών. Οι ενώσεις αυτές ονομάστηκαν Ενδοκρινικοί Διαταράκτες (*Endocrine Disrupting Compounds, EDCs*).

Σύμφωνα με την Ειδική Αναφορά στους Περιβαλλοντικούς Διαταράκτες από την Εταιρία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (*Environmental Protection Agency, EPA*), ο ορισμός των ενώσεων αυτών έχει ως εξής: «Ένας περιβαλλοντικός ή ορμονικός διαταράκτης ορίζεται ως ένας εξωγενής παράγοντας, ο οποίος εμπλέκεται στη σύνθεση, στην αποβολή, στη μεταφορά, στην πρόσδεση, στη δράση ή στην αποικοδόμηση των φυσικών ορμονών του σώματος, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την διατήρηση της ομοιόστασης, της αναπαραγωγής, της εξέλιξης και της συμπεριφοράς».

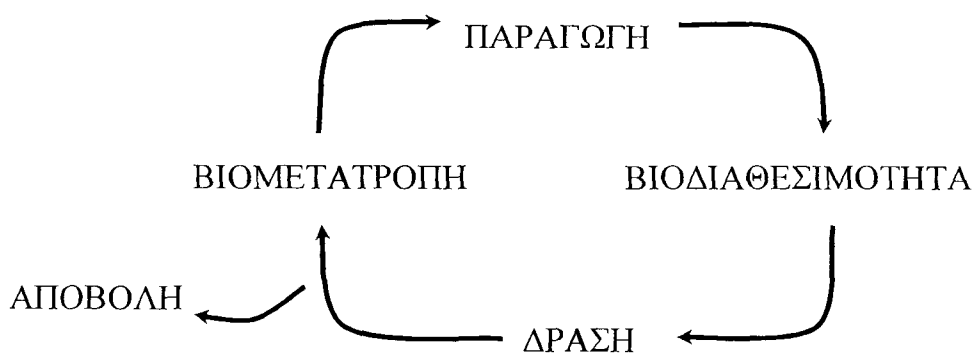
1.2 Το ενδοκρινικό σύστημα

Σε όλους σχεδόν τους σύνθετους πολυκύτταρους οργανισμούς υπάρχουν δύο κύρια συστήματα τα οποία ελέγχουν και συντονίζουν τις σωματικές διεργασίες: α) το νευρικό σύστημα, το οποίο ασκεί ταχύτατα, από σημείο σε σημείο έλεγχο μέσω

ηλεκτρικών σημάτων που διαπερνούν τα νεύρα σε συγκεκριμένα όργανα ή ιστούς και β) το ενδοκρινικό σύστημα, το οποίο είναι ένα πιο αργό σύστημα που βασίζεται στους χημικούς μεταφορείς μηνυμάτων, τις ορμόνες, οι οποίες εκκρίνονται στο αίμα και μπορούν να φτάσουν σε κάθε σημείο του σώματος.

Το ενδοκρινικό σύστημα είναι ένα σύνθετο δίκτυο από αδένες, ορμόνες και υποδοχείς. Παρέχει το «κλειδί» της επικοινωνίας και το σύνδεσμο του ελέγχου μεταξύ του νευρικού συστήματος και των σωματικών λειτουργιών όπως η αναπαραγωγή, η ανοσία, ο μεταβολισμός και η συμπεριφορά.

Οι ενδοκρινείς αδένες βρίσκονται σε διάφορα σημεία του σώματος και σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Τα κύτταρα αυτών των αδένων εκκρίνουν συγκεκριμένες χημικές ενώσεις που ονομάζονται ορμόνες. Η παραγωγή και τα επίπεδα κίνησης των ορμονών ελέγχονται μέσω ανατροφοδοτούμενων διεργασιών. Τα ανατροφοδοτούμενα συστήματα διατηρούν την ισορροπία στα διάφορα συστήματα του σώματος και αυτή είναι μια διεργασία γνωστή ως ομοιόσταση. Στο Σχήμα 1.1 φαίνεται η φυσιολογική δυναμική των ορμονών.



Σχήμα 1.1. Απλουστευμένο μοντέλο της δυναμικής των ορμονών (Guillete and Crain 2000)

Οι ορμόνες κυκλοφορούν στο σώμα μέσω της ροής του αίματος και συντονίζουν τις κυτταρικές ή οργανικές λειτουργίες αφού προσδεθούν στους υποδοχείς των κυττάρων που προορίζονται. Οι τελευταίοι, αφού ενεργοποιηθούν με την πρόσδεση των ορμονών, ελέγχουν τις λειτουργίες και διεργασίες στους ιστούς

μέσω των αλληλεπιδράσεων με το DNA των κυττάρων ή μέσω άλλων σύνθετων ενδοκυτταρικών διεργασιών. Η ισορροπία των ορμονών -ομοιόσταση- στον οργανισμό είναι απαραίτητη για την αποφυγή δυσλειτουργιών.

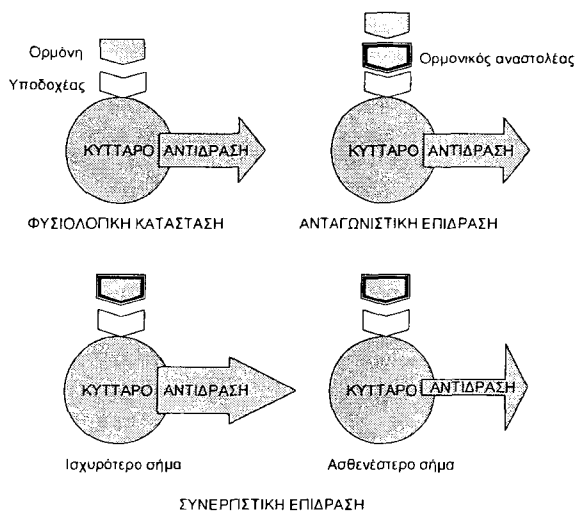
Τα EDCs μπορούν να επέμβουν σε κάθε ένα σημείο ξεχωριστά του μεταβολικού μονοπατιού των ορμονών. Μπορούν να επιδράσουν στην παραγωγή της ορμόνης, στη διαθεσιμότητα, στη δράση καθώς και στην αποβολή ή βιομετατροπή αυτής (Guillete and Crain 2000). Ωστόσο οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους οι ενώσεις διαταράσσουν τα ενδοκρινικά συστήματα είναι πολύπλοκοι και δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί.

1.3 Μηχανισμοί δράσης των Ενδοκρινικών Διαταρακτών

Λόγω της πολύπλοκης φύσης του ενδοκρινικού συστήματος είναι φανερό ότι οποιοδήποτε εξωτερικό ερέθισμα, π.χ. έκθεση σε ουσίες-μιμητές της ενδοκρινικής δράσης μπορεί να επηρεάσει σημαντικές λειτουργίες. Οι κυριότεροι μηχανισμοί δράσης των EDCs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στις άμεσες αλληλεπιδράσεις με τους ορμονικούς υποδοχείς και στις έμμεσες με το ενδοκρινικό σύστημα (Lintelmann, Katayama et al. 2003).

I. Άμεσες αλληλεπιδράσεις

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα EDCs που μπορούν να μιμηθούν την βιολογική δραστηριότητα των ορμονών και να προσδεθούν στον κυτταρικό υποδοχέα. Όπως προαναφέρθηκε, ένα μόριο ορμόνης εκκρίνεται από κάποιον αδέν, φτάνει μέσω του αίματος σε ένα κύτταρο και καταλαμβάνει έναν υποδοχέα. Η σχέση ορμόνης και υποδοχέα ακολουθεί την αρχή «κλειδιού και κλειδαριάς». Τότε στέλνεται ένα σήμα, το οποίο μπορεί να παράγει μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Οι ορμονικοί διαταράκτες εμφανίζουν διάφορους τρόπους σύγχυσης του συστήματος σημάτων του σώματος όταν καταλαμβάνουν έναν υποδοχέα ορμόνης. Στο Σχήμα 1.2 φαίνεται συγκριτικά η δράση των ορμονικών διαταρακτών σε σχέση με τις φυσικές ορμόνες.



Σχήμα 1.2. Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των ενδοκρινικών διαταρακτών

Έτσι, μπορούν να οδηγήσουν σε αποτελέσματα αντίστοιχα με αυτά της φυσιολογικής αντίδρασης του κυττάρου στην φυσική ορμόνη σε λάθος χρονική στιγμή ή σε υπερβολική έκταση (*Συνεργιστική επίδραση, Agonistic effect*). Η δραστηριότητα ενός εξωτερικού «συναγωνιστή» εξαρτάται από το βαθμό συγγένειάς του με τον υποδοχέα καθώς και από την ικανότητα του να τον διεγείρει. Μία χημική ένωση με τέτοια δράση είναι το συνθετικό οιστρογόνο diethylstilbestrol (*DES*).

Άλλες ενώσεις επιδρούν στον υποδοχέα ανταγωνιστικά όπου και προσδένονται με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή του. Η πρόσδεση μάλιστα, της χημικής ουσίας στον υποδοχέα αποτρέπει και την πρόσδεση της φυσιολογικής ορμόνης (*Ανταγωνιστική επίδραση, Antagonistic effect*). Η αναστολή του υποδοχέα μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: α) μια ενδογενής και μια εξωγενής ουσία να ανταγωνίζονται για το ίδιο ενεργό σημείο πρόσδεσης, οπότε ο υποδοχέας οδηγείται σε πλήρη απενεργοποίηση και β) ο αναστολέας δεσμεύεται στον υποδοχέα ή το σύμπλοκο υποδοχέα-ορμόνης, αλλά όχι στο ενεργό σημείο πρόσδεσης οπότε το αποτέλεσμα είναι οι πιο αργές ή μειωμένες έντασης αντιδράσεις από τον υποδοχέα. Τυπικοί ανταγωνιστές στους υποδοχείς ορμονών είναι τα ζιζανιοκτόνα linuron, vinclozolin και οι μεταβολίτες τους, η φαρμακευτική ουσία tamoxifen και ο

μεταβολίτης του οργανοχλωριουμένου φυτοφαρμάκου DDT, p,p'-DDE, που ανταγωνίζονται για το σημείο πρόσδεσης στους υποδοχείς ανδρογόνων και οιστρογόνων, αντίστοιχα (Cook, Mullin et al. 1993; Kelce, Stone et al. 1995).

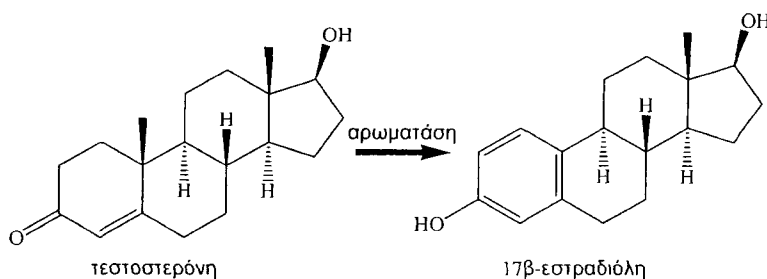
Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις πάντως η συγκέντρωση του υποκαταστάτη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Οι συγκεντρώσεις των ενδογενών ορμονών είναι πολύ χαμηλές υπό φυσιολογικές συνθήκες. Αν η συγκέντρωση των εξωγενών ουσιών σε έναν οργανισμό είναι υψηλή τα φαινόμενα ενδοκρινικών διαταραχών μπορούν να προκληθούν ακόμη και αν οι εξωγενείς υποκαταστάτες παρουσιάζουν μικρή συγγένεια πρόσδεσης με τον υποδοχέα.

II. Έμμεσες αλληλεπιδράσεις

Στην δεύτερη κατηγορία συγκαταλέγονται τα EDCs που μεταβάλλουν:

α) τα ποσοστά -συγκέντρωση- των φυσιολογικών ορμονών που υπάρχουν στο κυκλοφορικό σύστημα με πρόσδεση στις πρωτεΐνες μεταφοράς στο αίμα. Χημικές ενώσεις που ανταγωνίζονται τα φυλετικά στεροειδή για σημεία πρόσδεσης στις πρωτεΐνες μεταφοράς, μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα των ελεύθερων και επομένως δραστικών ορμονών. Επιπλέον μπορεί να μεταβληθεί η παραγωγή ορμονών με αναστολή σημαντικών αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα. Σε αυτήν την περίπτωση συγκαταλέγεται η διατάραξη των ορμονών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αναπαραγωγής και ανάπτυξης όπου μέχρι σήμερα έχει επικεντρωθεί το ενδιαφέρον λόγω μιας σειράς παρατηρήσεων στους ανθρώπους και στα είδη της άγριας πανίδας. Το κυριότερο πεδίο έρευνας αφορά τις στεροειδείς ορμόνες, παραγόμενες από τους αδένες αναπαραγωγής, οι οποίες, σε συνδυασμό με κάποιες άλλες ορμόνες, συντονίζουν διεργασίες όπως η αναπαραγωγή και η σεξουαλική συμπεριφορά, η εμβρυϊκή διαφοροποίηση και ανάπτυξη καθώς επίσης και η ωρίμανση. Επίσης, επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και τον γενικό μεταβολισμό. Από τα κυριότερα φυλετικά στεροειδή είναι τα οιστρογόνα που είναι ένα σύνολο από χημικές ουσίες παρόμοιας δομής και τα οποία είναι υπεύθυνα για την θηλυκή φυλετική ανάπτυξη και αναπαραγωγή. Το κυριότερο ανθρώπινο οιστρογόνο είναι η 17-β-εστραδιόλη. Τα ανδρογόνα είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και

διατήρηση των αρσενικών φυλετικών χαρακτηριστικών. Η τεστοστερόνη αποτελεί το κυριότερο ανθρώπινο ανδρογόνο. Η βιοσύνθεση λοιπόν των οιστρογόνων περιλαμβάνει τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε 17-β-εστραδιόλη και καταλύεται από το ένζυμο αρωματάση (Σχήμα 1.3). Για παράδειγμα το σύνολο ενζύμων P450 αναμιγνύεται τόσο στην αποτοξίνωση των οργανισμών από ρυπαντές όσο και στη μετατροπή των στεροειδών κατά τον μεταβολισμό και τη βιοσύνθεσή τους. Πολλά από αυτά τα ένζυμα είναι τα ίδια που συμμετέχουν και στις δύο διεργασίες. Έτσι, για παράδειγμα ψάρια που είχαν εκτεθεί σε πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) παρουσίασαν μια αύξηση στην ηπατική δραστηριότητα του P450 ενζύμου και μια ταυτόχρονη μείωση στη συγκέντρωση στεροειδών οδηγώντας στον επονομαζόμενο σεξουαλικό διμορφισμό (Soontornchat, Li et al. 1994; Safe and Krishnan 1995; Guillete and Crain 2000).



Σχήμα 1.3. Χημικές δομές του ανδρογόνου, τεστοστερόνη και του οιστρογόνου, 17β-εστραδιόλη, η μετατροπή της τεστοστερόνης σε 17β-εστραδιόλη καταλύεται από την P450 αρωματάση

β) τη συγκέντρωση των ορμονικών υποδοχέων (Lintelmann, Katayama et al. 2003). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ένωση με αντι-οιστρογόνο δράση 2,3,7,8-τετράχλωρο-διβενζό-*p*-διοξίνη (TCDD) που αποτελεί εξωγενή «αγωνιστή» για τον άρυλδδρογονάνθρακα-υποδοχέα (Ah). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας δεν αναμιγνύεται στον μεταβολισμό ορμονών αλλά η ενεργοποίησή του μπορεί να έχει διάφορες επιδράσεις στο ενδοκρινικό σύστημα όπως: (1) αύξηση του ποσοστού διάσπασης των

υποδοχέων οιστρογόνων, (2) επαγωγή των ένζυμων που μεταβολίζουν την εστραδιόλη και (3) αναστολή των γονιδίων που ελέγχονται από την εστραδιόλη.

1.4 Αποτελέσματα της έκθεσης σε Ενδοκρινικούς Διαταράκτες

Η κοινή διαπίστωση ότι η έκθεση σε χημικές ενώσεις που απελευθερώνονται στο περιβάλλον μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της ενδοκρινικής λειτουργίας, προέκυψε από την παρατήρηση αλλαγών σε έναν αρκετά μεγάλο αριθμό ειδών της άγριας πανίδας. Αποτελέσματα ενδοκρινικής δράσης έχουν αναφερθεί σε μαλάκια, καρκινοειδή, ψάρια, ερπετά, πουλιά, και θηλαστικά σε διάφορα μέρη του κόσμου. Ένα από τα πρώτα στοιχεία, ότι οι χημικές συνθετικές ενώσεις ασκούν επίδραση όμοια με τις ορμόνες, αποτέλεσε η ανακάλυψη ότι σε περιοχές αρκετά ρυπασμένες με το εντομοκτόνο DDT οι γλάροι παρουσίασαν παραμορφωμένα φυλετικά όργανα. Στη δεκαετία του 1980, ο τοξικολόγος Fry του Πανεπιστημίου της Καλιφόρνια (Davis) εμβολίασε αυγά γλάρων με DDT και τα νεογνά είχαν τις ίδιες παραμορφώσεις των φυλετικών οργάνων όπως οι εκτεθειμένοι γλάροι σε ρυπασμένη περιοχή με το συγκεκριμένο εντομοκτόνο (Patlak 1996). Έχουν αναφερθεί πάρα πολλά περιστατικά ενδοκρινικής διαταρακτικής δράσης χημικών ουσιών στα είδη του ζωικού βασιλείου (Rhind 2002; Gunderson, Kools et al. 2003; Singh and Canario 2004). Για παράδειγμα, οι αρσενικοί αλιγάτορες της λίμνης Apopka στη Φλόριντα των Η.Π.Α, ένα οικοσύστημα ιδιαίτερα επιβαρυνμένο από ρυπαντές λόγω γεωργικών δραστηριοτήτων στη γύρω περιοχή, εμφάνισαν θηλυκά χαρακτηριστικά (*feminization*) έχοντας μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης ενώ τα θηλυκά παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων (Guillete, Gross et al. 1994; Semenza, Tolbert et al. 1997). Αντιστροφή του φύλου και στρεβλωμένα ποσοστά της αναλογίας αρσενικών/θηλυκών πληθυσμών παρατηρήθηκαν σε πολλά είδη ψαριών, κυρίως σε περιοχές κοντά σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας πολτού, χαρτιού και αποβλήτων (Nash, Kime et al. 2004).

Οι ενδείξεις για ενδοκρινική διαταρακτική δράση των χημικών ενώσεων στον άνθρωπο είναι πιο περιορισμένες. Η πιο εμφανής ένδειξη ότι ακόμη και ο άνθρωπος

είναι επιρρεπής σε πιθανή τερατογενή επίδραση των οιστρογόνων προέρχεται από τις κλινικές επιπτώσεις της έκθεσης κατά την κύηση σε ένα φαρμακευτικό οιστρογόνο, το diethylstilbestrol (*DES*).

Πίνακας 1.1

Αποτελέσματα της έκθεσης ανθρώπων σε λογικές ποσότητες γνωστών χημικών ενώσεων που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές (Wade 2003)

	Μηχανισμός	Αποτελέσματα
DES	Ενεργοποίηση του υποδοχέα οιστρογόνων	Προγεννητική έκθεση προκαλεί καρκίνο της μήτρας, δυσπλασίες, υπογονιμότητα στη γυναίκα, χαμηλή παραγωγή σπέρματος.
Kerone	Ενεργοποίηση του υποδοχέα οιστρογόνων	Προβλήματα γονιμότητας στους άνδρες
Dioxin	Ενεργοποίηση του υποδοχέα αρυλ-υδρογονανθράκων (AhR)	Έκθεση ενηλίκων προκαλεί αυξημένο κίνδυνο για καρδιοαγγειακές παθήσεις, καρκίνο του θυρεοειδούς, λευχαιμία. Έκθεση εμβρύων οδηγεί σε αποβολές και δυσλειτουργικούς τοκετούς.
Πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), διβενζοφουράνια (DBF)	AhR, αύξηση του μεταβολισμού ορμονών του θυρεοειδούς και των φυλετικών στεροειδών	Έκθεση ανηλίκων προκαλεί μεταβολές στο θυρεοειδή αδένα και δερματικές παθήσεις. Έκθεση εμβρύων οδηγεί σε αναπτυξιακές δυσλειτουργίες του νευρικού συστήματος, μειωμένη ικανότητα ανοσοποιητικού συστήματος, γενετικές μεταλλάξεις.
PCBs, DDE, βαρέα μέταλλα	AhR, μεταβολή στον ορμονικό μεταβολισμό	Προβλήματα στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των εμβρύων, πρόωρο τοκετό, γνωστικές δυσκολίες.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1940, το DES δόθηκε σε πολλά εκατομμύρια εγκύων γυναικών κυριαρχώντας η λάθος εντύπωση ότι θα απέτρεπε τις πιθανές αποβολές. Ενώ όμως το φάρμακο είχε ελάχιστη επίδραση στη μητέρα, η επιβλαβής δράση στο έμβρυο δεν έγινε φανερή παρά μόνο στις αρχές της δεκαετίας του '70 όταν ανακαλύφθηκε ότι νέες γυναίκες που είχαν εκτεθεί ως έμβρυα στο DES παρουσίασαν σημαντικά αυξημένο βαθμό ανάπτυξης μιας σπάνιας μορφής καρκίνου της μήτρας. Το φάρμακο αυτό απαγορεύτηκε τελικά την δεκαετία του 1970 (Hoover, Gray et al. 1977).

Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι γυναίκες με καρκίνο του στήθους είχαν μεγαλύτερα επίπεδα συγκεντρώσεων του φυτοφαρμάκου DDT ή των μεταβολιτών του στον λιπώδη ιστό του στήθους ή στο αίμα τους από ότι υγιείς γυναίκες (Patlak 1996; Hoyer, Grandjean et al. 1998). Τα σημαντικότερα παραδείγματα της επίδρασης των EDCs στον άνθρωπο συμπεριλαμβάνονται στον Πίνακα 1.1.

1.5 Κατηγορίες Ενδοκρινικών Διαταρακτών

Οι χημικές ενώσεις με ορμονική δραστηριότητα περιλαμβάνουν: α) τις φυσικές ορμόνες, οι οποίες απελευθερώνονται στο περιβάλλον και μπορεί να ασκούν ορμονική επίδραση σε άλλα είδη του ζωικού βασιλείου. Παράδειγμα αποτελούν οι ανθρώπινες ορμόνες που ενεργοποιείται ξανά η δραστηριότητά τους κατά την κατεργασία των ανθρώπινων αποβλήτων σε υπονόμους (Ternes, Stumpf et al. 1999), προκαλώντας ενδοκρινικές μεταβολές στα ψάρια, β) τις φυσικές ενώσεις, όπως οι τοξίνες, οι οποίες παράγονται από συστατικά των φυτών (*φυτοοιστρογόνα*) καθώς και διαφόρων ειδών μυκήτων (Desbrow, Routledge et al. 1998), γ) τις συνθετικά παραγόμενες φαρμακευτικές ουσίες είναι επίσης υψηλά ορμονικά δραστικές. Παράδειγμα αποτελούν τα αντισυλληπτικά χάπια και οι ορμονικές θεραπείες για διάφορα είδη καρκίνων, οι οποίες ενώσεις ανιχνεύονται συχνά σε λύματα υπονόμων (Parkkonen, Larsson et al. 2000), δ) τις κατασκευασμένες από τον άνθρωπο χημικές ενώσεις καθώς και τα παραπροϊόντα αυτών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Τέτοιες ενώσεις περιλαμβάνουν κάποια φυτοφάρμακα όπως το DDT και άλλες

χλωριωμένες ενώσεις, τα πλαστικά πρόσθετα και έναν αριθμό βιομηχανικών χημικών ουσιών, όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινόλια (PCBs) και τις διοξίνες.

Πίνακας 1.2

Παρασιτοκτόνα που προκαλούν διαταραχές στο ορμονικό και αναπαραγωγικό σύστημα των οργανισμών (Dankwardt 1998)

Οιστρογόνος δράση

Amitraz
Lindane
Parathion-methyl
Permethrin
Triadimefon
s- triazines

Αντι-ανδρογόνος δράση

Atrazine
Lindane
Linuron
Procymidon
Vinclozolin
Πυρεθρίνες

Επίδραση στην αναπαραγωγική ικανότητα των ανδρών

Μυκητοκτόνα χαλκού
Πυρεθρίνες
Διθειοκαρβαμιδικά
Οργανοφωσφορικά
Glyphosate

Διαταραχή στο μεταβολισμό των στεροειδών

Atrazine
Carbofuran
Conazole
Lindane

Διαταραχή στη λειτουργία του θυρεοειδούς

Amitrole
Ioxynil
Metribuzin
Trifluralin
Maneb
Zineb
Mancozeb

Επίδραση στις γοναδοτροφικές ορμόνες

Οργανοφωσφορικά
Διθειοκαρβαμιδικά
Amitraz
Atrazine

Τοξικότητα του αναπαραγωγικού συστήματος

2,4-D
Διθειοκαρβαμιδικά
Οργανοφωσφορικά

Γενικά τα φυτοφάρμακα αποτελούν μια πολύ μεγάλη κατηγορία χημικών ενώσεων με πολλές εκατοντάδες δραστικά συστατικά που βρίσκονται σε χρήση. Παρ' όλο που είναι από τις πιο μελετημένες κατηγορίες χημικών ουσιών, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι ορισμένα από αυτά είναι πιθανοί ενδοκρινικοί διαταράκτες. Στον Πίνακα 1.2. φαίνονται τα κυριότερα παρασιτοκτόνα και ο τρόπος επίδρασής τους στο ορμονικό και αναπαραγωγικό σύστημα των οργανισμών.

Πρόσφατα, η Εταιρία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (EPA) δημοσίευσε μια «πρόχειρη» λίστα ενώσεων οι οποίες θα πρέπει να μελετηθούν για την πιθανή υπαιτιότητα ενδοκρινικών διαταραχών. Οι αναμενόμενη λίστα περιλαμβάνει φυτοφάρμακα που αποτελούν ήδη γνωστούς για τη δράση τους αλλά και πιθανούς ενδοκρινικούς διαταράκτες επιλεγμένους λόγω της πιθανής έκθεσης του ανθρώπου σε αυτά και του μεγάλου όγκου παραγωγής τους. Επιπρόσθετα, η Ευρωπαϊκή Ένωση δημοσίευσε και αυτή λίστα με ενώσεις που παρεμβαίνουν στο ορμονικό σύστημα. Δυστυχώς οι διάφοροι ρυθμιστικοί φορείς δεν έχουν καταλήξει ακόμη σε μια κοινή λίστα ενδοκρινικών διαταρακτών.

Σύμφωνα με τον Πίνακα του Παραρτήματος Α, τέσσερις επίσημες πηγές συμφωνούν μόνο στα παρασιτοκτόνα atrazine, DDT, lindane και tributyltin. Τον Μάιο του 2005 ειδικοί ερευνητές και επιστήμονες σε διεθνές επίπεδο, αντιπρόσωποι διάφορων αρχών, συνεδρίασαν στην Πράγα με θέμα συζήτησης την Ευρωπαϊκή Έρευνα σχετικά με τα EDCs (*CREDO, cluster for research on endocrine disrupters*). Τα αποτελέσματα ενίσχυσαν την ανησυχία για τις μακροχρόνιες επιδράσεις της έκθεσης σε ενδοκρινικούς διαταράκτες της άγριας πανίδας και του ανθρώπου.

1.6 Περιβαλλοντική σημασία των Ενδοκρινικών Διαταρακτών

Η μεγάλη περιβαλλοντική σημασία των ενώσεων που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές έγκειται στο γεγονός ότι περιλαμβάνουν ένα πλήθος ενώσεων είτε φυσικών είτε συνθετικών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και συνεπώς υπόκεινται σε ποικίλες διεργασίες διάσπασης και μεταφοράς ανάλογες των περιβαλλοντικών συνθηκών. Η μελέτη της τύχης τους στο περιβάλλον όμως μπορεί να

αντιμετωπίζεται με τις κλασσικές μεθόδους ανίχνευσης και προσδιορισμού των χημικών ενώσεων. Ωστόσο, η μεγάλη περιβαλλοντική σημασία των EDCs πέρα από τα παραπάνω διαφαίνεται από το ερώτημα «κλειδί» που τίθεται πλέον όλο και πιο έντονα και αφορά την επονομαζόμενη «υπόθεση χαμηλής-δόσης» αναφορικά με τη βιολογική τους δράση ή αλλιώς τις ανεπιθύμητες επιδράσεις της έκθεσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Τότε, η «υπόθεση» παύει πια να είναι «υπόθεση» και απαιτείται η λήψη ρυθμιστικών και πολιτικών αποφάσεων.

Το θέμα τέθηκε για πρώτη φορά από την ομάδα του Καθηγητή vom Saal ο οποίος δημοσίευσε το 1997 έρευνα σύμφωνα με την οποία εμφανίστηκε αύξηση του προστάτη σε αρσενικά ποντίκια η μητέρα των οποίων εκτέθηκε σε πολύ χαμηλή δόση διφαινόλης Α (*bisphenol A*, *BPA*) (Nagel, Vom Saal et al. 1997). Οι συνήγοροι της «υπόθεσης χαμηλής-δόσης» υποστηρίζουν ότι η παραδοσιακή τοξικολογική προσέγγιση για την εκτίμηση της επικινδυνότητας δεν αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για την περίπτωση των EDCs. Το τρέχον πρωτόκολλο υποθέτει μια γραμμική σχέση δόσης-απόκρισης για την χημική έκθεση, ορίζει το ελάχιστο επίπεδο στο οποίο παρατηρείται μια ανεπιθύμητη δράση και έπειτα προσθέτει ένα παράγοντα ασφάλειας ώστε να φτάσει σε μια επίσημη δόση αναφοράς –την ασφαλή ημερήσια ανθρώπινη πρόσληψη. Ωστόσο, τόσο οι μελέτες της ομάδας vom Saal όσο και άλλων ερευνητών (Sadik and Witt 1999) υπέδειξαν το γεγονός ότι σε αντίθεση με τις τοξικές ενώσεις όπου η τοξικότητα αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης, για τα EDCs οι αντίστοιχες καμπύλες έχουν την μορφή U ή ανεστραμμένου U, όπου η μεγαλύτερη απόκριση παρατηρείται σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις, συνήθως πολλές μονάδες μεγέθους κάτω από τις τρέχουσες δόσεις αναφοράς. Τα παραπάνω έχουν ως συνέπεια την ανάγκη για ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών προσδιορισμού των EDCs σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις μακράν των ορίων που έχουν θεσπιστεί είτε για το πόσιμο νερό είτε για τα τρόφιμα. Οι απόψεις γενικά είναι ακόμη αντικρουόμενες αν και πολλοί οργανισμοί και επιστήμονες έχουν συμφωνήσει πια στο ότι υπάρχει επίδραση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αλλά θα πρέπει να κατευθυνθεί η έρευνα στην αναζήτηση πρωτίστως κατάλληλων «εργαλείων» για την αποτίμηση της

επικινδυνότητας και έπειτα στην απάντηση στο ερώτημα εάν αυτή η επίδραση είναι ανεπιθύμητη και κατά πόσο ισχύουν για τον άνθρωπο τα αντίστοιχα με την άγρι πανίδα αποτελέσματα της έκθεσης σε EDCs (Hood 2005).

Η προφανής έλλειψη φυσιολογικής σχέσης δόσης-απόκρισης για τα EDCs σε συνδυασμό με το γεγονός ότι «η συγκέντρωση της ένωσης στο σημείο δράσης της είναι ανάλογη της δόσης, αλλά η ίδια δόση από δύο ή περισσότερες ενώσεις μπορεί να οδηγήσει σε τεράστια διαφορά συγκεντρώσεων τοξικότητας σε ένα συγκεκριμένο όργανο-στόχο» (Rozman and Klassen 1996) απαιτεί την επιπλέον μελέτη των κυριότερων παραγόντων που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των EDCs στα σημεία δράσης τους. Έτσι, στοιχεία σχετικά με τη βιοσυσσωρευση, την αποθήκευση και τη κινητικότητα των ενώσεων μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στη γνώση της σχέσης μεταξύ της έκθεσης σε έναν ρυπαντή και την συνεπαγόμενη συγκέντρωση ενός ρυπαντή στους ιστούς ενός οργανισμού. Αν και κάποιοι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι ενώσεις υδρόφιλες με μικρούς χρόνους ημιζωής (π.χ. οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα), στην πλειοψηφία τους είναι ενώσεις λιπόφιλες, που αποθηκεύονται στους λιπαρούς ιστούς των έμβιων οργανισμών. Πάντως, όλες οι παραπάνω διεργασίες εξαρτώνται ουσιαστικά από τη *βιοδιαθεσιμότητα* των ενώσεων η οποία αποτελεί συνάρτηση (α) των διαιτολογικών συνηθειών των οργανισμών, (β) της οδού έκθεσης στους ρυπαντές και (γ) του χρόνου παραμονής ενός ρυπαντή στο περιβάλλον.

Στην πραγματικότητα, ο άνθρωπος δεν εκτίθεται σε έναν μόνο ενδοκρινικό διαταράκτη αλλά σε ένα «κοκτέιλ» από τέτοιες ενώσεις και η πιθανότητα να παρουσιάζουν προσθετικές ή ενισχυμένες επιδράσεις (π.χ. μια ένωση με δράση όμοια των οιστρογόνων σε συνδυασμό με μια ένωση με αντι-ανδρογονική δράση) θα πρέπει να ληφθεί υπόψη σοβαρά και να στραφεί η επιστημονική έρευνα προς τη διερεύνηση αυτών των φαινομένων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ - ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΕΣ ΟΥΡΙΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Ο άνθρωπος έχει αναπτύξει την ικανότητα της σύνθεσης και εκτεταμένης χρήσης μιας μεγάλης κατηγορίας χημικών ενώσεων οι οποίες είναι ξένες προς το σώμα και περιβάλλον του ανθρώπου (ξενοβιοτικές). Οι συνθετικές αυτές οργανικές ενώσεις χρησιμοποιούνται κατά ποικίλους τρόπους: ως φάρμακα για τις ασθένειες, παρασιτοκτόνα για διάφορα είδη καλλιεργειών, συστατικά χρωμάτων, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές για τα τρόφιμα και τα ποτά, βαφές για τα ρούχα, πλαστικοποιητές, λιπαντικά, καθαριστικά διαφόρων ειδών, επιβραδυντές φλόγας, ενώσεις προσωπικής φροντίδας και περιποίησης, εκρηκτικά και δηλητηριώδη αέρια για στρατιωτικούς σκοπούς και πολλά άλλα. Το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης στρέφεται στην κατηγορία των φυτοφαρμάκων, τα οποία είναι ύποπτα για ενδοκρινική διαταρακτική δράση.

Τα φυτοφάρμακα (ουσίες ή μίγματα ουσιών που προορίζονται για την πρόληψη, καταστροφή, απομάκρυνση ή απλά μετρίαση κάποιου επιβλαβούς, φυτού ή ζώου ή

οποιοδήποτε «μη επιθυμητού» οργανισμού), τα οποία συνίστανται κυρίως φυτοπροστατευτικά προϊόντα και βιοκτόνα, έχουν σχεδιαστεί για να επιδρούν θεμελιώδεις λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών και είναι επομένως ικανά θανατώνουν ή να καταπολεμούν επιβλαβείς οργανισμούς, όπως οι φυσικοί εχθροί οργανισμοί-στόχοι μπορεί να είναι τα έντομα, τα τρωκτικά, τα ζιζάνια, οι μύκητες καθώς και οι μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια και οι ιοί. Ανάλογα με την δράση τους, τα παρασιτοκτόνα κατατάσσονται σε εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματώδοκτόνα και τρωκτικοκτόνα.

Ταυτόχρονα όμως, τα φυτοφάρμακα μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες δυσμενείς επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους, στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον. Ήδη υπάρχουσα ερευνητική εμπειρία έχει αποδείξει καθαρά ότι λόγω της ιδιαίτερης φύσης πολλών βιοχημικών και βιολογικών διεργασιών αρκετές από αυτές ενώσεις ή από τα προϊόντα διάσπασής τους μπορούν να εισέλθουν σε όλα σχεδόν τα οικοσυστήματα του περιβάλλοντος και τελικά την τροφική αλυσίδα. Οι πιθανοί κίνδυνοι τους οποίους συνεπάγεται η χρήση τους είναι αποδεκτοί μέχρι ενός σημείου από την κοινωνία χάρη στα οικονομικά οφέλη που απορρέουν καθώς, μεταξύ άλλων, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα συμβάλλουν στην εξασφάλιση επαρκών ποσοτήτων υγιεινών γεωργικών προϊόντων υψηλής ποιότητας σε προσιτές τιμές.

2.2 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά των φυτοφαρμάκων

Η εισαγωγή των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον, εκτός από το επιθυμητό αποτέλεσμα της καταπολέμησης των παρασίτων ενέχει και αρνητικές επιπτώσεις. Μερικές από αυτές είναι, η ελάττωση της βιοποικιλότητας, η ρύπανση των επιφανειακών και υπογείων υδάτων καθώς και η αύξηση του κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία που προέρχεται είτε από την απευθείας έκθεση στα φυτοφάρμακα είτε από τα υπολείμματά τους στα τρόφιμα και τα ύδατα. Σύμφωνα με τον ορισμό που έδωσε η GESAMP (*Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution*) ως ρύπανση ορίζεται «η άμεση ή έμμεση εισαγωγή, από τον άνθρωπο

ουσιών και ενέργειας που έχουν ή θα μπορούσαν να έχουν επιβλαβή δράση στο φυσικό περιβάλλον».

Τα φυτοφάρμακα από τη στιγμή της εφαρμογής τους στα φυτά ή στο έδαφος υπόκεινται σε μια σειρά διεργασιών μεταφοράς, συγκράτησης και μετατροπής με αποτέλεσμα να κατανέμονται στο περιβάλλον και τα υπολείμματά τους να ανιχνεύονται σε φυτά, σε εδάφη, σε υδάτινα οικοσυστήματα και κατά συνέπεια στα ανώτερα είδη της τροφικής αλυσίδας όπως τα πουλιά, τα ψάρια, τα ζώα και τέλος τον άνθρωπο. Στα υπολείμματα δε που ανιχνεύονται περιλαμβάνονται και οι ουσίες που είναι προϊόντα διάσπασης, μεταβολισμού ή χημικής αντίδρασης εφόσον είναι τοξικολογικά σημαντικές (FAO 1981). Ως «κατάλοιπα ή υπολείμματα φυτοφαρμάκων» ορίζονται τα κατάλοιπα, συμπεριλαμβανομένων των δραστικών ουσιών, των μεταβολιτών ή/και των προϊόντων αποδόμησης ή αντίδρασης δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται ή έχουν χρησιμοποιηθεί σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, όπως ορίζονται στο άρθρο 2 σημείο 1 της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ, τα οποία υπάρχουν εντός ή επί των προϊόντων που περιλαμβάνονται στο παράρτημα Ι του κανονισμού 396/2005 της ΕΕ, συμπεριλαμβανομένων ιδίως εκείνων τα οποία ενδέχεται να προκύψουν από τη χρήση τους για φυτοπροστασία, στην κτηνιατρική και ως βιοκτόνων (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και Συμβούλιο Ευρωπαϊκής Ένωσης 2005).

Οι ουσίες αυτές εισχωρούν στο υδάτινο οικοσύστημα είτε άμεσα, μέσω των εφαρμογών τους για τον έλεγχο των υδρόβιων παρασίτων, είτε έμμεσα, μέσω της έκπλυσης και επιφανειακής απορροής από τους αγρούς ή ακόμα λόγω ατυχημάτων σε σημειακές πηγές, όπως εργοστάσια παραγωγής και αποθήκες που βρίσκονται κοντά σε επιφανειακούς αποδέκτες (Σχήμα 2.1).

Οι ποταμοί αποτελούν ένα σύνθετο και ιδιαίτερου ενδιαφέροντος οικολογικό σύστημα του φυσικού περιβάλλοντος και συνδέονται απευθείας δια των εκβολών με τις ακτές και την ανοιχτή θάλασσα. Έτσι, οι ρυπαντές μεταφέρονται είτε μέσω της υγρής φάσης, είτε μέσω της αέριας (οι πτητικοί ρυπαντές σε επαφή με την ατμόσφαιρα) στο περιβάλλον. Τα ποτάμια συστήματα επικοινωνούν επιπλέον με τα υπόγεια ύδατα είτε γιατί τα τελευταία καταλήγουν στο ποτάμι όταν το πιεζομετρικό επίπεδο είναι

βενθικούς οργανισμούς ή στα υπερκείμενα ύδατα. Εν τέλει, μπορεί να εισαχθούν στην τροφική αλυσίδα περνώντας στα ψάρια, την άγρια πανίδα και τον άνθρωπο.

2.2.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την τύχη των φυτοφαρμάκων

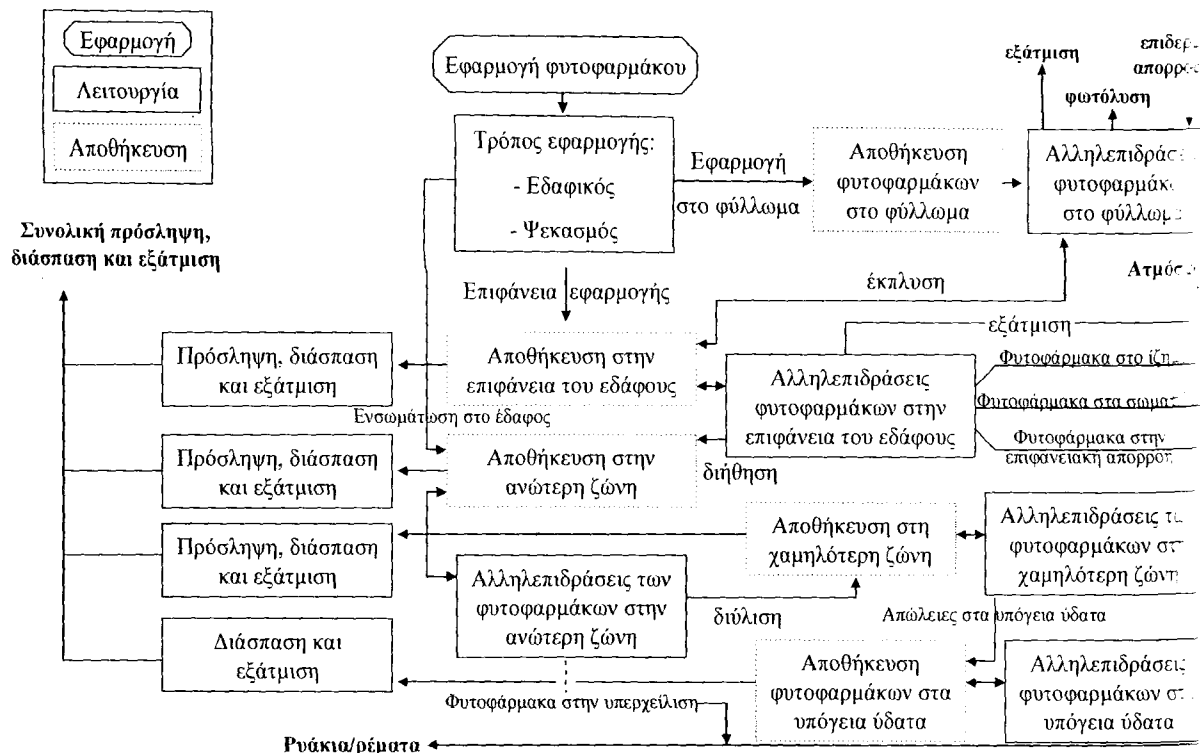
Τα φυτοφάρμακα από την στιγμή της διείσδυσής τους στο περιβάλλον υπόκεινται σε ποικίλες φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες μετατροπής και μεταφοράς. Η τύχη και η παραμονή των χημικών ενώσεων στο φυσικό περιβάλλον εξαρτάται από τέσσερις κύριους παράγοντες: τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φυτοφαρμάκων, τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του μέσου στο οποίο βρίσκεται το φυτοφάρμακο, τις συνθήκες της περιοχής και τους τρόπους διαχείρισης αυτών.

Οι κυριότερες ιδιότητες των φυτοφαρμάκων που επηρεάζουν την τύχη των υπολειμμάτων τους είναι η διαλυτότητα και η πτητικότητα τους. Γενικά, οι πολικές ενώσεις, βρίσκονται κυρίως στη διαλυτή φάση και προσδένονται σε πολικές θέσεις της αιωρούμενης φάσης, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με τις μη πολικές.

Οι ιδιότητες του εδάφους και των ιζημάτων όπου αποτίθενται τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων όπως η υφή, η δομή και η διαπερατότητά τους παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των προσροφημένων μορίων των ενώσεων στα σωματίδια της αργίλου και της οργανικής ύλης. Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση στην τύχη των φυτοφαρμάκων της οργανικής ύλης του εδάφους καθώς και της υγρασίας που αυτή περικλείει.

Επιπλέον, οι κλιματολογικές και μορφολογικές συνθήκες της περιοχής όπου εφαρμόζονται τα φυτοφάρμακα επιδρούν στην κατανομή τους στο περιβάλλον. Σημαντικές παράμετροι είναι επίσης οι βροχοπτώσεις, το βάθος στο οποίο βρίσκεται ο υδροφόρος ορίζοντας, η στατικότητα ή όχι του νερού, η μορφή και η ταχύτητα ροής, το pH, η αλατότητα και η περιεχόμενη βιομάζα του υδατικού συστήματος της περιοχής.

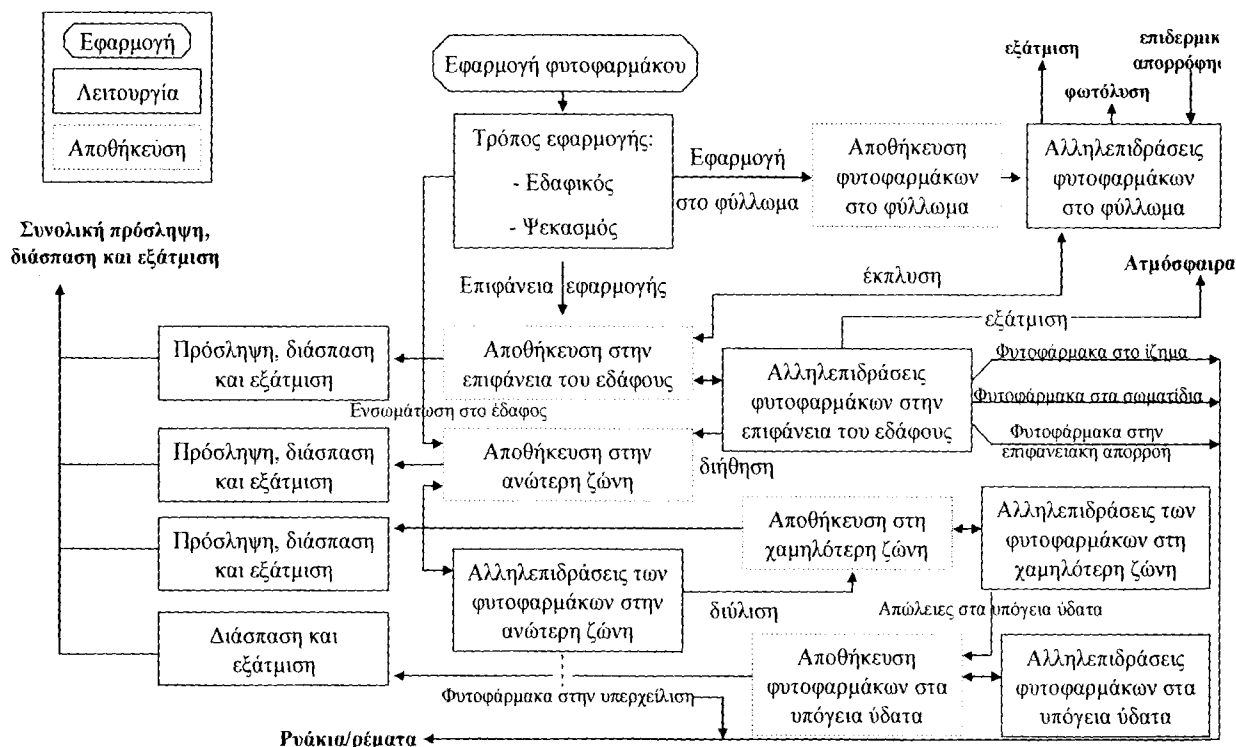
Τέλος, μεγάλη σημασία έχει ο τρόπος εφαρμογής του φυτοφαρμάκου, όπως η μορφή του (σε κοκκώδες ή υδατικό διάλυμα), η συχνότητα αυτής καθώς και η ποσότητες χρήσης.



Σχήμα 2.2. Μεταφορά και μετατροπή των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον του συστήματος έδαφος-φυτό και τον υδροφόρο ορίζοντα (Cheng 1990)

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες, πέρα από το υδάτινο οικοσύστημα συμβάλλουν ομοίως στη μεταφορά και στο μεταβολισμό των φυτοφαρμάκων μέσα στα φυτά μετά την εφαρμογή τους (Σχήμα 2.2). Στην επιφάνεια των φυτών, οι χημικές αυτές ουσίες υπόκεινται στις κοινές διεργασίες απομάκρυνσης όπως η εξάτμιση, έκπλυση και φωτοδιάσπαση. Τα διασυστηματικά φυτοφάρμακα διεισδύουν στους φυτικούς ιστούς, όπου και υποβάλλονται σε μια σειρά μοριακών μετατροπών, μέσω ενός σύνθετου κινητικού συστήματος παράλληλων και διαδοχικών βιοχημικών και χημικών αντιδράσεων που αποτελεί τον μεταβολισμό τους από το φυτό. Οι οδοί του

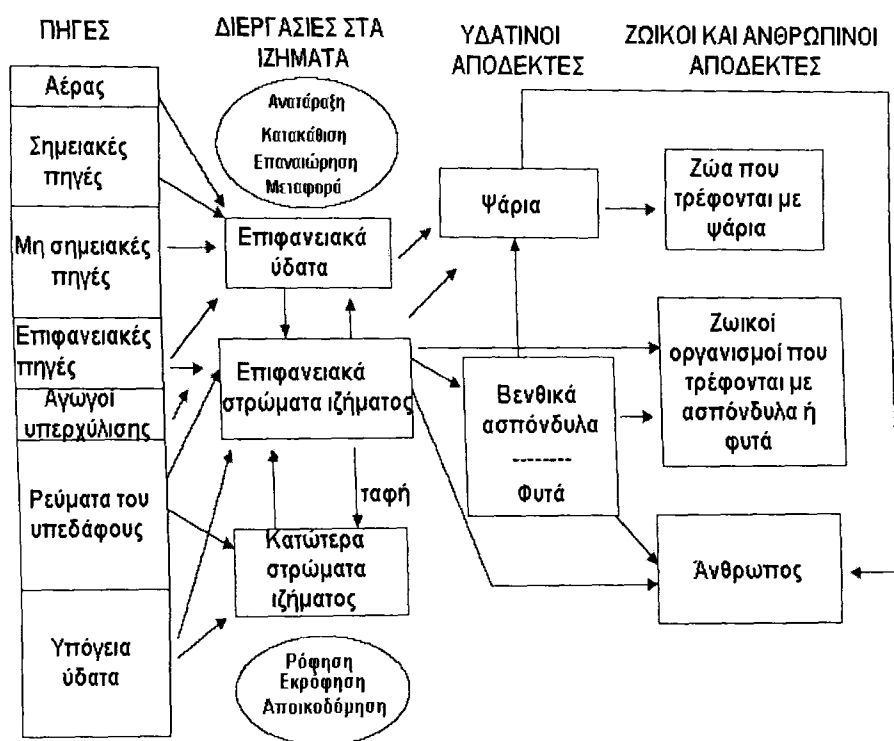
Τέλος, μεγάλη σημασία έχει ο τρόπος εφαρμογής του φυτοφαρμάκου, όπως μορφή του (σε κοκκώδες ή υδατικό διάλυμα), η συχνότητα αυτής καθώς και ο ποσότητες χρήσης.



Σχήμα 2.2. Μεταφορά και μετατροπή των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον του συστήματος έδαφος-φυτό και τον υδροφόρο ορίζοντα (Cheng 1990)

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες, πέρα από το υδάτινο οικοσύστημα, συμβάλλουν ομοίως στη μεταφορά και στο μεταβολισμό των φυτοφαρμάκων μέσα στα φυτά μετά την εφαρμογή τους (Σχήμα 2.2). Στην επιφάνεια των φυτών, οι χημικές αυτές ουσίες υπόκεινται στις κοινές διεργασίες απομάκρυνσης όπως η εξάτμιση, έκπλυση και φωτοδιάσπαση. Τα διασυστηματικά φυτοφάρμακα διεισδύουν στους φυτικούς ιστούς, όπου και υποβάλλονται σε μια σειρά μοριακών μετατροπών, μέσω ενός σύνθετου κινητικού συστήματος παράλληλων και διαδοχικών βιοχημικών και χημικών αντιδράσεων που αποτελεί τον μεταβολισμό τους από το φυτό. Οι οδοί του

υψηλότερο από αυτό των νερών του ποταμού είτε διότι ισχύει το αντίστροφο. Στην δεύτερη περίπτωση, οι χημικοί ρύποι που υπάρχουν στο ποτάμι μπορούν να μεταφερθούν στον υδροφόρο ορίζοντα με συνέπεια την ρύπανση αυτού. Κατ' επέκταση, το πόσιμο νερό που προκύπτει από υπόγεια ύδατα μπορεί να θέσει κινδύνους για την υγεία (Petit, Cabridenc et al. 1995).



Σχήμα 2.1. Μοντέλο εκτίμησης της πιθανότητας ρύπανσης του υδάτινου οικοσυστήματος (Menzie 2003)

Σημαντικό ρόλο στη μεταφορά και τύχη των οργανικών ρυπαντών διαδραματίζουν και τα ιζήματα, τα οποία αποτελούν τις κύριες λεκάνες απορροής και συχνά σωρεύουν το μεγαλύτερο μέρος αυτών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Όταν οι οργανικοί ρυπαντές καταλήξουν εκεί μπορεί να προσδεθούν και να μη είναι διαθέσιμοι για το υπερκείμενο οικοσύστημα, να μετασχηματιστούν σε περισσότερο ή λιγότερο τοξικές μορφές τους ή τελικά να μεταναστεύσουν από τα ιζήματα στους

αντιδράσεις, οξείδωση, αναγωγή, υδρόλυση και φωτοδιάσπαση. Οι βιολογικοί μηχανισμοί στα εδάφη ή τα ιζήματα και στους ζωντανούς οργανισμούς διέπονται συνήθως από αντιδράσεις όπως η οξείδωση, η αναγωγή, η υδρόλυση και η σύζευξη. Οι σημαντικότερες από τις διεργασίες μεταφοράς και μετατροπής των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον περιλαμβάνουν:

I. Εξάτμιση

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

II. Έκπλυση

Η διεργασία της έκπλυσης αναφέρεται κυρίως στην μεταφορά των οργανικών ρυπαντών προς τα βαθύτερα στρώματα του εδάφους υπό την επίδραση του νερού. Ο βαθμός έκπλυσης εξαρτάται κυρίως από τη διαλυτότητα της ένωσης στο νερό και το συντελεστή κατανομής της ουσίας στην οργανική ύλη του εδάφους, K_{oc} . Σύμφωνα με την EPA η εφαρμογή σε αμμώδη εδάφη φυτοφαρμάκων με διαλυτότητα μεγαλύτερη των 30 ppm και K_{oc} μικρότερο της τιμής 100 μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τον υδροφόρο ορίζοντα.

III. Φωτοδιάσπαση

Το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας που απαιτείται για την πρόκληση περιβαλλοντικών μετατροπών των φυτοφαρμάκων προέρχεται απευθείας από την ηλιακή ακτινοβολία. Τα φυτοφάρμακα, τα οποία είναι διαλυμένα ή αιωρούμενα στην υδατική ή αέρια φάση, μπορούν να απορροφήσουν ακτινοβολία και να διασπαστούν αυθόρμητα ή αντιδρώντας με παραγόμενες από την ακτινοβολία ενώσεις. Η φωτόλυση μπορεί να είναι άμεση όπου γίνεται απευθείας απορρόφηση της ενέργειας της φωτεινής ακτινοβολίας από την διασπώμενη ένωση ή έμμεση, όπου η ακτινοβολία απορροφάται από μόρια άλλων ουσιών στον αέρα ή το νερό, τα οποία στην συνέχεια

αντιδρούν με τα μόρια των φυτοφαρμάκων, είτε παράγουν δραστικές ελεύθερες ρίζες (π.χ. οξυγόνου και υπεροξειδίου) που με τη σειρά τους συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οδηγώντας στη διάσπαση του ρυπαντή.

Η φωτοδιάσπαση των φυτοφαρμάκων στο υδάτινο περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως την ένταση του φωτός και το μήκος κύματος, τη θολερότητα του νερού, το pH και την περιεχόμενη οργανική ύλη. Η τελευταία αποτελεί ίσως τον σημαντικότερο παράγοντα που μπορεί να επιταχύνει ή να επιβραδύνει τη φωτοδιάσπαση ανάλογα με την προέλευση του νερού (Zepp and Cline 1977; Frimmel and Hessler 1994).

IV. Υδρόλυση

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

V. Προσρόφηση

Η προσρόφηση είναι μια φυσικοχημική διεργασία κατά την οποία τα μόρια ή ιόντα μιας χημικής ουσίας έλκονται και συγκρατούνται από την επιφάνεια ενός στερεού σώματος. Χαρακτηρίζεται ως χημική προσρόφηση όταν οι δεσμοί προσροφηθέντος-προσροφητικού είναι ισχυροί (ομοιοπολικοί δεσμοί, δεσμοί ηλεκτροστατικής φύσεως) και είναι μη αντιστρεπτή διεργασία. Στην περίπτωση που αναπτύσσονται ασθενείς δεσμοί (δεσμοί υδρογόνου, *Van der Waals*) χαρακτηρίζεται ως φυσική και είναι αντιστρεπτή διαδικασία.

Η ένταση με την οποία λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της προσρόφησης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, οι σημαντικότεροι εκ των οποίων είναι η

θερμοκρασία του συστήματος, το pH, η επιφάνεια και η κατανομή μεγέθους σωματιδίων του στερεού, η αλατότητα, το είδος του εδάφους (περιεχόμενο σε άργιλο ή σε οργανική ύλη), η ικανότητα ιοντοανταλλαγής καθώς και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των φυτοφαρμάκων όπως η διαλυτότητα, ο όξινος ή βασικός χαρακτήρας τους, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης - νερού, η πτητικότητα και το μέγεθος και σχήμα των μορίων τους. Μια ποσοτική έκφραση της προσρόφησης ενός φυτοφαρμάκου στο έδαφος είναι ο συντελεστής κατανομής της ουσίας στην οργανική ύλη του εδάφους (*Organic Carbon Partition Coefficient, K_{oc}*) και αποτελεί δείκτη της κινητικότητάς του στο έδαφος. Χαμηλές τιμές K_{oc} υποδηλώνουν μεγαλύτερη πιθανότητα έκπλυσης των φυτοφαρμάκων και κατά συνέπεια μεγάλη πιθανότητα ρύπανσης των υπογείων υδάτων

VI. Βιολογική μετατροπή

Τα φυτοφάρμακα όταν βρεθούν στο περιβάλλον προσλαμβάνονται από τους οργανισμούς. Η χλωρίδα και η πανίδα εμπλέκεται με τα φυτοφάρμακα με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους (Petit, Cabridenc et al. 1995):

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

Γενικά τα προϊόντα διάσπασης ή μετατροπής των φυτοφαρμάκων εμφανίζουν μικρότερη τοξικότητα από τις ενώσεις προέλευσής τους (Day and Maguire 1990). Σε κάποιες περιπτώσεις όμως μπορεί να είναι πιο τοξικά (Osano, Admiraal et al. 2002) και κατά συνέπεια αυτές οι ενώσεις εμφανίζουν μεγαλύτερη επικινδυνότητα για το περιβάλλον από τις αρχικές ενώσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αιθυλενοθειουρία (ETU) που είναι προϊόν διάσπασης του μυκητοκτόνου maneb και άλλων ενώσεων της κατηγορίας των διθειοκαρβαμιδικών και είναι μεγαλύτερης τοξικότητας από την αρχική ένωση (Fielding, Barcelo et al. 1992). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα προϊόντα μετατροπής ενός φυτοφαρμάκου, το οποίο είναι μικρής σημασίας για την ρύπανση των υδάτων λόγω της μικρής κινητικότητας και υπολειμματικότητάς του, μπορεί να εμφανίζουν μεγαλύτερη υπολειμματικότητα και κινητικότητα και έτσι ακόμη και αν αυτά είναι λιγότερο τοξικά από την αρχική ένωση να δύνανται να επιδρούν αρνητικά στο περιβάλλον (Kolpin, Thurman et al. 2001).

Στην Ευρώπη, σύμφωνα με την Οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης 91/414/EEC και τις ακόλουθες τροποποιήσεις (EU 1994), θα πρέπει να παρέχονται δεδομένα για όλους τους μεταβολίτες, και τα προϊόντα διάσπασης ή μετατροπής, τα οποία αποτελούν πάνω από το 10% της ποσότητας της προστιθέμενης δραστικής ουσίας. Ήδη, έχουν συνταχθεί Οδηγίες πάνω στην εκτίμηση της περιβαλλοντικής σημασίας των προϊόντων μετατροπής (EU 2002; EU 2002; EU 2003).

Οι πιθανές αιτίες για ένα προϊόν μετατροπής να είναι το ίδιο ή πιο τοξικό από την αρχική ένωση είναι (Sinclair and Boxall 2003): (α) η δραστική ομάδα της αρχικής ένωσης να είναι ακόμη παρούσα στο προϊόν μετατροπής με αποτέλεσμα να επιδεικνύει τον ίδιο μηχανισμό τοξικότητας με την αρχική ένωση, (β) το προϊόν μετατροπής να είναι το δραστικό στοιχείο ενός προ-φυτοφαρμάκου, όπου η εφαρμοζόμενη ουσία έχει σχεδιαστεί να απορροφάται από έναν οργανισμό και στη συνέχεια να μεταβολίζεται σε μια δραστική ένωση που επιφέρει την επιθυμητή επίδραση, (γ) ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης του προϊόντος μετατροπής είναι μεγαλύτερος από αυτόν της αρχικής ουσίας και επομένως θα προσεγγίσει περισσότερο

το σημείο δράσης και (δ) το μονοπάτι μετατροπής καταλήγει σε ένα προϊόν με διαφορετικό και πιο ικανό τρόπο δράσης από την αρχική ένωση.

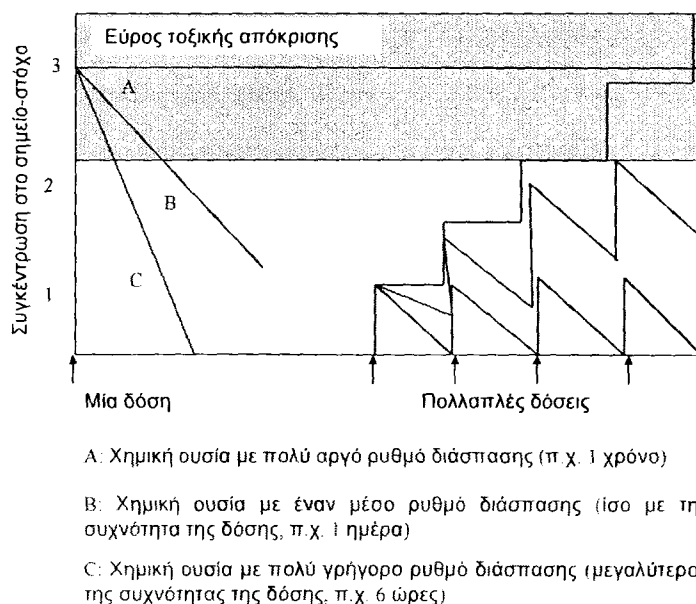
Η σημασία προσδιορισμού των μεταβολιτών των φυτοφαρμάκων επισημαίνεται από τα αποτελέσματα πολλών μελετών όπως για παράδειγμα σχετικά με το ζιζανιοκτόνο *propanil*, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή ρυζιού. Έχει βρεθεί ότι δημιουργεί μεταιμογλοβιναιμία στα ζώα και τους εκτεθειμένους σε αυτό λόγω επαγγέλματος ανθρώπους μέσω της δράσης του βασικού μεταβολίτη του, 3,4-διχλωροανιλίνη (3,4-DCA) (Wittke, Hajimiragha et al. 2001). Παρόλα αυτά, οι μεταβολίτες και τα προϊόντα διάσπασης των φυτοφαρμάκων δεν παύουν να προσδιορίζονται δύσκολα εξαιτίας της έλλειψης διαθεσιμότητας υλικών αναφοράς για τα περισσότερα από αυτά (Erickson 2002).

2.4 Αρχές τοξικολογίας και εκτίμηση επικινδυνότητας των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων

Με τον όρο *τοξικότητα* προσδιορίζεται η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να προκαλεί εσωτερικές ή εξωτερικές βλάβες στους οργανισμούς (Επιβατιανός 1988). Για να υπάρχει τοξική δράση θα πρέπει οι χημικές ουσίες να εισχωρήσουν σε ένα σημείο-στόχο σε κατάλληλα υψηλή συγκέντρωση και για κατάλληλα αρκετό χρονικό διάστημα. Αυτό εξαρτάται από:

(1) *τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ουσίας.*

(2) *τη διάρκεια και την κατάλληλη χρονική στιγμή της έκθεσης:* Ανάλογα με τη διάρκεια έκθεσης η τοξικότητα μιας ένωσης χαρακτηρίζεται ως οξεία όταν η επίδραση γίνεται αισθητή σε χρονικό διάστημα μικρότερο ή ίσο με 24 ώρες, υποξεία για χρονικό διάστημα μικρότερο ή ίσο με έναν μήνα, υποχρόνια για 1 με 3 μήνες και χρόνια για περισσότερο από 3 μήνες. Η συχνότητα της έκθεσης διαδραματίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα μιας ένωσης (Σχήμα 2.4). Σχετικά με τη χρονική στιγμή της έκθεσης, συνήθως οι οργανισμοί σε εμβρυική κατάσταση και στα πρώτα στάδια της ζωής τους εμφανίζονται να είναι πιο ευαίσθητοι στη επίδραση των τοξικών ρυπαντών.



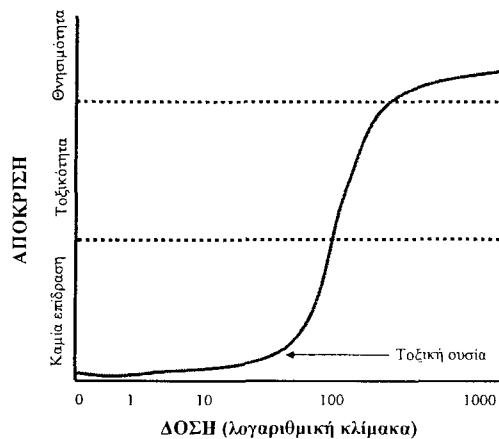
Σχήμα 2.4. Η σχέση της συχνότητας της έκθεσης και της τοξικότητας μιας χημικής ένωσης (Klaassen 1996)

(3) τη συγκέντρωση στην οποία εκτίθεται ο οργανισμός-στόχος: η συγκέντρωση ενός οργανικού ρυπαντή μπορεί από μόνη της να οδηγεί στην τοξικότητα αλλά μπορεί επιπλέον να δρα μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες υπάρχουσες τοξικές ουσίες είτε προσθετικά ($2+3=5$), είτε συνεργιστικά ($2+3=7$), είτε ανταγωνιστικά ($2+3=1$). Επιπλέον, μια μη-τοξική ένωση μπορεί να αποκτήσει τοξική δράση όταν βρεθεί μαζί με μια άλλη ένωση ($0+3=10$). Η συγκέντρωση μιας ένωσης έχει άμεση σχέση με τη δόση, δηλαδή την ποσότητα της χημικής ένωσης που τελικά παρέχεται σε έναν οργανισμό. Όταν αυτή εκφράζεται ανά μονάδα σωματικού βάρους θα πρέπει να αναφέρεται ως *δοσολογία* (*mg χημικής ένωσης /Kg σωματικού βάρους*).

(4) την ευπάθεια του βιολογικού συστήματος.

Οι κυριότεροι οδοί έκθεσης είναι η κατάποση, η εισπνοή και η δερματική επαφή. Η τοξικότητα των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων εκτιμάται μέσα από μια σειρά *in vivo* και *in vitro* δοκιμών σε πειραματόζωα. Η απόκριση σε μια δόση που ορίζει την τοξικότητα μπορεί να είναι οποιαδήποτε αλλαγή παρατηρείται από τη

φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού. Αυτή μπορεί να είναι τοπική ή συστηματική, αντιστρεπτή ή όχι, άμεση ή βραδεία, βαθμωτή ή κβαντισμένη. Στο Σχήμα 2.5 απεικονίζεται μια χαρακτηριστική καμπύλη δόσης-απόκρισης όπου φαίνεται ότι όσο αυξάνει η δόση αυξάνει και η τοξική επίδραση του ρυπαντή.



Σχήμα 2.5. Μορφή της καμπύλης δόσης-απόκρισης (Klaassen 1996)

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

Σχετικά με την οξεία επίδραση μιας τοξικής ένωσης χρησιμοποιείται ως απόκριση η θνησιμότητα και οι συντελεστές που την περιγράφουν είναι οι θανατηφόρος συγκέντρωση (LC_{50} , *Lethal Concentration*) και θανατηφόρος δόση (LD_{50} , *Lethal Dose*) που προσδιορίζουν τη συγκέντρωση της ουσίας ή τη δόση (σε mg/Kg ζάρους πειραματόζωου) αντίστοιχα που απαιτείται για τη θανάτωση του 50% ενός

πληθυσμού πειραματόζωων που έλαβαν εφάπαξ την εν λόγω δόση ή εκτέθηκαν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση. Το 1978 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (*World Health Organization, WHO*) προέβη στην ανάπτυξη κριτηρίων για την ταξινόμηση των φυτοφαρμάκων και των διάφορων μορφών των σκευασμάτων τους σύμφωνα με την οξεία τοξικότητά τους με σκοπό τη σήμανση και κατά συνέπεια την προστασία του καταναλωτή. Σύμφωνα με αυτή την κατηγοριοποίηση τα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε λιγότερο ή περισσότερο τοξικά με γνώμονα την οξεία δια στόματος και δερματικής επαφής τοξικότητά τους στους αρουραίους αφού οι εν λόγω προσδιορισμοί θεωρούνται οι βασικές δοκιμές τοξικότητας.

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

(1) *Αποδεκτή Ημερήσια Δόση (ADI, Acceptable Daily Intake)*: Ορίζεται ως η ημερήσια δόση δραστικής ουσίας, η οποία χορηγούμενη καθημερινά για όλη τη διάρκεια της ζωής του ενήλικα, με βάση τα γνωστά στοιχεία δεν ενέχει κίνδυνο για την υγεία του.

(2) *Οξεία Δόση Αναφοράς (ARfD, Acute Reference Dose)*: Ορίζεται ως η ημερήσια δόση δραστικής ουσίας, η οποία χορηγούμενη σε ένα γεύμα ή μια ημέρα, με βάση τα γνωστά στοιχεία δεν ενέχει κίνδυνο για την υγεία του.

(3) *Αποδεκτό Επίπεδο Έκθεσης Χειριστή (AOEL, Acceptable Operator Exposure Level)*: Ορίζεται ως το ημερήσιο επίπεδο έκθεσης των χειριστών- ανθρώπων που εργάζονται με φυτοφάρμακα τακτικά (για περίοδο ημερών, εβδομάδων ή μηνών).

Ωστόσο, γεγονός είναι ότι ο άνθρωπος δεν εκτίθεται μόνο σε μια ένωση αλλά σε σύνθετα μίγματα χημικών ενώσεων για τα οποία δεν υπάρχουν ακόμη επαρκείς μελέτες εκτίμησης της επικινδυνότητας. Είναι λοιπόν πολύ δύσκολο έως απίθανο να γίνει εκτίμηση της συνολικής αποτελεσματικής επίδρασης στην υγεία του ανθρώπου όλων των ουσιών που σήμερα χρησιμοποιούνται αφού η απαιτούμενη μεθοδολογία δεν είναι ακόμη διαθέσιμη (EU 2006).

2.5 Ισχύουσα νομοθεσία για τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων

Το 1979 εισήχθησαν για πρώτη φορά σε Ευρωπαϊκό επίπεδο οι έννοιες της πολιτικής και νομοθεσίας για τη χρήση των φυτοφαρμάκων δίνοντας έμφαση στο έλεγχο της διακίνησης στην αγορά των πιο επιβλαβών φυτοφαρμάκων και στην παρακολούθηση των επιπέδων των υπολλειμάτων τους. Η νομοθεσία που διέπει τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα καθορίζεται τόσο από αρμόδια κρατικά νομοθετικά όργανα όσο και από υπερεθνικά όργανα καθώς και από διμερείς ή πολυμερείς συμφωνίες που παράγονται μεταξύ διαφόρων κρατών. Στην περίπτωση της Ελλάδας τέτοια όργανα παραγωγής υπερεθνικού δικαίου είναι εκτός από τους διάφορους Διεθνείς Οργανισμούς και η Ευρωπαϊκή Ένωση. Το 60-70% της εθνικής νομοθεσίας για το περιβάλλον έχει προέλθει από την εναρμόνιση του Ελληνικού Δικαίου με το Κοινοτικό.

Το 1991 η Ευρωπαϊκή Ένωση εξέδωσε οδηγία (Κοινοτική Οδηγία 91/414/EEC) σύμφωνα με την οποία θα πρέπει να πραγματοποιείται εκτίμηση της επικινδυνότητας κάθε δραστικής ουσίας και των προϊόντων που την περιέχουν, πριν τη νομιμοποίηση της χρήσης της, ενώ με άλλη οδηγία του 1992 σχετικά με τα επικίνδυνα απόβλητα, ορίζει διατάξεις για τη συλλογή μη-χρησιμοποιούμενων, ληγμένων ή απαγορευμένων φυτοφαρμάκων.

Από τα μέσα του '80 και κυρίως με την οδηγία 91/414/ΕΟΚ προβλέπεται ότι τα κράτη μέλη, κατά την έκδοση των εγκρίσεων, οφείλουν να ορίζουν ότι τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα πρέπει να χρησιμοποιούνται ορθά. Η ορθή χρήση περιλαμβάνει την εφαρμογή των αρχών της Ορθής Γεωργικής Πρακτικής, ΟΓΠ, (*GAP, Good Agricultural Practice*) η οποία ορίζεται ως η σε εθνικό επίπεδο συνιστώμενη, εγκεκριμένη ή καταχωρισμένη ασφαλής χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων υπό πραγματικές συνθήκες σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγής, της αποθήκευσης, της μεταφοράς, της διανομής και της μεταποίησης τροφίμων και ζωοτροφών. Συνεπάγεται επίσης την εφαρμογή, σύμφωνα με τις διατάξεις της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ των αρχών του ολοκληρωμένου ελέγχου παρασίτων σε συγκεκριμένη κλιματική ζώνη, καθώς και τη χρήση της ελάχιστης ποσότητας φυτοφαρμάκων και τον καθορισμό των ελάχιστων επιπέδων Ανωτάτων Ορίων Καταλοίπων, ΑΟΚ, (*MRL, Maximum Residue Limit*) που μπορούν να επιτύχουν το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα.

Η σοβαρότητα του θέματος της ρύπανσης των υδάτων από τα παρασιτοκτόνα οδήγησε την Ευρωπαϊκή Ένωση με την οδηγία 80/778 και την ελληνική νομοθεσία με το ΦΕΚ 53/20-2-86 να καθορίσουν ένα πλαίσιο για την εκτίμηση, παρακολούθηση και διαχείριση της οικολογικής και χημικής κατάστασης όλων των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων. Η παρούσα οριακή τιμή για τις δραστικές ουσίες ($0.1 \mu\text{g/L}$) θεωρείται η μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση περιεχόμενη σε υπόγεια ύδατα, ενώ η ανώτατη συγκέντρωση για το σύνολο των φυτοφαρμάκων που μπορεί να ανευρίσκονται είναι $0.5 \mu\text{g/l}$. Αναφορικά με τα επιφανειακά ύδατα, η ανίχνευση οργανικών ουσιών απαιτείται όταν αυτά βρίσκονται σε επίπεδα της τάξης των $1\text{-}3\mu\text{g/l}$ (Zanella, Primel et al. 2003).

Τέλος, ο Κανονισμός αριθμ. 396/2005 (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και Συμβούλιο Ευρωπαϊκής Ένωσης 2005) επιβάλλει Ανώτατα Όρια Καταλοίπων των δραστικών ουσιών σε τρόφιμα και ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης, με σκοπό την μείωση της έκθεσης των καταναλωτών που βρίσκονται ψηλά στην τροφική αλυσίδα. Ως «Ανώτατο Όριο Καταλοίπων» ορίζεται το ανώτατο νόμιμο όριο συγκέντρωσης καταλοίπου φυτοφαρμάκου εντός ή επί τροφίμων ή ζωοτροφών, το

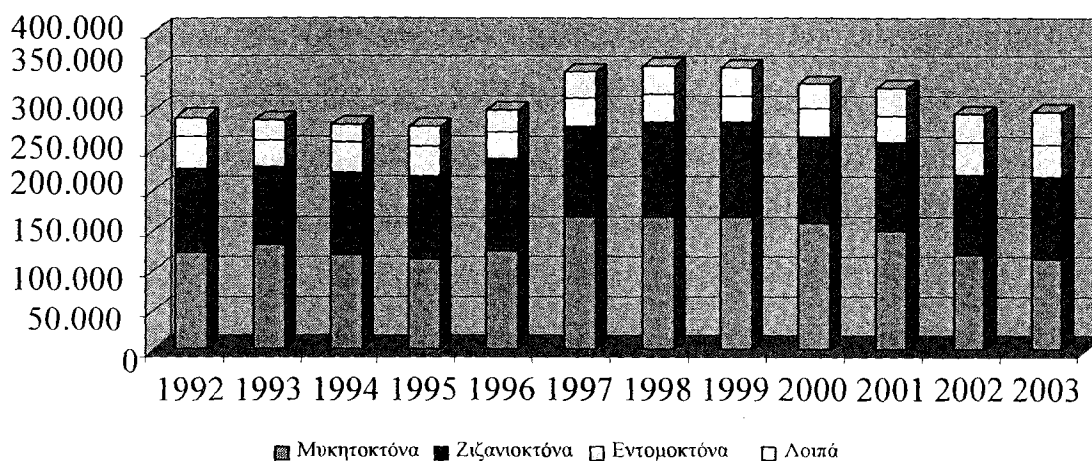
οποίο ορίζεται σύμφωνα με τον παρόντα κανονισμό και βασίζεται στην ΟΓΠ και τη χαμηλότερη απαιτούμενη έκθεση του καταναλωτή για την προστασία των ευάλωτων καταναλωτών. Ο καθορισμός των ΑΟΚ σε κοινοτικό επίπεδο θεωρήθηκε σκόπιμος για λόγους ελεύθερης κυκλοφορίας των εμπορευμάτων, ίσων όρων ανταγωνισμού μεταξύ των κρατών μελών, καθώς και για επίτευξη υψηλού επιπέδου προστασίας των καταναλωτών. Σύμφωνα με την οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 15ης Ιουλίου 1991, τα ΑΟΚ θα πρέπει να οριστούν στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο που είναι σύμφωνο με την ορθή αγροτική πρακτική, για κάθε φυτοφάρμακο, με στόχο την προστασία των ευάλωτων ομάδων όπως τα παιδιά και τα έμβρυα.

Τα ΑΟΚ προκύπτουν ύστερα από στατιστική επεξεργασία των δεδομένων για υπολείμματα φυτοφαρμάκων και προσεγγίζουν την υψηλότερη συγκέντρωση που ανιχνεύθηκε κατά τις δοκιμές ελεγχόμενης εφαρμογής του φυτοφαρμάκου στην καλλιέργεια του προϊόντος σύμφωνα με τις προτεινόμενες οδηγίες χρήσης και μετά το ενδεικνυόμενο χρονικό διάστημα μεσολάβησης από τη συγκομιδή (Commission of the European Communities 1997). Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα ΑΟΚ δεν βασίζονται σε τοξικολογικές μελέτες και δεν αποτελούν όρια ασφαλείας οπότε η έκθεση σε συγκεντρώσεις που τα υπερβαίνουν δεν επιφέρει υποχρεωτικά κίνδυνο για την υγεία (Hughes and Woods 2002).

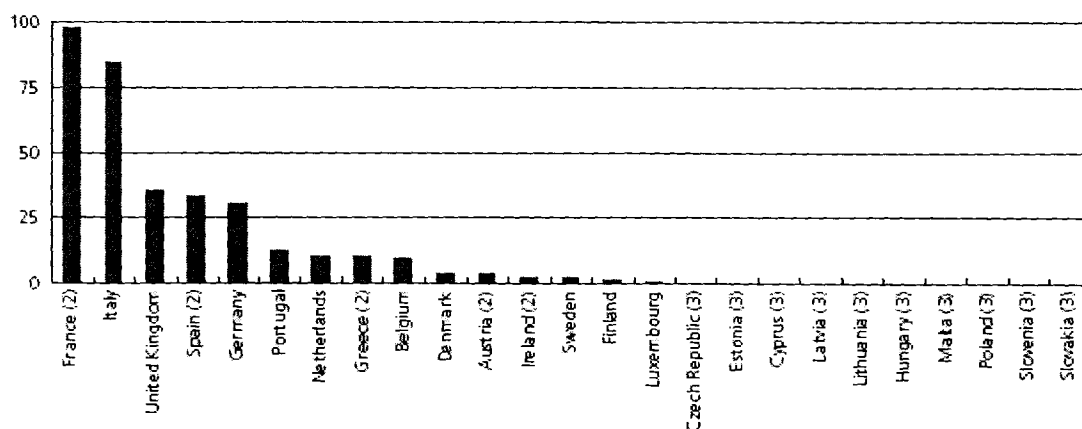
2.6 Κατηγορίες και χρήση των φυτοφαρμάκων

Μέχρι το πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα τα εν χρήσει παρασιτοκτόνα ήταν κυρίως ανόργανες ουσίες φυσικής προέλευσης. Χάρη στα άμεσα οφέλη που προκύπτουν από τη χρήση τους, τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα και θεωρούνται εν γένει απαραίτητα για τα σύγχρονα καλλιεργητικά συστήματα. Παρά τις υφιστάμενες πολιτικές και την ισχύουσα νομοθεσία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου και του περιβάλλοντος, η πραγματική κατανάλωση και χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην Ευρωπαϊκή Ένωση δεν μειώθηκε το διάστημα 1992-2003, όπως καταδεικνύουν τα διαθέσιμα στατιστικά στοιχεία (Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων 2006) (Σχήμα 2.6). Οι συνολικές πωλήσεις φυτοφαρμάκων

διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των χωρών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης και σε έναν βαθμό αντικατοπτρίζουν τη σημασία του τομέα της γεωργίας, τον τρόπο και τα είδη της καλλιέργειας κάθε χώρας.



Σχήμα 2.6. Πωλήσεις δραστικών ουσιών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (σε τόνους) στην ΕΕ-15



Σχήμα 2.7. Οι πωλήσεις των φυτοφαρμάκων στις χώρες μέλη της ΕΕ το 2002 συγκριτικά (Eurostat 2006)

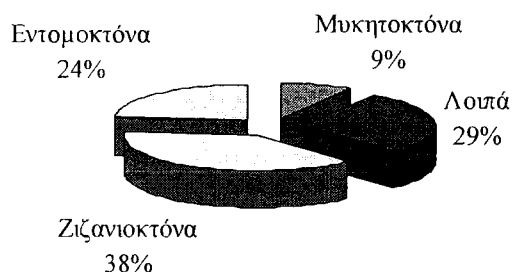
Περίπου 300000 τόνοι φυτοφαρμάκων πουλήθηκαν στην ΕΕ-15 το 2002 με τις πωλήσεις στη Γαλλία και στην Ιταλία να είναι περίπου 3 φορές μεγαλύτερες απ' ότι στην Αγγλία, στην Ισπανία και στη Γερμανία (Σχήμα 2.7).

Στην Ελλάδα σήμερα κυκλοφορούν περίπου 1350 εμπορικά σκευάσματα φυτοφαρμάκων. Το 2001 πουλήθηκαν 11111 τόνοι δραστικής ουσίας φυτοφαρμάκων συνολικά. Στον Πίνακα 2.1 αναφέρονται οι ποσότητες των φυτοφαρμάκων που καταναλώθηκαν στην Ελλάδα, σε τόνους δραστικής ουσίας, για τα έτη 1986,1998 και 2004.

Πίνακας 2.1

Ποσότητες δραστικών ουσιών που εισήχθησαν στην Ελλάδα σε τόνους δραστικής ουσίας (Αλμπάνης 1997; Eurostat 2001)

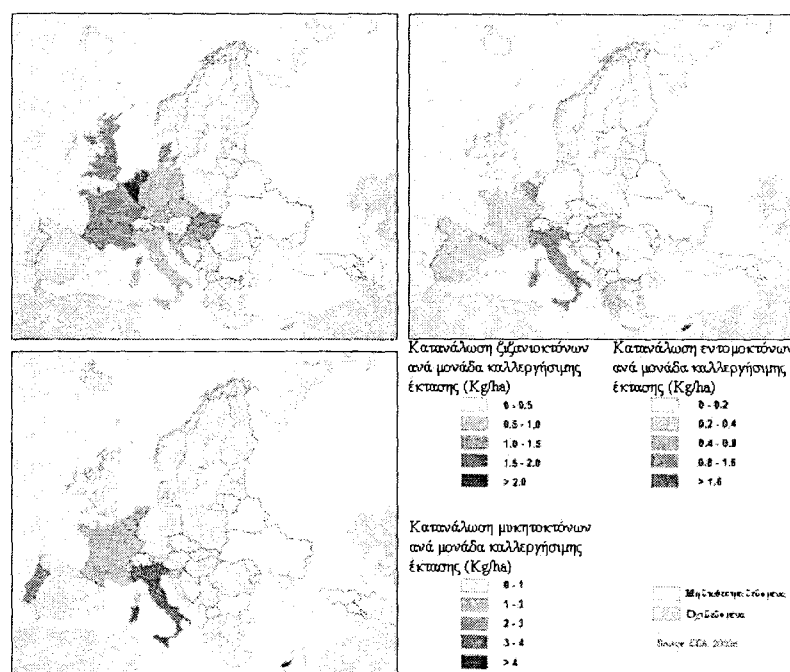
	1986	1998	2004
Ζιζανιοκτόνα	2483	2303	2675
Μυκητοκτόνα	24955	4731	5017
Εντομοκτόνα	3480	2505	2627
Διάφορα	2008	1940	1275
ΣΥΝΟΛΟ	32952	11479	11594



Σχήμα 2.8. Η παγκόσμια αγορά των δραστικών ουσιών των φυτοφαρμάκων ανάλογα με το είδος τους το 2001 (Kiely, Donaldson et al. 2004)

Τα τελευταία χρόνια με την βελτίωση των μεθόδων καλλιέργειας και εκμηχάνιση αυτής έχει αυξηθεί σημαντικά η παραγωγή των ζιζανιοκτόνων έναντι εντομοκτόνων. Τα ζιζανιοκτόνα συγκεκριμένα, σύμφωνα με τα στοιχεία τελευταίας δεκαετίας, είναι η κατηγορία των παρασιτοκτόνων που χρησιμοποιούνται σε ευρύτερη κλίμακα (Σχήμα 2.8).

Στο Σχήμα 2.9 απεικονίζεται η παγκόσμια κατανάλωση φυτοφαρμάκων ανά κατηγορία.



Σχήμα 2.9. Παγκόσμια κατανάλωση φυτοφαρμάκων ανά κατηγορία

Το πλήθος των φυτοφαρμάκων μπορεί να καταταχθεί σε διάφορες χημικές ομάδες, ανάλογα με την δραστική ουσία που περιέχουν και οι κυριότερες από αυτές είναι: (α) οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, (β) οι οργανοφωσφορικοί εστέρες, (γ) τα καρβαμιδικά και αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους, (δ) οι ενώσεις των χλωρο-αμινο-τριαζινών, (ε) οι ενώσεις της ομάδας των ουριών και των ανιλιδίων, (στ) οι

πυρεθρινοειδή και οι φυσικές πυρεθρίνες, (ζ) οι φερομόνες και (η) τα ανόργανα άλατα των μετάλλων As, Zn, Cu.

2.7 Η κατηγορία των ζιζανιοκτόνων

Τα ζιζανιοκτόνα αποτελούν κατηγορία των παρασιτοκτόνων και χρησιμοποιούνται για την παρεμπόδιση ή τη διακοπή της φυσιολογικής πορείας αύξησης και ανάπτυξης των ζιζανίων. Τα ζιζανιοκτόνα διακρίνονται, με βάση το εύρος του φάσματος των φυτών που επηρεάζουν, σε εκλεκτικά και καθολικά. Ανάλογα με τον τρόπο πρόσληψης και μετακίνησης στα φυτά διακρίνονται σε επαφής, διασυστηματικά και εδάφους. Η πρόσληψη των ζιζανιοκτόνων μπορεί να γίνει από τα φύλλα, τις ρίζες ή τον βλαστό του φυτού. Η κίνηση αυτών μέσα στο φυτό μπορεί να είναι αποπλαστική (προς τα επάνω), συμπλαστική (προς τα κάτω) ή ακόμα να μην κινούνται καθόλου (Γιαννοπολίτης and Πασπάτης 1985). Τέλος ανάλογα με τον χρόνο εφαρμογής τους διακρίνονται σε προφυτευτικά, προφυτρωτικά και μεταφυτρωτικά.

Το πλήθος των ζιζανιοκτόνων μπορεί να καταταχθεί σε διάφορες χημικές ομάδες ανάλογα με τη δραστική ουσία που περιέχουν και κυριότερες από αυτές είναι: (1) Φαίνοξυ-οξέα, (2) Βενζοϊκά οξέα, (3) Τριαζίνες, (4) Φαινιλουρίες, (5) Χλωροακεταμίδια και ανιλίδια, (6) Δίνιτρο-ανιλίνες, (7) Θειοκαρβαμιδικοί εστέρες και (8) Διπυριδύλια.

Τα ζιζανιοκτόνα έχουν φυσικοχημικές ιδιότητες που τους επιτρέπουν την διείσδυση στα φυτά με παθητική ή ενεργητική διάχυση, μέσω του φυλλώματος ή των ριζών. Ο τρόπος δράσης τους εξαρτάται γενικά από την χημική τους δομή και έτσι τα ζιζανιοκτόνα της ίδιας κατηγορίας τείνουν να έχουν τον ίδιο τρόπο δράσης. Σύμφωνα με την Επιστημονική Κοινότητα Ζιζανίων της Αμερικής (*Weed Science Society of America, WSSA*) τα ζιζανιοκτόνα κατατάσσονται, ανάλογα με τα σημεία δράσης τους, ως εξής (Peterson, Regehr et al. 2001):

(α) Στους ρυθμιστές αύξησης (φαίνοξυ, βενζοϊκά και καρβοξυλικά οξέα, π.χ. 2,4-D, dicamba, triclopyr)

(β) Στους αναστολείς αύξησης σποριόφυτων: (1) αναστολή εκβλάστησης (θειοκαρβαμιδικά, π.χ. EPTC), (2) αναστολή εκβλάστησης και ριζοβολής (ακεταμίδια, π.χ. alachlor) και (3) αναστολή της μίτωσης (δινιτροανιλίνες, π.χ. trifluralin)

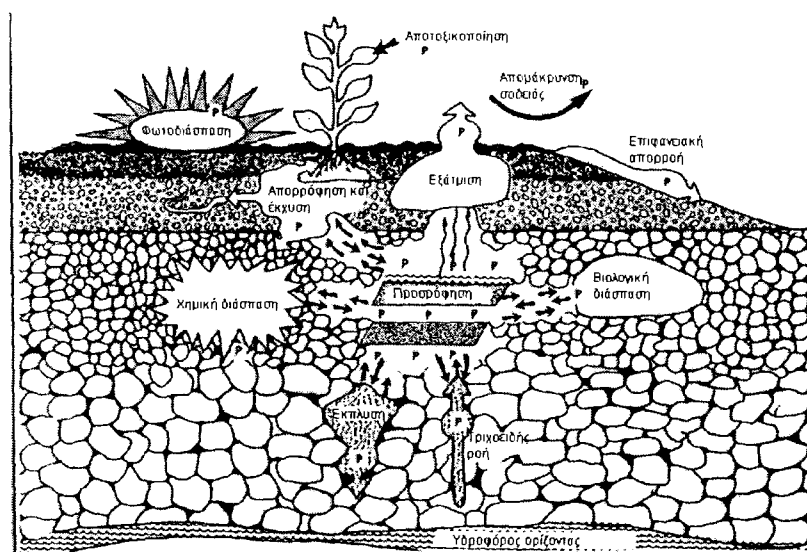
(γ) Στους αναστολείς της φωτοσύνθεσης: (1) φωτοσύστημα II, σημείο A (τριαζίνες, τριαζινόνες και ουρακίλες, π.χ. atrazine, metribuzin και terbacil), (2) φωτοσύστημα II, σημείο B (φαινυλουρίες, π.χ. linuron) και (3) φωτοσύστημα II, σημείο C (βενζοθειαζόλες, νιτρίλια και φαίνυλ-πυριδαζίνες, π.χ. bentazon, bromoxynil και pyridate)

(δ) Στους αναστολείς σύνθεσης αμινοξέων (σουλφονουρίες, ιμιδαζολινόνες, τριαζολοπυριμιδίνες και παράγωγα αμινοξέων, π.χ. chlorsulfuron, imazapyr, flumetsulam και glyphosate)

(ε) Στους αναστολείς του μεταβολισμού του αζώτου (φωσφορυλιωμένα αμινοξέα, π.χ. glyphosate)

(στ) Στους αναστολείς βιοσύνθεσης των λιπιδίων (κυκλοεξαδιόνες και αρυλοξυφαίνοξυ-προπιονικά, π.χ. sethoxydim και diclofor)

(ζ) Στους διαταράκτες κυτταρικών μεμβρανών (διφαινυλαιθέρες, φαίνυλφθαλιμίδια, αρυλ τριαζολινόνες και διπυριδύλια, π.χ. lactofen, flumiclorac, sulfetrazone και paraquat)



Σχήμα 2.10. Οι διεργασίες που επιδρούν στην συμπεριφορά και την τύχη των ζιζανιοκτόνων στο περιβάλλον (Grover 1988)

Η τύχη των ζιζανιοκτόνων στο περιβάλλον μετά την εφαρμογή τους εξαρτάται από τις διεργασίες που προαναφέρθηκαν και φαίνονται συνοπτικά στο Σχήμα 2.10.

2.8 Υποκατεστημένες ουρίες (*Δομή - Τρόπος δράσης*)

Οι υποκατεστημένες ουρίες αποτελούν κατηγορία των παρασιτοκτόνων, οι οποίες είναι παράγωγα της ουρίας ($H_2N-CO-NH_2$) και χρησιμοποιούνται ως ζιζανιοκτόνα (*φαινιλουρίες και σουλφονουρίες*) και ως εντομοκτόνα (*βενζοϋλουρίες*). Αποτελούν τις πρώτες ενώσεις που συντέθηκαν και περιείχαν μια αμινομάδα πλήρως υποκατεστημένη από αλκυλ- και αλκοξυ- ομάδες και μία δεύτερη που περιείχε μια μόνο- ή δι-χλωρο-φαινυλομάδα. Τα τελευταία χρόνια έχουν εισαχθεί παρασιτοκτόνα της ομάδας των υποκατεστημένων ουριών, τα οποία είναι ετεροκυκλικά, όμως η χρήση τους δεν είναι εκτεταμένη. Υπάρχουν περίπου 20 φαινιλουρίες που χρησιμοποιούνται ως ζιζανιοκτόνα και ο γενικός τους τύπος φαίνεται στον Πίνακα 2.2.

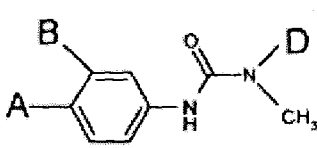
Οι φαινιλουρίες αντιπροσωπεύουν τη «δεύτερη γενιά φυτοφαρμάκων», εισήχθησαν μεταξύ του 1945 και 1955 και χρησιμοποιούνται ευρέως ως προ- και μετα-φυτρωτικά ζιζανιοκτόνα για τον έλεγχο ζιζανίων σε καλλιεργήσιμες ή μη εκτάσεις (Goger, Kunert et al. 2001). Χρησιμοποιούνται ως εκλεκτικά ζιζανιοκτόνα σε πολλές καλλιέργειες όπως, των δημητριακών (*chlorotoluron, isoproturon*), του βαμβακιού (*fluometuron*), της πατάτας (*monolinuron*), της φράουλας (*chloroxuron*) και του καρότου (*linuron*). Ένα άλλο μέλος της κατηγορίας αυτής είναι το *diuron* που χρησιμοποιείται ως καθολικό ζιζανιοκτόνο (Ruberu, Draper et al. 2000).

Οι φαινιλουρίες εφαρμόζονται στο έδαφος και απορροφούνται κυρίως μέσω των ριζών, μετακινούνται δε στο σημείο της δράσης τους, όπου παρεμβάλλονται στην μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά την φωτοσύνθεση. Η μετακίνησή τους στα φυτά μετά την πρόσληψη είναι αποπλαστική, δηλαδή μετακινούνται από τις ρίζες με την ροή του νερού προς τα φύλλα. Στη συνέχεια παρεμβάλλονται στην ροή των ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II στερώντας στο κύτταρο την ενέργεια που λογικά θα

παραγόταν μέσω της φωτοσύνθεσης. Τα φυτά δεν επηρεάζονται παρά μόνο αφού φυτρώσουν και ξεκινήσουν τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.

Πίνακας 2.2

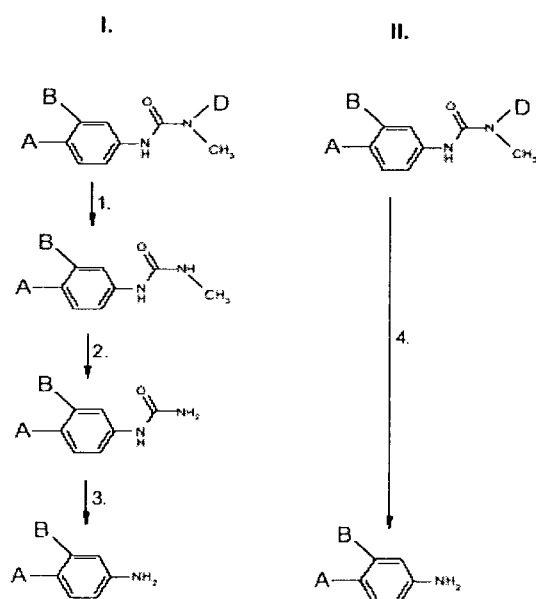
Η μοριακή δομή των κυριότερων ζιζανιοκτόνων της κατηγορίας των φαινυλουριών (Sorensen, Bending et al. 2003)



	A	B	D
Isoproturon [N-(4-isopropylphenyl)-N',N'-dimethylurea]	H ₃ C H ₃ C		H CH ₃
Diuron [N-(3,4-dichlorophenyl)-N',N'-dimethylurea]	Cl	Cl	CH ₃
Monuron [N-(4-chlorophenyl)-N',N'-dimethylurea]	Cl	H	CH ₃
Chlorotoluron [N-(3-chloro-4-methylphenyl)-N',N'-dimethylurea]	CH ₃	Cl	CH ₃
Fenuron [3-phenyl-N',N'-dimethylurea]	H	H	CH ₃
Fluometuron [N-(3-trifluoromethylphenyl)-N',N'-dimethylurea]	H	CF ₃	CH ₃
Metobromuron [N-(4-bromophenyl)-N'-methoxy-N'-methylurea]	Br	H	OCH ₃
Chlorobromuron [N-(4-bromo-3-chlorophenyl)-N'-methoxy-N'-methylurea]	Br	Cl	OCH ₃
Linuron [N-(3,4-dichlorophenyl)-N'-methoxy-N'-methylurea]	Cl	Cl	OCH ₃

Γενικά, τα επίπεδα ανίχνευσης υποκατεστημένων ουριών σε πραγματικά δείγματα είναι αρκετά χαμηλά, της τάξης των μg/l, εν μέρει λόγω των φυσικοχημικών

ιδιοτήτων τους όπως η σχετικά μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, το μικρό K_{ow} καθώς και λόγω της αραιής συχνότητας της εφαρμογής τους (Berrada, Font et al. 2003). Συνήθως μετά την εφαρμογή τους, οι κυριότεροι μηχανισμοί διάσπασής τους στα εδάφη, ιζήματα ή νερά περιλαμβάνουν την απομάκρυνση μιας αλκυλ - ή αλκοξυ - ομάδας από το αρχικό μόριο οπότε προκύπτουν μονο - υποκατεστημένες ή μη υποκατεστημένες φαινυλουρίες. Εναλλακτικά και κατά την υδρόλυσή τους με διάσπαση του αμιδικού δεσμού σχηματίζονται οι υποκατεστημένες ανιλίνες (Σχήμα 2.11) (Grover 1988).



Σχήμα 2.11. Τα προτεινόμενα μονοπάτια διάσπασης για τις N -μέθοξυ- N -μέθυλ- και N,N -διμέθυλ- υποκατεστημένες φαινυλουρίες. **I:** περιέχει διαδοχικά βήματα N -απαλκυλίωσης (βήματα 1 και 2) και υδρόλυση προς παράγωγα ανιλίνης (βήμα 3). **II:** άμεση υδρόλυση σε παράγωγα ανιλινών (βήμα 4). Στο Σχήμα 2.11 δίνονται οι υποκαταστάτες A, B, C, D (Sorensen, Bending et al. 2003)

Γενικά, οι φαινυλουρίες είναι σταθερές στη χημική διάσπαση σε υδατικό περιβάλλον σε ήπιες θερμοκρασίες και στην περιοχή του pH 4-10. Έτσι η χημική τους διάσπαση στα καλλιεργούμενα εδάφη είναι μικρού εύρους. Οι μελέτες ωστόσο έχουν

δείξει ότι μπορεί να συμβεί φωτοχημική διάσπαση αυτών όταν εκτεθούν στην ηλιακή ακτινοβολία. Οι φωτοχημικές όμως διεργασίες οδηγούν συνήθως σε μερική διάσπαση δημιουργώντας ενδιάμεσα προϊόντα που μπορούν να ανιχνευτούν στο περιβάλλον. Μια τέτοια παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων δεν είναι επιθυμητή διότι έχει βρεθεί ότι τα προϊόντα διάσπασης μπορεί να είναι πιο επικίνδυνα για οργανισμούς μη-στόχο από ότι τα ίδια τα ζιζανιοκτόνα.

2.9 Linuron, diuron και οι μεταβολίτες τους

Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν για μελέτη στην παρούσα εργασία είναι ζιζανιοκτόνα της κατηγορίας των φαινυλουριών, linuron, diuron και οι μεταβολίτες τους. Τα βασικά κριτήρια που οδήγησαν στην επιλογή των παραπάνω ενώσεων είναι ευρεία χρήση τους ως γεωργικά φυτοφάρμακα σε πολλές καλλιέργειες, περιορισμένες γνώσεις που αφορούν την τύχη τους στο περιβάλλον καθώς και πιθανές και σημαντικές επιπτώσεις στο ενδοκρινικό σύστημα των ζώων και του ανθρώπου, αφού συγκαταλέγονται στη λίστα των ύποπτων ενώσεων επονομαζόμενων ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, EDCs.

Οι μεταβολίτες, όπως προαναφέρθηκε, προκύπτουν με διαδοχικά βήματα απομάκρυνσης των μεθυλομάδων οπότε τρεις είναι οι κύριοι μεταβολίτες για linuron και diuron: N'-(3,4-διχλωροφαινυλ)-N-μεθυλουρία (DCPMU), 3,4-διχλωροφαινυλουρία (DCPU) και 3,4-διχλωροανιλίνη (3,4-DCA).

2.9.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Linuron

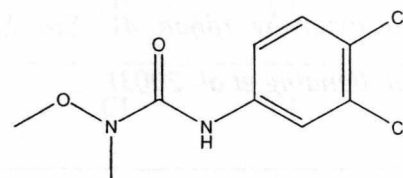
Μοριακό βάρος: 249.11 g/mol

Τάση ατμών: 2 mPa (24 °C)

Διαλυτότητα στο νερό: 75 mg/L

Log K_{ow} : 3.20

Σταθερά του Henry: 6.25×10^{-9} atm·m³/mole



Diuron

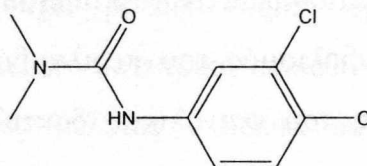
Μοριακό βάρος: 233.10 g/mol

Τάση ατμών: 0.41 mPa (50 °C)

Διαλυτότητα στο νερό: 42 mg/L

Log K_{ow} : 2.68

Henry's law constant: 5.04×10^{-10} atm-m³/mole



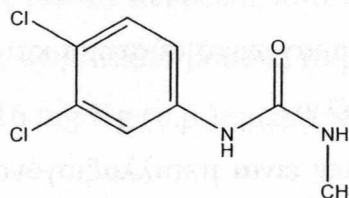
DCPMU

Μοριακό βάρος: 219.07 g/mol

Διαλυτότητα στο νερό: 107 mg/L

Log K_{ow} : 2.94

Henry's law constant: 2.43×10^{-10} atm-m³/mole



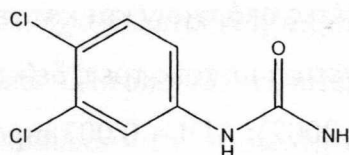
DCPU

Μοριακό βάρος: 205.04 g/mol

Διαλυτότητα στο νερό: 225 mg/L

Log K_{ow} : 2.65

Henry's law constant: 1.11×10^{-10} atm-m³/mole



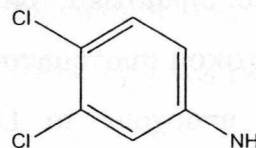
3,4-DCA

Μοριακό βάρος: 162.02 g/mol

Διαλυτότητα στο νερό: 600 mg/L

Log K_{ow} : 2.69

Henry's law constant: 1.46×10^{-5} atm-m³/mole



2.9.2 Τοξικότητα

Linuron

Στα θηλαστικά, το linuron μεταβολίζεται στο συκώτι και δεν βιοσυσσωρεύεται. Ο μεταβολισμός του περιλαμβάνει απαλκυλίωση, απομεθοξυλίωση, οξείδωση και σύζευξη του φαινολικού δακτυλίου (European Commission 2002). Οι κυριότερες μεταβολίτες του περιλαμβάνουν τα DCPU, N'-(3,4-δichλωροφαινυλ)-N-μεθοξουρε και N'-(6-υδροξυ-3,4-dichλωροφαινυλ) ουρία. Γενικά το linuron είναι ισχυρά τοξικό για τα υδρόβια ασπόνδυλα καθώς και για κάποια είδη ψαριών (LC_{50} για τη πολύχρωμη πέστροφα 3.3 mg/L) ενώ μέτρια τοξικότητα εμφανίζει για τα στρείδια και τις γαρίδες. Ο δείκτης NOAEL είναι 0.8-1 mg/Kg σωματικού βάρους (σ.β.)/ημέρα για το αναπαραγωγικό σύστημα και 10 mg/Kg (σ.β.)/ημέρα για το αναπτυξιακό σύστημα σε κουνέλια.

Δεν είναι μεταλλαξιογόνο αλλά εμπλέκεται στη μεταφορά και πρόσδεση των ανδρικών ορμονών οπότε και εμφανίζει μια τοξικότητα που σχετίζεται με το αναπαραγωγικό και αναπτυξιακό σύστημα των οργανισμών. Για τους ανθρώπους λίγες μελέτες υπάρχουν και κατατάσσεται ως πιθανό καρκινογενές στις ΗΠΑ.

Σχετικά με τους τρεις δείκτες επικινδυνότητας για τον άνθρωπο, αυτοί έχουν ως εξής (EC 2002): ADI = 0.003 mg/Kg (σ.β.)/ημέρα, AOEL = 0.009 mg/Kg (σ.β.)/ημέρα και ARfD = 0.03 mg/Kg (σ.β.)/ημέρα.

Diuron

Στα θηλαστικά, το diuron απορροφάται μέσω του γαστρεντερικού και του αναπνευστικού συστήματος. Ο κυρίαρχος μεταβολίτης είναι το DCPU ενώ σε μικρά ποσοστά υπάρχουν τα DCPMU, 3,4-DCA και 3,4-dichλωροφαινόλη. Γενικά, οι μεταβολίτες που ανιχνεύονται στα θηλαστικά είναι παρόμοιοι με αυτούς στο νερό και στο έδαφος με την απαλκυλίωση και υδροξυλίωση να παραμένουν τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια.

Το diuron παρουσιάζει χαμηλή οξεία τοξικότητα. Το LD_{50} για αρσενικά ποντίκια είναι > 3 g/Kg. Παρουσιάζει μέτρια τοξικότητα για τους υδρόβιους

οργανισμούς, όπως ψάρια, στρείδια και γαρίδες, με το LC_{50} για τα ψάρια να βρίσκεται μεταξύ 4.3 και 42 mg/L (LC_{50} για την πολύχρωμη πέστροφα 5.6 mg/L). Γενικά δεν παρουσιάζει φαινόμενα μετάλλαξης. Ωστόσο, έχει βρεθεί τοξική δράση σε οργανισμούς μη-στόχους κυρίως σε κυτταρικό και υπο-κυτταρικό επίπεδο, όπως τα άλγη (Guzzella, Capri et al. 2006). Τελευταίες μελέτες υποδεικνύουν ότι οι μεταβολίτες του εμφανίζουν υψηλότερη τοξική δράση από το diuron (Simon, Helliwell et al. 1998; Tixier, Bogaerts et al. 2000; WHO 2006). Ο δείκτης NOAEL για τα ποντίκια είναι 1.25 mg/Kg (σ.β.)/ημέρα για το ογκογενετικό σύστημα και 6.25 mg/Kg (σ.β.)/ημέρα για το αναπαραγωγικό σύστημα.

Σχετικά με τους τρεις δείκτες επικινδυνότητας για τον άνθρωπο, αυτοί έχουν ως εξής (EFSA 2005; EC 2008): ADI = 0.007 mg/Kg σωματικού βάρους (σ.β.)/ημέρα, AOEL = 0.007 mg/Kg (σ.β.)/ημέρα και ARfD = 0.016 mg/Kg (σ.β.)/ημέρα.

Μεταβολίτες

Για τους μεταβολίτες δεν υπάρχουν ακόμη επαρκή στοιχεία τοξικότητας με εξαίρεση το 3,4-DCA. Θεωρείται ιδιαίτερα τοξικό και έχει μελετηθεί η τοξικότητά του σε πολλούς οργανισμούς όπως οι *V. fischeri* and *Chironomus riparius* (Osano, Admiraal et al. 2002). Πολλές μελέτες επίσης επιβεβαίωσαν την τοξικότητα του 3,4-DCA σε πολλούς οργανισμούς όπως στο είδος ψαριού zebrafish (NOEL-200 µg/L) (Ensenbach, Hryk et al. 1996), μικροάλγη (700-4400 µg/L) (Girling, Tattersfield et al. 2000), πρωτόζωα (1.6 mg/L), φυτοπλαγκτόν (100 µg/L), μικροοργανισμοί *daphnia* (<100 µg/L) (Sosak-Swidarska, Tyrawska et al. 1998), ακόμη και βακτήρια (Guilhermino, Soares et al. 1998; Tixier, Bogaerts et al. 2000). Το LC_{50} για το είδος *Poecilia reticulata* ψαριού είναι 8.7 mg/L.

Στα θηλαστικά όπως τα ποντίκια η τοξικότητα του μεταβολίτη, 3,4-DCA, κυριαρχεί σε 24 ώρες και οι βασικοί ιστοί-στόχοι είναι τα νεφρά, το συκώτι και η ουροδόχος κύστη (Valentovic, Yahia et al. 1997). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί φαινόμενα βιοσυσσώρευσης συνεισφέροντας ακόμη περισσότερο στην επικινδυνότητα της τοξικής δράσης αυτού του μεταβολίτη (Ensenbach, Hryk et al.

1996). Για τον άνθρωπο δεν υπάρχουν ακόμη διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με την οξεί τοξική δράση του 3,4-DCA. Ωστόσο, εμφανίζει μέτρια οξεία τοξικότητα σε ποντίκι (LD_{50} για θηλυκά ποντίκια, 530 mg/Kg) και πιο έντονη σε κουνέλια (LD_{50} για αρσενικά κουνέλια, 300 mg/Kg). Ο δείκτης NOAEL είναι 25 mg/Kg σωματικό βάρους (σ.β.)/ημέρα για το αναπτυξιακό σύστημα σε ποντίκια (European Commission-Joint Research Centre 2006).

2.9.3 Ενδοκρινική δράση

Η Ευρωπαϊκή ένωση εξέδωσε τον Ιούνιο του 2000 μια πρώτη λίστα χημικών ενώσεων που περιέχει αρκετά φυτοφάρμακα, σύμφωνα με την οποία οι ενώσεις κατατάσσονται με τις πιθανές ενδείξεις για ενδοκρινική δράση σε δύο κατηγορίες: α) την κατηγορία υψηλής επικινδυνότητας, που περιλαμβάνει ενώσεις με βέβαιη ενδοκρινική δράση και β) την κατηγορία μέσης επικινδυνότητας, που περιλαμβάνει ενώσεις με πιθανή ενδοκρινική δράση. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει μεταξύ των άλλων το ζιζανιοκτόνο linuron και η δεύτερη το diuron. Πράγματι, αρκετές μελέτες παρουσιάζουν ενδείξεις για ενδοκρινική δράση των ζιζανιοκτόνων linuron και diuron καθώς και του μεταβολίτη τους 3,4-DCA.

Το linuron σύμφωνα με έρευνες σε αρσενικούς αρουραίους μεταβάλλει την πρόσδεση των ανδρογόνων στον υποδοχέα και επηρεάζει την επακόλουθη ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος (*anti-androgen*) (Daxenberger 2002). Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει για την πιθανή δημιουργία όγκου, έχει βρεθεί ότι η έκθεση πειραματόζων σε ποσότητα 125 mg/Kg/ημέρα linuron μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία όγκου στα ανδρικά γενετικά όργανα. Η ερευνητική ομάδα του Cook μελέτησε τις επιδράσεις του linuron σε έφηβους και ενήλικους αρουραίους. Στις μελέτες μικρής χρονικής διάρκειας *in vivo* διαπιστώθηκε ότι η έκθεση οδήγησε σε μειωμένα ποσοστά τεστοστερόνης και μετέβαλε την έκφραση των γονιδίων του προστάτη που ρυθμίζεται από τα ανδρογόνα (Cook, Mullin et al. 1993). Το linuron, πιθανότατα, λειτουργεί ανταγωνιστικά ως προς τα ανδρογόνα στους υποδοχείς τους

(Lintelmann, Katayama et al. 2003) και δρα μέσω αναστολής της στεροειδογένεσης (McIntyre, Barlow et al. 2000).

Η ομοιότητα στη δομή μεταξύ linuron και diuron καθιστά και το δεύτερο ύποπτο παρόμοιας ενδοκρινικής δράσης στους υποδοχείς των ανδρογόνων. Οι έρευνες σε σχέση με την ενδοκρινική δράση του diuron είναι περιορισμένες. Ωστόσο, σύμφωνα με αναφορά της EPA υπάρχουν ενδείξεις ότι προκαλεί καρκινώματα στην ουροδόχο κύστη μετά από πειράματα σε πειραματόζωα και των δύο φύλων (Office of Environmental Health Hazard Assessment 2000). Επίσης μπορεί να προκαλέσει ανάπτυξη καρκινωμάτων στους μαστικούς αδένες των θηλυκών ποντικών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης μιας σπάνιας μορφής καρκίνου του νεφρού. Πάντως, τόσο για το diuron όσο και για το μεταβολίτη DCPU, σύμφωνα με μια μελέτη πάνω στη σχετική συγγένεια πρόσδεσης (*RBA, Relative Binding Affinity*) επιβεβαιώνεται η ικανότητα των παραπάνω ενώσεων να αντιδρούν με τον υποδοχέα ανδρογόνων (Bauer, Meyer et al. 1998). Ωστόσο οι μελέτες που να τεκμηριώνουν την ενδοκρινική δράση αυτών των ενώσεων δεν είναι ακόμη επαρκείς.

Ο μεταβολίτης, 3,4-DCA, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως πιθανός ενδοκρινικός διαταράκτης διότι δεν είναι μόνο προϊόν διάσπασης των linuron και diuron αλλά αποτελεί και ενδιάμεσο προϊόν κατά την σύνθεση άλλων ζιζανιοκτόνων, χρωμάτων και φαρμάκων. Παρουσιάζει ανταγωνιστική δράση στους υποδοχείς ανδρογόνων στα θηλαστικά καθώς και στα ψάρια (Lintelmann, Katayama et al. 2003). Έχει επίσης αποδειχθεί ενδοκρινική δράση και στα ψάρια. Σύμφωνα με μελέτες, η έκθεση των αρσενικών ψαριών της οικογένειας *gasterosteidae* σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 200 και 400 $\mu\text{g/L}$ οδήγησε σε μειωμένη σύνθεση ανδρογόνων. Η αλλαγές στον μεταβολισμό των ανδρογόνων συνοδεύεται με αλλαγές στα δευτερογενή φυλετικά χαρακτηριστικά των ψαριών σε συγκεντρώσεις 100, 200 και 400 $\mu\text{g/L}$ DCA (European Commission-Joint Reseach Centre 2006). Είναι πιθανό γεγονός η μακροπρόθεσμη έκθεση σε 3,4-DCA των ψαριών να οδηγεί σε βαθμιαία αύξηση των επιπέδων της μεταιμογλοβίνης με συνέπεια την δημιουργία τοξικής μεταιμογλοβιναιμίας. Τα ίδια αποτελέσματα μπορούν πιθανότατα να εμφανιστούν και

στον άνθρωπο μετά από έκθεση σε 3,4-DCA (Crossland 1990). Επιπλέον, το DC εμφανίζει 1.7 φορές χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στους υποδοχείς από linuron (Bauer, Meyer et al. 1998).

Γενικά για τους μεταβολίτες DCPU και DCPMU δεν υπάρχουν ακόμη μελέτες σχετικά με την ενδοκρινική τους δράση. Παρόλα αυτά ένα ενδιαφέρον δυναμικό για ενδοκρινική δράση είναι αναμενόμενο λόγω της δομικής ομοιότητας του linuron με το diuron και του κοινού τους μεταβολίτη 3,4-DCA.

2.9.4 Περιβαλλοντική σημασία

Diuron

Το diuron γενικά εμφανίζει κινητικότητα και έτσι έχει την ικανότητα να απορρέει σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα. Ωστόσο, θεωρείται σχετικά σταθερό σε φυσικά νερά και ιδιαίτερα σταθερό στην υδρόλυση (σε pH 5, 7 και 9) και την ηλιακή ακτινοβολία (Konstantinou and Albanis 2004). Γενικά υπολείμμάτα του ανιχνεύονται ως επί το πλείστον στην υδατική φάση ενώ προσροφάται στα ιζήματα. Τα κύρια προϊόντα, τόσο κατά την αερόβια όσο και κατά την αναερόβια διαδικασία διάσπασής του περιλαμβάνουν τα: 1-(3,4-διχλωροφαίνυλ)-3,1-διμεθυλουρία (CPDU), 1-(3,4-διχλωροφαίνυλ)-3-μεθυλουρία (DCPMU), 1-(3,4-διχλωροφαίνυλ) ουρία (DCPU) και το διμέθυλ-diuron. Κατά την υδρόλυση ο κύριος μεταβολίτης του είναι το 3,4-DCA (Salvestrini, Di Cerbo et al. 2002). Στο έδαφος οι επικρατέστεροι μεταβολίτες είναι οι DCPMU και DCPU. Κατά τη διάσπασή του μπορεί να προκύψουν υπολείμματα μόνιμα προσδεμένα/ προσροφημένα. Τόσο το diuron όσο και οι μεταβολίτες του εμφανίζουν μια μέση έως χαμηλή τάση κινητικότητας στα εδάφη.

Λόγω της υψηλής υπολειμματικότητάς του -από ένα μήνα μέχρι και ένα χρόνο- το diuron ανιχνεύεται σε εδάφη, νερά και ιζήματα (Field, Reed et al. 2003; Okamura, Aoyama et al. 2003). Έχει βρεθεί να εμφανίζει μεγαλύτερη τάση απορροής σε βαθύτερα στρώματα του εδάφους λόγω της μικρότερης περιεκτικότητας σε οργανική ύλη, πράγμα το οποίο θέτει τον κίνδυνο ρύπανσης του υδροφόρου ορίζοντα (Alva and Singh 1990). Το diuron αποτελεί πηγή ρύπανσης του υδάτινου περιβάλλοντος και

λόγω της χρήσης του ως βιοκτόνο σε υφαλοχρώματα. Στο υδάτινο περιβάλλον της Ιαπωνίας 86% των αναλυθέντων δειγμάτων περιείχαν diuron σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 3.05 µg/L (Okamura, Aoyama et al. 2003). Στα Γερμανικά παράλια και τις προβλήτες ανιχνεύθηκε diuron σε συγκέντρωση 430 ng/L, πάνω από το επιτρεπτό όριο (Lamoree, Swart et al. 2002). Πολλές άλλες μελέτες αναφέρουν επίσης την ανίχνευση του diuron (Boxall, Comber et al. 2000; Thomas, Fileman et al. 2001; Okamura 2002; Okamura, Aoyama et al. 2003). Σε θαλασσινό νερό εμφανίζει αύξηση της προσρόφησής του στα ιζήματα με την αύξηση της περιεκτικότητας αυτού σε οργανική ύλη (Voulvoulis, Scrimshaw et al. 2002). Τέλος, στην Ελλάδα έχει ανιχνευτεί diuron στο θαλασσινό νερό και ίζημα στη μαρίνα της Πρέβεζας και τους τρεις καλοκαιρινούς μήνες της δειγματοληψίας (Boti, Sakkas et al. 2007; Boti, Sakkas et al. 2007).

Linuron

Γενικά, το linuron είναι σταθερό στην υδρόλυση (σε pH 5, 7 και 9) και φωτόλυση, ενώ εμφανίζει μια μικρή τάση βιοσυσσώρευσης και μικρή κινητικότητα. Τα κύρια προϊόντα διάσπασής του, τόσο κατά την αερόβια όσο και κατά την αναερόβια διαδικασία διάσπασής του περιλαμβάνουν τα: 1-(3,4-διχλωροφαίνυλ)-3-μεθυλουρία (DCPMU), 1-(3,4-διχλωροφαίνυλ) ουρία (DCPU), την 3,4-διχλωροανιλίνη (3,4-DCA) και το 1-(3,4-διχλωροφαίνυλ)-3-μεθοξουρία.

Στο έδαφος η διάσπαση λόγω ηλιακής ακτινοβολίας είναι αμελητέα με κυριότερη την αναερόβια διάσπασή του και κυρίαρχο μεταβολίτη το DCPMU σε ποσοστό 55% σε 119 ημέρες (EC 2002). Γενικά στο σύστημα νερό-ίζημα δε σχηματίζονται προϊόντα διάσπασης εκτός αν υπάρχει αρκετό μικροβιακό φορτίο. Μελέτες σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την προσρόφηση του linuron από εδάφη (Valverde-Garcia, Gonzalez-Pradas et al. 1989; Businelli, Vischetti et al. 1992), όπως είναι η θερμοκρασία, ο χρόνος επαφής (Brucher and Bergstrom 1997; Cox and Walker 1999) και η κινητικότητά του (Smith and Emmond 1975; Miliadis, Siskos et al. 1987) κατέληξαν στο συμπέρασμα της μεγάλης παραμονής του και

μικρής κινητικότητάς τους στα εδάφη. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η συχνότητα ανίχνευσής του στον υδροφόρο ορίζοντα είναι αυξανόμενη. Το 1998 σε μια μελέτη στα πλαίσια της θέσπισης Προδιαγραφών για την Ποιότητα του Νερού του Καναδά (*CWQG, Canadian Water Quality Guidelines*) το linuron ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις μέχρι 1100 και 2800 mg/L σε επιφανειακά και υπόγεια νερά, αντίστοιχα, σε περιοχές με έντονη καλλιεργητική δραστηριότητα (Caux, Kent et al. 1998). Το ποσοστό της περιεχόμενης οργανικής ύλης (πάνω από 2%) αποτελεί τη σημαντικότερη παράμετρο για την προσρόφηση του linuron στα εδάφη καθώς και για την κινητικότητά του που αυξάνεται με μείωση της οργανικής ύλης (Sanchez-Camazano, Sanchez-Martin et al. 2000).

Μεταβολίτες

Στοιχεία για την περιβαλλοντική τύχη και σημασία των μεταβολιτών DCPU και DCPMU δεν υπάρχουν μέχρι τώρα. Ωστόσο αρκετές μελέτες υπάρχουν σχετικά με το 3,4-DCA.

Τα γενικά χαρακτηριστικά του 3,4-DCA που σχετίζονται με την εκτίμηση της περιβαλλοντικής έκθεσης σε αυτό περιλαμβάνουν τα εξής (European Commission-Joint Reseach Centre 2006): (α) εκτιμώμενος χρόνος ημιζωής στην ατμόσφαιρα 9h, (β) μη-πτητικό σύμφωνα με τη σταθερά Henry, (γ) δεν υπόκειται σε υδρόλυση, (δ) φωτολύεται στα επιφανειακά ύδατα (εκτιμώμενος χρόνος ημιζωής 18 ημέρες), (ε) αμελητέα βιοδιάσπαση, (στ) αντίδραση με τις χουμικές ενώσεις στα εδάφη και στα ιζήματα και συσσώρευση των παραγόμενων προϊόντων αντίδρασης λόγω μικρού ρυθμού βιοδιάσπασης, (ζ) μικρό ποσοστό βιοσυσσώρευσης στα ψάρια, Πιθανή συσσώρευση των προϊόντων αντίδρασης με τις χουμικές ενώσεις των ιζημάτων στους βενθικούς οργανισμούς.

Γενικά, η φωτόλυση του 3,4-DCA οδηγεί σε φαινολικές ενώσεις και στη συνέχεια σε αμινοφαινοξαζόνες, ενώσεις για τις οποίες δεν υπάρχουν τοξικολογικά στοιχεία (Othmen and Boule 1999). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το DCA μπορεί να προσδεθεί μη αντιστρεπτά στα συστατικά του εδάφους και κατά συνέπεια να μην είναι

βιοδιαθέσιμο. Ωστόσο οργανισμοί όπως τα οστρακόδερμα επηρεάζονται και από πολύ μικρές συγκεντρώσεις του ($1 \mu\text{g/L}$). Ακόμα και αν δεν υπάρχουν ακόμη αρκετά στοιχεία για τα επίπεδα ανίχνευσης του DCA στο υδάτινο περιβάλλον φαίνεται ότι τόσο χαμηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να υπάρχουν. Στο έδαφος το DCA έχει ανιχνευθεί σε συγκεντρώσεις που μπορεί να ξεπεράσουν τα $5 \mu\text{g/Kg}$ (Gooddy, Chilton et al. 2002).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ, ΙΖΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΑ - ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Τα φυτοφάρμακα αποτελούν μια ομάδα ρυπαντών που περιλαμβάνει ενώσεις με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως την πτητικότητα, την πολικότητα καθώς και τη διαλυτότητα στο νερό. Επιπλέον, οι διάφορες διεργασίες στις οποίες υπόκεινται με την εισαγωγή τους στο περιβάλλον οδηγούν συχνά σε ρύπανση του επίγειου και υδάτινου οικοσυστήματος εισχωρώντας παράλληλα στην τροφική αλυσίδα με τελικό αποδέκτη τον ίδιο τον άνθρωπο. Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων (των μητρικών ενώσεων ή και των πιθανών προϊόντων διάσπασης αυτών) είναι απαραίτητος και κατά συνέπεια η χρήση αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών τεχνικών για τον προσδιορισμό τους καθίσταται κρίσιμο και καίριο θέμα επιστημονικής έρευνας. Επιπλέον, ο προσδιορισμός τους παρουσιάζει ιδιαιτερότητα διότι τις περισσότερες φορές απαντώνται σε ίχνη στα περιβαλλοντικά δείγματα. Με άλλα λόγια οι συγκεντρώσεις τους είναι πολύ χαμηλές (τάξεις των ppb),

συνευρίσκονται στο υπόστρωμα μαζί με πλήθος άλλων οργανικών και ανόργανων ενώσεων που συνήθως παρεμποδίζουν την ανάλυσή τους ενώ ταυτόχρονα το ιστορικό των δειγμάτων προς ανάλυση είναι συνήθως άγνωστο.

Είναι επομένως απαραίτητη μια προετοιμασία του δείγματος, ο βασικός στόχος της οποίας είναι η μετατροπή του σε τέτοια μορφή ή κατάσταση που θα επιτρέπει την ανάλυσή του με κάποια αξιόπιστη αναλυτική μέθοδο. Αυτή εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του υποστρώματος του προς ανάλυση δείγματος καθώς επίσης και από τις ιδιότητες και το επίπεδο συγκέντρωσης της ένωσης προς ανάλυση. Τα τυπικά στάδια της προετοιμασίας δείγματος περιλαμβάνουν τη δειγματοληψία/ομογενοποίηση, την εκχύλιση, τον καθαρισμό και τη συμπύκνωσή του πριν το τελικό στάδιο της ανάλυσης.

Γενικά, οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων διακρίνονται σε ειδικές (*specific*) όταν προσδιορίζεται ένα φυτοφάρμακο και πολύ-υπολειμματικές (*multiresidue*) όταν προσδιορίζονται ταυτόχρονα πολλά φυτοφάρμακα.

Αν και ακόμη χρησιμοποιούνται παραδοσιακές μεθοδολογίες προετοιμασίας του δείγματος, τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες ώστε να επιτυγχάνεται (Smith 2003):

- (α) Ικανότητα χρήσης όσο το δυνατόν μικρότερου μεγέθους (όγκου ή ποσότητας) αρχικού δείγματος ακόμη και για προσδιορισμό ενώσεων σε ίχνη
- (β) Μεγαλύτερη εκλεκτικότητα κατά την εκχύλιση του δείγματος
- (γ) Καλύτερη δυνατότητα αυτοματοποίησης ή χρήση τεχνικών σε απευθείας σύνδεση (on-line) με όργανα ανάλυσης όπως τη χρωματογραφία
- (δ) Φιλική στάση προς το περιβάλλον με λιγότερα απόβλητα και τη χρήση μικρότερων όγκων οργανικών διαλυτών

3.2 Δειγματοληψία

Ο ρόλος της δειγματοληψίας ως πρώτο βήμα της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος δεν πρέπει να υποτιμάται. Στις μελέτες για τον έλεγχο υπολειμμάτων η ποσότητα του δείγματος και ο τρόπος δειγματοληψίας και αποθήκευσης των

δειγμάτων είναι πρωταρχικής σημασίας προκειμένου να ληφθούν αντιπροσωπευτικά δείγματα, ενδέχεται να περιέχουν υπολείμματα. Η ανάγκη για χρήση όλο και μικρότερου μεγέθους δείγματος θα πρέπει να εξισορροπείται με την ανάγκη για τη χρήση όσο το δυνατόν περισσότερο αντιπροσωπευτικού δείγματος προς ανάλυση. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η φάση της δειγματοληψίας όταν πρόκειται για στερεά δείγματα όπως τα είδη τροφίμων όπου το δείγμα προς ανάλυση θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του συνολικού όγκου και της φύσης του αρχικού δείγματος. Έτσι για τον έλεγχο υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα η δειγματοληψία θα πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με επίσημες οδηγίες που υπάρχουν από διάφορα σωματεία όπως ο FAO/WHO (Codex Alimentarius Commission 1999).

3.3 Εκχύλιση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων

3.3.1 Υγρό υπόστρωμα

Οι συνήθεις μεθοδολογίες για την εκχύλιση ενώσεων βασίζονται στην κατανομή αυτών μεταξύ ενός διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το νερό και της υδατικής φάσης ή στην “παγίδευση” των ενώσεων πάνω σε μία στήλη ή σε στερεάς φάσης υπόστρωμα ή ακόμα σαν τελευταία επιλογή στην εξάτμιση του δείγματος μέχρι ξηρού και την επιλεκτική επαναδιάλυση των αναλυόμενων ουσιών.

Η πιο γνωστή μέθοδος εκχύλισης ενώσεων από υδατικό υπόστρωμα είναι η υγρή – υγρή εκχύλιση (*Liquid - Liquid Extraction, LLE*). Βασίζεται στην κατανομή των οργανικών ενώσεων μεταξύ του υδατικού δείγματος και ενός μη αναμίξιμου με το νερό οργανικού διαλύτη. Η αποτελεσματικότητα του διαλύτη στην εκχύλιση εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής ο οποίος εκφράζει την χημική συγγένειά του με την οργανική ένωση που αναλύεται. Η υγρή-υγρή εκχύλιση πραγματοποιείται σε διαχωριστικές χοάνες (*separating funnel*) όπου οι ενώσεις προς ανάλυση κατανέμονται μεταξύ της υδατικής φάσης και ενός μη πολικού διαλύτη. Ο συντελεστής κατανομής των ενώσεων πρέπει να είναι μεγάλος, διότι πρακτικά

δειγμάτων είναι πρωταρχικής σημασίας προκειμένου να ληφθούν αντιπροσωπευτικά δείγματα, ενδέχεται να περιέχουν υπολείμματα. Η ανάγκη για χρήση όλο και μικρότερου μεγέθους δείγματος θα πρέπει να εξισορροπείται με την ανάγκη για τη χρήση όσο το δυνατόν περισσότερο αντιπροσωπευτικού δείγματος προς ανάλυση. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η φάση της δειγματοληψίας όταν πρόκειται για στερεά δείγματα όπως τα είδη τροφίμων όπου το δείγμα προς ανάλυση θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό του συνολικού όγκου και της φύσης του αρχικού δείγματος. Έτσι για τον έλεγχο υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα η δειγματοληψία θα πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με επίσημες οδηγίες που υπάρχουν από διάφορα σωματεία όπως ο FAO/WHO (Codex Alimentarius Commission 1999).

3.3 Εκχύλιση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων

3.3.1 Υγρό υπόστρωμα

Οι συνήθεις μεθοδολογίες για την εκχύλιση ενώσεων βασίζονται στην κατανομή αυτών μεταξύ ενός διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το νερό και της υδατικής φάσης ή στην “παγίδευση” των ενώσεων πάνω σε μία στήλη ή σε στερεάς φάσης υπόστρωμα ή ακόμα σαν τελευταία επιλογή στην εξάτμιση του δείγματος μέχρι ξηρού και την επιλεκτική επαναδιάλυση των αναλυόμενων ουσιών.

Η πιο γνωστή μέθοδος εκχύλισης ενώσεων από υδατικό υπόστρωμα είναι η υγρή – υγρή εκχύλιση (*Liquid - Liquid Extraction, LLE*). Βασίζεται στην κατανομή των οργανικών ενώσεων μεταξύ του υδατικού δείγματος και ενός μη αναμίξιμου με το νερό οργανικού διαλύτη. Η αποτελεσματικότητα του διαλύτη στην εκχύλιση εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής ο οποίος εκφράζει την χημική συγγένειά του με την οργανική ένωση που αναλύεται. Η υγρή-υγρή εκχύλιση πραγματοποιείται σε διαχωριστικές χοάνες (*separating funnel*) όπου οι ενώσεις προς ανάλυση κατανέμονται μεταξύ της υδατικής φάσης και ενός μη πολικού διαλύτη. Ο συντελεστής κατανομής των ενώσεων πρέπει να είναι μεγάλος, διότι πρακτικά

υπάρχει περιορισμός αφ' ενός στην αναλογία όγκου διαλύτη – δείγματος, αφ' ετέρου στον αριθμό των εκχυλίσεων.

Η τεχνική της υγρής – υγρής εκχύλισης έχει πολλές εφαρμογές στην εκχύλιση διαφόρων κατηγοριών φυτοφαρμάκων από φυσικά νερά (Yrieix, Gonzalez et al. 1996). Χαρακτηρίζεται συχνά ως επίπονη και χρονοβόρα τεχνική, με δυσκολία στην αυτοματοποίηση ενώ πολλές φορές παρουσιάζει ορισμένα πρακτικά προβλήματα όπως τον σχηματισμό σταθερών γαλακτωμάτων (Poole 2003) και την δυσκολία εκχύλισης των πολικών και ιοντικών ενώσεων από το νερό (Kataoka 2003). Επιπλέον απαιτείται η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων διαλυτών υψηλής καθαρότητας που έχουν υψηλό οικονομικό κόστος και συχνά είναι τοξικές ενώσεις για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (Biziuk, Przyjazny et al. 1996). Το τελικό “χτύπημα” στη παραδοσιακή μεθοδολογία έγινε με το πρωτόκολλο του Μόντρεαλ, το οποίο έθεσε περιορισμούς στην ευρεία χρήση των χλωριωμένων διαλυτών λόγω της επίδρασής τους στο στρώμα του όζοντος στην ατμόσφαιρα (Smith 2003). Μία απλή μέθοδος που αναπτύχθηκε εναλλακτικά είναι η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση (*Micro Liquid – Liquid Extraction, MLLE*) με βασική αρχή την εκχύλιση από έναν μεγάλο όγκο νερού (400 ml) σε έναν πολύ μικρό όγκο οργανικού διαλύτη (500 μl) και την απευθείας ανάλυση στον χρωματογράφο παραλείποντας το στάδιο της συμπύκνωσης (Balanova 1996).

Ωστόσο, το ενδιαφέρον στρέφεται πλέον προς τις αναλυτικές τεχνικές με περιορισμένη χρήση οργανικών διαλυτών, με εναλλακτικούς μη χλωριωμένους διαλύτες και με δυνατότητα αυτοματοποίησης. Οι νέες αναλυτικές μέθοδοι διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: α) Σε αυτές που εγκλωβίζουν το δείγμα πάνω σε ένα μικρό όγκο ακινητοποιημένου υλικού, όπως η τεχνική εκχύλισης δια της στερεής φάσης (*Solid Phase Extraction – SPE*) (Albanis and Hela 1995; Green and Abraham 2000; Lee, Gan et al. 2002), η τεχνική της μικροεκχύλισης δια της στερεής φάσης (*Solid Phase Microextraction – SPME*) (Lambropoulou, Sakkas et al. 2002; Krutz, Senseman et al. 2003) και η τεχνική εκχύλισης με ανάδευση με ράβδο (*Stir-bar extraction*) (Vercauteren, Peres et al. 2001; Penalver, Garcia et al. 2003) και β) σε αυτές όπου οι αναλυόμενες ενώσεις μεταφέρονται σε μικρότερο όγκο ενός δεύτερου

διαλύτη, όπως η εκχύλιση μέσω μεμβρανών (*Membrane extraction*) (Jönsson and Mathiasson 2003; Liu, J.-B. et al. 2003) και η εκχύλιση δια της σταγόνας (*single drop extraction*) (Lopez-Blanco, Blanco-Cid et al. 2003; Gioti, Skalkos et al. 2005).

3.3.2 Στερεό υπόστρωμα

Η διαδικασία εκχύλισης ενώσεων από στερεά υποστρώματα πραγματοποιείται γενικά, σε πέντε φάσεις (Camel 2001): (α) την εκρόφηση των ενώσεων προς ανάλυση από τα δραστικά μέρη του υποστρώματος, (β) την διάχυση στο υπόστρωμα, (γ) διαλυτοποίηση των ενώσεων στον διαλύτη έκλουσης, (δ) διάχυση των ενώσεων στον διαλύτη έκλουσης και (ε) συλλογή του εκλούσματος. Στις πρακτικές περιβαλλοντικές εφαρμογές, όπως την εκχύλιση ουσιών από τρόφιμα, το πρώτο βήμα είναι συνήθως το καθοριστικό. Η πολύπλοκη φύση των περισσότερων στερεών υποστρωμάτων όπως των ιζημάτων και των τροφίμων είναι ένας από τους παράγοντες που δυσκολεύουν την ανάλυσή τους. Έτσι, παρά το συνεχές ενδιαφέρον για την εκτίμηση της ρύπανσης στερεών υποστρωμάτων, οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την εκχύλιση των οργανικών ρυπαντών παραμένουν πολύπλοκες, χρονοβόρες και με υψηλό κόστος.

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η προκατεργασία των στερεών δειγμάτων, η οποία είναι απαραίτητη τόσο λόγω της μείωσης του χρόνου της ανάλυσης όσο και λόγω του γεγονότος ότι κάθε βήμα της ανάλυσης αποτελεί μια πιθανή πηγή σφάλματος που προστίθεται στο συνολικό σφάλμα της μεθόδου. Ειδικά όταν απαιτείται ανάλυση σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, η φάση της προκατεργασίας του δείγματος είναι ίσως η πιο κρίσιμη. Ο προσδιορισμός ιχνών διαφόρων ρυπαντών από πολύπλοκα υποστρώματα όπως τα τρόφιμα απαιτεί συνήθως εκτεταμένες και χρονοβόρες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος, εκχύλισης αλλά και καθαρισμού (*clean-up*). Τα δείγματα τροφίμων καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος φυσικών ειδών από ξερές σκόνες έως βιολογικά υποστρώματα όπως κρέας, λίπη καθώς και διάφορα είδη υγρών. Το μέγεθος των σωματιδίων αποτελεί μια σημαντική παράμετρο για να υπάρχουν επαναλήψιμα αποτελέσματα αφού μπορεί να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Η αναλυόμενη ένωση εκροφάται από το υπόστρωμα και διαλύεται στον

κατάλληλο διαλύτη. Επομένως, η εκχύλιση της αναλυόμενης ουσίας εξαρτάται από τη διαλυτότητα, τη διεισδυτικότητα του διαλύτη στο δείγμα και την επίδραση του υποστρώματος (Ridgway, Lalljie et al. 2007). Τα στερεά δείγματα υπόκεινται πρώτα σε τεμαχισμό και ομογενοποίηση άμεσα ή μετά από ξήρανση και στη συνέχεια ακολουθεί η υδατική εκχύλιση ή εκχύλιση με κατάλληλο συνήθως οργανικό διαλύτη.

Η αποτελεσματική εκχύλιση στερεών δειγμάτων με υψηλά ποσοστά υγρασίας όπως τα δείγματα ιζημάτων και τροφίμων προϋποθέτει την προηγούμενη ξήρανση. Η συνήθης μέθοδος ξήρανσης είναι η λυοφιλοποίηση. Η λυοφιλοποίηση αποτελεί όμοια τεχνική με την εξάτμιση, πραγματοποιείται όμως σε μειωμένη θερμοκρασία και υπό κενό. Η λυοφιλοποίηση μπορεί επιπλέον να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην περίπτωση όπου οι ενώσεις που αναλύονται έχουν τάση ατμών αρκετά υψηλή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και συνεπώς γίνονται πιθανές απώλειες των ενώσεων υπό φυσιολογικές διαδικασίες εξάτμισης. Η τάση ατμών μιας ένωσης σχετίζεται εκθετικά με την θερμοκρασία με αποτέλεσμα μία μικρή μείωση της θερμοκρασίας να οδηγεί σε μείωση της τάσης ατμών των αναλυόμενων ουσιών αρκετή ώστε οι απώλειες κατά την διάρκεια της εξάτμισης να καθίστανται ασήμαντες. Η τεχνική της λυοφιλοποίησης είναι πιο ήπια από τις άλλες διεργασίες εξάτμισης και γι' αυτό χρησιμοποιείται πολλές φορές για βιολογικά δείγματα που είναι ασταθή, για θερμικά ευαίσθητα φυτοφάρμακα καθώς και για ουσίες όπως οι πρωτεΐνες που μετουσιώνονται εύκολα (Scott 1994). Ωστόσο, η ξήρανση πριν την εκχύλιση δεν είναι πάντα πρακτική λόγω της δομής του δείγματος, όπως για παράδειγμα στο κρέας λόγω της παρουσίας υψηλών ποσοστών λίπους ή λόγω της διάρρηξης των κυττάρων που έχουν ως συνέπεια την κατακράτηση των ενώσεων προς μελέτη. Σε αυτές τις περιπτώσεις αποτελεσματικές είναι οι μέθοδοι που δεν προϋποθέτουν την ξήρανση του δείγματος πριν την εκχύλιση.

Οι συνηθέστερες μέθοδοι εκχύλισης φυτοφαρμάκων από στερεά υποστρώματα όπως είναι τα εδάφη/ιζήματα και τα τρόφιμα είναι: οι υπέρηχοι (*sonication*) (Martinez and Barceló 2001; Gatidou, Kotrikla et al. 2004; Herrera and Luque de Castro 2005), η ανατάραξη (*shake-flask*) (Müller, Duquesne et al. 2000) και η Soxhlet (Albanis, Danis et al. 1995; Camusso, Galassi et al. 2002; Sporring, Bowadt et al. 2005). Τελευταία,

εφαρμόζονται τεχνικές όπως η εκχύλιση στο υπερκρίσιμο σημείο (*supercritical fluid extraction, SFE*) (Dachs, Fernández et al. 1997; Rissato, Galhiane et al. 2004), η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (*Microwave-assisted extraction, MAE*) (Pastor, Vázquez et al. 1997; Hermo, Barron et al. 2005) καθώς και η εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (*pressurized fluid extraction, PFE*) (Dabrowski, Giergielewicz-Mozajska et al. 2002; Barriada-Pereira, Gonzalez-Castro et al. 2007), οι οποίες όμως έχουν μεγαλύτερο οικονομικό κόστος από τις “παραδοσιακές” τεχνικές. Τέλος, η εκχύλιση με τη μέθοδο διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση (*Matrix solid Phase Dispersion – MSPD*) βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές πλέον τόσο σε όλα σχεδόν τα είδη τροφίμων (Valenzuela, Lorenzini et al. 1999; Zou, Liu et al. 2005) όσο και σε εδάφη και ιζήματα (Blanco, Casais et al. 2006; Pena, Casais et al. 2007). Στις παρακάτω ενότητες περιγράφονται αναλυτικά μέθοδοι όπως και η εκχύλιση δια της στερεής φάσης και η εκχύλιση με διασπορά του υποστρώματος σε στερεή φάση, αφού και οι δύο αποτελούν σημαντικότερες και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους εκχύλισης ενώσεων, ενώ ταυτόχρονα η αποτελεσματικότητα αυτών σε υδατικά και στερεά υποστρώματα αποτελεί και το αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης διατριβής.

3.3.3 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (*Solid Phase Extraction – SPE*)

Η εκχύλιση δια της στερεής φάσης είναι τα τελευταία χρόνια η πιο δημοφιλής μέθοδος προκατεργασίας υδατικών αλλά και στερών δειγμάτων που μετά από προκατεργασία φέρονται σε υγρή μορφή για την περαιτέρω εκχύλιση των ενώσεων. Η εκχύλιση πραγματοποιείται είτε σε μικροστήλες (*extraction cartridges*), οι οποίες περιέχουν κατάλληλο προσροφητικό υλικό είτε σε δίσκους εκχύλισης (*extraction disks*), στους οποίους το προσροφητικό υλικό έχει ενσωματωθεί σε πολυμερή μεμβράνη. Η μεθοδολογία εκχύλισης δια της στερεής φάσης περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) προετοιμασία του προσροφητικού υλικού, (β) διήθηση του δείγματος, (γ) έκπλυση - αν είναι δυνατόν - για την απομάκρυνση πιθανών ουσιών που παρεμποδίζουν και (δ) εκρόφηση και ανάκτηση των ενώσεων προς ανάλυση. Αρχικά

το υδατικό δείγμα διέρχεται από το στερεό υλικό της στήλης ή του δίσκου όπου συγκρατούνται οι προς ανάλυση ενώσεις. Στη συνέχεια οι ενώσεις αυτές εκλούν με την βοήθεια μικρής ποσότητας οργανικού διαλύτη. Παρακάτω συνοψίζονται πειραματικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τις ανακτήσεις των ενώσεων πρ ανάλυση κατά την εφαρμογή της τεχνικής εκχύλισης δια της στερεής φάσης (Poo Gunatilleka et al. 2000):

- *Διαλύτης προετοιμασίας προσροφητικού υλικού*

- (α) Διασφαλίζει επαναληπτική κατακράτηση και ροή. Αποτελεί σημαντικό βήμα γ μεμβράνες με προσροφητικό υλικό
- (β) Βοηθά στην ελαχιστοποίηση της επιμόλυνσης του εκλούσματος από ακαθαρσί του προσροφητικού υλικού
- (γ) Αντικαθίσταται από τον διαλύτη του δείγματος πριν τη διήθηση αυτού

- *Ταχύτητα ροής του δείγματος*

- (α) Είναι πιο σημαντική παράμετρος για τις μικροστήλες από ότι για τους δίσκου λόγω της διαφορετικής και ετερογενούς πυκνότητας του πακτωμένου υλικού (δημιουργία καναλιών)
- (β) Αποτελεί κρίσιμο σημείο όταν ο όγκος του δείγματος ξεπερνά τον όγκο διακοπής (*breakthrough volume*)

- *Ιδιότητες δείγματος*

- (α) Αραίωση των ιξωδών δειγμάτων με έναν ασθενή, χαμηλού ιξώδους διαλύτη για την μείωση του χρόνου της διαδικασίας
- (β) Απομάκρυνση της υπερβολικής ποσότητας αιωρούμενων σωματιδίων με διήθηση ή φυγοκέντριση για σταθεροποίηση του ρυθμού ροής του δείγματος
- (γ) Προσθήκη μικρού όγκου οργανικού διαλύτη (1-3%, v/v) για να είναι διαβρεγμένο το προσροφητικό υλικό από διαλύτη και η ροή να είναι σταθερή και γρήγορη. Ιδιαίτερα σημαντικό για υλικά με μεμβράνη.
- (δ) Ρύθμιση του pH για να παραμείνουν στη μοριακή μορφή ασθενή οξέα και βάσεις και να διηθηθούν με υλικά ανάστροφης φάσης

- (ε) Διατήρηση της ιοντικής ισχύος του δείγματος κατά την χρήση συνθηκών ανάστροφης φάσης. Κρίσιμη παράμετρος κατά την εκχύλιση ιονανταλλαγής
- (στ) Απαιτείται αποπρωτονίωση των βιολογικών υγρών για αποδεκτές ανακτήσεις των χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεων κατά την χρωματογραφία ανάστροφης φάσης
- (ζ) Καταβύθιση των ανόργανων οξέων για αποδεκτές ανακτήσεις των οργανικών οξέων από βιολογικά υγρά με εκχύλιση ιονανταλλαγής.

- *Χρόνος ξήρανσης*

- (α) Αρκετός ώστε να επιτυγχάνεται η απομάκρυνση όλης της ποσότητας του διαλύτη του δείγματος που κατακρατήθηκε από τους πόρους του υλικού προσρόφησης
- (β) Η υπερβολική ξήρανση οδηγεί σε απώλειες των ενώσεων λόγω εξάτμισής τους ή σε ασθενή κατακράτηση αυτών σε μη εμποτισμένες με διαλύτη περιοχές

- *Διαλύτης καθαρισμού (προαιρετικό στάδιο)*

- (α) Ένας μικρός όγκος διαλύτη ενδιάμεσης ισχύος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έκλυση των ουσιών του υποστρώματος
- (β) Το στάδιο έκπλυσης εφαρμόζεται κυρίως στα βιολογικά υγρά, τα εκχυλίσματα φυτών και εδάφους αλλά όχι στα επιφανειακά νερά

- *Διαλύτης έκλυσης (2-3 φορές ο κενός όγκος των μικροστηλών)*

- (α) Θα πρέπει να είναι ένας ισχυρός διαλύτης, ικανός να απομονώσει όλες τις προς ανάλυση ενώσεις από το προσροφητικό υλικό σε μικρό όγκο αυτού.
- (β) Θα πρέπει κανονικά να είναι πτητικός και αναμίξιμος με τον διαλύτη του δείγματος

Η προσρόφηση και η κατανομή είναι οι δύο μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η τεχνική της SPE. Τα συνηθέστερα προσροφητικά είναι ο ενεργός άνθρακας και τα πορώδη πολυμερή. Η κατανομή της προς ανάλυση ένωσης μεταξύ της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού και του νερού είναι ο δεύτερος μηχανισμός στον οποίο βασίζεται η τεχνική SPE. Η εκχύλιση είναι αποτέλεσμα των ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων των ιοντικών δυνάμεων που συγκρατούν τις διαλυμένες ουσίες στο νερό και των δυνάμεων διάχυσης που προκαλούν την μεταφορά των ενώσεων από το υδατικό μέσο στα προσδεμένα οργανικά μόρια που

βρίσκονται στην προσροφητική επιφάνεια. Η κατακράτηση των ενώσεων επιτυγχάνεται με ισχυρές αλλά αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων προς ανάλυση και της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού. Τυπικά είδη αυτών είναι οι υδρόφοβες δυνάμεις (δεσμοί *van der Waals*), οι πολικές (δεσμοί υδρογόνου) και οι δυνάμεις διπόλου-διπόλου) και οι επιδράσεις ιονανταλλαγής. Στον Πίνακα 3.1 φαίνεται η ενέργεια των δεσμών αυτών. Πριν από την επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού θα πρέπει να μελετηθεί η φυσικοχημεία του συστήματος όπως οι λειτουργικές ομάδες των προς ανάλυση ενώσεων, η φύση του προσροφητικού υλικού, οι ενέργειες των δεσμών που δημιουργούνται, οι δευτερεύουσες επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις του προσροφητικού υλικού καθώς και των ενώσεων προς ανάλυση με τα άλλα συστατικά του υποστρώματος (Masque, Marce et al. 1998).

Πίνακας 3.1

Η ενέργεια των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων κατά την διαδικασία εκχύλισης δια της στερεής φάσης (Hennion 1999)

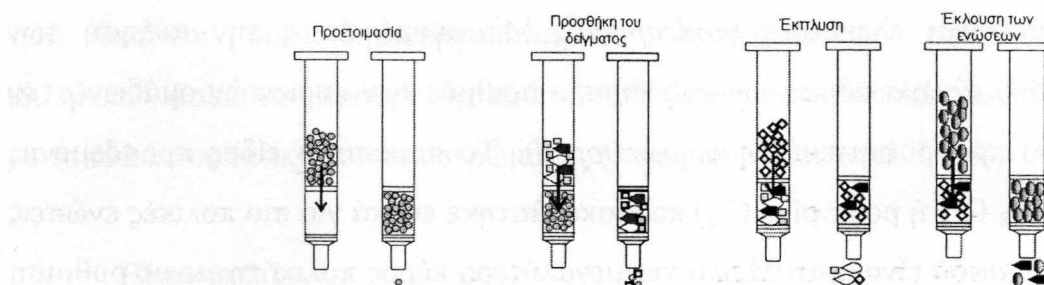
Είδος επίδρασης	Ενέργεια (Kcal/mol)
Δυνάμεις διασποράς	1-5
Διπόλου-διπόλου	2-7
Διπόλου-επαγόμενου διπόλου	5-10
Δεσμός υδρογόνου	5-10
Ιοντικός δεσμός	50-200
Ομοιοπολικός δεσμός	100-1000

Η τροποποιημένη σίλικα με C18 υλικό προσρόφησης ανάστροφης φάσης είναι το πιο δημοφιλές προσροφητικό υλικό λόγω της χωρητικότητάς του σε σχέση με άλλα υλικά δεσμευμένης σίλικας όπως τα C₈ και CN (Ferrer and Barcelo 1999). Χρησιμοποιείται κυρίως για την απομάκρυνση των υδρόφοβων ενώσεων από τα υδατικά δείγματα (Fernández-Alba, Aguera et al. 1998). Ιδιαίτερα χρησιμοποιούνται και τα πολυμερή προσροφητικά υλικά όπως ο γραφίτης άνθρακας (*graphitised*

carbon black, GCB) (Slobodnik, Oztezkizan et al. 1996) και το συμπολυμερές styrene-divinylbenzene (SDB) (Ferrer, Barcelo et al. 1999). Ο μηχανισμός κατακράτησης στηρίζεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ουσιών και των ανθρακούχων αλκυλομάδων της αλυσίδας. Ο συντελεστής κατακράτησης των ενώσεων εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερού (K_{ow}) αυτών. Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση της προσδεμένης σίλικας C_{18} είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό σε ίχνη ενώσεων που χαρακτηρίζονται από τιμές $\log K_{ow} > 2$ (Pichon 2000). Η σίλικα C_{18} μπορεί να βρίσκεται σε μορφή όπου οι πυριτικές ομάδες στην επιφάνεια δεν είναι ελεύθερες (*endcapped*). Με σκοπό όμως την αύξηση των δευτερευουσών αλληλεπιδράσεων αυξήθηκε ο αριθμός των πυριτικών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού (*non endcapped*). Το παραπάνω είδος προσδεμένης σίλικας C_{18} (C_{18} -OH ή polar plus C_{18}) κατασκευάστηκε ειδικά για πιο πολικές ενώσεις προς ανάλυση, αφού είναι κατάλληλο για μεγαλύτερο εύρος πολικότητας με ρύθμιση του pH, λόγω των δεσμών υδρογόνου και των ιοντικών επιδράσεων (Pichon 2000). Μια καινούρια προσέγγιση στην τεχνική SPE είναι η εκχύλιση με προσροφητικά υλικά που βασίζονται στην ανοσοσυγγένεια (*immunoaffinity*) με χρήση των αλληλεπιδράσεων αναλυόμενων ουσιών – αντιγόνου (*antibody*) (Liska 2000).

Τα φυτοφάρμακα εκροφώνται από τα προσροφητικά υλικά με μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ή μίγματος διαλυτών εξαρτάται από τη φύση του διαλύτη και της ένωσης που εκροφάται. Όταν η τεχνική της SPE εφαρμόζεται σε φυσικά νερά υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να συνεκχυλιστούν μαζί με τις ενώσεις προς ανάλυση και άλλες ουσίες που δρουν παρεμποδιστικά. Επομένως, αρκετές φορές είναι απαραίτητο ένα στάδιο εκπλύσεων του προσροφητικού υλικού με λίγο απεσταγμένο νερό ή νερό που να περιέχει μικρή ποσότητα κατάλληλου οργανικού διαλύτη ή κάποια επιφανειοδραστική ουσία, ώστε να απομακρυνθούν ενώσεις που παρεμβάλλονται στην ανάλυση με χρωματογραφία, όπως για παράδειγμα τα χουμικά και φουλβικά οξέα. Ωστόσο, το στάδιο της έκπλυσης ενέχει τον κίνδυνο για απώλειες των πιο ασθενώς συγκρατούμενων ενώσεων όπως οι πολικές ενώσεις (Pichon 2000).

Οι μικροστήλες εκχύλισης έχουν εισάγει δύο σημαντικά χαρακτηριστικά, τη τυποποίηση και κατά συνέπεια την μεγαλύτερη επαναληψιμότητα καθώς και 1 μεγαλύτερο πλήθος προσροφητικών υλικών με κυριότερα τα υλικά ανάστροφης φάσης (*reversed-phase*) και ιονανταλλαγής (*ion-exchange*) τα οποία είναι απαραίτητα για την επεξεργασία των υδατικών δειγμάτων καθώς και αρκετούς άλλους μηχανισμούς συγκράτησης των αναλυόμενων ουσιών. Στο Σχήμα 3.1 φαίνεται διαδικασία εκχύλισης δια της στερεής φάσης με μικροστήλες.



Σχήμα 3.1. Διαδικασία εκχύλισης δια της στερεής φάσης με μικροστήλες (*cartridges*) (Bulletin 910, Supelco, Sigma-Aldrich Co., 1998)

Η εκχύλιση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί σε δίσκους (*disks*) οι οποίοι επιτρέπουν την εκχύλιση από αρκετά μεγαλύτερο όγκο δείγματος και σε λιγότερο χρόνο (Fritz and Masso 2001). Ωστόσο, οι δίσκοι εκχύλισης απαιτούν την μεγαλύτερη κατανάλωση διαλυτών όπως επίσης έχουν περίπου 4 φορές υψηλότερο κόστος από ότι οι μικροστήλες εκχύλισης (Balinova 1996).

Η τεχνική της εκχύλισης δια της στερεής φάσης έχει τα εξής πλεονεκτήματα έναντι των υγρών – υγρών διεργασιών (Kataoka 2003): (α) υψηλότερες ανακτήσεις, (β) αποτελεσματικότερη προσυγκέντρωση, (γ) περιορισμένη χρήση οργανικού διαλύτη, (δ) όχι προβλήματα σχηματισμού γαλακτωμάτων ή φυσαλίδων, (ε) συντομότερο χρόνος προετοιμασίας του δείγματος, (στ) ευκολία χειρισμού και (ζ) ευκολότερη προσαρμογή σε αυτοματοποιημένη διαδικασία.

3.3.4 Μέθοδος διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση (*Matrix Solid Phase Dispersion – MSPD*)

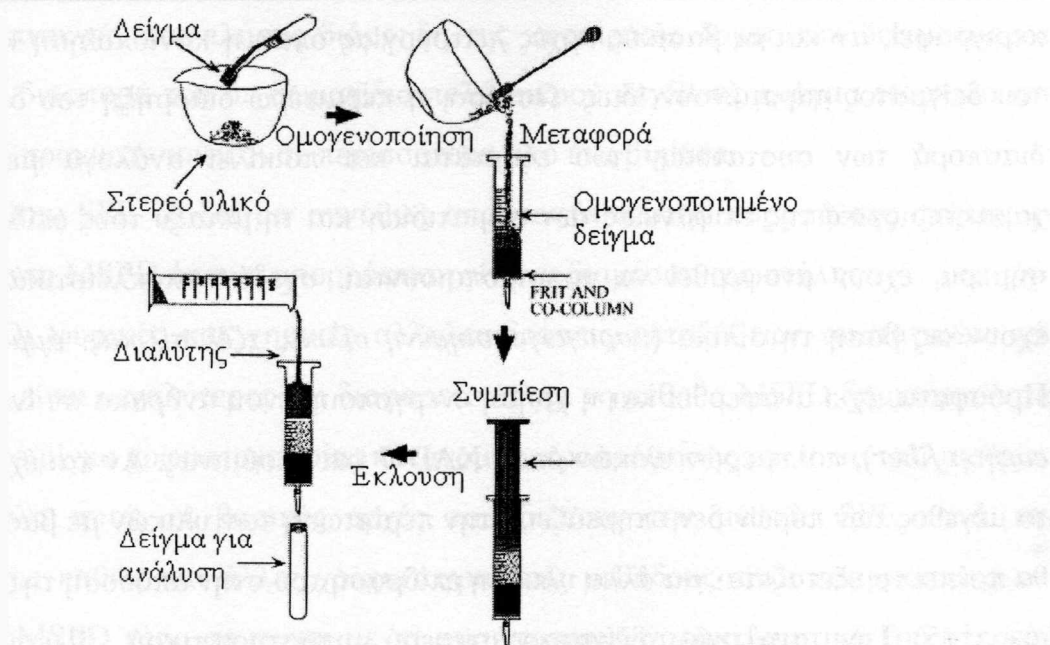
Οι αυξημένες απαιτήσεις για τον έλεγχο της παρουσίας υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεθόδων οικονομικότερων και πιο σύντομων χρονικά ώστε να μπορούν να εφαρμοστούν σε ελέγχους ρουτίνας μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Η μέθοδος της διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση, MSPD, εισήχθη το 1989 (Barker, Long et al. 1989) ως μέθοδος εκχύλισης των ενώσεων από στερεά και ημι-στερεά υποστρώματα και από τότε βρήκε μεγάλη αποδοχή λόγω της λειτουργικότητας και αποτελεσματικότητάς της σε ένα μεγάλο εύρος δειγμάτων. Βασίζεται σε απλές βασικές αρχές της φυσικής και χημείας εμπεριέχοντας τόσο τις δυνάμεις που εφαρμόζονται στο δείγμα με τη μηχανική ανάμιξη, ώστε να επιτευχθεί πλήρης διάρρηξη των κυττάρων του, όσο και τις αλληλεπιδράσεις του υποστρώματος του δείγματος με ένα στερεό προσδεμένης φάσης υποστηρικτικό υλικό (*solid support bonded-phase*) ή την χημεία επιφανειών άλλων στερεών υλικών.

Κατά την αρχική εφαρμογή της μεθόδου, η ανάμιξη ενός προσδεμένης-φάσης στερεού υποστηρικτικού υλικού (*οκταδέκυλσίλ-παραγωγοποιημένη σίλικα, C₁₈*) με βιολογικά δείγματα αποδείχθηκε ότι λειτουργεί ταυτόχρονα ως μέσο διάρρηξης της κυτταρικής δομής του δείγματος λόγω των παραγόμενων δυνάμεων συνάφειας και τριβής και ως «προσδεμένος διαλύτης» για τα συστατικά του δείγματος οδηγώντας τελικά στην πλήρη διάρρηξη και διασπορά του δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο το δείγμα διασπείρεται πάνω και μέσα στο υποστηρικτικό υλικό προσδεμένης φάσης, παράγοντας μέσω των υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων των διάφορων συστατικών, μία ιδιαίτερη μικτού-χαρακτήρα φάση για την απομόνωση των αναλυόμενων ουσιών (Barker, Long et al. 1989).

Η τεχνική εκχύλισης, MSPD, βρήκε τόσο ευρεία αποδοχή λόγω της υπεροχής της έναντι της πολυπλοκότητας των διαφόρων κλασικών μεθόδων εκχύλισης στερεών και ημι-στερεών δειγμάτων και ιδιαιτέρως των πολυσύνθετων βιολογικών δειγμάτων. Πράγματι, όλες οι κλασικές μορφές υγρής χρωματογραφίας προϋποθέτουν την

προηγούμενη μετατροπή τόσο του δείγματος όσο και των συστατικών του σε ρευστή, ελεύθερη σωματιδίων, και σχετικά ομογενή υγρή φάση. Τέτοιον είδη δείγματα μπορεί να προέρχονται από ζωικούς ιστούς ή φυτικό υλικό και συνήθως αποτελούνται από ανομοιογενείς περιοχές λίπους ή/και άλλα είδη ιστών, όπως στην περίπτωση των φυτών. Έτσι, συνήθως η κλασική προσέγγιση προκατεργαζόμενων δειγμάτων περιλαμβάνει πολλά, χρονοβόρα στάδια και συνδυασμούς μεθόδων όπως τεμαχισμό, άλεσμα, πολτοποίηση και εφαρμογή πίεσης για να διαρρηχθεί κυτταρική δομή, ενώ χρησιμοποιούνται διάφορα πρόσθετα υλικά όπως ρυθμιστικά διαλύματα, άλατα κ.α. για καλύτερα αποτελέσματα. Τέλος, στο σημείο αυτό πιθανότατα το δείγμα να απαιτεί διήθηση, φυγοκέντρηση ή κάποιον άλλο τρόπο απομάκρυνσης ανεπιθύμητων στερεών σωματιδίων πριν την εισαγωγή στη στερεής φάσης (SPE) ενώ συχνά παρουσιάζονται προβλήματα δημιουργίας γαλακτωμάτων. Η μέθοδος εκχύλισης, MSPD, παρακάμπτει όλα τα παραπάνω στάδια της κλασικής προσέγγισης συνδυάζοντάς τα σε ένα, ενώ ταυτόχρονα παρασκευάζει μια “μοναδικών ιδιοτήτων” στερεάς φάσης στήλη εκχύλισης/κλασματοποίησης των αναλυόμενων ουσιών.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, ένα δείγμα τοποθετείται σε γυάλινο πορσελάνινο γουδί μαζί με την κατάλληλη ποσότητα προσδεμένης φάσης ή άλλου υποστηρικτικού υλικού (π.χ. C_{18}). Το στερεό υλικό και το δείγμα αναμιγνύονται με χρήση ενός γουδοχειριού για περίπου 30 δευτερόλεπτα. Πριν από αυτό το στάδιο μπορεί να γίνει και εμβολιασμός του με γνωστή ποσότητα των προτύπων ουσιών του εσωτερικού προτύπου. Το μίκτο ομογενοποιημένο υλικό μεταφέρεται και συνεχώς πακτώνεται σε στήλη κατάλληλη για την περαιτέρω εκχύλιση με διαλύτη. Μπορεί επιπλέον να ενσωματωθεί στο κάτω μέρος της στήλης κάποιο άλλο στερεό υποστηρικτικό υλικό για την καλύτερη απόδοση εκχύλισης των ουσιών ή το ταυτόχρονο καθαρισμό του δείγματος (Σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2. Τα κυριότερα στάδια μιας τυπικής διαδικασίας εκχύλισης με τη μέθοδο της διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD)

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου περιλαμβάνουν:

(1) Τη μέση διάμετρο του μεγέθους των σωματιδίων. Όπως είναι αναμενόμενο, πολύ μικρά μεγέθη σωματιδίων ($3-10\ \mu\text{m}$) οδηγούν σε εκτεταμένους χρόνους έκλουσης και δημιουργούν την ανάγκη εφαρμογής επιπρόσθετης πίεσης ή κενού για να επιτευχθεί αποτελεσματική ροή. Συνήθως μεγέθη σωματιδίων $40\ \mu\text{m}$ με $100\ \mu\text{m}$ αποδίδουν αρκετά καλά.

(2) Υλικά με ελεύθερες (*non-encapped*) ή όχι (*encapped*) πυριτικές ομάδες στην επιφάνειά τους ή υλικά με ένα ποσοστό οργανικού άνθρακα 8-18%.

(3) Το χαρακτήρα της προσδεμένης φάσης. Ανάλογα με την πολικότητα της οποίας μπορεί να παρατηρηθεί σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα.

(4) Τη χρήση μη-παραγωγοποιημένης σίλικας ή άλλων υποστηρικτικών υλικών. Τα υλικά όπως η άμμος μπορεί να είναι το ίδιο αποδοτικά ανάλογα με την περίπτωση. Λειτουργούν όμως με διαφορετικό τρόπο από αυτόν που έχει ήδη

περιγραφεί, αν και οι βασικές αρχές λειτουργίας όπως η κονιοποίηση και διάρρηξη του δείγματος παραμένουν ίδιες. Ωστόσο, η περαιτέρω διάρρηξη του δείγματος και διασπορά των συστατικών του εξαρτάται και ποικίλει ανάλογα με τα χημικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας των σωματιδίων και τη μεταξύ τους επίδραση. Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί να χρησιμοποιούνται, σχεδόν αποκλειστικά, υλικά που έχουν ως βάση τη σίλικα (*παραγωγοποιημένη σίλικα, τζέλ σίλικας, άμμος, Florisil*). Πρόσφατα, έχει αναφερθεί και η χρήση ενεργοποιημένου άνθρακα σε ίνες (*activated carbon fiber*), πολυμερών υλικών όπως XAD-7 και αλούμινας. Αν και έχει βρεθεί ότι το μέγεθος των πόρων δεν επηρεάζει, στην περίπτωση των υλικών με βάση τη σίλικα, θα πρέπει να εξετάζεται για άλλα υλικά η επίδρασή του στην απόδοση της εκχύλισης.

(5) Την αναλογία δείγματος/στερεού υποστηρικτικού υλικού. Συνήθως χρησιμοποιείται η αναλογία 1:4.

(6) Τη χημική μετατροπή του υποστρώματος ή του στερεού υλικού με την προσθήκη οξέων, βάσεων, συμπλοκοποιητών και άλλων ουσιών.

(7) Τη βέλτιστη επιλογή διαλυτών έκλουσης καθώς και τη σειρά εφαρμογής τους. Η προετοιμασία των υποστηρικτικών υλικών με τους διαλύτες έκλουσης μπορεί να αυξήσει την ανάκτηση των αναλυόμενων ουσιών καθώς επίσης να διευκολύνει και να επιταχύνει τη διαδικασία της πολτοποίησης και διασποράς του δείγματος, διότι εξομαλύνονται οι πιθανές διαφορές στην επιφανειακή τάση μεταξύ του υποστρώματος και του στερεού υλικού.

(8) Τον όγκο έκλουσης. Ο μινιμαλισμός στην τεχνική MSPD με τη χρήση μικρότερης ποσότητας δείγματος και κατά αναλογία μικρότερου όγκου διαλυτών έκλουσης, καθώς και η δυνατότητα για on-line χρήση μεθόδων υγρής χρωματογραφίας, μπορεί να επιτρέψουν τη συνολική μείωση στη χρήση διαλυτών και τον αυτοματισμό.

(9) Την επίδραση του τύπου του υποστρώματος.

Η μέθοδος MSPD διαφέρει τόσο φυσικά όσο και λειτουργικά με τη μέθοδο SPE στα παρακάτω σημεία (Barker 2007):

(1) επιτυγχάνεται πλήρης διάρρηξη της κυτταρικής δομής του δείγματος και ταυτόχρονη διασπορά του σε σωματίδια πολύ μικρού μεγέθους πράγμα το οποίο στη μέθοδο SPE πραγματοποιείται σε περισσότερα από ένα βήματα.

(2) Στην SPE το δείγμα συνήθως απορροφάται στην κορυφή της στήλης εν αντιθέσει με τη MSPD όπου η απορρόφηση γίνεται διαμέσου της στήλης.

(3) Οι φυσικές και χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών του συστήματος είναι μεγαλύτερες και διαφορετικές για τη μέθοδο MSPD δημιουργώντας ένα μοναδικό μίγμα χρωματογραφίας κατανομής, προσρόφησης και ιονανταλλαγής.

Παρόλα αυτά, οι βασικές αρχές που διέπουν την μέθοδο SPE κατά την εφαρμογή της καθώς και άλλες χρωματογραφικές μεθόδους είναι εφαρμόσιμες και στη μέθοδο MSPD τόσο σε σχέση με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του στερεού υλικού και των συστατικών του δείγματος όσο και με τη μοναδικών ιδιοτήτων στήλη που προκύπτει.

Η τεχνική εκχύλισης με τη μέθοδο διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση αποτελεί λοιπόν μία εναλλακτική προσέγγιση κατά την οποία το μέγεθος του δείγματος που απαιτείται είναι ελάχιστο, επιτυγχάνεται μείωση στις ποσότητες των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και προσροφητικών μέσων και επιπλέον καθίσταται εφικτή μια καλή χρονική προσέγγιση της μεθόδου για αναλύσεις ρουτίνας.

3.4 Καθαρισμός

Λόγω της πολυπλοκότητας της φύσης των ιζημάτων και τροφίμων, στα εκχυλίσματά τους μπορεί να υπάρχει ένα πλήθος από άλλες ενώσεις που παρεμποδίζουν κατά την ανάλυση. Επομένως, το στάδιο του καθαρισμού πολλές φορές δεν μπορεί να παραλειφθεί. Ακόμη και κατά την εφαρμογή της τεχνικής MSPD μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να είναι απαραίτητος ο περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος. Συνήθως βασίζεται στην τεχνική της εκχύλισης δια της στερεής φάσης ή σε υγρή-στερεή χρωματογραφία στήλης με διάφορα είδη προσροφητικών υλικών. Τα συνηθέστερα από αυτά είναι η C_{18} , NH_2 ή CN τροποποιημένη σίλικα, το Florisil, η αλούμινα και διάφορα είδη άνθρακα (Petrovic, Eljarrat et al. 2001). Στην περίπτωση

της μεθόδου MSPD ο καθαρισμός γίνεται είτε με την κλασσική προσέγγιση της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης είτε με τη χρήση ενός ακόμη υλικού στερεάς φάσης που μπορεί να πακτωθεί στο κάτω μέρος της στήλης MSPD (*co-column*) ή συνδέεται αυτόματα με τη στήλη MSPD. Το τελευταίο στάδιο της ανάλυσης περιλαμβάνει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων κατά τον ίδιο τρόπο με την περίπτωση των υδατικών δειγμάτων.

3.5 Χρωματογραφικός προσδιορισμός

Μετά την απομόνωση των οργανικών ενώσεων από το υπόστρωμα ακολουθεί η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυόμενων ουσιών σε συστήματα χρωματογραφίας. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων επιτυγχάνεται συνήθως με τεχνικές αέριας κι υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών.

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές αέριας χρωματογραφίας είναι ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (*electron capture detector, ECD*), οι θερμιονικοί ανιχνευτές φλόγας και αζώτου-φωσφόρου (*flame thermionic detector, FTD* και *nitrogen-phosphorus detector, NPD*), ο φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής (*flame photometric detector, FPD*), οι ανιχνευτές ατομικής εκπομπής (*atomic emission detector, AED*) καθώς και ο ανιχνευτής ηλεκτρολυτικής αγωγιμότητας (*electrolytic conductivity*). Η χρήση συζευγμένης χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (*mass spectrometry, MS*) με την μέθοδο χημικού ιονισμού (*chemical ionization, CI*) ή ιονισμού ηλεκτρονίων (*electron ionization, EI*) αποτελεί μια ακόμη σημαντική αναλυτική τεχνική που είναι απαραίτητη για τις περιβαλλοντικές αναλύσεις. Ο προσδιορισμός γίνεται με τριχοειδείς στήλες (*capillary columns*), οι οποίες αντικατέστησαν τις πακεταρισμένες (*packed columns*) καθώς εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία και ικανότητα διαχωρισμού.

Οι τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται κυρίως για τον άμεσο προσδιορισμό των χαμηλής πτητικότητας και θερμικά ασταθών φυτοφαρμάκων, τα οποία απαιτούν παραγωγοποίηση προκειμένου να προσδιοριστούν με αέρια

χρωματογραφία. Οι κατηγορία των φαινυλουριών αποτελεί παράδειγμα τέτοιων ενώσεων. Η ανάλυση των φυτοφαρμάκων linuron και diuron για παράδειγμα με αέρια χρωματογραφία οδηγεί σε θερμική διάσπαση αυτών και συχνά ανεξέλεγκτη δημιουργία ισοκυανικών ενώσεων και ανιλινών (De Kok, Vos et al. 1984). Το σημαντικότερο πρόβλημα στην υγρή χρωματογραφία ήταν η κατασκευή ανιχνευτή με καλή ευαισθησία και γραμμικότητα. Οι κυριότεροι ανιχνευτές περιλαμβάνουν τον ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (*UV-Vis*) σε ένα ή πολλαπλά μήκη κύματος, τον ανιχνευτή ηλεκτρικής αγωγιμότητας, τον ανιχνευτή φθορισμού και τον ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Ο ανιχνευτής υπεριώδους διόδων σε συστοιχία (*UV-diode array detector*, *UV-DAD*) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενος σε αναλύσεις ρουτίνας. Οι στήλες που κυρίως χρησιμοποιούνται είναι ανεστραμμένης φάσης (π.χ. C_{18} ή C_8 κύανο, άμινο)

Η πιο πρόσφατα εξελιγμένη τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων είναι ο συνδυασμός των τεχνικών υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών (*liquid chromatography/mass spectrometry- LC/MS*). Η τεχνική συνδυάζει την εγκυρότητα της ταυτοποίησης των υπολειμμάτων που προσδίδει η φασματοσκοπία μάζας και την ευελιξία του διαχωρισμού πλήθους ενώσεων που παρέχει η υγρή χρωματογραφία.

3.6 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας

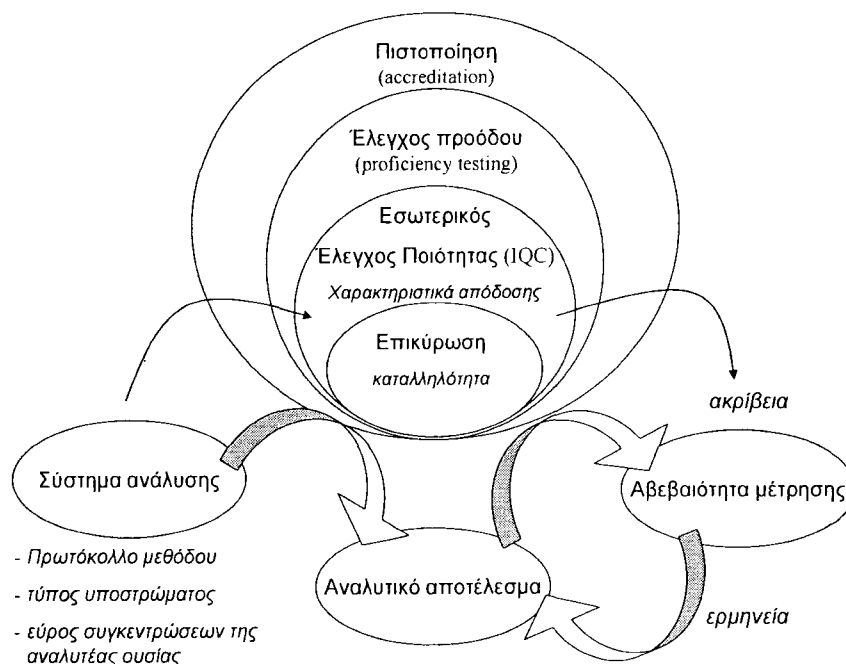
Το αποτέλεσμα μετά την εφαρμογή μια αναλυτικής μεθοδολογίας συχνά αποτελεί πληροφορία που χρησιμοποιείται για τη λήψη σημαντικών αποφάσεων. Η ανάγκη λοιπόν, για αξιόπιστα και συγκρίσιμα αποτελέσματα είναι επιτακτική. Τα περισσότερα Ευρωπαϊκά και Διεθνή θεσμικά όργανα, υπεύθυνα για την έκδοση οδηγιών καθώς και τα ρυθμιστικά σωματεία, ILAC (*International Laboratory Accreditation Cooperation*), CITAC (*Cooperation on international traceability in analytical chemistry*), EURACHEM (*a focus on analytical chemistry in Europe*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), ISO (*International Standardization Organization*), FAO/WHO: Codex/CCMAS (*Food and Agricultural*

Organization/World Health Organization: Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, EAL (European Cooperation for Accreditation), που ασχολούνται με την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων, εδώ και κάποια χρόνια, συμφωνούν στη επιτακτική ανάγκη τα εργαστήρια χημείας να συμμορφωθούν στα παρακάτω:

- Την αναθεώρηση του στόχου των δοκιμών που γίνονται σε σχέση με τη επικύρωση των μεθόδων, τη συνεισφορά στην αβεβαιότητα των μεθόδων και την ιχνηλασιμότητα των προτύπων ουσιών που χρησιμοποιούν.
- Τον υπολογισμό των αβεβαιοτήτων που προκύπτουν από μια αναλυτική διαδικασία.
- Την εκτίμηση των διαφόρων επιδράσεων στα τελικά αποτελέσματα.
- Την παρουσίαση βελτιωμένων στοιχείων σε σχέση με την ανάπτυξη μιας μεθόδου, τον εξοπλισμό και τα υλικά αναφοράς.

Τα διάφορα επίπεδα του Σχήματος 3.3 αντιπροσωπεύουν τα μέτρα που πρέπει να λάβει ένα εργαστήριο ώστε να διασφαλίσει ότι είναι ικανό και αρμόδιο να διεξάγει αναλυτικές μετρήσεις και να παρέχει αναλυτικά δεδομένα που ανταποκρίνονται στη απαιτούμενη ποιότητα. Οι «απαιτήσεις» μιας αναλυτικής μεθόδου και η «απαιτούμενη ποιότητα» ενός αναλυτικού αποτελέσματος αναφέρονται στην καταλληλότητα (*fitness-for-purpose*) της μεθόδου (Thompson and Wood 1995; Thompson, Ellison et al. 2002).

Έτσι, η ιχνηλασιμότητα σε συνδυασμό με το βαθμό αξιοπιστίας θα πρέπει να αποτελούν παραμέτρους που ορίζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων και έτσι θα πρέπει αυτά να παρουσιάζονται (Papadakis 2003). Η εκτίμηση της *αβεβαιότητας* μιας μεθόδου αποτελεί επομένως πολύ σημαντικό πεδίο ενδιαφέροντος για τον τομέα της χημείας που αφορά μετρήσεις (*measurement chemistry*).



Σχήμα 3.3. Διάφορα επίπεδα μετρήσεων για τη διασφάλιση ποιότητας (*Quality Assurance, QA*) των εργαστηρίων αναλυτικής χημείας και χημείας τροφίμων (Taverniers, De Loose et al. 2004)

3.6.1 Γενικά περί αβεβαιότητας

Η EURACHEM (Fleming, Albus et al. 1996; Ellison, Rosslein et al. 2000) ακολουθώντας τον πρωτότυπο ορισμό του Οδηγού Έκφρασης της Αβεβαιότητας στη Μέτρηση (*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, GUM*) ορίζει την αβεβαιότητα ως: «μια παράμετρο που συσχετίζεται άμεσα με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης, η οποία χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που λογικά μπορούν να αποδοθούν στο είδος προς μέτρηση». Παρά το γεγονός ότι η λέξη *αβεβαιότητα* παραπέμπει στο γενικότερο όρο *αμφιβολία*, ο όρος *αβεβαιότητα μέτρησης* κάθε άλλο παρά *αμφιβολία* εκφράζει. Αντιθέτως, η γνώση της αβεβαιότητας, σε αυτήν την περίπτωση, υποδηλώνει αυξημένη εμπιστοσύνη για την εγκυρότητα ενός μετρούμενου αποτελέσματος.

Είναι σημαντική η διάκριση μεταξύ του *σφάλματος* και της *αβεβαιότητας*. Το σφάλμα ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ ενός μεμονωμένου αποτελέσματος και της πραγματικής τιμής του είδους προς μέτρηση. Έτσι, το σφάλμα είναι μία απλή

αριθμητική τιμή και μπορεί να εφαρμοσθεί για τη διόρθωση ενός αποτελέσματος. Από την άλλη πλευρά, η αβεβαιότητα παίρνει τη μορφή εύρους και γενικά δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διόρθωση ενός μετρούμενου αποτελέσματος. Για παράδειγμα το αποτέλεσμα μιας ανάλυσης μπορεί να εμφανίζει ένα αμελητέο σφάλμα ως προς την πραγματική τιμή του μετρούμενου είδους, ωστόσο η αβεβαιότητα του αποτελέσματος να παραμένει μεγάλη.

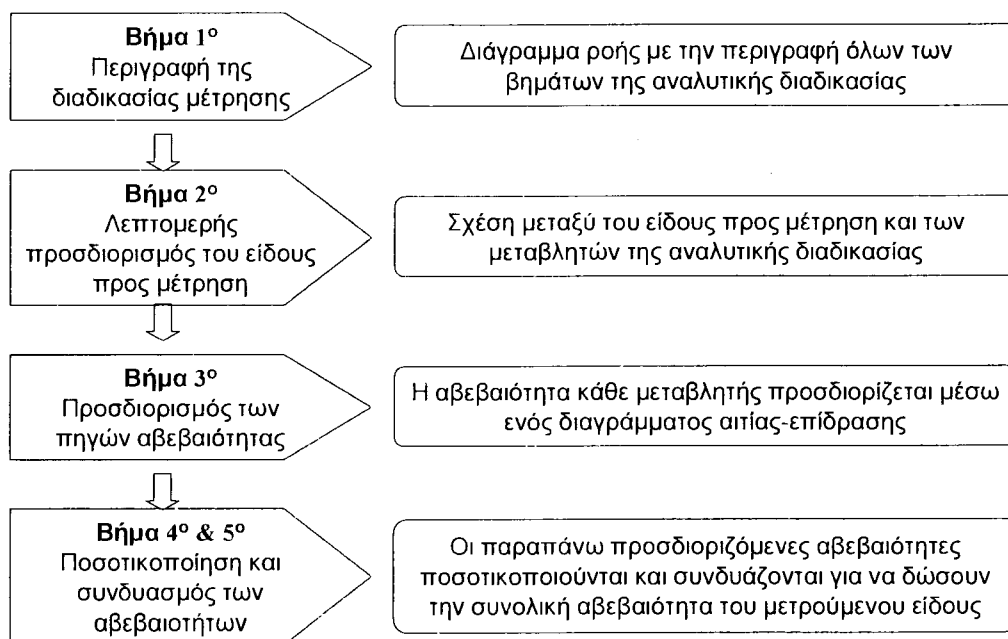
Η απόκλιση ενός μετρούμενου αποτελέσματος από την πραγματική τιμή αποδίδεται σε έναν αριθμό συστηματικών και τυχαίων σφαλμάτων. Κάθε συστατικό σφάλματος προσθέτει τη δική του αβεβαιότητα στον προϋπολογισμό της αβεβαιότητας μιας αναλυτικής διαδικασίας. Αυτά τα διάφορα συστατικά σφαλμάτων αναφέρονται και ως «πηγές της αβεβαιότητας». Πρακτικά, οι πηγές αβεβαιότητας ενός αποτελέσματος μπορεί να είναι διάφορες, όπως η δειγματοληψία, η επίδραση του υποστρώματος και οι παρεμποδίσεις, διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η αβεβαιότητα σε σχέση με τη μάζα ή τον όγκο του εξοπλισμού, προσεγγίσεις και υποθέσεις ενσωματωμένες στη μεθοδολογία μέτρησης καθώς και κάθε είδους τυχαία διακύμανση. Στην εκτίμηση, λοιπόν, της συνολικής αβεβαιότητας είναι απαραίτητο να ληφθεί η αβεβαιότητα κάθε πηγής ξεχωριστά και να συνυπολογισθεί η συνεισφορά κάθε συστατικού σε αυτήν. Ουσιαστικά, η αβεβαιότητα αποτελεί περισσότερο μια έννοια, η ερμηνεία της οποίας μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες μέτρησης και το σημείο αναφοράς στο οποίο ένα αποτέλεσμα είναι ιχνηλάσιμο.

Η αβεβαιότητα του αποτελέσματος μιας σειράς μετρήσεων, π.χ. μια συγκέντρωση, x , μπορεί να εκφραστεί στη μορφή της τυπικής απόκλισης (*standard deviation*) οπότε ονομάζεται *τυπική αβεβαιότητα* (*standard uncertainty*) και συμβολίζεται ως $u(x)$. Η *συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα* (*combined standard uncertainty*), $u_c(x)$, είναι μια εκτιμώμενη τυπική απόκλιση ίση με τη θετική τετραγωνική ρίζα της συνολικής διακύμανσης που προκύπτει από το συνδυασμό όλων των συστατικών αβεβαιότητας. Η *εκτεταμένη αβεβαιότητα* (*expanded uncertainty*), $U(x)$, ορίζει ένα διάστημα γύρω από το αποτέλεσμα μιας μέτρησης $x + U(x)$ με $U(x) = k u(x)$. Ο παράγοντας k ονομάζεται παράγοντας κάλυψης και η επιλογή του βασίζεται

στο επιθυμητό επίπεδο εμπιστοσύνης. Για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, που σημαίνει ότι η πιθανότητα να περικλείεται η μέση τιμή στην επεκτεινόμενη αβεβαιότητα είναι περίπου 95%, ο παράγοντας k έχει την τιμή 2.

3.6.2 Εκτιμώντας την αβεβαιότητα

Η γενική διαδικασία προσέγγισης της αβεβαιότητας μιας μέτρησης (*measurement uncertainty*) φαίνεται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Σχήμα 3.4).



Σχήμα 3.4. Γενική προσέγγιση της αβεβαιότητας μέτρησης (Spack 2002)

Ο προσδιορισμός της αβεβαιότητας για τους αναλυτικούς χημικούς αποτελεί πρόβλημα λόγω της ιδιαίτερης φύσης του τομέα τους και δυστυχώς επικρατεί μεγάλη σύγχυση και “αβεβαιότητα” για τον τρόπο προσδιορισμού της αβεβαιότητας μετρήσεων. Αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις υπάρχουν στη βιβλιογραφία και τις δημοσιευμένες οδηγίες και αυτό συμβαίνει για διάφορους λόγους (Hund, Massart et al. 2001) :

Ένας λόγος είναι ο τρόπος επεξεργασίας του σφάλματος. Είναι ξεκάθαρο ότι αβεβαιότητα σχετίζεται με τα μετρούμενα σφάλματα, αλλά η βιβλιογραφία και αναφορές των οδηγιών διαφέρουν στις πηγές αυτών που λαμβάνουν υπόψη το καθώς και σε ποιες από αυτές οφείλεται η αβεβαιότητα. Ειδικότερα, ένα σημείο ασυμφωνίας αποτελεί η επεξεργασία των συστηματικών σφαλμάτων.

Τα σφάλματα στην ουσία αναφέρονται στην απόκλιση από την αληθινή τιμή. Έτσι, το «τι θεωρεί κανείς ως αληθινή τιμή» αποτελεί μια ακόμη αιτία για τις διαφορετικές προσεγγίσεις προσδιορισμού της αβεβαιότητας μιας μέτρησης. Κάποιος ψάχνει για την πραγματική ή τη σχετική αληθινή τιμή;

Η τρίτη και πολύ σημαντική αιτία βρίσκεται στον τρόπο που πρακτικά προσδιορίζεται το σφάλμα. Οι αναλυτικοί χημικοί προσδιορίζουν το σφάλμα βάση τη διαδικασία επικύρωσης της μεθόδου και κατά τον ίδιο τρόπο θα ήθελαν να προσδιορίζεται και η αβεβαιότητα. Ωστόσο, οι μετρολόγοι έχουν ένα διαφορετικό τρόπο προσέγγισης που θα ήθελαν να εφαρμοσθεί και στην αναλυτική χημεία.

Ανάλογα με τις διαθέσιμες πληροφορίες, πάντως, επιλέγεται ο τρόπος προσέγγισης της αβεβαιότητας χημικών μετρήσεων. Οι τρεις βασικές προσεγγίσεις (Maroto, Boque et al. 1999) περιλαμβάνουν:

Ι. Την προσέγγιση του Διεθνούς Οργανισμού Τυποποίησης (ISO), προσαρμοσμένη στο αναλυτικό πεδίο από την Eurachem. Ο προσδιορισμός της συνολικής αβεβαιότητας πραγματοποιείται μετά από αναγνώριση, εκτίμηση και συνδυασμό όλων των πιθανών πηγών αβεβαιότητας που σχετίζονται με την μέτρηση. Η εν λόγω προσέγγιση έχει χαρακτηριστεί ως «από κάτω προς τα πάνω» (*bottom-up*) προσέγγιση, λόγω του τρόπου εκτίμησης της συνολικής αβεβαιότητας. Τα βασικά βήματα για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας είναι: (1) ο προσδιορισμός, όπου γίνεται προσομοίωση της διαδικασίας μέτρησης, (2) η αναγνώριση, όπου πραγματοποιείται η αναγνώριση των πηγών αβεβαιότητας, (3) η ποσοτικοποίηση, όπου γίνεται ο υπολογισμός της αβεβαιότητας και (4) ο συνδυασμός, δηλαδή ο υπολογισμός της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας και της εκτεταμένης αβεβαιότητας.

II. Την προσέγγιση της Επιτροπής Αναλυτικών Μεθόδων (*Analytical Methods Committee*), βασιζόμενη σε διεργαστηριακές πληροφορίες. Η προσέγγιση είναι γνωστή και ως «από πάνω προς τα κάτω» (*top-down*) προσέγγιση και ο υπολογισμός της αβεβαιότητας γίνεται με τη χρήση πληροφοριών από διαφορετικά εργαστήρια τα οποία ελέγχουν και εφαρμόζουν την ίδια μέθοδο. Η τιμή ενός αποτελέσματος λαμβάνεται ομόφωνα από έναν πληθυσμό εργαστηρίων. Από ένα, λοιπόν, υψηλότερο μετρολογικό επίπεδο, τα σφάλματα που οφείλονται στο εργαστήριο και στη σειρά μετρήσεων αποτελούν τυχαίες μεταβλητές με μια διακύμανση που συσχετίζεται με αυτά. Το σφάλμα της μεθόδου θεωρείται ως συστηματικό σφάλμα από αυτήν την οπτική γωνία.

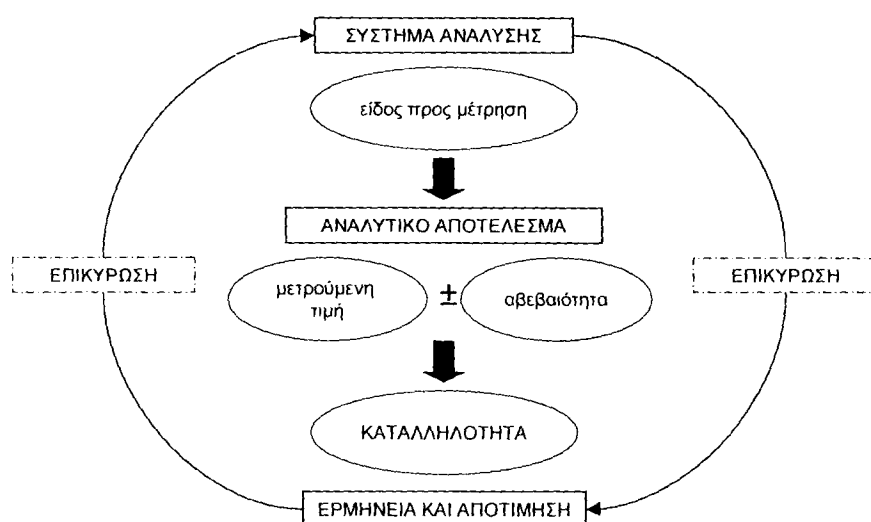
III. Μια νέα προσέγγιση που χρησιμοποιεί τις πληροφορίες που προέρχονται από τη διαδικασία επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου. Κατ' αυτόν τον τρόπο εκτιμάται η αβεβαιότητα και μελλοντικών αποτελεσμάτων μετρήσεων. Με αυτή τη διαδικασία, κανείς συλλέγει πληροφορίες σχετικά με την ακρίβεια (*accuracy*) μιας αναλυτικής μεθόδου, η οποία στη συνέχεια θα εφαρμοσθεί σε ανάλυση δειγμάτων ρουτίνας. Αναλυτική περιγραφή αυτής της προσέγγισης γίνεται παρακάτω. Το βασικό πλεονέκτημα της εκτίμησης της αβεβαιότητας με αυτόν τον τρόπο είναι ότι μελετώντας ούτως ή άλλως την ακρίβεια μιας μεθόδου, μπορεί κανείς ταυτόχρονα να υπολογίσει την αβεβαιότητα μελλοντικών μετρήσεων ρουτίνας. Επιπλέον, η συγκεκριμένη προσέγγιση παρουσιάζει μια απλότητα στην αντίληψη και πράξη, έχει χαμηλό κόστος και ευρεία εφαρμογή. Τέλος, είναι ολιστική προσέγγιση συγκριτικά με αυτήν της ISO, διότι δεν είναι απαραίτητη η γνώση των διαφόρων μεμονωμένων βημάτων από τα οποία αποτελείται η αναλυτική μεθοδολογία αφού αυτή λαμβάνεται ως σύνολο.

Γενικά, είναι προτιμότερο, ο προσδιορισμός της αβεβαιότητας να γίνεται βασιζόμενος σε πληροφορίες που λαμβάνονται από την επικύρωση μιας μεθόδου και άλλες διαδικασίες πιστοποίησης ποιότητας. Έτσι, η έκφραση της αβεβαιότητας μετατρέπεται σε φυσική προέκταση της επικύρωσης των μεθόδων, πράγμα το οποίο

αποτελεί για τους αναλυτικούς χημικούς μια πολύ καλύτερα κατανοητή έννοια και είναι η προσέγγιση «στοιχείο-στοιχείο» και μπορεί να υιοθετηθεί πιο εύκολα.

3.6.3 Αβεβαιότητα μέτρησης και μελέτες επικύρωσης

Πρακτικά, η χρησιμότητα μιας αναλυτικής μεθόδου συνήθως αποτιμάται μελετών επικύρωσης της μεθόδου. Λόγω της μεγάλης σημασίας αυτών των μελετών, πολλά Διεθνή θεσμικά όργανα έχουν συνεργαστεί για την έκδοση πρωτοκόλλων οδηγιών, ώστε να παρέχονται οι ελάχιστες απαιτήσεις των διαδικασιών εξασφαλίζουν επαρκή επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων (Thompson, Ellison *et al.* 2002). Στο Σχήμα 3.5 απεικονίζεται ο ρόλος της επικύρωσης μιας μεθόδου στην ποιότητα των αναλυτικών μετρήσεων.



Σχήμα 3.5. Ο ρόλος της επικύρωσης μιας μεθόδου στην ποιότητα των αναλυτικών μετρήσεων (Taverniers, Bockstaele *et al.* 2004)

Οι κυριότερες παράμετροι επικύρωσης, όταν πρόκειται για αναλυτικές μεθόδους ποσοτικοποίησης περιλαμβάνουν μερικές από τις παρακάτω:

Ι. Πιστότητα (*precision*). Οι βασικές μετρήσεις πιστότητας μιας μεθόδου περιλαμβάνουν την επαναληψιμότητα (*repeatability*), αναπαραγωγιμότητα

(*reproducibility*) και διάμεση πιστότητα (*intermediate precision*). Η παρατηρούμενη πιστότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας αποτελεί ουσιαστικό συστατικό της συνολικής αβεβαιότητας, είτε αυτή προσδιορίζεται με συνδυασμό των μεμονωμένων διακυμάνσεων είτε με μελέτη της μεθόδου σε εφαρμογή ως σύνολο.

II. Συστηματικό σφάλμα/ορθότητα (*Bias/trueness*). Προσδιορίζεται με μελέτες πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ή υλικών που έχουν εμβολιαστεί με γνωστή ποσότητα των αναλυτέων ουσιών. Το συστηματικό σφάλμα μπορεί να εκφραστεί ως η ανάκτηση μιας αναλυτικής μεθόδου και η αβεβαιότητα που συνδέεται με τον προσδιορισμό του αποτελεί ένα πολύ σημαντικό συστατικό της συνολικής αβεβαιότητας της μεθόδου.

III. Γραμμικότητα (*Linearity*). Αποτελεί σημαντική ιδιότητα μιας αναλυτικής μεθόδου αφού προσδιορίζεται η γραμμικότητα της απόκρισης σε καθαρές πρότυπες ουσίες και σε πραγματικά δείγματα. Συνήθως δεν ποσοτικοποιείται αλλά μπορεί να ελεγχθεί με χρήση ελέγχων σημαντικότητας (*significance tests*) για μη-γραμμικότητα. Οποιοσδήποτε αποκλίσεις μπορούν να αποδοθούν, ικανοποιητικά, από τη συνολική εκτίμηση πιστότητας για διάφορες συγκεντρώσεις ή να συνυπολογιστούν στις αβεβαιότητες που συνδέονται με τη βαθμονόμηση της μεθόδου.

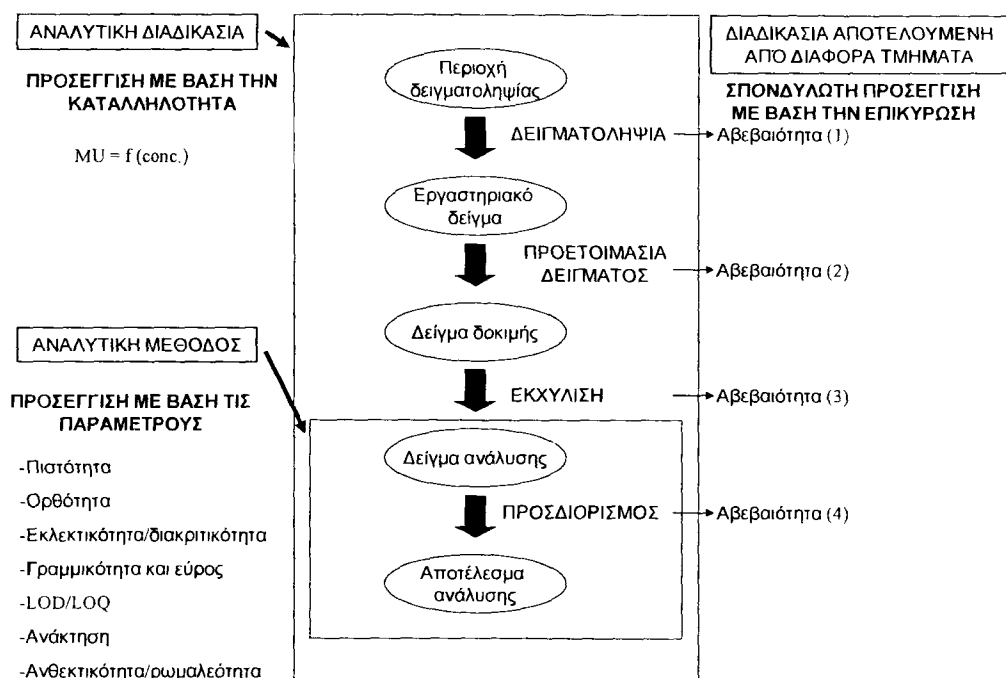
IV. Όριο ανίχνευσης (*LOD, Limit of Detection*). Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του χαμηλότερου ορίου ενός εύρους πρακτικής εφαρμογής μιας μεθόδου. Αν και η αβεβαιότητα κοντά στο όριο ανίχνευσης μπορεί να απαιτεί προσεκτική σκέψη και ειδικό χειρισμό, το όριο ανίχνευσης καθ' αυτό δεν σχετίζεται άμεσα με την εκτίμηση της αβεβαιότητας μιας μεθόδου.

V. Ρωμαλεότητα/Ανθεκτικότητα (*Robustness/Ruggedness*). Έτσι, νοείται η επιδεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου σε αλλαγές των πειραματικών συνθηκών. Τα αποτελέσματα δοκιμών ανθεκτικότητας προσφέρουν, λοιπόν, πληροφορίες σχετικά με την επίδραση διαφόρων σημαντικών παραμέτρων.

VI. Εκλεκτικότητα/Διακριτικότητα (*Selectivity/Specificity*). Αν και υπάρχει ασάφεια σε αυτόν τον ορισμό, ο όρος σχετίζεται με το βαθμό ιδιαίτερης απόκρισης μια μεθόδου απέναντι σε μία συγκεκριμένη ένωση προς ανάλυση. Οι τυπικές μελέτες

εκλεκτικότητας περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της πιθανής επίδρασης ουσιών που παρεμποδίζουν την ανάλυση. Τα αποτελέσματα μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της αβεβαιότητας που οφείλεται σε παρεμποδίσεις στην μέθοδο.

Στο Σχήμα 3.6 αναπαρίσταται η διάρθρωση μιας αναλυτικής διαδικασίας και διαφορετικές προσεγγίσεις επικύρωσης αυτής σε σχέση με τις πηγές αβεβαιότητας που τη διέπουν.



Σχήμα 3.6. Σχηματική αναπαράσταση της «αναλυτικής μεθόδου» που εμπεριέχεται σε μια «αναλυτική διαδικασία» και των διαφορετικών προσεγγίσεων επικύρωσης (MU =αβεβαιότητα μέτρησης, f =συνάρτηση, conc. =συγκέντρωση, LOD =όριο ανίχνευσης, LOQ =όριο ποσοτικοποίησης) (Taverniers, De Loose et al. 2004)

Η σχετικότητα μιας μελέτης που εφαρμόζεται για την εκτίμηση της αβεβαιότητας μιας μεθόδου ορίζεται από κάποιες βασικές αρχές που πρέπει να εφαρμόζονται. Έτσι, οι μελέτες θα πρέπει, όσο είναι δυνατόν, να είναι αντιπροσωπευτικές, δηλαδή να διεξάγονται με τρόπο που να παρέχουν μια ρεαλιστική

αποτίμηση του αριθμού και του εύρους των υπαρχουσών επιδράσεων κατά την κανονική χρήση μιας μεθόδου. Επίσης θα πρέπει να καλύπτουν το εύρος συγκεντρώσεων καθώς και τα διάφορα είδη δειγμάτων εντός των στόχων εφαρμογής μιας μεθόδου.

Όταν πραγματοποιείται επιλογή των παραγόντων για μελέτη διακύμανσης, είναι σημαντικό κανείς να διασφαλίζει τη μελέτη των παραγόντων με τη μεγαλύτερη επίδραση, όπου αυτό είναι δυνατόν.

Γενικά, είναι πιο εύκολη η επεξεργασία δεδομένων που προέρχονται από τυχαία επιλογή παρά από συστηματική διακύμανση. Ωστόσο, καλό είναι κατά τη μελέτη αβεβαιότητας μιας μεθόδου να προτιμάται η έρευνα μικρού αριθμού σημαντικών επιδράσεων συστηματικά.

Όταν οι παράγοντες που επιλέχθηκαν είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν ή αυτό είναι πιθανόν να συμβαίνει, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους. Αυτό επιτυγχάνεται, είτε διασφαλίζοντας την τυχαία επιλογή από διαφορετικά επίπεδα των παραμέτρων, που αλληλεπιδρούν, είτε χρησιμοποιώντας ένα προσεκτικά συστηματικό σχεδιασμό (πειραματικό σχέδιο, *experimental design*) ώστε να υπάρχουν πληροφορίες όχι μόνο για τη διακύμανση αλλά και συνδιακύμανσή τους.

3.6.4 Εκτίμηση της αβεβαιότητας με «εσωτερική» (*in-house*) μελέτη ανάπτυξης και επικύρωσης μιας μεθόδου

Ο «Οδηγός Έκφρασης της Αβεβαιότητας στη Μέτρηση» (*Guide to the expression of Uncertainty in Measurement, GUM*) της ISO εγκαθιδρύει γενικούς κανόνες για την αποτίμηση και έκφραση της αβεβαιότητας για ένα μεγάλο εύρος μετρήσεων, όπως έχουν δοθεί στην ενότητα 3.6.1. Ωστόσο, αυτές οι αρχές διαφέρουν σημαντικά με τις μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενες μεθόδους στην αναλυτική χημεία για την εκτίμηση της αβεβαιότητας (Analytical Methods Committee 1995; Ellison and Williams 1998; Rios and Valcarcel 1998), οι οποίες ουσιαστικά κάνουν χρήση των παραμέτρων απόδοσης της μεθόδου ως σύνολο, όπως είναι η πιστότητα και η

ανάκτηση, οι οποίες προκύπτουν από την «εσωτερική» μελέτη της επικύρωσης, μεθόδου ή από την ανάπτυξη και διεργαστηριακή μελέτη της (ISO 1994; Barwick Ellison 2000).

Κατά την «εσωτερική» μελέτη για ανάπτυξη και επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου γίνεται προσδιορισμός των παραμέτρων που σχετίζονται με την απόδοση μεθόδου. Η εκτίμηση της αβεβαιότητας από αυτές τις παραμέτρους απαιτεί:

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

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

Ο έλεγχος της ορθότητας μιας αναλυτικής μεθόδου εμπεριέχει την εκτίμηση του συστηματικού σφάλματος αυτής. Υπάρχουν δύο τύποι συστηματικού σφάλματος α) το αναλογικό, που εκφράζεται ως «ανάκτηση» και μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση και β) το σταθερό. Πολύ σημαντική, λοιπόν, είναι η συνεισφορά της διακύμανσης της ανάκτησης μιας μεθόδου στην εκτίμηση της συνολικής αβεβαιότητας.

Η ανάκτηση ($R=c_{obs}/c_{ref}$) ορίζεται ως ο λόγος της παρατηρούμενης συγκέντρωσης (ή ποσότητας, γενικά) c_{obs} , μετά την εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθοδολογίας σε ένα υλικό που περιέχει την αναλυτέα ουσία ως προς ένα επίπεδο αναφοράς, c_{ref} . Η συγκέντρωση αναφοράς μπορεί: α) να είναι η τιμή ενός πιστοποιημένου υλικού αναφοράς, β) να έχει μετρηθεί με μια ορισμένη εναλλακτική μέθοδο ή γ) να έχει ορισθεί μετά από προσθήκη με εμβολιασμό.

Η ιδανική εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθοδολογίας θα έδινε μια τιμή ανάκτησης ίση με τη μονάδα. Στην πραγματικότητα, περιστάσεις όπως μια ατελής εκχύλιση, οδηγούν συνήθως σε παρατηρήσεις που αποκλίνουν από την ιδανική

περίπτωση. Η εκτίμηση της ανάκτησης λοιπόν, μιας αναλυτικής μεθόδου είναι πολύ σημαντική και μπορεί να ελεγχθεί για τη σημαντικότητα της απόκλισής της από την μονάδα. Ο έλεγχος περιλαμβάνει το ερώτημα «εάν η ποσότητα $R-1$ είναι μεγαλύτερη από την αβεβαιότητα του προσδιορισμού της ανάκτησης, u_R , σε κάποιο επίπεδο εμπιστοσύνης». Στον Πίνακα 3.2 φαίνονται οι βασικές πηγές αβεβαιότητας κατά την εκτίμηση της ανάκτησης. Ένας τυπικός έλεγχος σημαντικότητας είναι της μορφής:

$|R-1| / u_R > t$: Η ανάκτηση διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα

$|R-1| / u_R \leq t$: Η ανάκτηση δε διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα

όπου: t , είναι η κρίσιμη τιμή βασιζόμενη σε έναν παράγοντα κάλυψης ή όταν ο έλεγχος είναι ολοκληρωτικά στατιστικός, $t(a/2, n-1)$, είναι η σχετική τιμή του ελέγχου του Student (*Student's t-test*) για ένα επίπεδο $1-a$.

Πίνακας 3.2

Πηγές αβεβαιότητας που σχετίζονται με την ανάκτηση μιας μεθόδου

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

Όταν η ανάκτηση διαφέρει από τη μονάδα τίθεται το ερώτημα εάν πρέπει να γίνει διόρθωση στην τελική τιμή της. Ιδιαίτερα στην περίπτωση σύνθετων υποστρωμάτων, όπως είναι τα τρόφιμα, όπου η δυσκολία εκχύλισης των ενώσεων είναι γνωστή και συχνά παρατηρούνται χαμηλά ποσοστά ανακτήσεων, το παραπάνω δύλλημα γίνεται ακόμη πιο έκδηλο (Willettts and Wood 1998).

Υπάρχουν επιχειρήματα υπέρ της διόρθωσης και κατά της διόρθωσης αυτής, αν και δεν έχει ακόμη εφαρμοσθεί κάποια συγκεκριμένη κοινή προσέγγιση ή νομοθεσία (Thompson, Ellison et al. 1999). Τέσσερις περιπτώσεις διακρίνονται κατά το παραπάνω πείραμα ανάλογα με τη χρήση της ανάκτησης R και η αβεβαιότητα μπορεί να διαχειριστεί ως εξής:

(α) Η ανάκτηση, R , δεν διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα (1): Σε αυτήν την περίπτωση δεν είναι απαραίτητη η διόρθωση του αποτελέσματος. Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η αβεβαιότητα που σχετίζεται με την ανάκτηση είναι αμελητέα. Παρόλα αυτά, το πείραμα δεν μπορεί να διακρίνει ένα εύρος ανακτήσεων στην περιοχή $1-ku_R$ και $1+ku_R$. Έτσι, κάποια αβεβαιότητα σε σχέση με την ανάκτηση υπάρχει ακόμη και θα πρέπει να συμπεριληφθεί στη συνολική αβεβαιότητα ενός αναλυτικού αποτελέσματος.

(β) Η ανάκτηση, R , διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα (1) και εφαρμόζεται διόρθωση: Σε αυτήν την περίπτωση γίνεται διόρθωση του αποτελέσματος (π.χ. $c_{\text{διορθ}} = c/R$, όπου c είναι το αρχικό αποτέλεσμα με μια αβεβαιότητα, u_c). Είναι φανερό λοιπόν, ότι η αβεβαιότητα, u_R , που σχετίζεται με την ανάκτηση θα πρέπει να συμπεριληφθεί στη συνολική εκτίμηση της αβεβαιότητας. Έτσι, οδηγούμαστε στη συνδυασμένη αβεβαιότητα, $u_{\text{διορθ}}$, που δίνεται από τύπο:

$$\frac{u_{\text{διορθ}}}{c_{\text{διορθ}}} = \sqrt{\left(\left(\frac{u_c}{c}\right)^2 + \left(\frac{u_R}{R}\right)^2\right)}$$

Το μέγεθος, $u_{\text{διορθ}}$ μπορεί να πολλαπλασιαστεί με τον παράγοντα k (συνήθως 2) οπότε υπολογίζεται η εκτεταμένη αβεβαιότητα, U .

(γ) Η ανάκτηση, R , διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα (1) και δεν εφαρμόζεται διόρθωση: Στην περίπτωση αυτή, η μη εφαρμογή διόρθωσης για μια γνωστή συστηματική επίδραση σε μια μέθοδο έρχεται σε αντίθεση με την προσπάθεια για όσο το δυνατόν καλύτερη εκτίμηση μιας ποσότητας προς μέτρηση. Ο συνυπολογισμός της ανάκτησης στη συνολική αβεβαιότητα είναι επίσης λιγότερο ακριβής. Αν η ανάκτηση διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα, τότε η διασπορά των τιμών που περιέχουν τη μετρούμενη ποσότητα δεν αντιπροσωπεύεται σωστά εκτός και

αν η αβεβαιότητα u_R αυξηθεί σημαντικά. Μια απλή προσέγγιση που υιοθετείται μερικές φορές είναι η αύξηση της εκτεταμένης αβεβαιότητας του τελικού αποτελέσματος κατά ένα παράγοντα b , $(U_c + b)$. Οπότε για την ανάκτηση είναι: $U = U_c + (c/R - c)$. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί ωστόσο, μια αρκετά «απαισιόδοξη» εκτίμηση της συνολικής αβεβαιότητας και αποκλίνει αρκετά από τις προτεινόμενες αρχές της ISO σύμφωνα με τις οποίες όλες οι αβεβαιότητες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως τυπικές αποκλίσεις.

Εναλλακτικά, αν η διόρθωση δεν εφαρμόζεται επειδή σύμφωνα με την κρίση του αναλυτικού χημικού η διαφορά από τη μονάδα έχει πρακτικό νόημα, η περίπτωση (γ) θα πρέπει να αντιμετωπίζεται αντίστοιχα με την περίπτωση (α). Οπότε, αρχικά, υπολογίζεται η αβεβαιότητα, u_R , ως $|1-R|/t$, όπου t είναι η κρίσιμη τιμή που χρησιμοποιήθηκε στον έλεγχο σημαντικότητας. Στη συνέχεια, αυτή η απλουστευμένη αβεβαιότητα θα πρέπει να χρησιμοποιείται όπως στην περίπτωση (β).

Παρόλα αυτά, και οι δύο παραπάνω μέθοδοι εκτίμησης της αβεβαιότητας υστερούν στο γεγονός ότι δεν γίνεται τελικά διόρθωση του αποτελέσματος, οδηγούν σε υπερεκτίμηση της αβεβαιότητας και το εύρος τιμών γύρω από το αποτέλεσμα θα περιλαμβάνει τελικά την μετρούμενη ποσότητα μόνο κοντά στο ένα άκρο, ενώ στο υπόλοιπο εύρος τιμών είναι σχεδόν απίθανο αυτή να περιλαμβάνεται.

Τελικά, είτε η ανάκτηση πρέπει να διορθωθεί, είτε μια σημαντικά μεγαλύτερη αβεβαιότητα πρέπει να αναφερθεί, ώστε να αποφεύγεται πιθανή παραπλάνηση από ένα αποτέλεσμα.

(δ) Χρησιμοποιείται μια εμπειρική μέθοδος, οπότε η ανάκτηση, R , λαμβάνεται αυθαίρετα ίση με τη μονάδα (1) και η αβεβαιότητα, u_R , ως μηδενική.

3.6.6 Ανάκτηση αναλυτικής μεθόδου και υπολογισμός της αβεβαιότητας

Πέρα από τις προσεγγίσεις που αναφέρθηκαν στα παραπάνω κεφάλαια για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας σε σχέση με την ανάκτηση μιας αναλυτικής μεθόδου, οι παρακάτω βασικές αρχές διέπουν τη διεξαγωγή πειραμάτων ανάκτησης:

(α) Η ανάκτηση καθώς και αβεβαιότητά της μπορεί να εξαρτώνται από συγκέντρωση της αναλυτέας ουσίας.

(β) Η μελέτη ανάκτησης θα πρέπει να περιλαμβάνει όλο το εύρος των πιθανών υποστρωμάτων που εμπεριέχονται στην κατηγορία για την οποία γίνεται επικύρωση της μεθόδου. Η τυπική απόκλιση της ανάκτησης που προκύπτει από αυτά υποστρώματα αποτελεί το κύριο μέρος της τυπικής αβεβαιότητας της ανάκτησης.

(γ) Αν υπάρχει υπόνοια ότι ένα μέρος της ένωσης προς ανάλυση δε εκχυλίζεται, τότε η ανάκτηση που εκτιμάται με υποκατεστημένη ουσία (*surrogate*) παρουσιάζει συστηματικό τυπικό σφάλμα. Αυτό θα πρέπει να εκτιμηθεί και συνυπολογιστεί στη συνολική αβεβαιότητα.

(δ) Αν κατά την εφαρμογή μιας μεθόδου, υπάρχει αναντιστοιχία μεταξύ των υποστρωμάτων στα πειράματα ανάκτησης κατά την επικύρωση και στο υλικό για έλεγχο κατά την ανάλυση, αυτό οδηγεί σε επιπλέον αβεβαιότητα στην τιμή της ανάκτησης.

Πρακτικά, αφού εκτιμηθούν οι βασικές πηγές αβεβαιότητας της ανάκτησης μιας μεθόδου, θα πρέπει να ορισθεί ο αριθμός των αντιπροσωπευτικών παραμέτρων που θα μεταβληθούν και ο απαιτούμενος αριθμός αναλύσεων. Τα δείγματα προς ανάλυση θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικά των επόμενων αναλύσεων ρουτίνας, ομογενή και σταθερά.

Σε αυτές τις περιπτώσεις προτείνεται το πειραματικό σχέδιο, ώστε να λαμβάνονται υπόψη όλοι οι παράγοντες διακύμανσης καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους σε σωστή βάση. Το προτεινόμενο είδος σχεδιασμένου πειράματος είναι το πλήρως-ένθετο σχέδιο (*fully-nested design*). Λεπτομέρειες σχετικά με τον σχεδιασμό πειραμάτων και τα διάφορα είδη του δίνονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 4.

Η πραγματική ανάκτηση ενός συγκεκριμένου δείγματος, R , μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τα εξής τρία στοιχεία (Barwick and Ellison 1999):

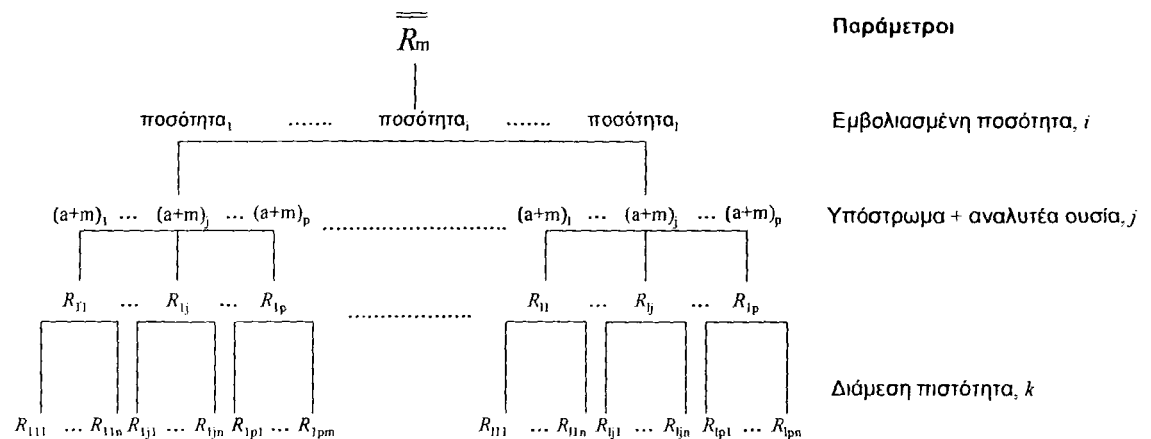
- R_m : Είναι μια εκτίμηση της μέσης ανάκτησης της μεθόδου που λαμβάνεται μετά από ανάλυση ενός πιστοποιημένου υλικού αναφοράς ή ενός εμβολιασμένου δείγματος. Η αβεβαιότητα αυτής αποτελείται από την

αβεβαιότητα στην τιμή αναφοράς και την αβεβαιότητα στην παρατηρούμενη τιμή. Η συνεισφορά της στη συνολική αβεβαιότητα μιας μεθόδου εξαρτάται από το εάν αυτή διαφέρει σημαντικά ή όχι από τη μονάδα και αν εφαρμόζεται ή όχι συντελεστής διόρθωσης.

- R_s : Είναι ένας συντελεστής διόρθωσης ο οποίος λαμβάνει υπόψη τις διαφορές στην ανάκτηση για ένα συγκεκριμένο δείγμα συγκριτικά με την ανάκτηση που παρατηρείται για το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της μέσης ανάκτησης, R_m .
- R_{rep} : Είναι ένας συντελεστής διόρθωσης, ο οποίος λαμβάνει υπόψη το γεγονός ότι ένα εμβολιασμένο δείγμα μπορεί να έχει διαφορετική συμπεριφορά από ένα πραγματικό δείγμα, που ήδη περιέχει την αναλυτέα ουσία.

Η ανάκτηση μπορεί να υπολογισθεί είτε με τη μέθοδο της μέσης ανάκτησης είτε με τεχνικές σχέσης μεταβλητών (*regression*) (Gonzalez, Herrador et al. 1999). Η πρώτη περίπτωση συνίσταται στην εκτίμηση της τιμής της μέσης ανάκτησης, $\overline{\overline{R}}_m$, η οποία προκύπτει ως αποτέλεσμα της εκτίμησης της ανάκτησης για κάθε ποσότητα της αναλυτέας ένωσης που έχει προστεθεί σε μια σειρά διαφορετικών υποστρωμάτων, αντιπροσωπευτικών των μελλοντικών δειγμάτων ρουτίνας. Αυτή η ανάκτηση πρέπει να υπολογισθεί τουλάχιστον εις διπλούν, ώστε τόσο η διάμεση πιστότητα της μεθόδου, όσο και η μεταβολή της ανάκτησης λόγω του υποστρώματος, του είδους της αναλυτέας ένωσης και του επιπέδου της συγκέντρωσης, να μπορούν να εκτιμηθούν. Η ολική ανάκτηση, $\overline{\overline{R}}_m$, καθώς και η τυπική της απόκλιση, $s(\overline{\overline{R}}_m)$, μπορούν να υπολογισθούν από τις προαναφερθείσες μετρήσεις.

Επιπλέον, τα πειράματα μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να λαμβάνονται όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες μέσω των δοκιμών ανάκτησης. Ένα πιθανό πειραματικό σχέδιο φαίνεται στο Σχήμα 3.7. Αυτό το σχεδιάγραμμα αντιστοιχεί σε ένα πλήρως-ένθετο σχέδιο τριών παραγόντων. Οι παράγοντες που μεταβάλλονται περιλαμβάνουν την ποσότητα της ουσίας προς ανάλυση που έχει προστεθεί, το υπόστρωμα και τη διάμεση πιστότητα.



Σχήμα 3.7. Πειραματικό σχέδιο για την εκτίμηση της ανάκτησης όταν l διαφορετικές ποσότητες αναλυτέας ουσίας προστίθενται σε αντιπροσωπευτικά υποστρώματα. Μελετούνται τρεις παράμετροι διακύμανσης: η προστιθέμενη ποσότητα, το υπόστρωμα και η διάμεση πιστότητα. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης p , η ανάκτηση μελετάται σε δείγματα στα οποία το υπόστρωμα ποικίλει, αντιπροσωπευτικά. Σε κάθε ένα από αυτά τα p δείγματα, η ανάκτηση υπολογίζεται φορές υπό συνθήκες διάμεσης πιστότητας. R_{ijk} είναι η k_{th} ανάκτηση, που έχει παρατηρηθεί να συνθήκες διάμεσης πιστότητας για μια ποσότητα i προστιθέμενη στο j_{th} δείγμα. R_{ij} είναι η μέση τιμή των ανακτήσεων R_{ijk} . $\overline{\overline{R_i}}$ είναι η μέση τιμή των $\overline{R_j}$ και τελικά $\overline{\overline{R_m}}$ είναι ο γενικός μέσος όρος όλων των ανακτήσεων που επιτεύχθηκαν κατά το πειραματικό σχέδιο (Maroto, Boque *et al.* 2001)

Το Σχήμα 3.7 μπορεί να απλοποιηθεί εάν η εμβολιασμένη ποσότητα και ο παράγοντας υπόστρωμα μελετηθούν ως σύνολο. Επίσης, το παραπάνω σχέδιο μπορεί να γίνει πιο πολύπλοκο εάν υπάρχουν και άλλες πηγές διακύμανση, όπως μεταβολές σε μερικά βήματα της αναλυτικής διαδικασίας. Αυτές μελετώνται ξεχωριστά ως διαφορετικές παράμετροι του πλήρως – ένθετου σχεδίου.

3.6.6.1 Πρακτική εκτίμηση των συστατικών της αβεβαιότητας

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η πραγματική ανάκτηση, R , ενός εμβολιασμένου δείγματος μπορεί να αποδοθεί ως το άθροισμα τριών συστατικών:

$$R = \bar{\bar{R}}_m + \Delta R_C + \Delta R_M \quad (\text{εξ. 1, Παράρτημα Β})$$

όπου $\bar{\bar{R}}_m$ είναι η ολική ανάκτηση, γνωστή και ως «ανάκτηση μεθόδου» και τα δύο τελευταία συστατικά σχετίζονται με τη διακύμανση της ανάκτησης που οφείλεται στο είδος του δείγματος προς ανάλυση: ΔR_C , είναι η διακύμανση της ανάκτησης που εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας προς ανάλυση με την οποία εμβολιάζονται τα δείγματα και ΔR_M , αποτελεί τη διακύμανση της ανάκτησης που οφείλεται στα διαφορετικά είδη υποστρωμάτων. Η ολική ανάκτηση, $\bar{\bar{R}}_m$, υπολογίζεται μέσω της αποτίμησης της ορθότητας μιας μεθόδου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διόρθωση μελλοντικών αποτελεσμάτων εάν είναι απαραίτητο.

Η τιμή της μέσης ανάκτησης, $\bar{\bar{R}}_m$, που αποτελεί ένα γενικό μέτρο της ανάκτησης της μεθόδου μπορεί να υπολογισθεί ως εξής:

$$\bar{\bar{R}}_m = \frac{\sum_{i=1}^l \bar{R}_i}{l} \quad (\text{εξ. 2, Παράρτημα Β})$$

Στην παραπάνω εξίσωση ο όρος, $\bar{R}_i$, εκφράζει τη μέση ανάκτηση για κάθε υπόστρωμα και l είναι ο αριθμός των υποστρωμάτων προς ανάλυση.

Είναι πάντως μια εκτίμηση της «ανάκτησης της μεθόδου» (Taverniers, Bockstaele et al. 2004), διότι προκύπτει από μια αντιπροσωπευτική διακύμανση των παραγόντων που μπορούν να έχουν επίδραση πάνω στην ανάκτηση. Αφού αυτή έχει υπολογισθεί μπορεί να γίνει έλεγχος ως προς τη στατιστική σημαντικότητα του αναλογικού συστηματικού σφάλματος.

Η αβεβαιότητα λοιπόν, $u(R)$, για την πραγματική ανάκτηση, R , θα αποτελείται από τη συμβολή των αβεβαιοτήτων, $u(\Delta R_C)$ και $u(\Delta R_M)$. Τα τελευταία δύο συστατικά της εξ. 1 αποτελούν άγνωστες ποσότητες για τα μελλοντικά δείγματα ρουτίνας. Ωστόσο, η διακύμανση που σχετίζεται με τη μεταβολή της ανάκτησης με το υπόστρωμα, $u(\Delta R_M)^2$, καθώς και η αντίστοιχη με τη συγκέντρωση, $u(\Delta R_C)^2$, μπορούν να υπολογισθούν. Οι παραπάνω διακυμάνσεις σχετίζονται αντίστοιχα με την

κατανομή των τιμών που οι ποσότητες ΔR_M και ΔR_c μπορούν να πάρουν ανάλογα με τον τύπο δείγματος υπό ανάλυση.

Η αβεβαιότητα της πραγματικής ανάκτησης R , μπορεί τότε να υπολογισθεί βάσει του τύπου:

$$u(R) = \sqrt{u(\bar{R}_m)^2 + u(\Delta R_c)^2 + u(\Delta R_M)^2} \quad (\text{εξ. 3 Παράρτημα Β})$$

Πίνακας 3.3

ANOVA και ο υπολογισμός των διακυμάνσεων για το προτεινόμενο πειραματικό σχέδιο

Πηγές αβεβαιότητας	Επίπεδα	Μέσο τετράγωνο	Βαθμοί ελευθερίας	Αβεβαιότητα
Υποστρώματα	$l = 3$	MS_m	$l-1$	$u(\Delta R_M)^2 = \frac{MS_m - MS_{conc}}{pr}$
Συγκεντρώσεις (Υποστρώματα)	$p = 3$	MS_{conc}	$l(p-1)$	$u(\Delta R_c)^2 = \frac{MS_{conc} - MS_r}{r}$
Επαναλήψεις	$r = 3$	MS_r	$lp(r-1)$	$u(\Delta R_r)^2 = MS_r$
Σύνολο			$lpr-1$	

όπου, $u(\bar{R}_m)^2$ είναι η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης και υπολογίζεται όπως περιγράφεται παρακάτω (Κεφ. 3.6.6.2). Η αβεβαιότητα των δύο τελευταίων συστατικών μπορεί να υπολογισθεί από την «ανάλυση διακύμανσης» (*ANOVA, analysis of variance*) των ανακτήσεων που έχουν βρεθεί με τα πειράματα ένθετου σχεδίου. Στον Πίνακα 3.3 φαίνεται η ανάλυση διακύμανσης και οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για την έκφραση των διάφορων τύπων αβεβαιότητας.

3.6.6.2 Αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης, $u(\bar{R}_m)$

Η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης, $u(\bar{R}_m)$ περιγράφεται από την εξίσωση 3.

$$u(\bar{R}_m) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p u(\bar{R}_j)^2}{p^2}}$$

(εξ. 4 Παράρτημα Β)

Η αβεβαιότητα, $u(\bar{R}_j)$, των μέσων ανακτήσεων μπορεί να υπολογιστεί από την τυπική απόκλιση αυτών (εξ. 4).

$$u(\bar{R}_j) = \frac{\sqrt{\sum_{j=1}^p (\bar{R}_{ij} - \bar{R}_j)^2}}{p(p-1)}$$

(εξ. 5 Παράρτημα Β)

όπου R_{ij} , είναι η μέση ανάκτηση για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα και για ένα συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης ως προς την αναλυόμενη ουσία ενός εμβολιασμένου δείγματος και p είναι ο αριθμός των διαφορετικών επιπέδων συγκέντρωσης.

Είναι σημαντική η παρατήρηση ότι η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης υπολογίζεται βάσει της υπόθεσης ότι οι αβεβαιότητες που σχετίζονται με τον εμβολιασμό δείγματος (καθαρότητα υλικού, συσκευές μάζας και όγκου) είναι αμελητέες. Σε αντίθετη περίπτωση θα πρέπει να συμπεριληφθούν και αυτές στην εξίσωση 3.

Οι εκτιμώμενες τιμές $\bar{R}_m$, καθώς και οι αβεβαιότητές τους επιτρέπουν, στη συνέχεια, την εφαρμογή ενός ελέγχου σημαντικότητας, όπως έχει προαναφερθεί, ώστε να αποφασισθεί η εισαγωγή ή όχι ενός συντελεστή διόρθωσης χρησιμοποιώντας την εξίσωση 6:

$$\frac{|\bar{R}_m - 1|}{u(\bar{R}_m)} \leq t_{\alpha/2, \text{eff}}$$

(εξ. 6 Παράρτημα Β)

όπου, $t_{\alpha/2, \text{eff}}$, είναι η «δύο-πλευρών» τιμή, t , για τους βαθμούς ελευθερίας που σχετίζονται με την αβεβαιότητα, $u(\bar{R}_m)$, και για ένα επίπεδο εμπιστοσύνης $1-\alpha$.

Σε κάθε περίπτωση πάντως, η αβεβαιότητα που προέρχεται από την εκτίμηση της ανάκτησης είναι πάντα υπολογίσιμη και θα πρέπει να συμπεριληφθεί στον τελικό προϋπολογισμό αβεβαιότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

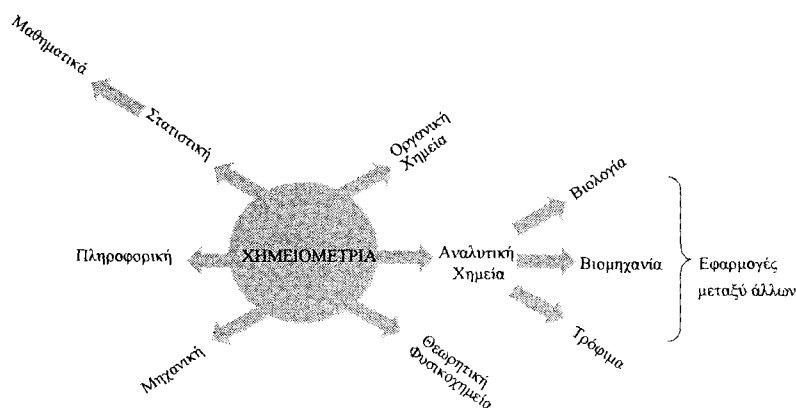
4.1 Γενικά

Η εφαρμογή διαφόρων κλάδων των μαθηματικών και της στατιστικής με σκοπό τη βέλτιστη κατανόηση των χημικών δεδομένων έδωσαν μια άλλη διάσταση στην αναλυτική χημεία που εκφράζεται με το όρο χημειομετρία (*chemometrics*). Η Διεθνής Κοινότητα Χημειομετρίας (*International Chemometrics Society, ICS*) δίνει τον εξής ορισμό (Wikipedia (the free encyclopedia)):

Χημειομετρία είναι η επιστήμη που συνδέει τις μετρήσεις που γίνονται σε ένα χημικό σύστημα ή μια χημική διεργασία με την κατάσταση του συστήματος μέσω της εφαρμογής μαθηματικών ή στατιστικών μεθόδων.

Η χημειομετρία αναγνωρίζεται ως ένας κλάδος της αναλυτικής χημείας από τα μέσα του 1970 αν και η προέλευση και ανάπτυξη των μεθόδων της βρίσκεται στους τομείς της οικονομίας και ψυχολογίας. Έχει εφαρμογές σχεδόν σε όλες τις επιστήμες (Σχήμα 4.1). Περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος μεθόδων που μπορούν να εφαρμοστούν στην χημεία και δεν αποτελεί ένα εργαλείο από μόνο του. Άλλες από αυτές

χρησιμοποιούνται για τη συλλογή σωστών δεδομένων και άλλες για την εξαγωγή πληροφοριών από τα υπάρχοντα δεδομένα (Πίνακας 4.1).



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

Πίνακας 4.1

Βασικές χημειομετρικές μέθοδοι

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

Ουσιαστικά, η χημειομετρία προσπαθεί να κτίσει μια γέφυρα μεταξύ των μεθόδων και της εφαρμογής αυτών στη χημεία. Στα επόμενα κεφάλαια περιγράφονται κάποιες από τις χημειομετρικές μεθόδους, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης τόσο για τη βελτιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων, την εκτίμηση της επίδρασης διαφόρων παραγόντων καθώς και της αβεβαιότητας των αναλυτικών μεθόδων. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δε θα πρέπει να γίνεται υπερεκτίμηση των χημειομετρικών μεθόδων. Αποτελούν απλά εργαλεία για

την εξαγωγή πληροφοριών από «σωστά» δεδομένα και εφόσον είναι γνωστοί οι βασικοί στόχοι, οι υποθέσεις που γίνονται και οι αδυναμίες της μεθόδου που χρησιμοποιείται (Rock 1997).

4.2 Βασική στατιστική: κάποιες έννοιες

4.2.1 Δοκιμασία Student, t (t -Test)

Υπάρχουν τρία είδη δοκιμασίας t (Morgan 1991):

- Η βασικότερη εφαρμογή αυτής της δοκιμασίας είναι η σύγκριση ενός πειραματικού μέσου όρου, $\bar{y}$, με μια γνωστή πραγματική τιμή (μ). Η στατιστική τιμή t υπολογίζεται από τη σχέση:

$$t = \frac{(\bar{y} - \mu)}{s} \sqrt{N} \quad (\text{εξ. 4.1})$$

όπου s η τυπική απόκλιση:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\bar{y} - y_i)^2}{N - 1}} \quad (\text{εξ. 4.2})$$

με y_i = μια από τις τιμές (N πλήθος) και $\bar{y}$ = η μέση τιμή

Στη συνέχεια, συγκρίνεται με μια τιμή t του πίνακα για δοσμένο αριθμό αποτελεσμάτων με την επιθυμητή στάθμη εμπιστοσύνης (*Πίνακας 1, Παράρτημα Γ*). Αν η τιμή t που υπολογίζεται είναι μεγαλύτερη της τιμής t του πίνακα, τότε υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων τιμών ($\bar{y} \neq \mu$) στη συγκεκριμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Αν δεν ξεπερνά την τιμή του πίνακα τότε μπορεί να προβλεφθεί πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ($\bar{y} = \mu$). Αυτό δε σημαίνει σε καμία περίπτωση ότι τα δύο αποτελέσματα ταυτίζονται.

Η δοκιμασία αυτή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση μεταξύ δύο σειρών μετρήσεων που πάρθηκαν με δύο διαφορετικές μεθόδους (*paired t-test*). Η μία από τις δύο μεθόδους είναι η μέθοδος που δοκιμάζεται και η άλλη είναι μια αποδεκτή μέθοδος. Αν η τιμή t που υπολογίζεται είναι μεγαλύτερη της τιμής t του πίνακα, τότε υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων στη συγκεκριμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Αν δεν ξεπερνά την τιμή του

πίνακα τότε μπορεί να προβλεφθεί πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Στην περίπτωση αυτή η στατιστική τιμή t υπολογίζεται από τη σχέση:

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d} \sqrt{N} \quad (\text{εξ. 4.3})$$

όπου:

$$s_d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{N-1}} \quad (\text{εξ. 4.4})$$

d_i = οι αλγεβρικές διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων για κάθε δείγμα και

$\bar{d}$ = η μέση τιμή όλων των διαφορών

• Τέλος, η δοκιμασία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση των μέσων τιμών δύο διαφορετικών δειγμάτων, $\bar{y}_1$ και $\bar{y}_2$. Εδώ, η τιμή t εκφράζεται ως:

$$t = \frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{s_p \sqrt{(1/N_1 + 1/N_2)}} \quad (\text{εξ. 4.5})$$

όπου:

$$s_p = \sqrt{\frac{(N_1-1)s_1^2 + (N_2-1)s_2^2}{N_1 + N_2 - 2}} \quad (\text{εξ. 4.6})$$

με N_1 και N_2 το πλήθος των δεδομένων για κάθε δείγμα, s_p η συνολική τυπική απόκλιση και s_1, s_2 οι τυπικές αποκλίσεις για τα δύο δείγματα.

Συνήθως μια δοκιμασία σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% θεωρείται *στατιστικά σημαντική*, ενώ μια δοκιμασία σε στάθμη εμπιστοσύνης 99% είναι *στατιστικά πολύ σημαντική* (Βουλγαρόπουλος, Ζαχαριάδης et al. 1999). Αυτό σημαίνει πως όσο μικρότερη είναι η τιμή του t τόσο πιο βέβαιοι είμαστε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων.

4.2.2 Δοκιμασία F (F -test)

Κατά την ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου είναι συχνά επιθυμητό να συγκριθούν τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη χρήση μια αποδεκτής (*πρότυπης*) μεθόδου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της δοκιμασίας F για να αποδειχθεί εάν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ δύο μεθόδων με βάση τις τυπικές τους αποκλίσεις. Το F ορίζεται ως το πηλίκο των

διακυμάνσεων των δύο μεθόδων, όπου η διακύμανση είναι το τετράγωνο της τυπικής απόκλισης (Βουλγαρόπουλος, Ζαχαριάδης et al. 1999):

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{εξ. 4.7})$$

όπου $s_1^2 > s_2^2$. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί βαθμοί ελευθερίας, v_1 και v_2 , που ορίζονται ως N_1-1 , (ο αριθμός των μετρήσεων μείον ένα) και N_2-1 αντίστοιχα.

Αν η τιμή του F που υπολογίζεται από την εξίσωση 1 είναι μεγαλύτερη της τιμής του F του πίνακα για τη στάθμη εμπιστοσύνης που έχει επιλεγθεί, τότε υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Τιμές του F για στάθμη εμπιστοσύνης 95% δίνονται στον Πίνακα 2 του Παραρτήματος Γ.

4.2.3 Ανάλυση διακύμανσης (*ANalysis Of VAriance, ANOVA*)

Όταν θέλουμε να συγκρίνουμε περισσότερες από δύο σειρές παρατηρήσεων ή μέσους όρους δειγμάτων χρησιμοποιείται η ανάλυση διακύμανσης. Είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τον προσδιορισμό ξεχωριστών επιδράσεων από διαφορετικές πηγές διακύμανσης των πειραματικών δεδομένων και αποτελεί γενίκευση της δοκιμασίας t (Ντζούφρας and Καρλής 2001).

Η ανάλυση διακύμανσης είναι πιο χρήσιμη όταν εφαρμοσθεί σε μια σειρά πειραμάτων που έχουν σχεδιαστεί έχοντας κατά νου τη στατιστική ανάλυση. Παραγοντικά πειράματα, στα οποία πολλοί παράγοντες μεταβάλλονται με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς σ' ένα ολοκληρωμένο πείραμα, επιτρέπουν την εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων, τις ταυτόχρονες επιδράσεις δύο ή περισσότερων μεταβλητών. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι εξαιρετικά σημαντικές. Παρ' όλα αυτά, μπορεί να διαφύγουν πλήρως την ανίχνευση με τον κλασικό τρόπο εκτέλεσης πειράματος κατά τον οποίο οι παράγοντες μεταβάλλονται μια κάθε φορά, διατηρώντας όλες τις δυνατές πηγές διακύμανσης σταθερές.

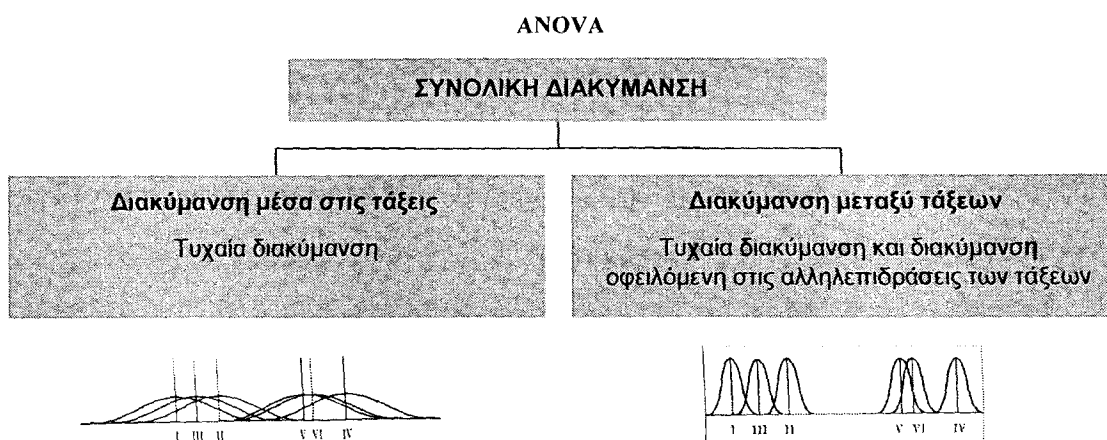
Όταν περιλαμβάνονται πολλοί παράγοντες, ο στατιστικός σχεδιασμός και η ανάλυση διακύμανσης γίνονται πολύπλοκοι. Η πιο απλή εφαρμογή είναι η ταξινόμηση μονής κατεύθυνσης (*one-way ANOVA*). Στο Σχήμα 4.2 φαίνεται η γενική διεύθυνση

των αποτελεσμάτων όταν πρόκειται για k τάξεις (*treatments*) ή δείγματα ή κατη (*groups*), για καθένα από τα οποία υπάρχουν n παρατηρήσεις.

		Τάξεις ή δείγματα					
		1	2		j		k
Παρατηρήσεις	1	y_{11}	y_{21}		y_{j1}		y_{k1}
	2	y_{12}	y_{22}		y_{j2}		y_{k2}
	.	.	.		.		.
	.	.	.		.		.
	j	y_{1j}	y_{2j}		y_{jj}		y_{kj}
	.	.	.		.		.
n	n	y_{1n}	y_{2n}		y_{jn}		y_{kn}

Σχήμα 4.2. Διευθέτηση των αποτελεσμάτων για ανάλυση διακύμανσης (Morgan 1991)

Κατά την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης γίνεται μέτρηση δύο πη διακύμανσης στα δεδομένα και σύγκριση των σχετικών μεγεθών τους, διακύμανσης «μεταξύ των τάξεων» (*between treatments*) και της διακύμανσης «μ στις τάξεις» (*within treatments*) (Σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3. Σχηματική απεικόνιση των πιθανών πηγών διακύμανσης

Η σημαντικότητα μιας πηγής διακύμανσης έναντι μιας άλλης μπορεί να προσδιοριστεί με την εφαρμογή της δοκιμασίας F . Οπότε:

$$F = \frac{MS_{\text{μεταξύ}}}{MS_{\text{μέσα}}} \quad (\text{εξ. 4.8})$$

όπου, $MS_{\text{μεταξύ}}$: το μέσο τετράγωνο «μεταξύ τάξεων» και $MS_{\text{μέσα}}$: το μέσο τετράγωνο «μέσα στις τάξεις». Το μέσο τετράγωνο, MS , ορίζεται ως ο λόγος του αθροίσματος των τετραγώνων, SS , προς τους βαθμούς ελευθερίας, df , για κάθε πηγή διακύμανσης:

$$MS = \frac{SS}{df} \quad (\text{εξ. 4.9})$$

Δε θα εισέλθουμε σε λεπτομέρειες σχετικά με την εξαγωγή των μαθηματικών τύπων. Γενικά, όμως, ισχύουν τα εξής:

$$SS_{\text{συνολικό}} = SS_{\text{μεταξύ}} + SS_{\text{μέσα}} \quad (\text{εξ. 4.10})$$

όπου, $SS_{\text{συνολικό}}$: το ολικό άθροισμα τετραγώνων, $SS_{\text{μεταξύ}}$: το άθροισμα τετραγώνων που προκύπτει από τις αποκλίσεις «μεταξύ τάξεων» και $SS_{\text{μέσα}}$: το άθροισμα τετραγώνων που προκύπτει από τις αποκλίσεις «μέσα στις τάξεις».

Πίνακας 4.2

Πίνακας ανάλυσης διακύμανσης για k τάξεις και n παρατηρήσεις

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

^aεπίπεδο σημαντικότητας για τη δοκιμασία F , αντιπροσωπεύει την πιθανότητα του σφάλματος κατά την αποδοχή ενός αποτελέσματος ως έγκυρο (γενικά, επίπεδο $p < 0.05$ θεωρείται ως αποδεκτό επίπεδο σφάλματος).

Οι διακυμάνσεις (μέσα τετράγωνα) υπολογίζονται (εξίσωση 9) με διαίρεση του αθροίσματος των τετραγώνων κάθε περίπτωσης με τον αριθμό των βαθμών ελευθερίας. Για τον υπολογισμό των βαθμών ελευθερία ισχύουν:

$$df_{\text{μεταξύ}} = k-1 \text{ (αριθμός τάξεων -1)} \quad (\text{εξ. 4.11})$$

$$df_{\text{μέσα}} = k(n-1) \text{ (αριθμός τάξεων(αριθμός παρατηρήσεων -1))} \quad (\text{εξ. 4.12})$$

$$df_{\text{ολικό}} = kn-1 \quad (\text{εξ. 4.13})$$

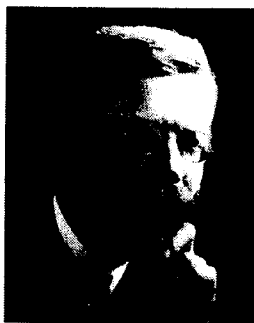
Οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν συνοπτικά να περιληφθούν σε έναν πίνακα ανάλυσης διακύμανσης (Πίνακας 4.2).

Αφού, τέλος, υπολογισθεί η πειραματική τιμή F με βάση την εξίσωση 4.8 αυτή συγκρίνεται με την τιμή F που προκύπτει από πίνακες στην επιθυμητή στάθμη εμπιστοσύνης όπως έχουμε ήδη περιγράψει.

4.3 Πειραματικό σχέδιο (*Experimental Design, DoE*)

4.3.1 Εισαγωγή

Το πειραματικό σχέδιο εισήχθη ως έννοια το 1929 από τον Βρετανό επιστήμονα στατιστικής, εξελικτικό βιολόγο και γενετιστή, R. A. Fisher (Wikipedia (the free encyclopedia)). Προσελήφθηκε το 1919 στον γεωργικό σταθμό Rothamsted



R. A. FISHER 1929

στο Harpenden, Hertfordshire της Αγγλίας με σκοπό την επεξεργασία ενός μεγάλου αριθμού καταγεγραμμένων δεδομένων μετά από πολλά χρόνια παρατηρήσεων στις αποδόσεις των καλλιεργειών. Το 1935 εξέδωσε το βιβλίο με τίτλο «Ο σχεδιασμός των πειραμάτων» το οποίο αποτέλεσε πρότυπο έργο αναφοράς για τους επιστήμονες και οδήγησε στην εξαγωγή των βασικών αρχών που διέπουν το πειραματικό σχέδιο.

Το πρώτο βήμα στο πειραματικό σχέδιο είναι ο ορισμός των *παραγόντων* (*factors*) ή μεταβλητών (*variables*) δηλαδή κάποιων χαρακτηριστικών των πειραματικών συνθηκών που μεταβάλλονται κατά βούληση από δοκιμή σε δοκιμή και μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα ενός πειράματος. Άλλοι παράγοντες μπορεί

να είναι *ποιοτικοί* και άλλοι *ποσοτικοί*. Το αποτέλεσμα ή η τιμή που εξάγεται από ένα πείραμα ονομάζεται *απόκριση (response)*. Αφού γίνει ο προσδιορισμός των παραγόντων που επιδρούν στην απόκριση πρέπει να προσδιοριστούν τα *επίπεδα (levels)* των παραγόντων. Οι διαφορετικές πιθανές τιμές που παίρνει ένας παράγοντας αναφέρονται ως διαφορετικά επίπεδα. Αφού προσδιοριστούν οι παράγοντες και τα επίπεδά τους θα πρέπει κανείς να αποφασίσει τον συνδυασμό των επιπέδων και τον αριθμό των πειραμάτων. Το σύνολο των επιπέδων όλων των παραγόντων μιας δεδομένης δοκιμής ονομάζεται *πειραματικός συνδυασμός (treatment combination)*. Οι βασικές αρχές που διέπουν το πειραματικό σχέδιο είναι:

1. Η λήψη πλήρως τυχαιοποιημένων δεδομένων (Randomization)

Είναι ένας τρόπος προστασίας από εξωτερικές διακυμάνσεις είτε αυτές είναι γνωστές είτε όχι ώστε να αποφευχθεί η συστηματοποίηση του προβλήματος. Στην ουσία εκτελούνται τα πειράματα με τυχαία σειρά ώστε να μειώνεται -όχι να εκμηδενίζεται- η πιθανότητα για αποτελέσματα με συστηματικά σφάλματα.

2. Η επανάληψη (Replication)

Είναι ένας τρόπος αντιμετώπισης της μεταβλητότητας. Θα πρέπει οι μετρήσεις να γίνονται τουλάχιστον εις διπλούν. Μέσα από επαναλαμβανόμενες μετρήσεις μπορεί να υπολογιστεί η τυχαία διακύμανση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

3. Τα πειράματα σε μπλόκ (Blocking)

Μερικές φορές οι επαναλήψεις των μετρήσεων δεν μπορούν να διεξαχθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, όπως για παράδειγμα όταν γίνονται σε διαφορετικές ημέρες ή το υλικό δεν είναι αρκετό για όλες τις επαναλήψεις και λαμβάνεται ένα καινούριο, ίδιο, τμήμα από αυτό για τις περαιτέρω μετρήσεις. Τότε, δημιουργούνται ομάδες με ομοειδή δεδομένα (*blocks*). Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η ανάπτυξη ενός είδους πειραματικού σχεδίου, του πλήρως τυχαιοποιημένου σχεδίου σε μπλόκ (*randomized block design*).

Η επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού εξαρτάται τόσο από τους στόχους του πειραματιστή όσο και από τον αριθμό των παραγόντων υπό έλεγχο. Η σχέση μεταξύ

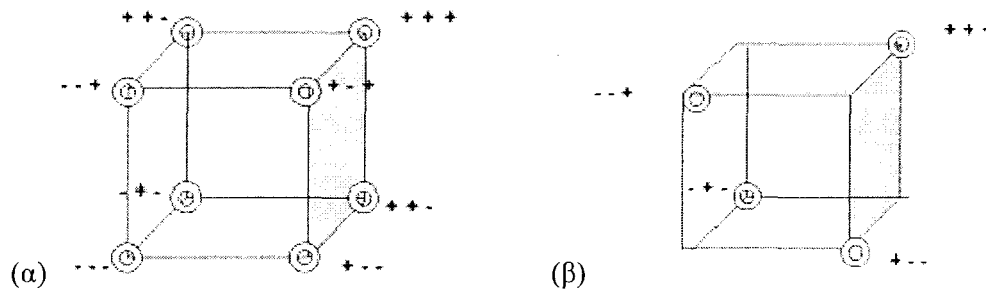
στρατηγική προσέγγισης των βέλτιστων συνθηκών από την μεταβολή ενός παράγοντα τη φορά, COST, και αυτήν τη στρατηγική προσφέρει το παραγοντικό πειραματικό σχέδιο. Η βασική ιδέα συνίσταται στην κατάστρωση ενός μικρού αριθμού πειραμάτων όπου όλοι οι παράγοντες μεταβάλλονται ταυτόχρονα. Έτσι μπορεί να γίνει ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών, των παραγόντων που έχουν τη σημαντικότερη επίδραση στο αποτέλεσμα και της παρουσίας αλληλεπιδράσεων ή συνεργιστικών φαινομένων. Για τον παραπάνω λόγο αυτή η μέθοδος έχει αρχίσει να εδραιώνεται μεταξύ άλλων και στο χώρο της αναλυτικής χημείας (Stalikas, Fiamegos et al. 2009). Τα πλεονεκτήματα του παραγοντικού σχεδιασμού συνοψίζονται στα παρακάτω (Czitrom 1999):

- ✓ Λιγότερα υλικά, πειράματα και συντομότερο χρόνο σε σχέση με την ποσότητα πληροφοριών που παρέχει. Ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος για πειράματα ακριβά και χρονοβόρα όπως στη βιομηχανία.
- ✓ Ακριβέστερη εκτίμηση των επιδράσεων των παραγόντων (*μικρότερη διακύμανση*).
- ✓ Συστηματική εκτίμηση των αλληλεπιδράσεων των παραγόντων.
- ✓ Πληροφορίες για μεγαλύτερη περιοχή του χώρου των παραγόντων και κατά συνέπεια αποτελεσματικότερη ανίχνευση του βέλτιστου σημείου.

4.3.3 Πλήρως παραγοντικό σχέδιο

Το πλήρως παραγοντικό σχέδιο αποτελεί μια ομάδα πειραμάτων όπου όλα τα επίπεδα ενός παράγοντα συνδυάζονται με όλα τα επίπεδα όλων των άλλων παραγόντων. Είναι ένα ισορροπημένο (*balanced*) σχέδιο. Ένα ισορροπημένο σχέδιο επιτρέπει την εκτίμηση της επίδρασης ενός παράγοντα ανεξάρτητα από όλες τις άλλες επιδράσεις. Το πιο γνωστό είναι το σχέδιο δύο επιπέδων που περιγράφεται ως 2^k , όπου η βάση 2 υποδηλώνει τον αριθμό των επιπέδων των παραγόντων και ο εκθέτης k τον αριθμό των παραγόντων. Για τους *σχεδιασμούς δύο επιπέδων*, το χαμηλό επίπεδο συμβολίζεται με το πρόσημο «-» ή «-1» ενώ το υψηλό με το πρόσημο «+» ή «+1». Εάν υπάρχουν τρία επίπεδα (3^k) το κεντρικό επίπεδο συμβολίζεται ως «0». Με 2

παράγοντες (2^2) ορίζεται ένα τετράγωνο στον χώρο των παραγόντων και με τρεις παράγοντες (2^3) ορίζεται ένας κύβος (Σχήμα 4.4α).



Σχήμα 4.4. (α) Πλήρως παραγοντικό σχέδιο τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα, $2^3 = 8$ πειράματα, (β) κλασματικό παραγοντικό σχέδιο τριών παραγόντων σε δύο επίπεδα $2^{3-1} = 4$ πειράματα (Trygg and Wold 2002)

Η επίδραση (*effect*) ενός παράγοντα είναι η μεταβολή στην απόκριση, η οποία επέρχεται λόγω της μεταβολής στο επίπεδο του παράγοντα. Όταν ένας παράγοντας εξετάζεται μόνο σε δύο επίπεδα, η επίδραση είναι απλώς η διαφορά μεταξύ της μέσης απόκρισης όλων των δοκιμών που γίνονται με τον παράγοντα στο χαμηλό επίπεδο (-1) και εκείνης όλων των δοκιμών με τον παράγοντα στο υψηλό επίπεδο (+1). Αυτή είναι και η κύρια επίδραση (*main effect*) του παράγοντα. Αν η επίδραση ενός παράγοντα είναι διαφορετική σε διαφορετικά επίπεδα ενός άλλου παράγοντα, τότε υπάρχει αλληλεπίδραση (*interaction*) μεταξύ των δύο παραγόντων (Αγατζίνη-Λεονάρδου 1983). Το γενικό μοντέλο για ένα πλήρως τυχαιοποιημένο παραγοντικό σχέδιο 2 παραγόντων με n παρατηρήσεις για κάθε συνδυασμό εκφράζεται ως (Hicks and Turner 1999):

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_{ij} + \varepsilon_{k(ij)}$$

με $i = 1, 2, \dots, a$, $j = 1, 2, \dots, b$, $k = 1, 2, \dots, n$

και $\tau_{ij} = A_i + B_j + AB_{ij}$

όπου ο παράγοντας A_i υποδηλώνει την επίδραση του i επιπέδου του παράγοντα A, ο παράγοντας B_j υποδηλώνει την επίδραση του j επιπέδου του παράγοντα B, ο

παράγοντας AB_{ij} υποδηλώνει την αλληλεπίδραση του i επιπέδου του παράγοντα Α με το j επίπεδο του παράγοντα Β, ο παράγοντας $\varepsilon_{k(ij)}$ υποδηλώνει την απόκλιση της k τιμής στο ij επίπεδο συνδυασμού από τον μέσο όρο του πληθυσμού σε αυτό το επίπεδο και μ ο πραγματικός μέσος όρος του πληθυσμού από όπου τα δεδομένα προήλθαν.

Πίνακας 4.3

Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για πειραματικό σχέδιο 2 παραγόντων

Πηγή διακύμανσης	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσα τετράγωνα
Παράγοντας Α	SS_A	$a - 1$	$MS_A = \frac{SS_A}{a - 1}$
Παράγοντας Β	SS_B	$b - 1$	$MS_B = \frac{SS_B}{b - 1}$
Αλληλεπίδραση Α x Β	SS_{AB}	$(a - 1)(b - 1)$	$MS_{AB} = \frac{SS_{AB}}{(a - 1)(b - 1)}$
Σφάλμα $\varepsilon_{k(ij)}$	SS_E	$ab(n - 1)$	$MS_E = \frac{SS_E}{ab(n - 1)}$
Σύνολο	SS_T	$abn - 1$	

Τέλος, η ανάλυση του μοντέλου γίνεται με την κατάλληλη εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA, βλ. παρ. 4.2.3) ανάλογα με τον τύπο του πειραματικού σχεδίου που χρησιμοποιείται (Πίνακας 4.3).

Η εφαρμογή ενός τέτοιου πειραματικού σχεδίου (2^k) ενέχει ωστόσο τον κίνδυνο να μην είναι ιδιαίτερα πρακτική όταν πρέπει να ελεγχθεί μεγάλος αριθμός παραγόντων ($k > 2$) και όταν λαμβάνονται υπόψη άλλες παράμετροι όπως το κόστος και ο χρόνος της ανάλυσης (Araujo and Brereton 1996).

4.3.4 Κλασματικό παραγοντικό σχέδιο

Είναι αδιαμφισβήτητα το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο πειραματικό σχέδιο ιδίως όταν πρόκειται για μεγάλο αριθμό παραγόντων. Τέτοια σχέδια είναι μια καλή εναλλακτική επιλογή των πλήρως παραγοντικών σχεδίων και θεωρούνται ότι αποτελούν ένα προσεκτικά καθορισμένο και αντιπροσωπευτικό υποσύνολο ενός πλήρους παραγοντικού σχεδίου. Εδώ, ο αριθμός των πειραμάτων μειώνεται κατά έναν αριθμό p σύμφωνα με το 2^{k-p} σχέδιο (Σχήμα 4.4β). Συνήθως χρησιμοποιείται το κλασματικό σχέδιο στο οποίο τα πειράματα μειώνονται ακριβώς στο μισό ($p=1$). Τα σχέδια αυτά είναι ιδιαιτέρως χρήσιμα όταν ο αριθμός των πιθανών παραγόντων είναι σχετικά μεγάλος επειδή μειώνεται αισθητά ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων. Εκμεταλλεύονται το γεγονός ότι τριών ή και παραπάνω κατευθύνσεων αλληλεπιδράσεις είναι σπάνια σημαντικές. Ωστόσο, η απώλεια πληροφορίας είναι αναπόφευκτη και εντοπίζεται στο γεγονός ότι το κλασματικό παραγοντικό σχέδιο δεν μπορεί να εκτιμήσει την ανεξάρτητη επίδραση ορισμένων παραγόντων (Hanrahan, Zhu et al. 2005).

4.3.5 Πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο ή ιεραρχικό

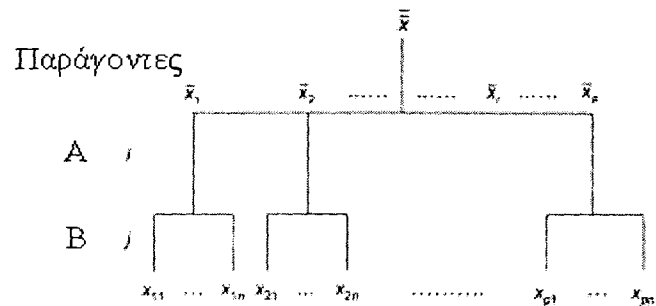
Σε αυτό το είδος σχεδίου τα επίπεδα ενός παράγοντα είναι ένθετα ή υποσύνολα των επιπέδων των άλλων παραγόντων. Το γενικό μοντέλο για δύο παράγοντες A και B με τον B να είναι ένθετος του A εκφράζεται ως (Hicks and Turner 1999):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$$

με $i = 1, 2, \dots, a$, $j = 1, 2, \dots, b$ και $k = 1, 2, \dots, n$

όπου όλα τα επίπεδα j του παράγοντα B είναι ένθετα του επιπέδου i του παράγοντα A. Ο παράγοντας $\varepsilon_{k(ij)}$ υποδηλώνει το ένθετο σφάλμα στα επίπεδα i και j .

Στο πλήρως ένθετο σχέδιο, ο αριθμός των επιπέδων του ένθετου παράγοντα δεν είναι απαραίτητο να είναι ο ίδιος για όλα τα επίπεδα των άλλων παραγόντων και επιπλέον δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις διότι τα επίπεδα των παραγόντων δεν διασταυρώνονται (Σχήμα 4.5).



Σχήμα 4.5. Πλήρως ένθετο σχέδιο δύο παραγόντων

Πίνακας 4.4.

Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για ένα ένθετο πειραματικό σχέδιο

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

Οι παράγοντες που κατά κύριο βαθμό επηρεάζονται από συστηματικές μεταβολές πρέπει να τοποθετούνται σε υψηλότερα επίπεδα ενώ αυτοί που επηρεάζονται από τυχαίες πρέπει να τοποθετούνται χαμηλότερα (Maroto, Riu et al. 1999).

Η ανάλυση και αυτού του σχεδίου γίνεται με τη χρήση της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) (Πίνακας 4.4).

4.4 Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (*Artificial Neural Networks, ANNs*)

4.4.1 Ορισμός

Τεχνητό Νευρωνικό Δίκτυο είναι μια αρχιτεκτονική δομή (*δίκτυο*) αποτελούμενη από πλήθος διασυνδεδεμένων μονάδων (*τεχνητοί νευρώνες*) (Λύκας 1999). Κάθε μονάδα χαρακτηρίζεται από εισόδους και εξόδους και υλοποιεί τοπικά έναν απλό υπολογισμό. Κάθε σύνδεση μεταξύ δύο μονάδων χαρακτηρίζεται από μια τιμή βάρους. Οι τιμές των βαρών των συνδέσεων αποτελούν τη γνώση που είναι αποθηκευμένη στο δίκτυο και καθορίζουν τη λειτουργικότητά του. Η έξοδος κάθε μονάδας καθορίζεται από τον τύπο της μονάδας, τη διασύνδεση με τις υπόλοιπες μονάδες και πιθανώς κάποιες εξωτερικές εισόδους. Πέρα από μία πιθανή δεδομένη λειτουργική ικανότητα ενός δικτύου, συνήθως ένα δίκτυο αναπτύσσει μία συνολική λειτουργικότητα μέσω μιας μορφής εκπαίδευσης.

4.4.2 Από τα βιολογικά στα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα

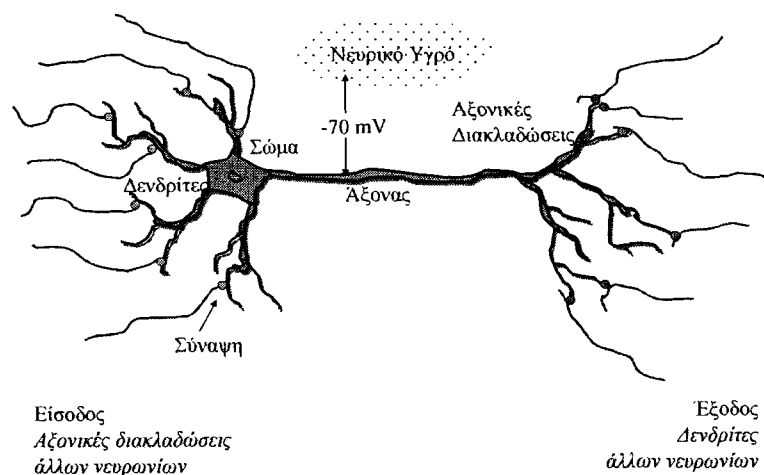
Οι σημαντικές ιδιότητες των βιολογικών συστημάτων όπως η προσαρμοστικότητα, η ικανότητα αναγνώρισης από τα συμφραζόμενα, η ανοχή στα λάθη, η μεγάλη χωρητικότητα μνήμης, η ικανότητα επεξεργασίας βιολογικών πληροφοριών σε πραγματικό χρόνο μας κατευθύνουν στη μελέτη και την προσπάθεια προσομοίωσης αυτών των εναλλακτικών βιολογικών αρχιτεκτονικών. Έχει λοιπόν αναπτυχθεί μια νέα τεχνολογία, που περιγράφεται με τον όρο νευρομορφική τεχνολογία (*neuromorphic engineering*) και η οποία βασίζεται στον σχεδιασμό και την κατασκευή τεχνητών νευρωνικών συστημάτων, των οποίων οι αρχιτεκτονικές και σχεδιαστικές αρχές ακολουθούν τις ίδιες αρχές που διέπουν και το βιολογικό νευρικό σύστημα (Λύκας 1999).

Υπάρχουν περίπου 3×10^{10} νευρώνια στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Κάθε νευρόνιο διαθέτει κατά μέσο όρο 10000 συνάψεις (*εισόδους*) και 500 συναπτικές απολήξεις (*εξόδους*). Το ανθρώπινο κεντρικό νευρικό σύστημα αποτελείται από περίπου 10^{15} συναπτικές συνδέσεις. Οι βασικές ιδιότητες των βιολογικών νευρωνικών δικτύων είναι οι εξής (Σπύρου 1997):

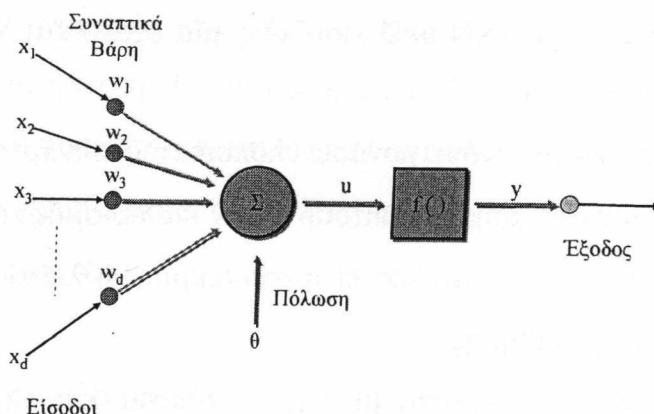
- Είναι απλές δομικές μονάδες
- Παρουσιάζουν ομοιόμορφη αρχιτεκτονική
- Πραγματοποιούν παράλληλα κατανεμημένη επεξεργασία
- Εμφανίζουν ταχύτητα επεξεργασίας και απόκρισης της τάξης των msec
- Επιδεικνύουν αξιόπιστη λειτουργία ακόμη και για θορυβώδη, ασαφή ή ημιτελή δεδομένα
- Εμφανίζουν ικανότητα λειτουργίας και σε συνθήκες βλάβης
- Έχουν τη δυνατότητα της αποθήκευσης και της ανάκλησης των πληροφοριών βάσει συσχετισμών
- Επιδεικνύουν προσαρμογή (ένα σύστημα για κάθε χρήση)

Στο Σχήμα 4.6 φαίνεται η βασική δομή ενός βιολογικού νευρώνα, ο οποίος αποτελείται από το σώμα, τον άξονα, τους δενδρίτες και τις συνάψεις.

Σε πλήρη αντιστοιχία με αυτό το απλοποιημένο μοντέλο του βιολογικού νευρώνα αναπτύχθηκε το μοντέλο του τεχνητού νευρώνα (Σχήμα 4.7).



Σχήμα 4.6. Βασική δομή νευρικού κυττάρου (Δενδρίτες: είσοδοι, δέχονται ηλεκτρικά σήματα από άλλους νευρώνες, άξονας: έξοδος, στέλνει ηλεκτρικούς παλμούς σταθερού πλάτους αλλά μεταβλητής συχνότητας, συνάψεις: σημεία ένωσης μεταξύ διακλαδώσεων του άξονα ενός νευρώνα και των δενδριτών από άλλους νευρώνες) (Σπύρου 1997)



Σχήμα 4.7. Βασική δομή τεχνητού νευρώνα (Σπύρου 1997)

Ας θεωρήσουμε έναν τεχνητό νευρώνα d με συνδέσεις εισόδου $x_1, \dots, x_d$ με αντίστοιχες τιμές βαρών $w_1, \dots, w_d$ (Σχήμα 4.7). Ο υπολογισμός που επιτελεί ένας νευρώνας διακρίνεται σε δύο στάδια (Λύκας 1999): α) τον υπολογισμό της ενεργοποίησης $u = \sum_{i=1}^d w_i x_i + \theta$, όπου θ η πόλωση του νευρώνα, β) τον υπολογισμό της εξόδου y του νευρώνα περνώντας την ενεργοποίηση u μέσα από μια συνάρτηση ενεργοποίησης f : $y = f(u)$. Η συνάρτηση ενεργοποίησης είναι συνήθως μη γραμμική, για να μπορεί να μοντελοποιεί μη γραμμικά φαινόμενα και στις περισσότερες περιπτώσεις είναι σιγμοειδής.

Η συνολική λειτουργικότητα ενός ANN καθορίζεται από α) την τοπολογία του δικτύου, β) τα χαρακτηριστικά των νευρώνων, γ) τη μέθοδο εκπαίδευσης και δ) τα δεδομένα με τα οποία γίνεται η εκπαίδευση.

4.4.3 Βασικές αρχές τεχνητών νευρωνικών δικτύων

Τα βασικά χαρακτηριστικά των ANNs περιλαμβάνουν:

I. Τις υπολογιστικές μονάδες. Υπάρχουν οι μονάδες εισόδου και εξόδου, οι οποίες ομαδοποιούνται σε επίπεδα ή στρώματα (*layers*). Οι μονάδες που δεν έχουν συνδέσεις με τον εξωτερικό κόσμο, λέμε ότι είναι «κρυμμένες» (*hidden*) ή εσωτερικές. Η σημειογραφία ενός ANN είναι ως εξής: (είσοδοι: κρυμμένα επίπεδα:

έξοδοι). Για παράδειγμα, ένα ANN με 3 εισόδους, μία έξοδο και 5 κρυμμένα επίπεδα περιγράφεται ως (3:5:1).

II. Τις συνδέσεις – βάρη. Κάθε μονάδα υλοποιεί μια συνάρτηση τοπικά και όλο το δίκτυο υλοποιεί μια συγκεκριμένη λειτουργία. Ο καθορισμός των παραμέτρων του δικτύου (τιμών βαρών) για να επιτελεστεί η συγκεκριμένη λειτουργία επιτυγχάνεται μέσω της διαδικασίας της μάθησης.

III. Την αρχιτεκτονική. Ανάλογα με την τοπολογία και τη δομή μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής: α) δίκτυα πρόσθιας τροφοδότησης (*feed forward*), τα οποία δεν περιέχουν κλειστά μονοπάτια από συνδέσεις, β) επαναληπτικά δίκτυα ή ανατροφοδοτούμενα, τα οποία επιτρέπουν την ύπαρξη κύκλων από συνδέσεις μεταξύ των μονάδων, γ) δίκτυα με δομή επιπέδων ή ιεραρχική και δ) δίκτυα με ανταγωνιστικές συνδέσεις (*competitive*).

IV. Τη μάθηση. Ο αντικειμενικός στόχος της διαδικασίας εκπαίδευσης είναι το ANN να αναπτύξει κατάλληλη εσωτερική δομή ώστε να αναγνωρίζει πρότυπα που θα μοιάζουν με αυτά με τα οποία εκπαιδεύτηκε. Υπάρχουν οι τεχνικές μάθησης με επίβλεψη (*supervised*) και οι αντίστοιχες χωρίς επίβλεψη (*unsupervised*).

Πίνακας 4.5

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ANNs

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
✓ Έμφυτος παραλληλισμός	✓ Δεν υπάρχουν σαφείς κανόνες για την ανάπτυξη ANN για οποιαδήποτε εφαρμογή
✓ Ανοχή σε βλάβες	✓ Δεν υπάρχει γενικός τρόπος για την ερμηνεία της εσωτερικής λειτουργίας του δικτύου
✓ Προσαρμοσμένη μάθηση	✓ Η εκπαίδευση μπορεί να είναι δύσκολη ή αδύνατη
✓ Αυτοοργάνωση	✓ Η ικανότητα γενίκευσης είναι δύσκολα προβλέψιμη

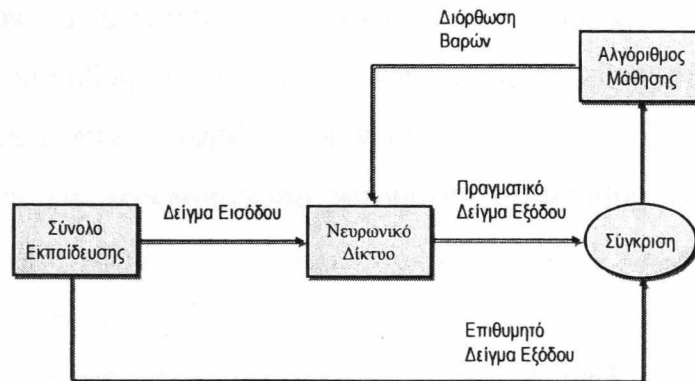
Σε γενικές γραμμές τα ANNs είναι κατάλληλα να αντιμετωπίσουν συγκεκριμένες κατηγορίες προβλημάτων και ειδικότερα προβλήματα εκπαίδευσης που αντιμετωπίζονται με συσχέτιση προτύπων. Η αντίληψη πάντως ότι τα ANNs μπορούν να λύσουν όλα τα προβλήματα αυτόματης απόκτησης γνώσης είναι μη ρεαλιστική (Λύκας 1999) (Πίνακας 4.5).

4.4.4 Εκπαίδευση – Γενίκευση

Γενικά η εκπαίδευση μπορεί να ορισθεί ως η κατάλληλη χρήση πληροφοριών για βελτίωση της συμπεριφοράς ενός συστήματος, ενώ στη συγκεκριμένη περίπτωση ορίζεται ως η τροποποίηση των παραμέτρων (βαρών) του ANN, ώστε χρησιμοποιώντας ένα σύνολο δεδομένων να πλησιάσουμε σταδιακά την επιθυμητή συμπεριφορά συγκρίνοντας την *τρέχουσα απόκριση* του δικτύου με την *επιθυμητή απόκριση*.

Ως σύνολο εκπαίδευσης νοείται ένα σύνολο δεδομένων απεικόνισης εισόδου/εξόδου τα οποία καθορίζουν την επιθυμητή συμπεριφορά του δικτύου. Στη μάθηση με επίβλεψη (Σχήμα 4.8), το σύνολο εκπαίδευσης παρέχει πληροφορίες για τη συσχέτιση των εισόδων με τις εξόδους και σημειώνεται ότι περιέχει έναν μικρό αριθμό ζευγών (εισόδου – εξόδου) σε σχέση με τον άπειρο πιθανό αριθμό τους. Στη μάθηση χωρίς επίβλεψη τα δεδομένα του συνόλου εκπαίδευσης είναι απεικονίσεις μόνο της εισόδου του ANN (Λύκας 1999).

Η εκπαίδευση τερματίζεται όταν το κριτήριο ελέγχου της ποιότητας του δικτύου φτάσει σε κάποια επιθυμητή τιμή. Τα κριτήρια ελέγχου ποιότητας είναι το μέσο σφάλμα του συνόλου εκπαίδευσης και η μεταβολή του (Βλαχάβας, Κεφαλάς et al.). Για να τερματίσει η φάση της εκπαίδευσης θα πρέπει η συνάρτηση σφάλματος που μετράει τη διαφορά μεταξύ των τρεχουσών και επιθυμητών αποκρίσεων να ελαχιστοποιηθεί.

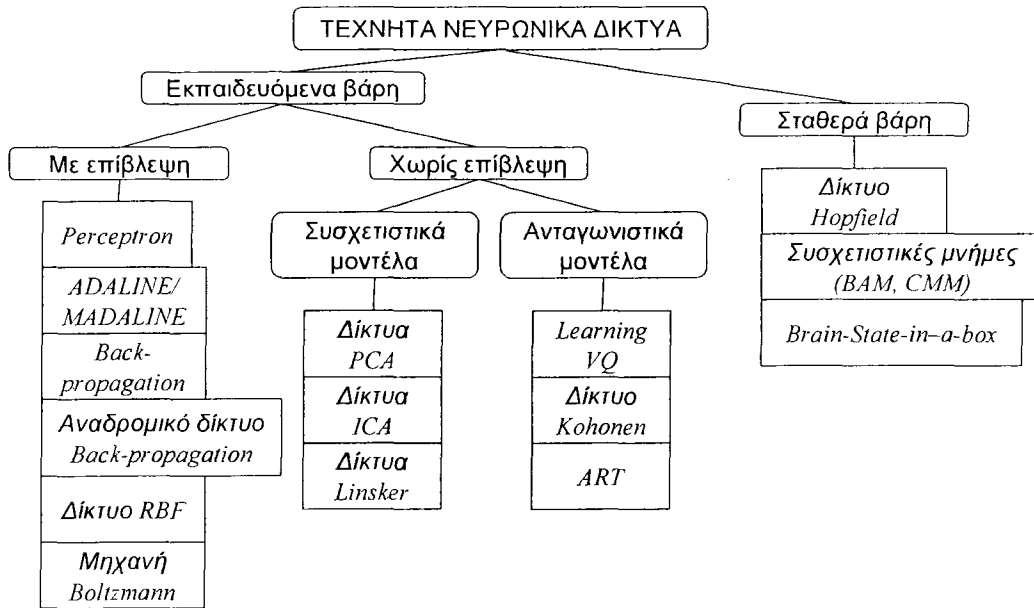


Σχήμα 4.8. Γενική πορεία επιβλεπόμενης μάθησης των ANNs (Σπύρου 1997)

Η τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως για τον υπολογισμό του σφάλματος γενίκευσης ενός εκπαιδευμένου μοντέλου θεωρεί ότι για την αξιολόγησή του χρησιμοποιούμε ένα ανεξάρτητο σύνολο προτύπων, που ονομάζεται σύνολο επικύρωσης (*validation set*), και με βάση τον αριθμό των σφαλμάτων στο σύνολο αυτό υπολογίζουμε τα σφάλματα ενός μοντέλου. Γενικά όσο προχωράει η εκπαίδευση, τόσο μειώνεται το σφάλμα εκπαίδευσης και μειώνεται και το σφάλμα επικύρωσης. Υπάρχει όμως ένα όριο πέρα από το οποίο περαιτέρω μείωση του σφάλματος εκπαίδευσης οδηγεί σε αύξηση του σφάλματος επικύρωσης, διότι αρχίζει και εμφανίζεται το φαινόμενο της υπερεκπαίδευσης (*overtraining*). Το τελευταίο σημαίνει ότι το μοντέλο έχει πολύ μεγάλο αριθμό παραμέτρων και έχει στην ουσία απομνημονεύσει τα δεδομένα, μειώνοντας έτσι τη γενικευτική του ικανότητα. Όταν αυτή αρχίζει να μειώνεται θεωρούμε ότι φτάσαμε σε βέλτιστο μοντέλο.

Μετά το τέλος της εκπαίδευσης το ANN για κάθε είσοδο θα πρέπει να παρέχει την αντίστοιχη επιθυμητή έξοδο. Ο στόχος της γενίκευσης είναι να επιτυγχάνεται το ίδιο και για εισόδους διαφορετικές από αυτές του συνόλου εκπαίδευσης.

Υπάρχουν πολλά είδη νευρωνικών δικτύων και όλα περιγράφονται από τη συνάρτηση ενεργοποίησης των νευρώνων, τον κανόνα εκμάθησης και τον τύπο διασύνδεσης. Στο Σχήμα 4.9 φαίνεται η ταξινόμηση και τα είδη των τεχνητών νευρωνικών δικτύων.

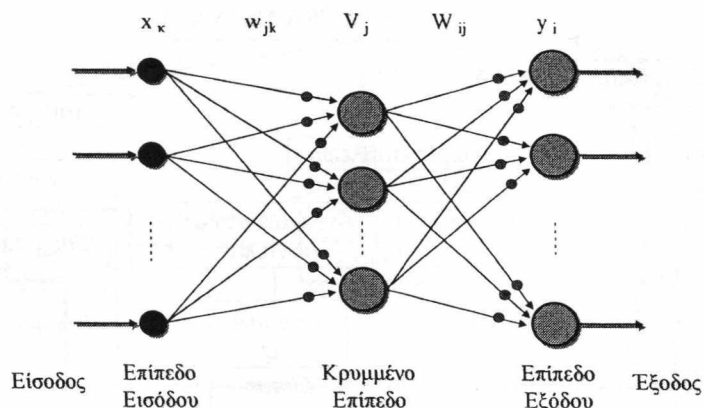


Σχήμα 4.9. Ταξινόμηση νευρωνικών μοντέλων (Διαμαντάρας)

4.4.5 Το Πολυεπίπεδο Perceptron (Multi layer Perceptron, MLP)

Το πολυεπίπεδο perceptron είναι ένα από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα ANNs, αποτελεί δίκτυο πρόσθιας τροφοδότησης (Σχήμα 4.10) και περιλαμβάνει ένα επίπεδο εισόδου, x , ένα ή περισσότερα κρυμμένα επίπεδα, V , και ένα επίπεδο εξόδου, y .

Οι κρυμμένοι νευρώνες ενός πολυεπίπεδου perceptron περιέχουν μια μη-γραμμική συνάρτηση ενεργοποίησης και συνήθως χρησιμοποιείται η σιγμοειδής. Η ύπαρξη ακριβώς της μη-γραμμικότητας είναι αυτή που προσδίδει στα δίκτυα MLP τις επιθυμητές υπολογιστικές ικανότητες. Τα -ένα ή περισσότερα- κρυμμένα επίπεδα μη γραμμικών νευρώνων δεν ανήκουν στα επίπεδα εισόδου ή εξόδου.



Σχήμα 4.10. Νευρωνικό δίκτυο πρόσθιας τροφοδότησης (Σπύρου 1997)

Η βασική λειτουργία που επιτελεί ένα δίκτυο MLP είναι η υλοποίηση απεικόνισης (*mapping*) από το χώρο των εισόδων στο χώρο των εξόδων, χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκπαίδευσης και τους κατάλληλους αλγόριθμους εκπαίδευσης. Μάλιστα έχει αποδειχθεί θεωρητικά ότι έχει αυξημένες δυνατότητες απεικόνισης και χαρακτηρίζεται από την ιδιότητα της *παγκόσμιας προσέγγισης* (*universal approximation*) (Hornik 1993; Busche 2004; Bas and Boyact 2007). Η ιδιότητα αυτή πέρα από τον αυστηρό μαθηματικό ορισμό της σημαίνει το εξής: ένα MLP με τουλάχιστον ένα κρυμμένο επίπεδο με μη γραμμικές κρυμμένες μονάδες μπορεί να προσεγγίσει οποιαδήποτε συνάρτηση με οποιοδήποτε ακρίβεια, αυξάνοντας κατάλληλα τον αριθμό των κρυμμένων μονάδων (Λύκας 1999).

Λόγω και της συγκεκριμένης ιδιότητάς τους, τα δίκτυα MLP είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα για την κατασκευή συστημάτων πρόβλεψης (*prediction*), την κατασκευή μοντέλων από δεδομένα (*data fitting*), τον έλεγχο συστημάτων, τα προβλήματα ταξινόμησης (*classification*), μέχρι και την επίλυση μερικών διαφορικών εξισώσεων. Επιπλέον τα ANNs μάθησης με επίβλεψη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικά εργαλεία της κλασσικής μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης (*response surface*) (Agatonovic-Kustrin and Beresford 2000).

Για την εκπαίδευση και κατ' επέκταση την ελαχιστοποίηση του σφάλματος γενίκευσης χρησιμοποιούνται αλγόριθμοι εκπαίδευσης. Ο πιο γνωστός είναι ο back-

propagation. Οι πιο μοντέρνοι δευτέρου βαθμού αλγόριθμοι, όπως οι conjugate gradient descent και Levenberg-Marquardt είναι ουσιαστικά πιο γρήγοροι για πολλά προβλήματα αλλά ο back-propagation πλεονεκτεί έναντι των μοντέρνων για κάποιες περιπτώσεις και παραμένει ο πιο απλός και κατανοητός αλγόριθμος.

Όπως προαναφέρθηκε η εκπαίδευση γίνεται μέσω ενός συνόλου δεδομένων, για παράδειγμα ένα σύνολο ζευγών τιμών εισόδου-εξόδου. Το «πέρασμα» ενός αλγόριθμου από αυτό το σύνολο εκπαίδευσης μία φορά, π.χ. μία φορά το κάθε ζεύγος τιμών, ονομάζεται εποχή (*epoch*). Κατά την εφαρμογή του αλγόριθμου back-propagation, υπολογίζεται το άνυσμα της κλίσης της επιφάνειας του σφάλματος που προκύπτει από το πέρασμα από π.χ. το πρώτο ζεύγος τιμών του συνόλου εκπαίδευσης. Στη συνέχεια, με τη μέθοδο της απότομης καθόδου (*steepest descent*) συνεχώς αναζητά το ελάχιστο σημείο της επιφάνειας σφάλματος. Έτσι γίνεται αναπροσαρμογή των βαρών του δικτύου μετά από κάθε περίπτωση, π.χ. ζεύγος τιμών, με επαναληπτικό τρόπο. Η διαδικασία εκπαίδευσης εκτελείται σε επαναλήψεις εποχών εωσότου τα βάρη σταθεροποιηθούν σε συγκεκριμένες τιμές για τις οποίες η μέση τιμή σφάλματος (για το σύνολο εκπαίδευσης) συγκλίνει στην ελάχιστη τιμή της.

Η μοντέρνα «εκδοχή» του αλγόριθμου back-propagation, είναι ο conjugated gradient descent (Svozil, Kvasnicka et al. 1997). Η βελτίωση έγκειται στο γεγονός ότι ο νέος αλγόριθμος επεξεργάζεται τη μέση κλίση της επιφάνειας σφάλματος που προκύπτει από όλες τις περιπτώσεις, π.χ. από όλα τα ζεύγη τιμών του συνόλου εκπαίδευσης, πριν την ενημέρωση των βαρών, μία φορά στο τέλος κάθε εποχής. Για ένα δεδομένο αριθμό επαναλήψεων, ο νέος αλγόριθμος κατάφερε να μειώσει το σφάλμα πιο γρήγορα και να οδηγήσει σε μικρότερη τιμή σφάλματος σε σχέση με τον αλγόριθμο back-propagation (Barnard 1992).

4.4.6 Εφαρμογές των ANNs στη χημεία

Από το 1986 αυξάνεται ολοένα το ενδιαφέρον για την εφαρμογή των ANNs στη χημεία. Οι ποικίλες εφαρμογές τους συνοψίζονται κυρίως στην ταξινόμηση, αναγνώριση προτύπων, πρόβλεψη και προσομοίωση. Κάποιοι τομείς της χημείας που

έχουν ενσωματώσει ή ακόμη διερευνούν τη χρήση των ANNs για την αντιμετώπιση βασικών ζητημάτων τους παρατίθενται παρακάτω:

➤ **Φασματοσκοπία**

Εδώ, η κύρια εφαρμογή των ANNs βρίσκεται στην προσπάθεια συσχετισμού των διαφόρων ειδών φάσματος (υπέρυθρο, υπεριώδες, ορατό, NMR κ. τ. λ.) με τη χημική δομή των αντίστοιχων ενώσεων (Andrews and Leiberman 1994; Goodacre, Neal et al. 1994; Baczek, Bucinski et al. 2004; Ni, Zhang et al. 2005). Επιπλέον, τα ANNs έχουν χρησιμοποιηθεί και για την πρόβλεψη του φάσματος μιας ένωσης υπό μελέτη (Clouser and Jurs 1994) ή για την πρόβλεψη της σύστασης ενός μίγματος ουσιών από τα φασματικά δεδομένα (Li, He et al. 2007).

➤ **Έλεγχος διεργασιών**

Κατά τον έλεγχο διεργασιών όλα τα δεδομένα προέρχονται από μη-γραμμικές εξισώσεις ή από μη-γραμμικές διεργασίες και γι' αυτό είναι πολύ δύσκολη η προσομοίωση ή πρόβλεψη. Η επιτυχία της εφαρμογής των ANNs σε τέτοιες μελέτες οφείλεται στο ότι το κατάλληλο δίκτυο μπορεί να προβλέψει ένα πιθανό σφάλμα πριν αυτό συμβεί (Kavuri and Venkatasubramanian 1993) ή ότι μπορεί να γίνει έλεγχος της ίδιας της διεργασίας (Puebla 1994).

➤ **Πρωτεϊνική δομή**

Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από αμινοξέα η θέση των οποίων και κυρίως η σειρά τοποθέτησής τους αποτελεί την πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Αυτή η γραμμική δομή διπλώνει και μετατρέπεται σε τρισδιάστατη ή αλλιώς δευτερογενή δομή. Η τελευταία καθορίζει και τη βιολογική δράση των πρωτεϊνών. Τα ANNs μπορούν να προβλέψουν τη δευτεροταγή δομή μιας πρωτεΐνης γνωρίζοντας την πρωτοταγή δομή της (Vieth, Kolinski et al. 1992). Κάποιες προσπάθειες έχουν γίνει και για πρόβλεψη της τεταρτοταγούς δομής πρωτεϊνών (Svozil, Kvasnicka et al. 1997).

➤ **Ποσοτική σχέση των δραστικών δομών (QSAR)**

Εδώ η έρευνα εστιάζει στην ποσοτικοποίηση της σχέσης μεταξύ δομών και ιδιοτήτων. Η μη-γραμμική σχέση επιτυχώς επιλύθηκε με την εφαρμογή των νευρωνικών δικτύων που σ' αυτή την περίπτωση λειτουργούν ως το μέσο προσέγγισης

της συνάρτησης (Manallack, David et al. 1994; Brasquet, Bourges et al. 1999). Στον τομέα της φαρμακευτικής επίσης, τα νευρωνικά δίκτυα κατάφεραν να παραγάγουν χρήσιμα μοντέλα της υδατοδιαλυτότητας φαρμάκων με παρόμοια δομή (Huuskonen, Salo et al. 1997).

➤ **Αναλυτική χημεία**

Η χρήση των ANNs στην αναλυτική χημεία δεν περιορίζεται μόνο στη φασματομετρία αλλά επεκτείνεται και σε πολλά άλλα θέματα (Kateman 1993). Έχουν επιτυχώς εφαρμοσθεί για την πρόβλεψη των χρόνων κατακράτησης κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό ενώσεων (Bruchmann, Zinn et al. 1993; Hu, Zhou et al. 1996; Agatonovic-Kustrin, Zecevic et al. 1998; Madden, Avdalovic et al. 2001) καθώς και στην επεξεργασία του σήματος χημικών αισθητήρων (Sommer, Tobias et al. 1993). Τελευταία, τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται στη βελτιστοποίηση αναλυτικών μεθόδων σε συνδυασμό με το πειραματικό σχέδιο, προσφέροντας μια πιο εύκολη, γρήγορη και καλύτερης προσέγγισης των βέλτιστων συνθηκών τεχνική (Frias-Garcia, Sanchez et al. 2004; Spanila, Pazourek et al. 2005).

αυτή τη στιγμή, η κατάσταση της αγοράς είναι πολύ δύσκολη. Η οικονομία είναι σε ύφεση, η ανεργία είναι υψηλή, και οι επιχειρήσεις αντιμετωπίζουν σημαντικές προκλήσεις. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα σημεία αισιοδοξίας. Η κυβέρνηση έχει λάβει μέτρα για την υποστήριξη της οικονομίας, και οι επιχειρήσεις έχουν δείξει ικανότητα προσαρμογής. Η αγορά εργασίας, αν και δύσκολη, παρουσιάζει ορισμένα σημεία ανάπτυξης, ιδιαίτερα σε ορισμένα τομείς. Η τεχνολογία και η đổiυσή είναι παράγοντες που μπορούν να βοηθήσουν στην ανάπτυξη. Η εκπαίδευση και η κατάρτιση είναι επίσης σημαντικές για την προετοιμασία της εργατικής δύναμης. Η κοινωνία πρέπει να είναι ενωτική και να υποστηρίξει τις προσπάθειες της κυβέρνησης και των επιχειρήσεων. Η υγεία της οικονομίας εξαρτάται από την αποτελεσματικότητα των μέτρων που λαμβάνονται. Η διαφάνεια και η εμπιστοσύνη είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη. Η αγορά πρέπει να λειτουργεί ελεύθερα, αλλά με την κατάλληλη ρύθμιση. Η καινοτομία και η ανταγωνιστικότητα είναι απαραίτητες για την πρόοδο. Η κοινωνική δικαιοσύνη και η αλληλεγγύη είναι επίσης σημαντικές. Η οικονομία πρέπει να είναι βιώσιμη και να προσφέρει ευκαιρίες για όλους. Η ανάπτυξη είναι μια μακροχρόνια προσπάθεια, αλλά με την κατάλληλη προσέγγιση, είναι δυνατό να πετύχουμε τα αποτελέσματα που θέλουμε.

B. Σκοπός και αντικείμενο της Διδακτορικής Διατριβής

Η εκπόνηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής πραγματεύεται τη βελτιστοποίηση και εφαρμογή αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό δύο επιλεγμένων φυτοφαρμάκων καθώς και των κοινών τους μεταβολιτών σε διάφορους τύπους υδάτων, σε ιζήματα ποικίλης προέλευσης και σε επιλεγμένα φρούτα και λαχανικά. Το ενδιαφέρον της εστιάζεται επιπλέον στην υπολειμματικότητα των παραπάνω ενώσεων σε ορισμένα είδη τροφίμων που συμπεριλαμβάνονται στο κοινώς λεγόμενο “καλάθι της νοικοκυράς”. Η ανάλυση ιζημάτων και φυσικών υδάτων αποτελεί προέκταση της ερευνητικής μελέτης που είχε πραγματοποιηθεί στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης. Η χρήση χημειομετρικών μεθόδων διαπερνά όλο τον κορμό της ερευνητικής εργασίας σε μια προσπάθεια εφαρμογής τους, τόσο για τη βελτιστοποίηση των αναλυτικών μεθόδων όσο και για την εκτίμηση του βαθμού της -προερχόμενης από την ανάκτηση- αβεβαιότητας αυτών. Έτσι γίνεται χρήση δύο διαφορετικών πειραματικών σχεδιασμών και επιπλέον επιχειρείται συνδυασμός με υπολογιστικά μοντέλα που ανήκουν στον κλάδο της Τεχνητής Νοημοσύνης, τα Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα. Επιπλέον, γίνεται προσπάθεια αξιολόγησης του κινδύνου των καταναλωτών των επιλεγμένων τροφίμων λόγω της υπολειμματικότητας των δύο φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους.

Η επιλογή των ενώσεων καθώς και των μεθόδων ανάλυσης στα συγκεκριμένα υποστρώματα έγινε λαμβάνοντας υπόψη τα στοιχεία που ήδη παρατέθηκαν στο θεωρητικό μέρος. Έτσι επιλέχθηκαν τα ευρέως χρησιμοποιούμενα σε γεωργικές καλλιέργειες ζιζανιοκτόνα linuron και diuron. Επιπλέον, οι παραπάνω ενώσεις συμπεριλαμβάνονται στις λίστες των ύποπτων ενώσεων για ενδοκρινική διαταρακτική δράση τόσο της Ευρωπαϊκής Ένωσης όσο και της Ένωσης Περιβαλλοντικής Προστασίας των Η.Π.Α. Η συνεκτίμηση των υπολειμμάτων τριών κοινών μεταβολιτών τους (DCPMU, DCPU και 3,4-DCA) κρίθηκε επίσης απαραίτητη αφού σε μερικές περιπτώσεις τα υπολείμματα των προϊόντων διάσπασης μπορεί να υπερβαίνουν αυτά των αρχικών ενώσεων, όσο και λόγω του γεγονότος ότι για τους

μεταβολίτες των περισσότερων φυτοφαρμάκων δεν έχουν ακόμη θεσπιστεί ασφαλή όρια (π.χ MRLs ή ADIs). Στα παραπάνω προστίθεται η ανάγκη για εύρεση απλούστερων, εκλεκτικότερων, ακριβέστερων και ταχύτερων αναλυτικών μεθόδων ταυτόχρονου προσδιορισμού των φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους εκτός των φυσικών υδάτων σε πολύπλοκα από τη φύση τους υποστρώματα όπως τα ιζήματα και τα τρόφιμα.

Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκαν να μελετηθούν τρεις αναλυτικές μέθοδοι ως οι πιο αρμόζουσες. Η εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων για τα ιζήματα, η εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (SPE) για τα φυσικά νερά και η μέθοδος εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος στη στερεά φάση (MSPD) για τα τρόφιμα. Επειδή οι επιλεγμένες ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των φαινολογικών και είναι θερμικά ασταθείς καθώς και ενδιάμεσης γενικά πολικότητας, επιλέχθηκε η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους, σειριακό φωτοδιόδων (HPLC-UV/DAD) ως η μέθοδος ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού τους.

Σκοπό της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποτέλεσε και ο έλεγχος των κυριότερων παραμέτρων που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την απόδοση τόσο της μεθόδου SPE όσο και της MSPD ώστε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για το μίγμα των δύο EDCs και των μεταβολιτών τους σε κάθε περίπτωση. Περαιτέρω, η βελτιστοποίηση της μεθόδου MSPD έγινε εκτός της κλασσικής (ένας παράγοντας τη φορά) προσέγγισης με τη χρήση πειραματικού σχεδιασμού σε συνδυασμό με τη χρήση μοντέλων όπως τα τεχνητά νευρωνικά δίκτυα με στόχο τη σύγκριση των δύο μεθόδων αλλά και την ουσιαστικότερη χαρτογράφηση και τελικά προσέγγιση των βέλτιστων συνθηκών.

Η ιχνηλασιμότητα σε συνδυασμό με το βαθμό αξιοπιστίας θα πρέπει να αποτελούν παραμέτρους που ορίζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων και έτσι θα πρέπει αυτά να παρουσιάζονται. Σε αυτά τα πλαίσια, η εκτίμηση της *αβεβαιότητας* μιας μεθόδου αποτελεί πολύ σημαντικό πεδίο ενδιαφέροντος για τον τομέα της χημείας που αφορά μετρήσεις. Με βάση τα παραπάνω, σ' αυτήν τη Διδακτορική Διατριβή έγινε μια προσπάθεια προσδιορισμού της προερχόμενης από την ανάκτηση αβεβαιότητας των

τριών μεθόδων εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν. Για την επίτευξη του στόχου χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο.

Τέλος, η μέθοδος MSPD εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων των επιλεγμένων ενώσεων και των μεταβολιτών τους σε δείγματα φρούτων και λαχανικών αντιπροσωπευτικών του «καλαθιού της νοικοκυράς» που περιλάμβαναν μήλα, καρότα, πατάτες, σιτάλευρα και χυμούς πορτοκαλιών. Ο τελικός στόχος ήταν η εκτίμηση της επικινδυνότητας από την ημερήσια πρόσληψη των παραπάνω τροφίμων για τους καταναλωτές.

Γ. Πειραματικό μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Πρότυπες ενώσεις και διαλύματα αυτών

Οι πρότυπες ενώσεις των φυτοφαρμάκων linuron και diuron καθώς και του εσωτερικού προτύπου metobromuron (αναλυτικής καθαρότητας >99%) αγοράστηκαν από τη Riedel-de-Häen, (*Seelze - Hannover, Germany*), ενώ οι αντίστοιχες των μεταβολιτών DCPU, DCPMU και 3,4-DCA (καθαρότητας >99.4%) προμηθεύτηκαν από τη Dr. Ehrenstorfer GmbH (*Augsburg, Germany*). Τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης κάθε δραστικής ουσίας παρασκευάστηκαν σε ακετονιτρίλιο στη συγκέντρωση των 2000 mg/L και φυλάχθηκαν σε γυάλινα αεροστεγώς κλεισμένα φιαλίδια των 10 ml στους -20°C. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας των αναλυόμενων ουσιών, του εσωτερικού προτύπου αλλά και των μιγμάτων τους σε διάφορες συγκεντρώσεις παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις σε ακετονιτρίλιο/νερό (50:50). Όλα τα διαλύματα εργασίας φυλάσσονταν στους 4°C αφού οι αναλυόμενες ουσίες δεν υφίστανται ουσιαστική διάσπαση για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 6 μηνών (Van Hoof, Van Wiele et al. 2002).

5.2 Διαλύτες-Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο, ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας και μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα καθώς και το νερό ήταν υψηλής καθαρότητας, κατάλληλοι για ανάλυση με υγρή χρωματογραφία (*HPLC-grade*) και αγοράστηκαν από τη Merck (*Darmstadt, Germany*).

Το χλωριούχο νάτριο (*NaCl*) καθαρότητας πάνω από 99.5% και τα χουμικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα επίδρασης παραγόντων αγοράστηκαν από τις Aldrich (*Milwaukee, WI, USA*) και Fluka (*Buchs, Switzerland*) αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (*DOC*) που εμπεριείχε το διάλυμα των χουμικών οξέων που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, μετρήθηκε και βρέθηκε 63.95 mg/L.

5.3 Όργανα-Συσκευές

Ιζήματα

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή λυοφιλοποίησης, μοντέλο LP3, της Jouan (*Saint-Herblain, France*). Επιπλέον, για την εκχύλιση των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους από τα δείγματα ιζημάτων χρησιμοποιήθηκε συσκευή συνεχούς ανακίνησης της Edmund Buhler P1, Tubigen και συσκευή υπερήχων (*FRITSCH GMBH laborette 17, Germany, 40 kHz*).

Νερά

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (*SPE*) συνδεδεμένη με αντλία κενού της Millipore. Για τη μέτρηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν συσκευή μέτρησης του pH, μοντέλο 701A, της Orion research και αγωγιμόμετρο, YSI τύπου 31, της Yellow Springs, Ohio. Ο περιεχόμενος διαλυμένος οργανικός άνθρακας (*DOC*) στο διάλυμα χουμικών οξέων προσδιορίστηκε με έναν αναλυτή ολικού οργανικού άνθρακα TOC-5000 της Shimadzu (*Tokyo, Japan*).

5.4 Υλικά

Οι μικροστήλες εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (*SPE cartridges*) που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα επιφανειακά νερά ήταν δύο ειδών: οι μικροστήλες πυριτικής βάσης Chromabond C₁₈ Hydra (6 ml, 1000 mg) για πολικές ενώσεις και οι μικροστήλες πολυμερούς ρητίνης Chromabond HR-P (6 ml, 1000 mg). Και οι δύο τύποι αγοράστηκαν από τη Macherey-Nagel (Düren, Germany).

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των μικροστηλών MSPD για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από δείγματα τροφίμων περιλάμβαναν: το Florisil (60–100 mesh) και το υλικό LiChroprep RP-18 (40–63 μm) που αγοράστηκαν από τη Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) και τη Merck (Darmstadt, Germany), αντίστοιχα. Το Florisil ενεργοποιήθηκε με θέρμανση σε φούρνο στους 150°C για 12 h και στη συνέχεια αφέθηκε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου σε ξηραντήρα πριν από τη χρήση του. Για την κατασκευή των μικροστηλών χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες πολυπροπυλενίου χωρητικότητας 15 mL. Για το τάπωμα των μικροστηλών (άνω και κάτω άκρο) χρησιμοποιήθηκε πυριτικός υαλοάνθρακας αναλυτικής καθαρότητας αγορασμένο από τη Serva (Heidelberg, Germany). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα μεμβρανών Supor-200 (25 mm, 0.2 μm) προμηθευμένα από την Pall Corp. (Michigan, USA) για τη συγκράτηση του πληρωτικού υλικού στις μικροστήλες MSPD.

5.5 Δείγματα

5.5.1 Δείγματα ιζημάτων

Τα δείγματα των ιζημάτων συλλέχθηκαν από την περιοχή της Ηπείρου (Β.Α. Ελλάδα, περιοχές: Μαρίνα της Πρέβεζας, ποταμός Λούρος, λίμνη Παμβώτιδα) με κατάλληλο δειγματολήπτη, ξηράθηκαν, περάστηκαν από κόσκινο 2 mm και φυλάχθηκαν σε κατάψυξη (-20°C) μέχρι την εκτέλεση των πειραμάτων. Για την ξήρανση των δειγμάτων ιζήματος πραγματοποιήθηκε λυοφιλοποίηση σε θερμοκρασία -49°C και υπό κενό 10⁻² bar.

5.5.2 Δείγματα νερών

Τα δείγματα των επιφανειακών υδάτων συλλέχθηκαν από την περιοχή Ηπείρου (*Β.Α. Ελλάδα*) και περιελάμβαναν νερό θάλασσας (*Ιόνιο Πέλαγος*), ποταμίου (*Λούρος*) και λίμνης (*Παμβώτιδα*). Η συλλογή έγινε σε σκούρες γυάλινες φιάλες του 1 L και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4°C σε σκοτάδι μέχρι την εκτέλεση των πειραμάτων.

5.5.3 Δείγματα τροφίμων

Για την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πατάτας που συλλέχθηκαν από την τοπική αγορά στην περιοχή των Ιωαννίνων. Για την μελέτη της αβεβαιότητας της μεθόδου και της καταλληλότητας της για άλλους τύπους τροφίμων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πατάτας, μήλου και σιτάλευρων επίσης από την περιοχή των Ιωαννίνων. Τέλος, η μελέτη των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους πραγματοποιήθηκε σε μια σειρά δειγμάτων τροφίμων που συλλέχθηκαν στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος COMPENDO (*Comparative Research on Endocrine Disruptors*). Συνολικά, δέκα χώρες μέλη της Ε.Ε. που συμμετείχαν στο πρόγραμμα συμπεριλαμβανόμενης και της Ελλάδος συνέλλεξαν διάφορα είδη τροφίμων λαμβάνοντας υπόψη της διατροφικές συνήθειες των χωρών σύμφωνα με το Πρόγραμμα Τροφίμων (*GMES/Food Program, Global Environment Monitoring System, Food Contamination Monitoring and Assessment Program*) του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας (*WHO, World Health Organization*). Τα δείγματα συλλέχθηκαν σε τρεις διαφορετικές περιόδους του έτους (*Ιανουάριο-Φεβρουάριο, Απρίλιο-Μάιο, Σεπτέμβριο-Οκτώβριο του 2003*) από την εκάστοτε τοπική αγορά και ήταν αντιπροσωπευτικά του «καλαθιού της νοικοκυράς». Τα τρόφιμα που αφορούν στην συγκεκριμένη μελέτη περιλαμβάνουν τα: καρότα, μήλα, πατάτες, σιτάλευρα και χυμούς πορτοκαλιού. Τα κυριότερα θρεπτικά συστατικά των παραπάνω τροφίμων φαίνονται στον Πίνακα 5.1. Όλα τα δείγματα μετά την παραλαβή τους φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.

Πίνακας 5.1**Θρεπτικά συστατικά των επιλεγμένων τροφίμων (USDA 2005)**

Θρεπτικά συστατικά (ανά 100g βρώσιμου τμήματος)	Καρότα	Χυμός πορτ.	Μήλα	Πατάτες	Σιτάλευρα
Νερό (g)	88.29	88.40	85.56	83.29	12.17
Πρωτεΐνες (g)	0.93	0.80	0.26	2.57	11.66
Υδατάνθρακες (g)	9.58	10.06	13.81	12.44	74.05
Ολικά λιπίδια (g)	0.24	0.27	0.17	0.10	1.43
Ίνες (g)	2.8	0.2	2.4	2.5	2.04
Ολικά σάκχαρα (g)	4.54	-	10.39	-	0.31
Βιταμίνη C (mg)	5.9	32.9	4.6	11.4	0
Βιταμίνη A (IU)	16811	78	54	0	2.6
α-καροτίνιο (mcg)	3477	-	0	-	0
β-καροτίνιο (mcg)	8285	-	27	-	1.4
Λουτεΐνη και ζεαξανθίνη (mcg)	256	-	29	-	82.8

Για την προκατεργασία όλων των τροφίμων ακολουθήθηκε το ανάλογο πρωτόκολλο (Department of Health and Human Services 1994). Πριν τον τεμαχισμό, το άλεσμα ή την ανάμιξη επιλέχθηκαν 5 με 7 τεμάχια αντιπροσωπευτικά του κάθε είδους τροφίμου. Για τα τρόφιμα στερεάς μορφής, ολόκληρο το κάθε τεμάχιο πολτοποιήθηκε και αναμίχθηκε ισχυρά για τη διασφάλιση της ομοιογένειας και αντιπροσωπευτικότητας του δείγματος προς ανάλυση. Το τελικό δείγμα προς ανάλυση παρασκευάστηκε από ίσες ποσότητες από κάθε τεμάχιο πριν την επιπλέον ανάμιξη και ομογενοποίηση. Τα δείγματα τροφίμων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη,

επικύρωση και περαιτέρω μελέτη της μεθόδου εκχύλισης αναλύθηκαν προηγουμένως ώστε να διασφαλιστεί η απουσία των ενώσεων προς μελέτη.

5.6 Εμβολιασμός Δειγμάτων

5.6.1. Ιζήματα

Για την επικύρωση της αναλυτικής μεθοδολογίας και την εκτίμηση των επιδράσεων στην απόδοση αυτής, ιζήματα με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (θαλασσινά, ποτάμια και λιμναία) (Πίνακας 5.2) εμβολιάστηκαν με τις αναλυόμενες ενώσεις. Προηγουμένως, έγινε ανάλυση των δειγμάτων για να διασφαλιστεί η μη-ύπαρξη ιχνών των αναλυτών.

Πίνακας 5.2

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ιζημάτων

Ιζήματα	Άμμος (%)	Ιλύς (%)	Πηλός (%)	TOC ^a (%)	pH
Λίμνη Παμβώτιδα	73.1	16.2	10.7	13.67	7.69
Ποτάμι Λούρος	38.1	42.2	19.7	5.76	7.86
Ιόνιο Πέλαγος	64.4	16.6	19.0	2.04	5.17

^aTOC (total organic carbon)=ολικός οργανικός άνθρακας

Η διαδικασία εμβολιασμού είχε ως εξής: μια κατάλληλη ποσότητα από το πρότυπο μίγμα των EDCs και των μεταβολιτών τους (*linuron*, *diuron*, *DCPU*, *DCPMU* and *3,4-DCA*) προστέθηκε σε 20 ml ακετόνη. Στη συνέχεια το διάλυμα ακετόνης προστέθηκε σε 20 g λυοφιλοποιημένου και κοσκινισμένου ιζήματος (ένα από κάθε τύπο) ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις στο μίγμα των αναλυόμενων ουσιών να κυμαίνονται από 5 μέχρι 100 µg/Kg (ξηρού ιζήματος, β./β.). Έπειτα, τα εμβολιασμένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή ανατάραξης σε θερμοκρασία δωματίου για 8h, διατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4 °C, και επαναλήφθηκε η ανατάραξη για άλλες 4h μέχρι πλήρους εξάτμισης του διαλύτη. Μετά

το τέλος αυτής της διεργασίας, τα δείγματα ήταν έτοιμα για την εκχύλιση με τη μέθοδο των υπερήχων.

Η μελέτη της περιοχής γραμμικότητας της μεθόδου περιελάμβανε το σύνολο της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος μετά τον εμβολιασμό του. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη χρήση καμπυλών αναφοράς 5 σημείων σε εύρος συγκεντρώσεων αντίστοιχο με τα αναμενόμενα επίπεδα προσδιορισμού των αναλυόμενων ουσιών σε πραγματικά δείγματα. Οι καμπύλες αναφοράς κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τα εμβολιασμένα δείγματα σε γνωστές συγκεντρώσεις και τα εμβαδά των αντίστοιχων κορυφών για τους διαφορετικούς τύπους ιζημάτων.

5.6.2 Νερά

Τα δείγματα των επιφανειακών νερών χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης και για τον προσδιορισμό πιθανών επιδράσεων οφειλόμενες στα διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υποστρωμάτων. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των διαφορετικού τύπου νερών προσδιορίστηκαν και απεικονίζονται στο Πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.3

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των επιφανειακών υδάτων

Προέλευση	pH	Αγωγιμότητα (μmhos/cm)	TDS ^a (mg/L)	TOC ^b (mg/L)	Αλατότητα (‰)
Απεσταγμένο νερό	5.87	2	n.d. ^γ	b.d.l. ^δ	n.d.
Λίμνη Παμβώτιδα	7.85	330	390	10.04	0.55
Ποταμός Λούρος	7.72	352	116	5.08	0.36
Ιόνιο Πέλαγος	7.61	52400	235	1.51	36.2

^aTDS (total dissolved solids) = ολικά διαλυμένα στερεά

^bTOC (total organic carbon) = ολικός οργανικός άνθρακας

^γn.d. (not determined) = δεν ανιχνεύτηκε

^δb.d.l (below detection limit) = κάτω του ορίου ανίχνευσης

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου εκφρασμένης ως ορθότητα και πιστότητα, της γραμμικότητας της μεθόδου και των ορίων ανίχνευσης, δείγματα απεσταγμένου νερού και φυσικών υδάτων εμβολιάστηκαν με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας μίγματος των επιλεγμένων ενώσεων ώστε να επιτευχθεί ένα εύρος συγκεντρώσεων 25-400 ng/L και έπειτα πραγματοποιήθηκε εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (*SPE*).

5.6.2 Τρόφιμα

Τα εμβολιασμένα δείγματα τροφίμων προετοιμάστηκαν με προσθήκη κατάλληλου όγκου σε ζυγισμένες με ακρίβεια ποσότητες τροφίμου προτύπου διαλύματος του μίγματος των επιλεγμένων ενώσεων σε ακετονιτρίλιο/νερό (1:1, ο./ο.). Το μίγμα που προέκυψε υποβλήθηκε έπειτα σε εκχύλιση με τη μέθοδο MSPD. Η βελτιστοποίηση των σπουδαιότερων παραμέτρων της μεθόδου έγινε με χρήση εμβολιασμένων με το μίγμα των ενώσεων δειγμάτων πατάτας σε συγκέντρωση 100 µg/Kg. Έτσι εκτιμήθηκε και η επίδραση των κυριότερων πειραματικών παραγόντων στην απόδοση της μεθόδου (εκχύλιση με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση, MSPD).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών ουσιών στα τρόφιμα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εσωτερικής βαθμονόμησης με χρήση διαφορετικού εσωτερικού προτύπου, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα αναφοράς προσομοίωσης του υποστρώματος (*matrix matched standards*). Η παρασκευή αυτών των προτύπων πραγματοποιήθηκε με εμβολιασμό προτύπου μίγματος των αναλυτών σε εκχυλίσματα τυφλών (*blank*) δειγμάτων τροφίμων, τα οποία δεν περιείχαν υπολείμματα των υπό προσδιορισμό δραστικών ουσιών και υποβλήθηκαν στην ίδια αναλυτική διαδικασία εκχύλισης και καθαρισμού με τα δείγματα. Έτσι, η συγκέντρωση των αναλυόμενων ενώσεων στα εμβολιασμένα δείγματα τροφίμων εκτιμήθηκε υπολογίζοντας το εμβαδό των κορυφών σε σχέση με αυτό του εσωτερικού προτύπου που χρησιμοποιήθηκε (*metobromuron*) και συγκρίνοντάς το με αυτά που αντιστοιχούσαν στο πρότυπο διάλυμα του μίγματος των ενώσεων. Οι συντελεστές

σχετικής απόκρισης (*Relative Response Factors*) των ενώσεων ως προς το εσωτερικό πρότυπο υπολογίστηκαν από τη σχέση:

$$RRF_{(A)} = [Area_{(IS)}/C_{(IS)}]/[Area_{(A)}/C_{(A)}]$$

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

5.7 Μέθοδοι εκχύλισης των δειγμάτων

5.7.1 Ιζήματα-Μέθοδος υπερήχων

Μια ποσότητα (~5g) λυοφιλοποιημένου και ομογενοποιημένου ιζήματος τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων (ισχύς 110W για 20 λεπτά) και εκχυλίστηκε διαδοχικά με 7 ml ακετόνης, 7 ml μεθανόλης και τέλος με 7 ml διχλωρομεθανίου. Σε κάθε περίπτωση, η θερμοκρασία δεν υπερέβη τους 35 °C για την αποφυγή πιθανής θερμικής διάσπασης των αναλυόμενων ενώσεων. Στη συνέχεια, τα εκχυλίσματα συνενώθηκαν, ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 5000 rpm για 5 λεπτά και το παραλαμβανόμενο υπερκείμενο διάλυμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού κάτω από ρεύμα αζώτου. Το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 0.05ml μίγματος ακετονιτριλίου/νερού (1:1) και ακολούθησε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία. Στην περίπτωση ύπαρξης σωματιδίων ύλης που παρεμβαίνουν στην ανάλυση του δείγματος, πριν την έγχυση στην HPLC, μπορεί να πραγματοποιηθεί φυγοκέντρωση (5000 rpm, 5 min) και διήθηση αυτού μέσω PTFE μεμβρανών της Millipore (0.22μm).

5.7.2 Νερά-Μέθοδος εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (SPE)

Για την απομόνωση και προσυγκέντρωση των επιλεγμένων ενδοκρινικών διαταρακτών και των μεταβολιτών τους αναπτύχθηκε μια μέθοδος εκχύλισης δια της στερεάς φάσης. Πριν την εκχύλιση, προστέθηκε μεθανόλη (0.1% v/v) σε 500 ml

δείγματος νερού. Μια μικροστήλη τύπου Chromabond C₁₈ Hydra τοποθετήθηκε σε συσκευή διήθησης της Millipore και εκπλύθηκε με 2 x 6 ml από το μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιο:ακετόνη (1:1, ο./ο.) υπό κενό ώστε να απομακρυνθούν πιθανά υπολείμματα προσδεμένων ενώσεων στο υλικό της στήλης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στη μικροστήλη 6 ml μεθανόλης και αφέθηκαν να τη διαποτίσουν για 3 λεπτά χωρίς την εφαρμογή κενού. Έπειτα, υπό κενό και χωρίς να αφηθεί η μικροστήλη να στεγνώσει (Basset, Wendelken et al. 2000) προστέθηκαν 6 ml νερού καθαρότητας HPLC και ακολούθως το δείγμα νερού με ρυθμό ροής 10 ml/ λεπτό. Αφού πέρασε όλο το δείγμα, το υλικό πλήρωσης της μικροστήλης αφέθηκε υπό κενό να στεγνώσει πλήρως για 5 λεπτά. Οι αναλυόμενες ενώσεις που συγκρατήθηκαν στη μικροστήλη κατά την εκχύλιση συλλέχθηκαν στη συνέχεια με 2 x 6 ml μίγματος των διαλυτών έκλουσης, διχλωρομεθάνιο:ακετόνη (1:1, ο./ο.). Το έκλουσμα συμπυκνώθηκε σε ήπιο ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και έγινε επαναδιάλυση του υπολείμματος σε τελικό όγκο 50 μl μίγματος ακετονιτριλίου:νερού (1:1, ο./ο.). Ακολούθησε ανάλυση σε υγρή χρωματογραφία.

5.7.3 Τρόφιμα-Μέθοδος εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD)

Σε όλα τα πειράματα, μια αντιπροσωπευτική ποσότητα δείγματος (0.5g) αναμίχθηκε απαλά με την κατάλληλη ποσότητα του προσροφητικού υλικού διασποράς σε ένα γυάλινο γουδί με γουδοχέρι, εφόσον να παραληφθεί ένα ομογενές, ημι-ξηρό μίγμα (χρόνος ομογενοποίησης: περίπου 1 λεπτό). Το διασπαρμένο στη στερεά φάση πια δείγμα, μεταφέρθηκε σε σύριγγα-μικροστήλη των 10 ml στην οποίας το κάτω μέρος είχε προσαρμοστεί φίλτρο μεμβράνης (0.22 μm) και μια ποσότητα υαλοάνθρακα. Στην κορυφή της στήλης προστέθηκε εκ νέου μια ποσότητα υαλοάνθρακα και η στήλη πιέστηκε ελαφρώς με το έμβολο της σύριγγας ώστε να μην υπάρχουν κενά και «κανάλια διαφυγής». Στη συνέχεια προστέθηκε στην κορυφή της στήλης κατάλληλη ποσότητα του συστήματος των διαλυτών έκλουσης επιτρέποντας έτσι την έκλυση των αναλυτέων ενώσεων σταγόνα-σταγόνα με την εφαρμογή μικρού

κενού. Το έκλουσμα συλλέχθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και αφέθηκε να εξατμιστεί μέχρι ξηρού κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου. Το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 50 μ l μίγματος ακετονιτριλίου:νερού (1:1, v/v). Ακολούθησε ανάλυση σε υγρή χρωματογραφία.

5.8 Συστήματα χρωματογραφίας

5.8.1 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, σειριακό φωτοδιόδων (HPLC-UV/DAD)

Η ανάλυση των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους παραγματοποιήθηκε σε υγρό χρωματογράφο της Shimadzu (*Kyoto, Japan*) μοντέλου αντλίας LC-10ADVp σε σύνδεση με 6-θυρών βαλβίδα μοντέλου 7725i Rheodyne. Ο ανιχνευτής ήταν υπεριώδους ακτινοβολίας σε σύστημα συστοιχίας διόδων μοντέλου SPD-10AVp σε σύνδεση με ολοκληρωτή της Shimadzu μοντέλου Class VP 5. Η συσκευή της HPLC περιλάμβανε επιπλέον σύστημα απαέρωσης της κινητής φάσης DGU-14A και σύστημα μίξης των διαλυτών FCV-10AL. Τα EDCs και οι μεταβολίτες τους διαχωρίστηκαν σε αναλυτική στήλη Discovery C₁₈ (25 cm μήκος x 4.6mm εσωτερική διάμετρος: 5 μ m μέγεθος σωματιδίων) της Supelco (Bellefonte, PA, USA) προσαρμοσμένη σε προστήλη Supelguard Discovery C₁₈ της ίδιας σύστασης (2 cm x 4.0 mm, 5 μ m). Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε στα 252 nm για τα diuron και DCPMU, 250 nm για τα linuron και DCPU και 248 nm για το 3,4-DCA. Για το διαχωρισμό των φαινυλουριών και των μεταβολιτών τους χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμωτής έκλουσης με κινητή φάση αποτελούμενη από ακετονιτρίλιο και νερό: το ποσοστό του ακετονιτριλίου στο νερό αυξάνεται γραμμικά από 10% σε 70% στα πρώτα 20 λεπτά και έπειτα σε 100% σε διάστημα 2 λεπτών. Η σύσταση αυτή παραμένει σταθερή για 2 λεπτά και στη συνέχεια το σύστημα επανέρχεται στην αρχική σύσταση διαλυτών με γραμμική κλίση σε διάστημα 3 λεπτών. Η στήλη αφήνεται να εξισορροπήσει για άλλα 5 λεπτά πριν την επόμενη έκχυση (*injection*). Η ταχύτητα ροής ήταν 1 ml/min χωρίς μεταβολή. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 35°C και ο όγκος έκχυσης 20 μ l. Το σύστημα έκχυσης (*loop*) εκπλένεται πριν από κάθε έκχυση.

5.9 Στατιστικά πακέτα επεξεργασίας

Η γραμμική σχέση των μεταβλητών και η εξαγωγή των σταθερών συσχέτισης (r) και προσδιορισμού (R^2) καθώς και οι μέσες ανακτήσεις και οι διακυμάνσεις των πειραματικών σχεδίων υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Statistica 6.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, USA). Με το ίδιο στατιστικό πρόγραμμα παράχθηκε η μήτρα των πειραματικών σχεδίων (πλήρως ένθετο και κλασματικό πειραματικό σχέδιο) που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτήν τη Διδακτορική Διατριβή.

Η μοντελοποίηση των δεδομένων με τη χρήση των Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Statistica Neural Networks (Έκδοση 4.0 E, StatSoft, Inc. Tulsa, USA).

Δ. Αποτελέσματα-συζήτηση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

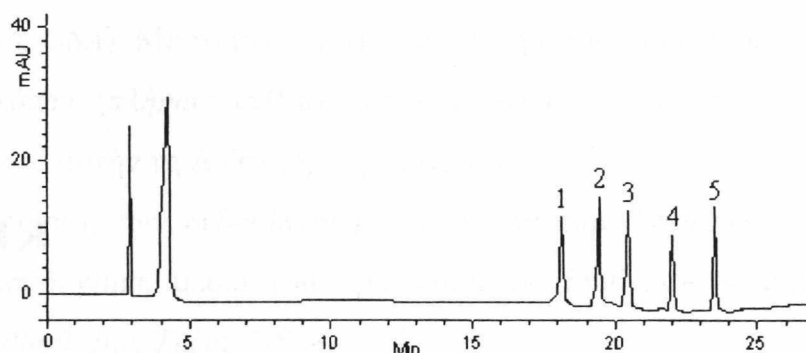
Η ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΤΥΠΟΥΣ ΙΖΗΜΑΤΩΝ

6.1 Χρωματογραφικός διαχωρισμός και ποσοτικοποίηση

Τα αναλυόμενα EDCs καθώς και οι κύριοι μεταβολίτες τους διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά με τη χρήση στήλης C₁₈ ανάστροφης φάσης και ενός βαθμωτού προγράμματος έκλουσης (ακετονιτρίλιο/νερό) στο αποδεκτά σύντομο χρονικό διάστημα των 27 λεπτών (Σχήμα 6.1).

Ωστόσο, όταν οι αναλυτές ενώσεις εισάγονταν στη στήλη με διαλύτη έκλουσης ακετονιτρίλιο, οι κορυφές παρουσίαζαν μορφολογική ανεπάρκεια, ιδιαίτερα στην περίπτωση των πιο πολικών μεταβολιτών, όπου παρατηρήθηκε ουρά στις αντίστοιχες κορυφές τους (*peak tailing*). Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ότι εμφανίζεται στις υποκατεστημένες ανιλίνες, λόγω των αλληλεπιδράσεων των πυριτικών ομάδων και της επίδρασης του pH (De Kok, Vos et al. 1984). Η

αναφερόμενη ασυμμετρία μειωνόταν όταν η σύσταση του διαλύτη μεταβαλόταν με την προσθήκη νερού. Έτσι, οι καλύτερα διαχωρισμένες και οξείες κορυφές επιτεύχθηκαν τελικά με έγχυση του δείγματος σε διαλύτη σύστασης σ. ακετονιτρίλιο/νερό, 1:1.



Σχήμα 6.1 HPLC-UV/DAD χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους συγκέντρωσης 1 mg/L. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα εξής: (1) DCPU, (2) DCPMU, (3) diuron, (4) 3,4-DCA, (5) linuron

Η σειρά έκλουσης των αναλυτών ενώσεων (DCPU, DCPMU, diuron, 3,4-DCA και linuron) μπορεί να ερμηνευτεί βάσει των δομών τους. Η βασικότητα των ενώσεων αυξάνεται με τους υποκαταστάτες ως εξής: $H < -CH_3 < -OCH_3$. Έτσι, οι μεταβολίτες DCPMU και DCPU εμφανίζουν μικρότερους χρόνους κατακράτησης από τις αρχικές τους ενώσεις. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι προκύπτουν από τη διαδοχική N-απαλκυλίωση των N-μέθοξυ-N-μέθυλ- και N,N-διμέθυλ-υποκατεστημένων φαινυλουριών και κατά συνέπεια εμφανίζουν πιο πολικές δομές με μικρότερη συνάφεια προς τη στατική φάση. Ωστόσο, το παράγωγο ανιλίνης, 3,4-DCA, παρουσιάζει μια πιο σύνθετη συμπεριφορά ως προς το χρόνο κατακράτησής του. Ο μεταβολίτης 3,4-DCA εκλούεται μετά τα DCPU, DCPMU και diuron, παρά το γεγονός ότι είναι η πιο υδατοδιαλυτή από τις ενώσεις του ενδιαφέροντός μας και κατά συνέπεια ο χρόνος έκλουσής της αναμενόταν να είναι ο μικρότερος, εάν η υδρόφοβη κατανομή ήταν ο μοναδικός μηχανισμός αλληλεπίδρασης. Η σειρά έκλουσης του 3,4-

DCA υποδηλώνει πιθανότατα ότι αυτή η ένωση αλληλεπιδρά με τη C₁₈ προσδεμένη φάση (*bonded-phase silica*) της στήλης μέσω των δεσμών υδρογόνου με τις ελεύθερες πυριτικές ομάδες (*un-end capped silanol groups*) (Field, Reed et al. 1997).

Πίνακας 6.1

Στατιστικές παράμετροι γραμμικότητας του οργάνου

	Linuron	Diuron	DCPMU	DCPU	3,4-DCA
Αριθμός δεδομένων	14	14	14	14	14
Εύρος (mg/L)	0.1-10	0.1-10	0.1-10	0.1-10	0.1-10
Σταθερά συσχέτισης “r”	0.999	0.998	0.995	0.991	0.997
Σταθερά προσδιορισμού “r ² ”	0.999	0.997	0.990	0.982	0.995
Κλίση “b”	112014	108843	124523	110159	66800
Τυπική απόκλιση του “b”	627.2	1839.6	3685.7	4326.6	1406.7
Σημείο τομής “a”	2108.7	-1178.4	-1431.1	3207.9	1331.4
Τυπική απόκλιση του “a”	2729.6	8005.8	15999.8	17912.2	7404.6
Τυπικό σφάλμα εκτίμησης	7888.2	23136.0	46237.8	51812.6	21452.8
95% διάστημα εμπιστοσύνης του σημείου τομής	-3838.6 με 8056	-18621.5 με 16264.7	-36291.8 με 33429.5	-35819 με 42235.2	-14802 με 17464.5
95% διάστημα εμπιστοσύνης της κλίσης	110647.1 με 113380.3	104835 με 112851.3	116492 με 132553	100731.6 με 119585	63735.6 με 69865.4
Δοκιμή παλινδρόμησης “F” (p) ^a	31893(<0.01)	3501(<0.01)	1141(<0.01)	648(<0.01)	2255(<0.01)

^ap:πιθανότητα

Η ταυτοποίηση των ενώσεων επιτεύχθηκε βάσει του χρόνου κατακράτησης σε συνδυασμό με το φάσμα απορρόφησής τους στο υπεριώδες (UV). Η επαναληπτικότητα των χρόνων κατακράτησης ήταν υψηλή με το υπάρχον σύστημα υγρής χρωματογραφίας.

Η ποσοτικοποίηση των ενώσεων έγινε με τη χρήση καμπύλης αναφοράς, 7 σημείων, από πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τα εμβαδά των κορυφών των αντίστοιχων ενώσεων. Τα γραφήματα κατασκευάστηκαν ύστερα από διπλές επαναλήψεις των μετρήσεων για κάθε σημείο του εμβαδού των

κορυφών. Στον Πίνακα 6.1 απεικονίζονται οι στατιστικές παράμετροι της γραμμικότητας του οργάνου για καθεμία αναλυτέα ένωση. Σε όλες τις περιπτώσεις η συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών προσαρμόζεται επιτυχώς σε ένα γραμμικό μοντέλο με τις σχετικές τυπικές αποκλίσεις (*RSDs*) να κυμαίνονται μεταξύ 0.5 και 4%.

6.2 Επικύρωση της μεθόδου εκχύλισης με τη χρήση υπερήχων

6.2.1 Εύρος γραμμικότητας, ευαισθησία και πιστότητα (*precision*)

Η ικανότητα της εκχύλισης των αναλυτέων ουσιών με τη χρήση υπερήχων εξετάστηκε σε δείγματα ιζημάτων διαφορετικής προέλευσης. Λόγω του γεγονότος ότι οι ενώσεις του μίγματος διέφεραν αρκετά στην πολικότητα μεταξύ τους καθίσταται απαραίτητη η εκχύλιση με περισσότερους από ένα διαλύτες ώστε η μέθοδος να είναι πολύ-υπολειμματική. Επιπλέον, η έλλειψη πιστοποιημένων υλικών αναφοράς για τα δύο ζιζανιοκτόνα και τους μεταβολίτες τους σε ιζήματα είναι επιζήμια αναφορικά με την ανάπτυξη εύρωστων (*robust*) μεθόδων εκχύλισης. Έτσι, για την ανάπτυξη και μελέτη της συγκεκριμένης μεθοδολογίας εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν, εμβολιασμένα με γνωστή ποσότητα μίγματος, δείγματα ιζημάτων (*παρ. 5.6.1*).

Η εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου έγινε με τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης και τον υπολογισμό των σταθερών προσδιορισμού R^2 . Όλες οι ενώσεις επέδειξαν εύρος γραμμικότητας μεταξύ 5 και 100 $\mu\text{g/Kg}$ με σταθερές προσδιορισμού μεγαλύτερες ή ίσες με 0.994 (Πίνακας 6.2).

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε μέσω των ορίων ανίχνευσης (*LODs*) και ποσοτικοποίησης (*LOQs*) που επιτεύχθηκαν. Το όριο ανίχνευσης ορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση για την οποία ο λόγος του σήματος προς τον θόρυβο ήταν τουλάχιστον ίσος με 3 και το όριο ποσοτικοποίησης ως η χαμηλότερη συγκέντρωση για την οποία ο ίδιος λόγος ήταν τουλάχιστον ίσος με την τιμή 10. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμάνθηκαν μεταξύ 0.6 και 4.6 $\mu\text{g/Kg}$ (ξηρού ιζήματος) για όλες τις αναλυόμενες ενώσεις, με εξαίρεση το 3,4-DCA για το οποίο τα όρια ανίχνευσης ήταν μεταξύ 1.9 και 63.3 $\mu\text{g/Kg}$. Οι σταθερές προσδιορισμού και τα όρια ανίχνευσης για κάθε ένωση φαίνονται στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2

Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων σε ιζήματα διαφορετικής προέλευσης

	Θαλάσσιο ιζήμα			Ποτάμιο ιζήμα			Λιμναίο ιζήμα		
	R ²	LOD ^a (μg/kg)	R.S.D. ^b (%)	R ²	LOD (μg/kg)	R.S.D (%)	R ²	LOD (μg/kg)	R.S.D. (%)
DCPU	0.9994	0.9	12.3	0.9976	3.5	10.0	0.9960	3.7	9.5
DCPMU	0.9964	0.7	9.1	0.9952	1.0	7.0	0.9985	4.6	14.8
Diuron	0.9947	0.7	7.1	0.9943	1.1	7.8	0.9974	4.2	13.5
3,4-DCA	0.9956	1.9	11.7	0.9947	4.8	11.0	0.9988	63.3	18.0
Linuron	0.9971	0.6	8.9	0.9951	1.6	9.0	0.9953	2.4	12.0

^aLOD: όριο ανίχνευσης για λόγο σήματος προς θόρυβο ίσο με 3

^bRSD: σχετική τυπική απόκλιση για επίπεδο συγκέντρωσης 10 μg/Kg (n=3)

Η πιστότητα της μεθόδου εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση προσδιορίστηκε με επανάληψη των αναλύσεων στο σύστημα χρωματογραφίας (3 φορές) εμβολιασμένου δείγματος με γνωστή συγκέντρωση του μίγματος των ενώσεων (10 μg/Kg). Λήφθηκαν πολύ καλές σχετικές τυπικές αποκλίσεις, μικρότερες από 12% σε όλες τις περιπτώσεις, με εξαίρεση το λιμναίο ιζήμα όπου κυμάνθηκαν μεταξύ 9.5 και 18%. Η πολύπλοκη φύση αυτού του υποστρώματος και η μεγαλύτερη περιεκτικότητά του σε οργανική ύλη αυξάνουν το εύρος των σχετικών τυπικών αποκλίσεων και καθιστούν δικαιολογημένα δυσκολότερη την καλή επαναληψιμότητα των τιμών.

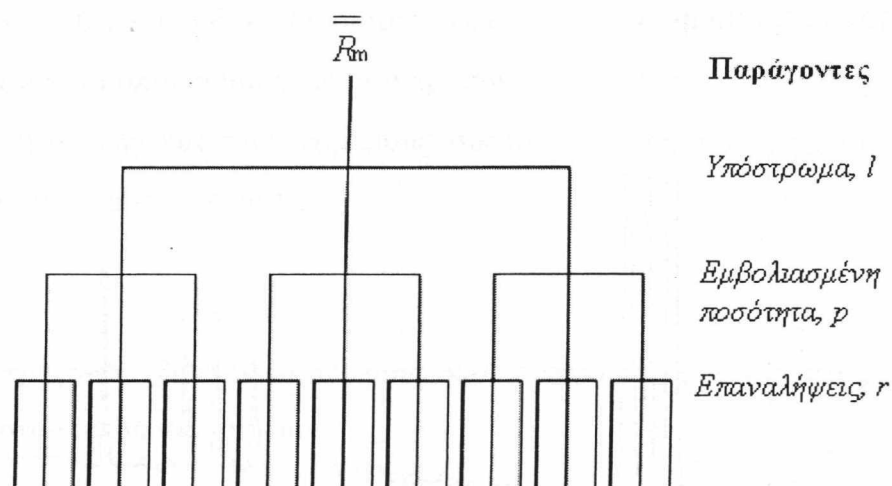
6.2.2 Εκτίμηση της ορθότητας (*trueness*) και προσδιορισμός της αβεβαιότητας της μεθόδου

Ο έλεγχος ορθότητας μιας αναλυτικής μεθοδολογίας περιλαμβάνει την εκτίμηση του συστηματικού σφάλματός της (*bias*). Τα δύο είδη συστηματικού

σφάλματος είναι το σταθερό (*constant*) και το αναλογικό (*proportional*). Στην παρούσα μελέτη γίνεται προσδιορισμός του αναλογικού συστηματικού σφάλματος, το οποίο εκφράζεται με τον όρο «ανάκτηση». Η διακύμανση (*variation*) της ανάκτησης εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση, τον τύπο του υποστρώματος και τη διακύμανση της μεθόδου μέσα στην ίδια μέρα. Για τον προσδιορισμό της ανάκτησης και της προερχόμενης από αυτήν αβεβαιότητας, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο (*fully nested experimental design*) αποτελούμενο από τρεις παράγοντες: τα διαφορετικά υποστρώματα, τα επίπεδα συγκεντρώσεων και τις επαναλήψεις. Επιπλέον υπολογίστηκαν οι διακυμάνσεις των παραγόντων σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Maroto, Boque et al. 2001; Dehouck, Van Looy et al. 2003; Polati, Roz et al. 2005; Wang, Leung et al. 2005). Το πειραματικό σχέδιο φαίνεται στο Σχήμα 6.2.

Οι οδηγίες της ISO απαιτούν να τοποθετείται στην υψηλότερη σειρά της ιεραρχίας ο παράγοντας που επηρεάζεται περισσότερο από συστηματικές επιδράσεις, ενώ οι επηρεαζόμενοι παράγοντες από τυχαίες κατά κύριο λόγο επιδράσεις να τοποθετούνται στις χαμηλότερες σειρές του ιεραρχικού σχεδιασμού (Maroto, Boque et al. 1999). Σύμφωνα με αναφορές (Dehouck, Van Looy et al. 2003; Wang, Leung et al. 2005; Wang, Leung et al. 2006) ο παράγοντας «συγκέντρωση» τοποθετείται συνήθως ψηλά στην ιεραρχία και ακολουθείται από τους παράγοντες «υπόστρωμα» και «επαναλήψεις».

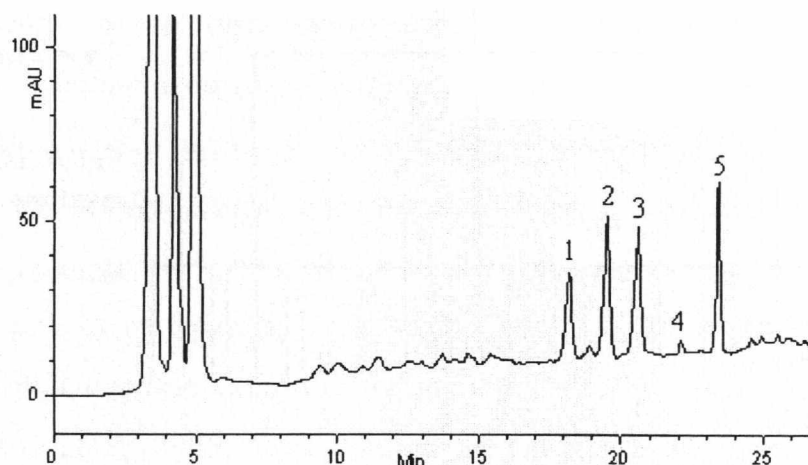
Σ' αυτήν τη Διδακτορική Διατριβή τα υποστρώματα που μελετήθηκαν (διαφορετικοί τύποι ιζημάτων) τοποθετήθηκαν ψηλά στην ιεραρχία ενώ ακολουθούν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις εμβολιασμού και έπειτα οι επαναλήψεις. Αυτό έγινε καθώς τα ιζήματα αποτελούν ιδιαίτερα σύνθετα υποστρώματα με σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες ανάλογα με την προέλευσή τους (Πίνακας 5.2) και κατά συνέπεια υπόκεινται σε συστηματικές επιδράσεις πολύ περισσότερο απ' ότι άλλου τύπου υποστρώματα. Ο τελευταίος παράγοντας (επαναλήψεις) θεωρείται ότι έχει υπολειμματική διακύμανση (*residual variation*).



Σχήμα 6.2 Πειραματικό σχέδιο για την εκτίμηση της ανάκτησης όταν l υποστρώματα διαφορετικών και αντιπροσωπευτικών προελεύσεων έχουν εμβολιαστεί σε p διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων με το μίγμα των αναλυτέων ουσιών. Εξετάζονται τρεις παράγοντες διακύμανσης: ο παράγοντας «υπόστρωμα, M », η εμβολιασμένη ποσότητα, C και η πιστότητα, r (επαναλήψεις). Για κάθε υπόστρωμα, στο οποίο η ποσότητα εμβολιασμού του μίγματος των ενώσεων ποικίλει (p επίπεδα συγκεντρώσεων) υπολογίζεται η μέση ανάκτηση. Τέλος, προκύπτει ο μεγάλος μέσος όρος όλων των ανακτήσεων του πειραματικού σχεδίου ($\bar{R}_m$)

Οι ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων υπολογίστηκαν σε τρεις διαφορετικούς τύπους ιζημάτων (θαλάσσιο, ποτάμιο και λιμναίο, $l = 3$). Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ($p = 3$), 25, 50 και 100 $\mu\text{g/Kg}$ και η ανάλυση για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε τρεις φορές ($r = 3$). Έτσι, το σύνολο των αναλύσεων ήταν 27 (Σχήμα 6.2) για κάθε ένα από τα συστατικά του μίγματος. Στο Σχήμα 6.3 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα σε σύστημα HPLC-UV/DAD, μετά την εκχύλιση των αναλυτέων ενώσεων από εμβολιασμένο δείγμα ποτάμιου ιζήματος σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/Kg}$ με την προτεινόμενη μεθοδολογία. Στο συγκεκριμένο πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο, όλοι οι

παράγοντες θεωρούνται τυχαίοι, δηλαδή μπορούν να πάρουν όλες τις ενδιάμεσες τιμές στο εύρος που μελετήθηκαν.



Σχήμα 6.3 Χρωματογράφημα σε σύστημα HPLC-UV/DAD μετά την εκχύλιση ενός εμβολιασμένου δείγματος ποτάμιου ιζημάτος (Λούρος ποταμός) με το μίγμα των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/Kg}$. Οι αριθμοί των κορυφών αντιστοιχούν στα εξής: (1) DCPU, (2) DCPMU, (3) diuron, (4) 3,4-DCA, (5) linuron (Χρωματογραφικές συνθήκες: Discovery C18 (250 x 4.6mm ID: 5 μm) στήλη; κινητή φάση: ακετονιτρίλιο/νερό; ρυθμός ροής: 1ml/λεπτό; ανιχνευτής UV/DAD ρυθμισμένος στα μήκη κύματος 248, 250 και 252 nm; οι συνθήκες της βαθμωτής έκλουσης αναφέρονται στην παράγραφο 5.8.1.)

Γενικά το αναλογικό συστηματικό σφάλμα πρέπει να εκτιμάται από μελέτες ανακτήσεων, χρησιμοποιώντας δείγματα αναφοράς, αντιπροσωπευτικά των δειγμάτων ρουτίνας (Thompson, Ellison et al. 1999). Ωστόσο, τα κατάλληλα δείγματα αναφοράς είναι σπάνια διαθέσιμα και συχνά οι αναλύσεις γίνονται τελικά με εμβολιασμένα δείγματα σε γνωστές συγκεντρώσεις. Η διαδικασία εμβολιασμού των ιζημάτων έγινε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.6.1 ώστε το δείγμα να είναι σταθερό, ομογενές και όσο το δυνατόν περισσότερο όμοιο με τα μελλοντικά δείγματα ρουτίνας.

Εδώ, η ανάκτηση υπολογίστηκε με τη μέθοδο της μέσης ανάκτησης. Στα υποκεφάλαια 3.6.6.1 και 3.6.6.2 δίνονται όλες οι εξισώσεις και αναφέρεται αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της τελικής μέσης ανάκτησης, της αβεβαιότητάς της και των επιμέρους συστατικών αβεβαιότητας με χρήση της ανάλυσης διακύμανσης (*ANOVA*).

Πίνακας 6.3

Μέσα τετράγωνα, βαθμοί ελευθερίας και συστατικά αβεβαιότητας για τα ζιζανιοκτόνα diuron και linuron

Πηγή	df	Diuron	Linuron
		MS ^a / F-τιμή ^b (p ^γ)	
Υποστρώματα	2	0.21184 / 86.97 (0.00004)	0.22277 / 55.86 (0.00013)
Συγκεντρώσεις (υποστρώματα)	6	0.00244 / 0.940 (0.49130)	0.00399 / 1.021 (0.44336)
Επαναλήψεις	18	0.00259	0.00391
<u>Αβεβαιότητα</u>			
$u(\Delta R_M)^2$		0.023267	0.024309
$u(\Delta R_C)^2$		-0.00005	0.000027
$u(\Delta R_r)^2$		0.00259	0.003907
$u(\overline{R_m})^2$		0.000089	0.000146
$u(R)$		0.152826	0.156468

^aMS: μέσα τετράγωνα

^bF - τιμή: F-δοκιμή που εκτιμά τις διακυμάνσεις ξεχωριστά και εκφράζει τα σχετικά τους μεγέθη

^γp: πιθανότητα

Στους Πίνακες 6.3 και 6.4 απεικονίζονται οι διακυμάνσεις, δηλαδή, τα μέτρα τετράγωνα των παραγόντων, η μετρούμενη αβεβαιότητα για κάθε παράγοντα αλλά και η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης, μετά τη χρήση των υπερήχων ως μέθοδος εκχύλισης για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους σε εμβολιασμένα δείγματα ιζημάτων.

Πίνακας 6.4

Μέσα τετράγωνα, βαθμοί ελευθερίας και συστατικά αβεβαιότητας για τους μεταβολίτες

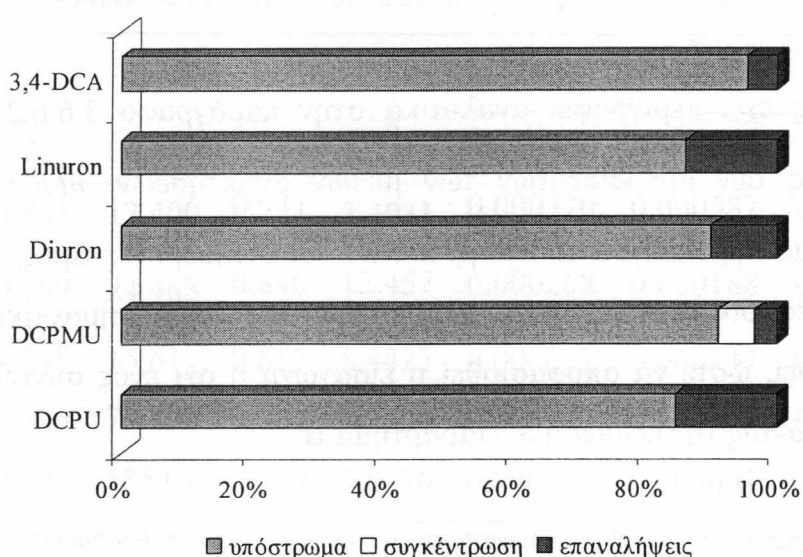
Πηγή	df	DCPMU	DCPU	3,4-DCA
		MS / F-τιμή (p)		
Υποστρώματα	2	0.29310 / 42.04 (0.00030)	0.12203	0.15145
Συγκεντρώσεις (υποστρώματα)	6	0.00697	0.00069 / 0.278 (0.93990)	0.00004
Επαναλήψεις	18	0.00116	0.00249	0.00078
<u>Αβεβαιότητα</u>				
$u(\Delta R_M)^2$		0.031792	0.013481	0.016823
$u(\Delta R_C)^2$		0.001936	-0.000599	-0.000247
$u(\Delta R_r)^2$		0.001164	0.002490	0.000777
$u(\overline{R_M})^2$		0.000258	0.000026	0.000001
$u(R)$		0.184356	0.116220	0.129711

Οι τιμές των μέσων τετραγώνων αναμένεται να αυξάνονται από τα χαμηλά προς τα ψηλά επίπεδα του ιεραρχικού σχεδίου διότι πηγαίνοντας σε υψηλότερο, ένας θετικός όρος προστίθεται στην τιμή του μέσου τετραγώνου του χαμηλότερου επιπέδου. Έτσι οι διακυμάνσεις αναμένεται να είναι θετικές (Vander Heyden, De Braekeleer et al. 1999). Αν όμως ένας παράγοντας εμφανίζει σημαντικά μικρότερη επίδραση στην απόκριση (ανάκτηση) σε σχέση με έναν παράγοντα που βρίσκεται

ακριβώς κάτω από αυτόν στο σχέδιο, τότε η υπολογιζόμενη τιμή του μέσου τετραγώνου είναι πολύ μικρή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διακύμανση αυτού του παράγοντα να έχει αρνητική τιμή.

Όπως φαίνεται στους Πίνακες 6.3 και 6.4 η εκτιμώμενη διακύμανση που οφείλεται στα επίπεδα των συγκεντρώσεων έχει αρνητική τιμή στις περιπτώσεις των diuron, DCPU και 3,4-DCA και υποδηλώνει ότι μια οποιαδήποτε αλλαγή στο επίπεδο των συγκεντρώσεων για αυτές τις ενώσεις θα προκαλεί αμελητέα διακύμανση στα αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, ο κυριότερος παράγοντας συνεισφοράς στην αβεβαιότητα της μεθόδου για τις παραπάνω ενώσεις είναι ο τύπος του υποστρώματος ενώ η αβεβαιότητα σχετικά με την ποσότητα εμβολιασμού (ή επίπεδο συγκεντρώσεων), δεν συμπεριλήφθηκε στην εκτίμηση της αβεβαιότητας $u(R)$ της πραγματικής ανάκτησης R .

Στο Σχήμα 6.4 φαίνονται οι επιμέρους διακυμάνσεις που οφείλονται στους παράγοντες «υπόστρωμα», «συγκέντρωση» και «επαναλήψεις» της συνολικής διακύμανσης για κάθε μία από τις αναλυόμενες ενώσεις, όπως αυτές υπολογίζονται με την μέθοδο της «εκτίμησης των συστατικών διακύμανσης» (*variance component estimates*).



Σχήμα 6.4 Συνεισφορά των συστατικών διακύμανσης (%)

Ένα άλλο κριτήριο για την ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων είναι η δοκιμή F (F -test), με την οποία συγκρίνονται τα μέσα τετράγωνα, που αποτελούν στην ουσία τις διακυμάνσεις. Η τιμή F για κάθε παράγοντα υπολογίζεται ως ο λόγος του μέσου τετραγώνου ενός παράγοντα προς το μέσο τετράγωνο αυτού που βρίσκεται στο ιεραρχικό σχέδιο ένα επίπεδο ακριβώς κάτω (Πίνακες 6.3 και 6.4). Έτσι μπορεί να εξακριβωθεί εάν ένας παράγοντας σε υψηλό επίπεδο στην ιεραρχική δομή του σχεδίου συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της διακύμανσης σε σύγκριση με τη συνεισφορά όλων των παραγόντων που βρίσκονται χαμηλότερα από αυτόν. Με αυτόν τον τρόπο, στην περίπτωση μας φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική ένδειξη της επίδρασης του υποστρώματος για τιμή $\alpha=0.05$ (p -τιμές < 0.05) για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες diuron και linuron καθώς και τον μεταβολίτη τους DCPMU. Με άλλα λόγια δε διαφαίνεται σημαντική επίδραση του επιπέδου των συγκεντρώσεων στην ανάκτηση της μεθόδου. Γενικά, είναι εμφανές ότι σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις η επίδραση του υποστρώματος είναι σημαντικότερη αυτής του επιπέδου των συγκεντρώσεων, πράγμα αναμενόμενο εάν ληφθούν υπόψη οι σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ιζημάτων (Πίνακας 5.2). Ιδιαίτερα ο περιεχόμενος οργανικός άνθρακας είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τις φαινολογίες (Vander Heyden, De Braekeleer et al. 1999) και κατά συνέπεια επιφέρει αξιοσημείωτη διακύμανση στις ανακτήσεις.

Όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στην παράγραφο 3.6.6.2 μπορεί να γίνει υπολογισμός των αβεβαιοτήτων των μέσων ανακτήσεων, $u(\overline{R}_i)$, καθώς και της αβεβαιότητας της ολικής ανάκτησης, $u(\overline{R}_m)$. Οι εκτιμώμενες τιμές, $\overline{R}_m$, καθώς και οι αβεβαιότητές τους επιτρέπουν την εφαρμογή ενός ελέγχου σημαντικότητας, όπως έχει προαναφερθεί, ώστε να αποφασισθεί η εισαγωγή ή όχι ενός συντελεστή διόρθωσης χρησιμοποιώντας την εξίσωση 6, Παράρτημα Β.

$$\frac{|\overline{R}_m - 1|}{u(\overline{R}_m)} \leq t_{\alpha/2, \text{eff}}$$

(εξ. 6, Παράρτημα Β)

όπου, $t_{a/2, \text{eff}}$ είναι η «δύο-πλευρών» τιμή t για τους βαθμούς ελευθερίας που σχετίζονται με την αβεβαιότητα, $u(\bar{R}_m)$, για επίπεδο εμπιστοσύνης $1-\alpha$. Εάν η ανάκτηση δεν είναι στατιστικά διαφορετική από τη μονάδα (1) μπορεί κανείς να καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η διαδικασία δεν εμφανίζει σημαντικό αναλογικό συστηματικό σφάλμα, οπότε δεν είναι απαραίτητη η εφαρμογή ενός συντελεστή διόρθωσης της ανάκτησης για τα μελλοντικά αποτελέσματα. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση που η ανάκτηση διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα (Barwick and Ellison 1999; Thompson, Ellison et al. 1999). Σε κάθε περίπτωση πάντως, η αβεβαιότητα που προέρχεται από την εκτίμηση της ανάκτησης είναι πάντα υπολογίσιμη και θα πρέπει να συμπεριληφθεί στον τελικό προϋπολογισμό αβεβαιότητας.

Οι τιμές t που προκύπτουν από τη δοκιμή σημαντικότητας της ολικής ανάκτησης χρησιμοποιώντας την εξίσωση 6 (Παράρτημα Β) για τις πέντε αναλυόμενες ενώσεις απεικονίζονται στον Πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5

Ολικές ανακτήσεις και οι μετρούμενες αβεβαιότητες των μέσων ανακτήσεων των επιλεγμένων ενδοκρινικών διαταρακτών και των μεταβολιτών τους

ένωση	$\bar{R}_m$	t	$\bar{R}_m^a$	t^a	$u(\bar{R}_m)^2$		
					θαλάσσιο	ποτάμιο	λιμναίο
linuron	0.851	12.400	0.941	3.3931	0.000320	0.000587	0.000080
diuron	0.769	24.463	0.846	12.457	0.000268	0.000188	0.000145
DCPMU	0.748	15.611	0.852	8.4427	0.000677	0.000247	0.000821
DCPU	0.595	79.830	0.662	46.669	0.000152	0.000005	0.000016
3,4-DCA	0.290	585.02	0.359	725.70	0.000002	0.000001	0.000008

^a: πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο με δύο τύπους υποστρωμάτων (θαλάσσιο και ποτάμιο ίζημα), χωρίς το λιμναίο ίζημα

Οι τιμές t για όλες τις ενώσεις ήταν μεγαλύτερες της τιμής $t_{\text{κρίσιμη}}$ ($\alpha = 0.05$) για 26 βαθμούς ελευθερίας σχετιζόμενους με την αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης ($t_{\text{κρίσιμη}} = 2.06$). Ουσιαστικά λοιπόν η διαφορά των ανακτήσεων των αναλυτέων ενώσεων είναι στατιστικά σημαντική από τη μονάδα και υπάρχει σημαντικό αναλογικό συστηματικό σφάλμα. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να εφαρμοστεί συντελεστής διόρθωσης στα αποτελέσματα ή η αναφερόμενη αβεβαιότητα της μεθόδου θα πρέπει να είναι ουσιαστικά μεγαλύτερη (Thompson, Ellison et al. 1999). Όταν πρόκειται για πολύπλοκα υποστρώματα όπως είδη τροφίμων, εδάφη και ιζήματα, όπου η δυσκολία εκχύλισης των αναλυόμενων ουσιών είναι πιο ευκρινής, αρκετά συχνά ένα σημαντικό ποσοστό των ενώσεων παραμένει προσδεμένο στο υπόστρωμα (Willettts and Wood 1998). Κατά συνέπεια η μεταφορά των ενώσεων είναι ελλιπής και ακολούθως η μετρούμενη συγκέντρωση είναι μικρότερη της πραγματικής. Η ασυμφωνία δε μεταξύ των αποτελεσμάτων από διαφορετικά εργαστήρια είναι αξιοπρόσεκτη, εάν δεν αντισταθμιστούν οι απώλειες. Ακόμη όμως μεγαλύτερες ασυμφωνίες μπορεί να προκύψουν εάν το ένα εργαστήριο λαμβάνει υπόψη τις απώλειες και εφαρμόζει κάποιο συντελεστή διόρθωσης και άλλο όχι. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη το γεγονός ότι ανακτήσεις μικρότερες από 90% είναι λογικά αναμενόμενες όταν πρόκειται για ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων όπως τα ιζήματα, τα αναλυτικά μας αποτελέσματα δεν διορθώθηκαν με χρήση συντελεστή διόρθωσης. Παρόλα αυτά η σχετιζόμενη με την ολική ανάκτηση αβεβαιότητα συμπεριλήφθηκε στον συνολικό προϋπολογισμό της «εσωτερικής» μελέτης επικύρωσης της μεθόδου για την αποφυγή υποτίμησης της αβεβαιότητας.

Παρατηρήθηκε ότι οι μέσες ανακτήσεις του ιζήματος λίμνης ήταν χαμηλότερες από αυτές των άλλων ιζημάτων για όλες σχεδόν τις ενώσεις (Πίνακας 6.5). Για το λόγο αυτό, ένα νέο πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο εφαρμόστηκε μόνο με τα δύο είδη ιζήματος (θαλάσσιο και ποτάμιο) και έγιναν εκ νέου οι υπολογισμοί. Παρατηρήθηκε μια μείωση στις τιμές t και στις ολικές αβεβαιότητες, $u(R)$, για όλες τις ενώσεις, αν και οι τιμές t παρέμειναν μεγαλύτερες της κρίσιμης τιμής $t_{\text{κρίσιμη}}$, αποδεικνύοντας ότι ή θα πρέπει να εφαρμοστεί ένας συντελεστής διόρθωσης ή θα

πρέπει να αναφέρεται το παρατηρούμενο συστηματικό σφάλμα και η αβεβαιότητά του μαζί με το αποτέλεσμα (IUPAC, ISO et al. 1996; Ellison, Rosslein et al. 2000; Hund, Massart et al. 2001).

Στον Πίνακα 6.5 περιλαμβάνονται επιπλέον τα αποτελέσματα των μέσων ανακτήσεων για όλους τους τύπους ιζημάτων. Ο μεταβολίτης 3,4-DCA εμφάνισε όπως ήταν αναμενόμενο τις χαμηλότερες τιμές ανακτήσεων. Γενικά, η τύχη των αρωματικών αμινών στα εδάφη και στα ιζήματα κυριαρχείται από τη μη αντιστρεπτή πρόσδεσή τους μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης και οξειδωτικής σύζευξης ριζών (Hsu and Bartha 1976; Li, Lee et al. 2000; Colon, Weber et al. 2002). Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με άλλες μελέτες σχετικά με την ικανότητα εκχύλισης της τελευταίας ένωσης από πολύπλοκα υποστρώματα και αποδίδεται στην δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των αρωματικών αμινών και των ομάδων κινονών των χουμικών οξέων που υπάρχουν στα ιζήματα (Di Corcia, Costantino et al. 1999; Gatidou, Kotrikla et al. 2004).

Πάντως, κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες εφαρμογής των πειραματικών σχεδίων, η επίδραση του υποστρώματος ήταν σημαντική ($p < 0.05$), υποδεικνύοντας ότι η σχετιζόμενη αβεβαιότητα με τον παράγοντα «υπόστρωμα», $u(\Delta R_M)$, θα πρέπει να συμπεριληφθεί στον προϋπολογισμό της ολικής αβεβαιότητας της μεθόδου.

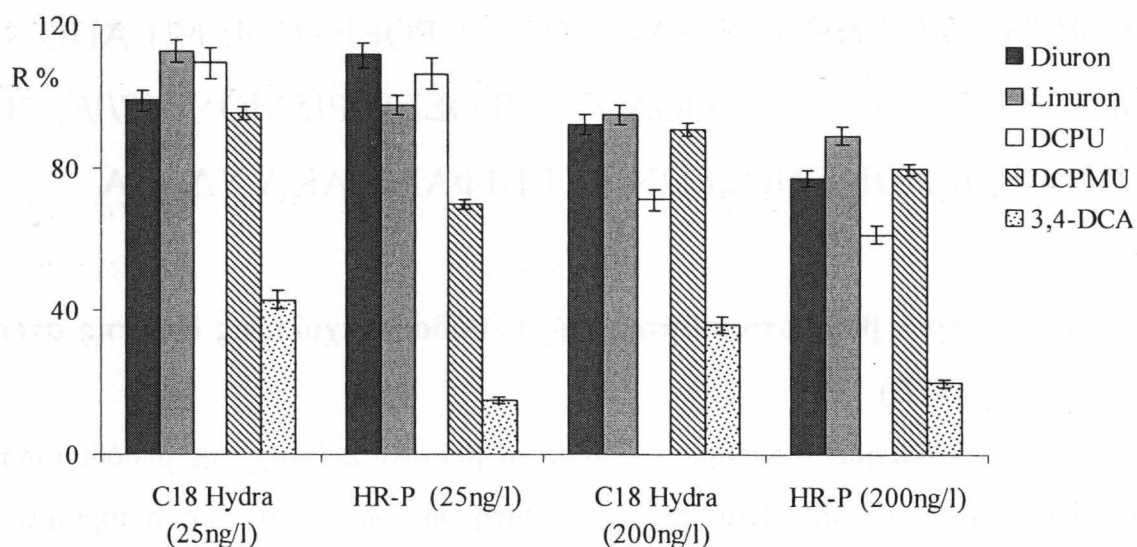
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Η ΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (*SPE*) ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΥΔΑΤΑ

7.1 Παράμετροι βελτιστοποίησης της μεθόδου εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (*SPE*)

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης της μεθόδου ώστε η μέθοδος εκχύλισης να είναι πιο ευαίσθητη ως προς τον προσδιορισμό των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους σε δείγματα υδάτων. Η πρώτη μελέτη περιλάμβανε τη δοκιμή δύο διαφορετικών προσροφητικών υλικών πλήρωσης της μικροστήλης, μιας οκταδέκυλ-τροποποιημένης σίλικας (*C₁₈ Hydra*) και μιας πορώδους προσροφητικής ρητίνης προσδεμένης σε πολυστυρένιο-διβινυλβενζένιο (*HR-P*). Έτσι, 100 ml δείγματος απεσταγμένου νερού που είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με το μίγμα των 5 αναλυόμενων ενώσεων σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, 25 και 200 ng/L χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ικανότητας των δύο διαφορετικών υλικών να κατακρατούν τις συγκεκριμένες ενώσεις.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 7.1, επιτεύχθηκαν καλές ανακτήσεις για όλες σχεδόν τις ενώσεις όταν χρησιμοποιήθηκαν μικροστήλες C18 Hydra (6ml, 1000mg), οι οποίες προτείνονται κυρίως για πολικές ενώσεις. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το διχλωρομεθάνιο και οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 71% έως και 112% εκτός του μεταβολίτη 3,4-DCA για τον οποίο οι ανακτήσεις ήταν χαμηλότερες σε όλες τις περιπτώσεις. Η ικανότητα εκχύλισης με χρήση της μικροστήλης HR-P (6ml, 1000mg) αποδείχθηκε ελαφρά μικρότερη σε σχέση με αυτή της μικροστήλης C₁₈ Hydra με τις ανακτήσεις να κυμαίνονται μεταξύ 61% και 111% για όλες τις αναλυτές ενώσεις με εξαίρεση τον μεταβολίτη 3,4-DCA, για τον οποίο επιτεύχθηκαν χαμηλότερες ανακτήσεις.



Σχήμα 7.1 Οι ανακτήσεις των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά πληρωτικά υλικά για τις μικροστήλες εκχύλισης και με διαλύτη έκλουσης το διχλωρομεθάνιο

Ωστόσο, οι ανακτήσεις του μεταβολίτη DCPMU δεν ήταν αρκετά ικανοποιητικές σε σχέση με την ικανότητα εκχύλισής του σε μικροστήλη C₁₈ Hydra,

πιθανότατα λόγω της ενδιάμεσης πολικότητάς του που οδηγεί σε ισχυρότερη πρόσδεση στο υλικό ρητίνης. Το ίδιο παρατηρήθηκε στην περίπτωση του 3,4-DCA, αν και οι ανακτήσεις του συγκεκριμένου μεταβολίτη ήταν πολύ χαμηλές σε όλες τις περιπτώσεις. Οι μικροστήλες του είδους Chromabond C₁₈ Hydra χρησιμοποιούνται ώστε να αυξηθούν οι δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις με την αύξηση του αριθμού των ελεύθερων πυριτικών ομάδων. Από την άλλη πλευρά, οι μικροστήλες HR-P προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τα υλικά C₁₈ όπως κατά κύριο λόγο τη σταθερότητα σε μια ευρεία περιοχή pH καθώς και την μεγαλύτερη κατακράτηση μιας μεγάλης ομάδας ενώσεων. Η τελευταία ιδιότητά τους αποδίδεται στις ισχυρές αλληλεπιδράσεις τύπου μεταξύ των αναλυόμενων ενώσεων και του πολυμερούς υποστρώματος. Παρόλα αυτά, οι ανακτήσεις παραμένουν μικρές για πολικούς μεταβολίτες όπως το 3,4-DCA όταν εκχυλίζονται όγκοι δειγμάτων 50 με 150 ml (Pichon 2000). Έτσι, τελικά από τους δύο τύπους μικροστηλών επιλέχθηκε η Chromabond C₁₈ Hydra (6 ml, 1000 mg) και χρησιμοποιήθηκε για τα περαιτέρω πειράματα.

Η ικανότητα εκχύλισης των οργανικών ενώσεων με τη μέθοδο της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης εξαρτάται μεταξύ άλλων και από την πολικότητα των διαλυτών έκλουσης, ειδικά όταν προσδιορίζονται συγχρόνως μεταβολίτες και οι μητρικές τους ενώσεις. Η απόδοση της εκχύλισης των επιλεγμένων ενώσεων από 100 ml εμβολιασμένου απεσταγμένου νερού σε συγκέντρωση 200 ng/L με μικροστήλες C₁₈ Hydra ελέγχθηκε με δοκιμή διάφορων διαλυτών έκλουσης όπως ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα, διχλωρομεθάνιο, ακετόνη καθώς και ένα μίγμα διχλωρομεθανίου:ακετόνης (1:1). Οι διαλύτες ακετονιτρίλιο και οξικός αιθυλεστέρας οδήγησαν σε φτωχές ανακτήσεις για το μεταβολίτη DCPU σε σχέση με τους άλλους διαλύτες, ενώ αυξημένες ανακτήσεις επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας τη μεθανόλη ή την ακετόνη ως διαλύτες έκλουσης. Σχετικά με την απόδοση εκχύλισης του linuron παρατηρήθηκαν σχετικά μειωμένες ανακτήσεις όταν χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη ή ακετόνη. Αντίθετα με τα παραπάνω, οι ανακτήσεις των diuron, DCPMU και 3,4-DCA δε φάνηκαν να επηρεάζονται ιδιαίτερα από τη φύση των διαλυτών έκλουσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων οι καλύτερες συνολικά ανακτήσεις για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των αναλυτών ενδοκρινικών διαταρακτών και των μεταβολιτών τους επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας το μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιου:ακετόνης (1:1) και αυτό χρησιμοποιήθηκε ως το σύστημα διαλυτών έκλουσης για τα επόμενα πειράματα.

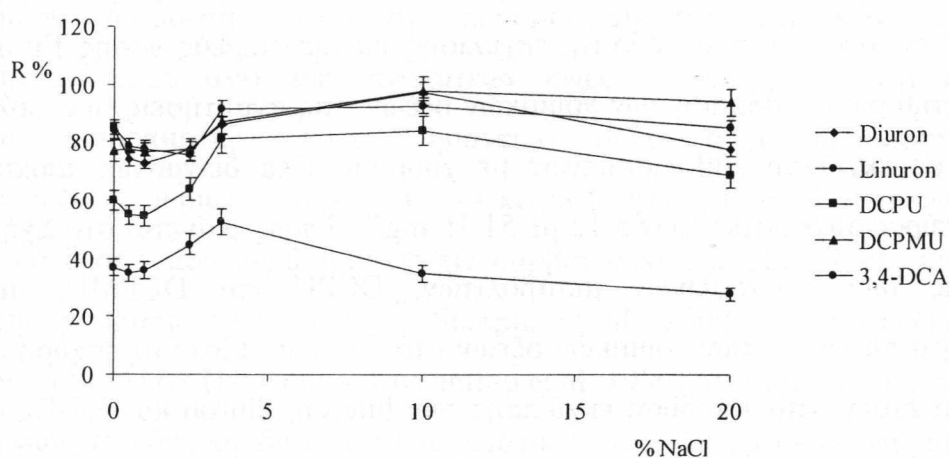
Για την εκτίμηση της επίδραση του pH στην ανάκτηση κάθε αναλυόμενης ένωσης εκχυλίστηκαν 100 ml εμβολιασμένου απεσταγμένου νερού σε συγκέντρωση 200 ng/L μίγματος των αναλυτών. Το εύρος του pH που μελετήθηκε ήταν μεταξύ 2 και 9. Γενικά, παρατηρήθηκε ότι οι ανακτήσεις όλων των ενώσεων παρέμειναν ανεπηρέαστες για ένα εύρος pH 4 με 8. Αυτό ήταν αναμενόμενο εάν λάβει κανείς υπόψη το γεγονός ότι σχετικά ουδέτερες ενώσεις εκχυλίζονται καλύτερα στις φυσικές τους ή σε ουδέτερες συνθήκες (Berrada, Font et al. 2000; Vandecasteele, Gaus et al. 2000). Επειδή το pH των δειγμάτων μας βρίσκεται σ' αυτήν την περιοχή, δεν χρειάστηκε να γίνει ρύθμιση του pH στα φυσικά ύδατα πριν την εκχύλιση, πράγμα το οποίο είχε ως αποτέλεσμα καθαρότερα τελικά διαλύματα έκλουσης, αφού αποφεύγεται με αυτόν τον τρόπο η συνεκχύλιση των χουμικών και φλουβικών οξέων που παρεμβαίνουν στη χρωματογραφική ανάλυση (Pichon, Cau Dit Coumes et al. 1996).

Γενικά η μείωση των ορίων ανίχνευσης μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση του όγκου του εκχυλιζόμενου δείγματος. Ωστόσο, κάτι τέτοιο έχει κάποιους περιορισμούς όπως το ότι μπορεί να υπερβεί ο όγκος δείγματος αυτόν που η μικροστήλη έχει ικανότητα να κατακρατά καθώς και το ότι μπορεί να εμφανιστεί το φαινόμενο προσπέλασης (*breakthrough*) για τις πιο πολικές αναλυόμενες ενώσεις. Επομένως, η σημασία της επίδρασης του όγκου του δείγματος στην ικανότητα εκχύλισης με τη μέθοδο εκχύλισης δια της στερεάς φάσης είναι πολύ σημαντική. Για τα υλικά ανάστροφης φάσης, ο όγκος διακοπής (*breakthrough volume*) είναι συνάρτηση της υδοφοβικότητας της διαλυμένης ουσίας και της ποσότητας του χρησιμοποιούμενου υλικού. Εδώ, οι όγκοι δείγματος, που υποβλήθηκαν σε εκχύλιση με τη μέθοδο SPE όπως ήδη περιγράφηκε, περιελάμβαναν τα 100, 500 και 1000 ml υδατικού δείγματος

εμβολιασμένου με το μίγμα των επιλεγμένων ενώσεων σε τελική συγκέντρωση 200 ng/L. Με αύξηση του όγκου του δείγματος παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή μείωση στην ανάκτηση του μεταβολίτη DCPU, το οποίο είναι από τα πιο πολικά προϊόντα διάσπασης των φυτοφαρμάκων linuron και diuron. Για τα περαιτέρω πειράματα λοιπόν επιλέχθηκε ο όγκος δείγματος των 500 ml αφού επιτρέπει ταυτόχρονα τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων σε αρκετά χαμηλά επίπεδα με αμελητέες απώλειες λόγω προσπέλασης (*breakthrough*) της μικροστήλης (για μικροστήλη με 1000 mg προσροφητικού υλικού).

7.1.1 Επίδραση της ιονικής ισχύος

Τα φυσικά νερά έχουν διαφορετική περιεκτικότητα σε αλάτι. Η ιονική ισχύς ενός διαλύματος αποτελεί έναν από τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την εκχύλιση. Γι' αυτό το λόγο μελετήθηκε η επίδραση της ιονικής ισχύος στην εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από δείγματα απεσταγμένου νερού με περιεκτικότητα σε NaCl να κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 20% (β./ο.) ενός κορεσμένου διαλύματος. Στο Σχήμα 7.2 φαίνεται η επίδραση της ιονικής ισχύος του δείγματος στις ανακτήσεις των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους.



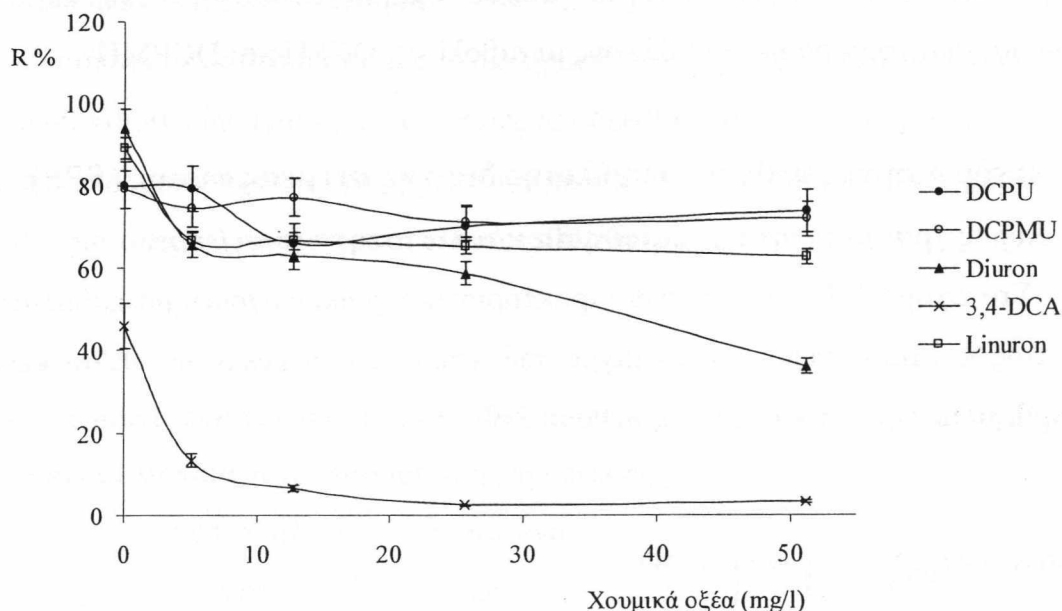
Σχήμα 7.2 Η επίδραση της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε NaCl (%) στις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων

Παρατηρήθηκε λοιπόν, ότι η ικανότητα εκχύλισης αυξάνει με την αύξηση της ιονικής ισχύος για όλες τις αναλυτέες ενώσεις μέχρι μια συγκεκριμένη τιμή (3.5 % μετά την οποία μειώνεται κυρίως στις περιπτώσεις των μεταβολιτών DCPU και 3,4-DCA. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάκτηση του μεταβολίτη 3,4-DCA που «παραδοσιακά» είναι χαμηλή, παρουσίασε σημαντική αύξηση σε διάλυμα με περιεκτικότητα σε NaCl 3.5 % (β./ο.) κάτι το οποίο εξηγεί και τις υψηλές ανακτήσεις του 3,4-DCA από θαλασσινό νερό σε σχέση με τα άλλα είδη υδάτων (παρ. 7.2.2).

Γενικά η συμπεριφορά όλων των αναλυτέων ενώσεων μπορεί να ερμηνευτεί θεωρώντας ότι συμβαίνουν ταυτόχρονα δύο διεργασίες. Αρχικά, η ικανότητα εκχύλισης των αναλυόμενων ενώσεων αυξάνεται λόγω της προσθήκης άλατος και κατά συνέπεια της μείωσης της διαλυτότητάς τους στο νερό (*salting out effect*). Ωστόσο, όσο η περιεκτικότητα σε NaCl συνεχίζει να αυξάνεται, κυριαρχεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των ιόντων NaCl και των μορίων των αναλυόμενων ουσιών, πράγμα το οποίο οδηγεί σε μείωση της ικανότητας των ενώσεων να κατακρατούνται από το υλικό της μικροστήλης (Carabias-Martinez, Rodriguez-Gonzalo et al. 2002).

7.1.2 Επίδραση των χουμικών οξέων

Η περιεχόμενη διαλυμένη οργανική ύλη, καλούμενη ως χουμικά οξέα, στα φυσικά νερά φέρεται να είναι πολλές φορές υπαίτια για τις χαμηλές ανακτήσεις των οργανικών ενώσεων με τη μέθοδο της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης. Γι' αυτόν τον λόγο μελετήθηκε η επίδραση των χουμικών οξέων στις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων με εκχύλιση εμβολιασμένων με χουμικά οξέα δειγμάτων απεσταγμένου νερού σε εύρος συγκεντρώσεων 5.12 με 51.16 mg/L. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.3 οι ανακτήσεις των πιο πολικών μεταβολιτών, DCPU και DCPMU, μειώθηκαν ανεπαίσθητα παρουσία των χουμικών οξέων στο διάλυμα. Ωστόσο, ισχυρή επίδραση φάνηκε ότι έχουν στην απόδοση εκχύλισης των linuron, diuron και 3,4-DCA, για τα οποία αρχικά παρατηρήθηκε μια γρήγορη πτώση στις ανακτήσεις τους. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του diuron η ανάκτησή του συνέχισε να μειώνεται αισθητά ακόμη και παρουσία της πιο υψηλής συγκέντρωσης χουμικών οξέων (51.16 mg/L).



Σχήμα 7.3 Η επίδραση της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε χουμικά οξέα (mg/L) στις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων

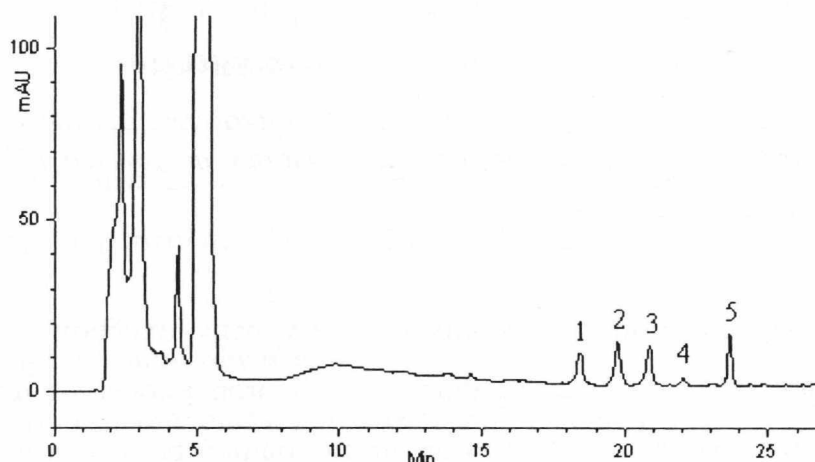
Η αρνητική επίδραση των χουμικών οξέων στην απόδοση εκχύλισης των λιγότερο πολικών ενώσεων όπως τα diuron και linuron μπορεί να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση των αναλυόμενων ενώσεων με τα χουμικά οξέα ή στην «κατάληψη» του σημείου πρόσδεσης λόγω της προσρόφηση των χουμικών οξέων στο προσροφητικό υλικό αντί των αναλυτέων ενώσεων. Θεωρείται ότι ο δεσμός υδρογόνου διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην προσρόφηση των υποκατεστημένων ουριών στο χουμικό υλικό ενώ έχει επίσης γίνει αναφορά στον ομοιοπολικό δεσμό που περιλαμβάνει τις καρβονυλικές, καρβοξυλικές και κινονο-ομάδες της χουμικής ύλης (Gevao, Semple et al. 2000). Έχει αποδειχθεί από εργαστηριακές μελέτες (Di Corcia, Costantino et al. 1999) ότι σημαντικά ποσοστά των περιεχόμενων σε υδατικά διαλύματα αρωματικών αμινών μπορούν να προσδεθούν στα διαλυμένα χουμικά οξέα (*Humic Acids, HAs*) τόσο με αντιστρεπτούς όσο και με μη αντιστρεπτούς μηχανισμούς αντιδράσεων. Έτσι μπορούν να εξηγηθούν οι ιδιαίτερα

χαμηλές ανακτήσεις του 3,4-DCA, παρά το γεγονός ότι είναι το πιο υδατοδιαλυτό προϊόν διάσπασης των linuron και diuron και θα αναμενόταν να παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με τους άλλους μεταβολίτες, DCPU και DCPMU.

7.2 Επικύρωση της μεθόδου εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (SPE)

7.2.1 Εύρος γραμμικότητας, ευαισθησία και πιστότητα (*precision*)

Στο Σχήμα 7.4 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένο δείγματος ποτάμιου νερού με το μίγμα των επιλεγμένων ενώσεων σε συγκέντρωση 400 ng/L μετά την εκχύλιση με τη μέθοδο SPE.



Σχήμα 7.4 Χρωματογράφημα σε σύστημα HPLC/UV-DAD ύστερα από εκχύλιση σε μικροστήλες C18 Hydra με τη μέθοδο SPE δείγματος ποτάμιου νερού εμβολιασμένου με το μίγμα των EDCs και των μεταβολιτών τους σε συγκέντρωση 400 ng/L: (1) DCPU, (2) DCPMU, (3) diuron, (4) 3,4-DCA και (5) linuron (Χρωματογραφικές συνθήκες: Discovery C18 (250 x 4.6mm ID: 5μm) στήλη; κινητή φάση: ακετονιτρίλιο/νερό; ρυθμός ροής: 1ml/λεπτό; ανιχνευτής UV/DAD ρυθμισμένος στα μήκη κύματος 248, 250 και 252 nm; οι συνθήκες της βαθμωτής έκλουσης αναφέρονται στην παράγραφο 5.8.1.)

Η ικανότητα εκχύλισης με μικροστήλες C₁₈ Hydra ελέγχθηκε για όλους τους τύπους νερών διαφορετικής προέλευσης. Η γραμμικότητα της μεθόδου για όλες τις

ενώσεις μελετήθηκε με εκχύλιση εμβολιασμένων φυσικών υδάτων σε πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων που κυμάνθηκαν από 25 μέχρι 400 ng/L. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα της ολοκλήρωσης των εμβαδών των κορυφών για την κατασκευή καμπυλών αναφοράς, οι οποίες αποδείχθηκε ότι ήταν γραμμικές σε όλο το εύρος των μελετούμενων συγκεντρώσεων με σταθερές προσδιορισμού μεγαλύτερες του 0.995 για όλες τις αναλυόμενες ενώσεις (Πίνακας 7.1).

Πίνακας 7.1

Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων σε φυσικά νερά διαφορετικής προέλευσης

	Απεσταγμένο νερό		Θαλασσινό νερό		Ποτάμιο νερό		Λιμναίο νερό	
	R ²	LOD ^a (ng/L)	R ²	LOD (ng/L)	R ²	LOD (ng/L)	R ²	LOD (ng/L)
DCPU	0.9995	5.5	0.9965	7.7	0.9967	6.5	0.9985	7.7
DCPMU	0.9995	1.8	0.9996	3.8	0.9993	1.3	0.9963	5.7
Diuron	0.9995	1.8	0.9999	3.1	0.9982	1.4	0.9949	5.7
3,4-DCA	0.9992	2.6	0.9979	4.3	0.9974	7.1	0.9973	11.2
Linuron	0.9994	2.1	0.9991	5.0	0.9952	3.9	0.9979	5.6

^aLOD: όριο ανίχνευσης για λόγο σήματος προς θόρυβο ίσο με 3

Η ευαισθησία της μεθόδου εκτιμήθηκε προσδιορίζοντας τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Το όριο ανίχνευσης ορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση για την οποία ο λόγος σήματος προς θόρυβο έχει τουλάχιστον την τιμή 3 και το όριο ποσοτικοποίησης ορίστηκε αντίστοιχα ως η χαμηλότερη συγκέντρωση για την οποία ο λόγος σήματος προς θόρυβο έχει τουλάχιστον την τιμή 10. Για όλες τις αναλυόμενες ενώσεις επιτεύχθηκαν αρκετά χαμηλά όρια ανίχνευσης της τάξεως των ppt (χαμηλότερα από 7.7 ng/L) με εξαίρεση το 3,4-DCA για το οποίο το όριο ανίχνευσης στα δείγματα λιμναίου νερού ήταν ελαφρά αυξημένο (11.2 ng/L). Πάρα ταύτα, η

μεθοδολογία εκχύλισης SPE αποδείχθηκε επαρκής για την ανάλυση και παρακολούθηση των επιπέδων των επιλεγμένων EDCs σε υδατικά δείγματα ρουτίνας (Πίνακας 7.1).

Πίνακας 7.2

Σχετικές τυπικές αποκλίσεις για συγκέντρωση 50 ng/L των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους σε διαφορετικούς τύπους επιφανειακών νερών

Προέλευση νερού	Απεσταγμένο	Θάλασσα	Ποτάμι	Λίμνη
RSD ^a (%)				
DCPU	4.1	6.4	11.2	13.8
DCPMU	6.3	5.8	9.7	9.4
Diuron	4.3	4.7	8.2	9.1
3,4-DCA	9.1	8.3	8.9	13.3
Linuron	4.9	3.7	8.6	7.9

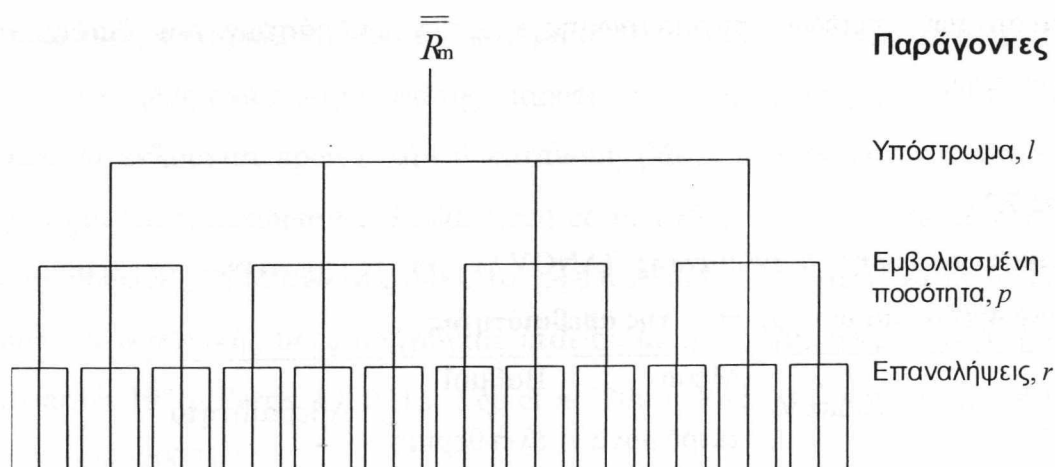
^aRSD: σχετική τυπική απόκλιση (%)

Σχετικά με την πιστότητα της χρωματογραφικής μεθόδου, αυτή ελέγχθηκε σε δείγματα εμβολιασμένα με το μίγμα των ενώσεων σε συγκέντρωση 50 ng/L και βρέθηκε ότι η επαναληψιμότητα της αναλυτικής μεθόδου ήταν ικανοποιητική ($n=3$) με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD) μεταξύ 4.1 και 13.8% για όλες τις αναλυτέες ενώσεις (Πίνακας 7.2).

7.2.2 Εκτίμηση της ορθότητας και προσδιορισμός της αβεβαιότητας της μεθόδου

Για την εκτίμηση των κριτηρίων της ικανότητας εκχύλισης της μεθόδου όπως είναι η ορθότητα εκφρασμένη ως ολική ανάκτηση καθώς και της αβεβαιότητας αυτής, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο (*fully nested experimental design*) όπως ήδη περιγράφηκε στην παράγραφο 6.2.2 για την περίπτωση των ιζημάτων. Περιλάμβανε τρεις παράγοντες: τα διαφορετικά υποστρώματα, τα επίπεδα

συγκεντρώσεων και τις επαναλήψεις των οποίων επιπρόσθετα υπολογίστηκαν οι διακυμάνσεις. Το πειραματικό σχέδιο απεικονίζεται στο Σχήμα 7.5.



Σχήμα 7.5 Πειραματικό σχέδιο για την εκτίμηση της ανάκτησης όταν l υποστρώματα διαφορετικών και αντιπροσωπευτικών προελεύσεων έχουν εμβολιαστεί σε p διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων με το μίγμα των αναλυόμενων ουσιών. Εξετάζονται τρεις παράγοντες διακύμανσης: ο παράγοντας «υπόστρωμα, M », η προστιθέμενη ποσότητα, C και η πιστότητα, r (επαναλήψεις). Για κάθε υπόστρωμα, στο οποίο η προστιθέμενη ποσότητα του μίγματος των ενώσεων ποικίλει (p επίπεδα συγκεντρώσεων) υπολογίζεται η μέση ανάκτηση. Τέλος, προκύπτει ο μεγάλος μέσος όρος όλων των ανακτήσεων του πειραματικού σχεδίου ($\bar{R}_m$)

Η ανάκτηση υπολογίστηκε για τέσσερις διαφορετικούς τύπους υδάτων (απεσταγμένο, θαλασσινό, ποτάμιο και λιμναίο, $l = 4$). Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ($p = 3$), 50, 100 και 200 ng/L και η ανάλυση για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε τρεις φορές ($r = 3$). Έτσι, το σύνολο των αναλύσεων ήταν 36 για κάθε ένα από τα συστατικά του μίγματος. Στο συγκεκριμένο πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο, όλοι οι παράγοντες θεωρούνται τυχαίοι. Ο υπολογισμός της ανάκτησης έγινε με τη μέθοδο της μέσης ανάκτησης. Οι αναλυτικοί υπολογισμοί για τις ολικές ανακτήσεις, τις διακυμάνσεις και τη μετρούμενη αβεβαιότητα περιγράφονται στην παράγραφο 3.6.6.1 και 3.6.6.2. Επιπλέον, στο

Παράρτημα Β φαίνονται συνοπτικά οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Στον Πίνακα 7.3 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) καθώς και οι μαθηματικές σχέσεις που εκφράζουν την αβεβαιότητα που προέρχεται από τη διακύμανση των επιπέδων συγκέντρωσης και των επιδράσεων των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Πίνακας 7.3

Ο πίνακας ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για το προτεινόμενο πειραματικό ιεραρχικό σχέδιο και οι εκφράσεις της αβεβαιότητας

Πηγές	Επίπεδα	Μέσα τετράγωνα	Βαθμοί ελευθερίας	Αβεβαιότητα
Υποστρώματα	$l = 4$	MS_m	$l-1$	$u(\Delta R_M)^2 = \frac{MS_m - MS_{conc}}{pr}$
Συγκεντρώσεις (υποστρώματα)	$p = 3$	MS_{conc}	$l(p-1)$	$u(\Delta R_C)^2 = \frac{MS_{conc} - MS_r}{r}$
Επαναλήψεις	$r = 3$	MS_r	$lp(r-1)$	$u(\Delta R_r)^2 = MS_r$
Σύνολο			$lpr-1$	

Η ολική ανάκτηση (Παράρτημα Β, εξ. 2), η οποία είναι αποτελεί μια εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου για κάθε αναλυόμενη ένωση, υπολογίστηκε από τις μέσες ανακτήσεις και φαίνεται στον Πίνακα 7.4.

Οι ολικές ανακτήσεις των αναλυτέων ενώσεων κυμάνθηκαν μεταξύ 0.716 (71.6 %) και 0.902 (90.2 %) εκτός του μεταβολίτη 3,4-DCA, για τον οποίο παρατηρήθηκε μια αρκετά χαμηλότερη ανάκτηση, 0.514 (51.4 %). Ωστόσο, η χαμηλή ανάκτηση του 3,4-DCA συνάδει με άλλες μελέτες (Field, Reed et al. 1997; Gatidou, Kotrikla et al. 2005) σύμφωνα με τις οποίες το παραπάνω οφείλεται μάλλον σε ατελή εκχύλιση του μεταβολίτη από το νερό στις μικροστήλες C_{18} παρά σε ατελή έκλουσή του από τις τελευταίες. Επιπλέον σύμφωνα με τις παραπάνω έρευνες μπορεί να υποτεθεί ότι ένα ποσοστό του 3,4-DCA σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τις ελεύθερες πυριτικές

ομάδες στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού καθιστώντας την έκλουσή του πολύ δυσκολότερη λόγω της ισχυρής πρόσδεσης. Η παραπάνω υπόθεση υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι το 3,4-DCA εκλύεται πιο αργά σε σύγκριση με τους άλλους μεταβολίτες, ακόμη και μετά το diuron, στη C₁₈ στήλη της υγρής χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης, παρότι έχει τη μεγαλύτερη διαλυτότητα και θα έπρεπε να εκλύεται πρώτο, εάν η κατανομή βάσει υδροφοβικότητας ήταν ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης (Field, Reed et al. 1997). Επιπρόσθετα, πολλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι ανιλίνες όπως το 3,4-DCA μπορούν επίσης να προσδεθούν στα σωματίδια οργανικής ύλης οδηγώντας έτσι σε ακόμη χαμηλότερες ανακτήσεις (Hsu and Bartha 1976; Parris 1980; Li, Lee et al. 2000; Weber, Colon et al. 2001; Colon, Weber et al. 2002).

Πίνακας 7.4

Οι ολικές ανακτήσεις και οι αβεβαιότητες της μέτρησης των μέσων ανακτήσεων των αναλυόμενων EDCs και των μεταβολιτών τους

ένωση	$\overline{R}_m$	t	$\overline{R}_m^a$	t ^a	Απεσταγμένο	$u(\overline{R}_i)^2$		
						Θαλασσινό	Ποτάμιο	Λιμναίο
linuron	0.825	27.389	0.860	21.110	0.000188	0.000039	0.000071	0.000193
diuron	0.902	11.994	0.953	4.371	0.000015	0.000088	0.000677	0.000021
DCPMU	0.800	21.420	0.836	18.133	0.000042	0.000354	0.000158	0.000493
DCPU	0.716	39.289	0.747	27.961	0.000011	0.000090	0.000452	0.000074
3,4-DCA	0.514	60.421	0.549	53.192	0.000203	0.000154	0.000128	0.000291

^a: πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο με τρεις τύπους υποστρωμάτων (απεσταγμένο, θαλασσινό και ποτάμιο νερό), χωρίς το λιμναίο

Στους Πίνακες 7.5 και 7.6 απεικονίζονται οι διακυμάνσεις, δηλαδή, τα μέσα τετράγωνα των παραγόντων, η μετρούμενη αβεβαιότητα για κάθε παράγοντα αλλά και η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης, μετά τη χρήση της μεθόδου SPE για τον

προσδιορισμό των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους σε εμβολιασμένα δείγματα νερών.

Πίνακας 7.5

Μέσα τετράγωνα, βαθμοί ελευθερίας και συστατικά αβεβαιότητας για τα ζιζανιοκτόνα diuron και linuron

Πηγή	df	Diuron	Linuron
		MS ^a / F-τιμή ^b (p ^γ)	
Υποστρώματα	3	0.09941 / 41.18 (0.00003)	0.06535 / 45.76 (0.00002)
Συγκεντρώσεις (υποστρώματα)	8	0.00241	0.00143
Επαναλήψεις	24	0.00148	0.0015
<u>Αβεβαιότητα</u>			
$u(\Delta R_M)^2$		0.010778	0.007102
$u(\Delta R_C)^2$		0.00031	-0.000023
$u(\Delta R_r)^2$		0.00148	0.0015
$u(\overline{R_M})^2$		0.000067	0.000041
$u(R)$		0.105615	0.084378

^aMS: μέσα τετράγωνα

^bF - τιμή: F-δοκιμή που εκτιμά τις διακυμάνσεις ξεχωριστά και εκφράζει τα σχετικά τους μεγέθη

^γp: πιθανότητα

Σε όλες τις περιπτώσεις, τα διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υδατικών υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν (Πίνακας 5.3) φαίνεται να συνεισφέρουν πολύ περισσότερο στη διακύμανση της μετρούμενης ανάκτησης συγκριτικά με τα διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων, όπως διαπιστώθηκε και στην περίπτωση των ιζημάτων (Κεφάλαιο 6). Όπως φαίνεται και από τους Πίνακες 7.5 και 7.6 για το linuron και το μεταβολίτη DCPU, η εκτιμώμενη διακύμανση που προκύπτει από τη

διακύμανση στα επίπεδα των συγκεντρώσεων είναι αρνητική. Αυτό επιβεβαιώνεται παρατηρώντας την τιμή των μέσων τετραγώνων (*MS*) για τον παράγοντα «συγκέντρωση», η οποία είναι μικρότερη από την τιμή των μέσων τετραγώνων που αντιστοιχούν στον παράγοντα «επαναλήψεις». Όπως προαναφέρθηκε, στο ιεραρχικό σχέδιο οι τιμές των μέσων τετραγώνων μειώνονται προς τα κάτω. Αν κάποιος παράγοντας έχει μικρότερη τιμή από αυτόν που βρίσκεται χαμηλότερα ιεραρχικά, τότε η συνεισφορά του στην ολική διακύμανση είναι μικρότερη σε σχέση με αυτήν του άλλου παράγοντα. Έτσι για τα linuron και DCPU οποιαδήποτε αλλαγή της συγκέντρωσης ουσιαστικά προκαλεί αμελητέα διακύμανση στα αποτελέσματα.

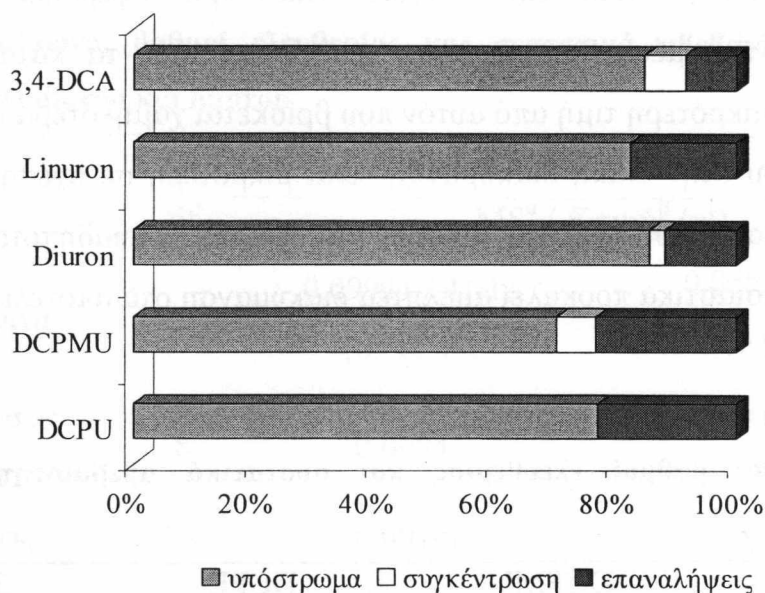
Πίνακας 7.6

Μέσα τετράγωνα, βαθμοί ελευθερίας και συστατικά αβεβαιότητας για τους μεταβολίτες

Πηγή	df	DCPMU	DCPU	3,4-DCA
		MS / F-τιμή (p)		
Υποστρώματα	3	0.04958 / 15.93 (0.00098)	0.06761 / 36.11 (0.00005)	0.063839 / 27.53 (0.00014)
Συγκεντρώσεις (υποστρώματα)	8	0.00311 / 1.836 (0.11917)	0.00187 / 0.871 (0.55384)	0.002319
Επαναλήψεις	24	0.0017	0.00215	0.000684
<u>Αβεβαιότητα</u>				
$u(\Delta R_M)^2$		0.005163	0.007304	0.006836
$u(\Delta R_C)^2$		0.00047	-0.000093	0.000545
$u(\Delta R_r)^2$		0.0017	0.00215	0.000684
$u(\overline{R_M})^2$		0.000087	0.000052	0.000065
$u(R)$		0.075635	0.085225	0.086286

Το ίδιο φαίνεται και στο Σχήμα 7.3 όπου παρατίθεται η διακύμανση (%) που οφείλεται στους παράγοντες «υπόστρωμα», «συγκέντρωση» και «επαναλήψεις» για

κάθε μία από τις αναλυόμενες ενώσεις, όπως αυτή υπολογίζεται με την μέθοδο της «εκτίμησης των συστατικών διακύμανσης» (*variance component estimates*).



Σχήμα 7.3 Συνεισφορά των συστατικών διακύμανσης (%)

Τελικά, η αβεβαιότητα που σχετίζεται με την ποσότητα εμβολιασμού των linuron και DCPU δεν περιλήφθηκε στην εκτίμηση της αβεβαιότητας, $u(R)$, της πραγματικής ανάκτησης, R . Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία F (p -τιμές < 0.05) ως άλλο κριτήριο ερμηνείας των αποτελεσμάτων φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική ένδειξη επίδρασης του υποστρώματος ($\alpha=0.05$) για όλες τις αναλυτέες ενώσεις, ενώ γενικά δεν υπάρχει σημαντική ένδειξη επίδρασης των συγκεντρώσεων.

Οι εκτιμώμενες τιμές των μέσων ανακτήσεων, $\overline{R_m}$, και της αβεβαιότητάς τους επέτρεψαν την εφαρμογή μιας δοκιμασίας σημαντικότητας ώστε να εξακριβωθεί εάν η ανάκτηση διέφερε ή όχι σημαντικά από τη μονάδα (1) με τον τρόπο που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 6. Σε κάθε περίπτωση υπάρχει πάντα μια αβεβαιότητα προερχόμενη από την ανάκτηση και θα πρέπει να συνυπολογίζεται στον τελικό προϋπολογισμό αβεβαιότητας. Οι τιμές t για τις 5 αναλυτέες ενώσεις φαίνονται στο Πίνακα 7.4 και

προέκυψαν από τη δοκιμασία σημαντικότητας της ολικής ανάκτησης χρησιμοποιώντας την εξίσωση 6 (Παράρτημα Β). Για όλες τις ενώσεις ήταν μεγαλύτερες της κρίσιμης τιμής t ($> t_{\text{κρίσιμη}}$ τιμή, $\alpha = 0.05$) για 35 βαθμούς ελευθερίας που σχετίζονται με την αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης ($t_{\text{κρίσιμη}} = 2.03$). Οι ανακτήσεις επομένως βρέθηκε ότι διαφέρουν σημαντικά από τη μονάδα πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η μέθοδος εμφανίζει σημαντικό αναλογικό σφάλμα. Κατά συνέπεια είτε θα πρέπει να εφαρμοστεί συντελεστής διόρθωσης εκφρασμένος ως ανάκτηση για τα αναλυτικά αποτελέσματα είτε θα πρέπει η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης να συμπεριληφθεί στον προϋπολογισμό της αβεβαιότητας της «εσωτερικής» μελέτης επικύρωσης της μεθόδου για την αποφυγή υποτίμησης της αβεβαιότητας.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παραπάνω δοκιμασία έχει σημασία εάν οι μέσες ανακτήσεις για κάθε υπόστρωμα είναι παρόμοιας τάξης. Σ' αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε ότι η μέση ανάκτηση από λιμναίο νερό ήταν γενικά χαμηλότερη από αυτές των άλλων τύπων φυσικών νερών για όλες τις ενώσεις. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση της περιεχόμενης οργανικής ύλης. Έτσι, θεωρήθηκε ενδιαφέρον να γίνει μια επανεκτίμηση της ολικής αβεβαιότητας με επανασχεδιασμό του πειράματος εξαιρώντας αυτή τη φορά το λιμναίο νερό ως υπό μελέτη υπόστρωμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια μείωση στις τιμές t και στη συνολική αβεβαιότητα, $u(R)$, για όλες τις ενώσεις (Πίνακας 7.4). Πάρα ταύτα, οι τιμές t παρέμειναν μεγαλύτερες της κρίσιμης τιμής υποδεικνύοντας και πάλι την ανάγκη εφαρμογής ενός συντελεστή διόρθωσης στα μελλοντικά δείγματα ρουτίνας ή την ανάγκη αναφοράς του παρατηρούμενου τυπικού σφάλματος και της αβεβαιότητάς του μαζί με τα αποτελέσματα.

Πάντως, κάτω από οποιεσδήποτε συνθήκες εφαρμογής των πειραματικών σχεδίων, η επίδραση του υποστρώματος ήταν σημαντική ($p < 0.05$), υποδεικνύοντας ότι η σχετιζόμενη αβεβαιότητα με τον παράγοντα «υπόστρωμα», $u(\Delta R_M)$, θα πρέπει να συμπεριληφθεί στον προϋπολογισμό της ολικής αβεβαιότητας της μεθόδου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ EDCs ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MSPD-ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΜΕ ΤΕΧΝΗΤΑ ΝΕΥΡΩΝΙΚΑ ΔΙΚΤΥΑ-ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

8.1 Βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD)

8.1.1 Μέθοδος αλλαγής ενός παράγοντα τη φορά (*One Factor At-a-Time, OFAT*)

Για τα αρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα (0.5g) από ομογενοποιημένο πολτό πατάτας, τα οποία εμβολιάστηκαν με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος με το μίγμα των linuron, diuron και των μεταβολιτών τους ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι 100 µg/Kg.

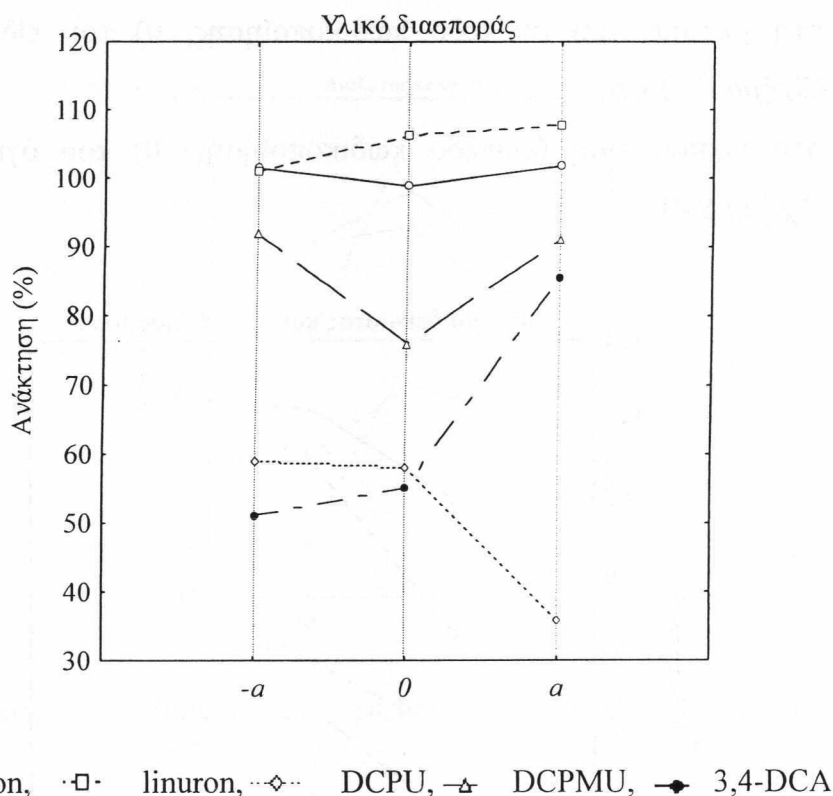
Η απόδοση της μεθόδου MSPD επηρεάζεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, κυρίως από το υλικό πλήρωσης της μικροστήλης και τη διαδικασία έκλουσης των ενώσεων. Οι παράγοντες που επιλέχθηκαν για μελέτη στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή καθώς και τα επίπεδα τιμών τους φαίνονται στον Πίνακα 8.1.

Πίνακας 8.1

Οι επιλεγμένοι παράγοντες και τα κωδικοποιημένα επίπεδα μελέτης τους

Παράγοντες	Κωδικοποιημένα επίπεδα	Τιμές
Υλικό διασποράς	-a	Florisil
	0	Florisil/C ₁₈ (50:50)
	a	C ₁₈
Αναλογία δείγματος και υλικού διασποράς	-a	1:1
	0	1:2
	a	1:4
Διαλύτης έκλουσης	-a	διχλωρομεθάνιο
	0	διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη (50:50)
	a	μεθανόλη
Όγκος διαλύτη έκλουσης	-a	5 ml
	0	10 ml
	a	15 ml

Στα Σχήματα 8.1, 8.2, 8.3 και 8.4 φαίνονται οι κυριότερες επιδράσεις των υπό εξέταση παραμέτρων της μεθόδου MSPD στην απόδοση της εκχύλισης (εκφρασμένη ως ανάκτηση) των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους.



Σχήμα 8.1 Επίδραση του τύπου του υλικού διασποράς στις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων

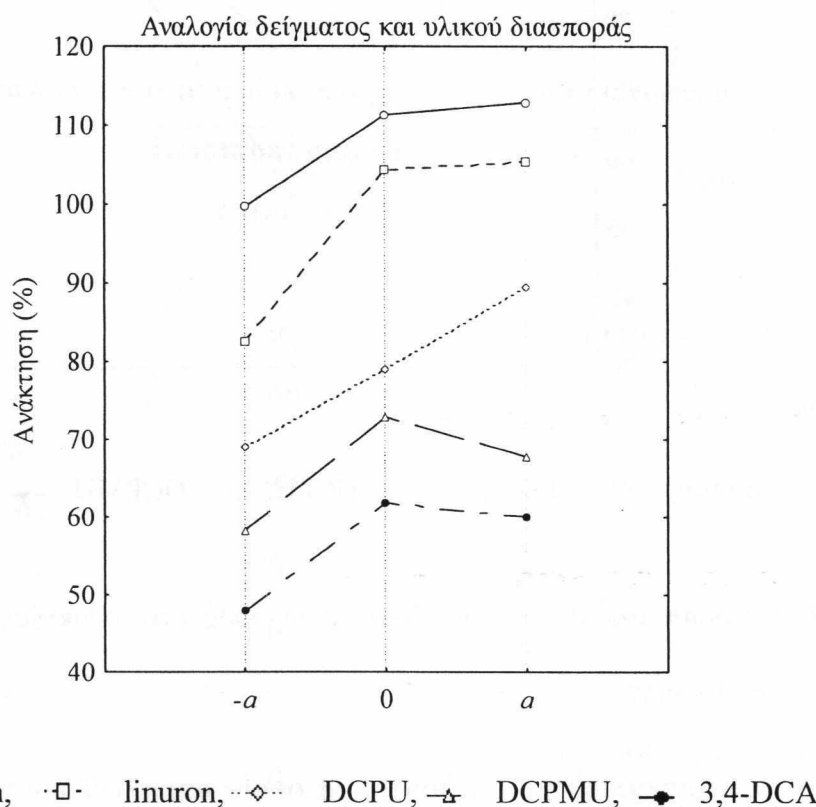
Από τα προαναφερθέντα Σχήματα, τα οποία απεικονίζουν τις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων και λαμβάνοντας υπόψη κάποιες πρακτικές πειραματικές παρατηρήσεις όπως η παραλαβή καθαρότερων εκλουσμάτων (λιγότερες παρεμβαλλόμενες κορυφές) : η καλύτερη απόδοση της εκχύλισης για όλες τις ενώσεις του μίγματος με τη μέθοδο MSPD μπορεί να επιτευχθεί:

α) στη χαμηλότερη τιμή (επίπεδο κωδικοποίησης, -a) του τύπου του υλικού διασποράς (Σχήμα 8.1)

β) στη μεσαία τιμή (επίπεδο κωδικοποίησης, 0) της αναλογίας ποσότητας δείγματος και υλικού διασποράς (Σχήμα 8.2)

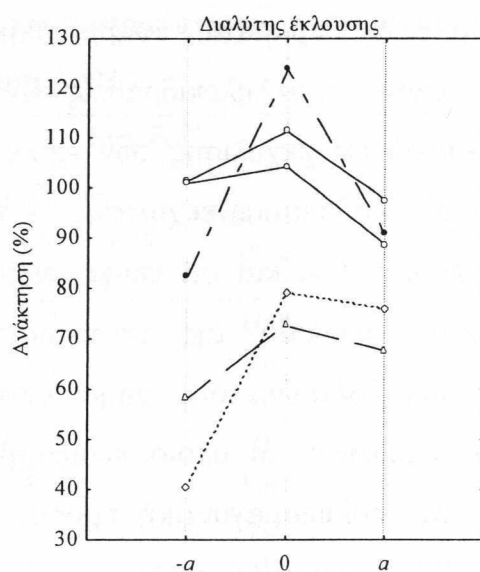
γ) στη μεσαία τιμή (επίπεδο κωδικοποίησης, 0) του είδους του διαλύτη έκλουσης (Σχήμα 8.3) και

δ) στη μεσαία τιμή (επίπεδο κωδικοποίησης, 0) του όγκου του διαλύτη έκλουσης (Σχήμα 8.4)



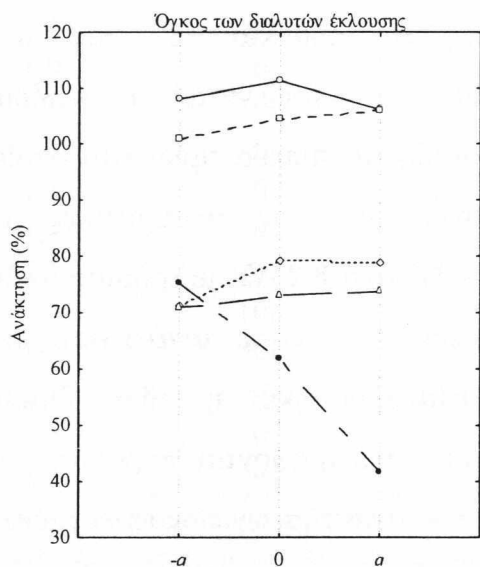
Σχήμα 8.2 Επίδραση της αναλογίας της ποσότητας δείγματος και του υλικού διασποράς στις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων

Ωστόσο αυτά τα διαγράμματα αποκαλύπτουν μεν τις βέλτιστες συνθήκες ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση στις ανακτήσεις των ενώσεων αλλά δεν είναι εφικτή η μελέτη των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων ενώ παράλληλα δεν μπορεί να προβλεφθεί και να ληφθεί υπόψη η απόδοση της εκχύλισης για τους ποικίλους συνδυασμούς των επιπέδων των τιμών των ελεγχόμενων παραμέτρων.



○ diuron, □ linuron, ◇ DCPU, △ DCPMU, ● 3,4-DCA

Σχήμα 8.3 Επίδραση του συστήματος διαλυτών έκλουσης στις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων



○ diuron, □ linuron, ◇ DCPU, △ DCPMU, ● 3,4-DCA

Σχήμα 8.4 Επίδραση του όγκου του συστήματος διαλυτών έκλουσης στις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων

8.1.2 Πολυπαραγοντική Μέθοδος (*Multivariable method*)

Μετά τα προκαταρκτικά πειράματα, εφαρμόστηκε μια πολυπαραγοντική μέθοδος, ώστε να ληφθούν υπόψη οι αλληλεπιδράσεις των επιλεγμένων παραγόντων και να προβλεφθούν οι αποδόσεις εκχύλισης των επιλεγμένων ενώσεων. Για τη λεπτομερέστερη εκτίμηση της διαδικασίας εκχύλισης με τη μέθοδο διασποράς του υποστρώματος σε στερεά φάση καθώς και την επακόλουθη εκτίμηση της επίδρασης των παραμέτρων της στην απόδοση της ταυτόχρονης εκχύλισης των δύο φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους χρησιμοποιήθηκε ένα κλασματικό παραγοντικό σχέδιο τριών επιπέδων, το οποίο περιλάμβανε τέσσερις ποσοτικές μεταβλητές. Σύμφωνα με την πολυπαραγοντική προσέγγιση, όλες οι παράμετροι μεταβάλλονται συγχρόνως. Το πειραματικό σχέδιο και η παραγωγή της μήτρας των πειραμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος στατιστικής, Statistica 6.0 (*StatSoft, Inc. Tulsa, USA*).

Στην περίπτωση μας, το πειραματικό σχέδιο που εφαρμόστηκε ήταν ένα $3^{(4-1)}$ κλασματικό πειραματικό σχέδιο πράγμα που σημαίνει ότι δοκιμάστηκαν τέσσερις παράγοντες, καθένας από τους οποίους ελέγχθηκε σε τρία επίπεδα τιμών. Σ' αυτό το πειραματικό σχέδιο πραγματοποιήθηκαν 27 πειράματα με τυχαία σειρά, προσπαθώντας παράλληλα να εκμηδενιστεί η επίδραση άλλων εξωτερικών μεταβλητών. Οι παράμετροι και τα επίπεδα τιμών στα οποία μελετήθηκαν καθώς και τα δεδομένα που προέκυψαν από τις πειραματικές μετρήσεις των τεσσάρων μεταβλητών φαίνονται στον Πίνακα 8.2. Ως μετρήσιμη απόκριση χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων των πέντε αναλυτών ενώσεων για κάθε σειρά πειραμάτων. Επιπλέον επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας εναλλακτικά, για λόγους που περιγράφονται παρακάτω, ως απόκριση την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής των ανακτήσεων των επιλεγμένων ενώσεων. Τα δεδομένα που ελήφθησαν από την εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού εκτιμήθηκαν με χρήση χημειομετρικών μεθόδων.

Πίνακας 8.2

Το σύνολο δεδομένων του πειραματικού σχεδιασμού που χρησιμοποιήθηκε για μοντελοποίηση με τη χρήση ANNs^a

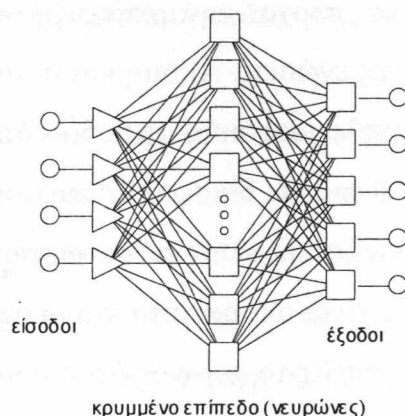
Σειρά	Είσοδοι ^a				Έξοδοι ^a	
	Florisol ^b (%)	Αναλογία δείγματος/υλικού διασποράς	Μεθανόλη ^γ (%)	Όγκος έκλυσης (mL)	Μέση τιμή ανάκτησης (%)	Τυπική απόκλιση (%)
1	100	1:1	100	10	71	15
2	0	1:2	50	15	104	22
3	0	1:4	50	10	107	42
4	100	1:4	0	10	67	31
5	50	1:1	100	5	103	9
6	50	1:4	50	15	64	17
7	50	1:1	0	15	82	46
8	100	1:4	50	5	95	25
9	0	1:1	100	15	35	15
10	0	1:4	100	5	117	21
11	0	1:2	100	10	87	37
12	0	1:2	0	5	114	47
13	50	1:2	100	15	82	46
14	100	1:2	100	5	84	34
15	50	1:2	0	10	109	27
16	50	1:2	50	5	101	28
17	100	1:2	0	15	65	43
18	100	1:4	100	15	102	41
19	0	1:2	0	15	105	27
20	0	1:1	0	10	85	20
21	50	1:4	0	5	71	55
22	100	1:1	50	15	75	42
23	50	1:4	100	10	92	46
24	100	1:2	50	10	94	33
25	50	1:1	50	10	100	26
26	100	1:1	0	5	52	27
27	0	1:1	50	5	93	45

^aANN₁: τέσσερις είσοδοι και μία έξοδος (μέση τιμή ανάκτησης), ANN₂: τέσσερις είσοδοι και μία έξοδος (τυπική απόκλιση), π.χ.: $R_{diuron}=97\%$, $R_{linuron}=71\%$, $R_{DCPU}=64\%$, $R_{DCPMU}=62\%$ και $R_{3,4-DCA}=60\%$ οπότε, μέση τιμή ανάκτησης=71% με τυπική απόκλιση=15% ^βπεριεχόμενο (επί τοις %) Florisol σε υλικό C₁₈, ^γπεριεχόμενη (επί τοις %) μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο.

Συγκεκριμένα, το σύνολο των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για την εφαρμογή των *Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων* (*Artificial Neural Networks, ANNs*). Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν (*υλικό διασποράς, αναλογία δείγματος/υλικού διασποράς, διαλύτης έκλουσης και όγκος έκλουσης*) χρησιμοποιήθηκαν ως οι είσοδοι για το νευρωνικό δίκτυο. Η μετρούμενη απόκριση, που στην περίπτωση μας ήταν η απόδοση της εκχύλισης (*ανάκτηση*), χρησιμοποιήθηκε ως έξοδος. Έτσι, οι έξοδοι κανονικά για το νευρωνικό δίκτυο θα έπρεπε να είναι πέντε, μία για κάθε αναλυτέα ένωση.

Αφού προσδιορίστηκαν οι είσοδοι και έξοδοι του τεχνητού νευρωνικού δικτύου μπορεί με την εκτέλεσή του να βρεθεί μια βέλτιστη περιοχή πειραματικών συνθηκών ώστε να επιτυγχάνεται η καλύτερη δυνατή απόδοση εκχύλισης για κάθε ένωση του μίγματος ξεχωριστά.

Επειδή η μέθοδος είναι πολύ-υπολειμματική θα πρέπει τελικά να βρεθεί μια **κοινή** περιοχή πειραματικών συνθηκών (*και όχι για κάθε αναλύτη ξεχωριστά*) που να επιτρέπει τον βέλτιστο προσδιορισμό όλων των αναλυτέων ενώσεων. Έτσι μπορεί να επιτευχθεί το επονομαζόμενο γενικό βέλτιστο σημείο (*global optimum*) συνθηκών για την πολύ-υπολειμματική μεθοδολογία MSPD (*1^ο ANN*). Ωστόσο, μια τέτοια διαδικασία, που θα είχε σαν στόχο τη βέλτιστη ανάκτηση για κάθε αναλυτέα ένωση ξεχωριστά (5 έξοδοι) είναι αρκετά ανακριβής, χρονοβόρα και απαιτεί χρήση κλασσικών υπολογιστικών μεθόδων, εκμηδενίζοντας παράλληλα τα βασικά πλεονεκτήματα της μοντελοποίησης με τη χρήση των τεχνητών νευρωνικών δικτύων. Η πολυπλοκότητα ενός νευρωνικού δικτύου με 4 εισόδους και 5 εξόδους φαίνεται στο Σχήμα 8.5. Οι παραπάνω συλλογισμοί καθιστούν εμφανή την ανάγκη εύρεσης κάποιου τρόπου “απλούστευσης” του εφαρμοζόμενου νευρωνικού δικτύου.



Σχήμα 8.5 Σχηματική απεικόνιση ενός πιθανού τεχνητού νευρωνικού δικτύου με 4 εισόδους και 5 εξόδους

Για τον παραπάνω λόγο θα πρέπει η έξοδος να είναι μία -και όχι πέντε- και η τιμή της να περιγράφει την απόδοση της εκχύλισης για τον **ταυτόχρονο** προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων (πολυ-υπολειμματική μεθοδολογία). Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας την μέση τιμή της ανάκτησης των πέντε αναλυτέων ουσιών, δηλαδή η μετρούμενη απόκριση και κατά συνέπεια η έξοδος του νευρωνικού δικτύου θα είναι **μία** και θα έχει την τιμή που υπολογίζεται από την εύρεση του **αριθμητικού μέσου όρου των τιμών των ανακτήσεων** των πέντε ενώσεων. Πρόσφατα, ο Y.-Y.Hu και η ομάδα του (Hu, Zheng et al. 2005) χρησιμοποίησαν ως απόκριση ενός πειραματικού σχεδιασμού για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου MSPD τη μέση τιμή της ανάκτησης των 11 αναλυόμενων οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων.

Παρόλ' αυτά, η μέση τιμή της ανάκτησης διαφορετικών συνεκχυλιζόμενων ενώσεων ως η μόνη παράμετρος-δείκτης της βέλτιστης απόδοσης εκχύλισης μιας πολύ-υπολειμματικής μεθόδου δεν αποτελεί ασφαλιστική δικλείδα. Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή ο παραπάνω συλλογισμός οδήγησε «ένα βήμα πιο πέρα» και έτσι χρησιμοποιήθηκε μια ακόμη παράμετρος: η **τυπική απόκλιση** της μέσης ανάκτησης των ενώσεων (2^ο ANN). Όπως είναι γνωστό, η βελτιστοποίηση μιας

αναλυτικής μεθόδου έχει ως στόχο την επίτευξη των υψηλότερων δυνατών ανακτήσεων για τις αναλυόμενες ενώσεις. Ακόμη και σ' αυτήν την περίπτωση όμως, η βελτιστοποίηση μιας πολύ-υπολειμματικής μεθόδου απαιτεί συχνά την επιλογή τέτοιων συνθηκών εκχύλισης ώστε να διασφαλίζεται ο καλύτερος δυνατός ιδανικός συμβιβασμός για τις τιμές ανακτήσεων όλων των ενώσεων. Αυτό βέβαια σημαίνει ότι οι ανακτήσεις των ενώσεων δεν είναι απαραίτητα και οι υψηλότερες δυνατές.

Σ' αυτή τη βάση γίνεται σαφές το γεγονός ότι μια υψηλή τιμή μέσης ανάκτησης των ενώσεων όταν η τελευταία αποτελεί τη **μόνη** μετρούμενη απόκριση μπορεί να είναι παραπλανητική, διότι μπορεί να οφείλεται σε υπερβολικά αυξημένη τιμή ανάκτησης για μία μόνο ένωση του μίγματος (*μια υψηλή τιμή αυξάνει τον αριθμητικό μέσο όρο*). Λαμβάνοντας υπόψη λοιπόν την τυπική απόκλιση, ώστε αυτή να είναι όσο το δυνατόν μικρότερη, μπορεί να αποφευχθούν τέτοιες παραπλανητικές καταστάσεις. Συνδυασμός δύο διαφορετικών παραμέτρων με τέτοιο τρόπο δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης Διδακτορική Διατριβή κατασκευάστηκαν δύο διαφορετικά τεχνητά νευρωνικά δίκτυα καθένα από τα οποία είχε τέσσερις εισόδους – κοινές για κάθε ANN- και μία έξοδο. Στο πρώτο ως έξοδος-απόκριση χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή της ανάκτησης όλων των αναλυτέων ενώσεων για κάθε σειρά πειράματος. Η βέλτιστη περιοχή πειραματικών συνθηκών που προκύπτει λογικά αντιστοιχεί στην **υψηλότερη** δυνατή μέση τιμή της ανάκτησης. Η τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης χρησιμοποιήθηκε ως έξοδος για το δεύτερο νευρωνικό δίκτυο και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία εκπαίδευσης. Ωστόσο, σ' αυτήν την περίπτωση, η βέλτιστη περιοχή πειραματικών συνθηκών για το 2^ο ANN αντιστοιχεί, στη **χαμηλότερη** δυνατή τιμή της τυπικής απόκλισης των ανακτήσεων. Τελικά, η γενική βέλτιστη περιοχή (ή τιμές) πειραματικών συνθηκών (*global optimum*) για τη μελετώμενη αναλυτική μέθοδο εκχύλισης, MSPD, είναι αυτή που αντιστοιχεί σε κοινή περιοχή τιμών ή κοινές τιμές μεταξύ των δύο παραπάνω βέλτιστων περιοχών των δύο νευρωνικών δικτύων. Με άλλα λόγια, οι βέλτιστες συνθήκες θα είναι αυτές που

εμφανίζουν τη μέγιστη δυνατή μέση τιμή ανάκτησης με την μικρότερη δυνατή τυπική απόκλιση.

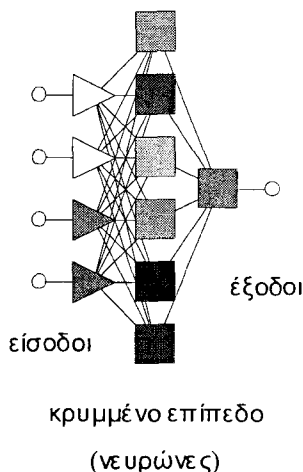
Η αρχιτεκτονική δομή των τεχνητών νευρωνικών δικτύων ερευνήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Statistica Neural Networks. Διενεργήθηκαν στο σύνολο 27 πειράματα από τα οποία τα 23 χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για την εκπαίδευση των δικτύων και τα υπόλοιπα 4 ως δεδομένα επιβεβαίωσης για τον προσδιορισμό του νευρωνικού δικτύου με την καλύτερη δυνατή αρχιτεκτονική δομή και το χαμηλότερο δυνατό σφάλμα. Η περίοδος εκμάθησης ολοκληρώθηκε όταν προσεγγίστηκε η μικρότερη τιμή της ρίζας αθροίσματος διαφορών μέσου τετραγώνου (*Root-Mean-Square, RMS*). Με άλλα λόγια θα πρέπει η συνάρτηση σφάλματος, η οποία υπολογίζει τη διαφορά μεταξύ των υπολογισμένων και επιθυμούμενων τιμών εξόδου, να “φτάσει” στο ελάχιστό της.

Τα νευρωνικά δίκτυα που ερευνήθηκαν περιλάμβαναν τα πολυεπίπεδα perceptrons καθώς και τα δίκτυα RBF (*Radial Basis Function*) με 1 έως 4 και 1 έως 6 κρυμμένα επίπεδα, αντίστοιχα. Οι αλγόριθμοι, back propagation και conjugate gradient descent εφαρμόστηκαν για την εκπαίδευση των πολυεπίπεδων perceptrons. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκπαίδευσης, προσδιορίστηκαν οι τιμές βαρών των μεταβλητών μεταξύ των νευρώνων. Ταυτόχρονα, υπολογίστηκαν οι τιμές του σφάλματος οι οποίες χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστεί η απόδοση ενός νευρωνικού δικτύου κατά τη διάρκεια της επαναλαμβανόμενης διαδικασίας εκπαίδευσης και εκτέλεσής του. Έπειτα, τα καλύτερα δίκτυα που βρέθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των βέλτιστων περιοχών πειραματικών συνθηκών στη βάση της υψηλότερης μέσης τιμής των ανακτήσεων σε συνδυασμό με τη χαμηλότερη τυπική απόκλιση αυτής για όλες τις αναλυτέες ενώσεις.

Επιπλέον, οι πραγματικές τιμές των εξόδων συγκρίθηκαν με τις προβλεπόμενες τιμές των δικτύων. Οι περιπτώσεις επιβεβαίωσης που περιλήφθηκαν στο σύνολο των δεδομένων των επιλεγμένων νευρωνικών δικτύων χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ικανότητάς τους για πρόβλεψη. Η ασυμφωνία μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών και των τιμών για επιβεβαίωση υποδεικνύει ότι υπάρχει υπέρ-μάθηση (*over-learning*),

δηλαδή υπέρ-προσαρμογή (*over-fitting*), η οποία προκύπτει όταν ο αλγόριθμος έχει “τρέξει” για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (και το δίκτυο είναι αρκετά πολύπλοκο για το πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπίσει ή για τον όγκο των διαθέσιμων δεδομένων).

Η βέλτιστη δομή νευρωνικού δικτύου που βρέθηκε με έξοδο τη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων ήταν ένα πολυεπίπεδο perceptron. Η τελική αρχιτεκτονική δομή του (Σχήμα 8.6) αποτελούταν από έξι νευρώνες στο κρυμμένο επίπεδο (4:6:1).



Σχήμα 8.6 Η αρχιτεκτονική δομή του εφαρμοζόμενου τεχνητού νευρωνικού δικτύου ($n=27$, είσοδοι: τέσσερις παράμετροι της μεθόδου εκχύλισης MSPD, έξι κρυμμένοι νευρώνες, έξοδος: μέση τιμή ανάκτησης των 5 αναλυόμενων ενώσεων, αλγόριθμος εκπαίδευσης: *conjugate gradient descent* στην 137^η εποχή)

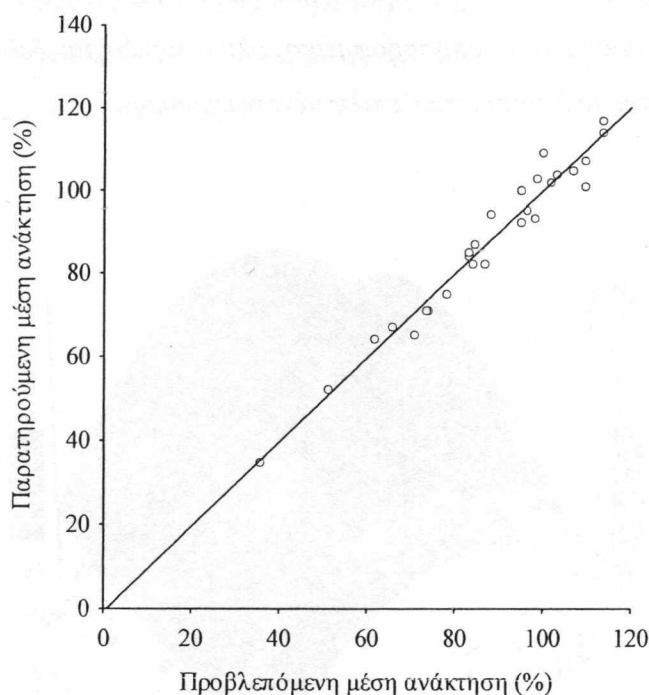
Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος *conjugate gradient descent* για την εκπαίδευση του νευρωνικού δικτύου, ο οποίος βρέθηκε στην 137^η εποχή. Το σφάλμα εκπαίδευσης και επιβεβαίωσης ήταν 3.935 RMS και 2.902 RMS, αντίστοιχα. Το γεγονός ότι οι τιμές των δύο αυτών σφαλμάτων συμφωνούν υποδηλώνει ισχυρά ότι το νευρωνικό δίκτυο δεν υφίσταται “υπέρ-προσαρμογή” (*over-fitting*) και έχει καλή απόδοση πρόβλεψης όπως φαίνεται και από το Σχήμα 8.7. Η συσχέτιση περιγράφεται από την ακόλουθη σχέση:

$$R_{\text{obs}}(\%) = -0.627 + 1.005 R_{\text{pred}}(\%) \quad (\text{εξ. 8.1})$$

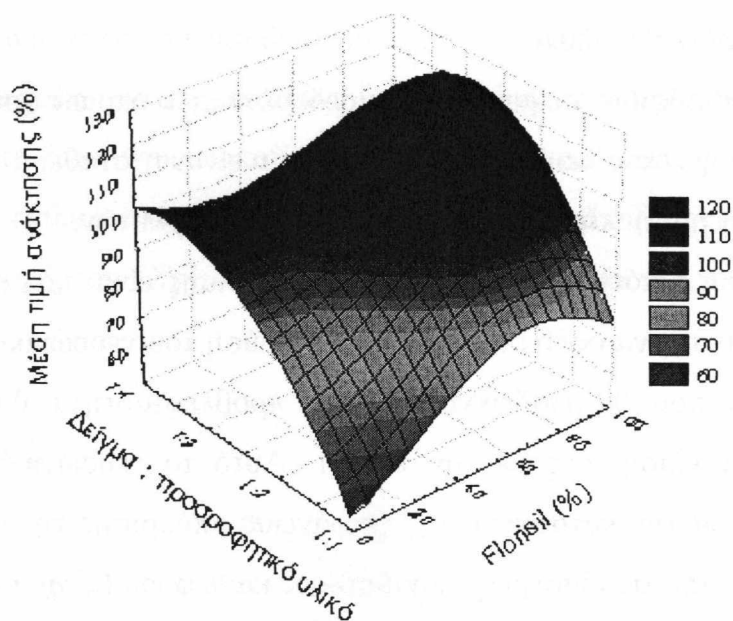
$$n = 23; r = 0.98076$$

όπου n είναι ο αριθμός των πειραμάτων τα δεδομένα των οποίων χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για την εκπαίδευση των ANNs και r είναι η σταθερά συσχέτισης που αντιπροσωπεύει τη γραμμική σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών.

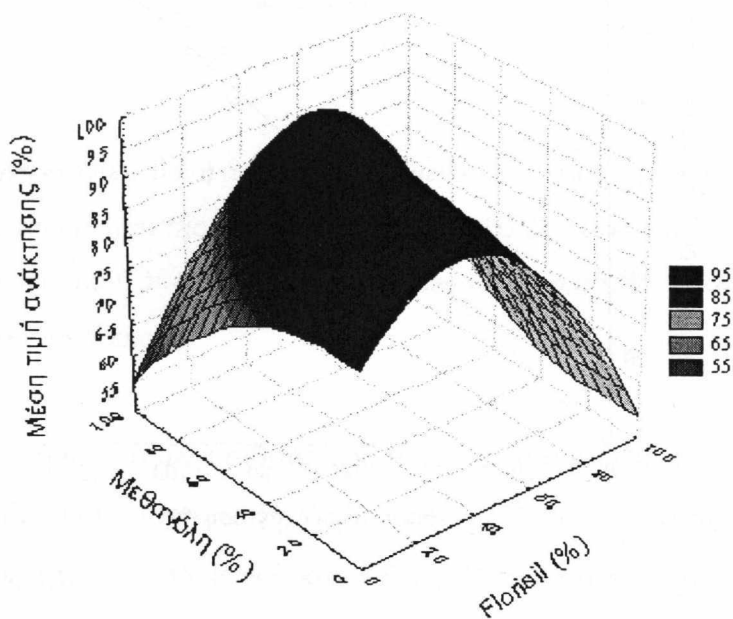
Η στατιστική ποιότητα της παραπάνω συσχέτισης είναι καλή με ένα μεγάλο μέρος της διακύμανσης να οφείλεται στην ίδια τη φύση του νευρωνικού δικτύου. Ένα νευρωνικό δίκτυο που θα επιδείκνυε άριστη προβλεψιμότητα θα είχε σταθερά συσχέτισης, r , και κλίση ίσες με την τιμή 1. Αυτό το νευρωνικό δίκτυο τελικά χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή της επιφάνειας απόκρισης της μέσης τιμής της ανάκτησης για δύο από τις τέσσερις παραμέτρους κάθε φορά (Σχήματα 8.8, 8.9, 8.10, 8.11, 8.12 και 8.13).



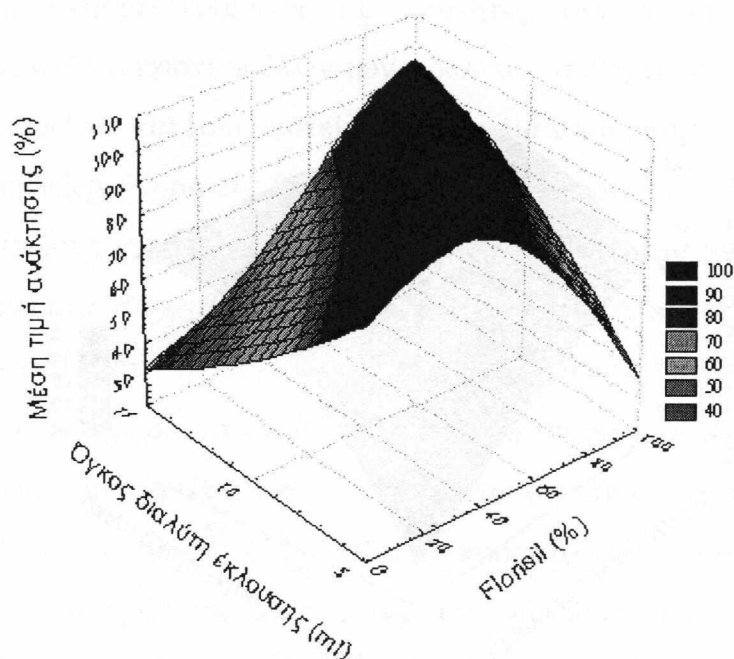
Σχήμα 8.7 Συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων μέσων τιμών ανάκτησης των αναλυόμενων ενώσεων



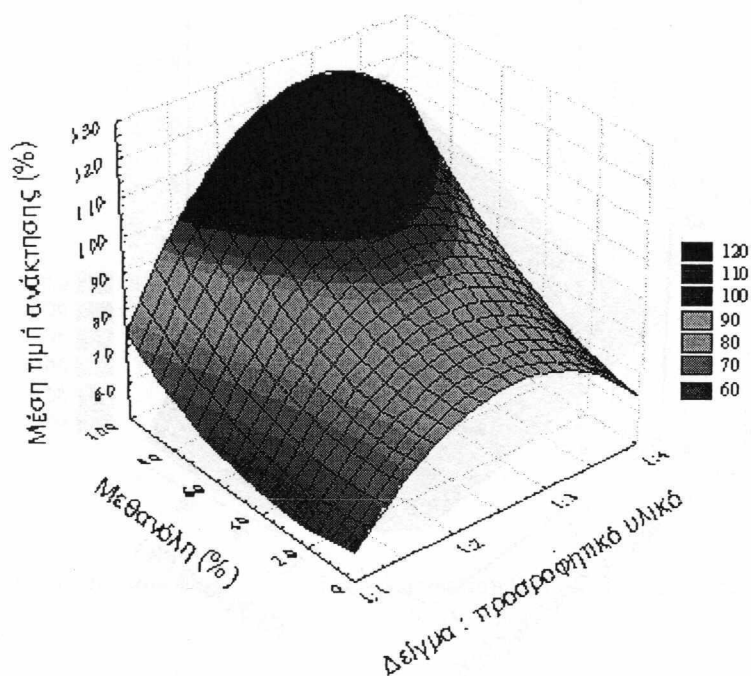
Σχήμα 8.8. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «προσροφητικό υλικό-αναλογία δείγματος/προσροφητικού υλικού» στη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων



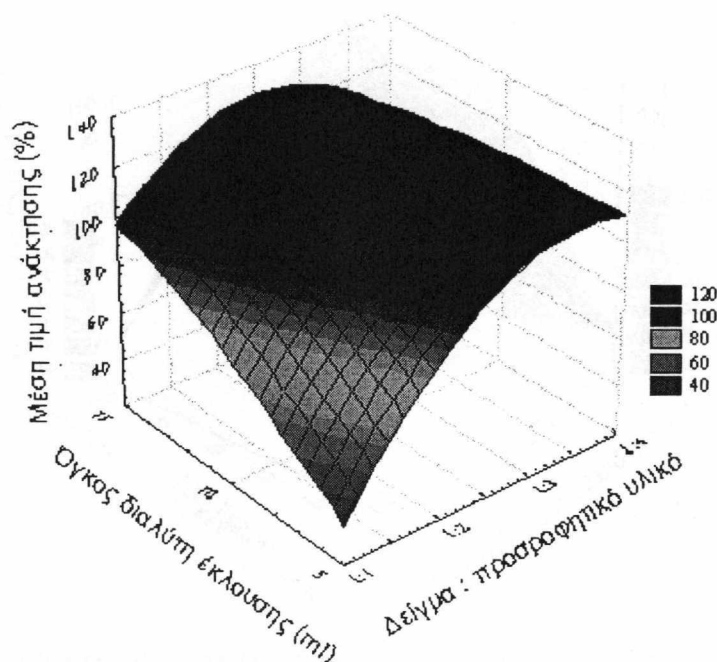
Σχήμα 8.9. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «προσροφητικό υλικό- διαλύτης έκλουσης» στη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων



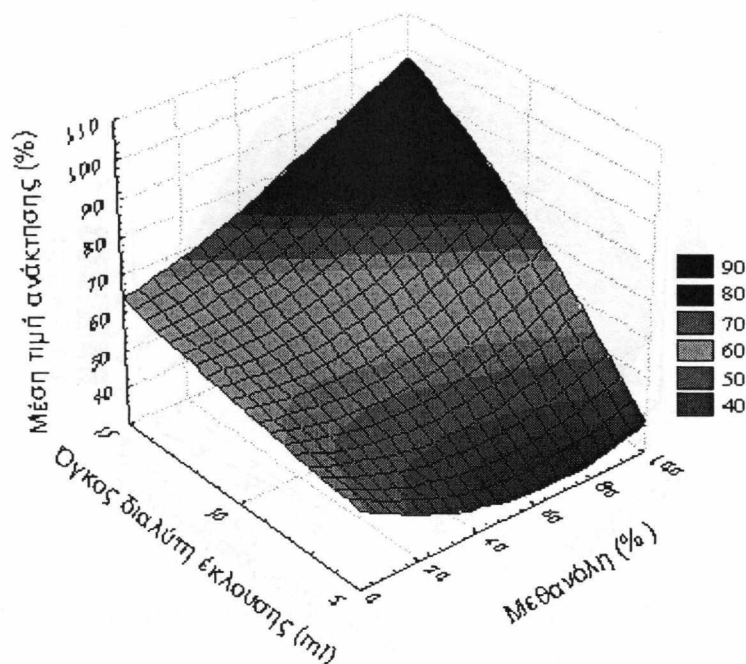
Σχήμα 8.10. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «προσροφητικό υλικό-όγκος διαλύτη έκλουσης» στη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων



Σχήμα 8.11. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγματος/προσροφητικού υλικού-διαλύτης έκλουσης» στη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων

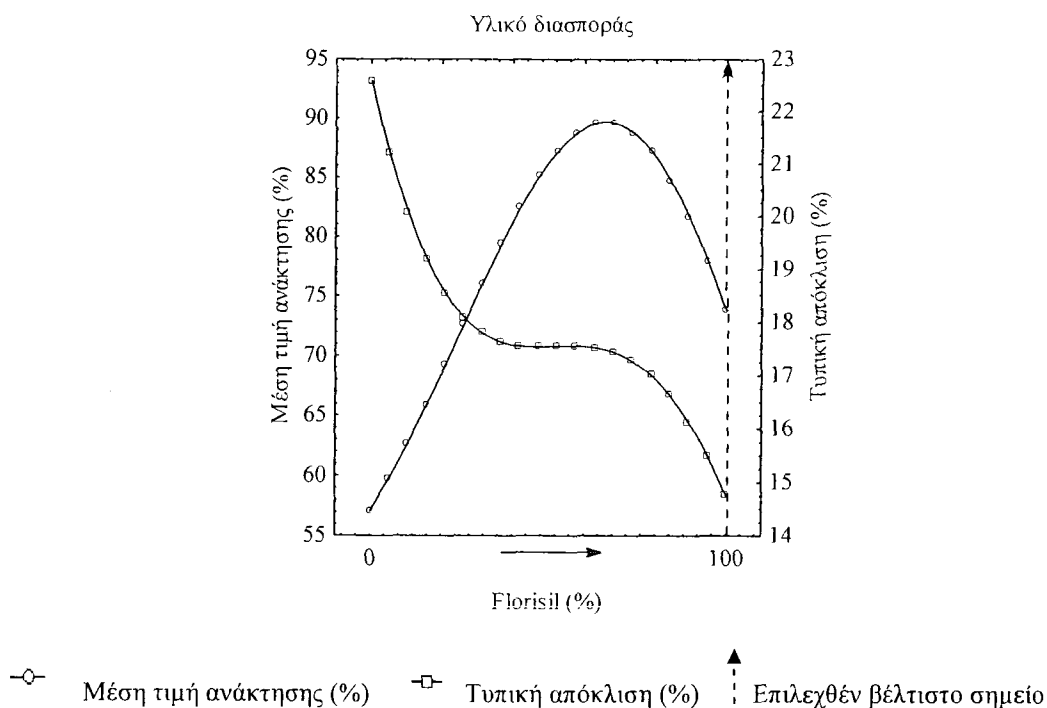


Σχήμα 8.12. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγματος/προσροφητικού υλικού-όγκος διαλύτη έκλουσης» στη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων

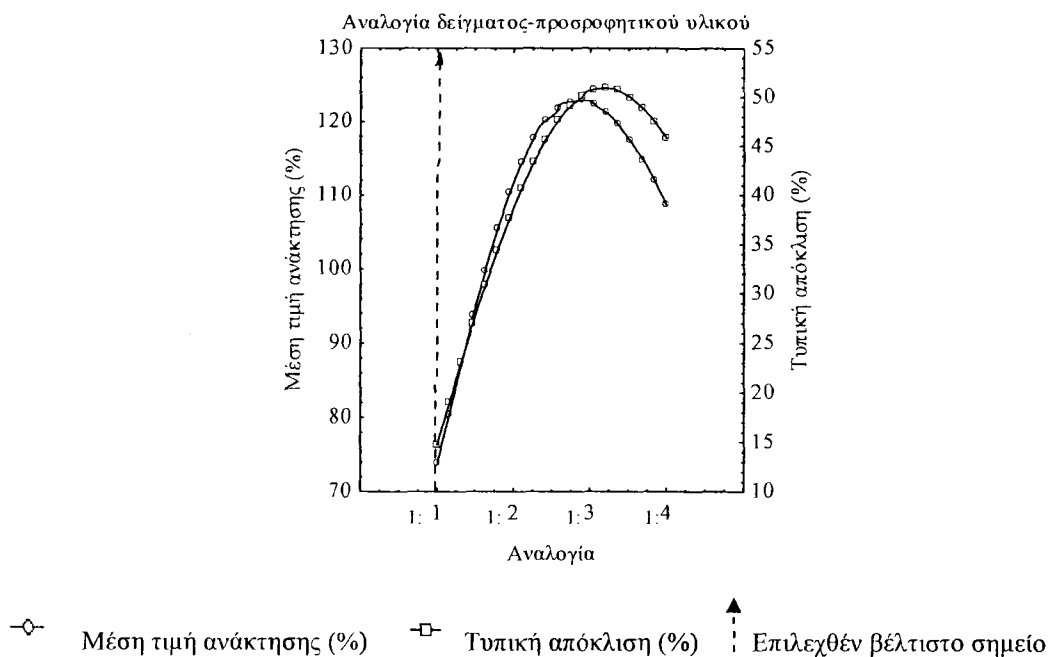


Σχήμα 8.13. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «διαλύτης έκλουσης-όγκος διαλύτη έκλουσης» στη μέση τιμή της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων

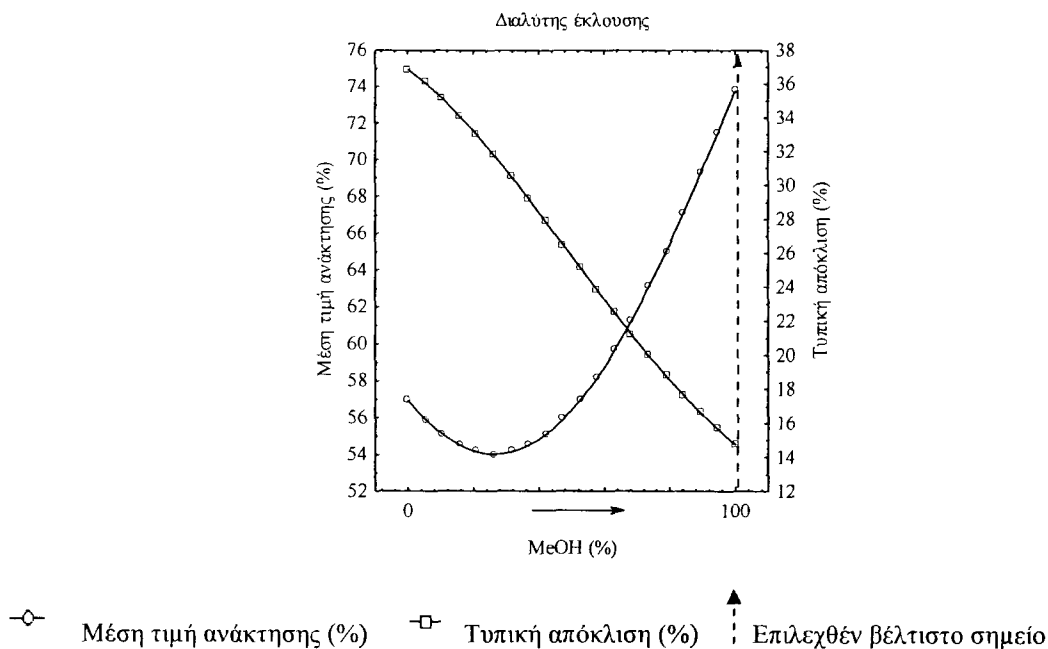
Ωστόσο, εκμεταλλευόμενοι τις ιδιότητες των νευρωνικών δικτύων να λειτουργούν ως «προσεγγιστές» όλων των ειδών των συναρτήσεων (Anjum, Tasadduq et al. 1997) μπορεί να κατασκευαστεί ένα γράφημα απόκρισης (response graph) που να επιτρέπει την εξερεύνηση της βέλτιστης περιοχής χωρίς την περαιτέρω ανάγκη της γνώσης της εξίσωσης της συνάρτησης όπως συμβαίνει με άλλα μοντέλα επιφανειακής απόκρισης (Σχήματα 8.14, 8.15, 8.16 και 8.17). Από τα αναφερόμενα γραφήματα συμπεραίνει κανείς ότι η μέγιστη απόδοση εκχύλισης όλων ταυτόχρονα των αναλυτέων ενώσεων (χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η τυπική απόκλιση των μέσων τιμών των ανακτήσεων) παρατηρείται υπό τις παρακάτω συνθήκες: ως υλικό διασποράς το μίγμα Florisil:C₁₈ σε αναλογία 67%: 33%, το ποσοστό της ποσότητας του δείγματος προς το υλικό διασποράς της τάξεως του 1:3, ως διαλύτη έκλουσης την καθαρή μεθανόλη (100% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο) και ως βέλτιστο όγκο έκλουσης τον όγκο των 15 ml.



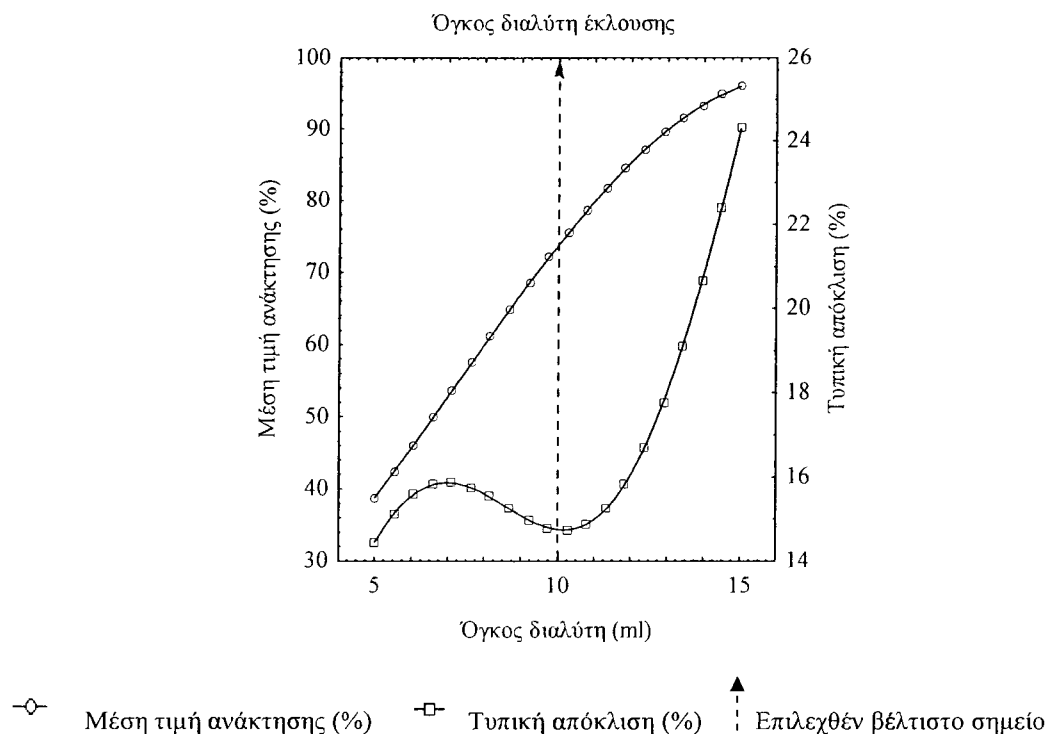
Σχήμα 8.14 Γράφημα απόκρισης με μελετώμενη παράμετρο το υλικό διασποράς, μετά από την εκπαίδευση των δύο ANN χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή της ανάκτησης και την τυπική της απόκλιση ως εξόδους, αντίστοιχα



Σχήμα 8.15 Γράφημα απόκρισης με μελετώμενη παράμετρο την αναλογία του δείγματος και του υλικού διασποράς, μετά από την εκπαίδευση των δύο ANN χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή της ανάκτησης και την τυπική της απόκλιση ως εξόδους, αντίστοιχα

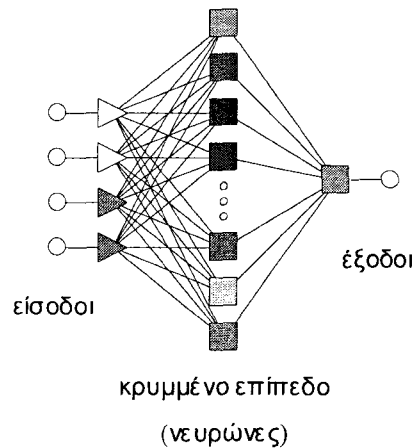


Σχήμα 8.16 Γράφημα απόκρισης με μελετώμενη παράμετρο τον διαλύτη έκλουσης, μετά από την εκπαίδευση των δύο ANN χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή της ανάκτησης και την τυπική της απόκλιση ως εξόδους, αντίστοιχα



Σχήμα 8.17 Γράφημα απόκρισης με μελετώμενη παράμετρο τον όγκο του διαλύτη έκλουσης, μετά από την εκπαίδευση των δύο ANN χρησιμοποιώντας τη μέση τιμή της ανάκτησης και την τυπική της απόκλιση ως εξόδους, αντίστοιχα

Στη συνέχεια, ερευνήθηκε το καλύτερο τεχνητό νευρωνικό δίκτυο με αντίστοιχη με τα προηγούμενα διαδικασία, με τη διαφορά ότι ως έξοδος χρησιμοποιήθηκε η τυπική απόκλιση της μέσης τιμής των ανακτήσεων. Η βέλτιστη δομή νευρωνικού δικτύου που βρέθηκε ήταν ένα πολυεπίπεδο perceptron. Η τελική αρχιτεκτονική δομή του (Σχήμα 8.18) αποτελείται από δέκα νευρώνες στο κρυμμένο επίπεδο (4:10:1). Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος conjugate gradient descent για την εκπαίδευση του νευρωνικού δικτύου και βρέθηκε στην 137^η εποχή. Το σφάλμα εκπαίδευσης και επιβεβαίωσης ήταν 1.327 RMS και 1.920 RMS, αντίστοιχα.



Σχήμα 8.18 Η αρχιτεκτονική δομή του εφαρμοζόμενου τεχνητού νευρωνικού δικτύου ($n=27$, είσοδοι: τέσσερις παράμετροι της μεθόδου εκχύλισης MSPD, δέκα κρυμμένοι νευρώνες, έξοδος: τυπική απόκλιση της μέσης ανάκτησης των 5 αναλυσόμενων ενώσεων, αλγόριθμος εκπαίδευσης: *conjugate gradient decent* στην 137^η εποχή)

Το γεγονός ότι οι τιμές των δύο αυτών σφαλμάτων συμφωνούν υποδηλώνει ισχυρά ότι το νευρωνικό δίκτυο δεν υφίσταται “υπέρ-προσαρμογή” και έχει καλή απόδοση πρόβλεψης. Στο Σχήμα 8.19 απεικονίζεται γραφικά η σχέση των πειραματικών τιμών της τυπικής απόκλισης της μέσων τιμής της ανάκτησης για τις επιλεγμένες ενώσεις με τις αντίστοιχες προβλεπόμενες από το νευρωνικό δίκτυο. Η συσχέτιση περιγράφεται από την ακόλουθη σχέση:

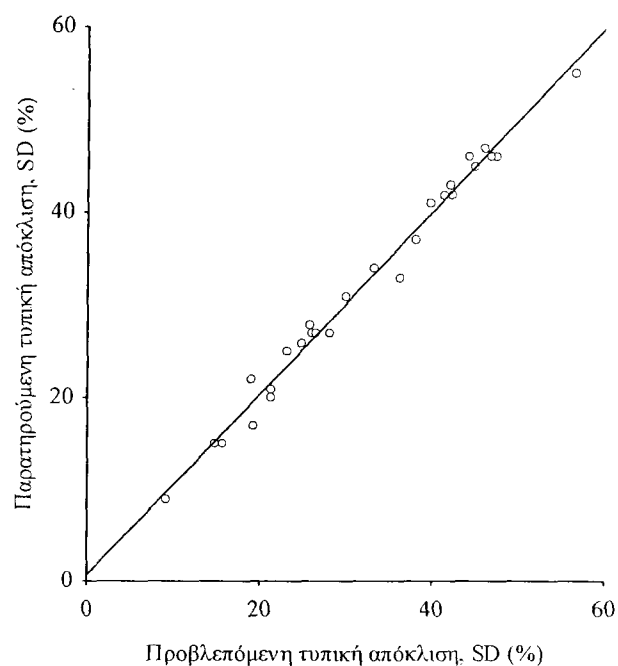
$$SD_{\text{obs}}(\%) = 0.7020 + 0.9838 SD_{\text{pred}}(\%) \quad (\text{εξ. 8.2})$$

$$n = 23; r = 0.9930$$

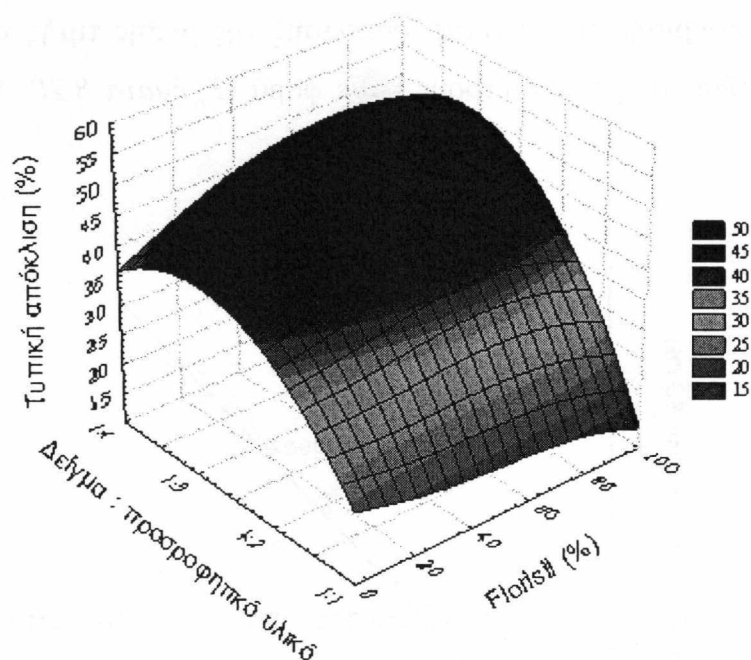
όπου n είναι ο αριθμός των πειραμάτων τα δεδομένα των οποίων χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα για την εκπαίδευση των ANNs και r είναι η σταθερά συσχέτισης που αντιπροσωπεύει τη γραμμική σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών.

Η παραπάνω σχέση υποδεικνύει το γεγονός ότι η αρχιτεκτονική δομή του επιλεγμένου νευρωνικού δικτύου προσομοιώνει σωστά τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό το νευρωνικό δίκτυο χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή

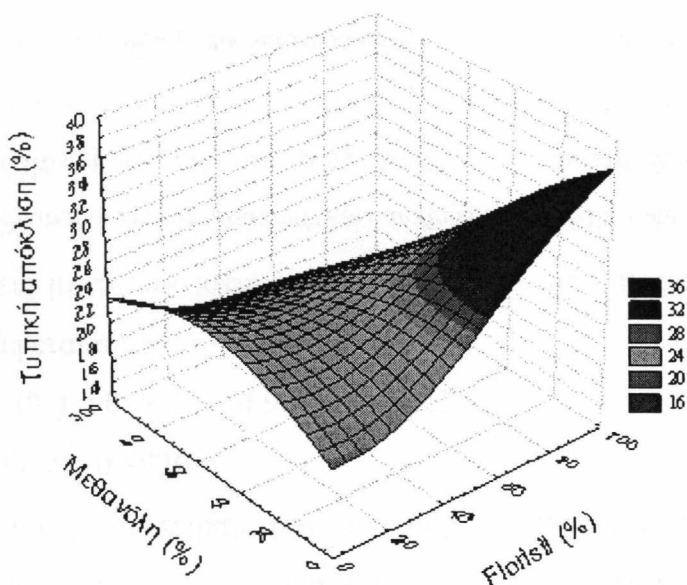
της επιφάνειας απόκρισης της τυπικής απόκλισης της μέσης τιμής των ανακτήσεων για δύο από τις τέσσερις παραμέτρους κάθε φορά (Σχήματα 8.20, 8.21, 8.22, 8.23, 8.24 και 8.25).



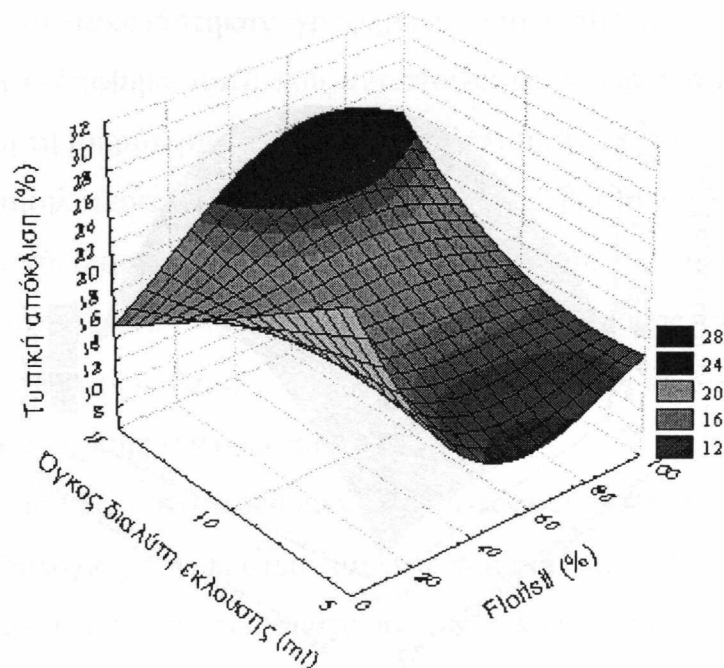
Σχήμα 8.19 Συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της τυπικής απόκλισης των μέσων τιμών των ανακτήσεων των αναλυόμενων ενώσεων



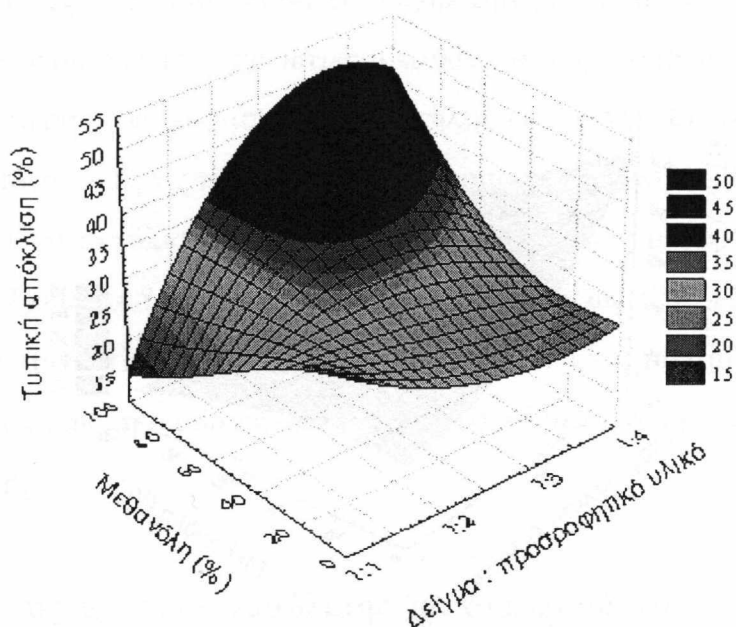
Σχήμα 8.19. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «προσροφητικό υλικό-αναλογία δείγματος/προσροφητικού υλικού» στην τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων



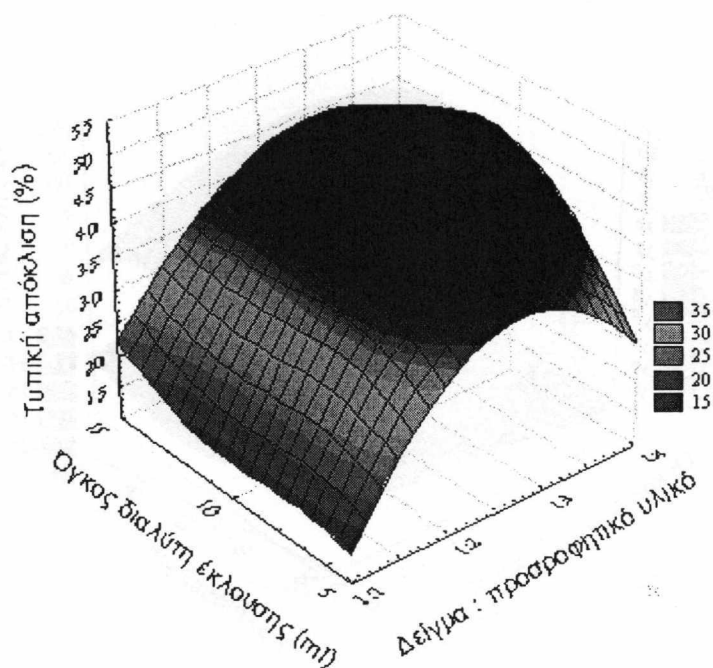
Σχήμα 8.20. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «προσροφητικό υλικό-διαλύτης έκλουσης» στην τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων



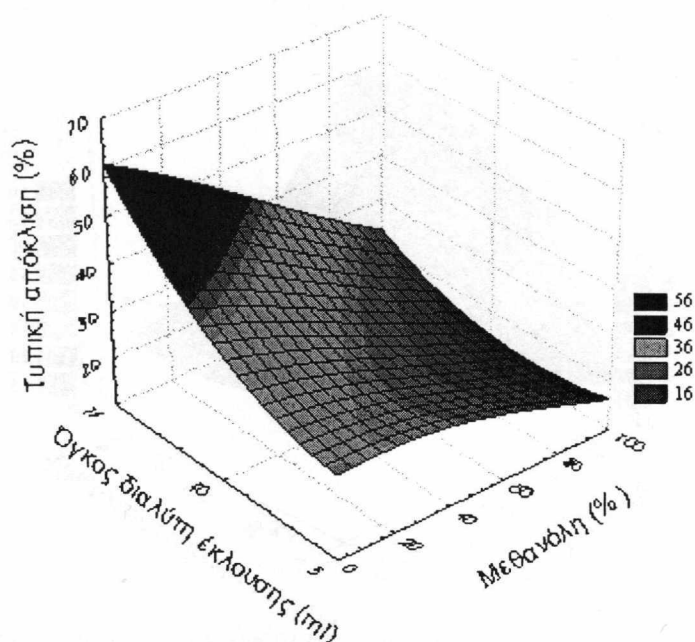
Σχήμα 8.21. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «προσροφητικό υλικό-όγκος διαλύτη έκλουσης» στην τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων



Σχήμα 8.22. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγματος/προσροφητικού υλικού-διαλύτη έκλουσης» στην τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων



Σχήμα 8.23. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «αναλογία δείγματος/προσροφητικού υλικού-όγκος διαλύτη έκλουσης» στην τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων



Σχήμα 8.24. Προσομοίωση, μετά την εφαρμογή των κατάλληλων ANNs, για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παραγόντων «διαλύτης έκλουσης-όγκος διαλύτη έκλουσης» στην τυπική απόκλιση της μέσης τιμής της ανάκτησης των επιλεγμένων ενώσεων

Επιπλέον, κατασκευάστηκαν γραφήματα απόκρισης με τη διαφορά ότι ως βέλτιστη περιοχή εκλήφθηκε αυτή που αντιστοιχεί στην περιοχή με τη χαμηλότερη απόκριση, δηλαδή τη μικρότερη τιμή τυπικής απόκλισης (Σχήματα 8.14, 8.15, 8.16 και 8.17). Έτσι οι χαμηλότερες τιμές τυπικής απόκλισης βρέθηκαν υπό τις παρακάτω συνθήκες: ως υλικό διασποράς το μίγμα Florisil:C₁₈ σε αναλογία 100%: 0%, το ποσοστό της ποσότητας του δείγματος προς το υλικό διασποράς της τάξεως του 1:1, ως διαλύτη έκλουσης την καθαρή μεθανόλη (100% μεθανόλη σε διχλωρομεθάνιο) και ως βέλτιστο όγκο έκλουσης τον όγκο των 5 ml.

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα, η ανάπτυξη της πολύ-υπολειμματικής αναλυτικής μεθοδολογίας που προτείνεται στα πλαίσια της Διδακτορικής Διατριβής απαιτεί την επιλογή τέτοιων πειραματικών συνθηκών ώστε να διασφαλίζεται η επίτευξη των υψηλότερων δυνατών μέσων τιμών ανακτήσεων με τις χαμηλότερες δυνατές τυπικές αποκλίσεις για το μίγμα των επιλεγμένων αναλυτών ουσιών. Ωστόσο, δεν μπορούν να παραβλεφθούν κάποιες πρακτικές πειραματικές παρατηρήσεις όπως τα πιο καθαρά εκχυλίσματα, παρεμβαλλόμενες κορυφές συνεκχυλιζόμενων ουσιών (π.χ. χρωστικές) καθώς και η λειτουργικότητα της ανάμιξης των υλικών και περαιτέρω παρασκευή της στήλης εκχύλισης. Σε αυτό το πλαίσιο και λαμβάνοντας υπόψη όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις, οι τελικές βέλτιστες συνθήκες για την ταυτόχρονη εκχύλιση των linuron, diuron και των μεταβολιτών τους με τη μέθοδο MSPD (Σχήματα 8.14, 8.15, 8.16 και 8.17) έχουν ως εξής: Ως υλικό διασποράς χρησιμοποιείται το Florisil σε αναλογία 1:1 με το υπόστρωμα του δείγματος για την παρασκευή της στήλης, η οποία εκχυλίζεται με 10 ml μεθανόλης που αποτελεί και τον διαλύτη έκλουσης.

8.2 Απόδοση της μεθόδου εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD)

Η εκτίμηση της απόδοσης της αναλυτικής μεθόδου MSPD που βελτιστοποιήθηκε πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων μίγματος

των αναλυόμενων ενώσεων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα αποτελέσματα δίνονται συνοπτικά στους Πίνακες 8.3 και 8.4.

Πίνακας 8.3

Ανακτήσεις^a, όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου MSPD

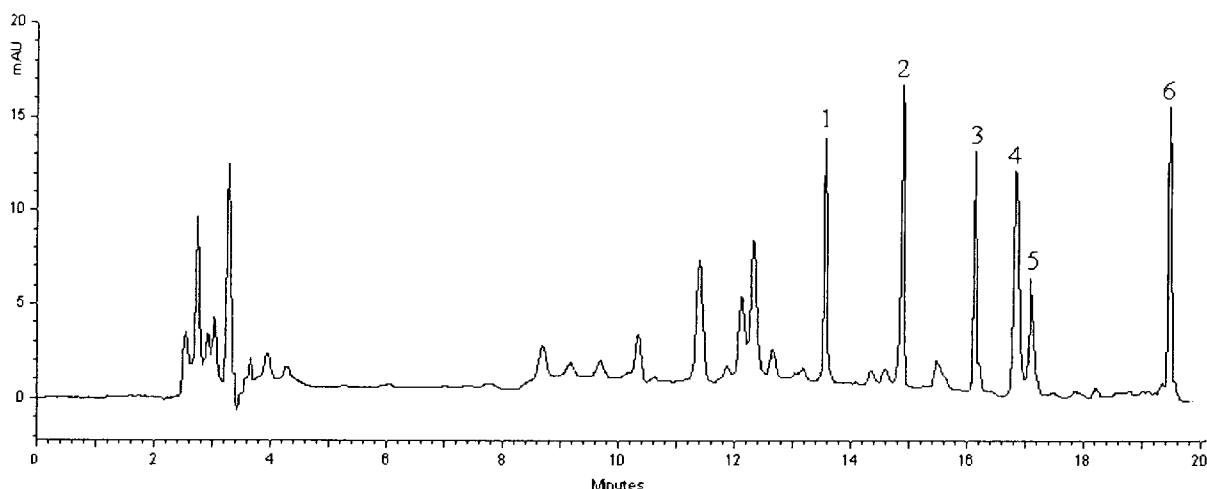
Ένωση	Ανάκτηση (%) (RSD %)	Σταθερά προσδιορισμού (R ²)	LOD (μg/Kg) ^β	LOQ (μg/Kg) ^β
DCPU	74 (4)	0.9981	5.0	15.2
DCPMU	95 (3)	0.9973	1.9	5.7
Diuron	91 (2)	0.9988	2.0	6.5
Linuron	96 (2)	0.9997	1.8	5.3
3,4-DCA	55 (6)	0.9945	3.0	9.1

^aΕμβολιασμένα δείγματα πατάτας με το μίγμα των αναλυτέων ενώσεων, τα οποία αναλύθηκαν με τη μέθοδο MSPD σε συνδυασμό με τον περαιτέρω χρωματογραφικό προσδιορισμό τους (HPLC-UV/DAD), επίπεδο συγκέντρωσης 0.1 mg/Kg. ^βόριο ανίχνευσης (LOD), S/N=3; όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), S/N=10; Ανίχνευση στα 252 nm για τα diuron και DCPMU, 250 nm για τα linuron και DCPU και 248 nm για το 3,4-DCA.

Η γραμμικότητα της μεθόδου στην απόκριση όλων των ενώσεων του μίγματος κατά τη χρωματογραφική ανάλυση με το σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC/UV-DAD) αξιολογήθηκε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων του μίγματος των ενώσεων υπό ανάλυση σε ακετονιτρίλιο:νερό (50:50) και σε πέντε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων που κυμάνθηκαν από 0.05 έως 1 mg/Kg. Οι σταθερές προσδιορισμού που επιτεύχθηκαν για όλες τις ενώσεις κυμάνθηκαν από 0.9945 έως 0.9997.

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου (Πίνακας 8.3) υπολογίστηκαν ως οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις για τις οποίες ο λόγος σήματος-θορύβου παίρνει τουλάχιστον τις τιμές 3 και 10 αντίστοιχα, ακολουθώντας τις συστάσεις της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*) (Currie 1995).

Όσον αφορά τις ανακτήσεις της μεθόδου MSPD, αυτές υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τρία ανεξάρτητα δείγματα πατάτας ίδιας ποσότητας (0.5g), τα οποία είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με το μίγμα των αναλυτέων ενώσεων σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 µg/Kg. Επιπλέον, έγινε επεξεργασία και ανάλυση κατά τον ίδιο τρόπο μη εμβολιασμένων δειγμάτων (τυφλά, $n=3$), τα οποία λήφθηκαν υπόψη κατά τους υπολογισμούς των ανακτήσεων. Στον Πίνακα 8.3 συνοψίζονται οι μέσες ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν για κάθε ένωση του μίγματος και οι οποίες κυμάνθηκαν από 55 έως 96 %. Στο Σχήμα 8.25 φαίνεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος πατάτας με το μίγμα των επιλεγμένων ενώσεων σε συγκέντρωση 100 µg/Kg μετά την εκχύλιση με τη μέθοδο MSPD.



Σχήμα 8.25 Χρωματογράφημα σε σύστημα HPLC/UV-DAD ύστερα από εκχύλιση με τη μέθοδο MSPD δείγματος πατάτας εμβολιασμένου με το μίγμα των EDCs και των μεταβολιτών τους σε συγκέντρωση 100 µg/Kg: (1) DCPU, (2) DCPMU, (3) diuron, (4) 3,4-DCA (5) metobromuron (IS, 1 mg/L) και (6) linuron (Χρωματογραφικές συνθήκες: Discovery C18 (250 x 4.6mm ID: 5µm) στήλη; κινητή φάση: ακετονιτρίλιο/νερό; ρυθμός ροής: 1ml/λεπτό; ανιχνευτής UV/DAD ρυθμισμένος στα μήκη κύματος 248, 250 και 252 nm; οι συνθήκες της βαθμωτής έκλουσης αναφέρονται στην παράγραφο 5.8.1.)

Η πιστότητα μιας αναλυτικής μεθόδου προσδιορίζει την αναλυτική απόκλιση και αποτελεί το πιο σημαντικό κριτήριο για την αξιολόγηση της απόδοσης αυτής. Η πιστότητα αντικατοπτρίζει τη διακύμανση στα αποτελέσματα όταν πραγματοποιείται επαναλαμβανόμενη ανάλυση του ίδιου δείγματος. Η πιστότητα μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων στο ίδιο δείγμα (*επαναληψιμότητα*) προσδιορίστηκε την ίδια μέρα και περιλάμβανε δύο σειρές των έξι επαναλήψεων σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/Kg}$. Η πιστότητα μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων σε διαφορετικά δείγματα (*αναπαραγωγιμότητα*) υπολογίστηκε με δύο σειρές των έξι επαναλήψεων στην ίδια προαναφερόμενη συγκέντρωση σε διάστημα τριών ημερών.

Πίνακας 8.4

Πιστότητα της μεθόδου MSPD (n=6 επαναλήψεις)

Ένωση	Επαναληψιμότητα (RSD %)	Αναπαραγωγιμότητα (RSD %)
DCPU	12.1	13.2
DCPMU	7.8	6.9
Diuron	7.3	6.1
Linuron	3.9	4.7
3,4-DCA	9.8	14.2

Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα των ενώσεων προς ανάλυση, εκφρασμένες και οι δύο ως σχετικές τυπικές αποκλίσεις, κυμάνθηκαν από 4 έως 12% και από 5 έως 14% αντίστοιχα (Πίνακας 8.4).

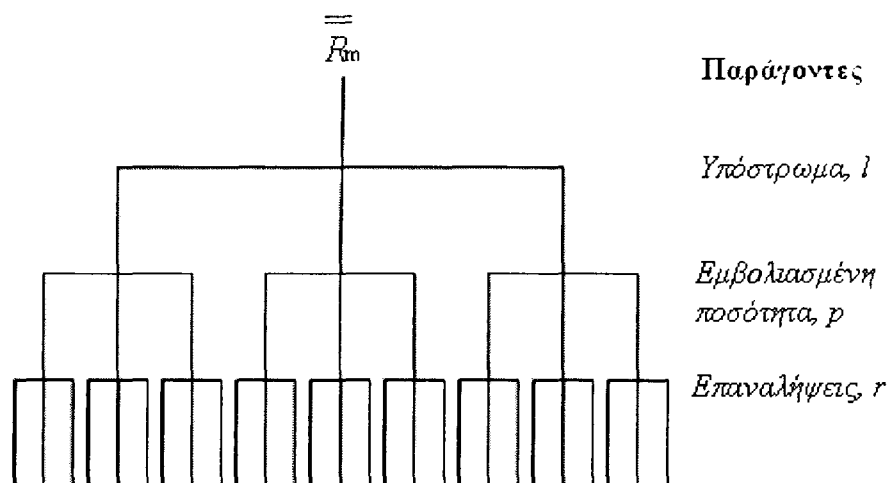
8.3 Εκτίμηση της αβεβαιότητας της μεθόδου MSPD σε διαφορετικά είδη τροφίμων βάσει ανακτήσεων

Όπως έχει προαναφερθεί, ο έλεγχος ορθότητας μιας αναλυτικής μεθοδολογίας περιλαμβάνει την εκτίμηση του συστηματικού σφάλματός της. Στην παρούσα μελέτη

γίνεται προσδιορισμός του αναλογικού συστηματικού σφάλματος, το οποίο εκφράζεται με τον όρο της «ανάκτησης», όπως έχει ήδη εφαρμοστεί στην περίπτωση των δειγμάτων ιζημάτων και επιφανειακών υδάτων. Η διακύμανση της ανάκτησης εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση, τον τύπο του υποστρώματος και τη διακύμανση της μεθόδου μέσα στην ίδια μέρα. Για τον προσδιορισμό της ανάκτησης και της αβεβαιότητας που αυτή συνεπάγεται, χρησιμοποιήθηκε, αντίστοιχα με τις προηγούμενες περιπτώσεις, ένα πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο αποτελούμενο από τρεις παράγοντες: τα διαφορετικά υποστρώματα (σ' αυτή την περίπτωση τα διαφορετικά είδη τροφίμων), τα επίπεδα συγκεντρώσεων και τις επαναλήψεις. Επιπλέον υπολογίστηκαν οι διακυμάνσεις των παραγόντων σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Maroto, Boque et al. 2001; Dehouck, Van Looy et al. 2003; Polati, Roz et al. 2005; Wang, Leung et al. 2005). Το πειραματικό σχέδιο φαίνεται στο Σχήμα 8.26.

Σ' αυτήν τη μελέτη τα διαφορετικά είδη τροφίμων που μελετήθηκαν τοποθετήθηκαν ψηλά στην ιεραρχία, καθότι είναι ο παράγοντας που επηρεάζεται περισσότερο από συστηματικές επιδράσεις ενώ ακολουθούν τα διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων και έπειτα οι επαναλήψεις. Αυτό έγινε καθότι τα τρόφιμα αποτελούν ιδιαίτερα σύνθετα υποστρώματα με σημαντικές διαφορές ανάλογα με τη σύστασή τους (Πίνακας 5.1) και κατά συνέπεια υπόκεινται σε συστηματικές επιδράσεις πολύ περισσότερο απ' ότι άλλου τύπου υποστρώματα. Ο τελευταίος παράγοντας (επαναλήψεις) θεωρείται ότι έχει υπολειμματική διακύμανση (*residual variation*).

Η ανάκτηση υπολογίστηκε για τρεις διαφορετικούς τύπους τροφίμων (σιτάλευρα, πατάτες και μήλα, $l = 3$). Για κάθε υπόστρωμα, η ανάλυση έγινε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων ($p = 3$), 0.05, 0.1 και 0.5 mg/Kg και η ανάλυση για κάθε δείγμα επαναλήφθηκε τρεις φορές ($r = 3$). Έτσι, το σύνολο των αναλύσεων ήταν 27 για κάθε ένα από τα συστατικά του μίγματος. Στο συγκεκριμένο πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο, όλοι οι παράγοντες θεωρούνται τυχαίοι.



Σχήμα 8.26 Πειραματικό σχέδιο για την εκτίμηση της ανάκτησης όταν l υποστρώματα διαφορετικών και αντιπροσωπευτικών προελεύσεων έχουν εμβολιαστεί σε p διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων με το μίγμα των αναλυόμενων ουσιών. Εξετάζονται τρεις παράγοντες διακύμανσης: ο παράγοντας «υπόστρωμα, M », η προστιθέμενη ποσότητα, C και η πιστότητα, r (επαναλήψεις). Για κάθε υπόστρωμα, στο οποίο η προστιθέμενη ποσότητα του μίγματος των ενώσεων ποικίλει (p επίπεδα συγκεντρώσεων) υπολογίζεται η μέση ανάκτηση. Τέλος, προκύπτει ο μεγάλος μέσος όρος όλων των ανακτήσεων του πειραματικού σχεδίου ($\overline{R_m}$)

Γενικά το αναλογικό συστηματικό σφάλμα πρέπει να εκτιμάται από μελέτες ανακτήσεων χρησιμοποιώντας δείγματα αναφοράς αντιπροσωπευτικά των δειγμάτων ρουτίνας (Thompson, Ellison et al. 1999; Maroto, Boque et al. 2001). Ωστόσο, τα κατάλληλα δείγματα αναφοράς είναι σπάνια διαθέσιμα και συχνά οι αναλύσεις γίνονται τελικά με εμβολιασμένα δείγματα σε γνωστές συγκεντρώσεις. Η διαδικασία εμβολιασμού των τροφίμων έγινε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.6.2 ώστε το δείγμα να είναι σταθερό, ομογενές και όσο το δυνατόν περισσότερο όμοιο με τα μελλοντικά δείγματα ρουτίνας.

Εδώ, η ανάκτηση υπολογίστηκε με τη μέθοδο της μέσης ανάκτησης. Στα υποκεφάλαια 3.6.6.1 και 3.6.6.2 δίνονται όλες οι εξισώσεις και περιγράφεται

αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της τελικής μέσης ανάκτησης, της αβεβαιότητάς της και των επιμέρους συστατικών αβεβαιότητας με χρήση της ανάλυσης διακύμανσης (*ANOVA*).

Στους Πίνακες 8.5 και 8.6 απεικονίζονται οι διακυμάνσεις, δηλαδή, τα μέσα τετράγωνα των παραγόντων και η αβεβαιότητα για κάθε παράγοντα αλλά και η αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης μετά την εκχύλιση με τη μέθοδο MSPD των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους από εμβολιασμένα δείγματα τροφίμων.

Οι τιμές των μέσων τετραγώνων αναμένεται να αυξάνονται από τα χαμηλά προς τα ψηλά επίπεδα του ιεραρχικού σχεδίου, διότι πηγαίνοντας σε υψηλότερο επίπεδο, ένας θετικός όρος προστίθεται στο μέσο τετράγωνο του χαμηλότερου επιπέδου. Έτσι οι διακυμάνσεις αναμένεται να είναι θετικές (Vander Heyden, De Braekeleer et al. 1999). Αν όμως ένας παράγοντας εμφανίζει σημαντικά μικρότερη επίδραση στην απόκριση σε σχέση με έναν παράγοντα που βρίσκεται ακριβώς κάτω από αυτόν στο σχέδιο, τότε η υπολογιζόμενη τιμή του μέσου τετραγώνου είναι πολύ μικρή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διακύμανση αυτού του παράγοντα να έχει αρνητική τιμή.

Όπως φαίνεται στους Πίνακες 8.5 και 8.6 η εκτιμώμενη διακύμανση που οφείλεται στα διαφορετικά είδη τροφίμων έχει αρνητική τιμή για όλες τις αναλυόμενες ενώσεις με μοναδική εξαίρεση την περίπτωση του ζιζανιοκτόνου linuron. Αυτό υποδηλώνει το γεγονός ότι κάθε πιθανή αλλαγή στο είδος του τροφίμου προς ανάλυση (αντιπροσωπευτικά είδη τροφίμων των εξεταζόμενων με παρόμοιες ιδιότητες-σύσταση) για αυτήν την ένωση θα προκαλεί διακύμανση στα αποτελέσματα. Κατά συνέπεια, ο κυριότερος παράγοντας συνεισφοράς στην αβεβαιότητα της μεθόδου για τις παραπάνω ενώσεις είναι τα επίπεδα των συγκεντρώσεων. Έτσι η αβεβαιότητα σχετικά με τον τύπο του υποστρώματος δεν συμπεριλήφθηκε στην εκτίμηση της αβεβαιότητας $u(R)$ της πραγματικής ανάκτησης R για όλους τους μεταβολίτες και την μητρική τους ένωση diuron.

Πίνακας 8.5

Μέσα τετράγωνα, βαθμοί ελευθερίας και συστατικά αβεβαιότητας για τα ζιζανιοκτόνα diuron και linuron

Πηγή	df	Diuron	Linuron
		MS ^a / F-τιμή ^b (p ^γ)	
Υποστρώματα	2	0.03721 / 0.4048 (0.684080)	0.10801/ 12.2970 (0.007543)
Συγκεντρώσεις (υποστρώματα)	6	0.09193/ 4.1348 (0.008762)	0.00878 / 0.3914 (0.874905)
Επαναλήψεις	18	0.02223	0.02244
<u>Αβεβαιότητα</u>			
$u(\Delta R_M)^2$		-0.006080	0.011025
$u(\Delta R_C)^2$		0.023231	-0.004552
$u(\Delta R_r)^2$		0.022232	0.022441
$u(\overline{R_w})^2$		0.003405	0.000325
$u(R)$		0.163205	0.106539

^aMS: μέσα τετράγωνα

^bF - τιμή: F-δοκιμή που εκτιμά τις διακυμάνσεις ξεχωριστά και εκφράζει τα σχετικά τους μεγέθη

^γp: πιθανότητα

Εν αντιθέσει με τα παραπάνω, για το linuron φαίνεται ότι κύρια συνεισφορά στην αβεβαιότητα της μεθόδου έχει ο παράγοντας «υπόστρωμα» και όχι το επίπεδο των συγκεντρώσεων, αφού η εκτιμώμενη διακύμανση του τελευταίου παράγοντα έχει αρνητική τιμή.

Πίνακας 8.6

Μέσα τετράγωνα, βαθμοί ελευθερίας και συστατικά αβεβαιότητας για τους μεταβολίτες

Πηγή	df	DCPMU	DCPU	3,4-DCA
		MS / F-τιμή (p)		
Υποστρώματα	2	0.01392 / 0.177 (0.842118)	0.00437 / 0.068 (0.935409)	0.002109 / 0.127 (0.882906)
Συγκεντρώσεις (υποστρώματα)	6	0.07872 / 2.034 (0.113674)	0.06470 / 2.103 (0.103569)	0.016584 / 2.478 (0.063263)
Επαναλήψεις	18	0.03871	0.03076	0.006692
<u>Αβεβαιότητα</u>				
$u(\Delta R_M)^2$		-0.007200	-0.006703	-0.001608
$u(\Delta R_C)^2$		0.013337	0.011312	0.003297
$u(\Delta R_r)^2$		0.038710	0.030760	0.006692
$u(\overline{R_M})^2$		0.002916	0.002396	0.000614
$u(R)$		0.127487	0.117083	0.062542

Ένα άλλο κριτήριο για την ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων είναι η δοκιμασία F (F -test), με την οποία συγκρίνονται τα μέσα τετράγωνα, που αποτελούν στην ουσία τις διακυμάνσεις. Η τιμή F για κάθε παράγοντα υπολογίζεται ως ο λόγος του μέσου τετραγώνου ενός παράγοντα προς το μέσο τετράγωνο αυτού που βρίσκεται στο ιεραρχικό σχέδιο ένα επίπεδο ακριβώς κάτω (Πίνακες 8.5 και 8.6). Έτσι μπορεί να εξακριβωθεί εάν ένας παράγοντας σε υψηλό επίπεδο στην ιεραρχική δομή του σχεδίου συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της διακύμανση σε σύγκριση με τη συνεισφορά όλων των παραγόντων που βρίσκονται χαμηλότερα από αυτόν. Με αυτόν τον τρόπο, στην περίπτωσή μας φαίνεται ότι υπάρχει σημαντική ένδειξη της επίδρασης του υποστρώματος για τιμή $\alpha=0.05$ (p -τιμές < 0.05) μόνο για τον ενδοκρινικό διαταράκτη linuron. Με άλλα λόγια δε διαφαίνεται σημαντική επίδραση του επιπέδου των

συγκεντρώσεων, πράγμα γενικά αναμενόμενο, εάν ληφθούν υπόψη κάποιες σημαντικές διαφορές στη σύσταση των εξεταζόμενων τροφίμων (Πίνακας 5.1).

Ωστόσο, τα παραπάνω έρχονται σε αντίθεση με το γεγονός ότι για όλες τις υπόλοιπες ενώσεις του μίγματος σημαντική φαίνεται η επίδραση του επιπέδου των συγκεντρώσεων και όχι του τύπου του υποστρώματος στη συνολική αβεβαιότητα της μεθόδου. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται επιπλέον σε αντίθεση με το γενικότερο συμπέρασμα συνεισφοράς των παραπάνω παραγόντων στην αβεβαιότητα των αντίστοιχων αναλυτικών μεθόδου για νερά και ιζήματα (Κεφάλαια 6 και 7). Αυτή ακριβώς η αντίθεση ίσως μπορεί να αποδοθεί σε μια συνδυασμένη επίδραση, τόσο της λιποφιλίας του linuron όσο και στη σημαντική διαφορά σε περιεκτικότητα σε νερό μεταξύ των δειγμάτων σιτάλευρων (12.17%) και των άλλων τροφίμων (83.29% για τις πατάτες και 85.56% για τα μήλα). Έτσι πιθανόν επηρεάζεται πολύ περισσότερο η εκχύλιση των πολικότερων ενώσεων του μίγματος, όπως των μεταβολιτών, ανάλογα με το επίπεδο της εμβολιαζόμενης συγκέντρωσής τους στο τρόφιμο σε σχέση με την πιο λιπόφιλη ένωση, linuron.

Όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά στην παράγραφο 3.6.6.2 μπορεί να γίνει υπολογισμός των αβεβαιοτήτων των μέσων ανακτήσεων, $u(\overline{Ri})$, καθώς και της αβεβαιότητας της ολικής ανάκτησης, $u(\overline{Rm})$. Οι εκτιμώμενες τιμές, $\overline{R_m}$, καθώς και οι αβεβαιότητές τους επιτρέπουν την εφαρμογή ενός ελέγχου σημαντικότητας, όπως έχει προαναφερθεί, ώστε να αποφασισθεί η εισαγωγή ή όχι ενός συντελεστή διόρθωσης χρησιμοποιώντας την εξίσωση 6, Παράρτημα Β.

$$\frac{|\overline{R_m} - 1|}{\overline{R_m}} \leq t_{a/2, \text{eff}}$$

(εξ. 6, Παράρτημα Β)

όπου, $t_{a/2, \text{eff}}$, είναι η «δύο-πλευρών» τιμή t για τους βαθμούς ελευθερίας που σχετίζονται με την αβεβαιότητα, $u(\overline{R_m})$, για επίπεδο εμπιστοσύνης $1-\alpha$. Εάν η ανάκτηση δεν είναι στατιστικά διαφορετική από τη μονάδα (1) μπορεί κανείς να καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η διαδικασία δεν εμφανίζει σημαντικό αναλογικό

συστηματικό σφάλμα, οπότε δεν είναι απαραίτητη η εφαρμογή ενός συντελεστή διόρθωσης της ανάκτησης για τα μελλοντικά αποτελέσματα. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση που η ανάκτηση διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα (Barwick and Ellison 1999; Thompson, Ellison et al. 1999). Σε κάθε περίπτωση πάντως, οι φορείς IUPAC, Eurachem και Nordtest δηλώνουν ρητά ότι η αβεβαιότητα που προέρχεται από την εκτίμηση της ανάκτησης είναι πάντα υπολογίσιμη και θα πρέπει να συμπεριληφθεί στον τελικό προϋπολογισμό αβεβαιότητας ακόμη και αν η ανάκτηση φτάνει το 100% ή το συστηματικό σφάλμα είναι μηδενικό (Thompson, Ellison et al. 1999; Ellison, Rosslein et al. 2000; Nordtest 2003; Lisinger 2008).

Πίνακας 8.7

Ολικές ανακτήσεις και οι μετρούμενες αβεβαιότητες των μέσων ανακτήσεων των επιλεγμένων ενδοκρινικών διαταρακτών και των μεταβολιτών τους

ένωση	$\bar{R}_m$	t	$u(\bar{R}_s)^2$		
			σιτάλευρα	πατάτες	μήλα
linuron	0.836	9.096	0.000320	0.000587	0.000080
diuron	0.806	3.326	0.000268	0.000188	0.000145
DCPMU	0.943	1.055	0.000677	0.000247	0.000821
DCPU	0.797	4.155	0.000152	0.000005	0.000016
3,4-DCA	0.570	17.341	0.000002	0.000001	0.000008

Οι τιμές t που προκύπτουν από τη δοκιμή σημαντικότητας της ολικής ανάκτησης χρησιμοποιώντας την εξίσωση 6 (Παράρτημα Β) για τις πέντε αναλυόμενες ενώσεις απεικονίζονται στον Πίνακα 8.7.

Οι τιμές t για όλες τις ενώσεις, με εξαίρεση τον μεταβολίτη DCPMU ($t=1.055$), ήταν μεγαλύτερες της τιμής $t_{\text{κρίσιμη}}$ ($\alpha=0.05$) για 26 βαθμούς ελευθερίας σχετιζόμενους με την αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης ($t_{\text{κρίσιμη}} = 2.06$). Ουσιαστικά λοιπόν η διαφορά των ανακτήσεων των αναλυόμενων ενώσεων είναι στατιστικά σημαντική από

τη μονάδα και υπάρχει σημαντικό αναλογικό συστηματικό σφάλμα. Σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να εφαρμοστεί συντελεστής διόρθωσης στα αποτελέσματα ή η αναφερόμενη αβεβαιότητα της μεθόδου θα πρέπει να είναι ουσιαστικά μεγαλύτερη (Thompson, Ellison et al. 1999). Όταν πρόκειται για πολύπλοκα υποστρώματα όπως είδη τροφίμων, εδάφη και ιζήματα, όπου η δυσκολία εκχύλισης των αναλυόμενων ουσιών είναι πιο ευκρινής, αρκετά συχνά ένα σημαντικό ποσοστό των ενώσεων παραμένει προσδεμένο στο υπόστρωμα (Willettts and Wood 1998). Κατά συνέπεια η μεταφορά των ενώσεων είναι ελλιπής και ακολούθως η μετρούμενη συγκέντρωση είναι μικρότερη της πραγματικής. Η ασυμφωνία δε μεταξύ των αποτελεσμάτων από διαφορετικά εργαστήρια είναι αξιοπρόσεχτη, εάν δεν αντισταθμιστούν οι απώλειες. Ακόμη όμως μεγαλύτερες ασυμφωνίες μπορεί να προκύψουν εάν το ένα εργαστήριο λαμβάνει υπόψη τις απώλειες και εφαρμόζει π.χ. κάποιο συντελεστή διόρθωσης και άλλο όχι. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη το γεγονός ότι ανακτήσεις μικρότερες από 90% είναι λογικά αναμενόμενες όταν πρόκειται για ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων όπως τα τρόφιμα καθώς και το γεγονός ότι ακόμη ουσιαστικά δεν υπάρχει ενιαίος τρόπος αντιμετώπισης αυτού του θέματος από τους παγκόσμιους φορείς, τα αναλυτικά μας αποτελέσματα δεν διορθώθηκαν με χρήση συντελεστή διόρθωσης. Παρόλα αυτά η σχετιζόμενη με την ολική ανάκτηση αβεβαιότητα συμπεριλήφθηκε στον συνολικό προϋπολογισμό της «εσωτερικής» μελέτης επικύρωσης της μεθόδου για την αποφυγή υποτίμησης της αβεβαιότητας.

Στον Πίνακα 8.7 περιλαμβάνονται επιπλέον τα αποτελέσματα των μέσων ανακτήσεων για όλους τους τύπους τροφίμων που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτή τη μελέτη. Ο μεταβολίτης 3,4-DCA εμφάνισε τις χαμηλότερες τιμές ανακτήσεων σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις του μίγματος και όλα τα είδη τροφίμων. Η δυσκολία εκχύλισης της διχλωροανιλίνης από τα τρόφιμα συνάδει με την αντίστοιχη συμπεριφορά κατά την εκχύλιση από το ίδιο πολύπλοκα υποστρώματα όπως το ιζήματα. Ωστόσο, σχετικά χαμηλές ανακτήσεις παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση του μεταβολίτη DCPU πράγμα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μεγαλύτερη δυσκολία στην εκχύλιση των πιο πολικών ενώσεων του μίγματος (DCPU, 3,4-DCA).

πιθανόν λόγω μεγαλύτερης συνάφειας με τα χαρακτηριστικά των επιλεγμένων τροφίμων που κατά κύριο λόγο θεωρούνται μη λιπαρά υποστρώματα.

8.4 Εφαρμογή της μεθόδου MSPD σε δείγματα τροφίμων, εμβολιασμένα με το μίγμα των επιλεγμένων ενώσεων

Μετά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου MSPD, την επικύρωσή της και την εκτίμηση της αβεβαιότητας των ανακτήσεων καθώς και της συνεισφοράς των κυριότερων παραγόντων σ' αυτή, θα πρέπει κανείς να επιβεβαιώσει την ουσιαστική εφαρμογή της μεθόδου σε ένα εύρος πραγματικών δειγμάτων τροφίμων.

Γι' αυτό το σκοπό επιλέχθηκαν τρόφιμα αντιπροσωπευτικά του «καλαθιού της νοικοκυράς» (*market basket*), τα οποία εμβολιάστηκαν με γνωστή ποσότητα από το μίγμα των επιλεγμένων ενώσεων σε τελική συγκέντρωση 100μg/Kg. Στη συνέχεια εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο MSPD υπό τις βέλτιστες συνθήκες, όπως αυτές προσδιορίστηκαν παραπάνω και αναλύθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας. Τα επιλεγμένα τρόφιμα περιλάμβαναν τα εξής: μήλα, καρότα, χυμοί πορτοκαλιών και σιτάλευρα. Τα αποτελέσματα αναφορικά με την απόδοση της μεθόδου για τα παραπάνω υποστρώματα τροφίμων συνοψίζονται στους Πίνακες 8.8 και 8.9.

Γενικά, παρατηρήθηκαν ελαφρά μειωμένες τιμές ανακτήσεων για όλες τις ενώσεις του μίγματος κατά την εκχύλισή τους από δείγματα καρότων και μήλων. Τα συγκεκριμένα υποστρώματα εμφανίζουν μεγαλύτερη δυσκολία κατά την κατεργασία τους και τα χρωματογραφήματά τους περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό παρεμβαλλόμενων κορυφών σε σχέση με τα άλλα τρόφιμα. Τα παραπάνω οφείλονται πιθανότατα στη σύστασή τους (*Πίνακας 5.1*) αφού τα μεν μήλα περιέχουν μεγάλο ποσοστό σακχάρων, τα δε καρότα περιέχουν σε υπολογίσιμο ποσοστό ενώσεις χρωστικές όπως τα καροτινοειδή. Εξάλλου τα εκχυλίσματα καρότων είχαν μια ελαφρά κίτρινη απόχρωση. Τα παραπάνω μπορούν σε κάποιο βαθμό να αποφευχθούν προσθέτοντας στο τέλος της μικροστήλης MSPD κατά την κατασκευή της μία μικρή επιπλέον ποσότητα υλικού διασποράς, όπως Florisil (0.5g), το οποίο θα λειτουργήσει ως μια επιπρόσθετη φάση καθαρισμού του δείγματος.

Πίνακας 8.8.

Ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων από διάφορα εμβολιασμένα σε γνωστή συγκέντρωση είδη τροφίμων, μετά από εκχύλιση υπό τις βέλτιστες συνθήκες με τη μέθοδο MSPD^a

Ενώσεις	Ανάκτηση % (RSD %)			
	Καρότα	Μήλα	Χυμοί πορτοκ.	Σιτάλευρα
DCPU	63 (13)	62 (14)	78 (12)	75 (9)
DCPMU	92 (11)	83 (12)	96 (8)	84 (8)
Diuron	81 (10)	79 (11)	82 (9)	87 (7)
Linuron	87 (8)	84 (10)	92 (6)	92 (5)
3,4-DCA	49 (15)	54 (12)	57 (10)	57 (9)

^aΕμβολιασμένα δείγματα που αναλύθηκαν με τη μέθοδο MSPD σε συνδυασμό με χρωματογραφική ανάλυση (HPLC-UV/DAD), επίπεδο συγκέντρωσης 100 µg/Kg; σχετική τυπική απόκλιση (RSD) n=6 επαναλήψεις; ανίχνευση στα 252 nm για τα diuron και DCPMU, 250 nm για τα linuron και DCPU και 248 nm για το 3,4-DCA

Τα δείγματα χυμών πορτοκαλιού και σιτάλευρων έδωσαν στο σύνολό τους καθαρά και άχρωμα εκχυλίσματα και επιτεύχθηκαν καλές ανακτήσεις για την πλειονότητα των ενώσεων του μίγματος με παράλληλα χαμηλές σχετικές τυπικές αποκλίσεις. Σε γενικές γραμμές, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για κάθε τρόφιμο από τα αναλυθέντα κυμάνθηκαν σε όμοια επίπεδα.

Ωστόσο, θα πρέπει κανείς να επισημάνει το γεγονός ότι οι χαμηλότερες ανακτήσεις παρατηρήθηκαν στην περίπτωση των πολικότερων ενώσεων του μίγματος, των μεταβολιτών DCPU και 3,4-DCA και για όλους τους τύπους τροφίμων που μελετήθηκαν. Σε κάθε περίπτωση πάντως, η προτεινόμενη μεθοδολογία εκχύλισης επαρκεί για τον προσδιορισμό των αναλυτών ενώσεων σε πραγματικά δείγματα τροφίμων.

Πίνακας 8.9.**Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου MSPD^a**

	Καρότα		Μήλα		Χυμοί πορτοκ.		Σιτάλευρα	
	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)
Ενώσεις								
DCPU	2.2	6.8	3.5	11.2	2.6	7.5	5.3	17.1
DCPMU	5.4	16.1	2.7	9.1	2.3	6.7	2.4	8.2
Diuron	1.9	6.3	2.2	7.0	1.7	5.0	2.1	6.6
Linuron	1.6	5.3	2.1	6.9	1.9	6.25	1.7	5.6
3,4-DCA	3.6	11.9	6.3	20.9	2.9	8.8	4.1	13.8

^aόριο ανίχνευσης (LOD), S/N=3, όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), S/N=10**8.5 Εφαρμογή της μεθόδου MSPD σε πραγματικά δείγματα τροφίμων**

Η προτεινόμενη μέθοδος εκχύλισης εφαρμόστηκε με επιτυχία σε πραγματικά δείγματα τροφίμων που συλλέχθηκαν στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος COMPREND0. Η λογική και ο τρόπος της δειγματοληψίας περιγράφεται στην παράγραφο 5.5.3 της Διδακτορικής Διατριβής. Τα επιλεγμένα είδη τροφίμων περιλάμβαναν: σιτάλευρα, μήλα, πατάτες, καρότα και χυμούς πορτοκαλιού. Για την κάθε περίοδο δειγματοληψίας (*Ιανουάριο-Φεβρουάριο, Απρίλιο-Μάιο, Σεπτέμβριο-Οκτώβριο*) συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν 50 δείγματα τροφίμων (*150 στο σύνολο*) με σκοπό την ανίχνευση υπολειμμάτων των EDCs linuron και diuron καθώς και των μεταβολιτών τους DCPMU, DCPU και 3,4-DCA.

Τα συνολικά αποτελέσματα των αναλύσεων των 150 δειγμάτων τροφίμων που συλλέχθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 8.10. Οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων (*Πίνακας 8.10*) των δραστικών ουσιών, που προσδιορίστηκαν, υπολογίστηκαν από τα δείγματα στα οποία ανιχνεύθηκαν κάποιες από τις ενώσεις του μίγματος σε υπολογίσιμες συγκεντρώσεις (*άνω του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου*). Ο αριθμός των δειγμάτων που περιείχαν υπολείμματα των αναλυτέων ενώσεων σε ποσότητα κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης δεν συμπεριλήφθηκε στους υπολογισμούς

των μέσων συγκεντρώσεων για κάθε ένωση ενώ παράλληλα αναγράφεται σε παρένθεση στη στήλη των θετικών ανιχνεύσεων.

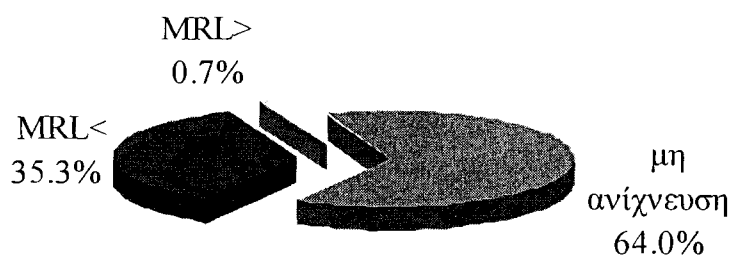
Πίνακας 8.10

Υπολείμματα των EDCs και των μεταβολιτών τους που ανιχνεύθηκαν σε 150 δείγματα τροφίμων

Δραστική ουσία	Μέση τιμή ^α (μg/Kg)	Εύρος συγκεντρώσεων ^α (μg/Kg)	Θετικές ανιχνεύσεις ^β (n) ^γ	Δείγματα άνω του MRL ^δ
Diuron	b.q.l. ^ε	b.q.l	0 (1)	0
Linuron	35.4	5.8-155.1	15 (12)	1
DCPMU	-	18.9	1 (5)	-
DCPU	15.8	6.5-23.1	13 (11)	-
3,4-DCA	27.5	11-48.6	4 (7)	-

^αΈχουν ληφθεί υπόψη μόνο οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν άνω του ορίου ποσοτικοποίησης, ^βΟ αριθμός των δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν υπολείμματα των αναλυτών σε συγκεντρώσεις άνω του ορίου ποσοτικοποίησης, ^γΟ αριθμός των δειγμάτων που περιείχαν ίχνη των αναλυτέων ενώσεων (συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης), ^δΓια τους μεταβολίτες DCPMU, DCPU και 3,4-DCA, δεν έχουν ακόμη θεσπιστεί από επίσημους φορείς ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων, ^εb.q.l=κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης

Γενικά, το 64% των δειγμάτων που ελέγχθηκαν δεν περιείχε ανιχνεύσιμα υπολείμματα των αναλυόμενων ουσιών. Στο 35.3% των δειγμάτων βρέθηκαν υπολείμματα κάτω του ανώτατου ορίου υπολειμμάτων ($<MRL$). Επιπλέον, από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μόνο στο 0.7% των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν υπολείμματα των αναλυτέων ενώσεων σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα ανώτατα επιτρεπτά όρια. Τα παραπάνω φαίνονται σχηματικά στο Σχήμα 8.27.



Σχήμα 8.27. Συνολικά αποτελέσματα (%) των ελέγχων των επιλεγμένων τροφίμων για υπολείμματα των δύο φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους

Στον Πίνακα 8.11 φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των ελέγχων των δειγμάτων (150 σε σύνολο) για κάθε επιλεγμένη ένωση.

Πίνακας 8.11

Αποτελέσματα ελέγχου των επιλεγμένων τροφίμων ανά αναλυτέα ένωση

	Πλήθος δειγμάτων	<MRL ^α	n.d. ^β	n.d.% ^γ	<MRL % ^δ	>MRL ^ε	>MRL % ^{στ}
Diuron	150.0	1.0	149.0	99.3	0.7	0.0	0.0
Linuron	150.0	26.0	123.0	82.0	17.3	1.0	0.7
DCPMU	150.0	6.0	144.0	96.0	4.0	0.0	0.0
DCPU	150.0	24.0	126.0	84.0	16.0	0.0	0.0
3,4-DCA	150.0	11.0	139.0	92.7	7.3	0.0	0.0

^α<MRL = αριθμός δειγμάτων που περιείχαν υπολείμματα σε συγκεντρώσεις κάτω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

^βn.d. = αριθμός δειγμάτων στα οποία δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα

^γn.d.% = ποσοστό δειγμάτων (%) στα οποία δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα

^δ<MRL = ποσοστό δειγμάτων (%) με υπολείμματα σε συγκεντρώσεις κάτω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

^ε<MRL = αριθμός δειγμάτων που περιείχαν υπολείμματα σε συγκεντρώσεις άνω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

^{στ}<MRL = ποσοστό δειγμάτων (%) με υπολείμματα σε συγκεντρώσεις άνω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

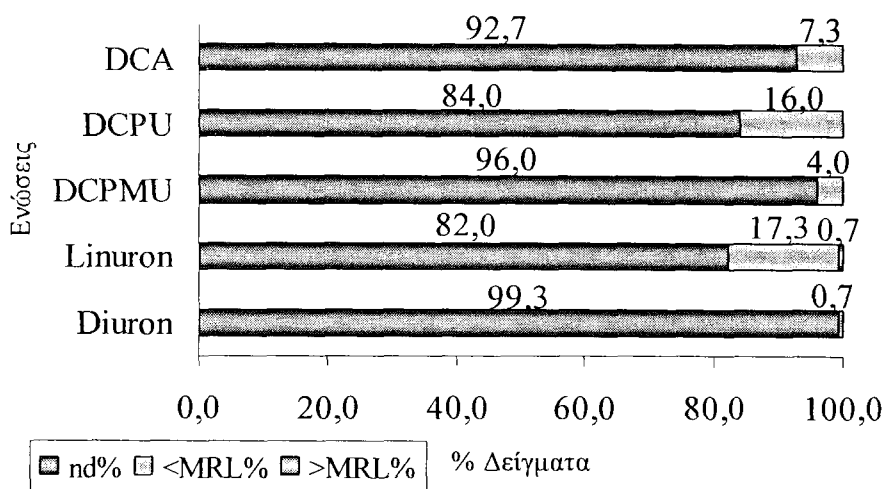
Με βάση τα αποτελέσματα αυτά παρατηρούμε ότι το linuron αποτελεί την πιο συχνά ανιχνεύσιμη ένωση στα δείγματα των τροφίμων αφού καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων με ανιχνεύσιμα υπολείμματα σε συγκεντρώσεις κάτω

των ανώτατων επιτρεπτών ορίων (17.3%) σε αντίθεση με το diuron, το οποίο ανιχνεύτηκε σε ίχνη σε ένα μόνο δείγμα ($< 7 \mu\text{g/Kg}$, 0.7%).

Ωστόσο το παραπάνω γεγονός μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις κυριότερες χρήσεις των δύο φυτοφαρμάκων: το linuron μεν είναι προ-φυτρωτικό εκλεκτικό ζιζανιοκτόνο που εφαρμόζεται κυρίως σε καλλιέργειες δημητριακών, λαχανικών και οπωροκηπευτικών ενώ το diuron είναι καθολικό ζιζανιοκτόνο που συνίσταται κατά κύριο λόγο για τον έλεγχο των υδρόβιων ζιζανίων και αλγών σε λίμνες, αρδευτικά αυλάκια και κανάλια.

Βάσει της συχνότητας ανίχνευσης, μετά το linuron (17,3%) ακολουθεί το DCPU (16%) και έπονται τα 3,4-DCA (7.3%) και DCPMU (4%).

Στο Σχήμα 8.28 φαίνονται τα παραπάνω συμπεράσματα παραστατικά.



Σχήμα 8.28. Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των δειγμάτων τροφίμων που περιείχαν υπολείμματα των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους ανά αναλυτέα ένωση

Η μόνη υπέρβαση του ανώτατου ορίου υπολειμμάτων παρατηρήθηκε στην περίπτωση του linuron σε ένα δείγμα χυμού πορτοκαλιού από τη Δανία όπου ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση $102.5 \mu\text{g/Kg}$ ($MRL: 50 \mu\text{g/Kg}$). Για τις υπόλοιπες ενώσεις του μίγματος δεν παρατηρήθηκαν υπερβάσεις των ανώτατων ορίων υπολειμμάτων ή αυτά δεν έχουν οριστεί όπως στην περίπτωση των μεταβολιτών.

Πίνακας 8.12

Αποτελέσματα ανίχνευσης των επιλεγμένων ενώσεων ανά είδος τροφίμου

Είδος τροφίμου	Πλήθος δειγμάτων	<MRL ^α	n.d. ^β	n.d.% ^γ	<MRL % ^δ	>MRL ^ε	>MRL % ^{στ}
Σιτάλευρα	30.0	2.0	28.0	93.3	6.7	0.0	0.0
Πατάτες	30.0	14.0	16.0	53.3	46.7	0.0	0.0
Καρότα	30.0	12.0	18.0	60.0	40.0	0.0	0.0
Μήλα	30.0	14.0	16.0	53.3	46.7	0.0	0.0
Χυμοί πορτοκαλιού	30.0	11.0	18.0	60.0	36.7	1.0	3.3

^α<MRL = αριθμός δειγμάτων που περιείχαν υπολείμματα σε συγκεντρώσεις κάτω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

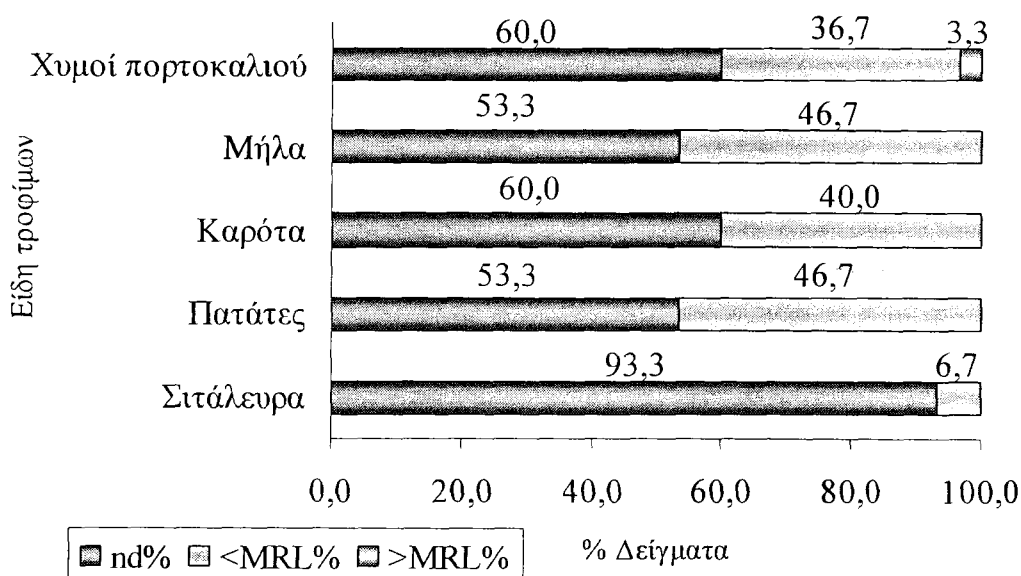
^βn.d. = αριθμός δειγμάτων στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα

^γn.d.% = ποσοστό δειγμάτων (%) στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα

^δ<MRL = ποσοστό δειγμάτων (%) με υπολείμματα σε συγκεντρώσεις κάτω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

^ε<MRL = αριθμός δειγμάτων που περιείχαν υπολείμματα σε συγκεντρώσεις άνω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

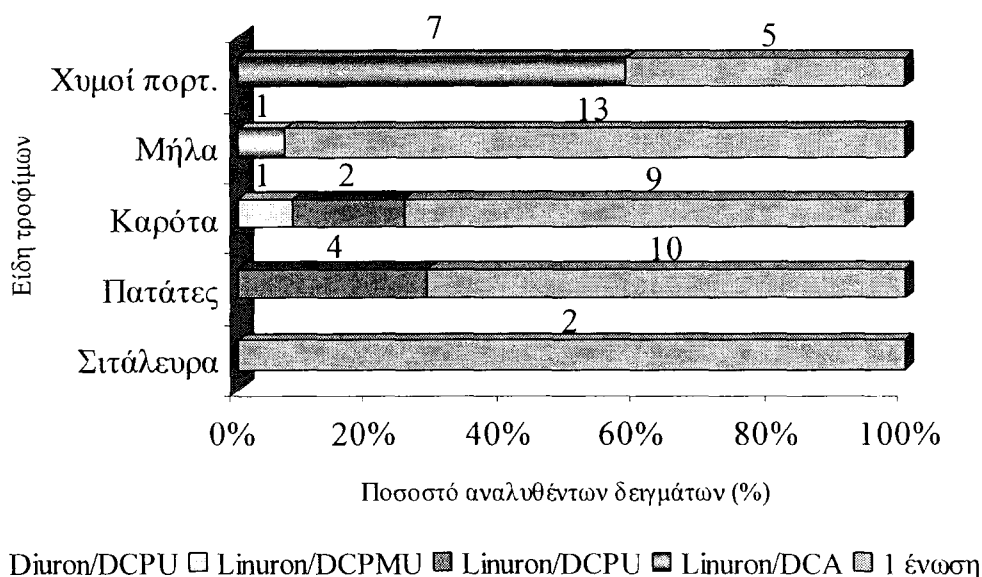
^{στ}<MRL = ποσοστό δειγμάτων (%) με υπολείμματα σε συγκεντρώσεις άνω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων



Σχήμα 8.29. Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των δειγμάτων τροφίμων που περιείχαν υπολείμματα των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους ανά είδος τροφίμου

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις υπολειμμάτων που ανιχνεύτηκαν ήταν 155 $\mu\text{g/Kg}$ για το linuron σε δείγμα καρότων (MRL: 200 $\mu\text{g/Kg}$), 48.6 $\mu\text{g/Kg}$ για το 3,4-DCA σε δείγμα μήλων, 31.1 $\mu\text{g/Kg}$ για το DCPU σε δείγμα πατάτας και 18.9 $\mu\text{g/Kg}$ για το DCPMU σε δείγμα καρότων. Στο Πίνακα 8.12 φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα αναφορικά με τις υπερβάσεις ή όχι των MRLs για κάθε είδος τροφίμου ξεχωριστά που ελέγχθηκε. Τα παραπάνω παρίστανται συγκεντρωτικά στο Σχήμα 8.29.

Υπολείμματα κοντά ή κάτω από τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων βρέθηκαν κυρίως στις πατάτες και στα μήλα (46.7 %) ενώ ακολουθούν τα καρότα (40 %) και οι χυμοί πορτοκαλιού (36,7 %). Το μικρότερο ποσοστό υπολειμμάτων βρέθηκε στα δείγματα σιτάλευρων (6,7 %). Υπολείμματα πάνω από το οριζόμενο MRL βρέθηκαν μόνο στα δείγματα χυμών (3.3 %).



Σχήμα 8.30. Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού των αναλυθέντων δειγμάτων που περιείχαν μόνο μία ένωση ή περισσότερες από μία από το μίγμα των δύο φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους

Λόγω της φύσης των επιλεγμένων ενώσεων (δύο φυτοφάρμακα και τρεις κοινοί τους μεταβολίτες), ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανίχνευση περισσότερων από μία από τις επιλεγμένες ενώσεις σε ένα δείγμα τροφίμου. Παρατηρήθηκε ότι υπήρχε ένας αριθμός δειγμάτων που περιείχε συνδυασμό δύο ενώσεων και σε κάθε περίπτωση ήταν συνδυασμός ενός από τα δύο φυτοφάρμακα με έναν από τους τρεις μεταβολίτες (Σχήμα 8.30).

Έτσι, μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων με συνδυασμό δύο ενώσεων (επί του πλήθους των θετικών ανιχνεύσεων) περιείχαν τα δείγματα χυμών πορτοκαλιού (58.3% των θετικών ανιχνεύσεων περιείχαν αποκλειστικά το ζιζανιοκτόνο *linuron* σε συνδυασμό με το μεταβολίτη 3,4-DCA). Έπονται τα δείγματα πατάτας (28.6% των θετικών ανιχνεύσεων περιείχαν αποκλειστικά το ζιζανιοκτόνο *linuron* σε συνδυασμό με το μεταβολίτη DCPU), τα δείγματα καρότων (25.0% των θετικών ανιχνεύσεων περιείχαν το ζιζανιοκτόνο *linuron* σε συνδυασμό είτε με το μεταβολίτη DCPU είτε με το μεταβολίτη DCPMU) και τα δείγματα μήλων (7.1% των θετικών ανιχνεύσεων περιείχαν αποκλειστικά το ζιζανιοκτόνο *diuron* σε συνδυασμό με το μεταβολίτη DCPU). Στα δείγματα σιτάλευρων δεν ανιχνεύτηκε συνδυασμός ενώσεων.

Τα παραπάνω αποτελούν μια ένδειξη του τρόπου μεταβολισμού κυρίως του πιο συχνά ανιχνεύσιμου ζιζανιοκτόνου *linuron* μετά την εφαρμογή του στα διάφορα είδη τροφίμων υποδηλώνοντας την διαδοχική απομάκρυνση της μέθοξυ- (μεταβολίτης DCPMU) και έπειτα μέθυλ- (μεταβολίτης DCPU) ομάδας του με τελικό προϊόν διάσπασης το 3,4-DCA.

Σχετικά με τη χώρα προέλευσης των επιλεγμένων δειγμάτων τροφίμων (Πίνακας 8.13, Σχήμα 8.31) φαίνεται ότι η Ισπανία κρατάει τα ηνία με το 60% των δειγμάτων της να περιέχουν υπολείμματα τουλάχιστον κάτω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων, ενώ ακολουθούν η Ολλανδία (53.3%) και η Δανία (53.4%) (Σχήμα 8.32) με την τελευταία να κατέχει και την ανίχνευση του *linuron* σε συγκέντρωση πάνω από τα ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων (6.7%).

Πίνακας 8.13

Αποτελέσματα ανίχνευσης των επιλεγμένων ενώσεων στα δείγματα τροφίμων ανά χώρα προέλευσης

Χώρα προέλευσης	Πλήθος δειγμάτων	<MRL ^α	n.d. ^β	n.d.% ^γ	<MRL % ^δ	>MRL ^ε	>MRL% ^{στ}
Γερμανία	15.0	6.0	9.0	60.0	40.0	0.0	0.0
Ολλανδία	15.0	8.0	7.0	46.7	53.3	0.0	0.0
Αγγλία	15.0	3.0	12.0	80.0	20.0	0.0	0.0
Σουηδία	15.0	7.0	8.0	53.3	46.7	0.0	0.0
Δανία	15.0	7.0	7.0	46.7	46.7	1.0	6.7
Γαλλία	15.0	4.0	11.0	73.3	26.7	0.0	0.0
Ισπανία	15.0	9.0	6.0	40.0	60.0	0.0	0.0
Ιταλία	15.0	2.0	13.0	86.7	13.3	0.0	0.0
Ελλάδα	15.0	6.0	9.0	60.0	40.0	0.0	0.0
Πολωνία	15.0	2.0	13.0	86.7	13.3	0.0	0.0

^α<MRL = αριθμός δειγμάτων που περιείχαν υπολείμματα σε συγκεντρώσεις κάτω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

^βn.d. = αριθμός δειγμάτων στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα

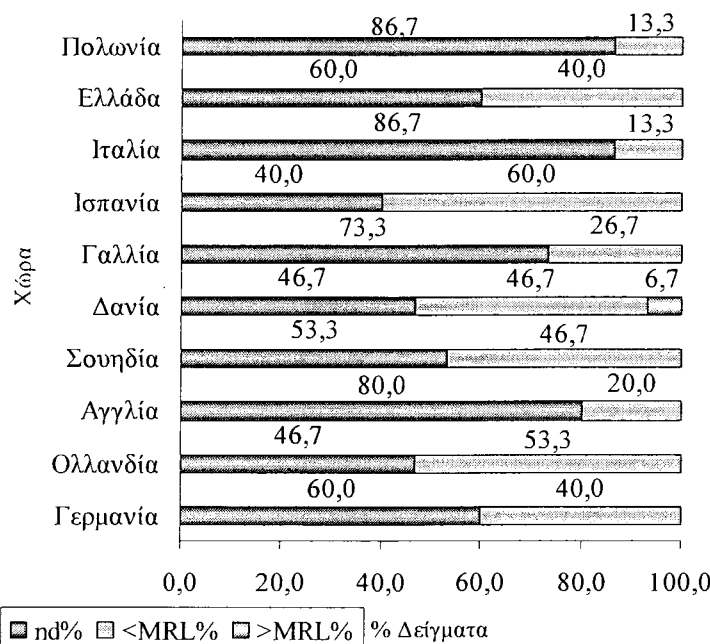
^γn.d.% = ποσοστό δειγμάτων (%) στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα

^δ<MRL = ποσοστό δειγμάτων (%) με υπολείμματα σε συγκεντρώσεις κάτω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

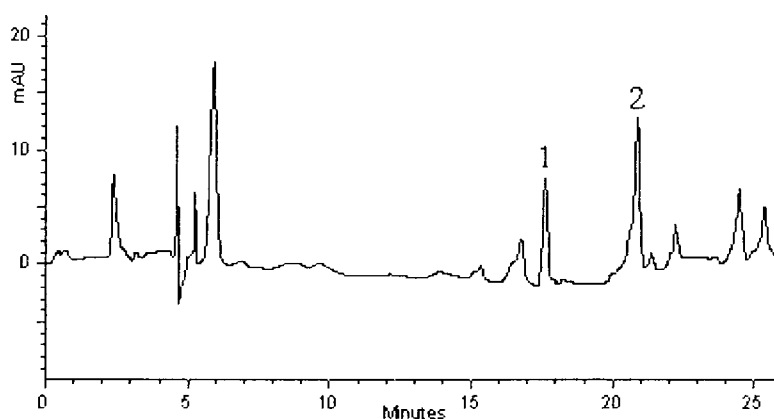
^ε<MRL = αριθμός δειγμάτων που περιείχαν υπολείμματα σε συγκεντρώσεις άνω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

^{στ}<MRL = ποσοστό δειγμάτων (%) με υπολείμματα σε συγκεντρώσεις άνω των ανώτατων επιτρεπτών ορίων

Πάντως, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 2.9 του κεφαλαίου 2, αυτές οι χώρες κατέχουν την «πρωτιά» σε σχέση με τη χρήση ζιζανιοκτόνων/μονάδα καλλιεργήσιμης έκτασης. Με σειρά κατάταξης, τις παραπάνω χώρες ακολουθούν η Σουηδία (46.7%), η Γερμανία (40.0%), η Ελλάδα (40.0%), η Γαλλία (26.7%), η Αγγλία (20%), η Ιταλία (13.3%) και η Πολωνία (13.3%). Γενικά ένα σημαντικό ποσοστό δειγμάτων περιείχε φυτοφάρμακα ή μεταβολίτες αυτών αλλά τα επίπεδα των υπολειμμάτων ήταν σε γενικές γραμμές χαμηλά.

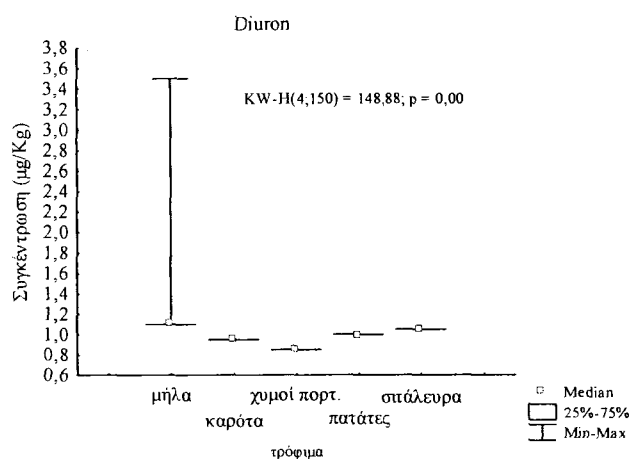


Σχήμα 8.31. Σχηματική απεικόνιση του ποσοστού (%) των δειγμάτων τροφίμων που περιείχαν υπολείμματα των επιλεγμένων EDCs και των μεταβολιτών τους ανά χώρα προέλευσης



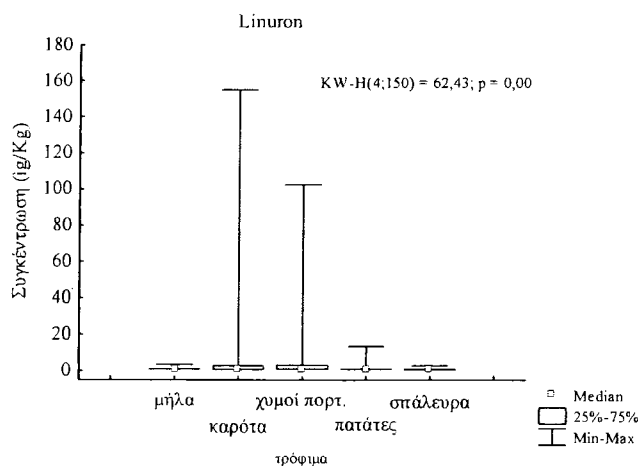
Σχήμα 8.32 HPLC-UV/DAD χρωματογράφημα ενός δείγματος (δειγματοληψία Σεπτεμβρίου-Οκτωβρίου) χυμού πορτοκαλιού από τη Δανία όπου ανιχνεύτηκε το φυτοφάρμακο linuron σε συγκέντρωση 102.5 µg/Kg, μετά την εκχύλιση με τη μέθοδο MSPD: (1) εσωτερικό πρότυπο, metobromuron, 1 mg/L, (2) linuron (Χρωματογραφικές συνθήκες: Discovery C18 (250 x 4.6mm ID: 5µm) στήλη; κινητή φάση: ακετονιτρίλιο/νερό; ρυθμός ροής: 1ml/λεπτό; ανιχνευτής UV/DAD ρυθμισμένος στα μήκη κύματος 248, 250 και 252 nm; οι συνθήκες της βαθμωτής έκλουσης αναφέρονται στην παράγραφο 5.8.1.)

Για την περαιτέρω στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, στις βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν, οι τιμές των συγκεντρώσεων των αναλυτέων ενώσεων που δεν ανιχνεύτηκαν ορίστηκαν ίσες με το μισό της τιμής του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου. Έπειτα οι τιμές των συγκεντρώσεων ελέγχθηκαν με τη δοκιμή Shapiro-Wilk και βρέθηκε ότι δεν παρουσιάζουν κανονική κατανομή, οπότε έγινε σύγκριση των μέσων επιπέδων των συγκεντρώσεων με την ανάλυση διακύμανσης Kruskal-Wallis τόσο μεταξύ των ειδών τροφίμων όσο μεταξύ των πέντε αναλυτέων ουσιών.

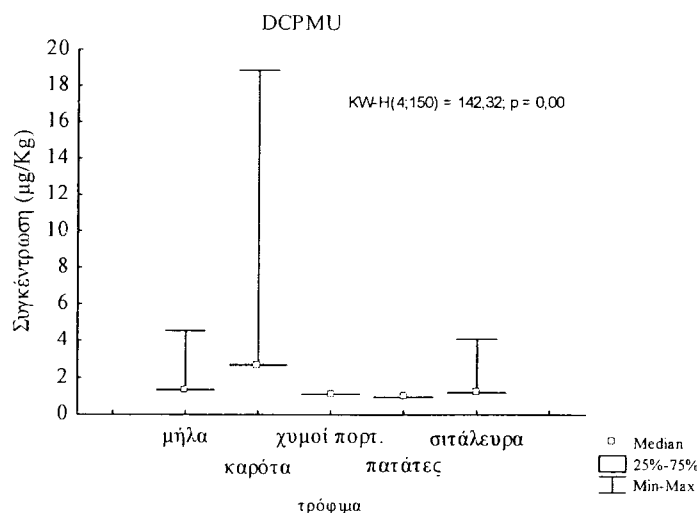


Σχήμα 8.32. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων του ανιχνευθέντος φυτοφαρμάκου diuron στα αναλυθέντα δείγματα τροφίμων

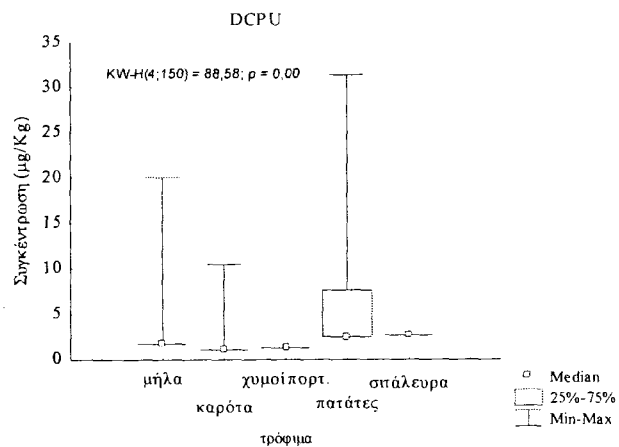
Τα αποτελέσματα σε κάθε περίπτωση έδειξαν ότι υπάρχουν διαφορές «στατιστικά σημαντικές» ($p < 0.01$) τόσο μεταξύ των τροφίμων όσο και μεταξύ των ρυπαντών σε σχέση με τα ανιχνευόμενα επίπεδα συγκεντρώσεων. Στα Σχήματα 8.32-8.41 φαίνεται παραστατικά με τη χρήση γραφημάτων Box-Whisker η συνεισφορά του κάθε ρυπαντή ή τροφίμου σε αυτές τις διαφορές.



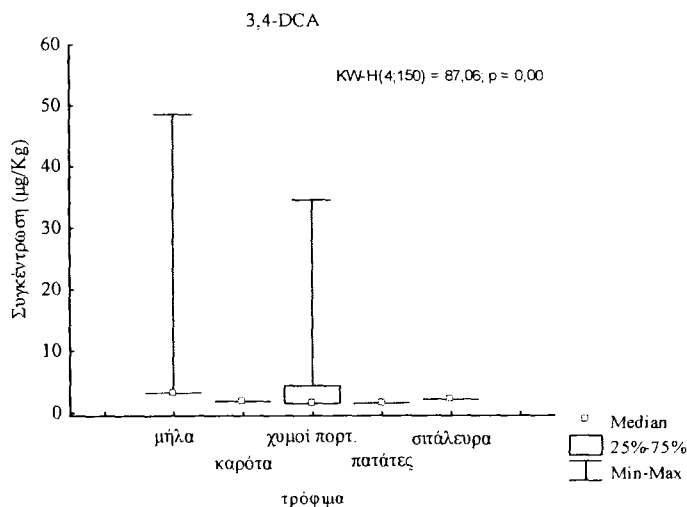
Σχήμα 8.33. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων του ανιχνευθέντος φυτοφαρμάκου linuron στα αναλυθέντα δείγματα τροφίμων



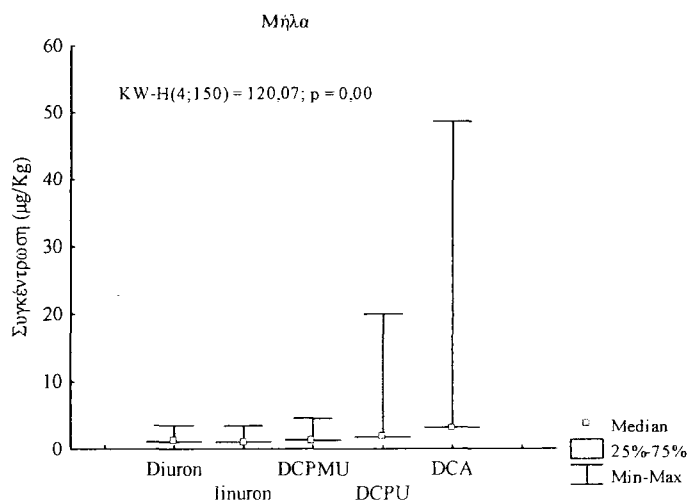
Σχήμα 8.34. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων του ανιχνευθέντος μεταβολίτη DCPMU στα αναλυθέντα δείγματα τροφίμων



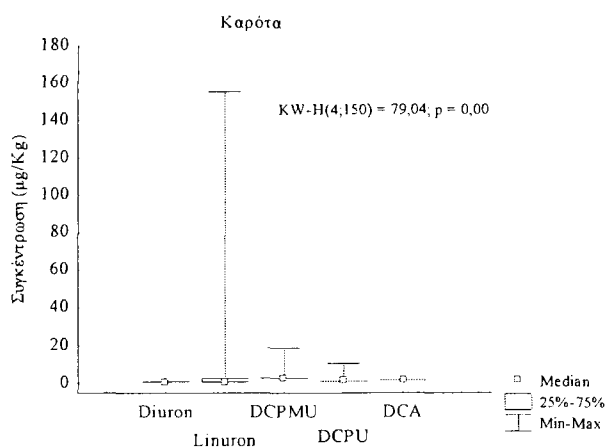
Σχήμα 8.35. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων του ανιχνευθέντος μεταβολίτη DCPU στα αναλυθέντα δείγματα τροφίμων



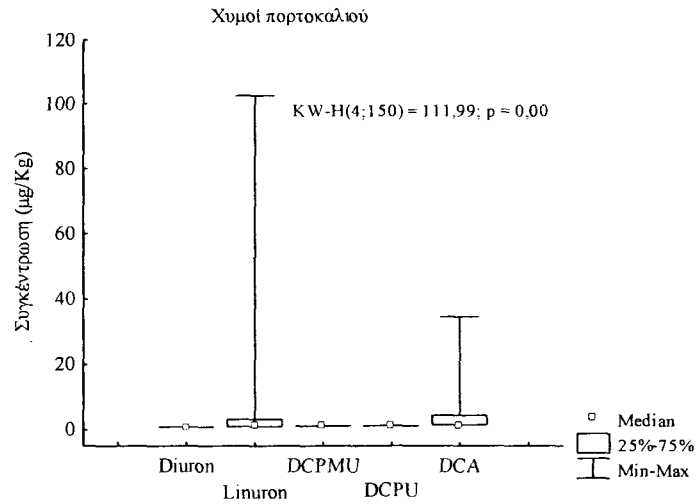
Σχήμα 8.36. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων του ανιχνευθέντος μεταβολίτη 3,4-DCA στα αναλυθέντα δείγματα τροφίμων



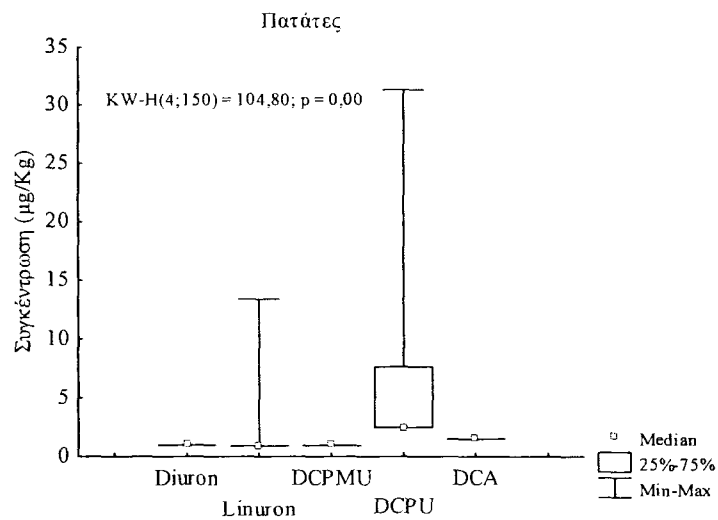
Σχήμα 8.37. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων των ανιχνευθέντων ενώσεων του μίγματος σε δείγματα μήλων



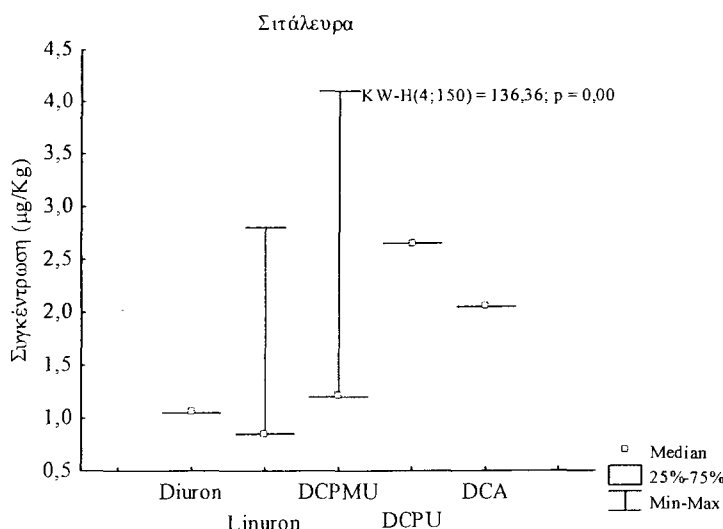
Σχήμα 8.38. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων των ανιχνευθέντων ενώσεων του μίγματος σε δείγματα καρότων



Σχήμα 8.39. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων των ανιχνευθέντων ενώσεων του μίγματος σε δείγματα χυμών πορτοκαλιού



Σχήμα 8.40. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων των ανιχνευθέντων ενώσεων του μίγματος σε δείγματα πατάτας



Σχήμα 8.41. Διάγραμμα Box-Whisker για τη διασπορά των τιμών των αποτελεσμάτων των ανιχνευθέντων ενώσεων του μίγματος σε δείγματα σιτάλευρων

Για την εύρεση της συσχέτισης μεταξύ των τροφίμων αλλά και των αναλυτέων ενώσεων, βάσει των επιπέδων των υπολειμμάτων, πραγματοποιήθηκε η μη παραμετρική στατιστική ανάλυση συσχέτισης των μεταβλητών, Spearman rank.

Επιπλέον έγινε ανάλυση κατηγοριοποίησης (*cluster analysis*) ξεχωριστά για τα δείγματα τροφίμων και τις επιλεγμένες ενώσεις (με τις Ευκλείδειες διαστάσεις ως μέτρο διαστάσεων και τον μονό σύνδεσμο ως κανόνα συνδέσεων) ώστε να γίνει εκτίμηση των συνολικών διαφορών στα μοτίβα ρύπανσης.

Στους Πίνακες 8.14 και 8.15 παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές (ή όχι) συσχετίσεις που προέκυψαν από τις αναλύσεις και στα Διαγράμματα 8.1α και 8.1β τα αντίστοιχα δένδρογράμματα που προκύπτουν από τις παραπάνω συσχετίσεις.

Γενικά, στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις (όλες θετικές) βρέθηκαν μεταξύ όλων των τροφίμων με ισχυρότερη αυτή μεταξύ των μήλων και των σιτάλευρων (Πίνακας 8.14). Εξαίρεση αποτελούν τα δείγματα καρότων σε σχέση με αυτά των πατατών για τα οποία δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

Πίνακας 8.14

Συσχετίσεις που προέκυψαν μεταξύ των τροφίμων που εξετάστηκαν από την μη παραμετρική ανάλυση Spearman με βάση τις συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους

N _o	Ζεύγη ειδών τροφίμων	Συντελεστές συσχέτισης (n=150)
1	Μήλα-καρότα	0.382 (0.000 [*])
2	Μήλα-χυμοί πορτοκαλιού	0.525 (0.000 [*])
3	Μήλα-πατάτες	0.537 (0.000 [*])
4	Μήλα-σιτάλευρα	0.795 (0.000 [*])
5	Καρότα-χυμοί πορτοκαλιού	0.294 (0.000 [*])
6	Καρότα-πατάτες	-0.114 (0.166 ^{**})
7	Καρότα-σιτάλευρα	0.408 (0.000 [*])
8	Πατάτες-χυμοί πορτοκαλιού	0.349 (0.000 [*])
9	Πατάτες-σιτάλευρα	0.665 (0.000 [*])
10	Χυμοί πορτοκαλιού-σιτάλευρα	0.492 (0.000 [*])

^{*} στατιστικά σημαντική συσχέτιση στην περιοχή εμπιστοσύνης $p < 0.01$,

^{**} όχι στατιστικά σημαντική συσχέτιση στην περιοχή εμπιστοσύνης $p < 0.05$

Αναφορικά με την ανάλυση συσχέτισης Spearman για τις αναλυόμενες ενώσεις παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις στο 50% των περιπτώσεων. Το 50% των μη σημαντικών συσχετίσεων οφείλεται κατά κύριο λόγο στο ζιζανιοκτόνο linuron, το οποίο δεν εμφανίζει συσχέτιση με καμία άλλη ένωση του μίγματος (Πίνακας 8.15). Αρνητική και στατιστικά σημαντική συσχέτιση εμφανίζουν μόνο οι μεταβολίτες DCPU και DCPMU, ενώ η ισχυρότερη συσχέτιση φαίνεται ότι είναι μεταξύ του diuron και του μεταβολίτη 3,4-DCA.

Πίνακας 8.15

Συσχετίσεις που προέκυψαν μεταξύ των αναλυτέων ενώσεων από την μη παραμετρική ανάλυση Spearman με βάση τις συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων τους στα τρόφιμα που αναλύθηκαν

N _o	Ζεύγη αναλυτέων ενώσεων	Συντελεστές συσχέτισης (n=150)
1	Diuron-Linuron	0.022 (0.789 ^{**})
2	Diuron-DCPMU	0.241 (0.002 [*])
3	Diuron-DCPU	0.539 (0.000 [*])
4	Diuron-DCA	0.604 (0.000 [*])
5	Linuron-DCPMU	-0.131 (0.108 ^{**})
6	Linuron-DCPU	-0.052 (0.529 ^{**})
7	Linuron-DCA	0.148 (0.070 ^{**})
8	DCPMU-DCPU	-0.336 (0.000 [*])
9	DCPMU-DCA	0.476 (0.000 [*])
10	DCPU-DCA	0.114 (0.164 ^{**})

* στατιστικά σημαντική συσχέτιση στην περιοχή εμπιστοσύνης $p < 0.05$,

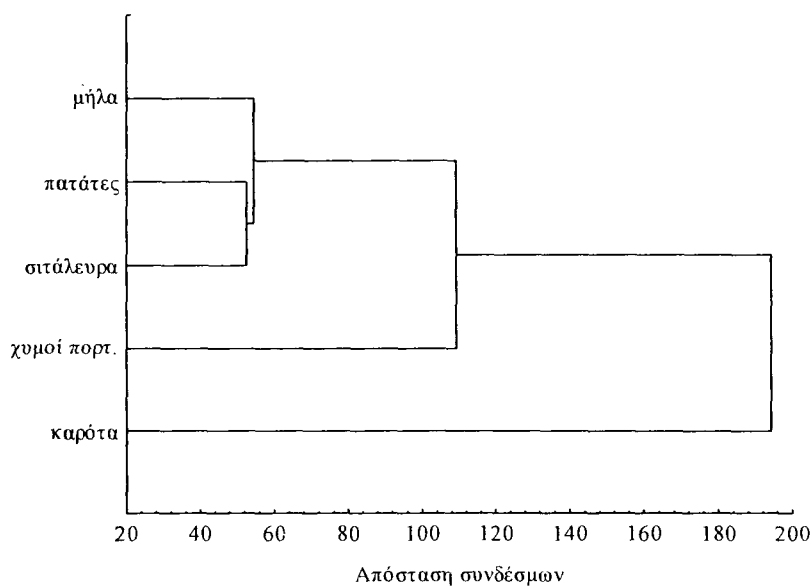
** όχι στατιστικά σημαντική συσχέτιση στην περιοχή εμπιστοσύνης $p < 0.01$

Η ανάλυση κατηγοριοποίησης, στη περίπτωση των τροφίμων, ξεχωρίζει εμφανώς τα καρότα από τα υπόλοιπα δείγματα τροφίμων, ενώ μια άλλη σαφώς διακεκριμένη ομάδα αποτελούν τα μήλα, οι πατάτες και τα σιτάλευρα (Διάγραμμα 8.1α).

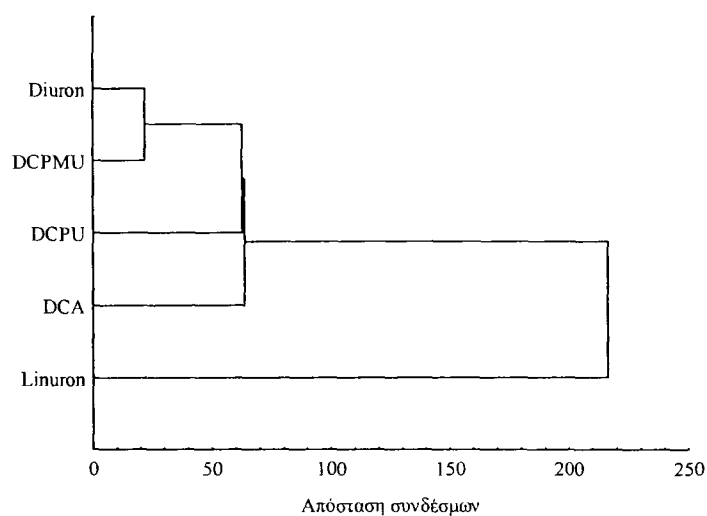
Σχετικά με την κατηγοριοποίηση των ανιχνευόμενων ενώσεων, ξεχωρίζει εμφανώς το linuron από τα υπόλοιπα εξηγώντας τη μη συσχέτιση (Spearman) με καμία από τις υπόλοιπες ενώσεις του μίγματος. Η πιο ευκρινής ομάδα κατηγοριοποίησης είναι αυτή του diuron με τον μεταβολίτη DCPMU.

Διάγραμμα 8.1

Δενδρογράμματα* ομαδοποίησης α) των τροφίμων που εξετάστηκαν και β) των υπολειμμάτων που βρέθηκαν στα δείγματα τροφίμων. Οι Ευκλείδειες αποστάσεις χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο των αποστάσεων και ο μονός σύνδεσμος ως ο κανόνας συνδέσμων



α)



β)

* ανάλυση κατηγοριοποίησης των μεταβλητών με κριτήριο την ιεραρχία της διαμέσου της δυαδικής συσχέτισης των μεταβλητών ανάμεσα στις ομάδες που σχηματίζονται.

8.6 Εκτίμηση επικινδυνότητας

Η ανάλυση του κινδύνου που ενέχει η κατανάλωση τροφίμων περιλαμβάνει τρία επιμέρους ουσιώδη στοιχεία: την εκτίμηση, τη διαχείριση και την γνωστοποίηση της επικινδυνότητας (*risk assessment, risk management, risk communication*). Ο δικός μας στόχος είναι η εκτίμηση της επικινδυνότητας. Για την αποτίμηση λοιπόν της πρόσληψης μιας χημικής ένωσης παρούσας σε κάποιο είδος τροφίμου είναι απαραίτητη η γνώση τόσο των δεδομένων που αφορούν τα υπολείμματα της χημικής ένωσης στο συγκεκριμένο τρόφιμο όσο και αυτών που αφορούν τη γενική/εθνική κατανάλωσή του. Τα πρώτα παρέχουν πληροφορίες για την ύπαρξη ή όχι της ένωσης και τη συγκέντρωσή της στο τρόφιμο. Τα δεδομένα πρόσληψης παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα του τροφίμου που καταναλώνεται από κάθε μονάδα καταναλωτή ή από ολόκληρο τον πληθυσμό. Τα δύο είδη δεδομένων μπορούν να συνδυαστούν έπειτα για την τελική εκτίμηση της πρόσληψης μιας συγκεκριμένης χημικής ένωσης από ένα τρόφιμο.

Έτσι, η έκταση της επικινδυνότητας από τη διατροφική πρόσληψη υπολειμμάτων χημικών ενώσεων μπορεί να εκτιμηθεί με τη συσχέτιση της ημερήσιας αποδεκτής δόσης (*Acceptable Daily Intake, ADI*) για τον προσδιορισμό της χρόνιας διατροφικής έκθεσης, ή της δόσης αναφοράς οξείας επίδρασης (*Acute Reference Dose, aRfD*) για τον προσδιορισμό της οξείας διατροφικής έκθεσης, με τα επίπεδα των υπολειμμάτων στα δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν. Οι σχετικές δόσεις (*ADI* και *aRfD*) έχουν προσδιοριστεί για τα δύο φυτοφάρμακα του μίγματος, linuron και diuron, όχι όμως και για τους τρεις κοινούς τους μεταβολίτες (*Πίνακας 8.16*).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το 64% των δειγμάτων που ελέγχθηκαν δεν περιείχε ανιχνεύσιμα υπολείμματα των αναλυόμενων ουσιών ενώ στο 35.3% των δειγμάτων βρέθηκαν υπολείμματα κάτω του ανώτατου ορίου υπολειμμάτων (*<MRL, Πίνακας 8.16*). Επιπλέον, μόνο στο 0.7% των δειγμάτων ανιχνεύτηκε το ζιζανιοκτόνο linuron σε συγκέντρωση που υπερβαίνει το ανώτατο όριο υπολειμμάτων. Το φυτοφάρμακο diuron ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα δείγμα τροφίμου σε συγκέντρωση κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, δηλαδή τις χαμηλές

συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων που προσδιορίστηκαν στα δείγματα των τροφίμων. θεωρήθηκε σκόπιμο να μην πραγματοποιηθεί μελέτη της οξείας επικινδυνότητας αλλά να γίνει μια εκτίμηση της χρόνιας μόνο για τη μία ένωση του μίγματος των επιλεγμένων ενώσεων, το linuron. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τους μεταβολίτες (*DCPU*, *DCPMU* και *3,4-DCA*) δεν έχουν θεσπιστεί ακόμη δείκτες επικινδυνότητας, ώστε να γίνει ξεχωριστή εκτίμηση για τον κίνδυνο που ενέχει η διατροφική πρόσληψη των υπολειμμάτων τους στα τρόφιμα.

Πίνακας 8.16

Ημερήσια αποδεκτή δόση (ADI)^a, οξεία δόση αναφοράς (aRfD)^a και ανώτατα όρια καταλοίπων (MRLs)^b στα επιλεγμένα είδη τροφίμων των δύο EDCs

		Linuron	Diuron
ADI (mg/Kg σωματικού βάρους/ημέρα)		0.003	0.007
aRfD (mg/Kg σωματικού βάρους/ημέρα.)		0.03	0.016
MRL (mg/Kg)	Καρότα	0.2	0.2
	Πατάτες	0.05	0.1
	Σιτάλευρα	0.05	0.2
	Χυμοί πορτ.	0.05	0.1
	Μήλα	0.05	0.05

^aΠηγή: EC, Directorate E, Linuron (7595/VI/97-final, 2002), Diuron (SANCO/2184/2008 rev 3, 2008)

^bΠηγή: EU MRLs, Reg. (EC) No 149/2008, 1/9/2008

Η εκτίμηση λοιπόν της επικινδυνότητας έγινε με μια απλή ντετερμινιστική προσέγγιση (Tsoutsis, Konstantinou et al. 2008; Amvrazi and Albanis 2009) όπως αυτή προτείνεται στην οδηγία του WHO (GEMS/Food 1997). Επειδή πραγματοποιήθηκε συστηματικός έλεγχος των υπολειμμάτων των επιλεγμένων φυτοφαρμάκων σε πέντε διαφορετικά είδη τροφίμων και σε δέκα διαφορετικές χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

έχοντας υπόψη το «καλάθι της νοικοκυράς», η εκτίμηση της επικινδυνότητας βασιζόμενης σε τέτοιες μελέτες, μπορεί να θεωρηθεί πιο αντιπροσωπευτική και εφαρμόσιμη σε διεθνές επίπεδο (WHO 1987). Ουσιαστικά γίνεται μια εκτίμηση του δείκτη IEDI (*International Estimated Daily Intake, διεθνής εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη*), ο οποίος στη συνέχεια συγκρίνεται με τον δείκτη ADI για το linuron και το αποτέλεσμα εκφράζεται σε επί τοις εκατό ποσοστό της αποδεκτής ημερήσιας πρόσληψης, ADI.

Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των υπολειμμάτων του linuron που ανιχνεύθηκαν στα επιλεγμένα τρόφιμα στη μέση τιμή τους αλλά και το 5^ο και 95^ο εκατοστημόριο του εύρους των τιμών ώστε να υπάρξει μια εκτίμηση στην καλύτερη αλλά και στη χειρότερη περίπτωση, αντίστοιχα (GEMS/Food 1997). Όσον αφορά τα δείγματα στα οποία οι συγκεντρώσεις ήταν κάτω των ορίων ανίχνευσης, θεωρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις ήταν ίσες με το μισό του ορίου ανίχνευσης ($ND=1/2 LOD$). Η εκτίμηση επικινδυνότητας έγινε για ενήλικα με ένα μέσο σωματικό βάρος 60 Kg, βάσει των κανονισμών από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας.

Τέλος, για την εκτίμηση της ημερήσιας πρόσληψης των υπολειμμάτων του linuron, απαραίτητη είναι η γνώση της ημερήσιας κατανάλωσης των επιλεγμένων τροφίμων βασισμένη στις διατροφικές συνήθειες κάθε έθνους. Επειδή γίνεται εκτίμηση της χρόνιας έκθεσης θα πρέπει και οι διατροφικές συνήθειες να αντικατοπτρίζουν το βάθος του χρόνου. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές της ημερήσιας κατανάλωσης των επιλεγμένων τροφίμων. Τα πρότυπα κατανάλωσης τροφίμων διαφέρουν σημαντικά από χώρα σε χώρα οπότε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στοιχεία αντίστοιχα της χώρας κατανάλωσης του τροφίμου. Όμως, για την εκτίμηση της πρόσληψης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε διεθνές επίπεδο, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα μέσης κατανάλωσης τροφίμων που δίνονται στον ισολογισμό τροφίμων του FAO. Αυτά τα δεδομένα, ταξινομούνται σε πέντε μεγάλες κατηγορίες βάσει της τοπικής δίαιτας (*Μέση Ανατολή, Άπω Ανατολή, Αφρική, Αατινική Αμερική και Ευρώπη*). Στην πορεία, για την καλύτερη και ακριβέστερη εκτίμηση της

πρόσληψης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε διεθνές επίπεδο, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει επανεκτιμήσει και διευρύνει αυτές τις κατηγορίες ώστε να αντιπροσωπεύονται όσο το δυνατόν καλύτερα οι διαφορετικοί πολιτισμοί και τόποι του κόσμου. Σ' αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η τελευταία βάση δεδομένων του WHO (Van der Velde-Koerts 2006).

Ο υπολογισμός του δείκτη IEDI προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{IEDI} = \sum \text{LR}_i \times \text{F}_i \quad (\text{εξ. 8.3})$$

όπου:

LR_i = Επίπεδο υπολειμμάτων φυτοφαρμάκου (mg/kg)

F_i = Τοπική κατανάλωση τροφίμου βάσει του GMES/Food (g/ημέρα)

Στους Πίνακες 8.17-19 συνοψίζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την αξιολόγηση της επικινδυνότητας της χρόνιας έκθεσης από τη διατροφική πρόσληψη υπολειμμάτων του ζιζανιοκτόνου με ενδοκρινική δράση, linuron, υπολογισμένη για έναν ενήλικα ($\approx 60 \text{ kg}$) στο 5^ο και 95^ο εκατοστημόριο του εύρους των συγκεντρώσεων των υπολειμμάτων καθώς και στη μέση τιμή τους.

Πίνακες 8.17-8.19 Ημερήσια πρόσληψη ανά άτομο (μg/ημέρα) και %ADI για κάθε τρόφιμο ανά ομάδα χωρών, συνολική ημερήσια πρόσληψη και συνολικό ποσοστό %ADI για κάθε ομάδα χωρών των υπολειμμάτων του ζιζανιοκτόνου linuron στο 5^ο και 95^ο εκατοστημόριο και στη μέση τιμή των συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν (ADI=0.003 mg/Kg/ημέρα)

Πίνακας 8.17. 5 ^ο εκατοστημόριο του εύρους των συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν ^a										
Ομάδα χωρών ^b		Α			Β			Γ		
Είδος τροφίμου	Linuron (mg/kg)	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI
Μήλα	0,0011	60,5	0,1	0,04	50,8	0,1	0,03	39,4	0,0	0,02
Καρότα	0,0008	15,1	0,0	0,01	27,1	0,0	0,01	28,4	0,0	0,01
Χυμοί πορτ.	0,0010	2,1	0,0	0,00	16,2	0,0	0,01	22,6	0,0	0,01
Πατάτες	0,0009	160,8	0,1	0,08	230,1	0,2	0,12	204,7	0,2	0,10
Σιτάλευρα	0,0009	396,3	0,3	0,19	236,3	0,2	0,11	216,0	0,2	0,10
Συνολική πρόσληψη (μg/άτομο)=		0,6			0,5			0,5		
Μέσο σωματικό βάρος (kg) =		60			60			60		
Συνολικό %ADI=		0,31%			0,28%			0,25%		

Πίνακας 8.18. 95^ο εκατοστημόριο του εύρους των συγκεντρώσεων που ανιχνεύτηκαν^α

Ομάδα χωρών ^β		Α			Β			Γ		
Είδος τροφίμου	Linuron (mg/kg)	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI
Μήλα	0,0011	60,5	0,1	0,04	50,8	0,1	0,03	39,4	0,0	0,02
Καρότα	0,0814	15,1	1,2	0,68	27,1	2,2	1,23	28,4	2,3	1,28
Χυμοί πορτ.	0,0089	2,1	0,0	0,01	16,2	0,1	0,08	22,6	0,2	0,11
Πατάτες	0,0109	160,8	1,7	0,97	230,1	2,5	1,39	204,7	2,2	1,24
Σιτάλευρα	0,0009	396,3	0,3	0,19	236,3	0,2	0,11	216,0	0,2	0,10
Συνολική πρόσληψη (μg/άτομο)=		3,4			5,1			5,0		
Μέσο σωματικό βάρος (kg) =		60			60			60		
Συνολικό %ADI=		1,89%			2,84%			2,76%		

Πίνακας 8.19. Μέση τιμή του εύρους των συγκεντρώσεων που ανιχνεύτηκαν^a

Ομάδα χωρών ^β		Α			Β			Γ		
Είδος τροφίμου	Linuron (mg/kg)	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI
Μήλα	0,0011	60,5	0,1	0,04	50,8	0,1	0,03	39,4	0,0	0,02
Καρότα	0,0127	15,1	0,2	0,11	27,1	0,3	0,19	28,4	0,4	0,20
Χυμοί πορτ.	0,0054	2,1	0,0	0,01	16,2	0,1	0,05	22,6	0,1	0,07
Πατάτες	0,0025	160,8	0,4	0,23	230,1	0,6	0,32	204,7	0,5	0,29
Σιτάλευρα	0,0009	396,3	0,4	0,20	236,3	0,2	0,12	216,0	0,2	0,11
Συνολική πρόσληψη (μg/άτομο)=		1,0			1,3			1,2		
Μέσο σωματικό βάρος (kg) =		60			60			60		
Συνολικό %ADI=		0,58%			0,71%			0,69%		

^aΣυγκεντρώσεις <LOD θεωρήθηκε ότι έχουν τιμή ίση με ½ LOD^βΟμάδες χωρών (τα δείγματα τροφίμων από τις χώρες με έντονη γραφή αναλύθηκαν στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος COMPENDO):Α) **Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία**, Κύπρος, Πορτογαλία, Τουρκία, Ισραήλ, Λίβανο, Ενωμένα. Αραβικά Εμιράτα (9 χώρες)Β) **Δανία, Γαλλία, Γερμανία, Ολλανδία, Πολωνία, Αγγλία**, Ελβετία, Αυστρία, Βέλγιο, Κροατία, Τσεχία, Ουγγαρία, Ιρλανδία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Σλοβακία, Σλοβενία (17 χώρες)Γ) **Σουηδία**, Εστονία, Φιλανδία, Ισλανδία, Λετονία, Λιθουανία, Νορβηγία (7 χώρες)

Τα αποτελέσματα σχετικά με την ημερήσια πρόσληψη υπολειμμάτων του ζιζανιοκτόνου linuron από τα επιλεγμένα δείγματα τροφίμων τόσο μεμονωμένα όσο και ως σύνολο προϊόντων διατροφικής συνήθειας για όλες τις κατηγορίες χωρών έδειξαν μηδαμινό κίνδυνο. Οι επί τοις εκατό ADI τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 0.25% (στο 5^ο εκατοστημόριο) και 2.84% (στο 95^ο εκατοστημόριο ή αλλιώς στη χειρίστη περίπτωση). Γενικά, παρατηρούνται πολύ μικρές διαφορές στην ημερήσια πρόσληψη του φυτοφαρμάκου μεταξύ των διαφορετικών χωρών όπως έχουν ταξινομηθεί βάσει των διατροφικών τους συνηθειών. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα καρότα και οι πατάτες φαίνεται να συνεισφέρουν περισσότερο στη συνολική πρόσληψη του ζιζανιοκτόνου απ' ό,τι τα άλλα είδη διατροφής.

Στην περίπτωση μας παρατηρήθηκε υπέρβαση του ανώτατου ορίου υπολειμμάτων μόνο για ένα τρόφιμο (*χυμός πορτοκαλιού από τη Δανία*) και για το φυτοφάρμακο linuron το οποίο ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση 102.5 µg/Kg. Ακόμη όμως και σ' αυτή την περίπτωση και αν γίνει μεμονωμένα έλεγχος επικινδυνότητας για τα δείγματα που υπερβαίνουν τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων, η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη (*υπολογισμένη για έναν ενήλικα με μέσο σωματικό βάρος 60 Kg*) παραμένει χαμηλή, με τιμή 4.09% της τιμής ADI. Παρά λοιπόν την υπέρβαση του MRL, δεν παρατηρήθηκε και πάλι υπέρβαση του ADI.

Δυστυχώς, για τους μεταβολίτες όπως προαναφέρθηκε δεν έχουν θεσπιστεί δείκτες επικινδυνότητας. Οι μεταβολίτες όμως DCPMU και DCPU παρουσιάζουν έντονη συγγένεια με τις αρχικές ενώσεις τους linuron και diuron λόγω της δομικής τους ομοιότητας και είναι πιθανόν να έχουν παρόμοια τοξική δράση με αυτές. Αντίθετα, ο μεταβολίτης 3,4-DCA δεν είναι μόνο προϊόν διάσπασης των linuron και diuron αλλά αποτελεί και ενδιάμεσο προϊόν κατά την σύνθεση άλλων ζιζανιοκτόνων, χρωμάτων και φαρμάκων. Έτσι, θεωρήθηκε σκόπιμο, αν και ακόμη παράτολμο, να γίνει μια εκτίμηση της πρόσληψης υπολειμμάτων ως άθροισμα των υπολειμμάτων του linuron και των μεταβολιτών του DCPU και DCPMU, αντίστοιχα με το παράδειγμα του WHO για το φυτοφάρμακο parathion-methyl και τον μεταβολίτη του paraoxon-methyl (GEMS/Food 1997). Τα αποτελέσματα φαίνονται στους Πίνακες 8.20-22.

Πίνακες 8.20-8.22 Ημερήσια πρόσληψη ανά άτομο (μg/ημέρα) και %ADI για κάθε τρόφιμο ανά ομάδα χωρών, συνολική ημερήσια πρόσληψη και συνολικό ποσοστό %ADI για κάθε ομάδα χωρών του αθροίσματος των υπολειμμάτων του ζιζανιοκτόνου linuron και των μεταβολιτών του DCPMU και DCPU στο 5^ο και 95^ο εκατοστημόριο και στη μέση τιμή των συγκεντρώσεων που ανιχνεύτηκαν (η σύγκριση γίνεται με την τιμή ADI για το linuron, 0.003 mg/Kg/ημέρα)

Πίνακας 8.20. 5^ο εκατοστημόριο του εύρους των συγκεντρώσεων που ανιχνεύτηκαν^a

Ομάδα χωρών ^b		Α			Β			Γ		
Είδος τροφίμου	Υπολείμματα (mg/kg)	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI
Μήλα	0,0042	60,5	0,3	0,14	50,8	0,2	0,12	39,4	0,2	0,09
Καρότα	0,0046	15,1	0,1	0,04	27,1	0,1	0,07	28,4	0,1	0,07
Χυμοί πορτ.	0,0034	2,1	0,0	0,00	16,2	0,1	0,03	22,6	0,1	0,04
Πατάτες	0,0044	160,8	0,7	0,39	230,1	1,0	0,56	204,7	0,9	0,49
Σιτάλευρα	0,0047	396,3	1,9	1,03	236,3	1,1	0,62	216,0	1,0	0,56
Συνολική πρόσληψη										
(μg/άτομο)=			2,9			2,5			2,3	
Μέσο σωματικό βάρος (kg)										
=			60			60			60	
Συνολικό %ADI=			1,61%			1,39%			1,26%	

Πίνακας 8.21. 95^ο εκατοστημόριο του εύρους των συγκεντρώσεων που ανιχνεύτηκαν^a

Ομάδα χωρών ^b		Α			Β			Γ		
Είδος τροφίμου	Υπολείμματα (mg/kg)	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI
Μήλα	0,0154	60,5	0,9	0,52	50,8	0,8	0,44	39,4	0,6	0,34
Καρότα	0,0852	15,1	1,3	0,72	27,1	2,3	1,28	28,4	2,4	1,34
Χυμοί πορτ.	0,0114	2,1	0,0	0,01	16,2	0,2	0,10	22,6	0,3	0,14
Πατάτες	0,0240	160,8	3,9	2,14	230,1	5,5	3,07	204,7	4,9	2,73
Σιτάλευρα	0,0058	396,3	2,3	1,27	236,3	1,4	0,76	216,0	1,2	0,69
Συνολική πρόσληψη (μg/άτομο)=		8,4			10,2			9,4		
Μέσο σωματικό βάρος (kg) =		60			60			60		
Συνολικό %ADI=		4,66%			5,65%			5,25%		

Πίνακας 8.22. Μέση τιμή του εύρους των συγκεντρώσεων που ανιχνεύτηκαν^α

Ομάδα χωρών ^β		Α			Β			Γ		
Είδος τροφίμου	Υπολείμματα (mg/kg)	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI	Κατανάλωση τροφίμου (g/ημέρα)	Πρόσληψη (μg/ημέρα)	%ADI
Μήλα	0,0065	60,5	0,4	0,22	50,8	0,3	0,18	39,4	0,3	0,14
Καρότα	0,0182	15,1	0,3	0,15	27,1	0,5	0,27	28,4	0,5	0,29
Χυμοί πορτ.	0,0078	2,1	0,0	0,01	16,2	0,1	0,07	22,6	0,2	0,10
Πατάτες	0,0106	160,8	1,7	0,94	230,1	2,4	1,35	204,7	2,2	1,20
Σιτάλευρα	0,0049	396,3	1,9	1,07	236,3	1,1	0,64	216,0	1,1	0,58
Συνολική πρόσληψη (μg/άτομο)=		4,3			4,5			4,2		
Μέσο σωματικό βάρος (kg)		60			60			60		
Συνολικό %ADI=		2,39%			2,52%			2,31%		

^αΣυγκεντρώσεις <LOD θεωρήθηκε ότι έχουν τιμή ίση με ½ LOD^βΟμάδες χωρών (τα δείγματα τροφίμων από τις χώρες με έντονη γραφή αναλύθηκαν στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος COMPRENDO):Α) **Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία**, Κύπρος, Πορτογαλία, Τουρκία, Ισραήλ, Λίβανο, Ενωμένα. Αραβικά Εμιράτα (9 χώρες)Β) **Δανία, Γαλλία, Γερμανία, Ολλανδία, Πολωνία, Αγγλία**, Ελβετία, Αυστρία, Βέλγιο, Κροατία, Τσεχία, Ουγγαρία, Ιρλανδία, Λουξεμβούργο, Μάλτα, Σλοβακία, Σλοβενία (17 χώρες)Γ) **Σουηδία**, Εστονία, Φιλανδία, Ισλανδία, Λετονία, Λιθουανία, Νορβηγία (7 χώρες)

Όπως φαίνεται από τους Πίνακες 8.20-22, ακόμη και στην περίπτωση της εκτίμησης της πρόσληψης του αθροίσματος των υπολειμμάτων του ζιζανιοκτόνου linuron και των βασικών μεταβολιτών του, DCPU και DCPMU, η επικινδυνότητα σε όλες τις περιπτώσεις είναι μηδαμινή με τις επί τοις εκατό του ADI τιμές να κυμαίνονται από 1.26% έως και 5.65% (στη χείριστη περίπτωση). Αν και η συνεισφορά των μεταβολιτών αυξάνει σημαντικά την ημερήσια πρόσληψη υπολειμμάτων από τους πληθυσμούς δεν είναι αρκετή ώστε να ενέχει κίνδυνο για τον καταναλωτή. Σε κάθε περίπτωση πάντως διαφαίνεται η ανάγκη συνεκτίμησης στον έλεγχο της διατροφικής έκθεσης των καταναλωτών επιπρόσθετα σε μεταβολίτες ή τυχόν προϊόντα διάσπασης των υπό μελέτη χημικών ενώσεων, λόγω της πιθανότητας συνύπαρξής τους με τις αρχικές ενώσεις, αφού τα τρόφιμα υπόκεινται σε διάφορες διεργασίες πριν την κατανάλωσή τους, π.χ. αποθήκευση. Πολύ σημαντικότερος δε είναι ο προσδιορισμός κατ' αρχάς της τυχόν τοξικής ή όποιας άλλης δράσης τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν έχουν θεσπιστεί ασφαλή όρια για την ημερήσια αποδεκτή διατροφική πρόσληψη ενώσεων που παρουσιάζουν ενδοκρινική διαταρακτική δράση, συνεκτιμώντας τη σοβαρότητα της δράσης τους ακόμη και όταν υπάρχουν σε ίχνη στους ζώντες οργανισμούς (σε ppt).

Ωστόσο, όλα τα παραπάνω αναφέρονται κυρίως στη διατροφική πρόσληψη μίας μόνο ένωσης ενώ οι τροφές περιέχουν συνήθως ένα πολύπλοκο μίγμα υπολειμμάτων χημικών ενώσεων. Έτσι τα παραπάνω δεδομένα δεν επιτρέπουν τη συνολική και τελική κρίση για την πιθανή επίδραση που μπορεί να έχουν ακόμη και υπολείμματα χημικών ενώσεων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στην υγεία του καταναλωτή. Μελλοντικά, σύμφωνα με τον Καθηγητή Tony Hardy, Πρόεδρο της Επιτροπής Φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των Υπολειμμάτων τους (*Plant protection products and their residues Panel, PPR/ European Food Safety Authority, EFSA*), θα πρέπει να γίνει προσέγγιση της εκτίμησης της επικινδυνότητας λαμβάνοντας υπόψη τα παρακάτω (Hardy 2008):

α) την αθροιστική και συνεργιστική δράση των φυτοφαρμάκων,

β) τη βελτίωση των αρχείων δεδομένων (φυσικοχημικές ιδιότητες, τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον, έκθεση των χειριστών κ.α.),

γ) την καλύτερη διαχείριση της αβεβαιότητας που ενέχει η εκτίμηση επικινδυνότητας με τις υπάρχουσες μεθόδους, όπως τις ντετερμινιστικές (*deterministic*). Γι 'αυτό θα πρέπει να κατευθυνθεί ή έρευνα στη χρήση άλλων μεθόδων (*probabilistic*) που λαμβάνουν υπόψη όλο το εύρος των δυνατοτήτων (όλες για παράδειγμα τις κατηγορίες καταναλωτών),

δ) τη βελτίωση των πληροφοριών και συμβουλών πάνω στην εκτίμηση της επικινδυνότητας και τέλος

ε) την πολιτική πίεση για μείωση της χρήσης φυτοφαρμάκων.

Ε. Συμπεράσματα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα επιλεγμένα φυτοφάρμακα, ύποπτα για ενδοκρινική διαταρακτική δράση, diuron και linuron καθώς και οι κύριοι κοινοί μεταβολίτες τους DCPU, DCPMU και 3,4-DCA διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά και έγινε ο ποιοτικός και ποσοτικός τους προσδιορισμός με τη χρήση στήλης C_{18} ανάστροφης φάσης και ενός βαθμωτού προγράμματος έκλουσης (ακετονιτρίλιο/νερό) στο αποδεκτά σύντομο χρονικό διάστημα των 27 λεπτών σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας, HPLC-UV/DAD.

ΙΖΗΜΑΤΑ

Η ικανότητα της εκχύλισης των επιλεγμένων ενώσεων με τη χρήση υπερήχων εξετάστηκε σε δείγματα ιζημάτων διαφορετικής προέλευσης. Για τον προσδιορισμό της ολικής ανάκτησης και της αβεβαιότητας που προέρχεται από την επίδραση του τύπου του υποστρώματος και του επιπέδου των συγκεντρώσεων, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο αποτελούμενο από τρεις παράγοντες: τα διαφορετικά υποστρώματα (τρεις διαφορετικοί τύποι ιζημάτων, θαλάσσιο, ποτάμιο και λιμναίο, $l = 3$), τα επίπεδα συγκεντρώσεων ($p = 3, 25, 50$ και $100 \mu\text{g/Kg}$) και τις

επαναλήψεις ($r = 3$). Οι ολικές ανακτήσεις (συμπεριλαμβάνονται όλοι οι τύποι ιζημάτων) κυμάνθηκαν από 59.5 έως 85.1 % για όλες τις ενώσεις με εξαίρεση τη μεταβολίτη 3,4-DCA για τον οποίο η παρατηρούμενη ολική ανάκτηση ήταν αρκετά χαμηλή (29.0 %). Ειδικά στην τελευταία περίπτωση, η μειωμένη ικανότητα εκχύλισης των αρωματικών αμινών αποδίδεται στους ομοιοπολικούς δεσμούς με τις ομάδες κινονών των περιεχόμενων στα ιζήματα χουμικών οξέων.

Η μέθοδος εκχύλισης υπερήχων επέδειξε γραμμικότητα στην μελετώμενη περιοχή (5-100 $\mu\text{g/Kg}$) με τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου να κυμαίνονται μεταξύ 0.1 και 4.6 $\mu\text{g/Kg}$ (ξηρού ιζήματος) για όλες τις αναλυόμενες ενώσεις, με εξαίρεση τη μεταβολίτη 3,4-DCA (1.9-63.3 $\mu\text{g/Kg}$). Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ήταν μικρότερες από 12% σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός για το λιμναίο ίζημα όπου κυμάνθηκαν μεταξύ 9.5 και 18%, πράγμα λογικό λαμβάνοντας υπόψη της πολύπλοκη φύση ενός τέτοιου υποστρώματος.

Η αβεβαιότητα των ολικών ανακτήσεων της μεθόδου προσδιορίστηκε μεταξύ 0.000001 (3,4-DCA) και 0.000258 (DCPMU). Παρατηρήθηκε ότι το 3,4-DCA εμφάνιζε την χαμηλότερη αβεβαιότητα της ολικής ανάκτησης αν και η δυσκολότερα εκχυλιζόμενη ένωση του μίγματος. Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στις ανακτήσεις όλων των επιλεγμένων ενώσεων ήταν προφανής ενώ βρέθηκε ότι το επίπεδο των συγκεντρώσεων συνεισέφερε ουσιαστικά στην αβεβαιότητα της μεθόδου μόνο στην περίπτωση του μεταβολίτη DCPMU. Γενικά, σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται ότι η επίδραση του υποστρώματος είναι σημαντικότερη αυτής του επιπέδου των συγκεντρώσεων, πράγμα αναμενόμενο εάν ληφθούν υπόψη οι σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ιζημάτων. Επιπλέον, επειδή η διαφορά των ανακτήσεων των αναλυόμενων ενώσεων είναι στατιστικά σημαντική από τη μονάδα (δοκιμή t) και υπάρχει σημαντικό αναλογικό συστηματικό σφάλμα θα πρέπει η σχετιζόμενη με την ολική ανάκτηση αβεβαιότητα να συμπεριληφθεί στον συνολικό προϋπολογισμό της «εσωτερικής» μελέτης επικύρωσης της μεθόδου. Τέλος, λόγω της σημαντικής διαφοράς στη φύση του λιμναίου ιζήματος με τα άλλα είδη έγιναν εκ νέου οι υπολογισμοί μόνο με τα δύο είδη ιζήματος, θαλάσσιο και ποτάμιο.

Και πάλι όμως, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των ανακτήσεων των ενώσεων από τη μονάδα και θα πρέπει αυτές να αναφέρονται μαζί με την σχετιζόμενη αβεβαιότητα.

NEPA

Για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από δείγματα επιφανειακών υδάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης δια της στερεάς φάσης (SPE). Καλύτερη απόδοση της μεθόδου επιτεύχθηκε, μετά την κλασική μέθοδο βελτιστοποίησης ενός παράγοντα τη φορά, με τη χρήση μικροστηλών Chromabond C₁₈ Hydra (6 ml, 1000 mg) και μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιου:ακετόνης (1:1) ως το σύστημα διαλυτών έκλουσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι οι ανακτήσεις όλων των ενώσεων παρέμειναν ανεπηρέαστες για ένα εύρος pH 4 με 8, οπότε δεν ήταν απαραίτητη η ρύθμισή του στα φυσικά ύδατα πριν την εκχύλιση. Τέλος, ο όγκος δείγματος 500 ml ήταν αρκετός αφού επέτρεπε ταυτόχρονα τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων σε αρκετά χαμηλά επίπεδα με αμελητέες απώλειες λόγω προσπέλασης της μικροστήλης (1000 mg προσροφητικού υλικού).

Στα πλαίσια των παραγόντων που επηρεάζουν τις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων, μελετήθηκε η επίδραση της ιονικής ισχύος και των περιεχόμενων χουμικών οξέων των επιφανειακών υδάτων. Βρέθηκε ότι η ικανότητα εκχύλισης αυξάνει με την αύξηση της ιονικής ισχύος μέχρι μια συγκεκριμένη τιμή (NaCl 3,5 %) μετά την οποία μειώνεται στην περίπτωση του φυτοφαρμάκου linuron και των μεταβολιτών DCPU και DCPMU, ενώ για το diuron παρέμεινε σχεδόν ανεπηρέαστη. Αξιοσημείωτη αύξηση παρατηρήθηκε στην ανάκτηση του μεταβολίτη 3,4-DCA από διάλυμα με περιεκτικότητα σε NaCl 3.5 % (v/v) κάτι το οποίο εξηγεί και τις υψηλές ανακτήσεις του από θαλασσίνο νερό σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη υδάτων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι οι ανακτήσεις των πιο πολικών μεταβολιτών, DCPU και DCPMU μειώθηκαν ανεπαίσθητα παρουσία των χουμικών οξέων στο διάλυμα ενώ ισχυρή επίδραση φάνηκε ότι έχουν στην απόδοση εκχύλισης των linuron, diuron και 3,4-

DCA, για τα οποία αρχικά παρατηρήθηκε μια γρήγορη πτώση στις τιμές ανακτήσεως τους.

Για τον προσδιορισμό της ολικής ανάκτησης και της αβεβαιότητας που προέρχεται από την επίδραση του τύπου του υποστρώματος και του επιπέδου των συγκεντρώσεων, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρως ένθετο πειραματικό σχέδιο αποτελούμενο από τρεις παράγοντες: τα διαφορετικά υποστρώματα (απεσταγμένο θαλασσινό, ποτάμιο και λιμναίο, $l = 4$), τα επίπεδα συγκεντρώσεων ($p = 3, 50, 100$ και 200 ng/L) και τις επαναλήψεις ($r = 3$). Οι ολικές ανακτήσεις (συμπεριλαμβάνονται όλοι οι τύποι υδάτων) κυμάνθηκαν από 71.6 έως 90.2 % για όλες τις ενώσεις με εξαίρεση τον μεταβολίτη 3,4-DCA για τον οποίο η παρατηρούμενη ολική ανάκτηση ήταν αρκετά χαμηλότερη (51.4 %).

Η μέθοδος εκχύλισης δια της στερεάς φάσης επέδειξε γραμμικότητα στην μελετώμενη περιοχή (25-400 ng/L) με τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου να κυμαίνονται μεταξύ 1.3 και 7.7 ng/L για όλες τις αναλυόμενες ενώσεις, με εξαίρεση το 3,4-DCA (2.6-11.2 ng/L). Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ήταν καλές για όλες τις υπό μελέτη ενώσεις και κυμάνθηκαν μεταξύ 4.1 και 13.8 %. Η αβεβαιότητα των ολικών ανακτήσεων της μεθόδου προσδιορίστηκε μεταξύ 0.000041 (*linuron*) και 0.000087 (*DCPMU*). Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στις ανακτήσεις όλων των επιλεγμένων ενώσεων ήταν προφανής ενώ βρέθηκε ότι το επίπεδο των συγκεντρώσεων συνεισέφερε ουσιαστικά στην αβεβαιότητα της μεθόδου στις περιπτώσεις των *diuron*, *DCPMU* και 3,4-DCA. Γενικά, σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται ότι η επίδραση του υποστρώματος είναι σημαντικότερη αυτής του επιπέδου των συγκεντρώσεων, πράγμα αναμενόμενο εάν ληφθούν υπόψη οι σημαντικές διαφορές στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των επιφανειακών υδάτων. Επιπλέον, επειδή η διαφορά των ανακτήσεων των αναλυόμενων ενώσεων είναι στατιστικά σημαντική από τη μονάδα (δοκιμή *t*) και υπάρχει σημαντικό αναλογικό συστηματικό σφάλμα θα πρέπει η σχετιζόμενη με την ολική ανάκτηση αβεβαιότητα να συμπεριληφθεί στον συνολικό προϋπολογισμό της «εσωτερικής» μελέτης επικύρωσης της μεθόδου. Τέλος, λόγω της σημαντικής διαφοράς στη φύση του λιμναίου ύδατος με

τα άλλα είδη έγιναν εκ νέου οι υπολογισμοί μόνο με τα άλλα τρία είδη, απεσταγμένο, θαλάσσιο και ποτάμιο. Παρόλα αυτά, οι τιμές των ανακτήσεων διέφεραν και πάλι στατιστικά σημαντικά από τη μονάδα και η σχετιζόμενη αβεβαιότητα θα πρέπει να συμπεριληφθεί στον συνολικό προϋπολογισμό της μελέτης επικύρωσης της μεθόδου.

ΤΡΟΦΙΜΑ

Η μέθοδος MSPD επιλέχθηκε για την μελέτη της εκχύλισης του μίγματος των επιλεγμένων ενώσεων από διάφορα δείγματα τροφίμων. Έγινε κατ' αρχάς βελτιστοποίηση της μεθόδου. Αυτή πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους: την κλασική μέθοδο βελτιστοποίησης ενός παράγοντα τη φορά και την πολυπαραγοντική μέθοδο ώστε να ληφθούν υπόψη οι αλληλεπιδράσεις των διαφόρων παραγόντων. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα πατάτας εμβολιασμένα με το μίγμα των ενώσεων σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/Kg}$. Και στις δύο περιπτώσεις εξετάστηκαν τέσσερις κύριοι παράγοντες επίδρασης στη εκχύλιση με τη μέθοδο MSPD και σε τρία επίπεδα (αναλογία υλικών διασποράς, *Florisil*: C_{18} , αναλογία δείγματος:υλικού διασποράς, αναλογία διαλυτών έκλουσης, μεθανόλη:διχλωρομεθάνιο, όγκος διαλύτη έκλουσης). Στην πρώτη περίπτωση βρέθηκε ότι η καλύτερη απόδοση της εκχύλισης για όλες τις ενώσεις του μίγματος με τη μέθοδο MSPD μπορεί να επιτευχθεί με υλικό διασποράς το *Florisil* σε αναλογία 1:2 με το δείγμα και χρησιμοποιώντας 10 ml μίγματος διαλυτών διχλωρομεθανίου:μεθανόλης (50:50) ως σύστημα διαλυτών έκλουσης. Στη δεύτερη περίπτωση οι αντίστοιχες βέλτιστες συνθήκες περιλάμβαναν το *Florisil* ως υλικό διασποράς σε αναλογία 1:1 με το δείγμα για την παρασκευή της στήλης και 10 ml μεθανόλης ως τον διαλύτη έκλουσης. Παρατηρήθηκε επομένως μια συμφωνία στο υλικό διασποράς και τον όγκο του διαλύτη έκλουσης ενώ η διαφορά εστιάζεται στην αναλογία δείγματος:υλικού διασποράς και στη φύση του διαλύτη έκλουσης. Με την κλασική μέθοδο προσεγγίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες «λίγο πιο μακριά» από τις πραγματικές.

Σύμφωνα με την πολυπαραγοντική προσέγγιση, όλες οι παράμετροι μεταβάλλονται συγχρόνως. Το πειραματικό σχέδιο που εφαρμόστηκε ήταν ένα $3^{(4-1)}$

κλασματικό πειραματικό σχέδιο. Μόνο που σ' αυτή την περίπτωση όλοι οι παράγοντες μπορούν θεωρητικά να πάρουν όλες τις τιμές που περιέχονται στο μελετώμενο εύρος και σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς τους. Αυτό επιτυγχάνεται περαιτέρω με τη μοντελοποίηση του συνόλου των δεδομένων με τη χρήση των *Τεχνητών Νευρωνικών Δικτύων*. Για τη συγκεκριμένη μελέτη κατασκευάστηκαν δύο διαφορετικά τεχνητά νευρωνικά δίκτυα καθένα από τα οποία είχε τέσσερεις εισόδους -τις ίδιες- και μία έξοδο. Η βέλτιστη περιοχή πειραματικών συνθηκών αντιστοιχούσε στην **υψηλότερη** δυνατή τιμή της μέσης ανάκτησης (1° ANN) και στη **χαμηλότερη** δυνατή τιμή της τυπικής απόκλισης (2° ANN). Τελικά, η γενική βέλτιστη περιοχή (ή τιμές) πειραματικών συνθηκών (*global optimum*) για τη μελετώμενη μέθοδο εκχύλισης, MSPD, ήταν αυτή που αντιστοιχούσε σε κοινή περιοχή τιμών ή κοινές τιμές μεταξύ των δύο παραπάνω βέλτιστων περιοχών των δύο νευρωνικών δικτύων. Και για τα δύο τεχνητά νευρωνικά δίκτυα παρατηρήθηκε καλή συσχέτιση πραγματικών και προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών.

Χρησιμοποιώντας ως βέλτιστες συνθήκες τις εξαχθείσες από την πολυπαραγοντική μέθοδο βελτιστοποίησης, η ικανότητα της εκχύλισης των επιλεγμένων ενώσεων με τη μέθοδο MSPD εξετάστηκε σε δείγματα πατάτας. Η μέθοδος MSPD επέδειξε γραμμικότητα στην μελετώμενη περιοχή (0.05-1 mg/Kg) με σταθερές προσδιορισμού μεταξύ 0.9945 και 0.9997. Οι μέσες ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν για κάθε ένωση του μίγματος κυμάνθηκαν από 55 έως 96 % με όρια ανίχνευσης της μεθόδου μεταξύ 1.8 και 5.0 μg/Kg. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγικότητα των ενώσεων προς ανάλυση, εκφρασμένες και οι δύο ως σχετικές τυπικές αποκλίσεις, κυμάνθηκαν από 4 έως 12% και από 5 έως 14% αντίστοιχα.

Περαιτέρω, προσδιορίστηκε η ολική ανάκτηση και η αβεβαιότητα που προέρχεται από την επίδραση του τύπου του υποστρώματος και του επιπέδου των συγκεντρώσεων, με τη χρήση ενός *πλήρως ένθετου πειραματικού σχεδιασμού* αποτελούμενου από τρεις παράγοντες: τα διαφορετικά υποστρώματα (σιτάλευρα, πατάτες και μήλα, $l=3$), τα επίπεδα συγκεντρώσεων ($p=3$, 0.05, 0.1 και 0.5 mg/Kg) και τις επαναλήψεις ($r=3$). Οι ολικές ανακτήσεις (συμπεριλαμβάνονται όλοι οι τύποι

τροφίμων) κυμάνθηκαν από 79.7 έως 94.3 % για όλες τις ενώσεις με εξαίρεση τον μεταβολίτη 3,4-DCA για τον οποίο η παρατηρούμενη ολική ανάκτηση ήταν χαμηλότερη (57.0 %). Γενικά παρατηρήθηκε μεγαλύτερη δυσκολία στην εκχύλιση των πιο πολικών ενώσεων του μίγματος (DCPU, 3,4-DCA) πιθανόν λόγω μεγαλύτερης συνάφειας με το είδος των μελετώμενων τροφίμων που κατά κύριο λόγο θεωρούνται μη λιπαρά υποστρώματα.

Η αβεβαιότητα των ολικών ανακτήσεων της μεθόδου προσδιορίστηκε μεταξύ 0.000325 (*linuron*) και 0.003405 (*diuron*). Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος στις ανακτήσεις όλων των επιλεγμένων ενώσεων, με μοναδική εξαίρεση το φυτοφάρμακο *linuron*, ήταν αμελητέα, ενώ βρέθηκε ότι το επίπεδο των συγκεντρώσεων συνεισέφερε ουσιαστικά στην αβεβαιότητα της μεθόδου για όλες τις ενώσεις του δείγματος, εκτός του *linuron*. Γενικά, σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται ότι η επίδραση του επιπέδου των συγκεντρώσεων είναι σημαντικότερη αυτής του υποστρώματος. Το παραπάνω εξηγείται εν μέρει βάσει της παρόμοιας σύστασης των επιλεγμένων τροφίμων (μη λιπαρά), το οποίο παράλληλα μπορεί να δρα αντίθετα στην περίπτωση της μη πολικής ένωσης του μίγματος, *linuron*. Λόγω επίσης της πολύπλοκης φύσης των τροφίμων ως υποστρώματα, μπορεί κάποιες διακυμάνσεις οφειλόμενες στον τρόπο και την ποσότητα εμβολιασμού να είναι αναμενόμενες. Τέλος, επειδή η διαφορά των ανακτήσεων των αναλυόμενων ενώσεων είναι στατιστικά σημαντική από τη μονάδα (δοκιμή *t*), με εξαίρεση τον μεταβολίτη DCPMU, υπάρχει σημαντικό αναλογικό συστηματικό σφάλμα και θα πρέπει η σχετιζόμενη με την ολική ανάκτηση αβεβαιότητα να συμπεριληφθεί στον συνολικό προϋπολογισμό της «εσωτερικής» μελέτης επικύρωσης της μεθόδου για τις υπόλοιπες ενώσεις του μίγματος.

Μετά τα παραπάνω έγινε εφαρμογή της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα τροφίμων αντιπροσωπευτικά του «καλαθιού της νοικοκυράς» που περιλάμβαναν μήλα, καρότα, χυμούς πορτοκαλιών και σιτάλευρα. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 62 έως 96% εκτός του μεταβολίτη 3,4-DCA (49-57%) με σχετικές τυπικές αποκλίσεις μεταξύ 5 και 15%. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου βρίσκονταν στο εύρος 1.6 και 6.3

μg/Kg για όλες τις ενώσεις. Γενικά, παρατηρήθηκαν ελαφρά μειωμένες τιμές ανακτήσεων για όλες τις ενώσεις του μίγματος κατά την εκχύλισή τους από δείγματα καρότων και μήλων.

Για την εφαρμογή της μεθόδου MSPD σε πραγματικά δείγματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν 50 δείγματα τροφίμων (150 στο σύνολο) σε τρεις περιόδους δειγματοληψίας (Ιανουάριο-Φεβρουάριο, Απρίλιο-Μάιο, Σεπτέμβριο-Οκτώβριο) με σκοπό την ανίχνευση υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων linuron και diuron καθώς και των μεταβολιτών τους DCPMU, DCPU και 3,4-DCA. Το 64% των δειγμάτων που ελέγχθηκαν δεν περιείχε ανιχνεύσιμα υπολείμματα των αναλυόμενων ουσιών. Στο 35.3% των δειγμάτων βρέθηκαν υπολείμματα κάτω του ανώτατου ορίου υπολειμμάτων ($<MRL$) ενώ μόνο στο 0.7% των δειγμάτων ανιχνεύτηκαν οι αναλυόμενες ενώσεις σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων.

Βάσει της συχνότητας ανίχνευσης, μετά το συχνότερα ανιχνεύσιμο linuron (17,3%) ακολουθεί το DCPU (16%) και έπονται τα 3,4-DCA (7.3%) και DCPMU (4%) ενώ το diuron ανιχνεύτηκε σε ίχνη σε ένα μόνο δείγμα ($< 7 \mu\text{g/Kg}$, 0.7%). Η μόνη υπέρβαση του ανώτατου ορίου υπολειμμάτων παρατηρήθηκε στην περίπτωση του linuron σε ένα δείγμα χυμού πορτοκαλιού από τη Δανία όπου ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση $102.5 \mu\text{g/Kg}$ ($MRL: 50 \mu\text{g/Kg}$).

Υπολείμματα κοντά ή κάτω από τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων βρέθηκαν κυρίως στις πατάτες και στα μήλα (46.7 %) ενώ ακολουθούν τα καρότα (40 %) και οι χυμοί πορτοκαλιού (36,7 %). Το μικρότερο ποσοστό υπολειμμάτων βρέθηκε στα δείγματα σιτάλευρων (6,7 %). Υπολείμματα πάνω από το οριζόμενο MRL βρέθηκαν μόνο στα δείγματα χυμών (3.3 %).

Μεγαλύτερο ποσοστό δειγμάτων με συνδυασμό δύο ενώσεων (επί του πλήθους των θετικών ανιχνεύσεων) περιείχαν τα δείγματα χυμών πορτοκαλιού (58.3% των θετικών ανιχνεύσεων περιείχαν αποκλειστικά το ζιζανιοκτόνο linuron σε συνδυασμό με το μεταβολίτη 3,4-DCA). Έπονται τα δείγματα πατάτας (28.6% των θετικών ανιχνεύσεων περιείχαν αποκλειστικά το ζιζανιοκτόνο linuron σε συνδυασμό με το

μεταβολίτη DCPU), τα δείγματα καρότων (25.0% των θετικών ανιχνεύσεων περιείχαν το ζιζανιοκτόνο linuron σε συνδυασμό είτε με το μεταβολίτη DCPU είτε με το μεταβολίτη DCPMU) και τα δείγματα μήλων (7.1% των θετικών ανιχνεύσεων περιείχαν αποκλειστικά το ζιζανιοκτόνο diuron σε συνδυασμό με το μεταβολίτη DCPU). Στα δείγματα σιτάλευρων δεν ανιχνεύτηκε συνδυασμός ενώσεων.

Η Ισπανία κρατάει τα ηνία με το 60% των δειγμάτων της να περιέχουν τουλάχιστον κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης υπολείμματα των αναλυόμενων ουσιών, ενώ ακολουθούν η Ολλανδία (53.3%) και η Δανία (53.4%). Με σειρά κατάταξης, τις παραπάνω χώρες ακολουθούν η Σουηδία (46.7%), η Γερμανία (40.0%), η Ελλάδα (40.0%), η Γαλλία (26.7%), η Αγγλία (20%), η Ιταλία (13.3%) και η Πολωνία (13.3%).

Αναφορικά με την ανάλυση συσχέτισης Spearman για τις αναλυόμενες ενώσεις παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις στο 50% των περιπτώσεων. Το 50% των μη σημαντικών συσχετίσεων οφείλεται κατά κύριο λόγο στο ζιζανιοκτόνο linuron, το οποίο δεν εμφανίζει συσχέτιση με καμία άλλη ένωση του μίγματος. Αρνητική και στατιστικά σημαντική συσχέτιση εμφανίζουν μόνο οι μεταβολίτες DCPU και DCPMU, ενώ η ισχυρότερη συσχέτιση φαίνεται ότι είναι μεταξύ του diuron και του μεταβολίτη 3,4-DCA. Η ανάλυση κατηγοριοποίησης, στη περίπτωση των τροφίμων, ξεχωρίζει εμφανώς τα καρότα από τα υπόλοιπα δείγματα τροφίμων, ενώ μια άλλη σαφώς διακεκριμένη ομάδα αποτελούν τα μήλα, οι πατάτες και τα σιτάλευρα. Σχετικά με την κατηγοριοποίηση των ανιχνευόμενων ενώσεων, ξεχωρίζει εμφανώς το linuron από τα υπόλοιπα εξηγώντας τη μη συσχέτιση (Spearman) με καμία από τις υπόλοιπες ενώσεις του μίγματος. Η πιο ευκρινής ομάδα κατηγοριοποίησης είναι αυτή του diuron με τον μεταβολίτη DCPMU.

ΓΕΝΙΚΑ

Η εκτίμηση της αβεβαιότητας μιας αναλυτικής μεθόδου και των πηγών της είναι αναπόσπαστο κομμάτι της επικύρωσης της μεθόδου και θα πρέπει να εκτιμάται όπου αυτή είναι δυνατόν καθότι η γνώση της, αντίθετα με την εννοιολογική της

σημασία, υποδηλώνει αυξημένη εμπιστοσύνη για την εγκυρότητα ενός μετρούμενου αποτελέσματος.

Συγκρίνοντας το εύρος αβεβαιότητας των τριών αναλυτικών μεθόδων για την απομόνωση του ίδιου μίγματος ενώσεων από ιζήματα, φυσικά νερά και τρόφιμα. 0.000001 (3,4-DCA) με 0.000258 (DCPMU), 0.000041 (linuron) με 0.000087 (DCPMU) και 0.000325 (linuron) με 0.003405 (diuron), αντίστοιχα, παρατηρήθηκε ότι: α) η τάξη μεγέθους είναι σαφέστατα μικρότερη στην ανάλυση υδάτων με τη μέθοδο SPE και σαφέστατα μεγαλύτερη στην ανάλυση τροφίμων με τη μέθοδο MSPD, κάτι που μπορεί να αποδοθεί στη φύση του αναλυόμενου υποστρώματος, β) ο μεταβολίτης 3,4-DCA παρουσιάζει τη χαμηλότερη αβεβαιότητα στα ιζήματα, όπου παρατηρείται και η χαμηλότερη τιμή της ανάκτησης του, γ) η περισσότερο λιπόφιλη ένωση του μίγματος, linuron, παρουσιάζει τη χαμηλότερη αβεβαιότητα της ανάκτησής του τόσο από φυσικά ύδατα όσο και από τα τρόφιμα, δ) ο μεταβολίτης DCPMU παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή αβεβαιότητας σε ιζήματα και φυσικά νερά.

Σε επίπεδο παραγόντων που συνεισφέρουν στην αβεβαιότητα των τριών αναλυτικών μεθόδων για την απομόνωση του ίδιου μίγματος ενώσεων από ιζήματα, φυσικά νερά και τρόφιμα, παρατηρήθηκε ότι στις δύο πρώτες περιπτώσεις ο τύπος του υποστρώματος συνεισέφερε εμφανώς στην αβεβαιότητα για όλες τις ενώσεις του μίγματος σε αντίθεση με την τρίτη περίπτωση όπου σημαντική ήταν η συνεισφορά του επιπέδου των συγκεντρώσεων και όχι του τύπου του υποστρώματος. Αξιοσημείωτη είναι η περίπτωση του linuron που παρουσίασε την ίδια συμπεριφορά ως προς την αβεβαιότητα των ανακτήσεών του και για τις τρεις μεθόδους εκχύλισης. Τα παραπάνω οδηγούν στο γενικό συμπέρασμα ότι για την ανάλυση ιζημάτων και φυσικών υδάτων θα πρέπει να εφαρμόζεται μια διαφοροποιημένη μέθοδος εκχύλισης ανάλογα με το υπόστρωμα ενώ για τη συγκεκριμένη κατηγορία τροφίμων (φρούτα και λαχανικά) δεν τίθεται σε γενικές γραμμές τέτοιο θέμα.

Η μέθοδος εκχύλισης MSPD από τρόφιμα παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα αφού είναι οικονομική, σύντομη χρονικά, έχει καλή απόδοση για ταυτόχρονη ανάλυση των αρχικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους, μπορεί να

εφαρμοστεί με πολύ μικρές διαφοροποιήσεις σε ένα μεγάλο εύρος τροφίμων και για ελέγχους ρουτίνας μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Η σημασία του πειραματικού σχεδιασμού, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για πειράματα με πολλούς μεταβλητούς παράγοντες είναι πολύ μεγάλη. Με την κλασική μέθοδο βελτιστοποίησης μεθόδων, μεταβολής ενός παράγοντα τη φορά, αγνοούνται οι πιθανές αλληλεπιδράσεις των παραγόντων και το υποτιθέμενο βέλτιστο σημείο στην πραγματικότητα βρίσκεται «δίπλα» από το πραγματικό, αφού δε λαμβάνεται υπόψη η απόκριση των πολυάριθμων συνδυασμών των μελετώμενων επιπέδων των παραγόντων. Ένα βήμα πιο πέρα, έρχεται η συνεισφορά μοντέλων όπως τα Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα. Αυτά επιτρέπουν την καλύτερη χαρτογράφηση της περιοχής δεδομένων και κατά συνέπεια την πιο καλά στοχευόμενη εύρεση του βέλτιστου σημείου συνθηκών χωρίς την ανάγκη γνώσης της συνάρτησης (*συχνά πολύπλοκης*) που περιγράφει τη σχέση παραγόντων/μεταβλητών –απόκρισης, χάρη στην ιδιότητά τους να μπορούν να *προσεγγίσουν οποιαδήποτε συνάρτηση με οποιοδήποτε ακρίβεια*.

Τέλος, η εκτίμηση της χρόνιας επικινδυνότητας (*υπολογισμένη για έναν ενήλικα με μέσο σωματικό βάρος 60 Kg*) μόνο για τη μία ένωση του μίγματος των επιλεγμένων ενώσεων, το linuron κατέδειξε ότι η ημερήσια πρόσληψη υπολειμμάτων του ζιζανιοκτόνου linuron από τα επιλεγμένα δείγματα τροφίμων τόσο μεμονωμένα όσο και ως σύνολο προϊόντων διατροφικής συνήθειας για όλες τις κατηγορίες χωρών παρουσίασαν μηδαμινό κίνδυνο. Οι επί τοις εκατό ADI τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 0.25% (στο 5^ο εκατοστημόριο) και 2.84% (στο 95^ο εκατοστημόριο ή αλλιώς στη *χειρίστη περίπτωση*). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα καρότα και οι πατάτες φαίνεται να συνεισφέρουν περισσότερο στη συνολική πρόσληψη του ζιζανιοκτόνου απ' ό,τι τα άλλα είδη διατροφής. Ακόμη και στην περίπτωση της εκτίμησης της πρόσληψης του αθροίσματος των υπολειμμάτων του ζιζανιοκτόνου linuron και των βασικών μεταβολιτών του, DCPU και DCPMU, η επικινδυνότητα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μηδαμινή με τις επί τοις εκατό του ADI τιμές να κυμαίνονται από 1.26% έως και 5.65% (στη *χειρίστη περίπτωση*). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εκτίμηση επικινδυνότητας δεν λαμβάνει υπόψη την ύπαρξη ενός πολύπλοκου μίγματος ενώσεων

στα τρόφιμα με πιθανή αθροιστική ή συνεργιστική δράση ή ακόμη την πιθανή επίδραση που μπορεί να έχουν ακόμη και υπολείμματα χημικών ενώσεων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (ενδοκρινικοί διαταράκτες) στην υγεία του καταναλωτή. Επιπλέον οι τιμές ADI έχουν θεσπιστεί με βάση την τοξική δράση των ενώσεων ενώ δεν λαμβάνουν υπόψη την πιθανή διαταρακτική ενδοκρινική δράση, η οποία μπορεί να λαμβάνει χώρα σε επίπεδα συγκεντρώσεων ίσως και χαμηλότερα των ορίων ανίχνευσης αυτών.

* * *

Θα έλεγα ότι οι φοιτητές έχουν την ανάγκη μαθημάτων πειραματικού σχεδιασμού πριν ακόμη ασχοληθούν με οποιοδήποτε είδος πειράματος. Κάποτε, πρώτο το Πανεπιστήμιο της Washington, στο Τμήμα Χημείας εισήγαγε ένα μάθημα για προπτυχιακούς και τελειόφοιτους με το όνομα Χημειομετρία. Μου ζητήθηκε να κάνω μερικές διαλέξεις. Πράγματι έκανα για κάνα δύο χρόνια, κάπου έξι διαλέξεις. Διάλεξα τυχαία κάποια πράγματα και μίλησα λίγο για εισαγωγή στο πειραματικό σχέδιο, σχετικά με πολυπαραγοντικά πειράματα, PCA κ.α. Δεν γνώριζαν ότι αυτή ήταν μόνο η κορυφή του παγόβουνου. Ένας τελειόφοιτος φοιτητής παρακολουθούσε το μάθημα τέσσερα χρόνια. Έρθε και με βρήκε δύο βδομάδες πριν τελειώσει η ακαδημαϊκή χρονιά (*ο συγκεκριμένος αποφοιτούσε δύο βδομάδες μετά τη διάλεξή μου για πλήρεις και κλασματικούς πειραματικούς σχεδιασμούς*). Έρθε λοιπόν εμφανώς ταραγμένος και μου είπε: «Είμαι πραγματικά εκνευρισμένος γιατί πρόκειται να αποφοιτήσω με πτυχίο Χημείας και δύο βδομάδες πριν την αποφοίτηση, μου λέτε ότι υπάρχουν βέλτιστοι τρόποι για να διεξάγεις πειράματα ώστε να εξάγεις τη μέγιστη ποσότητα πληροφορίας με τον λιγότερο κόπο! Αυτό που με τρομοκρατεί περισσότερο είναι ότι σχεδόν ούτε το κατάλαβα...»

Bruce Kowalski

Ιδρυτής της Χημειομετρίας

(Σε ερώτηση που του έγινε σχετικά με τη θέση της Χημειομετρίας στο Πανεπιστημιακό πρόγραμμα σπουδών, σε συνέδριο της EURACHEM με θέμα “Η Χημειομετρία στην Οργανική και Βιο-οργανική Χημεία”, Trieste, Ιταλία, 19-26 Ιουνίου 1988 (Geladi and Esbensen 1990))

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agatonovic-Kustrin, S. and Beresford, R. (2000), "Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **22**(5), 717-727.

Agatonovic-Kustrin, S., Zecevic, M., Zivanovic, L. and Tucker, I.G. (1998), "Application of neural networks for response surface modeling in HPLC optimization", *Anal. Chim. Acta.* **364**(1-3), 265-273.

Albanis, T.A., Danis, T.G. and Hela, D.G. (1995), "Transportation of pesticides in estuaries of Louros and Arachthos rivers (Amvrakikos Gulf, N.W. Greece)", *The Science of The Total Environment.* **171**(1-3), 85-93.

Albanis, T.A. and Hela, D.G. (1995), "Multiresidue analysis of pesticides in various environmental water simulated samples using solid phase extraction disks followed by gas chromatography techniques with FTD and MSD", *J Chromatogr. A.* **707** 283-292.

Alva, A.K. and Singh, M. (1990), "Sorption of bromacil, diuron, norfluron, and simazine at various horizons in two soils", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* . **45** 365-374.

Amvrazi, E.G. and Albanis, T.A. (2009), "Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected ", *Food Chemistry.* **113**(1), 253-261.

Analytical Methods Committee (1995), "Uncertainty of Measurement: Implications of its Use in Analytical Science", *Analyst.* **120** 2303-2308.

Andrews, J.M. and Leiberman, S.H. (1994), "Neural network approach to qualitative identification of fuels and oils from laser induced fluorescence spectra", *Anal. Chim. Acta.* **285** 237-246.

- Anjum, M.F., Tasadduq, I. and Al-Sultan, K. (1997), "Response surface methodology: a neural network approach", *European Journal of Operational Research*. **101** 65-73.
- Araujo, P.W. and Brereton, R.G. (1996), "Experimental design I. Screening", *Trends Anal. Chem.*, **15**(1), 26-31.
- Baczek, T., Bucinski, A., Ivanov, A.R. and Kaliszan, R. (2004), "Artificial Neural Network Analysis for Evaluation of Peptide MS/MS Spectra in Proteomics". *Anal.Chem.*, **76**(6), 1726-1732.
- Balinova, A. (1996), "Strategies for chromatographic analysis of pesticide residues in water", *J Chromatogr. A*. **754** 125-135.
- Barker, S.A. (2007), "Matrix solid phase dispersion (MSPD)", *J. Biochem. Biophys. Methods* **70** 151-162.
- Barker, S.A., Long, A.R. and Short, C.R. (1989), "Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion", *J Chromatogr. A*. **475** 353-361.
- Barnard, E. (1992), "Optimisation for training neural networks", *IEEE Trans. Neural Networks*. **3** 232-240.
- Barriada-Pereira, M., Gonzalez-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S., Lopez-Mahia, P., Prada-Rodriguez, D. and Fernandez-Fernandez, E. (2007), "Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables ", *Talanta*. **71**(3), 1345-1351.
- Barwick, V.J. and Ellison, S.L.R. (1999), "Measurement uncertainty: Approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery", *Analyst*. **124** 981-990.
- Barwick, V.J. and Ellison, S.L.R. (2000), "The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies Part 1: Description of a laboratory protocol", *Accred Qual Assur.*, **5** 47-53.

Bas, D. and Boyact, I.H. (2007), "Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction", *J Food Engneen.* **78** 846-854.

Basset, M.V., Wendelken, S.C., Dattilio, T.A., Pepich, B.V. and Munch, D.J. (2000), *Determination of phenylurea compounds in drinking water by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with UV detection*, U.S. Environmental Protection Agency

Bauer, E.R.S., Meyer, H.H.D., Stahlschmidt - Allner, P. and Sauerwein, H. (1998), "Application of an androgen receptor assay for the characterisation of the androgenic or antiandrogenic activity of various phenylurea herbicides and their derivatives ", *Analyst.* **123** 2485-2487.

Bayne, C.K. and Rubin, I.B. (1986), *Practical Experimental Designs and Optimization Methods for Chemists*, VCH Publishers, Inc.

Berrada, H., Font, G. and Molto, J.C. (2000), "Indirect analysis of urea herbicides from environmental water using solid-phase microextraction", *J. Chromatorg. A.* **890** 303-312.

Berrada, H., Font, G. and Moltó, J.C. (2003), "Determination of Urea Pesticide Residues in Vegetable, Soil, and Water Samples", *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* **33** 19-41.

Biziuk, M., Przyjazny, A., Czerwinski, J. and Wiergowski, M. (1996), "Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters", *J Chromatogr. A.*(754), 103-123.

Blanco, E., Casais, M.C., Mejuto, M.C. and Cela, R. (2006), "Approaches for the Simultaneous Extraction of Tetrabromobisphenol A, Tetrachlorobisphenol A, and

Related Phenolic Compounds from Sewage Sludge and Sediment Samples Based on Matrix Solid-Phase Dispersion", *Anal. Chem.*, **78**(8), 2772-2778.

Boti, V.I., Sakkas, V.A. and Albanis, T.A. (2007), "Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples. Part I: Ultrasonic extraction from diverse sediment matrices ", *J Chromatogr. A*. **1146** 139-147.

Boti, V.I., Sakkas, V.A. and Albanis, T.A. (2007), "Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples. Part II. Solid-phase extraction from environmental natural waters ", *J Chromatogr. A*. **1146** 148-156

Boxall, A.B.A., Comber, S.D., Conrad, A.U., Howcroft, J. and Zaman, N. (2000), "Inputs, monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK estuaries", *Mar. Pollut. Bull.*, **40** 898-905.

Brasquet, C., Bourges, B. and Cloirec, P.L. (1999), "Relationship (QSPR) for the adsorption of organic compounds onto activated carbon cloth: Comparison between multilinear regression and neural network.", *Environ. Sci. Technol.*, **33** 4226-4231.

Brereton, R.G. *Introduction to Chemometrics*, Centre for Chemometrics, University of Bristol, United Kingdom

Brucher, J. and Bergstrom, L. (1997), "Temperature dependence of linuron sorption to three different agricultural soils", *J. Environ. Qual.*, **26** 1327-1335.

Bruchmann, A., Zinn, P. and Haffer, C.M. (1993), "Prediction of gas chromatographic retention index data by neural networks", *Anal. Chim. Acta*. **283** 869-880.

Busche, S. (2004). "Artificial Neural Networks: Tools for the Optimisation of Chemical and Biochemical Sensors". 28/29 June, SOWA-Workshop, Prague.

- Businelli, A., Vischetti, C. and Coletti, A. (1992), "Validation of Koc approach for modelling the fate of some herbicides in italian soils", *Fresenius Environ. Bull.*, **1** 583-588.
- Camel, V. (2001), "Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls", *Analyst*. **126** 1182-1193.
- Camusso, M., Galassi, S. and Vignati, D. (2002), "Assessment of river Po sediment quality by micropollutant analysis", *Water Research*. **36** 2491-2504.
- Carabias-Martinez, R., Rodriguez-Gonzalo, E., Herrero-Hernandez, E., Sanchez-San Roman, F.J. and Prado Flores, M.G. (2002), "Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters", *J. Chromatogr. A*. **950** 157-166.
- Caux, P.Y., Kent, R.A., Fan, G.T. and Grande, C. (1998), "Canadian water quality guidelines for linuron", *Environ. Toxicol. Water Qual.*, **13** 1-41.
- Cheng, H.H. (1990), *Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts and Modeling*, Soil Science Society of America, Book Series No 2, Madison.
- Clouser, D.L. and Jurs, P.C. (1994), "Simulation of ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of tetrahydropyrans using regression analysis and neural networks", *Anal.Chim. Acta*. **295**(3), 221-231.
- Codex Alimentarius Commission (1999), *Recommended methods of sampling for the determination of pesticide residues for compliance with MRLs*, CAC/GL 33
- Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J.P. (1997), *Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence and survival?:a scientific detective story*, Dutton: New York, NY

Colon, D., Weber, E.J. and Baughman, G.L. (2002), "Sediment-associated reactions of aromatic amines. 2. QSAR development", *Environ. Sci. Technol.*, **36** 2443-2450.

Commission of the European Communities (1997), *Calculation of Maximum Residue Levels and Safety Intervals*, Directorate General for Agriculture VI BII-1, 7039/VI/95 EN

Cook, J.C., Mullin, L.S., Frame, S.R. and Biegel, L.B. (1993), "Investigation of a Mechanism for Leydig Cell Tumorigenesis by Linuron in Rats Toxicology and Applied Pharmacology", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **119**(2), 195-204.

Cox, L. and Walker, A. (1999), "Studies of time-dependent sorption of linuron and isoproturon in soils", *Chemosphere*. **38** 2707-2718.

Crossland, N.O. (1990), "A review of the fate and toxicity of 3,4-dichloroaniline in aquatic environments", *Chemosphere*. **21** 1489-1497.

Currie, L.A. (1995), "Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995)", *Pure Appl. Chem.*, **67**(10), 1699-1723.

Czitrom, V. (1999), "One-Factor-at-A-Time versus Designs Experiments", *The American Statistician*. **53**(2), 126-131.

Dabrowski, L., Giergielewicz-Mozajska, H., Biziuk, M., Gaca, J. and Namiesnik, J. (2002), "Some aspects of the analysis of environmental pollutants in sediments using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry", *J Chromatogr. A*. **957** 59-67.

Dachs, J., Fernández, I. and Bayona, J.M. (1997), "Combined experimental design and information theory for the optimization of supercritical fluid extraction of organic priority pollutants from sediment", *Anal. Chim. Acta*. **351** 377-385.

- Dankwardt, A. (1998), *Evaluation of Pesticides Disrupting the Hormone and Reproductive System*, Technical University of Munich, WWF- Germany
- Daxenberger, A. (2002), "Pollutants with androgen-disrupting potency", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **104** 124-130.
- Day, K.E. and Maguire, R. (1990), "Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide deltamethrin and its major degradation products to daphnia magna ", *J. Environ. Toxicol. Chem.*, **9**(10), 1297-1300.
- De Kok, A., Vos, Y.J., Van Garderen, C., De Jong, T., Van Opstal, M., Frei, R.W., Geerdink, R.B. and Brinkman, U.A.T. (1984), "Chromatographic determination of phenylurea herbicides and their corresponding aniline degradation products in environmental samples.I.", *J Chromatogr. A*. **288** 71-89.
- Dehouck, P., Van Looy, E., Haghedooren, E., Deckers, K., Vander Heyden, Y., Adams, E., Roets, E. and Hoogmartens, J. (2003), "Analysis of erythromycin and benzoylperoxide in topical gels by liquid chromatography", *J. Chromatogr. B*. **794** 293-302.
- Department of Health and Human Services (1994), *Pesticide Analytical Manual, Volume I: Multiresidue methods*, Public Health Service Food and Drug Administration, U.S.
- Desbrow, C., Routledge, E., Brighty, G.C., Sumpter, J. and Waldlock, M. (1998), "Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening", *Environ. Sci. Technol.* . **32** 1549-1558.
- Di Corcia, A., Costantino, A., Crescenzi, C. and Samperi, R. (1999), "Quantification of phenylurea herbicides and their free and humic acid-associated metabolites in natural waters", *J. Chromatogr. A*. **852** 465-474.

Dorough, H.W. (1976), *Bound and conjugated pesticide residues: Biological activity of pesticides conjugates*, American Chemical Society, USA.

EC (2002), *Review report for the active substance linuron*, (Health & consumer protection directorate-general), 7595/VI/97-final, 2 December 2002, European Commission

EC (2008), *Review report for the active substance diuron*, (Health & Consumer protection directorate-general), SANCO/2184/2008 rev 3, 10 July 2008, European Commission

EFSA (2005), *Scientific Report: Conclusion on the peer review of diuron*, 25, 1-58

Ellison, S.L.R., Rosslein, M. and Williams, A. (2000), *EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, second ed.

Ellison, S.L.R. and Williams, A. (1998), "Measurement uncertainty and its implications for collaborative study method validation and method performance parameters ", *Accred Qual. Assur.*, 3(1), 6-10.

Ensenbach, U., Hryk, R. and Nagel, R. (1996), "Kinetics of 3,4-dichloroaniline in several fish species exposed to different types of water", *Chemosphere*. **32** 1643-1654.

Erickson, B.E. (2002), "Analysing the ignored environmental contaminants", *Environ. Sci. Technol.*, **36** 140A-145A.

EU (1994), *Council Directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market (91/414/EEC)*, Official Journal of the European Communities

EU (2002), "Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology", (Sanco/3268/2001-rev.4).

EU (2002), "Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology under Council Directive 91/414/EEC", (Sanco/10329/2002-rev. 2).

EU (2003), "Guidance Document of the Assessment of the Relevance of Metabolites in Groundwater of Substances Regulated Under Council Directive 91/414/EEC", (Sanco/221/2000-rev.10).

EU (2006), *The impact assessment of the thematic strategy on the sustainable use of pesticides.* ,

European Commission-Joint Research Centre (2006), *3,4-Dichloroaniline (3,4-DCA): Summary Risk Assessment Report*, Institute for Health and Consumer Protection (IHCP), European Chemicals Bureau (ECB)

European Commission (2002), *Review report for the active substance linuron*, Health & Consumer Directorate-general

Eurostat (2001), *Environment Statistics Pocketbook Data 1980-1999*, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities

Eurostat (2006), *Europe in figures, Eurostat yearbook 2006-07*, Statistical Office of the European Communities, EU.

FAO (1981), *Guidelines on pesticide residue trials to provide data for the registration of pesticides and the establishment of maximum residue limits* Plant Protection bulletin (29)

Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., Contreras, M., Penuela, G., Ferrer, I. and Barcelo, D. (1998), "Comparison of various sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters", *J Chromatogr. A.* **823** 35-47.

Ferrer, I. and Barcelo, D. (1999), "Validation of new solid-phase extraction materials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **18** 180-192.

Ferrer, I., Barcelo, D. and Thurman, E.A. (1999), "Double-Disk Solid-Phase Extraction: Simultaneous Cleanup and Trace Enrichment of Herbicides and Metabolites from Environmental Samples", *Anal. Chem.*, **71** 1009-1015.

Field, J.A., Reed, R.L., Sawyer, T.E., Griffith, S.M. and Wigington, P.J. (2003), "Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production", *J. Environ. Qual.*, **32** 171-179.

Field, J.A., Reed, R.L., Sawyer, T.E. and Martinez, M. (1997), "Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution", *J. Agric. Food Chem.*, **45** 3897-3902.

Fielding, M., Barcelo, D., Helweg, A., S., G., Tornstenson, L., Van Zoonen, P., Wolter, R. and Angelletti, G. (1992), *Pesticides in ground and drinking water*, EC Commission, Water Pollution Research Report 27, Brussels.

Fleming, J., Albus, H., Neidhart, B. and Wegschieder, W. (1996), "Glossary of Analytical Terms (II)", *Accred. Qual. Assur.*, **1**(2), 87-88.

Frias-Garcia, S., Sanchez, M.J. and Rodriguez-Delgado, M.A. (2004), "Optimisation of a solid-phase microextraction procedure for the determination of herbicides by micellar electrokinetic chromatography", *J. Sep. Sci.*, **27** 660-666.

Frimmel, F.H. and Hessler, D.P. (1994), *Photochemical degradation of triazine and anilide pesticides*, *Surface Photochemistry*, CRC press, Inc., Boca Raton, pp 137-147.

Fritz, J.S. and Masso, J.J. (2001), "Miniaturized solid-phase extraction with resin disks", *J Chromatogr. A*, **909** 79-85.

Gatidou, G., Kotrikla, A., Thomaidis, N.S. and Lekkas, T.D. (2004), "Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography-diode array detection", *Anal. Chim. Acta.* **505** 153-159.

Gatidou, G., Kotrikla, A., Thomaidis, N.S. and Lekkas, T.D. (2005), "Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography–diode array detector", *Anal. Chim. Acta.* **528** 89-99.

Geladi, P. and Esbensen, K. (1990), "The start and the early history of Chemometrics: selected interviews. Part 1 ", *J Chemometrics.* **4** 337-354.

GEMS/Food (1997), *Guidelines for predicting dietary intake of pesticide residues (revised)*, Global Environment Monitoring System-Food Contamination Monitoring and Assessment Programme in collaboration with Codex Committee on Pesticide Residues (WHO/FSF/FOS/97.7)

Gevao, B., Semple, K.T. and Jones, K.C. (2000), "Bound pesticide residues in soils: a review", *Environmental Pollution.* **108** 3-14.

Gioti, E.M., Skalkos, D.C., Fiamegos, Y.C. and Stalikas, C.D. (2005), "Single-drop liquid-phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in biological fluids by high performance liquid chromatography", *J Chromatogr. A.* **1093**(1-2), 1-10.

Girling, A.E., Tattersfield, L., Mitchell, G.C., Crossland, N.O., Pascoe, D., Blockwell, S.J., Maund, S.J., Taylor, E.J., Wenzel, A., Janssen, C.R. and Juttner, I. (2000), "Derivation of predicted no-effect concentrations for lindane, 3,4-dichloroaniline, atrazine, and copper", *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **46** 148-162.

- Goger, B., Kunert, O., Seger, C., Rinelli, R. and Wintersteiger, R. (2001), "Quantification of Phenylurea Pesticides by HPLC/ECD and Photolysis", *Electroanalysis*. **13** 1335-1345.
- Gonzalez, A.G., Herrador, M.A. and Asuero, A.G. (1999), "Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays", *Talanta*. **48**(3), 729-736.
- Goodacre, R., Neal, M.J. and Kell, D.B. (1994), "Rapid and quantitative analysis of the pyrolysis mass spectra of complex binary and tertiary mixtures using multivariate calibration and artificial neural networks", *Anal.Chem.*, **66** 1070-1085.
- Goody, D.C., Chilton, P.J. and Harrison, I. (2002), "A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil", *Sci. Total Environ.*, **297** 67-83.
- Green, C.E. and Abraham, M.H. (2000), "Investigation into the effects of temperature and stirring rate on the solid-phase extraction of diuron from water using a C18 extraction disk", *J Chromatogr. A*. **885** 41-49.
- Grover, R. (1988), *Environmental chemistry of herbicides: Volume I*, Florida.
- Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M.A.P.C. and Lopes, M.C. (1998), "Acute effects of 3,4-dichloroaniline on blood of male wistar rats", *Chemosphere*. **37** 619-632.
- Guillete, L.J. and Crain, D.A. (2000), *Environmental Endocrine Disruptors: an evolutionary perspective*, Taylor & Francis, Inc
- Guillete, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F. and Woodward, R. (1994), "Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida", *Environ. Health Perspect.*, **102** 680-688.

- Gunderson, M.P., Kools, S.A.E., Milnes, M.R. and Jr.L.J., G. (2003), "Effect of acute stress on plasma b-corticosterone, estradiol-17b and testosterone concentrations in juvenile American alligators collected from three sites within the Kissimmee-Everglades drainage basin in Florida (USA)", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **135** 365-374.
- Guzzella, L., Capri, E., Di Corcia, A., Barra Caracciolo, A. and Giuliano, G. (2006), "Fate of Diuron and Linuron in a Field Lysimeter Experiment", *J. Environ. Qual.* . **35** 312-323.
- Hanrahan, G., Zhu, J., Gibani, S. and G., P.D. (2005), *Chemometrics and statistics: Experimental design*, Elsevier Ltd., California State University, Los Angeles, CA, USA, p.p 8-13.
- Hardy, T. (2008), *Scientific risk assessment of pesticides - where are we now and what are the challenges ahead?*, Science Director, Central Science Laboratory, Chair of EFSA Plant protection products and their residues Panel (PPR), York, UK.
- Hedges, L.V. (2007), *Basic Experimental Design*, IES summer research training Institute, Northwestern University
- Hennion, M.C. (1999), "Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography", *J Chromatogr. A*. **856** 3-54.
- Hermo, M.P., Barron, D. and Barbosa, J. (2005), "Determination of residues of quinolones in pig muscle: Comparative study of classical and microwave extraction techniques", *Anal. Chim. Acta*. **539**(1-2), 77-82.
- Herrera, M.C. and Luque de Castro, M.D. (2005), "Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection", *J Chromatogr. A*. **1100**(1), 1-7.

Hicks, C.R. and Turner, K.V.J. (1999), *Fundamental Concepts in the Design of Experiments*, Oxford University Press, Inc, New York.

Hood, E. (2005), "Are EDCs blurring issues of gender?", *Environ. Health Perspect.*, **113**(10), A670-A677.

Hoover, R., Gray, L. and Fraumeni, J. (1977), "Stilbestrol (diethylstilbestrol) and the risk of ovarian cancer", *The Lancet*. **310** 533-534.

Hornik, K. (1993), "Some new results on neural network approximation", *Neural Networks*. **6**(8), 1069-1072.

Hoyer, A.P., Grandjean, P., Jorgensen, T., Brock, J.W. and Hartvig, H.B. (1998), "Organochlorine exposure and risk of breast cancer", *Lancet*. **352** 1816-1820.

Hsu, T.-S. and Bartha, R. (1976), "Hydrolyzable and nonhydrolyzable 3,4-Dichloroaniline-Humus complexes and their respective rates of biodegradation", *J. Agric. Food Chem.*, **24**(1), 118-122.

Hu, Y.-Y., Zheng, P., He, Y.-Z. and Sheng, G.-P. (2005), "Response surface optimization for determination of pesticide multiresidues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography", *J. Chromatogr. A*. **1098** 188.

Hu, Y., Zhou, G., Kang, J., Du, Y., Huang, F. and Ge, J. (1996), "Assessment of chromatographic peak purity by means of artificial neural networks", *J. Chromatogr. A*. **734**(2), 259-270.

Hughes, I. and Woods, H.F. (2002), *Risk Assessment of Mixtures of Pesticides and Similar Substances*, Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment

Hund, E., Massart, D.L. and Smeyers-Verbeke, J. (2001), "Operational definitions of uncertainty", *Trends Anal. Chem.*, **20**(8), 394-405.

Huuskonen, J., Salo, M. and Taskinen, J. (1997), "Neural network modeling for estimation of the aqueous solubility of structurally related drugs", *Pharm. Sci.*, **86** 450-454.

ISO (1994), "Accuracy (trueness and prediction) of measurement methods and results", **ISO 5724**(Geneva).

IUPAC, ISO, AOAC Int. and EURACHEM (1996), *Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement*, 4-5 September, Technical Report Resulting from the Symposium on Harmonization of Quality Assurance systems for Analytical Laboratories, Orlando, FL.

Jinde, C.D. (1994), *Physico-Chemical Properties and Environmental Fate of Pesticides*, Environmental Hazards Assessment Program (Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring and Pest Management Branch), State of California.

Jönsson, J.A. and Mathiasson, L. (2003), "Membrane Extraction for Sample Preparation", *LCGC North America*. **21** 424-438.

Kataoka, H. (2003), "New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **22** 232-243.

Kateman, G. (1993), "Neural networks in analytical chemistry?", *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **19**(2), 135-142.

Kavuri, S.N. and Venkatasubramanian, V. (1993), "Using fuzzy clustering with ellipsoidal units in neural networks for robust fault classification", *Comput. Chem. Eng.*, **17**(8), 765-784.

Kelce, W.R., Stone, C.R., Laws, S.C., Gray, L.G., Kemppainen, J.A. and Wilson, E.M. (1995), "Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist", *Nature*. **375** 581-585.

Kiely, T., Donaldson, D. and Grube, A. (2004), *Pesticides Industry Sales and Usage 2000 and 2001 Market Estimates*, (Biological and Economic Analysis Division, Office of Pesticide Programs, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances) U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460

Klaassen, K. (1996), *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw Hill, Health Professions Division, 1221 Avenue of the Americas, New York. NY 10020-1095, 5th edition

Kolpin, D.W., Thurman, E.M. and Linhart, S.M. (2001), "Occurrence of Cyanazine Compounds in Groundwater: Degradates More Prevalent Than the Parent Compound". *Environ. Sci. Technol.*, **35**(6), 1217-1222.

Konstantinou, I.K. and Albanis, T.A. (2004), "Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review", *Environ. Int.*, **30**(2), 235-248.

Krutz, L.J., Senseman, S.A. and Sciumbato, A.S. (2003), "Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples", *J Chromatogr. A.* **999** 103-121.

Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Hela, D.G. and Albanis, T.A. (2002), "Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas River (N.W. Greece)", *J Chromatogr. A.* **963** 107-116.

Lamoree, M.H., Swart, C.P., Van der Horst, A. and Van Hattum, B. (2002), "Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters", *J Chromatogr. A.* **970** 183-190.

Lee, S., Gan, J. and Kabashima, J. (2002), "Recovery of Synthetic Pyrethroids in Water Samples during Storage and Extraction", *J. Agric. Food Chem.*, **50** 7194 -7198.

- Li, B., He, Y. and Xu, C. (2007), "Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides residues in vegetables using continuous-flow chemiluminescence with artificial neural networks calibration", *Talanta*. **72** 223-230.
- Li, H., Lee, L.S., Jafvert, C.T. and Graveel, J.G. (2000), "Effect of substitution on irreversible binding and transformation of aromatic amines with soils in aqueous systems", *Environ. Sci. Technol.*, **34** 3674-3680.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, I. and Wenzel, A. (2003), "IUPAC Technical Report: Endocrine disruptors in the environment ", *Pure Appl. Chem.*, **75** 631-681.
- Lisinger, T.P.J. (2008), "Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution", *Trends Anal. Chem.*, **27**(10), 916-923.
- Liska, I. (2000), "Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview", *J Chromatogr. A*. **885** 3–16.
- Liu, J.-F., J.-B., C., Jiang, G.-B., Cai, Y.-G. and Liu, J.-M. (2003), "Trace analysis of sulfonylurea herbicides in water by on-line continuous flow liquid membrane extraction-C18 precolumn liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection", *J Chromatogr. A*. **995** 21-28.
- Lopez-Blanco, M.C., Blanco-Cid, S., Cancho-Grande, B. and Simal-Gandara, J. (2003), "Application of single-drop microextraction and comparison with solid -phase microextraction and solid-phase extraction for the determination of a- and b- endosulfan in water samples by gas chromatography-electron-capture detection", *J Chromatogr. A*. **984** 245-252.
- Müller, J.F., Duquesne, S., NG, J., Shaw, G.R., Krrishnamohan, K., Manonmanii, K., Hodge, M. and Eaglesham, G.K. (2000), "Pesticides in Sediments From Queensland Irrigation Channels and Drains", *Marine Pollution Bulletin*. **41** 294-301.

- Madden, J.E., Avdalovic, N., Haddad, P.R. and Havel, J. (2001), "Prediction of retention times for anions in linear gradient elution ion chromatography with hydroxide eluents using artificial neural networks", *J. Chromatogr. A*. **910** 173-179.
- Manallack, D.T., David, T., Ellis, D.D. and Livingstone, D.J. (1994), "Analysis of Linear and Non-Linear QSAR Data Using Neural Networks", *J. Med. Chem.*, **37** 3758-3767.
- Maroto, A., Boque, R., Riu, J. and Rius, F.X. (1999), "Evaluating uncertainty in routine analysis", *Trends Anal. Chem.*, **18**(9+10), 577-584.
- Maroto, A., Boque, R., Riu, J. and Rius, F.X. (2001), "Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays", *Anal.Chim. Acta*. **440** 171-184.
- Maroto, A., Riu, J., Boque, R. and Rius, F.X. (1999), "Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process", *Anal.Chim. Acta*. **391** 173-185.
- Martinez, K. and Barceló, D. (2001), "Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC-APCI-MS", *Fresenius J. Anal. Chem.*, **370** 940-945.
- Masque, N., Marce, R.M. and Borrull, F. (1998), "New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **17**(6), 384-393
- McIntyre, B.S., Barlow, N.J., Wallace, D.G., Maness, S.C., Gaido, K.W. and Foster, P.M.D. (2000), "Effects of in Utero Exposure to Linuron on Androgen-Dependent Reproductive Development in the Male Crl:CD(SD)BR Rat", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* . **167**(2), 87-99.

- Menzie, C.A. (2003). "Using Weight of Evidence Approaches for Sediment Management, *Chemical Stability Workshop*, Menzie-Cura & Associates, Inc.", San Diego.
- Miliadis, G.E., Siskos, P.A. and Vasilikiotis, G.S. (1987), "Persistence of linuron in soil of Marathon area as determined by a HPLC method", *An. Inst. Phytopathol.*, **15** 141-149.
- Morgan, E. (1991), *Chemometrics: Experimental Design*, Thames Polytechnic, Analytical Chemistry By Open Learning, Wiley J. & Sons Ltd, England.
- Nagel, S.C., Vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M. and Welshons, W.V. (1997), "Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol", *Environ. Health Perspect.*, **105**(1), 70-76.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P. and Tyler, C.R. (2004), "Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish ", *Environ. Health Perspect.*, **112**(17), 1725-1733.
- Ni, Y., Zhang, G. and Kokot, S. (2005), "Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks", *Food Chemistry*. **89** 465-473.
- Nordtest (2003), *Handbook for the calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*, Nordtest, Version 1.3
- Office of Environmental Health Hazard Assessment (2000), *Chemicals under consideration for possible listing via the authoritative bodies mechanism*, (OEHHA)
- Okamura, H. (2002), "Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and diuron released from a commercial antifouling paint", *Chemosphere*. **48** 43-50.

- Menzie, C.A. (2003). "Using Weight of Evidence Approaches for Sediment Management, *Chemical Stability Workshop*, Menzie-Cura & Associates, Inc.", San Diego.
- Miliadis, G.E., Siskos, P.A. and Vasilikiotis, G.S. (1987), "Pesistence of linuron in soil of Marathon area as determined by a HPLC method", *An. Inst. Phytopathol.*, **15** 141-149.
- Morgan, E. (1991), *Chemometrics: Experimental Design*, Thames Polytechnic, Analytical Chemistry By Open Learning, Wiley J. & Sons Ltd, England.
- Nagel, S.C., Vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M. and Welshons, W.V. (1997), "Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol", *Environ. Health Perspect.*, **105**(1), 70-76.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P. and Tyler, C.R. (2004), "Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish ", *Environ. Health Perspect.*, **112**(17), 1725-1733.
- Ni, Y., Zhang, G. and Kokot, S. (2005), "Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks", *Food Chemistry*. **89** 465-473.
- Nordtest (2003), *Handbook for the calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*, Nordtest, Version 1.3
- Office of Environmental Health Hazard Assessment (2000), *Chemicals under consideration for possible listing via the authoritative bodies mechanism*, (OEHHA)
- Okamura, H. (2002), "Photodegradation of the antifouling compounds Irgarol 1051 and diuron released from a commercial antifouling paint", *Chemosphere*. **48** 43-50.

- Okamura, H., Aoyama, I., Ono, Y. and Nishida, T. (2003), "Antifouling herbicide in the coastal waters of western Japan", *Mar. Poll. Bull.*, **47**(1-6), 59-67.
- Osano, O., Admiraal, W., Klammer, H.J.C., Pastor, D. and Bleeker, E.A.J. (2000), "Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidins and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*", *J. Environ. Pollut.*, **119** 195-202.
- Othmen, K. and Boule, P. (1999), "Photochemical behaviour of dichloroaniline in water and formation of aminochlorophenoxazones", *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, **121** 161-167.
- Papadakis, I. (2003), *Quality Assurance in Analytical Chemistry: Metrology, Chemistry and Traceability of Analytical Measurement Results*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Parkkonen, J., Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Berg, M., Olsson, P.E. and Forlin, L. (2000), "Contraceptive pill residues in sewage effluent are estrogenic to fish", *Marine Environmental Research*. **50** 191-199.
- Parris, G.E. (1980), "Covalent binding of aromatic amines to humates. 1. Reaction with carbonyls and quinones", *Environ. Sci. Technol.*, **14**(9), 1099-1106.
- Pastor, A., Vázquez, E., Ciscar, R. and De la Guardia, M. (1997), "Efficiency of microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments", *Chim. Acta*. **344** 241-249.
- Patlak, M. (1996), "Estrogens may link pesticides, breast cancer", *Environ.Sci.Technol.*, **30** 210A-211A.
- Patlak, M. (1996), "A testing deadline for endocrine disrupters", *Environ. Technol.*, **30** 540A-544A.

- Okamura, H., Aoyama, I., Ono, Y. and Nishida, T. (2003), "Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan", *Mar. Poll. Bull.*, **47**(1-6), 59-67.
- Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J.C., Pastor, D. and Bleeker, E.A.J. (2002), "Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*", *J. Environ. Pollut.*, **119** 195-202.
- Othmen, K. and Boule, P. (1999), "Photochemical behaviour of dichloroanilines in water and formation of aminochlorophenoxazones", *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **121** 161-167.
- Papadakis, I. (2003), *Quality Assurance in Analytical Chemistry: Metrology in Chemistry and Traceability of Analytical Measurement Results*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Parkkonen, J., Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E. and Forlin, L. (2000), "Contraceptive pill residues in sewage effluent are estrogenic to fish", *Marine Environmental Research*. **50** 191-199.
- Parris, G.E. (1980), "Covalent binding of aromatic amines to humates. 1. Reactions with carbonyls and quinones", *Environ. Sci. Technol.*, **14**(9), 1099-1106.
- Pastor, A., Vázquez, E., Ciscar, R. and De la Guardia, M. (1997), "Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments", *Anal. Chim. Acta*. **344** 241-249.
- Patlak, M. (1996), "Estrogens may link pesticides, breast cancer", *Environ.Sci.Technol.*, **30** 210A-211A.
- Patlak, M. (1996), "A testing deadline for endocrine disrupters", *Environ. Sci. Technol.*, **30** 540A-544A.

Pena, M.T., Casais, M.C., Mejuto, M.C. and Cela, R. (2007), "Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction", *J Chromatogr. A*. **1165**(1-2), 32-38.

Penalver, A., Garcia, V., Pocurull, E., Borrull, F. and Marce, R.M. (2003), "Stir bar sorptive extraction and large volume injection gas chromatography to determine a group of endocrine disrupters in water samples", *J Chromatogr. A*. **1007** 1-9.

Peterson, D.E., Regehr, D.L., Thompson, C.R. and Al-Khatib, K. (2001), *Herbicide Mode of Action*, Kansas State University, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service

Petit, V., Cabridenc, R., Swannell, R.P.J. and Sokhi, R.S. (1995), "Review of strategies for modelling the environmental fate of pesticides discharged into riverine systems", *Environment International*. **21** 167-176.

Petrovic, M., Eljarrat, E., Loèpez de Alda, M.J. and Barcelo, D. (2001), "Analysis and environmental levels of endocrine disrupting compounds in freshwater sediments", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **20** 637-648.

Pichon, V. (2000), "Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water", *J. Chromatogr. A*. **885**(1-2), 195-215.

Pichon, V., Cau Dit Coumes, C., Chen, L., Guenu, S. and Hennion, M.-C. (1996), "Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides", *J. Chromatogr. A*. **737** 25-33.

Polati, S., Roz, M., Angioi, S., Gianotti, V., Gosetti, F., Marengo, E., Rinaudo, C. and Gennaro, M.C. (2005), "Statistical evaluation of recovery of 3,4-dichloroaniline in soil as function of particle size and analyte concentration", *Talanta*. **68**(1), 93-98.

Poole, C.F. (2003), "New trends in solid-phase extraction", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **22** 362-373.

Poole, C.F., Gunatilleka, A.D. and Sethuraman, A. (2000), "Contributions of theory to method development in solid-phase extraction", *J Chromatogr. A*. **885** 17-39.

Puebla, C. (1994), "Industrial process control of chemical reactions using spectroscopic data and neural networks: A computer simulation study", *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **26**(1), 27-35.

Rhind, S.M. (2002), "Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, actions and routes of exposure", *Domestic Animal Endocrinology*. **23** 179-187.

Ridgway, K., Lalljie, S.P.D. and Smith, R.M. (2007), "Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods", *J Chromatogr. A*. **1153** 36-53.

Rios, A. and Valcarcel, M. (1998), "A view of uncertainty at the bench analytical level", *Accred. Qual Assur.*, **3**(1), 14-29.

Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Knoll, F.R.N. and Apon, B.M. (2004), "Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection", *J Chromatogr. A*. **1048**(2), 153-159.

Rock, B.A. (1997), *An Introduction to Chemometrics-Avoiding pitfalls*, (http://home.neo.rr.com/catbar/chemo/flnch_ap.htm)

Rozman, K.K. and Klassen, C.D. (1996), *Absorption, Distribution, and Excretion of Toxicants. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons.*, McGraw-Hill, New York.

- Ruberu, S.R., Draper, W.M. and Perera, S.K. (2000), "Multiresidue HPLC methods for phenyl urea herbicides in water", *J. Agric. Food Chem.*, **48** 4109-4115.
- Sadik, O.A. and Witt, D.M. (1999), "Monitoring Endocrine - Disrupting Chemicals", *Environ.Sci.Technol.*, **33** 368A-374A.
- Safe, S. and Krishnan, V. (1995), "Chlorinated hydrocarbons: estrogens and antiestrogens", *Toxicol. Lett.*, **82-83** 731-736.
- Salvestrini, S., Di Cerbo, P. and Capasso, S. (2002), "Kinetics of the chemical degradation of diuron", *Chemosphere*. **48** 69-73.
- Sanchez-Camazano, M., Sanchez-Martin, M.J. and Delgado-Pascual, R. (2000), "Adsorption and Mobility of Linuron in Soils As Influenced by Soil Properties, Organic Amendments, and Surfactants", *J. Agric. Food Chem.*, **48** 3018-3026.
- Scott, R.P.W. (1994), *Liquid chromatography for the analyst*, Chromatographic science, Marcel Dekker, INC (67)
- Semenza, J.C., Tolbert, P.E., Rubin, C.H., Guillete, L.J. and Jackson, R.J. (1997), "Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida", *Environ. Health Perspect.*, **105** 1030-1032.
- Simon, D., Helliwell, S. and Robards, K. (1998), "Analytical chemistry of chlorpyrifos and diuron in aquatic ecosystems", *Anal. Chim. Acta* **360**(1-3), 1-16.
- Sinclairand, C.J. and Boxall, A.A. (2003), "Assessing the Ecotoxicity of Pesticide Transformation Products", *Environ. Sci. Technol.*, **37** 4617-4625.
- Singh, P.B. and Canario, V.M. (2004), "Reproductive endocrine disruption in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*, in response to the pesticide γ -hexachlorocyclohexane", *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **58**(1), 77-83.

Slobodnik, J., Oztezkizan, O., Lingeman, H. and Brinkman, U.A.T. (1996), "Solid-phase extraction of polar pesticides from environmental water samples on graphitized carbon and Empore-activated carbon disks and on-line coupling to octadecyl-bonded silica analytical columns", *J Chromatogr. A.* **750** 227-238.

Smith, A.E. and Emmond, G.S. (1975), "Persistence of linuron in Saskatchewan soils". *Can. J. Soil Sci.*, **55** 145-148.

Smith, R. (2003), "Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques", *J Chromatogr. A.* **1000** 3-27.

Sommer, V., Tobias, P. and Kohl, D. (1993), "Methane and butane concentrations in a mixture with air determined by microcalorimetric sensors and neural networks", *Sens. Actuators B.* **12**(2), 147-152.

Soontornchat, S., Li, M.H., Cooke, P.S. and Hansen, L.G. (1994), "Toxicokinetic and Toxicodynamic Influences on Endocrine Disruption by Polychlorinated Biphenyls", *Environ. Health Perspect.*, **102** 568-571.

Sorensen, S.R., Bending, G.D., Jacobsen, C.R., Walker, A. and Aamand, J. (2003), "Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields", *FEMS Microbiology Ecology.* **45** 1-11.

Sosak-Swidarska, B., Tyrawska, D. and Maslikowska, B. (1998), "Microalgal ecotoxicity test with 3,4-dichloroaniline", *Chemosphere.* **37** 2975-2982.

Spack, L. (2002), *Introduction of the measurement uncertainty concept in Nestle laboratories*, NRC Nestle Research Center

Spanila, M., Pazourek, J., Farkova, M. and Havel, J. (2005), "Optimisation of solid-phase extraction using artificial neural networks in combination with experimental design for the determination of resveratrol by capillary zone electrophoresis in wines", *J. Chromatogr. A.* **1085** 180-185.

Sporring, S., Bowadt, S., Svensmark, B. and Bjorklund, E. (2005), "Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil", *J Chromatogr. A*. **1090**(1-2), 1-9.

Stalikas, C., Fiamegos, Y., Sakkas, V. and Albanis, T. (2009), "Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction", *J Chromatogr. A*. **1216**(2), 175-189.

Svozil, D., Kvasnicka, V.I. and Pospichal, J. (1997), "Introduction to multi-layer feed-forward neural networks", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **39** 43-62.

Taverniers, I., Bockstaele, E.V. and De Loose, M. (2004), "Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **23**(7).

Taverniers, I., De Loose, M. and Bockstaele, E.V. (2004), "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **23**(8), 535-552.

Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D. and Servos, M. (1999), "Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants -- I. Investigations in Germany, Canada and Brazil", *Sci. Total Environ.*, **225** 81-90.

Thomas, K.V., Fileman, T.W., Readman, J.W. and Waldock, M. (2001), "Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects", *Mar. Pollut. Bull.*, **42** 677-688.

Thompson, M., Ellison, S.L.R., Fajgelj, A., Willetts, P. and Wood, R. (1999), "Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement", *Pure & Appl. Chem.*, **71**(2), 337-348.

Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R. (2002), "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)", *Pure Appl. Chem.*, **74**(5), 835-855.

Thompson, M. and Wood, R. (1995), "Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories", *Pure & Appl. Chem.*, **67**(4), 49-56.

Tixier, C., Bogaerts, P., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Twagilimana, L., Cuer, A., Bohatier, J. and Veschambre, H. (2000), "Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites", *Pest Manage. Sci.*, **56** 455-462.

Trygg, J. and Wold, S. (2002), *Introduction to Statistical Experimental Design*, University of Queensland, Australia & Umeå University, Sweden, Homepage of Chemometrics (<http://www.acc.umu.se/~tnkjtg/Chemometrics/Editorial>)

Tsoutsi, C.S., Konstantinou, I.K. and Hela, D.G. (2008), "Organophosphorus pesticide residues in Greek virgin olive oil: levels, dietary intake and risk assessment", *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* **25**(10), 1225-1236.

USDA (2005), *National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18*, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service

Valentovic, M.A., Yahia, T., Ball, J.G., Hong, S.K., Brown, P.I. and Rankin, G.O. (1997), "3,4-Dichloroaniline acute toxicity in male Fischer 344 rats", *Toxicology*. **124** 125-134.

Valenzuela, A.I., Lorenzini, R., Redondo, M.J. and Font, G. (1999), "Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit", *J Chromatogr. A*, **839** 101-107.

Valverde-Garcia, A., Gonzalez-Pradas, E., Villafranca-Sanchez, R., Rey-Bueno, F. and Garcia-Rodriguez, A. (1989), "Adsorption of linuron and atrazine on Almeria soils", *Agrochimica*, **33** 389-396.

Van der Velde-Koerts, T. (2006), *IEDI calculations for the account of JMPR, FAO panel*, WHO/GMES Food, RIVM, Bilthoven, The Netherlands.

Van Hoof, F., Van Wiele, P., Acobas, F., Guinamant, J.-L., Bruchet, A., Schmitz, I., Bobeldijk, I., Sacher, F., Ventura, F. and Boleda, R. (2002), "Multiresidue determination of pesticides in drinking and related waters by solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection: Interlaboratory study", *J. AOAC Int.*, **85**(2), 375-383.

Vandecasteele, K., Gaus, I., Debreuck, W. and Walraevens, K. (2000), "Identification and quantitation of 77 pesticides in groundwater using solid phase coupled to liquid-liquid microextraction and reversed-phase chromatography", *Anal. Chim. Acta*, **72** 3093-3101.

Vander Heyden, Y., De Braekeleer, K., Zhu, Y., Roets, E., Hoogmartens, J., De Beer, J. and Massart, D.L. (1999), "Nested designs in ruggedness testing", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **20** 875-887.

Vercauteren, J., Peres, C., Devos, C., Sandra, P., Vanhaecke, F. and Moens, L. (2001), "Stir Bar Sorptive Extraction for the Determination of ppq-Level Traces of Organotin Compounds in Environmental Samples with Thermal Desorption Capillary Gas Chromatography-ICP Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*, **73** 1509-1514.

Vieth, M., Kolinski, A., Skolnick, J. and Sikorski, A. (1992), "Prediction of protein secondary structure by neural networks: encoding short and long range patterns of amino acid packing", *Acta Biochim. Pol.*, **39**(4), 369-392.

Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. (2002), "Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment", *Mar. Environ. Res.*, **53** 1-16.

Wade, M. (2003), *Human health and exposure to chemicals which disrupt estrogen, androgen and thyroid hormone*, Physiology Environmental and Occupational Toxicology Division, Environmental Health Directorate, Health Canada.

Wang, J., Leung, D. and Butterworth, F. (2005), "Determination of five macrolide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, **53** 1857-1865.

Wang, J., Leung, D. and Lenz, S. (2006), "Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, **54** 2873-2880.

Weber, E.J., Colon, D. and Baughman, G.L. (2001), "Sediment-associated reactions of aromatic amines. 1. Elucidation of sorption mechanisms", *Environ. Sci. Technol.*, **35** 2470-2475.

WHO (1987), *Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants*, GEMS/Food, World Health Organisation, Offset publication No 87 (E, S, F) Geneva.

WHO (2006), *Guidelines for Drinking-water Quality - Incorporating First Addendum to Third Edition - Volume 1: Recommendations* World Health Organization, Geneva.

Wikipedia (the free encyclopedia) *Chemometrics*,
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemometrics>)

Vieth, M., Kolinski, A., Skolnick, J. and Sikorski, A. (1992), "Prediction of protein secondary structure by neural networks: encoding short and long range patterns of amino acid packing", *Acta Biochim. Pol.*, **39**(4), 369-392.

Voulvoulis, N., Scrimshaw, M.D. and Lester, J.N. (2002), "Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment", *Mar. Environ. Res.*, **53** 1-16.

Wade, M. (2003), *Human health and exposure to chemicals which disrupt estrogen, androgen and thyroid hormone*, Physiology Environmental and Occupational Toxicology Division, Environmental Health Directorate, Health Canada.

Wang, J., Leung, D. and Butterworth, F. (2005), "Determination of five macrolide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, **53** 1857-1865.

Wang, J., Leung, D. and Lenz, S. (2006), "Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.*, **54** 2873-2880.

Weber, E.J., Colon, D. and Baughman, G.L. (2001), "Sediment-associated reactions of aromatic amines. 1. Elucidation of sorption mechanisms", *Environ. Sci. Technol.*, **35** 2470-2475.

WHO (1987), *Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants*, GEMS/Food, World Health Organisation, Offset publication No 87 (E, S, F) Geneva.

WHO (2006), *Guidelines for Drinking-water Quality - Incorporating First Addendum to Third Edition - Volume 1: Recommendations* World Health Organization, Geneva.

Wikipedia (the free encyclopedia) *Chemometrics*,
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemometrics>)

Wikipedia (the free encyclopedia) Ronald Fisher,
(http://en.wikipedia.org/wiki/Ronald_Fisher)

Willetts, P. and Wood, R. (1998), "Measurement uncertainty – a reliable concept in food analysis and for the use of recovery data? ", *Accred Qual Assur.* **3**(6), 231-236.

Wittke, K., Hajimiragha, H., Dunemann, L. and Begerow, J. (2001), "Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure", *J Chromatogr. B: Biomedical Sciences and Applications.* **755** 215-228.

Yrieix, C., Gonzalez, C., Deroux, J.M., Lacoste, C. and Leybros, J. (1996), "Countercurrent liquid/liquid extraction for analysis of organic water pollutants by GC/MS", *Water Research.* **30** 1791-1800.

Zanella, R., Primel, E.G., Goncalves, F.F., Kurz, M.H.S. and Mistura, C.M. (2003), "Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture waters", *J. Sep. Sci.*, **26** Short Communication.

Zepp, R.G. and Cline, D.M. (1977), "Rates of direct photolysis in the aquatic environment ", *Environ. Sci. Technol.*, **11** 359-364.

Zou, Q.-H., Liu, Y., Xie, M.-X., Han, J. and Zhang, L. (2005), "A rapid method for determination and confirmation of the thyreostats in milk and urine by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry", *Anal. Chim. Acta.* **551**(1-2), 184-191.

Αγατζίνη-Λεονάρδου, Σ. (1983), "Χρήση του παραγοντικού σχεδιασμού στον μεταλλουργικό πειραματισμό", *Μεταλλειολογικά-Μεταλλουργικά Χρονικά.* **54** 51-54.

Αλμπάνης, Τ. (1997), *Φυτοφάρμακα : Χρήσεις - Επιπτώσεις και νομοθεσία*, Ιωάννινα.

Βλαχάβας, Ι., Κεφαλάς, Π., Βασιλειάδης, Ν., Κόκκορας, Φ. and Σακελλαρίου, Η. *Τεχνητή Νοημοσύνη: Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks)*, Κεφάλαιο 19

Βουλγαρόπουλος, Α., Ζαχαριάδης, Γ.Α. and Στράτης, Ι.Α. (1999), *Εισαγωγή στην ποσοτική χημική ανάλυση : αρχές, χημειομετρία, μεθοδολογία, κατεργασίες* Εκδόσεις Ζήτη

Γιαννοπολίτης, Κ.Ν. and Πασπάτης, Ε.Α. (1985), *Οδηγός αντιμετώπισης ζιζανίων : Συστάσεις για την χρήση ζιζανιοκτόνων*, Αγροτύπος ΑΕ, Αθήνα.

Διαμαντάρας, Κ. *Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα*, Τμήμα Πληροφορικής, Τ.Ε.Ι. Θεσσαλονίκης

Επιβατιανός, Π. (1988), *Ιατροδικαστική και Τοξικολογία*, University Studio Press, Θεσ/νίκη.

Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (2006), *Ανακοίνωση της Επιτροπής προς το Συμβούλιο, το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, την Ευρωπαϊκή Οικονομική και Κοινωνική Επιτροπή και την Επιτροπή των Περιφερειών: Θεματική στρατηγική για την αειφόρο χρήση των φυτοφαρμάκων*,

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και Συμβούλιο Ευρωπαϊκής Ένωσης (2005), *Κανονισμός για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα ή πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου*, Νο 396

Λύκας, Α. (1999), *Υπολογιστική Νοημοσύνη*, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Πληροφορικής, Ιωάννινα.

Ντζούφρας, Ι. and Καρλής, Δ. (2001), *Στοιχεία Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Δεδομένων: σημειώσεις για το μάθημα Ανάλυση Δεδομένων Ι*, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Τμήμα Διοίκησης Επιχειρήσεων, Χίος.

Σπύρου, Σ. (1997), *Ανάπτυξη αλγόριθμων εξομοίωσης, ενδεικτική εφαρμογή OCR: Νευρωνικά δίκτυα ευθείας τροφοδότησης με ανάστροφη διάδοση σφάλματος*, Εισηγητής: Λεβέντης Σ. Κ., Τ.Ε.Ι. Πειραιά-PeLAB

Summary

Assessment of the analytical methods used for the determination of potential endocrine disruptors and their main metabolites in sediments, natural waters and several food commodities-Chemometrics application

Thesis

Vasiliki I. Boti

Phenylureas are an important group of herbicides utilized in weed control. Their prolonged use may lead to pollution of surface and ground waters as well as the main environmental sinks -sediments- by the herbicides themselves and their metabolites. Ultimately, they can be taken up in the food chain, contaminating fish, wildlife and humans. The European Commission has published a draft list of chemicals, including the phenylureas linuron and diuron, which are believed to damage health by interfering with the way hormones work. In addition, recently, a much anticipated draft list of compounds to screen for endocrine disruption was also released by the U.S. EPA. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) include ubiquitous environmental contaminants assumed to be able to cause adverse effects by interfering in some way with the body's hormones or chemical messengers and induce a broad spectrum of biochemical and toxic responses at low environmentally relevant dose on human health and wildlife. The range of substances reported to cause endocrine disruption is diverse including among others a variety of pesticides. The phenylurea herbicides linuron and diuron have been included in the EDCs lists and identified as potential and suspected endocrine disruptors, respectively.

The metabolic pathways involved in the degradation of the phenylurea herbicides exhibit great similarities. Consequently, some of the diuron and linuron degradation products may be common under specific conditions, the major ones being 1-(3,4-dichlorophenyl)-3-methylurea (DCPMU), 1-(3,4-dichlorophenyl) urea (DCPU)

and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA). Linuron is assumed to exhibit a potential antiandrogenic activity. The metabolite 3,4-DCA acts as competitive antagonist at the aryl receptor (AR) in mammals and there is evidence that it may also disturb the endocrine system in fish. For diuron and the metabolite DCPU, a study of relative binding affinity (RBA) confirms the ability of these compounds to interact with the androgen receptor, however, there are still insufficient experimental data available that would support endocrine disruption properties of these compounds. Nevertheless, an intrinsic endocrine potential may be expected taking into consideration the structural similarities between linuron and diuron and their common metabolite 3,4-DCA.

This globally increased concern towards endocrine disrupting chemicals induced a necessity to develop highly sensitive, specific and multiresidue analytical methods for the simultaneous determination of the parent compounds and their metabolites in environmental samples such as natural waters and sediments as well as the several food commodities consumed by humans.

Additionally, analytical results must be both reliable and comparable because they are often used as a piece of valuable information for a certain aim. One of the most important parameters in the validation of an analytical method is the assessment of trueness, which involves estimating its bias. Moreover, the uncertainty of bias of the analytical method should also be calculated to see whether the biases are statistically significant or not. Nested experimental designs can be used to evaluate the method's performance criteria involving proportional bias and measurement uncertainty (in terms of recovery), which is an essential part of quantitative results.

In the above-mentioned framework, this study was primarily focused on the validation, optimization and application of three different preconcentration methods for the simultaneous determination of the target EDCs and their common metabolites in various natural waters and sediments as well as several food commodities. Furthermore, special attention was given to the estimation of the measurement uncertainty arising from trueness of the three analytical methods used. Whenever possible, chemometric methods such as experimental designs –both fractional factorial

and fully nested- in combination with artificial neural networks were applied and/or compared to classical approaches. A high-performance liquid chromatography system coupled to UV-diode array detector (HPLC/UV-DAD) was used for the target analytes quantification.

Generally, the study comprises of three parts each one dealing respectively with the analysis of sediments, natural waters and selected food commodities. In the first part, the validation of an analytical method based on ultrasonic extraction of the target analytes from various freshwater sediments and the estimation of the method measurement uncertainty is presented. The analytical method was shown to be linear over the studied range of concentrations (5-100 $\mu\text{g/Kg}$), exhibiting satisfactory repeatability and reaching limits of detection usually in the 0.6-4.6 $\mu\text{g/Kg}$ range on dry sediment basis with the exception of the metabolite 3,4-DCA (1.9-63.3 $\mu\text{g/Kg}$). Relative standard deviations achieved were lower than 12% in all cases not including the lake sediment exhibiting RSDs ranging from 9.5 to 18%, probably due to its complex nature. A fully nested experimental design was applied to study the measurement uncertainty arising from trueness by estimating proportional bias (in terms of recovery). The recovery was estimated in three sediment matrices of different nature (sea, river and lake, $l = 3$). For each matrix, the analysis was carried out on three concentration levels ($p = 3$), that is, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/Kg}$ and samples in triplicates ($r = 3$). This resulted in 27 different analyses for each of the five target analytes. The overall recoveries, that is, those determined by the nested experiments were in the range of 59.5 to 85.1 %, except 3,4-DCA for which a low overall recovery of 29.0 % was observed. The measurement uncertainties of the overall recovery of the method were in the range of 0.000001 (3,4-DCA) to 0.000258 (DCPMU). Generally, in almost all cases, the matrices tested seem to cause a much larger variation in the measured recovery values than the different concentration levels of the target analytes.

In the second part, a solid phase extraction (SPE) preconcentration method for the simultaneous determination of the two EDCs and their metabolites present in natural waters was optimized and validated. Water was subjected to solid phase

extraction and the influence of several experimental variables affecting the extraction efficiency of the target analytes was studied in order to maximize extraction efficiency, including the sorbent material, elution solvents, pH and breakthrough volume, as well as some solution parameters that is, ionic strength and organic matter content. Results indicated that analytes enrichment from water samples was better accomplished by solid-phase extraction on a C₁₈ sorbent for polar analytes (Chromabond C18 Hydra cartridges, 1000 mg) from 500 ml of water sample using a mixture of dichloromethane:acetone (1:1) as the eluting system. It was additionally observed that extraction yields were increasing with the ionic strength until a given value was reached (3.5% NaCl) after which it was decreasing mainly in the cases of the metabolites DCPU and 3,4-DCA. Concerning the dissolved organic matter effect, recoveries of the most polar metabolites DCPU and DCPMU were slightly reduced in the presence of humic acid. However, humic acid concentration seemed to have a significant effect on extraction yields of linuron, diuron and 3,4-DCA for which an initial rapid decrease was observed.

A fully nested experimental design, adapted to the new experimental parameters, was used to study the measurement uncertainty arising from trueness by estimating proportional bias (in terms of recovery). The recovery was estimated in four different water matrices (distilled, sea, river and lake water, $l = 4$). For each matrix, the analysis was carried out on three concentration levels ($p = 3$), that is, 50, 100 and 200 ng/L and samples in triplicates ($r = 3$). This resulted in 36 different analyses for each of the five target analytes. The overall recoveries of the target analytes were in the range of 71.6 to 90.2 %, except 3,4-DCA for which a low overall recovery of 51.4 % was obtained. The analytical procedure was shown to be linear over the studied range of concentration (25 - 400 ng/L), exhibiting satisfactory repeatability and reaching limits of detection in the 1.3-11.2 ng/L range for all, quite different in nature, water types. Good RSD values were obtained in all cases ranging from 4.1 to 13.8%. The measurement uncertainties of the overall recovery of the method were in the range of 0.000041 (linuron) to 0.000087 (DCPMU). Generally, in almost all cases similarly to

the sediments case, the matrices tested, seem to cause a larger variation in the measured recovery values than the different concentration levels of the target analytes.

In the third part, matrix solid-phase dispersion (MSPD) as a sample preparation method for the determination of the two potential EDCs and their common metabolites in food commodities was developed. The influence of the main factors on the extraction process yield was thoroughly evaluated. In the performance of MSPD, the analytes recoveries and matrix cleanup depend on several parameters such as the solid support and the bound phase, the nature of the sample matrix, the sample to solid support ratio, the solvent elution sequence performed, as well as the use of matrix modifiers. The classical approach for an experiment involving factors is the one-factor-at-a-time experiment, but this method cannot solve the dependence of multi-variables. An alternative experimental arrangement would be a factorial experiment. In the cases of searching the maximum yield, the factorial will give a combination of variables near the maximum in contrast to the one-factor-at-a-time procedure. Multi-variable approach successfully overcomes the limitation of the classical method thus; the probability of global optimum finding is much higher. As the number of factors to be considered in a factorial experiment increases, the number of treatment combinations increases very rapidly. In such cases, a fractional factorial design can be used in order to minimize the experiments needed. For that purpose, a $3^{(4-1)}$ fractional factorial design in further combination with artificial neural networks (ANNs) was employed. In general, compared with classical statistical optimization techniques, such as response surface methodology, ANNs show superiority as a modelling technique for data sets showing nonlinear relationships and act as global approximators, and thus, for both data fitting and prediction abilities. The optimal networks found were afterwards used to identify the optimum regions generating optimum MSPD extraction conditions, on the basis of the highest average recovery as well as the lowest standard deviation simultaneously for all analytes.

Using the classical method optimization approach, the observed optimal extraction conditions included Florisil as the dispersion material, a ratio of sample to

dispersion material of 1:2 and 10 ml of a mixture of dichloromethane:methanol (1:1) as the eluting system. Instead, the multivariate approach indicated that the optimum conditions were Florisil as the dispersant in equal quantity (1:1) to the sample weight and 10 ml of methanol as the elution solvent. Under final optimal conditions as they were determined by the multivariable method, potato samples (0.5 g) were mixed and dispersed on the same amount of Florisil. The blend was transferred on a polypropylene cartridge and analytes were eluted using 10 ml of methanol. The extract was concentrated to 50 μ l of acetonitrile/water (50:50) and injected in a high performance liquid chromatography coupled to UV-diode array detector system (HPLC/UV-DAD). The analytical method was shown to be linear over the studied range of concentrations (0.05-1 mg/Kg), exhibiting satisfactory repeatability and reaching limits of detection usually in the 1.8-5.0 μ g/Kg range. Inter- and intra- day RSDs achieved varied between 5% to 14% and 4% to 12%, respectively, in all cases. Recoveries in potato samples ranging from 55 to 96% for all analytes were achieved.

A fully nested experimental design was applied to study the measurement uncertainty arising from trueness as well as to examine the usability of the optimized MSPD method for different food commodities. The recovery was estimated in three food commodities of different nature (wheat flours, potatoes and apples, $l = 3$). For each matrix, the analysis was carried out on three concentration levels ($p = 3$), that is, 0.05, 0.1 and 0.5 mg/Kg and samples in triplicates ($r = 3$). This resulted in 27 different analyses for each of the five target analytes. The overall recoveries, that is, those determined by the nested experiments were in the range of 79.7 to 94.3 %, except 3,4-DCA for which a lower overall recovery of 57.0 % was observed. The measurement uncertainties of the overall recovery of the method were in the range of 0.000325 (linuron) to 0.003405 (diuron). Surprisingly, in contrast to the sediments and waters results, the matrices tested seem to cause a negligible variation in the measured recovery values than the different concentration levels for all the target analytes with the exception of linuron for which the exact opposite behaviour was observed

(matrices caused larger variation in the measured recovery than the concentration levels).

The method was then validated using selected food commodities representative of the “market basket” including apples, carrots, wheat flours and orange juices demonstrating very good overall performance. Recoveries ranged between 62% to 96% in all cases except the metabolite 3,4-DCA (49%-57%) and exhibiting RSDs in the range of 5 to 15% as well as reaching detection limits down to 1.6 to 6.3 µg/Kg for all analytes.

In order to verify the real applicability of the proposed procedure and to assess the contamination extend, representative market baskets were sampled in 10 European countries in 3 sampling campaigns (Jan-Feb, Apr-May, Sept-Oct) as described by the GMES/Food Program (Global Environment Monitoring System, Food Contamination Monitoring and Assessment Program) at the World Health Organization (WHO). It was ensured for the samples to represent different geographical areas and preferred nutrition modes of their inhabitants. The overall results on EDCs residues of three food sampling campaigns regarding five food commodities (apples, potatoes, carrots, wheat flours and orange juices) in the ten European countries indicated that 64 % of the samples analysed, contained no detectable EDCs residues. Detectable residues at or below the MRLs were found in 35.3 % of the samples. 0.7% contained residues above the MRLs. Residues of linuron were found most often (17.3 % of all the samples), followed by DCPU (16%). Most frequent residues detection was observed in potatoes and apples (46.7 %), followed by carrots (40 %). 58.3% of the orange juice samples contained residues of both linuron and its metabolite 3,4-DCA. 60% of the samples originating from Spain contained traceable residues, followed by Netherland (53.3%) and Denmark (53.4%). In general, a significant proportion of the samples analysed contained EDCs residues but the levels of contamination were generally low.

Finally, a risk assessment originating from food consumption was attempted. To estimate the intake of a chemical present in food both chemical residue data and general/national food consumption data is needed. Both sets of data were then

combined using the deterministic approach to estimate the dietary intake of a particular food chemical (linuron as the most frequently detectable residue) comparing it to the established ADI (Acceptable Daily Intake) in order to determine the extent of the risks associated with dietary intake of such residues. Estimated daily intake (calculated as: occurrence $\mu\text{g Kg}^{-1}$ x consumption g day^{-1} / 60 Kg body weight) was low and ranged between 0.08 (5th percentile) and 0.85% (95th percentile or worst case) of ADI values. Despite the violations of MRLs, in no case linuron residues exceeded the ADIs. However, the latter refer to single substance intake whereas aliment contains a complex mixture of chemical residues. Therefore, these data do not allow the final judging on which impacts even low EDCs contaminations may have on the individual health of consumers. Furthermore, current safety regulation for consumer health protection does not consider endocrine effects.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

**Ταξινόμηση φυτοφαρμάκων από τους κυριότερους Ευρωπαϊκούς και
Διεθνείς Οργανισμούς Περιβάλλοντος ανάλογα με την δράση τους ως
ενδοκρινικοί διαταράκτες**

Χημική Ένωση	Ευρωπαϊκοί και Διεθνείς Οργανισμοί				
	UK.EA	Ger.EA	EU	OSPAR	WWF
Acephate			✓2		
Acetochlor		✓	✓1*		✓
Alachlor		✓	✓1*		✓
Aldicarb			✓2		
Aldrin	✓		✓2*		✓
Amitrol		✓	✓2*		
Atrazine	✓	✓	✓1*	✓	✓
Benomyl					✓
Beta-HCH			✓1	✓	✓
Bifenthrin			✓1		
Bioallethrin			✓2		
Bromoxynil			✓2		
Carbaryl			✓1		
Carbendazim			✓2*		
Carbofuran			✓2		✓
Chlordane		✓	✓1*	✓	✓
Chlordecone		✓	✓1*	✓	✓
Chlorfenvinphos			✓2		
Cyathrin			✓1		
Cyanazine			✓2		
Cypermethrin			✓2		
2,4-D			✓2*		
2,4-DB			✓1 ή 2		
DDT	✓	✓	✓1*	✓	✓
Delta HCH			✓2		
Deltamethrin			✓1		✓
Demeton-s-methyl ✓					
Dialifos			✓2*		
Diazinon			✓2*		
Dichlorvos	✓				
Dicofol			✓2*	✓	✓
Dieldrin	✓		✓2*	✓	✓
Dimethoate	✓		✓2*		✓
Diuron		✓	✓2*		

Endosulfan	✓		✓2*	✓	✓
Endrin	✓		✓2*		✓
Etridiazole			✓2		
Fenarimol			✓1		
Fentin acetate		✓	✓2*		
Fenitrothion			✓1		
Fenothrin			✓2		
Fenoxycarb			✓2		
Fenvalerate			✓2		
Fluavinate			✓2		
HCB		✓	✓1*	✓	✓
HCH			✓1		
Heptachlor			✓2*		
Ioxynil			✓1		
Iprodione			✓2*		
Lindane	✓	✓	✓1*	✓	✓
Linuron	✓	✓	✓1*		✓
Malathion			✓2*		
Mancozeb			✓1		
Maneb		✓	✓1*		✓
Metam sodium			✓1*		
Methomyl			✓2		
Methoxychlor			✓1	✓	✓
Methyl bromide			✓2*		
Metiram			✓1		✓
Metribuzin			✓1		
Mevinphos			✓2		
Mirex		✓	✓1*		✓
Nitrofen		✓	✓2*		
Orthochlordane			✓2*		
Parathion ethyl			✓2*		
Parathion methyl			✓2*		
Pentachlorophenol			✓1		
Permethrin	✓		✓2		✓
Phosphamidon			✓2		
Photomirex			✓2*		
Picloram			✓1		

Piperonyl butoxide			✓2		
Prochloraz			✓2*		
Procymidone			✓1		
Prometryn			✓2	✓	
Propanil			✓2*		
Resmethrin			✓1		
Simazine	✓		✓2*		✓
2,4,5-T			✓1 ή 2		
Tebutryn			✓1		
Thiram		✓	✓1*		
Toxaphene		✓	✓1*	✓	✓
Triadimefon			✓2*		
Triadimenol			✓2		
Tributyltin	✓	✓	✓1*	✓	✓
Trichlorfon			✓1 ή 2		
Trifluralin	✓		✓2		✓
Triphenyltin		✓	✓1*		
Vinclozolin		✓	✓1*	✓	✓
Zineb		✓	✓1*		✓
Ziram			✓2*		

✓ = έχουν ταυτοποιηθεί σύμφωνα με τους παρακάτω ορισμούς

UK EA

Ενδοκρινικοί Διαταράκτες στο περιβάλλον: Η στρατηγική της Εταιρίας Περιβάλλοντος (<http://www.environmentagency.gov.uk/commondata/acrobat/139909>)

German EA

Λίστα προτεραιότητας των EDCs. (κατηγορία 1), Ομοσπονδιακό Γερμανικό Πρακτορείο Περιβάλλοντος, 2001 (<http://www.umweltbundesamt.org/fpdf-l/2530.pdf>)

EU

Υλοποίηση του προγράμματος στρατηγικής της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες (COM(1999)706). Κατηγορία 1: υπάρχει τουλάχιστον μία μελέτη που να αποδεικνύει την ενδοκρινική διαταραχή σε έναν άθικτο οργανισμό (ανεπίσημη προσέγγιση). Κατηγορία 2: υπάρχει δυναμικό για ενδοκρινική διαταραχή. Δεδομένα *in vitro* υποδεικνύουν τη δυνατότητα για ενδοκρινική διαταραχή σε έναν άθικτο οργανισμό. Περιλαμβάνονται επίσης επιδράσεις *in vivo* που μπορεί ή όχι να προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές καθώς και δομικές αναλύσεις και μεταβολικές μελέτες. Commission Staff Working Document [Brussels, 28.10.2004 SEC(2004) 137 (http://europa.eu.int/comm/environment/endocrine/documents/sec_2004_1372_en.pdf).

* *Communications from the Commission to the Council and the European Parliament [Brussels, 14.06.2001 COM(2001) 262 final]* (http://europa.eu.int/eurlex/en/com/cnc/2001/com2001_0262en01.pdf)

OSPAR

Αναγνωρισμένα ως πιθανοί ενδοκρινικοί διαταράκτες από την Ένωση Όσλου και Παρισιού, *Endocrine disrupting pesticide*: Gwynne Lyons. *Pesticides News* 46, December 1999.

WWF

Η λίστα του Παγκόσμιου Ταμείου για τη Φύση (*World Wide Fund for Nature*) με φυτοφάρμακα που έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν φαινόμενα αναπαραγωγικής και ενδοκρινικής διαταραχής.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

**Οι κυριότερες εξισώσεις για τον υπολογισμό της προερχόμενης από την
ορθότητα (εκφρασμένης ως ανάκτηση) αβεβαιότητας μιας αναλυτικής
μεθόδου**

$$R = \overline{\overline{R_m}} + \Delta R_C + \Delta R_M \quad (\epsilon\xi. 1)$$

$$\overline{\overline{R_m}} = \frac{\sum_{i=1}^l \overline{\overline{R_i}}}{l} \quad (\epsilon\xi. 2)$$

$$u(R) = \sqrt{u(\overline{\overline{R_m}})^2 + u(\Delta R_C)^2 + u(\Delta R_M)^2} \quad (\epsilon\xi. 3)$$

$$u(\overline{\overline{R_m}}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l u(\overline{\overline{R_i}})^2}{l^2}} \quad (\epsilon\xi. 4)$$

$$u(\overline{\overline{R_i}}) = \frac{\sum_{j=1}^p (\overline{\overline{R_{ij}}} - \overline{\overline{R_i}})^2}{p(p-1)} \quad (\epsilon\xi. 5)$$

$$\frac{|\overline{\overline{R_m}} - 1|}{u(\overline{\overline{R_m}})} \leq t_{\alpha/2, \text{eff}} \quad (\epsilon\xi. 6)$$

Τα σύμβολα επεξηγούνται στα κεφάλαια 3.6.6.1 και 3.6.6.2.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

Πίνακες κρίσιμων τιμών για τις κατανομές *Student t* και *F*

Πίνακας 1.

Άνω κρίσιμες τιμές της κατανομής *Student t* με ν βαθμούς ελευθερίας

<i>Πιθανότητα υπέρβασης της κρίσιμης τιμής</i>						
ν	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.313
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.782
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.499
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.296
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.143
.						
.						
.						
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408
.						
.						
.						
100	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090

Πίνακας 2.

Άνω κρίσιμες τιμές της κατανομής F με ν βαθμούς ελευθερίας

ν	<i>Πιθανότητα υπέρβασης της κρίσιμης τιμής</i>					
	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001
1	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	318.313
2	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327
3	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215
4	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173
5	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893
6	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208
7	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.782
8	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.499
9	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.296
10	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.143
.						
.						
.						
26	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435
27	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421
28	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408
.						
.						
.						
100	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.174
∞	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΜΠΟΤΗ

Χημικός

Α. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνομα : Βασιλική
Επίθετο : Μπότη
Ημερομηνία γέννησης : 7 Απριλίου 1979
Τόπος γέννησης : Ιωάννινα
e-mail : yboti@cc.uoi.gr

Β. ΣΠΟΥΔΕΣ

1994-1997: Απολυτήριο Γενικού Λυκείου, 4^ο Λύκειο Ιωαννίνων (βαθμός Απολυτηρίου: *Άριστα 19 και 3/10*).

1997-2001: Πτυχίο Χημείας από το Χημικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (βαθμός Πτυχίου: *Λίαν καλώς 8,02*).

2001-2003: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (Master) στην «Χημική Τεχνολογία» στο Χημικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
Επιβλέπων: Καθηγητής Τρ. Αλμπάνης.

2003-σήμερα: Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Τομέας Βιομηχανικής Χημείας, Ερευνητικό Εργαστήριο Τεχνολογίας Ελέγχου και Προστασίας Περιβάλλοντος. Επιβλέπων: Καθηγητής Τρ. Αλμπάνης.

Γ. ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

1. Αγγλικά (Άριστα: *Certificate of Proficiency in English*, Michigan University).
2. Γαλλικά (Καλά: *Certificat de Langue Française*, Institut Français d'Athènes).

Ε. ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ – ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

1997 Υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) λόγω εισαγωγής στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε σειρά 1^η.

1997-1999 Υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για άριστη επίδοση στο 1^ο και 2^ο έτος σπουδών.

2001-2002 Υποτροφία στο 1^ο έτος των μεταπτυχιακών σπουδών λόγω εισαγωγής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Χημείας σε σειρά 3^η.

ΣΤ. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ι. Πρακτική άσκηση στα εργαστήρια του Ινστιτούτου Γάλακτος Ιωαννίνων (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε)
από 25-6-2001 έως 25-7-2001.

II. Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα με σύμβαση ανάθεσης έργου:

1. «Προσδιορισμός υπολειμμάτων βιοκτόνων στην υδροληψία του ποταμού Αλιάκμονα για τα διυλιστήρια στην πόλη της Θεσσαλονίκης» (No 1060), 1/11/2002-31/12/2002. (Επιστημονικός υπεύθυνος: Τρ. Α. Αλμπάνης).
2. «Μελέτη της Φωτοκαταλυτικής αποικοδόμησης επιλεγμένων φυτοφαρμάκων» (No 1210), 15/11/2001-15/11/2002. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τρ. Α. Αλμπάνης).
3. «Comparative research on endocrine disrupters, phylogenetic approach and common principles focusing on androgenic / antiandrogenic compounds» (no 1336), 1/10/2002-30/09/2003, 1/10/2003-31/07/2004 και 01/08/2004-30/09/2005. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τρ. Α. Αλμπάνης).
4. «Περιβάλλον-Πυθαγόρας.Υποέργο 6. Ανάπτυξη μεθοδολογίας ολοκληρωμένου ελέγχου και τεχνολογίας απορρύπανσης οργανικών τοξικών ουσιών, συστατικών αγροχημικών και φαρμακευτικών ουσιών στα φυσικά νερά και τα επεξεργασμένα λύματα» (No 1713), 01/04/2004-31/03/2005. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τρ. Α. Αλμπάνης).
5. «Περιβάλλον-Πυθαγόρας. Υποέργο 4. Ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογίας ελέγχου των επιπέδων οργανικών ρυπών σε βασικά προϊόντα της μεσογειακής διατροφής και των επιπτώσεων τους στον άνθρωπο» (No 1711), 01/04/2004-31/12/2004 και 01/01/2005-31/12/2005. (Επιστημονικός υπεύθυνος Δ. Χελά).
6. «Περιβάλλον-Πυθαγόρας II. Υποέργο 4. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την μελέτη της φωτοχημικής και φωτοκαταλυτικής αποικοδόμησης ρύπων με συνδυασμό φασματοσκοπικών και αναλυτικών τεχνικών» (No 1917), 01/04/2005-1/1/2006. (Επιστημονικός υπεύθυνος Ι. Δελληγιαννάκης).
7. «Ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών ολοκληρωμένου ελέγχου και προχωρημένων οξειδωτικών διεργασιών για την απομάκρυνση οργανικών τοξικών-ενδοκρινικών διαταρακτικών από τα φυσικά νερά» (No 1986), 05/12/2005-2/07/2006. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τ. Αλμπάνης).
8. «ΠΕΝΕΔ-2003: Ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών ολοκληρωμένου ελέγχου & προχωρημένων οξειδωτικών διεργασιών για την απομάκρυνση οργανικών τοξικών-ενδοκρινικών διαταρακτικών από τα φυσικά νερά» (No 1986), 05/12/2005-2/07/2006. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τρ. Α. Αλμπάνης).

III. Διδακτική εμπειρία

- | | |
|-----------|---|
| 2002-2006 | Επικουρικό διδακτικό έργο στα πλαίσια του εργαστηριακού μαθήματος «Φυσικές Διεργασίες της Χημικής Τεχνολογίας» 7 ^ο εξάμηνο, Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. |
| 2002-2006 | Επικουρικό διδακτικό έργο στα πλαίσια του εργαστηριακού μαθήματος «Χημικές Διεργασίες της Χημικής Τεχνολογίας» 8 ^ο εξάμηνο, Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. |

IV. Τομείς Ειδίκευσης

- Ανάπτυξη και εφαρμογή αναλυτικών μεθοδολογιών για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων (φυτοφάρμακα, ενώσεις που προκαλούν ενδοκρινική διαταραχή, φαρμακευτικά κ.τ.λ.) σε φυσικά νερά, εδάφη, τρόφιμα και βιολογικά δείγματα. Προσδιορισμός αβεβαιότητας

II. Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα με σύμβαση ανάθεσης έργου:

1. «Προσδιορισμός υπολειμμάτων βιοκτόνων στην υδροληψία του ποταμού Αλιάκμονα για τα διωλστήρια στην πόλη της Θεσσαλονίκης» (No 1060), 1/11/2002-31/12/2002. (Επιστημονικός υπεύθυνος: Τρ. Α. Αλμπάνης).
2. «Μελέτη της Φωτοκαταλυτικής αποικοδόμησης επιλεγμένων φυτοφαρμάκων» (No 1210), 15/11/2001-15/11/2002. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τρ. Α. Αλμπάνης).
3. «Comparative research on endocrine disrupters, phylogenetic approach and common principles focusing on androgenic / antiandrogenic compounds» (no 1336), 1/10/2002-30/09/2003, 1/10/2003-31/07/2004 και 01/08/2004-30/09/2005. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τρ. Α. Αλμπάνης).
4. «Περιβάλλον-Πυθαγόρας. Υπόεργο 6. Ανάπτυξη μεθοδολογίας ολοκληρωμένου ελέγχου και τεχνολογίας απορρύπανσης οργανικών τοξικών ουσιών, συστατικών αγροχημικών και φαρμακευτικών ουσιών στα φυσικά νερά και τα επεξεργασμένα λύματα» (No 1713), 01/04/2004-31/03/2005. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τρ. Α. Αλμπάνης).
5. «Περιβάλλον-Πυθαγόρας. Υπόεργο 4. Ανάπτυξη και εφαρμογή μεθοδολογίας ελέγχου των επιπέδων οργανικών ρυπών σε βασικά προϊόντα της μεσογειακής διατροφής και των επιπτώσεων τους στον άνθρωπο» (No 1711), 01/04/2004-31/12/2004 και 01/01/2005-31/12/2005. (Επιστημονικός υπεύθυνος Δ. Χελά).
6. «Περιβάλλον-Πυθαγόρας II. Υπόεργο 4. Ανάπτυξη μεθοδολογίας για την μελέτη της φωτοχημικής και φωτοκαταλυτικής αποικοδόμησης ρυπών με συνδυασμό φασματοσκοπικών και αναλυτικών τεχνικών» (No 1917), 01/04/2005-1/1/2006. (Επιστημονικός υπεύθυνος Ι. Δελληγιαννάκης).
7. «Ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών ολοκληρωμένου ελέγχου και προχωρημένων οξειδωτικών διεργασιών για την απομάκρυνση οργανικών τοξικών-ενδοκρινικών διαταρακτικών από τα φυσικά νερά» (No 1986), 05/12/2005-2/07/2006. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τ. Αλμπάνης).
8. «ΠΕΝΕΔ-2003: Ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών ολοκληρωμένου ελέγχου & προχωρημένων οξειδωτικών διεργασιών για την απομάκρυνση οργανικών τοξικών-ενδοκρινικών διαταρακτικών από τα φυσικά νερά» (No 1986), 05/12/2005-2/07/2006. (Επιστημονικός υπεύθυνος Τρ. Α. Αλμπάνης).

III. Διδακτική εμπειρία

- | | |
|-----------|---|
| 2002-2006 | Επικουρικό διδακτικό έργο στα πλαίσια του εργαστηριακού μαθήματος «Φυσικές Διεργασίες της Χημικής Τεχνολογίας» 7 ^ο εξάμηνο, Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. |
| 2002-2006 | Επικουρικό διδακτικό έργο στα πλαίσια του εργαστηριακού μαθήματος «Χημικές Διεργασίες της Χημικής Τεχνολογίας» 8 ^ο εξάμηνο, Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. |

IV. Τομείς Ειδίκευσης

- Ανάπτυξη και εφαρμογή αναλυτικών μεθοδολογιών για τον προσδιορισμό οργανικών ρυπών (φυτοφάρμακα, ενώσεις που προκαλούν ενδοκρινική διαταραχή, φαρμακευτικά κ.τ.λ.) σε φυσικά νερά, εδάφη, τρόφιμα και βιολογικά δείγματα. Προσδιορισμός αβεβαιότητας

αναλυτικών μεθόδων.

- Εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων (Τεχνητά νευρωνικά δίκτυα, Πειραματικοί σχεδιασμοί, Ανάλυση διακύμανσης)
- Χρήση αέριας (GC) και υγρής (HPLC) χρωματογραφίας για τον διαχωρισμό και ταυτοποίηση διάφορων τοξικών οργανικών ρυπαντών.
- Φυτικοχημική συμπεριφορά και τύχη οργανικών ρύπων στο περιβάλλον (κινητική, μηχανισμοί διάσπασης) - Έλεγχος τοξικότητας
- Τεχνολογία απορρύπανσης υπολειμμάτων οργανικών ρύπων σε υδατικά συστήματα (ομογενής και ετερογενής φωτοκατάλυση).

H. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

I. Διατριβές

1. Βασιλική Ι. Μπότη (2003):

«Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για τον έλεγχο των επιπέδων επιλεγμένων ζιζανιοκτόνων και των μεταβολιτών τους με ενδοκρινική διαταρακτική δράση σε φυσικά νερά και ιζήματα». Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

II. Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά (Μετά από κρίση).

1. V.I. Valsamaki, V.I. Boti, V.A. Sakkas and Triantafyllos A. Albanis, (2006) "Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion", *Analytica Chimica Acta*, **573-574**, 195-201.
2. J. Falandysz, I. Albanis, J. Bachmann, R. Bettinetti, I. Bochentin, V. Boti, S. Bristeau, B. Daehne, I. Dagnac, S. Galassi, R. Jeannot, J. Oehlmann, A. Orlikowska, V. Sakkas, V. Valsamaki, and U. Schulte-Oehlmann, (2006), "Some Chemical Contaminant of Surface Sediments at the Baltic Sea Coastal Region with Special Emphasis on Androgenic and Anti-Androgenic Compounds", *J. Environ. Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, **41** (10), 2127-2162.
3. V. Sakkas, V. Boti, V. Valsamaki and T. Albanis, (2006), "Food contamination by androgenic/antiandrogenic compounds in the European Union", *Credo, Cluster of research into endocrine disruption in Europe*, **6**, 3.
4. V. I. Boti, V. A. Sakkas, T. A. Albanis, (2007), "Measurement uncertainty arising from trueness of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples: Part I: Ultrasonic extraction from diverse sediment matrices", *Journal of Chromatography A*, **1146** (2), 139-147.
5. V.I. Boti, V. A. Sakkas, T. A. Albanis, (2007), "Measurement uncertainty arising from trueness of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples: Part II: Solid phase extraction from environmental natural waters", *Journal of Chromatography A*, **1146** (2), 148-156.
6. S. Galassi, R. Bettinetti, M.C. Neri, R. Jeannot, T. Dagnac, S. Bristeau, V. Sakkas, T. Albanis, V. Boti, T. Valsamaki, J. Falandysz, U. Schulte-Oehlmann, (2008), "A multispecies approach for monitoring persistent organic pollutants in the Gulf of Gdansk (Baltic Sea)", *Ecotox. Environ. Saf.*, **69** (1), 39-48.

7. P. Calza, V.A. Sakkas, A. Villioti, C. Massolino, V. Boti, E. Pelizzetti, T. Albanis (2008), "Multivariate experimental design for the photocatalytic degradation of imipramine. Determination of the reaction pathway and identification of intermediate products", *Applied Catalysis B: Environmental* 84 (3-4), 379-388.

8. V.I. Boti, V. A. Sakkas, T. A. Albanis, (2009), "An Experimental Design Approach Employing Artificial Neural Networks for the Determination of Potential Endocrine Disruptors in Food using Matrix Solid Phase Dispersion", *Journal of Chromatography A*, 1216 (9), 1296-1304.

III. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΠΛΗΡΗ ΠΡΑΚΤΙΚΑ

1. V.I. Boti, V.A. Sakkas and T.A. Albanis, "Determination of selected endocrine disrupting compounds and their metabolites in natural waters and freshwater sediments using high-performance liquid chromatography" 3rd *Conference on Instrumental Methods of Analysis (IMA 2003) Thessaloniki, Greece, 23-27 September*.

2. V.I. Boti, V.A Sakkas and T.A Albanis, 'Determination of selected endocrine disrupting compounds and degradation products in freshwater sediments'. *International Conference, Protection and Restoration of the Environment VII, Mykonos, Greece, June 28-July 1 2004 (ORAL)*

3. V.A. Sakkas, A.D. Dimou, V.I. Boti and T.A. Albanis, "Photodegradation study of the antifouling agent Diuron in aqueous media under simulated solar irradiation", *9th Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece, September 1-3 2005.(ORAL)*

4. V.I. Boti, V.A Sakkas and T.A Albanis, "Analysis and environmental levels of selected endocrine disrupting compounds and their metabolite in natural waters and freshwater sediments". 3rd *European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, Halkidiki, Greece, October 7-10 2004. (ORAL)*

5. V.I. Boti, V.A Sakkas and T.A Albanis, " Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples: Part II: Solid phase extraction from environmental natural waters", *10th International Conference on Environmental Science and Technology, Kos, Greece, September 5-7 2007*.

6. Α. Βλάχου, Β. Σακκάς, Β. Μπόττη και Τρ. Αλμπάνης, "Φωτοκαταλυτική αποικοδόμηση του flufenacet με χρήση H₂O₂ και υδατικών αιωρημάτων TiO₂", 3^ο *Περιβαλλοντικό Συνέδριο Μακεδονίας, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, Μάρτιος 14-17 2008*.

7. V.I. Boti, V.A Sakkas and T.A Albanis, "An Experimental Design Approach Employing Artificial Neural Networks for the Determination of Potential Endocrine Disruptors in Food using Matrix Solid Phase Dispersion". 5th *European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, Marseille, France, October 22-25 2008*.

IV. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ

1. V.I. Boti and T.A. Albanis "Determination of Endocrine Disrupting Compounds (linuron and diuron) in natural water samples using SPE and SPME methods", *5th Conference of the Chemistry Department on "Basic and Applied Chemical Research", University of Ioannina, 22-24 October 2002*.

2. V.I. Boti, V.A Sakkas, T.A Albanis, "Validation of matrix solid-phase dispersion for the determination of endocrine disrupting compounds and their metabolites in fruits, vegetables and juices", *SETAC-Europe 15th Annual meeting, Lille, France, May 22-26 2005*.

3. V. Boti, V. Sakkas, T. Albanis, "Validation of Matrix Solid-Phase Dispersion for the determination of endocrine disrupting compounds and their metabolites in fruits, vegetables and juices", 13th *International Symposium on environmental pollution and its impact on life in the Mediterranean region, Thessaloniki, Greece, October 8-12 2005*.

4. V. Boti, V. Sakkas, T. Albanis, "Matrix Solid-Phase Dispersion for the screening of endocrine disrupting compounds and their metabolites residues in fruits, vegetables and juices", 4th *European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment / 10th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Almeria, Spain, November 26-29 2006 (ORAL)*

5. T. Albanis, V. Sakkas, V. Boti, V. Valsamaki, "Analysis and concentration level of pesticides with endocrine disruptive activity (EDC) in European food diet", 4th *European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment/10th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Almeria, Spain, November 26-29 2006. (ORAL)*

6. V. Boti, V. Sakkas, T. Albanis, "Extraction of endocrine disrupting compounds and their metabolites from various food matrices using an optimized matrix solid-phase dispersion method", 3rd *International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, November 7-9, 2007*.

7. V. Boti, V. Sakkas, T. Albanis, "Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in sediment matrices", 3rd *Instrumental Methods of Analysis - Modern Trends and Applications, Patra, Greece, September 30- October 4, 2007*.

8. V. Boti, V. Sakkas, T. Albanis, "An experimental design approach employing artificial neural networks for the determination of potential endocrine disruptors in food using matrix solid phase dispersion", 11th *International Conference on Chemometrics for Analytical Chemistry, Montpellier, France June 30-July 4, 2008. (flash presentation)*

I. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΗΜΕΡΙΑΔΕΣ

- 1) «Γεωργικά προϊόντα -Διατροφή-Περιβάλλον», Συντονιστής Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Αγροχημεία -Βιολογικές καλλιέργειες» του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 3 Ιουνίου 2005.
- 2) «Περιβάλλον και Πράσινη Χημεία», Συντονιστές Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Περιφερειακό Τμήμα Ηπείρου -Κέρκυρας-Λευκάδας της Ένωσης Ελλήνων Χημικών, Κόνιτσα, 24 Σεπτεμβρίου 2005.

II. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- 1) «Νέα υλικά για βιώσιμη ανάπτυξη» (Το Σεμινάριο περιλάμβανε Θεωρητικό και Πρακτικό μέρος συνολικής διάρκειας 49 ωρών), Συντονιστής ΕΚΕΤΑ / ΙΤΧΗΔ-Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Καυσίμων και Υδρογονανθράκων, Ιωάννινα, 8-17 Δεκεμβρίου 2004.
- 2) «Basic Chemometrics» Course in Rome, Italy, September 27-29, 2008 (Eigenvector Research Incorporated).