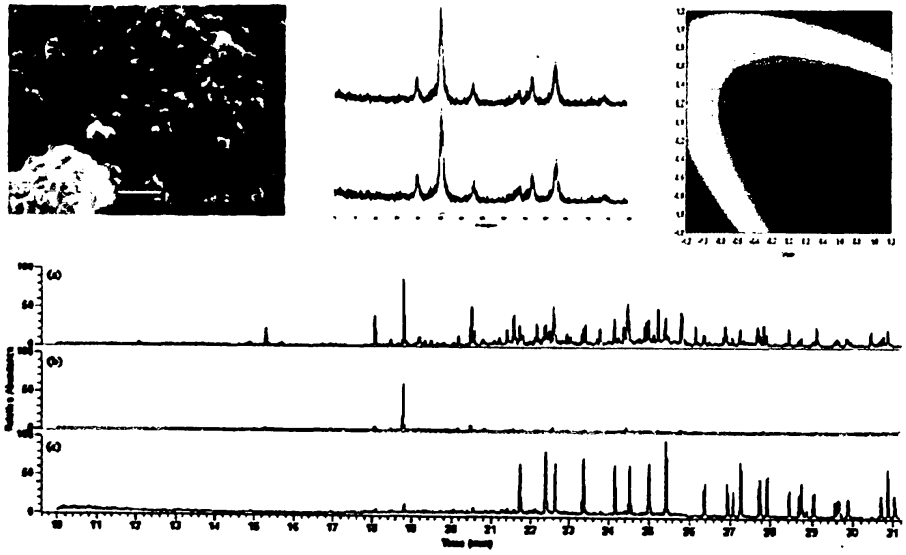
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός τροποποιημένων μαγνητικών νανοϋλικών για τον προσδιορισμό ενδοκρινικών διαταρακτών σε αγελαδινό γάλα, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας



Μαρία-Ευαγγελία Συναρίδου

Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

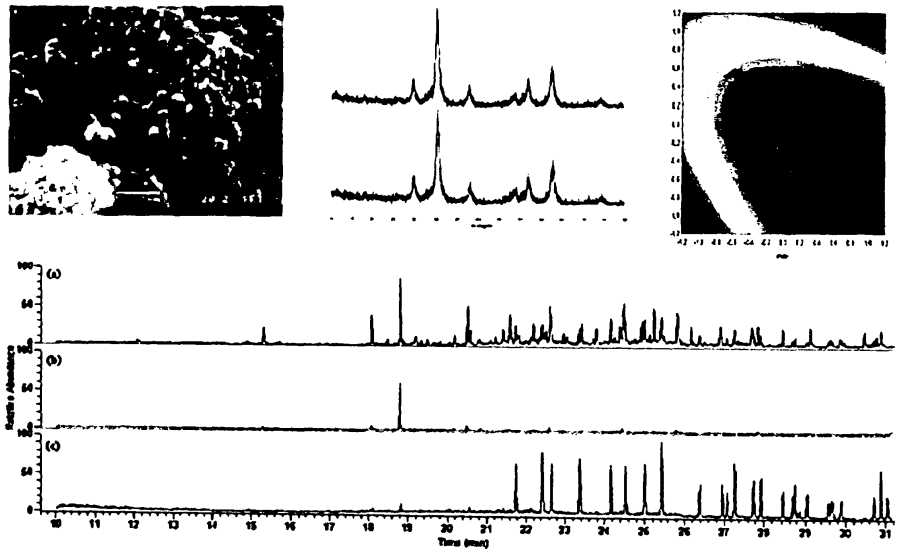
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύνθεση και χαρακτηρισμός τροποποιημένων μαγνητικών νανοϋλικών για τον προσδιορισμό ενδοκρινικών διαταρακτών σε αγελαδινό γάλα, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας



Μαρία-Ευαγγελία Συναρίδου

Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

Ημερομηνία **αίτησης** του κ. Σακκά 11-6-14

Ορισμός **Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 886/20-6-2014

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Σακκάς Βασίλειος

……

Ημερομηνία **ορισμού θέματος: 11-6-14**

Θέμα: «Σύνθεση και χαρακτηρισμός τροποποιημένων μαγνητικών νανοϋλικών για τον προσδιορισμό ενδοκρινικών διαταρακτών σε αγελαδινό γάλα, με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 886/20-6-2014

1. Καθηγητής Τριαντάφυλλος Αλμπάνης
2. Αναπληρωτής Καθηγητής Κωνσταντίνος Σταλίκας
3. Επίκουρος Καθηγητής Βασίλειος Σακκάς

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις **3-7-14**

Ο Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας | **Η Γραμματέας του Τμήματος**

Τσίκαρης Βασίλειος, Καθηγητής | **Ελένη Αδαμαντίου**

Περιεχόμενα

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 3ο
Οργανολογία- Χρωματογραφικός προσδιορισμός και αναλυτικά χαρακτηριστικά

Κεφάλαιο 4ο
Χαρακτηρισμός Μαγνητικών Νανοϋλικών- Ανάπτυξη Αναλυτικής Μεθοδολογίας

Θεωρητικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°

1.1 Ενδοκρινικοί Διαταράκτες (*Endocrine Disrupting Compounds, EDCs*)

1.1.1 Εισαγωγή

Η βιομηχανική εποχή έφερε χιλιάδες ανθρωπογενείς ουσίες που κατασκευάστηκαν για χάρη της βελτίωσης της ζωής μας. Έφερε εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα, καλλυντικά και πολλά ανεπιθύμητα παράγωγα της βιομηχανικής επεξεργασίας, όπως το χλώριο και τις διοξίνες. Δεν ήταν όμως από την αρχή γνωστές οι επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και στην υγεία των έμβιων όντων ούτε και στην υγεία του ανθρώπου. Κανένας δεν γνώριζε εξ' αρχής ότι οι ουσίες αυτές είχαν ένα κοινό γνώρισμα: μιμούνται τις ορμόνες και παρεμβαίνουν στο ορμονικό σύστημα των ανθρώπων αλλά και των ζώων, με αποτέλεσμα να προκαλούν το φαινόμενο της ενδοκρινικής διατάραξης, γι' αυτό και αποκαλούνται ενδοκρινικοί διαταράκτες (*Endocrine Disrupting Compounds, EDCs*). Το ενδοκρινικό είναι ένα από τα συστήματα του σώματος, το οποίο συντονίζει τα περισσότερα από τα λοιπά συστήματα και το οποίο φαίνεται να είναι 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 [1]. Ορισμένες από τις επιπτώσεις της παρουσίας αυτών των ενώσεων είναι η διαταραχή της γονιμότητας, νεοπλασίες, καρκίνοι αλλά το σπουδαιότερο είναι, η επίδρασή τους κατά τη διάρκεια της κύησης στο έμβρυο, οδηγώντας στη δημιουργία των λεγόμενων «συγγενών ανωμαλιών» που καταγράφουν απειλές για τη υγεία του εμβρύου, ακόμα και στην ενήλικη ζωή του.

Σύμφωνα με την Αμερικανική Εταιρεία Προστασίας Περιβάλλοντος (*U.S. Environmental Protection Agency - EPA*) ως ενδοκρινικός διαταράκτης

ορίζεται «ένας εξωγενής παράγοντας, ο οποίος επεμβαίνει στη σύνθεση, την έκκριση, το μεταβολισμό, τη δεσμευτική ικανότητα ή την απέκκριση των φυσικών ορμονών του σώματος, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ομοιόσταση, την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη» [2]. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (*European Commission*) έχει δημοσιεύσει μία λίστα χημικών ουσιών που είναι ύποπτες για βλάβες στην υγεία του ανθρώπου, παρεμβάλλοντας με κάποιο τρόπο στην λειτουργία των ορμονών [3-5].

1.1.2 Ενδοκρινικό σύστημα

Σε όλους τους σύνθετους πολυκύτταρους οργανισμούς υπάρχουν δύο συστήματα τα οποία ελέγχουν και συντονίζουν τις σωματικές διεργασίες: α) το νευρικό σύστημα, το οποίο ασκεί ταχύτατα έλεγχο από σημείο σε σημείο 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 [6].

Το ενδοκρινικό σύστημα είναι το σύστημα των οργάνων ενός οργανισμού που είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο μίας πληθώρας λειτουργιών του όπως είναι ο έλεγχος της αναπαραγωγής, του μεταβολισμού κλπ.. Είναι ένα σύνθετο σύστημα αδένων και αποτελείται από τον θυρεοειδή, τους παραθυρεοειδείς, το πάγκρεας, τις ωοθήκες, τους όρχεις, τα επινεφρίδια, την υπόφυση και τον υποθάλαμο. Οι αδένες αυτοί με τις ουσίες που εκκρίνουν, τις ορμόνες, ελέγχουν και συντονίζουν πολλές δραστηριότητες του οργανισμού. Γενικά το ενδοκρινές σύστημα παίζει κυρίαρχο ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού, δηλαδή στην διατήρηση της σταθερότητας του εσωτερικού περιβάλλοντος του οργανισμού. Ο έλεγχος των διαφόρων λειτουργιών πραγματοποιείται με έκκριση κατάλληλων ορμονών από ειδικά όργανα που λέγονται ενδοκρινείς αδένες. Οι κύριοι ενδοκρινείς αδένες του σώματος είναι η

υπόφυση, ο θυρεοειδής, ο παραθυρεοειδής, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια και οι γονάδες.

Για την έκκριση των ορμονών το ενδοκρινές σύστημα συνεργάζεται με το νευρικό σύστημα. Με την εμφάνιση κατάλληλου ερεθίσματος, το νευρικό σύστημα δίνει εντολή στο ενδοκρινές να εκκρίνει την κατάλληλη ορμόνη. Η απελευθέρωση των ορμονών μπορεί να είναι συνεχής, περιοδική ή κατά κύματα. 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 τις διεργασίες στους ιστούς μέσω 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 [6].

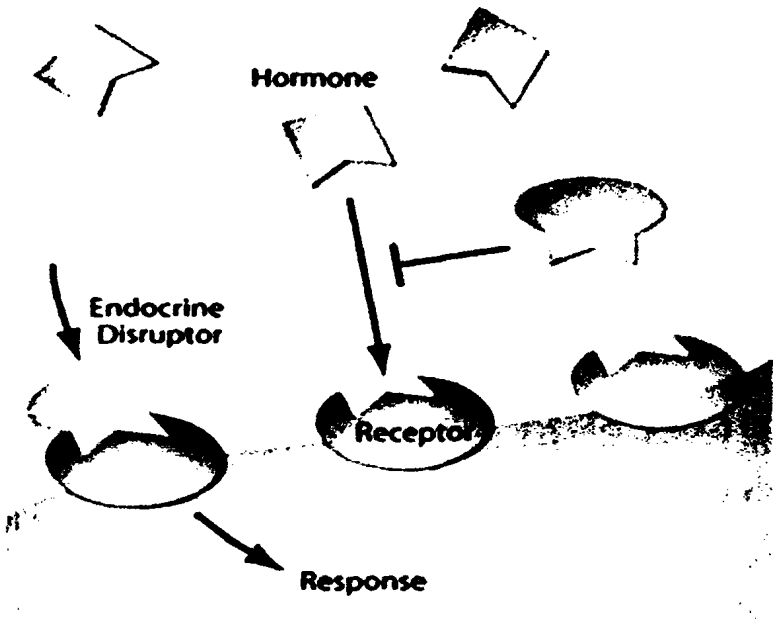
Τα EDCs μπορούν να επέμβουν σε κάθε ένα σημείο ξεχωριστά του μεταβολικού μονοπατιού των ορμονών. Μπορούν να επιδράσουν στην παραγωγή της ορμόνης, στη διαθεσιμότητα, στη δράση καθώς και στην αποβολή ή βιομετατροπή αυτής [7]. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους οι ενώσεις διαταράσσουν τα ενδοκρινικά συστήματα είναι πολύπλοκοι και δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί [6].

1.1.3 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 [6,8].

Α. Άμεσες αλληλεπιδράσεις

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τα EDCs που μπορούν να μιμηθούν τη βιολογική δραστικότητα των ορμονών και να προσδεθούν στον κυτταρικό υποδοχέα. Όπως προαναφέρθηκε, ένα μόριο ορμόνης εκκρίνεται από κάποιον αδένα, φτάνει μέσω του αίματος σε ένα κύτταρο και καταλαμβάνει έναν υποδοχέα. Η σχέση ορμόνης και υποδοχέα ακολουθεί την αρχή «κλειδιού-κλειδαριάς» (*Εικόνα 1.1*). 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.



Εικόνα 1.1 : *Σχέση κλειδιού- κλειδαριάς*

Έτσι, μπορούν να οδηγήσουν σε αποτελέσματα αντίστοιχα με αυτά της φυσιολογικής αντίδρασης του στην φυσική ορμόνη σε λάθος χρονική στιγμή ή σε υπερβολική έκταση (*Συνεργιστική επίδραση, Agonistic effect*). Η δραστικότητα ενός εξωτερικού «συναγωνιστή» εξαρτάται από το βαθμό συγγένειάς του με τον υποδοχέα καθώς και με την ικανότητά του να τον διεγείρει. Μια 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*). Τυπικά παραδείγματα ανταγωνιστών στους υποδοχείς των ορμονών είναι το ζιζανιοκτόνο linuron, η φαρμακευτική ουσία tamoxifen και ο μεταβολίτης του οργανοχλωριωμένου φυτοφαρμάκου DDT, p,p'-DDE που ανταγωνίζονται για το σημείο πρόσδεσης στους υποδοχείς ανδρογόνων και οιστρογόνων, αντίστοιχα [6, 9].

Β. Έμμεσες αλληλεπιδράσεις

Σ' αυτή την κατηγορία συγκαταλέγονται τα EDCs που μεταβάλλουν:

α) τη συγκέντρωση των φυσιολογικών ορμονών που υπάρχουν στο κυκλοφορικό σύστημα με πρόσδεση στις πρωτεΐνες μεταφοράς στο αίμα. Για παράδειγμα 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.

β) τη συγκέντρωση των ορμονικών υποδοχέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ένωση με αντι-οιστρογόνο δράση 2,3,7,8-τετραχλωρο-διβενζο-p-διοξίνη (*TCDD*) που αποτελεί εξωγενή «ανταγωνιστή» για τον άρυλυδρογονάνθρακα-υποδοχέα (*Ah*) [6].

1.1.4 Αποτελέσματα έκθεσης σε Ενδοκρινικούς διαταράκτες

Το πρόβλημα των ορμονικών διαταραχών ήταν εμφανές από την αρχή των δεκαετιών του 20ου αιώνα αλλά σχετικά πρόσφατα ήρθε στο προσκήνιο ως ένα σοβαρό θέμα για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Πολυάριθμες μελέτες στα θηλαστικά, πουλιά και ψάρια υποδεικνύουν πιθανές ορμονικές διαταραχές, η πλειονότητα των οποίων περιλαμβάνουν ανωμαλίες στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη. Οι ερευνητές αλλά και η κοινή γνώμη έστρεψαν την προσοχή τους στην δυσμενή δράση των ενδοκρινικών

διαταρακτών όταν έγινε ή σύνδεση μεταξύ του αντισυλληπτικού χαπιού (που περιέχει την συνθετική ορμόνη αιθινυλοοιστραδιόλη) και της τοξικής επίδρασης του στα ψάρια. Ήδη από τη δεκαετία του 1930 ήταν γνωστό ότι ορισμένες ανθρωπογενείς χημικές ουσίες που εκλύονταν στο περιβάλλον μπορούσαν να μιμηθούν τα οιστρογόνα. Κατά τη δεκαετία του 1970, παρατηρήθηκαν στις ΗΠΑ δυσλειτουργίες στο ενδοκρινικό σύστημα πτηνών οι οποίες αποδόθηκαν στην έκθεση σε χημικές ουσίες. Στις δεκαετίες του 1980 και του 1990, πραγματοποιήθηκε μια σειρά μελετών επί του θέματος που έδειξαν ότι η έκθεση σε περιβαλλοντικές χημικές ουσίες προκαλούσε διαταραχές στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη πολλών και διαφόρων ειδών άγριας πανίδας σε όλο τον κόσμο. Σε αυτά τα είδη ζώων περιλαμβάνονταν τα θαλάσσια μαλάκια (Ευρώπη), τα ψάρια (του γλυκού και του αλμυρού νερού, ΗΠΑ και Ηνωμένο Βασίλειο), οι βάτραχοι (ΗΠΑ), οι αλιγάτορες (ΗΠΑ) και τα θηλαστικά (ΗΠΑ και Ευρώπη). Τα περισσότερα από τα προσβεβλημένα είδη άγριας πανίδας ζούσαν σε υδρόβιο περιβάλλον ή είχαν στενή σχέση με αυτό.

Οι ενδείξεις για ενδοκρινική διαταρακτική δράση των χημικών ενώσεων στον άνθρωπο είναι πιο περιορισμένες. Κάποιες πιθανές επιπτώσεις που έχουν αναφερθεί είναι οι διαταραχές γονιμότητας, η παχυσαρκία, το σύνδρομο υπερκινητικότητας, νευρολογικές παθήσεις, πολλές μορφές καρκίνου καθώς επίσης και συγγενείς ανωμαλίες. Πρέπει να σημειωθεί ότι αρκετά συχνά μπορεί να μεσολαβεί ένα σημαντικό χρονικό διάστημα από την έκθεση μέχρι την εκδήλωση της διαταραχής. Αξιοσημείωτο επίσης είναι και το συμπέρασμα, που έχει προκύψει από παρατηρήσεις σε πειραματόζωα, ότι η έκθεση στις ως άνω ουσίες μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο το άτομο που εξετέθη, αλλά και τις επόμενες γενιές. Ιδιαίτερη κλινική σημασία εμφανίζει η έκθεση των εμβρύων και των νεογνών στους ενδοκρινικούς διαταράκτες, η οποία γίνεται μέσω του πλακούντα, στην περίπτωση των εμβρύων, και μέσω του θηλασμού, στην περίπτωση των νεογνών και των βρεφών.

Οι ενδοκρινείς διαταράκτες προκαλούν επιδράσεις ακόμα και όταν βρίσκονται σε απειροελάχιστες ποσότητες και ιδίως όταν κάποιος εκτίθεται σε

πολλούς ταυτόχρονα, όπως πχ μπορεί να συμβεί στο περιβάλλον του σπιτιού μας όταν χρησιμοποιούμε πολλά χημικά. Οι επιδράσεις αυξάνονται αν η έκθεση είναι συνεχής ή επαναλαμβανόμενη. Το πρόβλημα εντείνεται ακόμα περισσότερο γιατί με την έκθεση η επίδραση που προκαλείται δεν μπορεί άμεσα να διαπιστωθεί (π.χ. με δυσφορία, ζαλάδα κλπ) γιατί οι ενδοκρινείς διαταράκτες κυρίως αλλοιώνουν λειτουργίες του οργανισμού. Το αποτέλεσμα της επίδρασης λοιπόν διαπιστώνεται σταδιακά και πολύ αργότερα. Γι' αυτό η πρόληψη και μείωση της έκθεσης σ' αυτούς είναι απόλυτα αναγκαία. Τα κυριότερα παραδείγματα επίδρασης EDCs στον άνθρωπο δίνονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 *:Επιπτώσεις έκθεσης των ανθρώπων σε λογικές ποσότητες γνωστών χημικών ενώσεων που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές [6,10]*

	Μηχανισμός	**Αποτελέσματα**
DES	Ενεργοποίηση του υποδοχέα οιστρογόνων	Προγεννητική έκθεση προκαλεί καρκίνο της μήτρας, δυσπλασίες, υπογονιμότητα στη γυναίκα, χαμηλή παραγωγή σπέρματος.
Kepone	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 θυροειδούς, λευχαιμία. Έκθεση εμβρύων οδηγεί σε αποβολές και δυσλειτουργικούς τοκετούς.
Πολυχλωριωμένα διφαινύλια(PCBs), διβενζοφουράνια (DBF)	AhR, αύξηση του μεταβολισμού ορμονών του θυροειδούς και των φυλετικών στεροειδών	Έκθεση ανηλίκων προκαλεί μεταβολές στο θυροειδή 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.

1.1.5 Κατηγορίες Ενδοκρινικών Διαταρακτών

Ως ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορούν να δράσουν:

Α) Προϊόντα της χημικής βιομηχανίας, όπως:

1. Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (*polychlorinated bisphenyls, PCBs*), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μονωτικά υλικά.
2. Τα πολυβρωμιούχα διφαινύλια (*polybrominated bisphenyls, PBBs*), τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ως επιβραδυντικά ανάφλεξης σε ηλεκτρικές συσκευές και πλαστικά.
3. Οι διοξίνες
4. τα πλαστικά όπως η δισφαινόλη-Α (*bisphenol-A, BPA*), που χρησιμοποιούνται σε πλαστικά μπουκάλια νερού, κουτιά αναψυκτικών, φακούς επαφής, οικιακές συσκευές κ.α.
5. οι πλαστικοποιητές, όπως οι φθαλικές ενώσεις, που χρησιμοποιούνται σε παιδικά παιχνίδια, παιδικές πάνες, συσκευασίες τροφίμων, προϊόντα περιποίησης κ.α.
6. τα φυτοφάρμακα, όπως το DDT και toDDE
7. ορισμένα φάρμακα, όπως η diethylstilbestrol (*DES*)

Β) Διάφορες φυσικές ενώσεις, όπως:

1. τα φυτοοιστρογόνα, όπως η σόγια και οι ξηροί καρποί
2. τα βαρέα μέταλλα, όπως ο μόλυβδος και ο υδράργυρος

1.1.6 Έκθεση των ανθρώπων σε Ενδοκρινικούς Διαταράκτες-Περιβαλλοντική σημασία Ενδοκρινικών Διαταρακτών

Οι άνθρωποι μπορεί να εκτεθούν σε ενδοκρινικοί διαταράκτες μέσω των τροφίμων και των αναψυκτικών που καταναλώνουν, μέσω φαρμάκων που λαμβάνουν, καθώς επίσης και μέσω των φυτοφάρμακων που εφαρμόζονται στις καλλιέργειες και των προϊόντων προσωπικής φροντίδας που

χρησιμοποιούν. Έτσι, η έκθεση μπορεί να είναι μέσω της διατροφής, του αέρας, του νερού και της δερματικής επαφής.

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες έχουν μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής και δεν μεταβολίζονται εύκολα. Μερικοί ενδοκρινικοί διαταράκτες, όπως το DDT, οι διοξίνες και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (*PCBs*), που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί γεγονός που τους καθιστά δυνητικά επικίνδυνους ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται για παρατεταμένη χρονική περίοδο.

1.2 Φυτοφάρμακα

Ο άνθρωπος από τη στιγμή που εμφανίστηκε στον κόσμο και μέχρι σήμερα είναι στενά δεμένος με τη γη, τη «μητέρα γη» όπως την ονόμαζε παλαιότερα. Τα πρώτα χρόνια της ύπαρξής του ο άνθρωπος έπαιρνε όλα τα αγαθά που χρειάζονταν, τρόφιμα ή άλλα, όπως τα έβρισκε χωρίς να μπορεί να επεμβαίνει σ' αυτά. Όμως, τα τελευταία χρόνια, με την αύξηση του πληθυσμού και την ανάπτυξη της τεχνολογίας, ο άνθρωπος άρχισε να επεμβαίνει αλόγιστα στο φυσικό περιβάλλον με σκοπό να παράγει περισσότερα αγαθά και με λιγότερο κόπο, έτσι ώστε όχι μόνο να ζει πιο άνετα, αλλά να μπορεί να μεγαλώσει το κέρδος του, χωρίς να σκέφτεται τις συνέπειες και τις βλάβες που μπορεί να προκαλέσει στο περιβάλλον το οποίο κινείται, αλλά και την ίδια του την υγεία.

Έτσι σήμερα η καλλιέργεια της γης γίνεται με σύγχρονα μέσα, με τη βοήθεια της επιστήμης και με τη χρήση διαφόρων μέσων. Μερικά απ' αυτά είναι η εντατικοποίηση των καλλιεργειών, η μονοκαλλιέργεια, η υπερβολική άντληση των υπόγειων νερών, η χρήση λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων κ.ά.

Με τον όρο «φυτοφάρμακο» εννοούμε κάθε ουσία ή μίγματα ουσιών οι οποίες έχουν στόχο την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου ή επιβλαβούς φυτού. Σύμφωνα με τη νομοθεσία των ΗΠΑ, ως φυτοφάρμακα θεωρούνται επίσης ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο των φυτών, για αποφυλλίωση και για ξήρανση [2, 11].

Τα φυτοφάρμακα έχουν μια ιστορία τουλάχιστον 4500 ετών, με τις πρώτες μαρτυρίες να προέρχονται από τη Μεσοποταμία και την Ινδία. Η χρήση βαρέων και τοξικών μετάλλων ως προστασία για τις καλλιέργειες ήταν ήδη διαδεδομένη από το 15° μ.Χ. αιώνα (*αρσενικός, υδράργυρος, μόλυβδος*), ενώ το τέλος του 2ου παγκοσμίου πολέμου, σήμανε μια ραγδαία αύξηση του πληθυσμού των ανεπτυγμένων βιομηχανικά χωρών και μία τεράστια ανάγκη για μεγάλες σοδειές, έτσι ώστε οι δεκαετίες 1940 και 1950 να θεωρούνται η απαρχή των συνθετικών φυτοφαρμάκων. Μέχρι το 1950, φυτοφάρμακα με βάση το αρσενικό και τα οργανοχλωριωμένα όπως το DDT είχαν ήδη εισαχθεί με τεράστια επιτυχία στην απομάκρυνση παρασιτικών μικροοργανισμών από τις καλλιέργειες. Ζιζανιοκτόνα με βάση το άζωτο και τα καρβοξυλικά οξέα όπως οι τριαζίνες και το 2,4-υδροξυοξικό οξύ έκαναν την εμφάνισή τους το 1960.

Σήμερα, η χρήση φυτοφαρμάκων έχει αυξηθεί στο πενηνταπλάσιο αριθμό σε σχέση με τη δεκαετία του 1950, με πάνω από 2,5 εκατομμύρια τόνους να χρησιμοποιούνται πλέον ετησίως για την παραγωγή καλλιεργειών και το 75% αυτών να χρησιμοποιείται από τις ανεπτυγμένες χώρες. Το 2001, η EPA σταμάτησε την υποβολή εκθέσεων για την χρήση των φυτοφαρμάκων. Το 1960 βρέθηκε ότι το DDT προκαλούσε προβλήματα στην αναπαραγωγή των πτηνών που τρέφονται με ψάρια, προκαλώντας σοβαρή διαταραχή στην τροφική αλυσίδα. Έκτοτε, πολλά φυτοφάρμακα κατηγορήθηκαν για επικίνδυνες ασθένειες όπως ο καρκίνος, η νόσος Πάρκινσον, η αρθρίτιδα και πληθώρα άλλων. Αν και η χρήση του DDT έχει απαγορευθεί βάση της Σύμβαση της Στοκχόλμης, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες ως εντομοκτόνο για προστασία από την ελονοσία.

1.2.1 Κατηγορίες φυτοφαρμάκων

Τα φυτοφάρμακα μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση διάφορα κριτήρια όπως την χρήση τους και την χημική τους δομή (δραστική ουσία) (Πίνακας 1.2) [12].

Πίνακας 1.2: Ταξινόμηση φυτοφαρμάκων

Ταξινόμηση φυτοφαρμάκων	
Ανάλογα με τη χρήση	Εντομοκτόνα Ζιζανιοκτόνα Τρωκτικοκτόνα Μυκητοκτόνα
Ανάλογα με την χημική δομή	Οργανοχλωριωμένα Οργανοφωσφορικά Πυρεθρίνες Καρβαμιδικά Αζωτούχα Τριαζίνες, τριαζόλες κ.α.

Ανάλογα με την χρήση:

- *Εντομοκτόνα:* Είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση εντόμων, τα οποία είναι επιβλαβή για φυτά και ζώα. Ανάλογα με τη χημική τους σύνθεση κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες, όπως οι καρβαμιδικοί εστέρες, οι νιτροφαινόλες, οι οργανοφωσφορικοί εστέρες και οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες.
- *Ζιζανιοκτόνα:* Είναι χημικές ουσίες που μπορούν να διαταράξουν τη φυσιολογία ενός φυτού, με αποτέλεσμα την καταστροφή του. Διακρίνονται σε ζιζανιοκτόνα επαφής, με οξεία δράση στα τμήματα των φυτών που ψεκάζονται, σε διασυστημικά ζιζανιοκτόνα, τα οποία σε μικρό χρονικό διάστημα διαφοροποιούν την ανάπτυξη και τις λειτουργίες του φυτού και σε απολυμαντικά εδάφους, που αναστέλλουν την ανάπτυξη των φυτών στο έδαφος.
- *Τρωκτικοκτόνα:* Χρησιμοποιούνται για την εξόντωση των ποντικών και των αρουραίων.
- *Μυκητοκτόνα:* Είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη θανάτωση ή την αναστολή της ανάπτυξης των σπόρων ή των μυκήτων.

Ανάλογα με την χημική δομή:

- *Οργανοφωσφορικές ενώσεις:* Τα διάφορα είδη οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται στη γεωργία διαφέρουν πολύ ως προς

την τοξικότητα και συνεπώς και ως προς την επικινδυνότητά τους. Δε συσσωρεύονται στο λίπος του σώματος και επίσης δεν αφήνουν μόνιμα κατάλοιπα στο περιβάλλον. Συνήθως σκοτώνουν τα έντομα με επαφή. Ορισμένα απ' αυτά έχουν την ικανότητα να περνούν στο εσωτερικό των φρούτων και να σκοτώνουν τα έντομα που βρίσκονται εκεί.

- *Οργανοχλωριωμένες ενώσεις:* Οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες που χρησιμοποιούνται στη γεωργία, όπως για παράδειγμα το endosulfan, δεν είναι ιδιαίτερα επικίνδυνοι για τις μέλισσες γιατί η τοξικότητά τους είναι πολύ μικρή. Η κατηγορία αύτη των φυτοφαρμάκων θα αναπτυχθεί παρακάτω πιο διεξοδικά.
- *Καρβαμιδικά:* Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες δεν αφήνουν μόνιμα κατάλοιπα στο περιβάλλον και δεν συσσωρεύονται στο λίπος του σώματος. Η τοξικότητά τους ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό.

Πυρεθροειδή: Τα πυρεθροειδή, αν και είναι πολύ αποτελεσματικά εντομοκτόνα, είναι τοξικά για τον άνθρωπο και μπορεί να γίνουν πολύ επικίνδυνα αν χρησιμοποιηθούν χωρίς να έχουν ληφθεί οι κατάλληλες προφυλάξεις κατά την εφαρμογή τους. Αν και σε εργαστηριακές δοκιμές που έχουν γίνει, έχουν αποδειχτεί εξαιρετικά τοξικά για τις μέλισσες, στο φυσικό περιβάλλον η τοξικότητά τους είναι χαμηλή λόγω του ότι έχουν τη τάση να απωθούν τις μέλισσες.

1.2.2 Τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον

Οι συνέπειες της επέμβασης του ανθρώπου στη γη ήταν πολύ λιγότερες τα προηγούμενα χρόνια, σήμερα όμως τις ζούμε καθημερινά και όλο σε μεγαλύτερο βαθμό. Μεγάλο είναι το μερίδιο σ' αυτές τις συνέπειες της χρήσης των φυτοφαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία. Η ατμόσφαιρα ρυπαίνεται, το νερό μολύνεται, το έδαφος καταστρέφεται, η χλωρίδα και η πανίδα εξαφανίζονται. Αλλά και η ίδια μας η υγεία κινδυνεύει. Τα τρόφιμα που παράγει τώρα η γη δεν είναι τόσο υγιεινά, αφού οι βλαβερές ουσίες που περιέχουν τα

φυτοφάρμακα εισχωρούν σ' αυτά και σιγά σιγά βλάπτουν τον οργανισμό του ανθρώπου.

Οι κυριότερες πηγές ρύπανσης του περιβάλλοντος από παρασιτοκτόνα, είναι οι ψεκασμοί γεωργικών περιοχών από το έδαφος ή από αεροπλάνα. Οι ενώσεις αυτές προσροφώνται ισχυρά τόσο στο έδαφος όσο και στα αιωρούμενα σωματίδια της ατμόσφαιρας. Με τις βροχές, ένα μέρος από τα παρασιτοκτόνα που βρίσκονται στο έδαφος ή στα αιωρούμενα σωματίδια της ατμόσφαιρας μεταφέρονται στα φυσικά νερά. Η μεταφορά αυτή είναι μεγαλύτερη την άνοιξη (*Ιανουάριος-Απρίλιος*), γεγονός που οφείλεται στο λιώσιμο των πάγων, τις ισχυρές βροχοπτώσεις και τη μικρή κάλυψη του εδάφους. Όλες αυτές οι ενώσεις είναι ελάχιστα διαλυτές στο νερό και μάλιστα η διαλυτότητά τους ελαττώνεται με την αύξηση της αλατότητας των νερών.

Τα παρασιτοκτόνα, κυρίως τα χλωριωμένα, στα φυσικά νερά είναι ανθεκτικά σε υδρόλυση και οξείδωση. Αντίθετα, προσροφώνται στα ιζήματα των πυθμένων, όπου υφίστανται μικροβιακή επίδραση και μετατρέπονται σε διάφορους μεταβολίτες. Η ταχύτητα αυτής της βιοαποικοδόμησης είναι πάρα πολύ μικρή με αποτέλεσμα τα ιζήματα να λειτουργούν ως μέσα αποθήκευσης αυτών των ενώσεων [13]. Στην εικόνα 1.2, απεικονίζονται οι διεργασίες που επηρεάζουν την τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον.

Εικόνα 1.2: *Απεικόνιση των διεργασιών που επηρεάζουν την τύχη των φυτοφαρμάκων [14, 15]*

1.2.2.1 Διεργασίες μεταφοράς

➢ Προσρόφηση

Η προσρόφηση είναι η φυσικοχημική διεργασία όπου τα μόρια ή τα ιόντα μιας χημικής ένωσης, στην προκειμένη περίπτωση του φυτοφαρμάκου, έλκονται και συγκρατούνται από στερεά σωματίδια (*έδαφος*).

➢ Εξάτμιση

Η εξάτμιση είναι η φυσική διεργασία μετάβασης από τη στερεά ή υγρή φάση στην αέρια. Με αυτόν τον τρόπο τα φυτοφάρμακα μπορούν να μετατοπιστούν σε μεγάλη απόσταση από την περιοχή αρχικής εφαρμογής τους.

➢ Μεταφορά μέσω ψεκασμού

Η μεταφορά μέσω ψεκασμού είναι η εναέρια κυκλοφορία των σταγονιδίων του φυτοφαρμάκου μακριά από την επιθυμητή περιοχή εφαρμογής τους.

➢ Απορροή

Η απορροή είναι η μεταφορά των φυτοφαρμάκων υπό την επίδραση του νερού κατά μήκος μιας κεκλιμένης επιφάνειας.

➢ Έκπλυση

Η έκπλυση είναι η μεταφορά των φυτοφαρμάκων υπό την επίδραση του νερού προς τα βαθύτερα στρώματα του εδάφους.

➢ Απορρόφηση

Η απορρόφηση είναι η πρόσληψη των φυτοφαρμάκων και άλλων χημικών ενώσεων σε φυτά και μικροοργανισμούς.

➢ Απομάκρυνση με καλλιέργεια

Η απομάκρυνση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με καλλιέργεια πραγματοποιείται μέσω της συγκομιδής ή της βόσκησης [14].

1.2.2.2 Διεργασίες αποικοδόμησης ή διάσπασης

➢ Μικροβιακή αποικοδόμηση

Η μικροβιακή αποικοδόμηση είναι η διάσπαση των χημικών ουσιών που οφείλεται σε μικροοργανισμούς.

➢ Χημική αποικοδόμηση

Η χημική αποικοδόμηση είναι η διάσπαση των φυτοφαρμάκων από χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο έδαφος.

➢ Φωτοδιάσπαση

Η φωτοδιάσπαση είναι η αποικοδόμηση των φυτοφαρμάκων από το ηλιακό φως. Όλα τα φυτοφάρμακα εμφανίζουν το φαινόμενο της φωτοδιάσπασης σε κάποιο βαθμό, άλλα σε μεγάλο και άλλα σε ελάχιστο ποσοστό [14-16].

1.2.3 Οργανοχλωριωμένες ενώσεις

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις αποτελούν την πιο σημαντική ομάδα παρασιτοκτόνων και είναι συνθετικά παρασκευαζόμενες οργανικές χημικές ενώσεις, με κυκλική δομή στην οποία άτομα υδρογόνου έχουν αντικατασταθεί με χλώριο. Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις όπως τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (*PCBs*) αποτελούν σημαντικούς ρύπους του περιβάλλοντος και είναι ύποπτες για ενδοκρινική διαταρακτική δράση. Οι κυριότερες ιδιότητες των ενώσεων αυτών είναι οι εξής:

- μικρή διαλυτότητα στο νερό
- μεγάλη διαλυτότητα στο λιπώδη ιστό των οργανισμών
- δεν αποικοδομούνται ή αποικοδομούνται με πολύ αργούς ρυθμούς (*ημιπερίοδος ζωής από 9 - 116 έτη*)
- αθροίζονται στην τροφική αλυσίδα
- είναι ιδιαίτερα τοξικές για τους διάφορους οργανισμούς.

Αναλυτικότερα, η χρήση τους δημιουργεί μεγάλα περιβαλλοντικά προβλήματα όπως τη ρύπανση της ατμόσφαιρας, του εδάφους και των νερών, αλλοίωση της χλωρίδας και της πανίδας. Επιπλέον, οι ενώσεις αυτές

βιοσυσσωρεύονται στους λιπαρούς ιστούς των ζωικών οργανισμών και μέσω της τροφικής αλυσίδας φτάνουν στον άνθρωπο [17- 23].

1.2.4 Οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (*OCPs*)

Τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα ήταν τα πρώτα επιτυχημένα εντομοκτόνα που συνέβαλαν αποφασιστικά στην καταπολέμηση παρασίτων που είχαν σοβαρές επιπτώσεις νοσηρότητας και θνησιμότητας στον άνθρωπο. Η ανακάλυψη του DDT βοήθησε αποφασιστικά στην μείωση της ελονοσίας και άλλων παρασιτικών ασθενειών μετά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο. Το DDT χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα (αν και έχει απαγορευθεί από το 1975) σε έκτακτες περιπτώσεις παρασιτικών επιδημιών, σε χώρες του Τρίτου Κόσμου. Η επιτυχία αυτή προώθησε την σύνθεση νέων οργανοχλωριωμένων ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως φυτοφάρμακα στην γεωργία. Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις δεν βιοδιασπώνται εύκολα και είναι λιποδιαλυτές. Για τον λόγο αυτό συσσωρεύονται στους λιπαρούς ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Μέσω της τροφικής αλυσίδας γίνεται βιοσυσσώρευση στο σώμα των οργανισμών και ειδικά βιομεγένθυνση των συγκεντρώσεων σε λιπαρούς ιστούς [24].

Τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα χωρίζονται κυρίως σε 5 ομάδες [25]:

(α) ομάδα του DDT: και περίπου 10 ανάλογες ενώσεις (π.χ. dicofol, chlorfenethol, chlorobenzilate, chloropropylate, methoxychlor, Prolan, κλπ)

(β) εξαχλωροκυκλοεξάνιο (HCH, και 8 ισομερή, εκ των οποίων το πιο γνωστό το γ-ισομερές είναι το Lindane)

(γ) ομάδα χλωριωμένων κυκλοδιενίων (περιλαμβάνει τα γνωστά φυτοφάρμακα Aldrin, Isodrin, Dieldrin, Endrin, Telodrin, Heptachlor, Chlordane, Endosulfan),

(δ) Toxaphene (μίγμα ενώσεων)

(ε) φυτοφάρμακα με δομή κλωβού (caged structure), όπως το Mirex και το Chlordecone (εμπορικό όνομα Kepone).

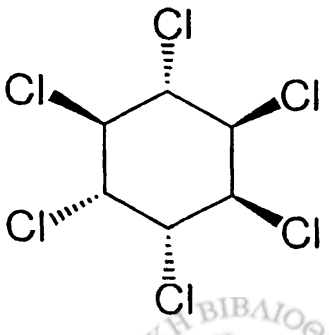
Παρακάτω, περιγράφονται αναλυτικά τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα που μελετήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή [14].

Πίνακας 1.3: *Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό εξέταση OCPs [14, 26- 27].*

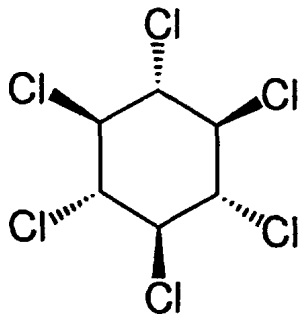
Χημική Ένωση	Μοριακός τύπος	Διαλυτότητα στο νερό mg/L (*25 °C*)	log K_{OW}	Τάση ατμών mmHg (*25 °C*)
α-BHC	$C_6H_6Cl_6$	7.0	3.80	4.5×10^{-5}
β-BHC	$C_6H_6Cl_6$	7.3	3.78	3.6×10^{-7} (*20 °C*)
γ-BHC	$C_6H_6Cl_6$	7.3	3.72	4.2×10^{-5} (*20 °C*)
δ-BHC	$C_6H_6Cl_6$	7.0	4.14	3.5×10^{-5}
α-Chlordane	$C_{10}H_6Cl_8$	1.850	5.54	3.0×10^{-6}
γ-Chlordane	$C_{10}H_6Cl_8$	1.850	5.54	3.9×10^{-6}
Endosulfan I	$C_9H_6Cl_6O_3S$	0.53	3.83	1.0×10^{-5}
Endosulfan II	$C_9H_6Cl_6O_3S$	0.28	3.52	1.0×10^{-5}
Endosulfan sulfate	$C_9H_6Cl_6O_4S$	0.22	3.66	1.0×10^{-5}
Heptachlor	$C_{10}H_5Cl_7$	0.05	6.10	3.0×10^{-4}
Heptachlor epoxide	$C_{10}H_5Cl_7O$	0.275	5.40	1.95×10^{-5} (*30 °C*)
Methoxychlor	$C_{16}H_{15}Cl_3O_2$	0.045	4.68	1.4×10^{-6}
p,p´-DDT	$C_{14}H_9Cl_5$	0.025	6.91	1.60×10^{-7} (*20 °C*)
p,p´-DDE	$C_{14}H_8Cl_4$	0.12	6.51	6.00×10^{-6}
p,p´-DDD	$C_{14}H_{10}Cl_4$	0.090	6.02	1.35×10^{-6}
Aldrin	$C_{12}H_8Cl_6$	0.011(*20 °C*)	6.50	1.2×10^{-4}
Dieldrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	0.110 (*20 °C*)	6.20	5.89×10^{-6}
Endrin	$C_{12}H_8Cl_6O$	0.20	5.60	2.0×10^{-7}
Endrin aldehyde	$C_{12}H_8Cl_6O$	50	4.70	2.0×10^{-7}
Endrin ketone	$C_{12}H_8Cl_6O$	-	4.99	-

➢ ***BHCs (Hexachlorocyclohexane)***

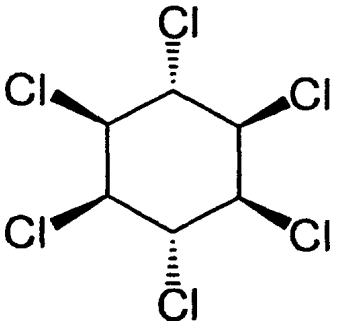
Το α-BHC (*α-hexachlorocyclohexane*), είναι μια οργανοχλωριωμένη ένωση, συγκεκριμένα ισομερές της ομάδας των εξα-υποκατεστημένων εξανίων. Αποτελεί παραπροϊόν κατά τη διαδικασία παραγωγής του ζιζανιοκτόνου γ-BHC (*γ-hexachlorocyclohexane-Lindane).*



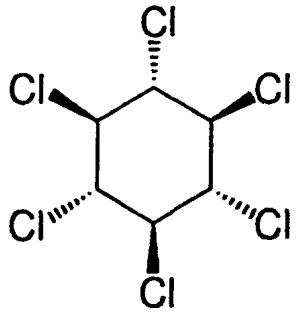
Το β-BHC (*β-hexachlorocyclohexane*) αποτελεί και αυτό παραπροϊόν του γ-BHC. Χρησιμοποιήθηκε ευρέως κατά τη δεκαετία 1960-1970, κυρίως στην καλλιέργεια του βαμβακιού. Το συγκεκριμένο φυτοφάρμακο έχει απαγορευτεί παραπάνω από 30 χρόνια.



Το γ-BHC (*γ-hexachlorocyclohexane, Lindane*), έχει ζιζανιοκτόνο δράση αποτελεί όμως και φαρμακευτική ουσία κατά των ψειρών. Εκτιμάται ότι από το 1950-2000 παρήχθησαν σε παγκόσμια κλίμακα περίπου 600.000 τόνοι Lindane, όπου κατά κύριο λόγο εφαρμόστηκαν στη γεωργία. Το Νοέμβριο του 2006, η χρήση του απαγορεύτηκε σε 52 χώρες και περιορίστηκε σε άλλες 33. Το 2009, με τη Συνθήκη της Στοκχόλμης απαγορεύτηκε παγκοσμίως η γεωργική του χρήση, ενώ ακόμη και σήμερα, σε μικρό βαθμό, αποτελεί φαρμακευτική ουσία κατά της ψώρας.

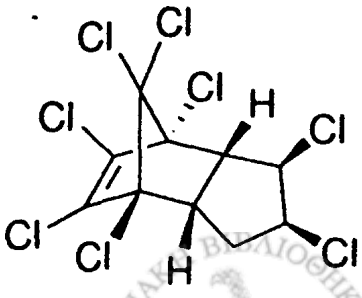


Το δ-BHC (*δ-hexachlorocyclohexane*) είναι μια οργανοχλωριωμένη ένωση, ισομερές από την ομάδα των εξα-υποκατεστημένων εξανίων και χρησιμοποιούνταν ως ζιζανιοκτόνο φυτοφάρμακο. Η χρήση του πλέον έχει απαγορευτεί.



➢ ***Chlordane***

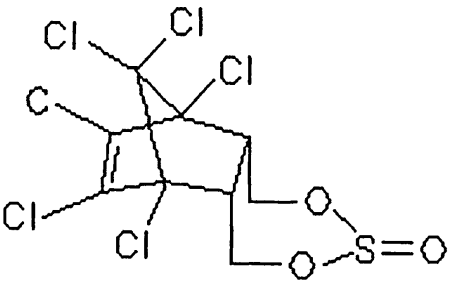
Το chlordane αποτελεί ένα οργανοχλωριωμένο φυτοφάρμακο με ζιζανιοκτόνο δράση. Εφαρμόστηκε κυρίως σε καλλιέργειες καλαμποκιού, εσπεριδοειδών, σε χλοοτάπητες, σε οικιακούς κήπους καθώς επίσης και στην καταπολέμηση των τερμιτών. Ανήκει στην κατηγορία των φυτοφαρμάκων κυκλοδιενίου, υπάρχει σε δύο ισομερείς μορφές την α και γ, έτσι κάνουμε



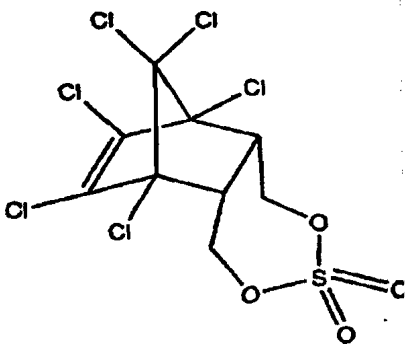
λόγο για α-chlordane και γ-chlordane, αντίστοιχα. Σημαντική παράμετρος σε σχέση με τα δύο ισομερή, είναι ότι το γ είναι πιο βιοδραστικό. Λόγω των αρνητικών επιπτώσεων που είχε η χρήση του τόσο στο περιβάλλον όσο και στον άνθρωπο, η Εταιρία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (*Environmental Protection Agency-EPA*) έχει απαγορεύσει κάθε χρήση του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου από το 1988.

➢ ***Endosulfan***

Το endosulfan αποτελεί ένα οργανοχλωριωμένο φυτοφάρμακο με ζιζανιοκτόνο και ακαρεοκτόνο δράση. Λόγω των αρνητικών επιπτώσεων που έχει στο περιβάλλον και στην υγεία του ανθρώπου θεωρείται ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα αγροχημικά προϊόντα. Αυτοί ήταν και οι λόγοι όπου στη Συνθήκη της Στοκχόλμης, τον Απρίλιο του 2011 αποτέλεσε αντικείμενο διαπραγμάτευσης η παγκόσμια απαγόρευσή του. Η θέσπιση αυτή εφαρμόζεται από τα μέσα του 2012, με ορισμένες χρήσεις του να εξαιρούνται για επιπλέον πέντε χρόνια. Από το 1980-1989 η παγκόσμια κατανάλωση ανερχόταν σε 10.500 τόνους ετησίως, ενώ από τη δεκαετία 1990 αυξήθηκε σε 12.800 τόνους ετησίως. Από χημικής πλευράς είναι παράγωγο του εξαχλωροκυκλοπενταδιενίου και συνίσταται από δύο ισομερείς δομές την I και την II. Το endosulfan I αποτελεί τη θερμοδυναμικά σταθερή δομή οπότε το endosulfan II μετατρέπεται στο ισομερές I, όμως η μετατροπή αυτή λαμβάνει χώρα με μικρή ταχύτητα.

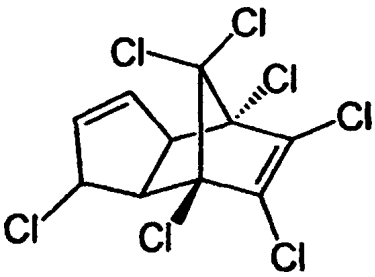


➢ ***Endosulfan sulfate***



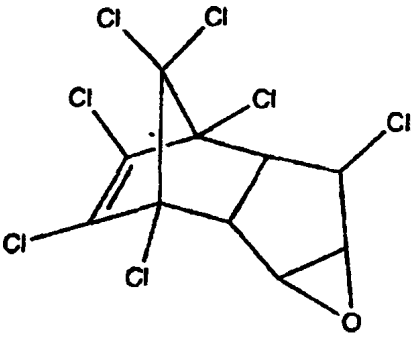
Στα θηλαστικά οι ισομερείς μορφές του endosulfan μετατρέπονται σε μεταβολίτες περισσότερο υδατοδιαλυτούς σε σχέση με τη μητρική ένωση, η κυρίαρχη μορφή αυτών είναι το endosulfan sulfate.

➢ ***Heptachlor***



Το heptachlor είναι ένα οργανοχλωριωμένο φυτοφάρμακο με ζιζανιοκτόνο δράση και συγκεκριμένα εντάσσεται στην ομάδα εκείνη των φυτοφαρμάκων που έχουν ως βάση στην χημική τους δομή το κυκλοδιένιο. Λόγω της πολύ σταθερής του δομής παραμένει στο περιβάλλον ακόμη και μετά από πολλές δεκαετίες. Σε σύγκριση με το chlordane παρουσιάζει 2-3 φορές ισχυρότερη δράση, ωστόσο χημικά είναι πιο αδρανές. Η Εταιρία Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (*Environmental Protection Agency-EPA*) έχει περιορίσει την πώληση προϊόντων με βάση το heptachlor μόνο για συγκεκριμένες εφαρμογές.

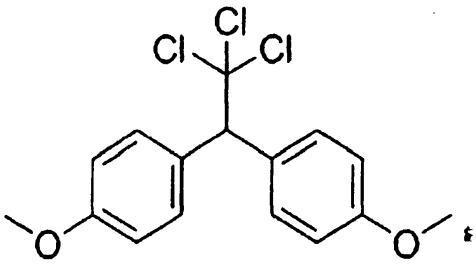
➢ ***Heptachlor epoxide***



Το heptachlor epoxide δεν διατίθεται εμπορικά, άλλα αποτελεί μεταβολίτη του heptachlor ως προϊόν οξείδωσής του. Το heptachlor epoxide παρουσιάζει αυξημένη τοξικότητα σε σχέση με τη μητρική ένωση.

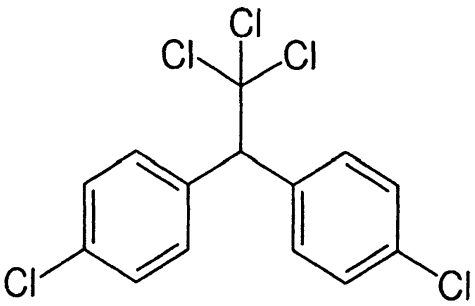
➢ ***Methoxychlor***

Το methoxychlor είναι ένα οργανοχλωριωμένο φυτοφάρμακο με εντομοκτόνο δράση. Αρχικά, είχε ως στόχο την αντικατάσταση του DDT, ωστόσο και αυτό παρουσιάζει οξεία τοξικότητα, με αποτέλεσμα η χρήση του, σαν εντομοκτόνο, να απαγορευτεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2002 και στις ΗΠΑ το 2003.



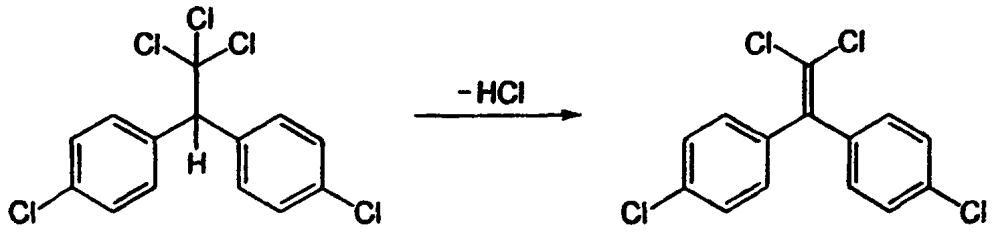
➢ ***DDT (Dichlorodiphenyltrichloroethane)***

Το DDT αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα εντομοκτόνα. Ανακαλύφθηκε από τον Ελβετό χημικό Paul Hermann Muller, όπου για τον λόγο αυτό τιμήθηκε με βραβείο Nobel Ιατρικής το 1948, λόγω της αποτελεσματικότητας της συγκεκριμένης ένωσης κατά των αρθροπόδων. Το 1962 η αμερικανίδα βιολόγος Rachel Carson δημοσιεύει το βιβλίο με τίτλο "Silent Spring" όπου αναφέρει όλες τις αρνητικές επιπτώσεις του συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου τόσο στο οικοσύστημα όσο και στην υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, καταδεικνύει το DDT και άλλα φυτοφάρμακα ως υπεύθυνα για την ανάπτυξη πολλών τύπων καρκίνου. Με τη Συνθήκη της Στοκχόλμης απαγορεύτηκε η γεωργική του χρήση σε παγκόσμια κλίμακα. Ένα αμφιλεγόμενο θέμα, αποτελεί η μέχρι σήμερα χρήση του για την καταπολέμηση κάποιων ασθενειών. Χαρακτηριστικά το 2009, 3.314 τόνοι DDT παρήχθησαν για τον έλεγχο της ελονοσίας και της σπλαχνικής λεϊσμανίασης.



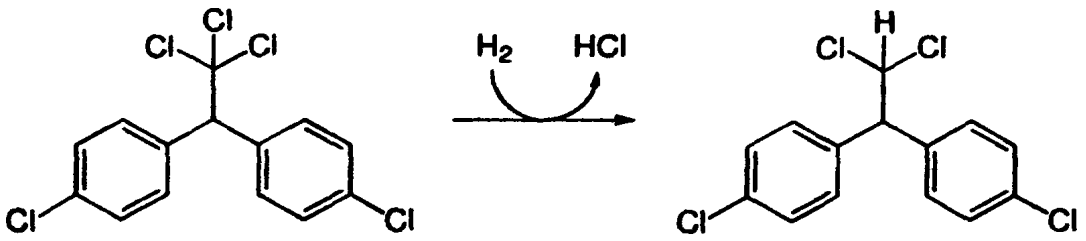
➢ ***DDE (Dichlorodiphenyldichloroethylene)***

Το DDE είναι μια χημική ένωση που αποτελεί τον έναν από τους δύο βασικούς μεταβολίτες του DDT (*ο δεύτερος είναι το DDD*). Ο συγκεκριμένος μεταβολίτης σχηματίζεται μέσω αφυδραλογόνωσης από τη μητρική ένωση σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



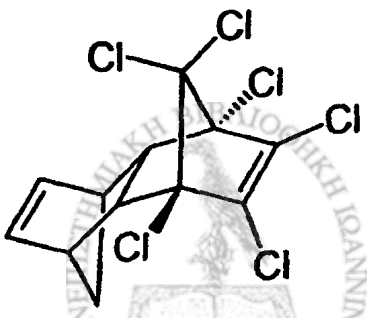
➢ ***DDD (Dichlorodiphenyldichloroethane)***

Το DDD είναι και αυτό ένα οργανοχλωριωμένο ζιζανιοκτόνο και αποτελεί μεταβολίτη του DDT. Έχει παρόμοιες χημικές ιδιότητες με τη μητρική ένωση αλλά παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα σε σχέση με το DDT. Στις ΗΠΑ, δεν έχει καταγραφεί γεωργική χρήση της συγκεκριμένης ένωσης. Η διάσπαση του DDT σε DDD γίνεται σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



➢ ***Aldrin***

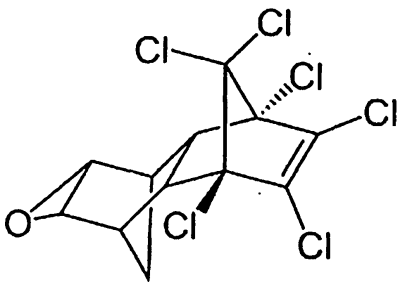
Το aldrin είναι ένα οργανοχλωριωμένο φυτοφάρμακο το οποίο έχει ζιζανιοκτόνο δράση και χρησιμοποιούνταν ευρέως μέχρι τη δεκαετία του 1970. Όπως και πλειάδα άλλων ζιζανιοκτόνων ανήκει στην



κατηγορία των φυτοφαρμάκων του κυκλοδιενίου. Η χρήση της συγκεκριμένης ουσίας έχει σταματήσει στις ΗΠΑ από το 1974, ενώ έχει απαγορευτεί και με οδηγία της Συνθήκης της Στοκχόλμης. Παρ' όλα αυτά, ακόμη και σήμερα χρησιμοποιείται κατά των τερμιτών στη Μαλαισία, στην Ταϊλάνδη, στη Βενεζουέλα και σε περιοχές της Αφρικής.

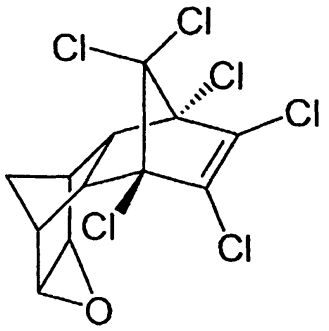
➢ ***Dieldrin***

Το dieldrin αποτελεί έναν χλωριωμένο υδρογονάνθρακα που η παραγωγή του ξεκίνησε το 1948 με σκοπό την εντομοκτόνο δράση και την αντικατάσταση του DDT. Λόγω της αποτελεσματικότητάς του χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα από το 1950 ως τις αρχές του 1970. Χημικά μοιάζει με το aldrin το οποίο με οξείδωση μέσα στους έμβιους οργανισμούς μεταβολίζεται σχηματίζοντας το dieldrin, ένωση περισσότερο δραστική και τοξική. Όπως το aldrin, έτσι και το dieldrin έχει απαγορευτεί στην πλειοψηφία των αναπτυγμένων χωρών.

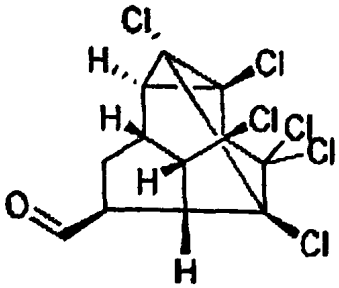


➢ ***Endrin***

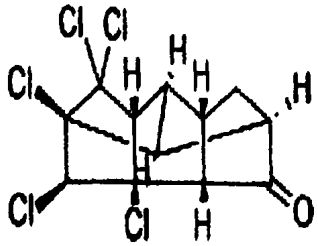
Το endrin είναι ένα οργανοχλωριωμένο φυτοφάρμακο με εντομοκτόνο και τρωκτικοκτόνο δράση. Αποτελεί ουσιαστικά στερεοϊσομερές του dieldrin. Η συγκεκριμένη ουσία χρησιμοποιήθηκε κυρίως (*80%*) σε καλλιέργειες βαμβακιού. Λόγω της περιβαλλοντικής υποβάθμισης που προκαλεί έχει απαγορευτεί σε πολλές χώρες.



➢ ***Endrin aldehyde, Endrin ketone***

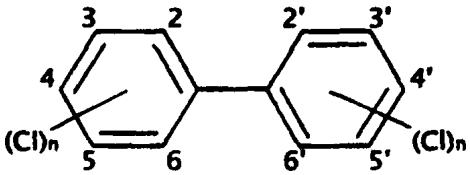


Τα endrin aldehyde και endrin ketone δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα φυτοφάρμακα. Το endrin σε υψηλές θερμοκρασίες και σε παρουσία φωτός μπορεί να διασπαστεί και να σχηματιστούν πρωτίστως οι παραπάνω δυο ενώσεις, σε μικρό όμως ποσοστό. Τέλος, τα endrin aldehyde και endrin ketone αποτελούν και προσμείξεις του endrin.



1.2.5 Πολυχλωριωμένα διφαινύλια (*PCBs*)

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (*Polychlorinated Biphenyls, PCBs*) είναι ενώσεις όπου δύο βενζολικοί δακτύλιοι συνδέονται με έναν απλό C-C δεσμό. Παράγονται με χλωρίωση του διφαινυλίου, το οποίο έχει συνολικά δέκα διαθέσιμες θέσεις για την προσθήκη των ατόμων χλωρίου, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία συνολικά διακοσίων εννέα (*209*) διαφορετικών ενώσεων που ανήκουν στην οικογένεια των PCBs, αλλά εμπορικά διαθέσιμες είναι 130. Οι ενώσεις αυτές καλούνται συμπαράγωγα (*congeners*) και η διαφορά τους από τα ισομερή είναι ότι, ισομερή ονομάζονται μόνο τα συμπαράγωγα που έχουν τον ίδιο αριθμό ατόμων χλωρίου, δηλαδή τον ίδιο συντακτικό τύπο, αλλά σε διαφορετικές θέσεις. Ο γενικός χημικός τύπος για τα PCBs είναι $C_{12}H_{10-x}Cl_x$ (*Εικόνα 1.3*) [11].



Εικόνα 1.3: *Η χημική δομή των PCBs, με τους αριθμούς υποδεικνύονται οι δυνατές θέσεις υποκατάστασης με άτομα χλωρίου στους άνθρακες του διφαινυλίου*

Ο χρόνος ημιζωής και αποδόμησής τους αυξάνεται με το βαθμό χλωρίωσης και κυμαίνεται μεταξύ 8 και 365 ημερών. Τα προσροφημένα μόνο-, δι- και τρι-χλωροδιφαινύλια αποικοδομούνται σχετικά γρήγορα, αλλά τα PCBs με περισσότερα από 5 άτομα χλωρίου στο μόριό τους είναι πολύ σταθερά στη βιοαποικοδόμηση, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο περιβάλλον σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις

Χρησιμοποιήθηκαν κατά την περίοδο 1930-1976 σε πολλές βιομηχανικές χώρες και η ολική παραγωγή ήταν περίπου 600 εκατομμύρια κιλά. Το πρώτο χημικό που είχε ομοιότητες με την κατηγορία των PCBs (*chemical like PCB*) ανακαλύφθηκε το 1865 και βρέθηκε πως ήταν υποπροϊόν λιθανθρακόπισσας. Αργότερα, το 1881, γερμανοί χημικοί συνέθεσαν το πρώτο PCB σε εργαστήριο. Τα εμπορικά ονόματα ήταν Alachlors (*ΗΠΑ*), Clophen (*Γερμανία*), Kanechlor (*Ιαπωνία*), Phenochlor και Pyralene (*Γαλλία*) και χρησιμοποιήθηκαν κυρίως, λόγω της υψηλής σταθερότητάς τους, ως μονωτικά και θερμομονωτικά υλικά σε μετασχηματιστές. Απαγορεύθηκαν το 1977 στις ΗΠΑ με τον Νόμο U.S. Toxic Substances Control Act [28- 29].

Τα PCBs έχουν την ικανότητα, λόγω λιποδιαλυτότητας, να συσσωρεύονται σε διάφορα τμήματα της τροφικής αλυσίδας. Η φαρμακοκινητική κατανομή PCBs στα όργανα και συστήματα των οργανισμών υποδεικνύει την χημεία και την βιολογική δράση τους. Οι αρχικές ενώσεις, ανάλογα με τις θέσεις χλωρίωσης, βιοσυσσωρεύεται σε λιπαρούς ιστούς, ενώ οι μεταβολίτες τους εμφανίζονται σε υδρόφιλα τμήματα των ιστών των κυττάρων.

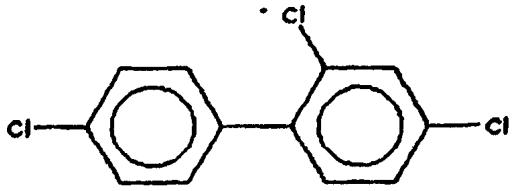
Λόγω των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους, τα PCBs έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολύ μεγάλο αριθμό εφαρμογών. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε ότι χρησιμοποιούνταν ως μονωτικά και ψυκτικά υγρά σε πυκνωτές και σε μετασχηματιστές, πλαστικοποιητές σε χρώματα και τσιμέντα, σταθεροποιητές σε επιχρίσματα PVC ηλεκτρικών καλωδιώσεων, ως προσθετικά σε επιβραδυντικά φλόγας, διαλυτικά φυτοφαρμάκων, λιπαντικά έλαια, κολλητικές ουσίες ακόμη και σε χειρουργικά εμφυτεύματα [2, 11,14].

Εξαιτίας της μεγάλης τοξικής δράσης τους, η παραγωγή των PCBs απαγορεύτηκε στις ΗΠΑ το 1979, ενώ από τη Σύνοδο της Στοκχόλμης για τους Επίμονους Οργανικούς Ρυπαντές (*Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*) το 2001, ταξινομήθηκαν ως Επίμονοι Οργανικοί Ρυπαντές (*Persistent Organic Pollutants- POPs*) [14, 30].

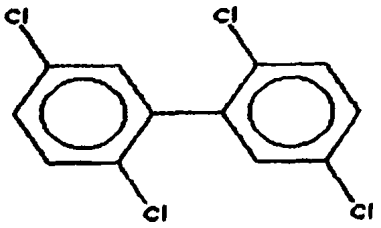
Πίνακας 1.4 : Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των PCBs [14, 31]

Συμπαράγωγα (*Congeners*)	Μοριακός τύπος	Διαλυτότητα στο νερό g/m^3 (*25 °C*)	Log K_{OW}	Τάση ατμών Pa (*25 °C*)
Μονό-χλώρο	$C_{12}H_9Cl$	1.21-5.50	4.4	1.10
Δι-χλώρο	$C_{12}H_8Cl_2$	0.06-2.00	5.1	0.24
Τρι-χλώρο	$C_{12}H_7Cl_3$	0.015-0.400	5.5	0.054
Τετρά-χλώρο	$C_{12}H_6Cl_4$	0.0043-0.0100	5.9	0.012
Πεντά-χλώρο	$C_{12}H_5Cl_5$	0.004-0.020	6.3	2.6×10^{-3}
Εξά-χλώρο	$C_{12}H_4Cl_6$	0.0004-0.0007	7.1	5.8×10^{-4}
Επτά-χλώρο	$C_{12}H_3Cl_7$	0.000045-0.000200	7.1	1.3×10^{-4}
Οκτά-χλώρο	$C_{12}H_2Cl_8$	0.0002-0.0003	7.5	2.8×10^{-5}
Εννιά-χλώρο	$C_{12}HCl_9$	0.00018-0.0012	7.9	6.3×10^{-6}
Δεκά-χλώρο	$C_{12}Cl_{10}$	0.000001-0.000076	8.3	1.4×10^{-6}

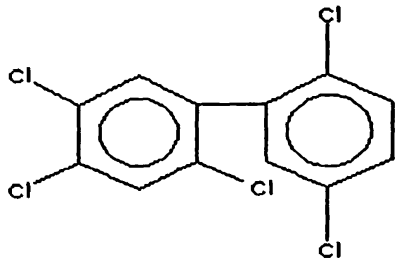
Αντικείμενο έρευνας αυτής της εργασίας αποτέλεσαν τα συμπαράγωγα PCBs 28, 52, 101, 138, 153 και 180, των οποίων οι χημικές δομές φαίνονται παρακάτω.



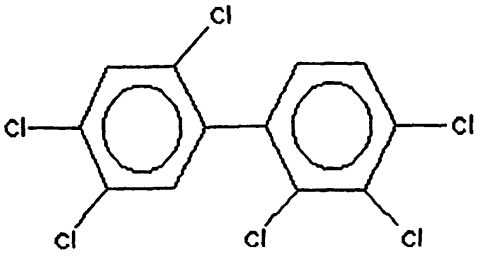
PCB 28 - 2,4,4'-Trichlorobiphenyl



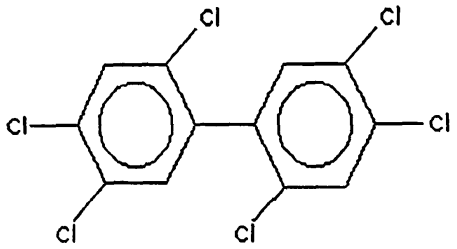
PCB 52 - 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl



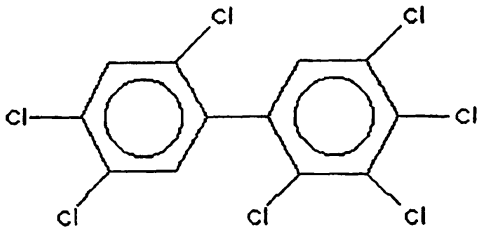
PCB 101 - 2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl



PCB 138 - 2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobiphenyl



PCB 153 - 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl



PCB 180 - 2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl

1.2.5 Ισχύουσα νομοθεσία για τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα

Το 1979 εισήχθησαν για πρώτη φορά σε Ευρωπαϊκό επίπεδο οι έννοιες της πολιτικής και νομοθεσίας για τη χρήση των φυτοφαρμάκων δίνοντας έμφαση στον έλεγχο της διακίνησης στην αγορά των πιο επιβλαβών φυτοφαρμάκων και στην παρακολούθηση των επιπέδων των υπολειμμάτων 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/ΕΕC) 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 τοθ 1980 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 ή εγκεκριμένη 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 Ανώτατων Ορίων Καταλοίπων, ΑΟΚ, (*MRL, Maximum Residue Limit*) που μπορούν να επιτύχουν το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα.

Τέλος, ο Κανονισμός 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 τη μείωση της έκθεσης των καταναλωτών που βρίσκονται ψηλά στην τροφική αλυσίδα. Ως «Ανώτατο Όριο Καταλοίπων» ορίζεται το ανώτατο νόμιμο όριο συγκέντρωσης καταλοίπων 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 την επίτευξη υψηλού επιπέδου προστασίας των καταναλωτών. Σύμφωνα με την οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 15^{ης} 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 τα 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 όποτε η έκθεση σε συγκεντρώσεις που τα υπερβαίνουν δεν επιφέρει υποχρεωτικά κίνδυνο για την υγεία. [6].

Τα ανώτατα όρια καταλοίπων μίγματος PCBs (PCB 28, 52, 101, 138, 180) σε γαλακτοκομικά προϊόντα, σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων «Codex Alimentarius» που συστάθηκε από δύο οργανώσεις των Ηνωμένων Εθνών: τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (*Food and Agriculture Organization, FAO*) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (*World Health Organization, WHO*), είναι 40 μg L^{-1} [32].

Όσον αφορά τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, τα ανώτατα όρια καταλοίπων τους σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως θεσπίστηκαν από την Ευρωπαϊκή επιτροπή, φαίνονται στον πίνακα 1.5 [33].

Πίνακας 1.5: Χρήση και Ανώτατα Όρια Καταλοίπων OCPs γαλακτοκομικά προϊόντα

OCPs	Χρήση	ΑΟΚ (μg/L)
a-BHC	εντομοκτόνο, τρωκτικοκτόνο	1
b-BHC	εντομοκτόνο, τρωκτικοκτόνο	1
γ-BHC	εντομοκτόνο, τρωκτικοκτόνο	1
δ-BHC	εντομοκτόνο, τρωκτικοκτόνο	1
Heptachlor	Εντομοκτόνο	4
Aldrin	Εντομοκτόνο	6
Heptachlor epoxide	προϊόν διάσπασης	
γ-chlordane	Εντομοκτόνο	2
a-chlordane	Εντομοκτόνο	2
endosulfan I	Εντομοκτόνο	4
p,p'- DDE	Εντομοκτόνο	-
Dieldrin	εντομοκτόνο	6
Endrin	Εντομοκτόνο	0.8
Endosulfan II	Εντομοκτόνο	4
p,p'-DDD	Εντομοκτόνο	-
Endrin aldehyde	προϊόν διάσπασης	
Endosulfan sulfate	προϊόν διάσπασης	
p,p'-DDT	Εντομοκτόνο	40
Endrin ketone	προϊόν διάσπασης	
Methoxychlor	Εντομοκτόνο	10

Κεφάλαιο 2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο}

Μέθοδοι διαχωρισμού και στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων

Γενικά, οι αναλυτικές μέθοδοι περιλαμβάνουν διαδικασίες όπως η δειγματοληψία, η προετοιμασία του δείγματος, ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των αναλυτών και η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων. Περισσότερο από το 80% του συνολικού χρόνου που απαιτείται για την ανάλυση καταναλώνεται στη δειγματοληψία και στα στάδια επεξεργασίας του δείγματος όπως η εκχύλιση, η συμπύκνωση και η απομόνωση των αναλυτών. Έτσι, είναι εύκολο να συμπεράνουμε ότι η επιλογή μιας κατάλληλης μεθόδου επεξεργασίας του δείγματος επηρεάζει σημαντικά την αξιοπιστία και την ακρίβεια της ανάλυσης των τροφίμων [34]. Οι περισσότερες μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων περιλαμβάνουν δύο βασικά στάδια: την εκχύλιση των επιλεγμένων αναλυτών από το μεγαλύτερο μέρος της μήτρας και τον καθαρισμό τους έτσι ώστε να διαχωριστούν από άλλες ενώσεις που βρίσκονται στη μήτρα και εκχυλίζονται ταυτόχρονα με τους επιλεγμένους αναλύτες [35].

2.1 Γάλα

Το γάλα είναι ίσως η πιο πλήρης τροφή σε θρεπτικά συστατικά που υπάρχει στη φύση. Το γάλα είναι το έκκριμα του μαστικού αδένα των θηλαστικών ζώων που προορίζεται για τη διατροφή του νεογέννητου και για το οποίο αποτελεί τη μοναδική τροφή μέχρι μια ορισμένη ηλικία. Για τον άνθρωπο, όμως, το γάλα εξακολουθεί να αποτελεί μέρος της δίαιτάς του είτε αυτούσιο είτε με τη μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων (τυρί, βούτυρο, γιαούρτι κ.α.) για όλη τη διάρκεια της ζωής του [36].

Σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (*Κ.Τ.Π. 1998*), υπάρχει ο παρακάτω ορισμός για το γάλα:

«Γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης» [37].

Σύμφωνα με το FAO/WHO (*1973*) :

«Γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται μετά από μία ή δύο αρμέξεις χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε και προορίζεται για κατανάλωση σε υγρή μορφή ή για περαιτέρω επεξεργασία» [38-39].

2.1.1 Τύποι γάλακτος

Το γάλα που παράγεται από το ζώο πρέπει να υποστεί επεξεργασία πριν την κατανάλωση, αφού πολλές φορές περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς. Για να γίνει το γάλα ασφαλές για τη διατροφή, αφού ελεγχθούν αρκετοί φυσικοχημικοί και μικροβιολογικοί παράγοντες, εφαρμόζεται κυρίως θερμική επεξεργασία. Υπάρχουν τέσσερις βασικοί τύποι θερμικά επεξεργασμένου γάλακτος:

Α) Φρέσκο παστεριωμένο γάλα

Όλα τα γάλατα έχουν υποστεί παστερίωση και έχουν επεξεργαστεί σε θερμοκρασία 72.5 °C για 15 δευτερόλεπτα (ή ισοδύναμο αυτής). Το προϊόν της επεξεργασίας έχει τα μέγιστα ποσοστά σε διατροφική αξία με πολύ μικρή επίδραση στη γεύση, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουμε τη διάρκεια ζωής του από 3 έως 7 ημέρες το μέγιστο, στο ψυγείο.

Στο πόσιμο γάλα βλέπουμε τη σήμανση Ομογενοποιημένο, που είναι το γάλα που έχει υποστεί επεξεργασία ώστε το λίπος του να διαχέεται σε όλη τη μάζα του και άρα να είναι περισσότερο εύπεπτο.

Β) Υψηλής παστερίωσης

Και εδώ έχουμε παστερίωση αλλά σε υψηλότερη θερμοκρασία που κυμαίνεται από 110 °C έως 127 °C για 2 δευτερόλεπτα. Η επεξεργασία αυτή

συνεπάγεται μείωση στην διατροφική αξία του γάλακτος, όμως παράγεται προϊόν με διάρκεια ζωής μέχρι 30 ημέρες, πολύ σημαντικό για μια μερίδα καταναλωτών. Από την στιγμή που θα ανοιχτεί συντηρείται στο ψυγείο για 3 έως 4 ημέρες.

Γ) Υπέρ Υψηλής Παστερίωσης (Ultra Hight Pasteurized, UHT)

Εδώ έχουμε αποστείρωση σε Υπέρ Υψηλή Θερμοκρασία μεγαλύτερη από 135 °C για τουλάχιστον 1 δευτερόλεπτο. Στην περίπτωση αυτή η διάρκεια ζωής του προϊόντος μπορεί να φτάσει τις 365 ημέρες, δηλαδή ένα έτος, αλλά υστερεί στα γευστικά και διατροφικά χαρακτηριστικά.

Δ) Συμπυκνωμένο (εβαπορέ ή σακχαρούχο)

Έχουμε α) το συμπυκνωμένο σακχαρούχο γάλα, που δεν είναι αποστειρωμένο και β) το εβαπορέ, που είναι αποστειρωμένο. Με τη συμπύκνωση επιτυγχάνουμε το τελικό προϊόν να είναι ελαφρύτερο, να αποθηκεύεται σε φθηνότερους περιέκτες και να μεταφέρεται με λιγότερα έξοδα, καθώς και άλλα οικονομικά οφέλη, αλλά έχει μειωμένη διατροφική αξία.

Ε) Σκόνη γάλακτος

Η σκόνη γάλακτος είναι και αυτή γάλα, μόνο που έχει εξατμιστεί όλο το νερό που περιείχε. Η εξάτμιση γίνεται με το ράντισμα του γάλακτος πάνω σε πολύ ζεστές επιφάνειες.

Γενικά το γάλα χωρίζεται σε διάφορους τύπους, ανάλογα με τα παρακάτω κριτήρια (*Πίνακας 2.1*).

Πίνακας 2.1: Είδη γάλακτος ανάλογα με διάφορα κριτήρια

Κριτήριο	Είδος
Γεύση	ξινόγαλο, κακάο, με γεύσεις φρούτων
Ενίσχυση	με βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία
Επεξεργασία	νωπό, παστεριωμένο, ομογενοποιημένο, συμπυκνωμένο, ζαχαρούχο
μέθοδο εκτροφής ή παραγωγής	από ζώα ελευθέρας βοσκής, ζώα σε κτηνοτροφι μονάδα, οργανικό, βιολογικό
Προέλευση	*ζωικής προέλευσης*: αγελαδινό, κατσικίσιο, πρόβε *φυτικής προέλευσης*: καρύδας, σόγιας
Σύνθεση	πλήρες, χαμηλό σε λιπαρά
Συντήρηση	διαρκείας, σε σκόνη
Συσκευασία	σε μπουκάλι, σε χαρτόνι
Σύσταση	χωρίς λακτόζη, υποαλλεργικό

2.1.2 Σύσταση γάλακτος

Η σύνθεση του γάλακτος διαφέρει από ζώο σε ζώο, όμως είναι δυνατό να διαφέρει και στο ίδιο το ζώο, ανάλογα με την τροφή που έχει φάει ή ακόμη και

την ώρα που έγινε το άρμεγμα. Στις αγελάδες, κατά κανόνα, το πρωινό γάλα έχει μεγαλύτερο ποσοστό λίπους από εκείνο που αρμέγεται το βράδυ [11].

Το γάλα δεν είναι ομοιογενές, αλλά μείγμα διάφορων οργανικών ουσιών και αποτελείται από νερό, λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ένζυμα, άλατα και βιταμίνες. Μερικά από τα συστατικά αυτά, όπως το λίπος, είναι δυνατό να χωριστούν από το υπόλοιπο γάλα με μηχανικό τρόπο [11].

Πίνακας 2.2. *Μέση σύσταση του γάλακτος διαφόρων θηλαστικών (g/100g) [40].*

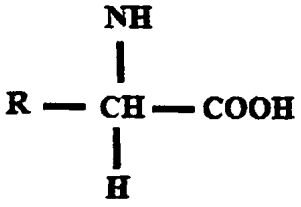
Είδος γάλακτος	**Νερό**	**Λίπος**	**Πρωτεΐνες**	**Λακτόζη**	**Τέφρα**	**ΣΥΑΛ***	**Ολικά στερεά**
Γίδινο	87.00	4.25	3.52	4.27	0.86	8,75	13.00
Αγελαδινό	87.2	3.70	3.50	4.90	0.70	9,10	12.80
Πρόβειο	80.71	7.90	5.23	4.81	0.90	11,39	19.29
Ανθρώπινο	87.43	3.75	1.63	6.98	0.21	8,82	12.57

*ΣΥΑΛ :Συνολικό υπόλειμμα άνευ λίπους

Το πλήρες γάλα περιέχει βιταμίνες (κυρίως θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, παντοθενικό οξύ και βιταμίνες A, B12 και D), μέταλλα (ασβέστιο, νάτριο, φώσφορο, κάλιο και ιχνοστοιχεία), πρωτεΐνες (που περιλαμβάνουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα), υδατάνθρακες (κυρίως λακτόζη) και λιπίδια (λίπη).

Πρωτεΐνες γάλακτος

Οι πρωτεΐνες είναι μια εξαιρετικά σημαντική κατηγορία φυσικά απαντώμενων ενώσεων που είναι απαραίτητες για όλες τις διαδικασίες της ζωής. Συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν μία από τις σημαντικότερες συνεισφορές του γάλακτος στη διατροφή του ανθρώπου. Οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή των αμινοξέων και έχουν γενική δομή $RCH_2NHCOOH$ (*Εικόνα 2.1*):



Εικόνα 2.1 : Γενική δομή πρωτεϊνών

Το R συμβολίζει την οργανική ρίζα. Το είδος και η αλληλουχία των αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη επηρεάζουν τις ιδιότητές της. Μερικές πρωτεΐνες περιέχουν και άλλες ουσίες εκτός από αμινοξέα π.χ. οι λιποπρωτεΐνες περιέχουν λίπος και πρωτεΐνη. Οι κύριες πρωτεΐνες σε όλα τα είδη γάλακτος δηλαδή το αγελαδινό, το πρόβειο και το κατσικίσιο, αλλά και στο τυρόγαλα είναι οι καζεΐνες, η β-λακτογλοβουλίνη, η α-λακταλβουμίνη, η αλβουμίνη ορού και οι ανοσογλοβουλίνες. Όλες οι κύριες πρωτεΐνες (εκτός της αλβουμίνης και τις ανοσογλοβουλίνες) συντίθεται στα επιθηλιακά κύτταρα στο μαστικό αδένα από αμινοξέα που προέρχονται στο αίμα.

Πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος

Ορός του γάλακτος ή τυρόγαλα ονομάζεται το θολό υποκίτρινο υγρό που παραμένει μετά την απομάκρυνση από το γάλα του λίπους και της καζεΐνης. Η τελευταία απομακρύνεται είτε με οξίνιση, είτε με την επίδραση της πυτιάς. Ο ορός αυτός περιέχει διάφορα θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, γαλακτοζάχαρο και υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Τα κυριότερα πρωτεϊνικά συστατικά του γάλακτος είναι η γαλακταλβουμίνη και γαλακτογλοβουλίνη. Η γαλακταλβουμίνη λαμβάνεται από το τυρόγαλα με εξαλάτωση με θειικό μαγνήσιο. Η γαλακτογλοβουλίνη απαντά σε ελάχιστα ποσά στο γάλα (μερικά χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο γάλακτος) σε αντίθεση δε προς την καζεΐνη και τη γαλακταλβουμίνη, περιέχει γλυκίνη. Με θέρμανση του γάλακτος επέρχεται καθίζηση τόσο της αλβουμίνης όσο και της γλοβουλίνης.

Καζεΐνη

Οι καζεΐνες (*CN*) είναι φωσφοπρωτεΐνες. Βρίσκονται στο γάλα με τη μορφή μικυλλίων (καζεϊνικά μικύλλια), δηλαδή ως μια μάζα πυκνών πρωτεϊνικών κόκκων. Οι φωσφορικές ομάδες που είναι δεσμευμένες στα μόρια των καζεϊνών, δεσμεύουν το ασβέστιο (Ca^{+2}) σχηματίζοντας ιονικούς δεσμούς. Ακολούθως, εφόσον οι καζεΐνες φωσφορυλιωθούν, δημιουργούνται οι δεσμοί του ασβεστίου με τις φωσφορούχες ομάδες και αρχίζει ο πολυμερισμός των μορίων του μικυλλίου. Αυτή η δομή {καζεΐνη-PO_4-Ca^{+2}-PO_4-καζεΐνη} είναι σημαντική για τον σχηματισμό των μικυλλίων [11].

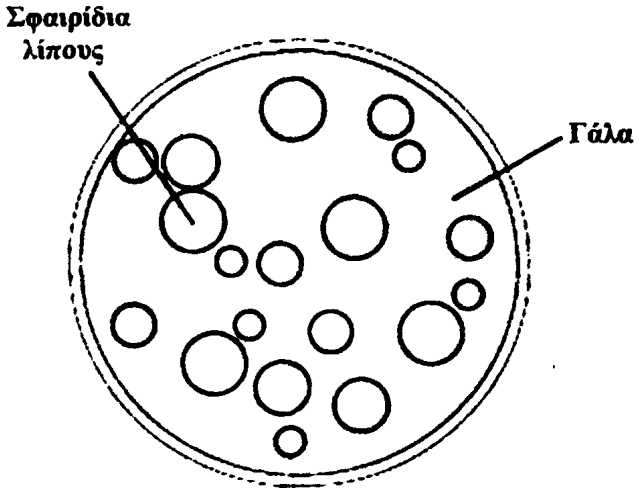
Άλατα, ανόργανα άλατα και βιταμίνες

Το ασβέστιο, το μαγνήσιο, το νάτριο, το κάλιο και το χλώριο είναι κάποια μέταλλα που συναντώνται στο γάλα σε συγκέντρωση περίπου 5-40 mM. Τα άλατα του γάλακτος και κυρίως το φωσφορικό ασβέστιο, αλληλεπιδρούν έντονα με την καζεΐνη. Επιπλέον, το γάλα είναι μια καλή πηγή βιταμινών. Οι κυριότερες βιταμίνες που περιέχονται στο γάλα είναι οι βιταμίνες A, B6, B12, C, D, K, E, η θειαμίνη, η νιασίνη, η βιοτίνη και η ριβοφλαβίνη [11].

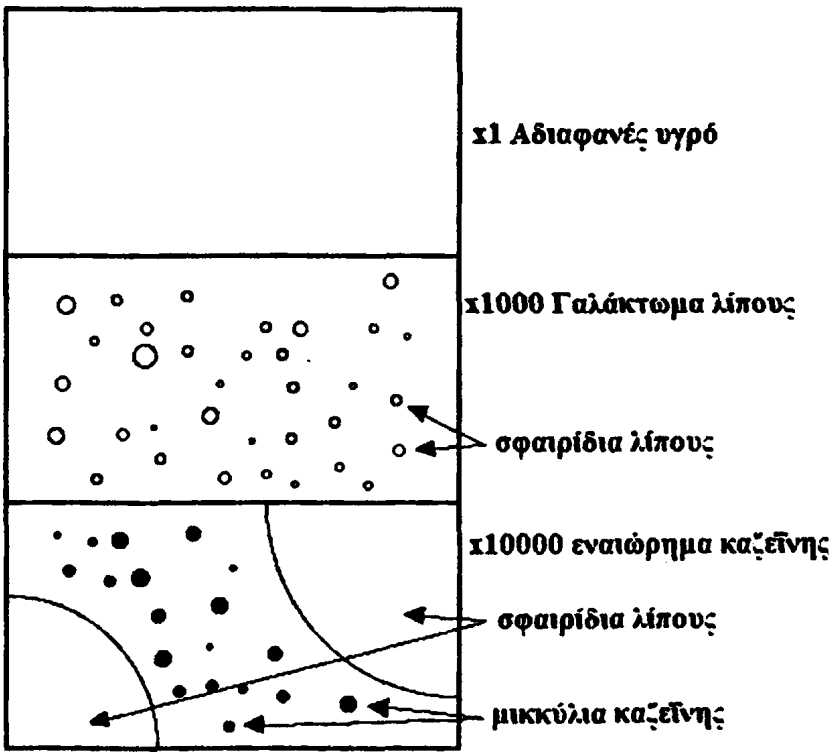
Λίπος του γάλακτος

Αν το γάλα μείνει για κάποιο διάστημα, στην επιφάνεια δημιουργείται ένα στρώμα σε μορφή κρέμας. Κοιτάζοντας το γάλα με μικροσκόπιο, σε χαμηλή μεγέθυνση (*x1*), παρατηρείται ένα ομοιόμορφο αλλά θολό υγρό. Σε μεγαλύτερη μεγέθυνση (*x100*) το κρεμώδες αυτό στρώμα μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό σφαιρών διαφόρων μεγεθών που επιπλέουν μέσα στο γάλα και τα οποία είναι τα σφαιρίδια λίπους. Κάθε σφαίρα περιβάλλεται από μία λεπτή μεμβράνη, η οποία δρα ως παράγοντας γαλακτωματοποίησης για το αιωρούμενο λίπος του γάλακτος. Η μεμβράνη αυτή προστατεύει το λίπος από τα ένζυμα και αποτρέπει τη συσσωμάτωση των

σωματιδίων προς σχηματισμό κομματιών βουτύρου. Το λίπος μπορεί να παρομοιαστεί με γαλάκτωμα λαδιού σε νερό, το οποίο μπορεί να σπάσει με μηχανικές ενέργειες όπως για παράδειγμα η ανακίνηση (*Εικόνα 2.2*). Σε ακόμα μεγαλύτερη μεγέθυνση (*x10000*) μπορούν να παρατηρηθούν και τα μικκύλια της καζεΐνης (*Εικόνα 2.3*) [41].



Εικόνα 2.2: *Σφαιρίδια λίπους στο γάλα*



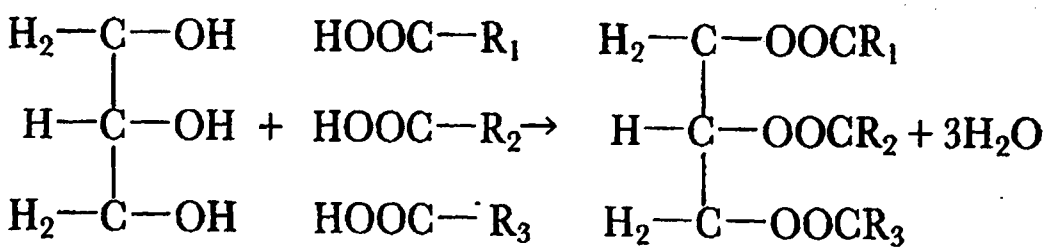
Εικόνα 2.3: *Δομή γάλακτος σε τρεις διαφορετικές μεγενθύσεις*

Το λίπος είναι εν μέρη στερεό σε θερμοκρασία δωματίου. Ο όρος έλαιο χρησιμοποιείται για λίπη που είναι εντελώς υγρά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα λίπη και τα έλαια είναι διαλυτά σε μη πολικούς διαλύτες.

Σχεδόν το 98% του λίπους του γάλακτος είναι ένα μίγμα από τριακυλο-γλυκεριδίων. Υπάρχουν επίσης ουδέτερα λιπίδια, υδατοδιαλυτές βιταμίνες, χρωστικές ουσίες (π.χ. η καροτίνη δίνει το κίτρινο χρώμα στο βούτυρο) και στερόλες. Τα λίπη αποτελούν για τον οργανισμό πηγή ενέργειας καθώς η οξείδωση του λίπους δίνει ενέργεια ίση με 9 θερμίδες/ γραμμάριο. Επιπλέον, το λίπος του γάλακτος δρα σαν διαλύτης για τις λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K και παρέχουν τα απαραίτητα λιπαρά οξέα όπως το λινολενικό, το λινολεϊκό και το αραχιδονικό.

Ένα μόριο λιπαρού οξέος περιλαμβάνει μια αλυσίδα υδρογονάνθρακα και μια καρβοξυλική ομάδα (-COOH). Τα λιπαρά οξέα ποικίλλουν ως προς τον αριθμό των ατόμων άνθρακα στην αλυσίδα. Για παράδειγμα, το βουτυρικό οξύ (βρίσκεται στο λίπος του βουτύρου) αποτελείται από 4 άτομα άνθρακα, ενώ το αριχιδονικό ξύ από 20 άτομα άνθρακα. Σχεδόν όλα τα λιπαρά οξέα περιέχουν άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα.

Τα πιο σημαντικά λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα τριγλυκερίδια του γάλακτος δίνονται στον Πίνακα 2.3. Τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται με την γλυκερόλη όπως φαίνεται [42]:



Γλυκερόλη + λιπαρά οξέα ⟶ τριγλυκερίδια (λίπος) + νερό

Πίνακας 2.3: Κύρια λιπαρά οξέα που υπάρχουν στα τριγλυκερίδια του γάλακτος

Λιπαρά οξέα	Μοριακός τύπος	Μήκος αλυσίδας	Σημείο βρασμού
Βουτυρικό	$CH_3(CH_2)_2COOH$	C_4	□8°C
Καπροϊκό	$CH_3(CH_2)_4COOH$	C_6	□2°C
Καπρυλικό	$CH_2(CH_2)_6COOH$	C_8	16°C
Καπρικό	$CH_3(CH_2)_8COOH$	C_{10}	31.5°C
Λαυρικό	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	C_{12}	44°C
Μυριστικό	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	C_{14}	58°C
Παλμιτικό	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	C_{16}	64°C
Στεαρικό	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	C_{18}	70°C
Αριχιδονικό	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	C_{20}	
Ολεϊκό	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	$C_{18:1}$	13°C
Λινολεϊκό	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CH.CH_2)_2(CH_2)_6COOH$	$C_{18:2}$	□5°C
Λινολενικό	$CH_3CH_2(CH{=}CH.CH_2)_3(CH_2)6COOH$	$C_{18:3}$	

Τα οργανοχλωριωμένες ενώσεις, OCPs και PCBs, λόγω των λιπόφιλων ιδιοτήτων τους, αποθηκεύονται σε ιστούς που είναι πλούσιοι σε λίπος και στη συνέχεια αποβάλλονται μέσω του λίπους του γάλακτος [43-44]. Επομένως, η γνώση της ύπαρξης υπολειμμάτων ενδοκρινικών διαταρακτών στο γάλα, παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την έκθεση του ανθρώπου σ' αυτές τις προσμείξεις με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων. Μία από τις βασικές δυσκολίες που σχετίζονται με τον προσδιορισμό των εν λόγω αναλυτών σε δείγματα γάλακτος, είναι η υψηλή περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος και πρωτεΐνες που συχνά δυσχεραίνουν τον αναλυτικό προσδιορισμό τους. Για το λόγο αυτό, η προκατεργασία του δείγματος ή/και η εκχύλιση μπορεί να είναι χρονοβόρα και επίπονη, κουραστική και να απαιτεί πολλά στάδια καθαρισμού για την απομάκρυνση του συνεκχυλίζοντων ουσιών από τη μήτρα [35, 45].

2.2 Προκατεργασία γάλακτος

Το γάλα είναι ένα πολύπλοκο δείγμα. Πολλές φορές, μαζί με τους επιλεγμένους αναλύτες συν- εκχυλίζονται και κάποιες παρεμποδίζουσες ενώσεις όπως τα λίπη και οι πρωτεΐνες και δυσχεραίνουν τον προσδιορισμό των αναλυτών. Επιπλέον, κάποιες συν- εκχυλίζουσες ενώσεις και ιδιαίτερα τα λιπίδια, έχουν την τάση να προσροφώνται σε τμήματα του αέριου χρωματογράφου όπως είναι η θύρα έγχυσης και η στήλη με αποτέλεσματα να μειώνεται η χρωματογραφική απόδοση [46]. Συνεπώς, πριν την εκχύλιση, είναι απαραίτητο ένα στάδιο καθαρισμού για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και άλλων παρεμποδιζουσών ουσιών με σκοπό την απελευθέρωση των επιλεγμένων αναλυτών από τις πρωτεΐνες και το σπάσιμο των σφαιριδίων λίπους. Διάφορες μέθοδοι καθαρισμού έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση των παρεμποδιζουσών ουσιών συμπεριλαμβανομένου της κατάψυξης, φυγοκέντρησης, επεξεργασίας με οξέα κ.α. [35]. Παρακάτω αναφέρονται ορισμένες διαδικασίες καθαρισμού.

- ***Ψύξη- Φυγοκέντρηση***

Στην περίπτωση εκχύλισης οργανοχλωριωμένων ενώσεων από δείγματα γάλακτος, μία από τις σημαντικότερες παρεμποδίσεις είναι τα λιπίδια. Μια συνηθισμένη τεχνική απομάκρυνσης των λιπιδίων είναι η φυγοκέντρηση του γάλακτος αφού πρώτα έχει ψυχθεί. Οι λιπαρές ουσίες έχουν χαμηλότερα σημεία τήξεως από το διαλύτη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κατεψυγμένα λιπίδια να μπορούν να αφαιρεθούν με φυγοκέντρηση ή με διήθηση, ενώ οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις παραμένουν διαλυμένες στο διαλύτη. Όμως, η διαλυτότητα των λιπιδίων δεν εξαρτάται μόνο από τη θερμοκρασία αλλά και από το γινόμενο διαλυτότητας. Κατά συνέπεια, η τεχνική αυτή μπορεί να αφαιρέσει ποσότητα λιπιδίων από πολλά λιπαρά υποστρώματα αλλά δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις περιπτώσεις [35, 47].

➢ ***Διαχωρισμός λιπιδίων***

Ο υγρός- υγρός διαχωρισμός χρησιμοποιείται γενικά σαν επιπλέον στάδιο καθαρισμού σε μεθόδους εκχύλισης όπως για παράδειγμα η εκχύλιση στερεάς φάσης, για να ελαχιστοποιήσει τις εκχυλίσεις παρεμποδιζουσών ουσιών από εκχυλίσματα φυτοφαρμάκων. Για παράδειγμα, το 1963, το ακετονιτρίλιο (*MeCN*) χρησιμοποιήθηκε για τον υγρό- υγρό διαχωρισμό μεταξύ ακετονιτριλίου- νερού και πετρελαϊκού αιθέρα, για την απομάκρυνση παρεμποδιζουσών ουσιών πριν την εκχύλιση OCPs. Παρόλα αυτά, ο διαχωρισμός του διαλύτη σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα δεν είναι πολύ διαλυτά σε πολικούς διαλύτες, μπορεί να οδηγήσει απώλεια μερικών αναλυτών με αποτέλεσμα τη μείωση των ανακτήσεων [35, 46-47].

➢ ***Χρωματογραφία προσρόφησης***

Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες διαδικασίες καθαρισμού είναι η χρωματογραφία προσρόφησης. Με την τεχνική αυτή, οι αναλύτες και οι παρεμποδίζουσες ουσίες προσροφώνται σε ένα στερεό προσροφητικό και ακολουθεί έκλουση των επιλεγμένων αναλυτών από το υπόστρωμα και κατακράτηση των παρεμποδιζουσών ουσιών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές στήλες γεμάτες με τροποποιημένο διοξείδιο του πυριτίου (*silica*), οξείδιο του αργιλίου (*alumina*) ή σιλικικό μαγνήσιο (*Florisil*). Αυτά τα υλικά συσκευασίας που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων από λιπίδια, μπορούν να εφαρμοστούν και στο στάδιο της εκχύλισης στερεάς φάσης με ελάχιστες δυσμενείς επιπτώσεις στους αναλύτες. Η τεχνική αυτή μπορεί να συνδυαστεί με διάφορες μεθόδους εκχύλισης για τον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων ενώσεων λιπαρά τρόφιμα όπως το γάλα.

- ***Χρωματογραφία διάχυσης πήκτης (Gel Permeation Chromatography, GPC)***

Η GPC εφαρμόστηκε για τον καθαρισμό των υπολειμμάτων οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων στα τέλη της δεκαετίας του 1970 και αποτέλεσε απαραίτητο βήμα για την απομάκρυνση των λιπιδίων από λιπαρά τρόφιμα. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους (έως και αρκετές εκατοντάδες), όπως για παράδειγμα τα OCPs, από ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους (600-1500 μονάδες μάζας) όπως είναι τα λιπίδια. Τα μεγαλύτερα μόρια κατακρατούνται, ενώ τα μικρότερα εκπλένονται. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία πήκτης συνήθως περιέχουν συμπολυμερή στυρολίου και διβυνυλβενζολίου.

- ***Κατεργασία με οξέα***

Μία άλλη κοινή μέθοδος καθαρισμού για την απομάκρυνση των λιπαρών ουσιών που συν- εκχυλίζονται, είναι η κατεργασία με οξέα όπως για παράδειγμα το θειικό οξύ. Όμως ορισμένα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (π.χ. endrin, dieldrin, endosulfan, chlordane κ.α.) δεν είναι ανθεκτικά στην κατεργασία με αυτό το ισχυρό οξύ αλλά εμφανίζουν σταθερότητα όταν χρησιμοποιούνται ασθενέστερα οξέα όπως το φορμικό οξύ [48].

2.3 Αναλυτικές μέθοδοι εκχύλισης OCPs και PCBs

Οι παραδοσιακές αναλυτικές μέθοδοι εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται, όμως είναι χρονοβόρες, περίπλοκες, δαπανηρές και χρησιμοποιούν μεγάλους όγκους διαλυτών. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί πολλές αναλυτικές τεχνικές για την προκατεργασία τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων και των προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε αυτά τα υποστρώματα. Πρόσφατα γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης μεθόδων που να

απαιτούν μικρότερους όγκους αρχικού δείγματος, να είναι εκλεκτικές ως προς τους αναλύτες που θέλουμε να προσδιορίσουμε, να υπάρχει η δυνατότητα αυτοματοποίησής τους και να απαιτούν μικρότερους όγκους μη τοξικών διαλυτών και συνεπώς να είναι φιλικές προς το περιβάλλον (*πράσινη χημεία*). Δηλαδή, η ιδανική αναλυτική μέθοδος θα πρέπει να είναι γρήγορη, ακριβής, αξιόπιστη, εύκολη, να απαιτεί υλικά χαμηλού κόστους και να είναι φιλική προς το περιβάλλον.

Για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε δείγματα γάλακτος συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται διάφορες συμβατικές μέθοδοι όπως η υγρή-υγρή εκχύλιση (*LLE*) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (*SPE*) αλλά επιπλέον έχουν προταθεί και κάποιες εναλλακτικές μέθοδοι εκχύλισης όπως η εκχύλισης μέσω διασποράς υποστρώματος σε στερεά φάση (*MSPD*) [49], η QuEChERS (*συντομογραφία που προκύπτει από τις λέξεις: γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική και ασφαλής*) [50], η υγρή εκχύλιση υπό πίεση (*PLE*) [51] και η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (*SPME*) [35, 52].

2.3.1 Υγρή- υγρή εκχύλιση (*liquid- liquid extraction, LLE*)

Στην πλέον απλή περίπτωση της εκχύλισης υγρού – υγρού η ουσία κατανέμεται μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων φάσεων. Τις περισσότερες φορές μία από τις δύο φάσεις είναι υδατική ενώ η άλλη είναι ένας οργανικός διαλύτης. Επειδή τα υγρά είναι μη μιγνυόμενα μεταξύ τους σχηματίζουν δύο στιβάδες με το πυκνότερο υγρό να αποτελεί την κάτω στιβάδα. Η ουσία, ενώ αρχικά βρίσκεται στη μία φάση, μετά την εκχύλιση υπάρχει και στις δύο φάσεις. Η κατανομή της ουσίας, δηλαδή ο λόγος των συγκεντρώσεών της στις δύο διαφορετικές στιβάδες, εξαρτάται από τη σχετική διαλυτότητά της στις δύο φάσεις και καθορίζεται από τον συντελεστή ή σταθερά κατανομής, K_D.

Η υγρή- υγρή εκχύλιση εξακολουθεί μέχρι και σήμερα να είναι η προτεινόμενη μεθοδολογία για την εκχύλιση οργανοχλωριωμένων ενώσεων από δείγματα γάλακτος σε υγρή μορφή. Η διαδικασία της μεθόδου αυτής περιλαμβάνει την ανάμειξη και ανακίνηση των δειγμάτων γάλακτος με

επιλεγμένους οργανικούς διαλύτες για να εκχυλιστούν τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων από τον όγκο του γάλακτος.

Όταν χρησιμοποιούνται διαλύτες ή μίγματα διαλυτών που είναι αναμίξιμα με το νερό είναι απαραίτητη μία περαιτέρω επεξεργασία απομάκρυνσης του νερού. Η ανάλυση των δειγμάτων γάλακτος για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων παρουσιάζει πολλά προβλήματα λόγω της πολυπλοκότητας της μήτρας. Μεγάλο ποσοστό του γάλακτος αποτελείται από νερό, λιπίδια, σάκχαρα και πρωτεΐνες τα οποία πρέπει να αφαιρεθούν για να επιτευχθεί η απαιτούμενη ευαισθησία της μεθόδου. Επιπλέον το γάλα τείνει να σχηματίζει γαλακτώματα κατά τη διάρκεια της υγρής- υγρής εκχύλισης. Πολλές φορές η κατεργασία με υπερήχους διευκολύνει την εκχύλιση. Τέλος το σημαντικότερο σημείο στην υγρή- υγρή εκχύλιση είναι η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ή μίγματος διαλυτών.

Γενικά, στην υγρή- υγρή εκχύλιση η επιλογή του διαλύτη γίνεται με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

- δεν αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία, αλλά έχει την ικανότητα να επιδιαλυτώνει τα αφόρτιστα σωματίδια της
- ο συντελεστής κατανομής της εκχυλιζόμενης ουσίας (διαλυτότητα) πρέπει να διαφέρει σημαντικά από αυτούς των παρεμποδίσεων και να έχει τη μέγιστη δυνατή τιμή (ισχύει η βασική αρχή ότι "όμοια διαλύουν όμοια")
- μικρή διαλυτότητα του διαλύτη στο νερό (μικρότερη του 5%)
- διαφορετική πυκνότητα από αυτή του νερού για πληρέστερο και ταχύτερο διαχωρισμό των φάσεων
- ο εκχυλιζόμενος αναλύτης πρέπει να ανακτάται εύκολα (π.χ. με εξάτμιση του διαλύτη)

2.3.2 Στερεή- υγρή εκχύλιση (*solid- liquid extraction, SLE*)

Η στερεή- υγρή εκχύλιση βασίζεται στην αναλογία κατανομής των αναλυτών μεταξύ στερεού και υγρού. Στην εκχύλιση αυτή, στο στερεό

προστίθεται κάποιος διαλύτης έτσι ώστε να απορροφήσει τους αναλύτες και να από το στερεό. Στην περίπτωση του γάλακτος μπορεί να εφαρμοστεί σε γάλατα σε μορφή σκόνης ή και σε υγρά γάλατα αφού πρώτα υποστούν περαιτέρω επεξεργασία με άλατα όπως για παράδειγμα το άνυδρο θειικό νάτριο για να αποκτήσουν τη μορφή σκόνης [53-54]. Όπως και στην υγρή- υγρή εκχύλιση, η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

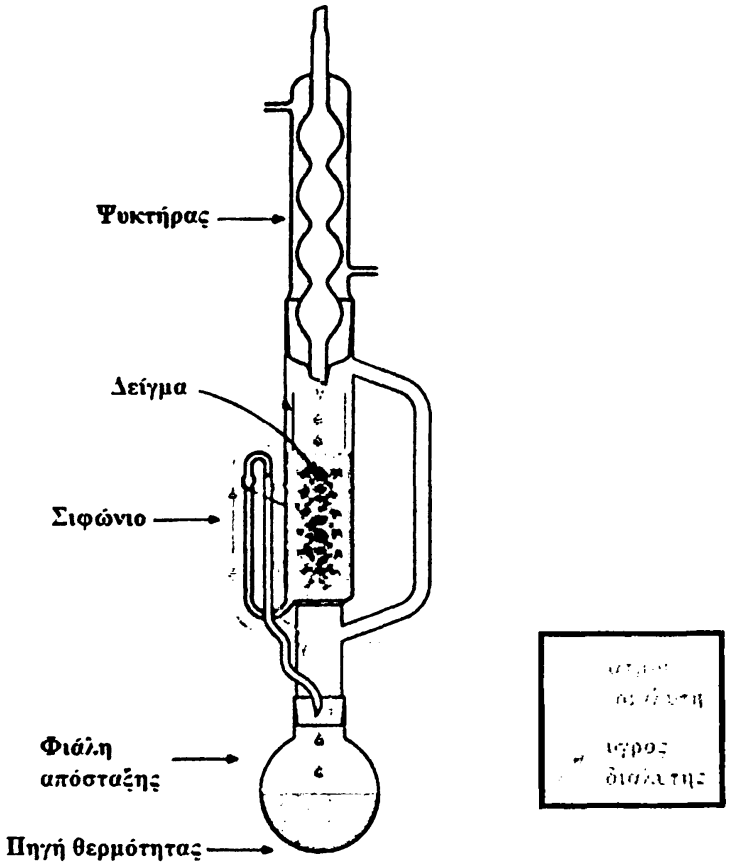
2.3.3 Εκχύλιση Soxhlet

Το 1879, ο von Soxhlet ανέπτυξε ένα νέο σύστημα εκχύλισης το οποίο για μεγάλο χρονικό διάστημα αποτελούσε την πιο διαδεδομένη τεχνική διύλισης [55]. Το δείγμα τοποθετείται σε ένα συγκρατούμενο δακτύλιο ο οποίος βαθμιαία γεμίζει με συμπυκνωμένο απόσταγμα από την φιάλη απόσταξης (*Εικόνα 2.4*). Όταν το υγρό φτάσει το σημείο υπερχείλισης, ένα σιφώνιο «αναπνέει» την διαλυμένη ουσία από τον συγκρατούμενο δακτύλιο και την οδηγεί πίσω στην φιάλη απόσταξης έχοντας συγκρατήσει τους εκχυλιζόμενους αναλύτες. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθεί η εκχύλιση. Η κλασσική εκχύλιση Soxhlet πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνικών καθώς το δείγμα έρχεται επαναλαμβανόμενα σε επαφή με καθαρά εκχυλίσματα. Επιπλέον το σύστημα παραμένει σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία ως αποτέλεσμα της θερμότητας που εφαρμόζεται στην φιάλη απόσταξης [56].

Επιπρόσθετα δεν είναι αναγκαίο κάποιο είδος φιλτραρίσματος μετά την εκχύλιση και ο εμπλουτισμός του δείγματος μπορεί να αυξηθεί εφαρμόζοντας ταυτόχρονες εκχυλίσεις το οποίο διευκολύνεται από το χαμηλό κόστος του βασικού εξοπλισμού. Η εκχύλιση Soxhlet είναι μια πολύ απλή μέθοδος η οποία απαιτεί μικρή εκπαίδευση και μπορεί να εξάγει περισσότερη μάζα δείγματος από πολλές άλλες εναλλακτικές τεχνικές. Η μέθοδος Soxhlet έχει επιδεχτεί μεγάλο αριθμό τροποποιήσεων και έχουν αναπτυχθεί τεχνικές εκχύλισης με βάση αυτήν όπως: η υψηλής πίεσης εκχύλιση Soxhlet, η αυτοματοποιημένη

εκχύλιση Soxhlet, με χρήση υπερήχων αλλά και χρήση μικροκυμάτων εκχύλιση Soxhlet [56].

Η εκχύλιση Soxhlet είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τον προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού φυτοφαρμάκων. Ωστόσο, είναι μία χρονοβόρα διαδικασία, δαπανηρή από άποψη της ενέργειας και απαιτεί μεγάλους όγκους διαλυτών.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος εκχύλισης Soxhlet

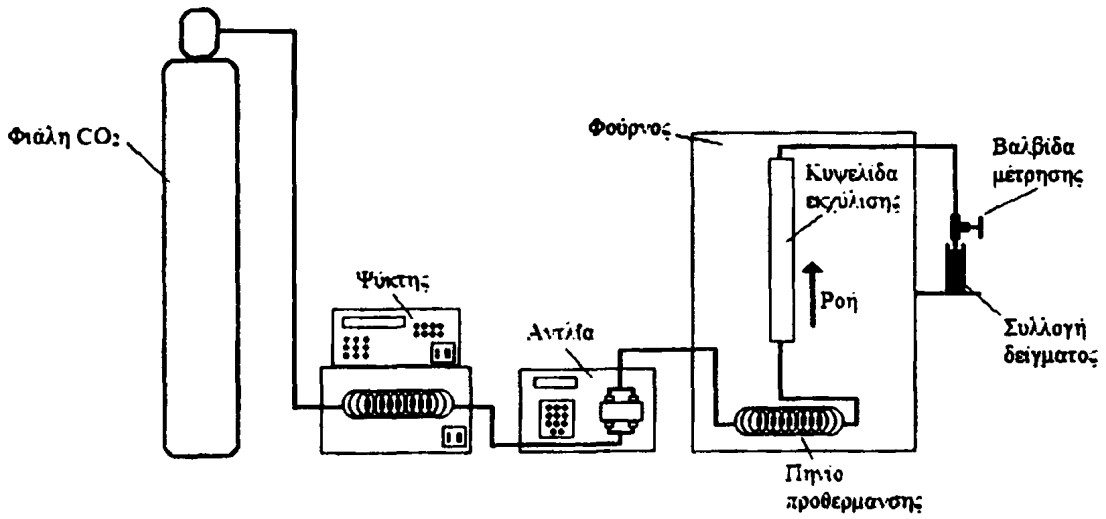
2.3.4 Εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (*Superficial- fluid extraction, SFE*)

Για να ενισχυθούν πολλές μέθοδοι εκχύλισης συνδυάζονται με μηχανήματα τα οποία επιτρέπουν τη ρύθμιση διαφόρων παραμέτρων όπως για παράδειγμα

η θερμοκρασία. Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων αυτών οφείλεται στην αυξημένη θερμοκρασία του διαλύτη που χρησιμοποιείται, γεγονός που αυξάνει την ταχύτητα της εκχύλισης των αναλυτών από στερεές μήτρες. Οι βελτιωμένες αυτές τεχνικές, στηρίζονται στη χρήση θερμοκρασιών υψηλότερων του σημείου βρασμού του διαλύτη εκχύλισης. Μια τέτοια τεχνική είναι η SFE που μοιάζει με την εκχύλιση Soxhlet. Στην SFE, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι ένα υπεκρίσιμο ρευστό (*superficial fluid, SF*).

Πάνω από μία συγκεκριμένη τιμή θερμοκρασίας (T_c) και πίεσης (P_c) οι ατμοί δεν είναι σε στερεή, υγρή ή αέρια φάση αλλά χαρακτηρίζονται ως υπερκρίσιμο ρευστό (*supercritical fluid*). Σε αυτή την κατάσταση έχουν πυκνότητα, διαλυτική ισχύς και ικανότητα διάχυσης παρόμοια με αυτή των υγρών, η διαφορά είναι στο ιξώδες τους το οποίο συγκρίνεται με εκείνο των αερίων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η μεταφορά μάζας να είναι ταχύτερη και ο χρόνος εκχύλισης μειωμένος.

Κατά την εφαρμογή της SFE στην ανάλυση τροφίμων, ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται συνήθως το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) γιατί οι κρίσιμες συνθήκες επιτυγχάνονται εύκολα (*κρίσιμη θερμοκρασία TC 31°C και κρίσιμη πίεση Pc 1073 psi*). Επιπλέον, το CO_2 δεν είναι τοξικό και είναι σχετικά φθηνό. Όμως το συνολικό κόστος της απαιτούμενης διάταξης είναι αρκετά υψηλό [57].



Εικόνα 2.5: *Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστό*

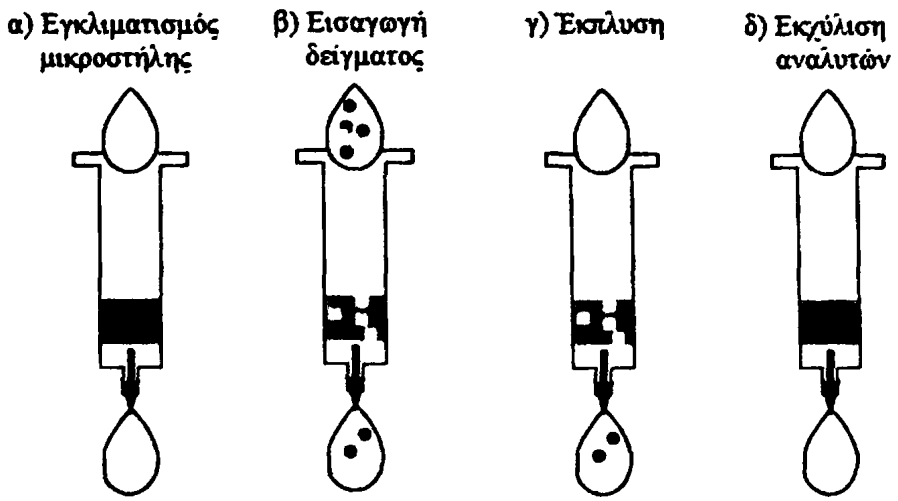
2.3.5 Εκχύλιση στερεάς φάσης *(Solid- phase extraction, SPE)*

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκχύλισης/ καθαρισμού για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε υγρά δείγματα. Ο διαχωρισμός λαμβάνει χώρα σε μικροστήλες (*extraction cartridges*) ή σε δίσκους εκχύλισης (*disks cartridges*), όπου και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει η παρουσία κατάλληλου προσροφητικού υλικού. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία περιλαμβάνει τέσσερα διακριτά στάδια: (α) τον εγκλιματισμό της στήλης με μικρή ποσότητα διαλύτη, (β) την εισαγωγή του δείγματος, με αποτέλεσμα να συγκρατούνται οι αναλύτες από το προσροφητικό υλικό-προσρόφηση, (γ) την έκπλυση, για απομάκρυνση τυχόν παρεμποδίζουσων ουσιών και τέλος, (δ) την εκχύλιση-εκρόφηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων με εισαγωγή κατάλληλου εκλουστικού συστήματος (*Εικόνα 2.6*). Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ο ενεργός άνθρακας και πορώδη πολυμερή [14].

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι πρόκειται για μια απλή και αποτελεσματική μέθοδο εκχύλισης, απαιτεί μικρούς όγκους οργανικών διαλυτών και προσφέρει τη δυνατότητα αυτοματοποίησης [57]. Ωστόσο, πρόκειται για μια χρονοβόρα μέθοδο με υψηλό κόστος, μιας και οι μικροστήλες που χρησιμοποιούνται είναι μίας χρήσης. Ακόμη, στις διαδικασίες πολλών βημάτων υπάρχει πάντα ο κίνδυνος απώλειας μέρους των αναλυτών [35].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσμτικότητα της SPE είναι:

- η επιλογή του διαλύτη έκλουσης (πολικότητα)
- το pH
- το πληρωτικό υλικό
- η ταχύτητα ροής του δείγματος και του διαλύτη έκλουσης



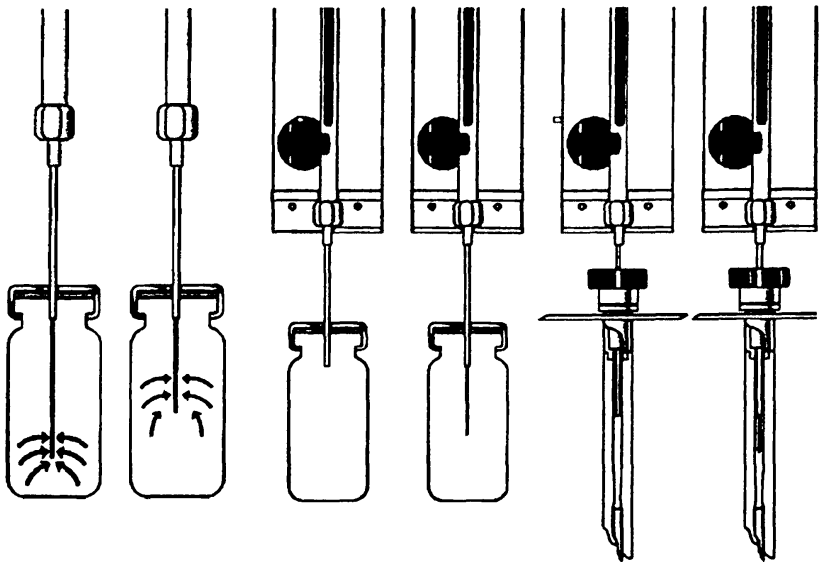
Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης στερεάς φάσης

2.3.6 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης *(Solid- phase microextraction, SPME)*

Η μικρεοκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Pawliszyn και τους συνεργάτες του το 1990 και τα τελευταία χρόνια βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων τόσο σε βιολογικά δείγματα όσο και σε τρόφιμα [33]. Πρόκειται για μία απλή, γρήγορη μέθοδο ενός σταδίου, που δεν απαιτεί διαλύτη εκχύλισης και αυτοματοποιείται εύκολα. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην κατανομή των πτητικών συστατικών μεταξύ του δείγματος και της στερεάς στατικής φάσης (πολυμερές υλικό), με το οποίο είναι επικαλυμμένη η ίνα πηκτής διοξειδίου πυριτίου (*fused silica gel*) της συσκευής [57]. Η μέθοδος της SPME χρησιμοποιείται για υγρά, αέρια και στερεά δείγματα και απομονώνει πτητικά και ημιπτητικά συστατικά.

Η συσκευή, που χρησιμοποιείται, αποτελείται από μια τριχοειδή ίνα πηκτής τετηγμένου διοξειδίου πυριτίου 1 cm, η οποία επικαλύπτεται εξωτερικά από τη στατική φάση. Η ίνα είναι συνδεδεμένη με ένα ατσαλένιο έμβολο και μια συσκευή συγκράτησης που μοιάζει με μικροσύριγγα. Το δείγμα τοποθετείται σε φιαλίδιο, με διάτρητο πώμα, που σφραγίζεται με διάφραγμα (*septum*) (*Εικόνα 2.7*).

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την απομόνωση των ουσιών είναι η στατική φάση της ίνας, η ανάδευση, η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς και το pH του δείγματος, καθώς επίσης και οι συνθήκες εκρόφησης της ίνας και ο όγκος του δείγματος [56].



προσρόφησης εκρόφησης στην ίνα ποικιλία φιαλιδίων για διάφορους τύπους δειγμάτων

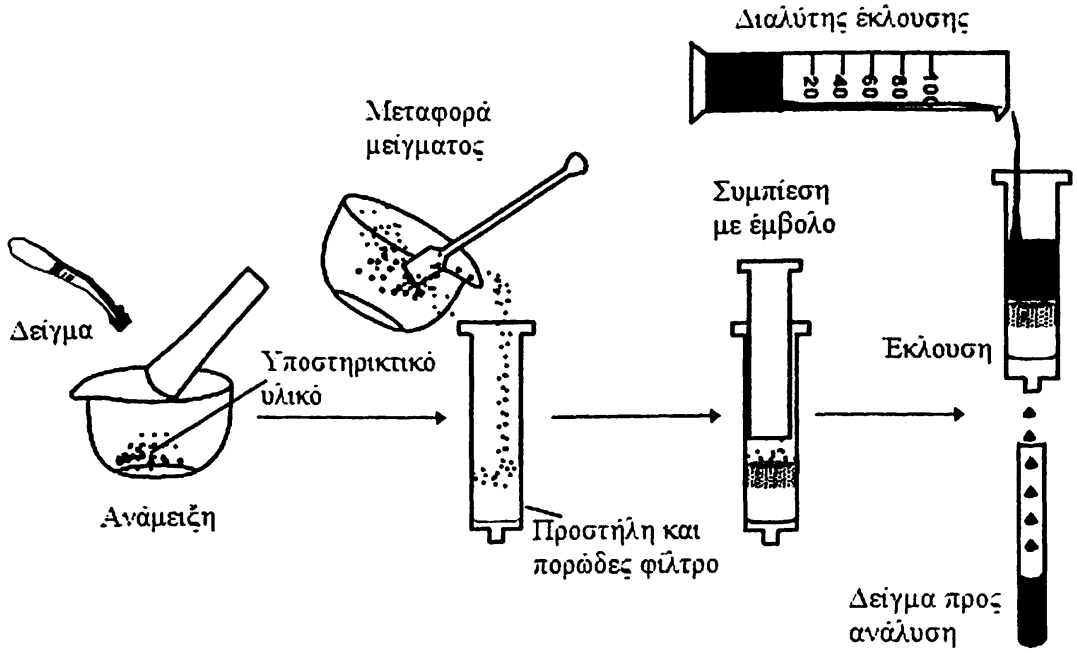
Εικόνα 2.7: Σχηματική αναπαράσταση μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME)

2.3.7 Μέθοδος εκχύλισης μέσω διασποράς υποστρώματος σε στερεά φάση (*Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD*)

Η εκχύλιση μέσω διασποράς υποστρώματος σε στερεά φάση είναι μία τεχνική εκχύλισης και καθαρισμού που βασίζεται στην εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και εισήχθη για πρώτη φορά το 1989. Η κύρια διαφορά μεταξύ της MSPD και της SPE είναι ότι στην SPE τα δείγματα πρέπει να είναι σε υγρή κατάσταση πριν περάσουν από τη στήλη, ενώ η MSPD μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την εκχύλιση στερεών ή παχύρευστων υγρών δειγμάτων [57].

Η τεχνική περιλαμβάνει ανάμειξη ενός παχύρευστου, στερεού ή ημιστερεού δείγματος με ένα υποστηρικτικό υλικό. Το υποστηρικτικό υλικό υπηρετεί τον ίδιο σκοπό όπως η χρήση της άμμου ως λειαντικό. Οι δυνάμεις συνάφειας κατά την ανάμειξη σε γουδί με γουδοχέρι ή με κάποιο άλλο μηχανικό μέσο διαρρηγνύει την συνολική αρχιτεκτονική του δείγματος, διασπώντας το υλικό σε μικρότερα κομμάτια. Ωστόσο, η παρουσία της προσδεμένης οργανικής φάσης δίνει μια περαιτέρω διάσταση στην όλη διαδικασία: τα συστατικά του δείγματος διαλύονται και διασπείρονται μέσα στην προσδεμένη οργανική φάση, στην επιφάνεια των σωματιδίων, οδηγώντας στην πλήρη διάρρηξη του δείγματος και στην διάσπαση του. Τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται στην επιφάνεια με βάση τις σχετικές πολικότητες π.χ. μη-πολικά συστατικά διασπόνται μέσα στην μη-πολική οργανική φάση με βάση τους συντελεστές κατανομή τους με τη φάση και τις δυναμικές αλλαγές που συμβαίνουν καθώς η πορεία προχωρά [56].

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, το δείγμα τοποθετείται σε γουδί που περιέχει κατάλληλο προσδεμένης φάσης στερεό υλικό. Το υποστηρικτικό υλικό και το δείγμα αναμειγνύονται μηχανικά με την χρήση γουδοχεριού μέχρι την ολική διάρρηξη του υποστρώματος και σχηματισμό ενός ομογενοποιημένου μίγματος, αρκετά ξηρό λόγω προσρόφησης των μορίων του νερού στους πόρους του υλικού. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρεται ποσοτικά και πακτώνεται σε μικροστήλη που περιέχει πορώδες φίλτρο για να συγκρατεί το δείγμα. Τέλος, με κατάλληλο σύστημα διαλυτών επιτυγχάνουμε εκχύλιση των αναλυτών και συλλογή του εκλούσματος. Σε αρκετές εφαρμογές της MSPD τοποθετείται στο κάτω μέρος της στήλης και άλλο στερεό υποστηρικτικό υλικό-προστήλη (*co-column*) για μεγαλύτερο βαθμό διαχωρισμού και ως ταυτόχρονο στάδιο καθαρισμού (*clean-up*) (*Εικόνα 2.8*).



Εικόνα 2.8 Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου εκχύλισης μέσω διασποράς υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD)

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης είναι:

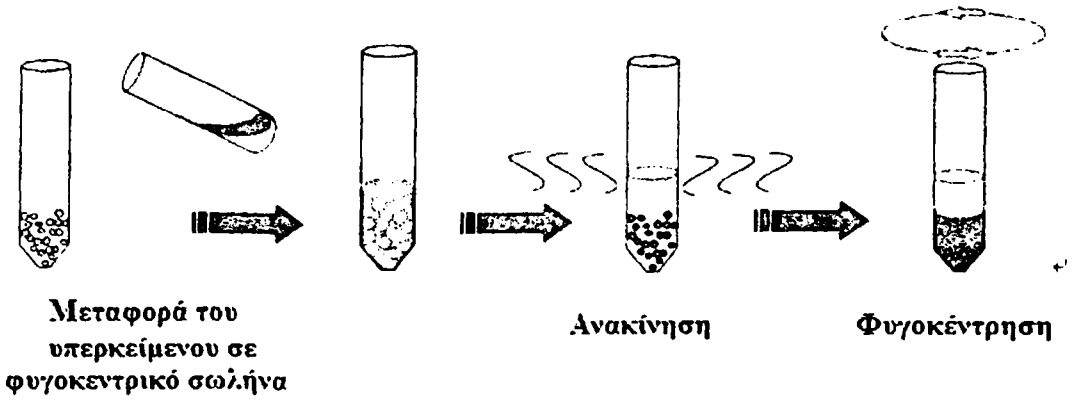
- Η φύση του υποστηρικτικού υλικού
- Η μέση διάμετρος των σωματιδίων
- Η φύση της προσδεμένης φάσης
- Η φύση του υποστρώματος
- Η τροποποίηση του υποστρώματος
- Η φύση του διαλύτη εκχύλισης και η σειρά προσθήκης
- Η αναλογία δείγματος –στερεού

Γενικά, η MSPD είναι μία αποτελεσματική και αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα, όπως το γάλα [49]. Επιπλέον, δίνει τη δυνατότητα καθαρισμού και εκχύλισης του δείγματος σε ένα στάδιο με την χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυτών γεγονός που μειώνει το κόστος και τον χρόνο της ανάλυσης. Όμως, το μειονέκτημά της είναι η εξάτμιση μέρους του διαλύτη κατά τη διάρκεια της εκχύλισης [57].

2.3.8 QuEChERS (*quick, easy, effective, robust and safe)*

Η QuEChERS είναι μία εναλλακτική μέθοδος διαχωρισμού παρέχοντας αξιόπιστα αποτελέσματα σε μικρό αριθμό βημάτων. Η μέθοδος βασίζεται σε ένα απλό στάδιο υγρής υγρής εκχύλισης με χρήση ακετονιτριλίου και $MgSO_4$ ακολουθούμενο από ένα στάδιο καθαρισμού *(clean up)* με εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά *(dispersive SPE)*. Πρόκειται για μία πολύ- υπολειμματική μέθοδο για την ανάλυση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε προϊόντα με χαμηλή περιεκτικότητα λίπους π.χ φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και επεξεργασμένα προϊόντα. Η μέθοδος αρχικά δημιουργήθηκε από τον Δρ. Αναστασσιάδη με στόχο τον προσδιορισμό της υπολλειμματικότητας φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας και ανιχνευτή μαζών *(GC/MS)*. Σε περεταίρω έρευνα ο Lehotay επέκτειναν το πεδίο εφαρμογής της μεθόδου προκειμένου να περιλαμβάνει και φυτοφάρμακα τα οποία συμβαδίζουν με την υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με διαζευγμένο ανιχνευτή μαζών *(LC/MS/MS)* και τροποποίησε το στάδιο καθαρισμού ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος της ανάλυσης σε λιπαρά υποστρώματα *(γάλα, αυγά και αβοκάντο)* [58].

Η QuEChERS αποτελεί μία απλή, γρήγορη, αξιόπιστη και αποτελεσματική μέθοδο για τον προσδιορισμό φυτοφάρμακων. Είναι οικονομική γιατί απαιτεί μικρούς όγκους διαλυτών και δεν χρειάζεται γυάλινα σκεύη. Τα οργανικά οξέα και άλλοι πιθανοί ρυπαντές απομακρύνονται κατά το στάδιο του καθαρισμού. Το κύριο όμως μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι για 1 γρ. δείγματος ανά χιλιοστόλιτρο τελικού εκχυλίσματος η συγκέντρωση του εκχυλίσματος είναι μικρότερη σε σχέση με το συμπυκνωμένο εκχύλισμα που λαμβάνεται σε άλλες κλασσικές μεθόδους εκχύλισης. Οπότε, το τελικό εκχύλισμα πρέπει να συμπυκνώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό έτσι ώστε να εμφανίζει την απαραίτητη ευαισθησία για να φτάσει τα όρια ποσοτικοποίησης (*LOQ*) [57].



Εικόνα 2.9 Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου QuEChERS

2.4 Νανοτεχνολογία

Η έννοια της νανοτεχνολογίας εισήχθηκε το 1959 από τον φυσικό Richard Feynman κατά τη διάρκεια μίας διάλεξης του στην Αμερικανική Φυσική Εταιρεία (*American Physical Society*). Η ομιλία του βασιζόταν στην ιδέα ότι υπήρχε η δυνατότητα οι επιστήμονες να χειρίζονται κάθε υλικό σε ατομικό επίπεδο έτσι ώστε να αποθηκεύονται τεράστιες ποσότητες πληροφορίας σε πολύ μικρό χώρο ή να κατασκευαστούν πολύ μικρές σε μέγεθος συσκευές, οι οποίες θα παράγουν και θα αποθηκεύουν ενέργεια. Επιπλέον, όσο πιο μικρές θα ήταν οι συσκευές αυτές, ιδιότητες της ύλης όπως οι ελκτικές δυνάμεις Van Der Waals και οι επιφανειακές τάσεις δε θα θεωρούνταν πια αμελητέες σε αντίθεση με τη βαρύτητα [59].

Ο όρος «νανοτεχνολογία» εισήχθηκε από τον ερευνητή και συγγραφέα Eric Drexler το 1986 στο βιβλίο του «*Οι Μηχανές της Δημιουργίας*» (*Engines of Creation*). Με τον όρο «νανοτεχνολογία» περιγραφόταν ουσιαστικά η ανάπτυξη συσκευών σε επίπεδο νανοκλίμακας. Πριν από αυτό, όμως, ο Eric Dexler καθιέρωσε κάποιες από τις βασικές αρχές του μοριακού σχεδιασμού και της νανομηχανικής. Στα τέλη της δεκαετίας του '80 και στις αρχές της δεκαετίας του '90 η νανοτεχνολογία ξεφεύγει από τα εργαστήρια των πανεπιστημίων και οι πρώτες εταιρείες αρχίζουν να διεξάγουν έρευνες πάνω

στη νανοεπιστήμη ενώ τη δεκαετία του '00 αρχίζουν να αναπτύσσονται και οι πρώτες εμπορικές εφαρμογές της νανοτεχνολογίας [60].

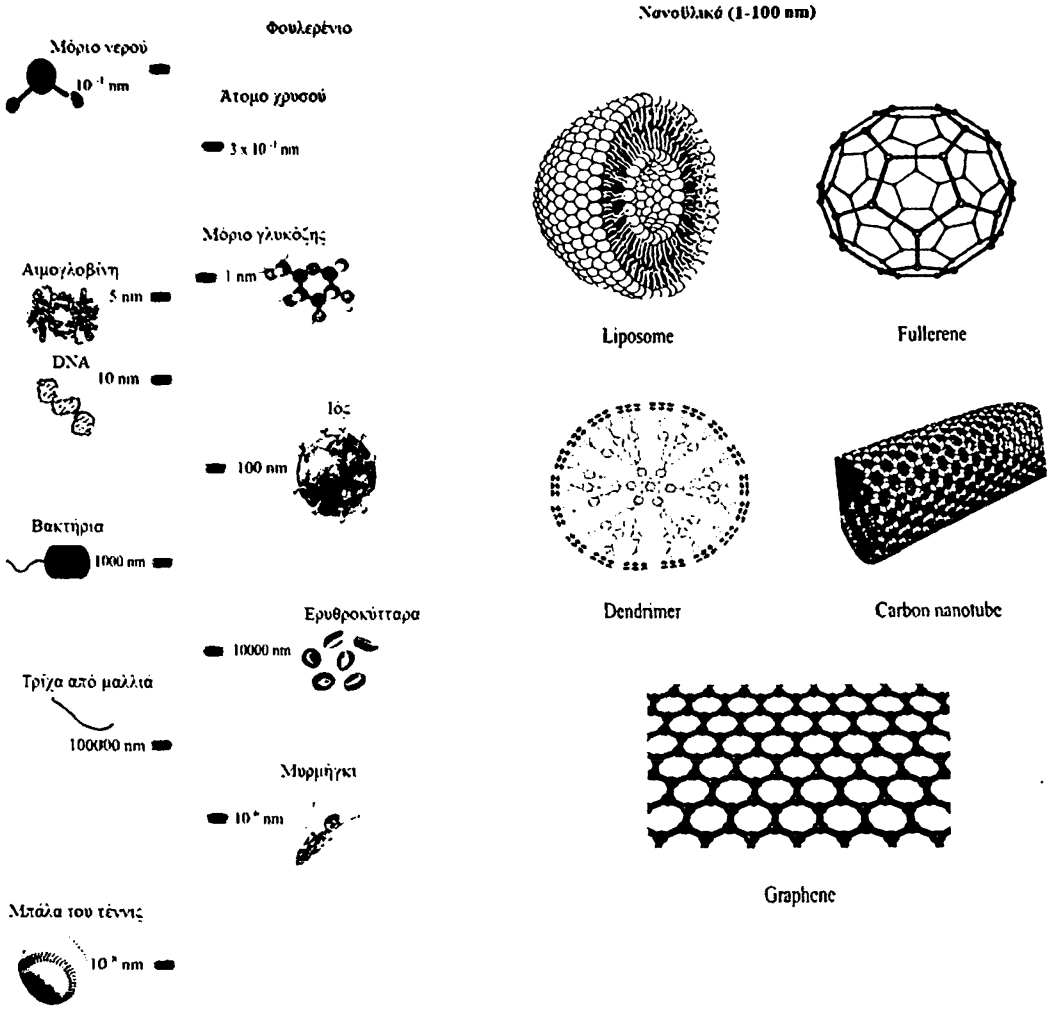
Υπάρχουν πολλοί ορισμοί για τις νανοεπιστήμες και τις νανοτεχνολογίες, οι οποίες επισημαίνουν το πολύ μικρό μέγεθος των νανοϋλικών (συνήθως 1-100nm). Ως νανοτεχνολογία ορίζεται το πεδίο των εφαρμογών της μηχανικής που χρησιμοποιεί δομές μεγέθους μορίου. Η κλίμακα μέτρησης των δομών αυτών είναι η νανοκλίμακα και αποδίδει τα μεγέθη τους σε νανόμετρα (nm), δηλαδή σε πολλαπλάσια του ενός δισεκατομμυριοστού του μέτρου. Ως επί το πλείστον, στο πεδίο της νανοτεχνολογίας οι δομές ενδιαφέροντος συνήθως έχουν μέγεθος μικρότερο των 100nm. Συγκριτικά, η διατομή μιας ανθρώπινης τρίχας είναι περίπου 60.000nm, ενός μορίου DNA από 2 έως 2,5 nm, και ενός μορίου νερού σχεδόν 0,3nm (*Εικόνα 2.10*).

Σύμφωνα με σύσταση που εξέδωσε η Ευρωπαϊκή Επιτροπή τον Οκτώβρη του 2011, ως νανοϋλικά ορίζονται τα υλικά των οποίων τα κύρια συστατικά έχουν διαστάσεις μεταξύ ενός και 100 δισεκατομμυριοστών του μέτρου.

Οι δράσεις της νανοτεχνολογίας περιλαμβάνουν το σχεδιασμό και την κατασκευή των υλικών στο επίπεδο του μορίου και το ατόμου, καθώς και τις ποικίλες εφαρμογές των υλικών αυτών. Η ύλη, στα επίπεδα που την εξετάζει η νανοτεχνολογία, εμφανίζει ιδιότητες κβαντικής φύσεως, τελείως διαφορετικές από τις ιδιότητες των μακροσκοπικών μεγεθών που περιτριγυρίζουν τον άνθρωπο στην καθημερινότητα του. Συνεπώς, η νανοτεχνολογία έχει χαρακτήρα διεπιστημονικό, αφού συνδυάζεται άριστα με τις υπόλοιπες επιστήμες των οποίων οι δομές που τις απαρτίζουν μετρώνται και αυτές στην ίδια κλίμακα (νανοκλίμακα), όπως η κβαντική φυσική, η χημεία, η βιολογία, η πληροφορική και μικροηλεκτρονική κτλ.

Οι δυνατότητες εξέλιξης που προσφέρουν τα εργαλεία της νανοτεχνολογίας αφενός υπόσχονται να επιλύσουν πολλές παγκόσμιες προκλήσεις που απασχολούν τον άνθρωπο, όπως ζητήματα βιομηχανικής παραγωγής, προστασίας του περιβάλλοντος, επικοινωνίας, ιατρικής κτλ. Αφετέρου όμως, εγείρουν πολλά ερωτήματα σχετικά με το κατά πόσο είναι απόλυτα εφικτή η υπεύθυνη ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας στα πλαίσια της καθημερινότητας

του ανθρώπου χωρίς την ύπαρξη ηθικά αμφιλεγόμενων εφαρμογών της.



Εικόνα 2.10: Σύγκριση του μεγέθους των νανοϋλικών [11]

2.4.1 Η Νανοτεχνολογία στην Αναλυτική Χημεία

Η Αναλυτική επιστήμη δεν θα μπορούσε να μείνει ανέπαφη από την ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας. Στην πραγματικότητα, είναι παρούσα ακόμα και σε πολλούς ορισμούς της νανοτεχνολογίας και της νανοεπιστήμης, μιας και σ' αυτό τον τομέα είναι απαραίτητη η ακρίβεια των αποτελεσμάτων για την σωστή αξιολόγηση των πληροφοριών που προκύπτουν. Παράλληλα με τον προσδιορισμό των φυσικών χαρακτηριστικών των νανοϋλικών (διαστάσεις, τυπικές φυσικές ιδιότητες, τοπογραφία κ.α.) είναι απαραίτητος και ο

προσδιορισμός των χημικών τους ιδιοτήτων (σύνθεση, χειρομορφία, χημική συμπεριφορά κ.α.) μιας και οι δύο αυτοί τύποι πληροφοριών είναι αλληλένδετες (φυσικοχημικές ιδιότητες).

Επιπλέον τα νανοϋλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως «αναλυτικά εργαλεία» για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων ή για να βελτιώσουν τις ήδη υπάρχουσες, εκμεταλλευόμενοι το μέγεθός τους και τις μοναδικές τους ιδιότητες. Γενικά, μια αναλυτική διαδικασία μπορεί να χωριστεί σε διάφορα στάδια. Τα στάδια της αναλυτικής διαδικασίας στα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν νανοϋλικά είναι η επεξεργασία/ καθαρισμός του δείγματος, η εκχύλιση και ο χρωματογραφικός προσδιορισμός (τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται ως στατική φάση). Τα νανοσωματίδια ανάλογα με το ρόλο τους στην αναλυτική διαδικασία κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

- Νανοϋλικά που χρησιμοποιούνται ως προσροφητικά. Στην περίπτωση αυτή υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των ναονοσωματιδίων και των αναλυτών.
- Νανοϋλικά που λειτουργούν ως αδρανές υπόστρωμα. Για παράδειγμα τα υλικά που αποτελούνται από διοξείδιο του πυριτίου (silica) μπορούν να τροποποιηθούν με άλλες ομάδες.
- Νανοϋλικά που λειτουργούν ως παράγοντες ιοντισμού για την άμεση ανάλυση δειγμάτων με φασματομετρία μάζας δευτερογενούς ιοντισμού (*secondary ion mass spectrometry, SIMS*).
- Νανοσωματίδια με μαγνητικές ιδιότητες. Σε αυτή την περίπτωση η χρήση ενός μαγνητικού πεδίου μπορεί να απλοποιήσει την αναλυτική διαδικασία. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να απορροφήσουν τον άμεσα ή μετά από ενεργοποίηση με οργανικές ομάδες [61].

2.4.2 Τροποποιημένα μαγνητικά νανοϋλικά (*functionalized magnetic nanoparticles*)

Τα μαγνητικά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγέθη της νανοκλίμακας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από οποιοδήποτε άλλο υλικό. Υπάρχουν πολλά μαγνητικά υλικά, όπως του σιδήρου (*Fe*), κοβαλτίου (*Co*), νικελίου (*Ni*),

μαγνητίτη (Fe_3O_4), μαγκεμίτη (c-Fe_2O_3) κ.α.. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μαγνητικά υλικά είναι αυτά των οξειδίων του σιδήρου (c-Fe_2O_3 και Fe_3O_4) εξαιτίας των ακόλουθων πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν [62]:

1. Ευκολία σύνθεσης (υπάρχουν πολλές απλές και γρήγορες μέθοδοι).
2. Ευκολία τροποποίησης της επιφάνειας (δυνατότητα εύκολης τροποποίησης με λειτουργικές ομάδες λόγω της ύπαρξης των υδροξυλίων στην επιφάνεια των οξειδίων του σιδήρου).
3. Ευκολία χρήσης (λόγω των μαγνητικών τους ιδιοτήτων, μπορούν εύκολα να απομονωθούν από το διάλυμα με την χρήση μόνο ενός απλού μαγνήτη).
4. Σταθερότητα (τα μαγνητικά υλικά μπορούν συνήθως να επαναχρησιμοποιηθούν μετά από κατάλληλες εκπλύσεις).
5. Εξαιρετική ικανότητα διασποράς σε υδατικό διάλυμα.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλές διαφορετικές διαδικασίες σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων. Κάποιες από αυτές αποτελούνται από ένα στάδιο και κάποιες από περισσότερα. Όλες οι πορείες σύνθεσης εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ενώ καμία από αυτές δεν παρέχει έναν τρόπο σύνθεσης όλων των μαγνητικών νανοσωματιδίων. Ακολουθούν οι πιο συχνά εμφανιζόμενες τεχνικές σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων με πιο κοινή την τεχνική της συγκαταβύθισης.

1. Η μέθοδος της **υδρολυτικής καταβύθισης** αποτελεί μία από τις παλαιότερες τεχνικές. Πραγματοποιείται με τη προσεχτική ρύθμιση του pH ενός διαλύματος δισθενούς σιδήρου με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πλέγματος μαγνητικών οξειδίων σιδήρου μέσω της αρχικής παραγωγής $Fe(OH)_2$ και αντιδράσεων αφυδάτωσης, συμπύκνωσης και οξείδωσης. Τα νανοσωματίδια που παρασκευάζονται με αυτήν την μέθοδο έχουν μέγεθος 5 nm. Αυτή η τεχνική είναι απλή και δεν απαιτεί συγκεκριμένο εργαστηριακό εξοπλισμό.

2. Με τη μέθοδο της **συγκαταβύθισης**, υδατικά διαλύματα σιδηρούχων (Fe^{+2}) και σιδηρικών (Fe^{+3}) ιόντων σιδήρου, παρουσία περίσσειας υδροξυλίων

(αλκαλικό περιβάλλον), οδηγούν ταχύτατα στην παρασκευή σωματιδίων μαγνητίτη, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$$Fe^{+2} + 2Fe^{+3} + 8OH^{-} \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O$$

Η μέθοδος αυτή έχει το μειονέκτημα ότι τα ιόντα μετάλλου που παίρνουν μέρος σε αυτήν τη σύνθεση καταβυθίζονται σε διαφορετικά pH το οποίο αποτελεί βασικό παράγοντα για τη ρύθμιση του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Πρέπει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο ότι είναι απαραίτητη η αποφυγή της οξείδωσης του Fe^{+2} για τη δημιουργία μαγνητίτη.

3. Ο **σχηματισμός ανάστροφων μικκυλίων** αποτελεί ένα μηχανισμό σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων ο οποίος εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, ο παραπάνω σχηματισμός πραγματοποιείται με τη χρήση επιφανειοδραστικών ουσιών. Επιφανειοδραστικές είναι οι ουσίες οι οποίες διαθέτουν μία υδρόφιλη κεφαλή και μία μακριά υδρόφοβη αλυσίδα. Ο σχηματισμός των μικκυλίων συμβαίνει όταν η συγκέντρωση των επιφανειοδραστικών μορίων φτάσει σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο. Τα κανονικά μικκύλια σχηματίζονται σε υδατικό μέσο ενώ τα ανάστροφα σε ελαιώδες μέσο. Το κέντρο των ανάστροφων μικκυλίων είναι υδρόφιλο και μπορούν να αποθηκευτούν εκεί τα ανόργανα συστατικά του μίγματος της αντίδρασης. Για τη σύνθεση των μαγνητικών οξειδίων του σιδήρου ανόργανες πρόδρομες ουσίες όπως χλωριούχος σίδηρος διαλύονται σε υδατικό μέσο και προστίθενται σε ελαιώδες μείγμα το οποίο περιέχει επιφανειοδραστικές ουσίες.

Βασικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η ρύθμιση του μεγέθους των νανοσωματιδίων που συντίθενται όπως και η ύπαρξη μικρής διασποράς του μεγέθους τους. Όμως επειδή η διάμετρος των μικκυλίων κυμαίνεται από 20 μέχρι 500 nm· δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων. με αυτήν τη μέθοδο, των οποίων το επιθυμητό μέγεθος να βρίσκεται έξω από τα παραπάνω όρια.

4. Η μέθοδος της **εξάτμισης** πραγματοποιείται όταν πτητικές ενώσεις μετάλλου θερμαίνονται σε περιβάλλον αδρανούς αερίου. Υπό αυτές τις συνθήκες οι συγκεκριμένες ενώσεις αποσυντίθενται και σχηματίζουν

νανοσωματίδια μετάλλου. Έτσι υπάρχει δυνατότητα σύνθεσης νανοσωματιδίων μαγνητίτη και μαγκεμίτη μέσω της οξείδωσης πρόδρομων ενώσεων σιδήρου όπως $Fe(CO)_5$.

5. Η **θερμολυτική** μέθοδος βασίζεται στη θερμική αποδόμηση οργανομεταλλικών ενώσεων του σιδήρου σε οργανικούς διαλύτες υψηλού σημείου ζέσεως (250 – 300 ^oC). Τα νανοσωματίδια που λαμβάνονται είναι συνήθως μεγέθους 4 nm έως 20 nm. Η διάσπαση οργανομεταλλικών συμπλόκων σιδήρου παρουσία επιφανειοδραστικών μορίων, χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες με υψηλές θερμοκρασίες βρασμού, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μαγνητικών νανοσωματιδίων με πολύ καλό έλεγχο μεγέθους και πολύ μικρή διασπορά.. Τα δομικά χαρακτηριστικά των προϊόντων εξαρτώνται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία σύνθεσης και ο ρυθμός αύξησής της, η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, η φύση του διαλύτη και των προδρόμων μεταλλικών ενώσεων, ακόμη και της ταχύτητας με την οποία προστίθενται τα αντιδραστήρια [63, 64].

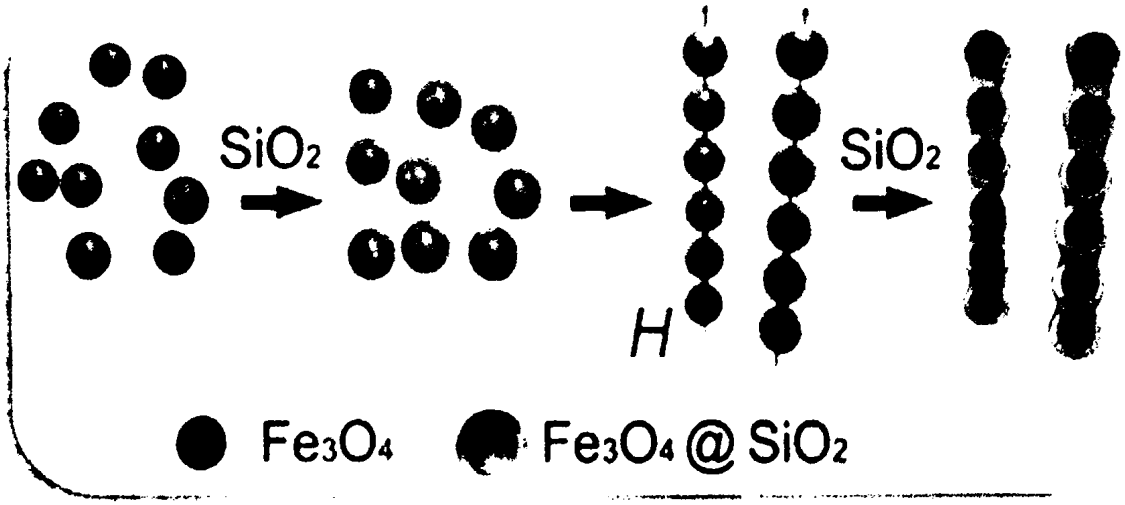
Μολονότι τα οξείδια του σιδήρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα για την απομόνωση των επιλεγμένων αναλυτών, συνήθως τροποποιούνται πριν την χρήση με επιλεγμένες λειτουργικές ομάδες για να αποκτήσουν επιθυμητές ιδιότητες. Η πιο συνηθισμένη τροποποίηση των οξειδίων του σιδήρου είναι η σιλανοποίηση, δηλαδή η τροποποίηση με διοξείδιο του πυριτίου (*silica*) (*Εικόνα 2.11*). Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα που προσφέρει αυτή η διαδικασία τροποποίησης είναι τα εξής [62]:

1. Το διοξείδιο του πυριτίου μπορεί εύκολα να επιστρωθεί στην επιφάνεια του οξειδίου του σιδήρου μέσω της διαδικασίας sol- gel κατά την οποία γίνεται υδρόλυση και συμπύκνωση αλκόξυ-σιλανίου (*μέθοδος Stober*).

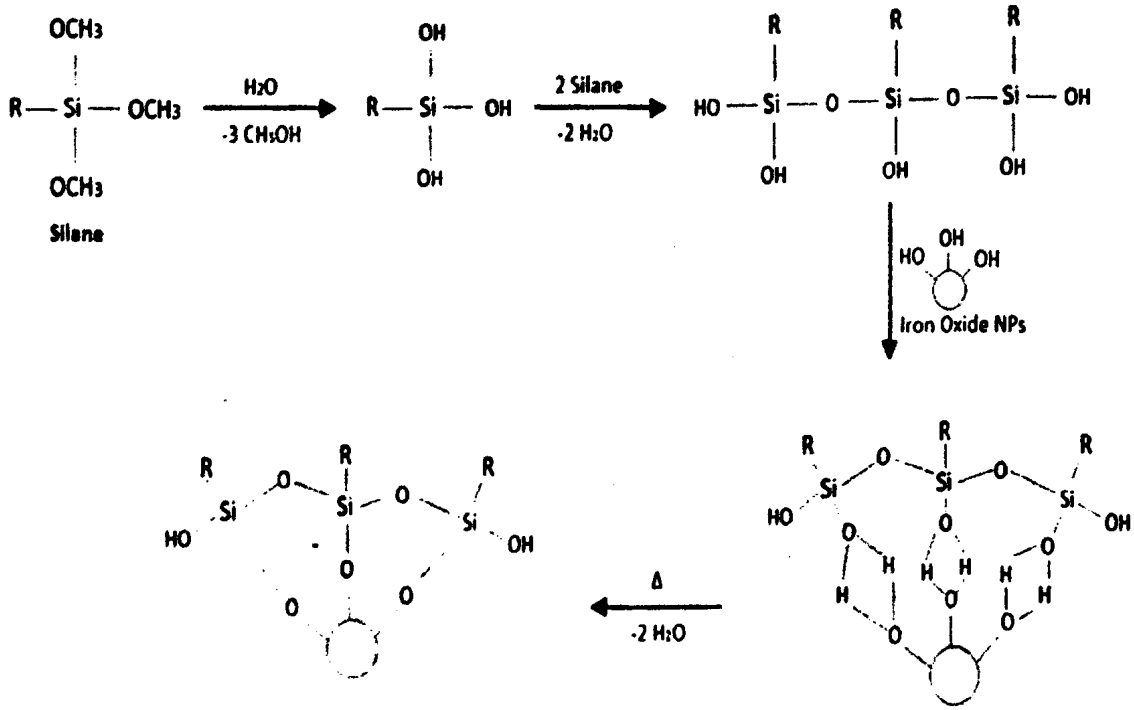
2. Τα επικαλυμένα με διοξείδιο του πυριτίου οξείδια του σιδήρου είναι πιο σταθερά από καθαρά οξείδια του σιδήρου γιατί η πυριτία τα προστατεύει από την οξείδωση.

3. Η επικάλυψη με διοξείδιο του πυριτίου αποτρέπει την συσωμάτωση.

4. Τα επικαλυμένα με διοξείδιο του πυριτίου οξείδια του σιδήρου, μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με άλλες λειτουργικές ομάδες (π.χ. αλκυλομάδες) ανάλογα με τις επιθυμητές ιδιότητες (*Εικόνα 2.12*).



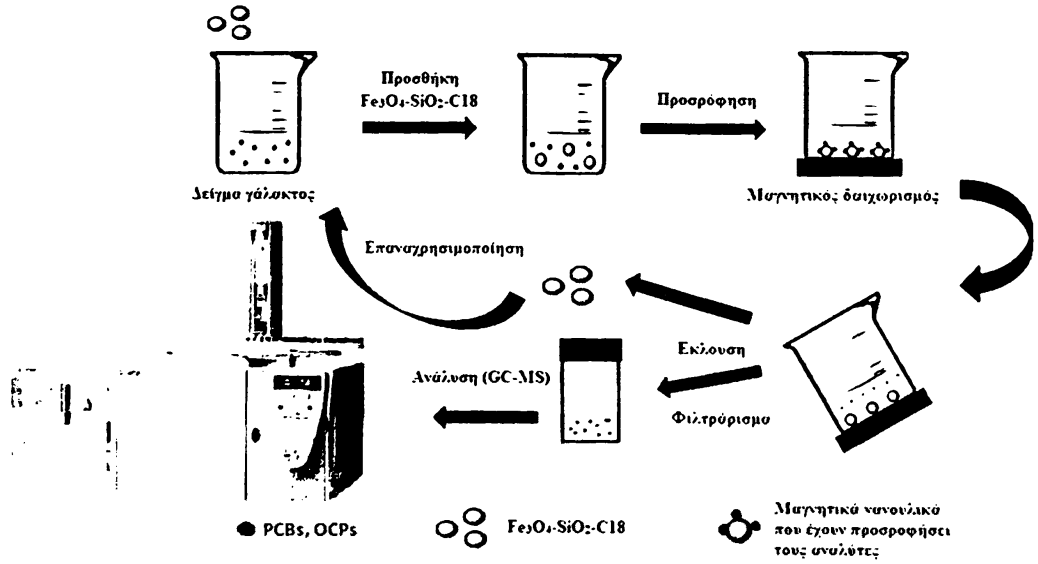
Εικόνα 2.11: *Σχηματική αναπαράσταση τροποποίησης μαγνητίτη με διοξείδιο του πυριτίου*



Εικόνα 2.12: *Φυσικοχημικός μηχανισμός τροποποίησης της επιφάνειας των οξειδίων του σιδήρου*

2.5 Εκχύλιση στερεάς φάσης βασισμένη σε μαγνητικά νανοϋλικά (*Magnetic solid phase extraction, MSPE)*

Τον τελευταίο καιρό υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για τα μαγνητικά νανοϋλικά λόγω του μεγέθους τους (τάξης μεγέθους micro- ή nano-) και των εξαιρετικών ηλεκτρικών και μαγνητικών ιδιοτήτων τους. Η μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης (*MSPE*) είναι μια παραλλαγή της SPE που βασίζεται στην χρήση μαγνητικών ή μαγνητιζόμενων προσροφητικών και παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Το προσροφητικό δεν χρειάζεται να συσκευάζεται σε φυσίγγια SPE. Τα μαγνητικά νανοϋλικά διασπείρονται μέσα στο διάλυμα, αυξάνεται η επιφάνεια επαφής μεταξύ διαλύματος και προσροφητικού με αποτέλεσμα την εύκολη προσρόφηση των αναλυτών, βελτιώνοντας έτσι την απόδοση της εκχύλισης [61, 65]. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της μεθόδου MSPE είναι το γεγονός ότι τα μαγνητικά σωματίδια που έχουν προσροφήσει τους επιθυμητούς αναλύτες μπορούν εύκολα να απομονωθούν από το διάλυμα με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (*Εικόνα 2.13*). Επιπλέον, είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον καθώς απαιτεί μικρούς όγκους διαλυτών.



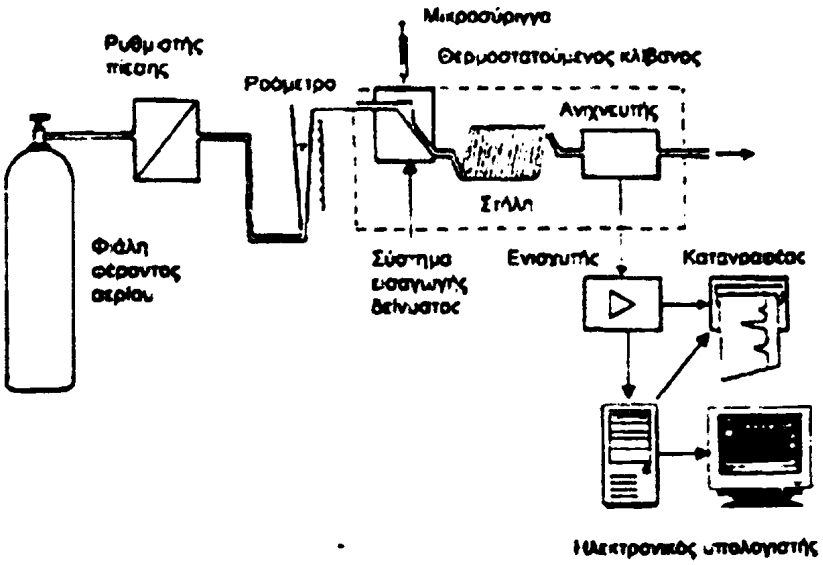
Εικόνα 2.13: *Σχηματική αναπαράσταση μαγνητικής εκχύλισης στερεάς φάσης (MSPE).*

2.6 Τεχνικές χρωματογραφικής ανάλυσης

Μετά την απομόνωση των οργανικών ενώσεων από το υπόστρωμα ακολουθεί η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυόμενων ουσιών με συστήματα χρωματογραφίας. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων επιτυγχάνεται συνήθως με τεχνικές αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography-GC) και υγρής χρωματογραφίας (Liquid Chromatography-LC) σε συνδυασμό με την χρήση ειδικών ανιχνευτών.

➢ ***Αέρια Χρωματογραφία***

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.λπ. *(Εικόνα 2.14).*



Εικόνα 2.14: Διάταξη ενός Αέριου Χρωματογράφου

Το φέρον αέριο (He, N_2, H_2) πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης. Η επιλογή του φέροντος

αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται [66, 67].

Σημαντικό ρόλο παίζει η στήλη η οποία αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο χώρο, από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό. Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης [66, 67].

Διάφοροι ανιχνευτές χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία. Ορισμένοι από αυτούς είναι ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (*Flame ionization detector-FID*) ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις περισσότερες οργανικές ενώσεις, ο ανιχνευτής αζώτου- φωσφόρου(*Nitrogen-Phosphorous detector- NPD)* κατάλληλος για την ανίχνευση ενώσεων εμπεριεχόμενων ατόμων αζώτου ή φωσφόρου, ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (*Electron capture detector-ECD)* ένας αρκετά εκλεκτικός ανιχνευτής ως προς τις αλογονούχες ενώσεις και ο ανιχνευτής θερμιονικής φλόγας (*Flame thermionic detector-FTD).* Ένας αέριος χρωματογράφος μπορεί να συζευχθεί με φασματομετρία μάζας ταχείας σάρωσης. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (ΜΒ) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους [66, 67].

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από:

1.Το θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου

2.Τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγω m/z

3.Τον ανιχνευτή

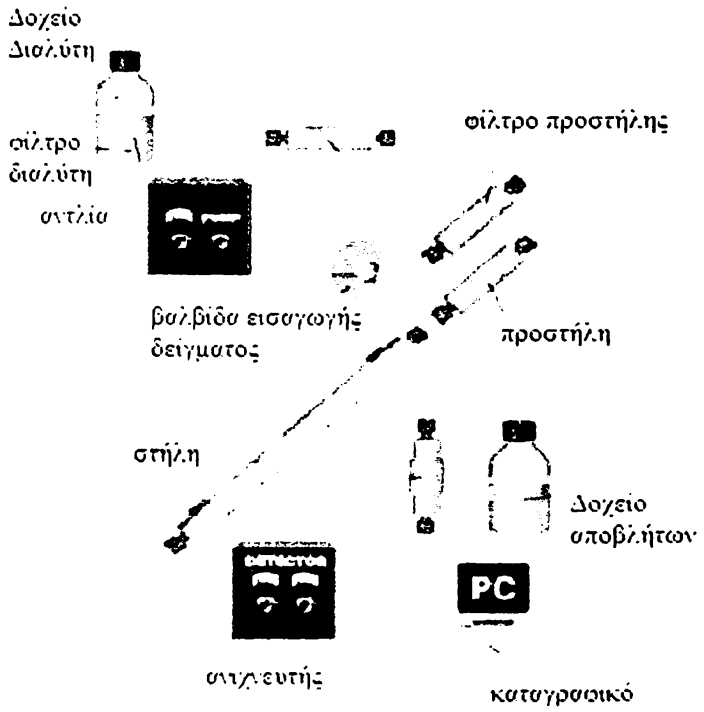
Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπασή της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού. Επίσης απομακρύνονται τα μόριά της και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από το χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση.

Ο αναλυτής αποτελείται από ένα σωλήνα σε σχήμα τόξου, που βρίσκεται μέσα σε ομογενές μαγνητικό πεδίο μεγάλης έντασης (3000-4000 gauss) και σε διεύθυνση κάθετη προς τις δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου. Με δύο κυκλικές οπές – διαφράγματα μεταβλητής ακτίνας στην αρχή και στο τέλος του σωλήνα ένα μέρος από τα ιόντα που δεν εστιάζονται στο κέντρο των διαφραγμάτων απορρίπτεται.

Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αερίων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων (EI). Κατά τον ιοντισμό της ένωσης με ηλεκτρόνια, ο οποίος επιτυγχάνεται με βομβαρδισμό μορίων αυτής με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας (συνήθως 70 eV), δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μέρους της ένωσης μια κατιοντική ρίζα, που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Οι κατιοντικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια κινούνται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το m/z. Άλλοι τρόποι σχηματισμού ιόντων είναι: ο χημικός ιοντισμός (CI), η εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (FI), ο βομβαρδισμό με γρήγορα ουδέτερα άτομα Xe ή Ar ή ιόντα Cs (FIB) [56, 66-67].

➢ ***Υγρή Χρωματογραφία***

Στην υγρή χρωματογραφία είναι δυνατός ο διαχωρισμός μη-πτητικών, θερμοευαίσθητων ή πολικών ενώσεων που δεν είναι δυνατή η ανάλυση τους με την αέρια χρωματογραφία. Μπορούν να αναλυθούν δείγματα με μεγάλα μόρια και για θερμικά ασταθείς ενώσεις των οποίων δεν είναι δυνατή η εξαέρωση χωρίς τη διάσπαση τους. Οι κυριότεροι ανιχνευτές στην LC είναι ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (*UV-Vis*), ο ανιχνευτής υπερύθρου, οι ανιχνευτές φθορισμού, ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής, ο ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού συστοιχίας διόδων (*UV-DAD*). Η συνδυασμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών (*LC-MS*) χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία, εκλεκτικότητα και αξιοπιστία με αποτέλεσμα την εφαρμογή της στον προσδιορισμό πλήθους αναλυτών σε ιδιαιτέρως πολύπλοκα υποστρώματα [14, 67]. Στην εικόνα 2.15 αναπαριστάται η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου.



Εικόνα 2.15 Διάταξη ενός Υγρού Χρωματογράφου

2.7 Επεξεργασία δεδομένων με τη βοήθεια στατιστικής ανάλυσης

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 τον όρο χημειομετρία (*chemometrics*). Η Διεθνής Κοινότητα Χημειομετρίας (*International 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 κλάδος της αναλυτικής χημείας από τα μέσα του 1970 αν και η προέλευση και ανάπτυξη των μεθόδων της βρίσκεται στους τομείς της οικονομίας και της ψυχολογίας. Έχει εφαρμογές σχεδόν σε όλες τις επιστήμες. 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.

Στη συνέχεια περιγράφονται κάποιες χημειομετρικές μέθοδοι, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής διατριβής για τη βελτιστοποίηση της προτεινόμενης αναλυτικής μεθόδου. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δε θα πρέπει να γίνεται υπερεκτίμηση των χημειομετρικών μεθόδων. Αποτελούν απλά εργαλεία για την εξαγωγή πληροφοριών από τα «σωστά» δεδομένα και εφόσον είναι γνωστοί οι βασικοί στόχοι, οι υποθέσεις που γίνονται και οι αδυναμίες της μεθόδου που χρησιμοποιείται [6].

2.7.1 Δοκιμασία student, t (*t-Test*)

Υπάρχουν τρία είδη δοκιμασίας t [6, 68]. Η βασικότερη εφαρμογή αυτής της δοκιμασίας είναι η σύγκριση του μέσου όρου, y, με μία γνωστή πραγματική τιμή (μ). Η στατιστική τιμή t υπολογίζεται από τη σχέση:

$$t = \frac{(y-\mu)}{s}\sqrt{N} \qquad \text{(εξ. 2.1)}$$

όπου s η τυπική απόκλιση:

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma(y-yi^2)}{N-1}} \qquad \text{(εξ. 2.2)}$$

όπου y_i = μια από τις πραγματικές τιμές (*N πλήθους*) και y = η μέση τιμή

Στη συνέχεια συγκρίνεται με μια τιμή *t* του πίνακα (*Πίνακας 1, Παράρτημα Ι*) για δοσμένο αριθμό αποτελεσμάτων με την επιθυμητή στάθμη εμπιστοσύνης. Αν η τιμή *t* που υπολογίζεται είναι μεγαλύτερη της τιμής *t* του πίνακα, τότε υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκρινόμενων τιμών στη συγκεκριμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Αν δεν ξεπερνά την τιμή του πίνακα τότε μπορεί να προβλεφθεί πως δεν υπάρχει σημαντική διαφορά. Αυτό δεν 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 μία 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 ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Στην περίπτωση αυτή η στατιστική τιμή *t* υπολογίζεται από τη σχέση:

$$t = \frac{d}{s_d}\sqrt{N} \qquad \text{(εξ. 2.3)}$$

όπου

$$s_d = \sqrt{\frac{\Sigma(di-d)^2}{N-1}} \qquad \text{(εξ. 2.4)}$$

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

d = η μέση τιμή όλων των διαφορών

Τέλος, η διαδικασία αύτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση των μέσων τιμών δύο διαφορετικών, y_1 και y_2. Εδώ, η τιμή t εκφράζεται ως:

$$t = \frac{y_1 - y_2}{s_p\sqrt{(1/N_1 + 1/N_2)}} \qquad \text{(εξ. 2.5)}$$

όπου

$$s_p = \sqrt{\frac{(N_1-1)s_1^2+(N_2-1)s_2^2}{N_1+N_2-2}} \qquad \text{(εξ. 2.6)}$$

με N_1 και N_2 το πλήθος των δεδομένων για κάθε δείγμα, s_p η συνολική τυπική απόκλιση και s_1 και 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. Αυτό σημαίνει πως όσο μικρότερη είναι η τιμή του t τόσο πιο βέβαιοι είμαστε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων [6].

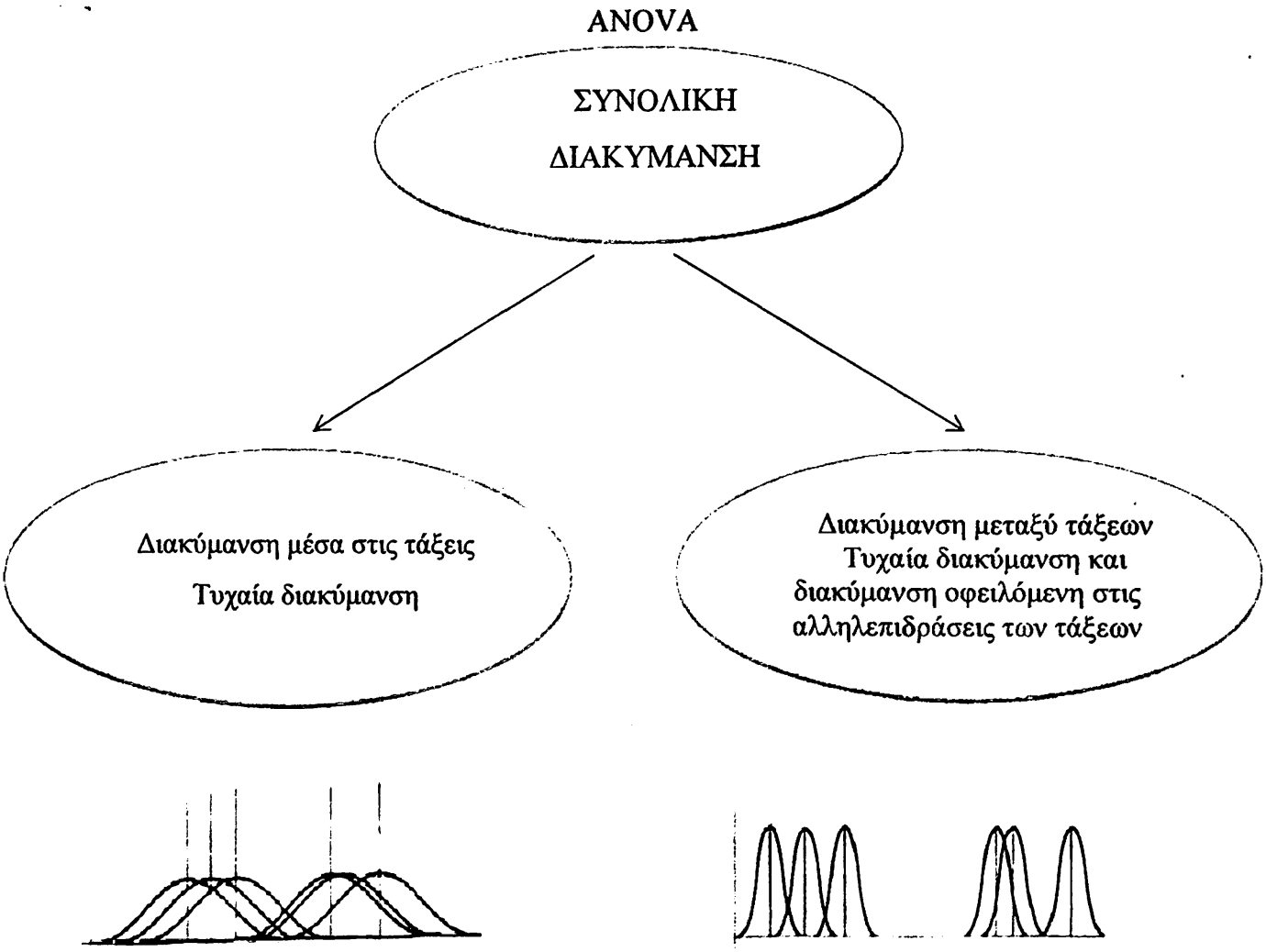
2.7.2 Ανάλυση Διακύμανσης (ANalysis Of VAriance, ANOVA)

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 διαδικασίας t [6, 69].

Η ανάλυση διακύμανσης είναι πιο χρήσιμη όταν εφαρμοστεί 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, δηλαδή τις ταυτόχρονες επιδράσεις δύο ή περισσοτέρων μεταβλητών. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι εξαιρετικά σημαντικές και παρ' όλα αυτά μπορεί να μην εντοπιστούν με τον κλασσικό τρόπο εκτέλεσης πειράματος κατά τον οποίο οι παράγοντες

μεταβάλλονται μια κάθε φορά, διατηρώντας όλες τις δυνατές πηγές διακύμανσης σταθερές [6].

Γίνεται μέτρηση δύο πηγών διακύμανσης στα δεδομένα και σύγκριση των σχετικών μεγεθών τους, της διακύμανσης «μεταξύ των τάξεων» και της διακύμανσης «μέσα στις τάξεις» [56, 70] (*Εικόνα 2.16*).



Εικόνα 2.16

Η δοκιμασία F εκφράζει την σημαντικότητα μια πηγής διακύμανσης και δίνεται από τον τύπο:

$$F = \frac{MS_{\mu\varepsilon\tau\alpha\xi\acute{\upsilon}}}{MS_{\mu\acute{\varepsilon}\sigma\alpha}} \qquad (\varepsilon\xi.\ 2.7)$$

Όπου $MS_{μεταξύ}$ είναι το μέσο τετράγωνο «μεταξύ των τάξεων» και το $MS_{μέσα}$ το μέσο τετράγωνο «μέσα στις τάξεις». Ως μέσο τετράγωνο MS ορίζεται ο λόγος του αθροίσματος του τετραγώνων, SS, προς τους βαθμούς ελευθερίας , *df*, για κάθε πηγή διακύμανσης

$$MS = \frac{SS}{df} \qquad (εξ. 2.8)$$

Γενικά ισχύει $SS_{συνολικό} = SS_{μεταξύ} + SS_{μέσα}$ (εξ. 2.9)

Για τον υπολογισμό των βαθμών ελευθερίας για κάθε περίπτωση ισχύει:

$$df = k - 1(αριθμός\ τάξεων - 1) \qquad (εξ. 2.10)$$

$$df_{μέσα} = k(n-1)[αριθμός\ τάξεων(αριθμός\ παρατηρήσεων - 1)]$$
(εξ. 2.11)

$$df = kn - 1 \qquad (εξ. 2.12)$$

2.7.3 Πειραματικός Σχεδιασμός - Οι κυριότεροι πειραματικοί σχεδιασμοί

Για πρώτη φορά το 1929 εισήχθη ο όρος από τον επιστήμονα στατιστικής, εξελικτικό βιολόγο και γενετιστή R. A. Fisher, μετά από επεξεργασία ενός μεγάλου αριθμού δεδομένων για πολλά χρόνια, στις αποδόσεις καλλιεργειών. Μέσω του πειραματικού σχεδιασμού επιτυγχάνεται η πραγματοποίηση μικρού αριθμού πειραμάτων λαμβάνοντας τη καλύτερη δυνατή πληροφόρηση για ένα σύστημα. Βασικό σκέλος του πειραματικού σχεδιασμού είναι ο προσδιορισμός των παραγόντων (*factors*) ή μεταβλητών (*variables*) του πειράματος που

μπορούν να μεταβληθούν από πείραμα σε πείραμα και έχουν σημαντικές επιδράσεις στο αποτέλεσμα μια πειραματικής διαδικασίας. Το αποτέλεσμα μιας πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή η τιμή που εξάγεται ονομάζεται απόκριση (*response*) [6, 56].

Οι τέσσερις βασικές αρχές του (καλού) πειραματικού σχεδιασμού είναι:

- Επανάληψη (*replication*)

Η επανάληψη (να μην συγχέεται με την επαναληψιμότητα, που είναι η δυνατότητα επανάληψης) σημαίνει την ανεξάρτητη επανάληψη των συνδυασμών των παραγόντων και αποτελεί μία εκτίμηση του τυχαίου πειραματικού σφάλματος. Η επίδραση του σφάλματος στην επίδραση ενός παράγοντα εκτιμάται με τον υπολογισμό του τυπικού σφάλματος. Το τυπικό σφάλμα μειώνεται όσο ο αριθμός των παρατηρήσεων και επαναλήψεων αυξάνεται [56, 71].

- Τυχαία επιλογή δειγμάτων (*randomization*)

Η τυχαία κατανομή είναι βάση του καλού πειραματικού σχεδιασμού. Ουσιαστικά σημαίνει απλώς ότι τόσο η κατανομή των υλικών του πειράματος, αλλά και η σειρά με την οποία θα γίνουν τα πειράματα, αποφασίζονται τυχαία [56, 71].

- Ομαδοποίηση (*blocking*)

Η ομαδοποίηση βοηθάει στην ανάλυση των δεδομένων και στη μείωση του πειραματικού λάθους. Ο στόχος της ομαδοποίησης είναι ουσιαστικά η κατάταξη του συνόλου των δεδομένων σε «ομάδες» που να είναι όσο το δυνατό περισσότερο ομογενοποιημένες. Αυτό βοηθάει στο ότι το πειραματικό λάθος θα υπολογιστεί για κάθε ομάδα ξεχωριστά και στη συνέχεια όλα τα πειραματικά λάθη θα αθροιστούν για το σύνολο του πειράματος. Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται μικρότερο πειραματικό λάθος σε σχέση με τον υπολογισμό όταν δεν γίνει ομαδοποίηση [56, 71].

➢ Συγκριτική σχεδίαση

Η συγκριτική σχεδίαση στηρίζεται απλά στην αρχή του ότι αν θέλουμε να δούμε πως επηρεάζει ένας παράγοντας μία διεργασία, πρέπει να παρατηρήσουμε τι συμβαίνει στη διεργασία όταν αλλάζουν οι τιμές του εν λόγω παράγοντα, διατηρώντας τους υπόλοιπους ελεγχόμενους και μη ελεγχόμενους παράγοντες σταθερούς [56, 71].

Βασικά σημεία του πειραματικού σχεδιασμού

1. *Επιλογή των εξεταζόμενων παραγόντων και των αντίστοιχων επιπέδων τιμών τους*

Σε αυτό το πρώτο βήμα επιλέγονται εκείνοι οι παράγοντες οι οποίοι πιθανόν να επηρεάζουν την απόκριση του πειράματος με τη μεταβολή τους. Και στη συνέχεια ορίζονται τα επίπεδα των τιμών τους που θα εξεταστούν τα οποία κωδικοποιούνται.

2. *Σχεδιασμός διαλογής /αξιολόγησης (screening experiment)*

Με τη σειρά αυτών των πειραμάτων καθορίζονται οι παράγοντες που επιδρούν σημαντικά στην απόκριση.

3. *Προσαρμογή μαθηματικού μοντέλου*

Τα μαθηματικά πρότυπα, (συνήθως ονομάζονται και μοντέλα), είναι μία αλγεβρική έκφραση που καθορίζει την εξάρτηση των αποκρίσεων από τις ανεξάρτητες μεταβλητές. Μπορούν να είναι είτε εμπειρικά, είτε θεωρητικά. Τα πιο συνηθισμένα γραμμικά μαθηματικά πρότυπα συσχέτισης δίνονται παρακάτω:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \ldots + \varepsilon \qquad (2.13)$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \ldots + \varepsilon \qquad (2.14)$$

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \ldots + \varepsilon \qquad (2.15)$$

όπου:

Y: η υπολογισμένη απόκριση (πολλές φορές συμβολίζεται και ως E(y)),

X_i: οι τιμές των υπό εξέταση παραγόντων,

β_0: το σημείο τομής με τον άξονα των αποκρίσεων, όταν οι τιμές των παραγόντων είναι μηδέν,

β_i, β_{ii}, β_{ij}: οι συντελεστές που παρουσιάζουν τη σημαντικότητα των επιδράσεων πρώτου βαθμού, δεύτερου βαθμού και των αλληλεπιδράσεων δευτέρου βαθμού, αντίστοιχα,

ε: το καθαρό σφάλμα (*pure error*).

Εάν η προσαρμογή των μαθηματικών προτύπων είναι καλή, τότε η περιγραφή της προσαρμοσμένης επιφάνειας απόκρισης, προσεγγίζει ικανοποιητικά αυτήν του πραγματικού συστήματος [56, 72].

4. Επάρκεια μοντέλου

Με την ανάλυση διακύμανσης (*ANOVA*) είναι δυνατόν να εκτιμηθεί ο βαθμός προσαρμογής του μαθηματικού μοντέλου καθώς σε κάποιες περιπτώσεις είναι πιθανόν το μαθηματικό μοντέλο που υπολογίστηκε με την προσαρμογή της πολυωνυμικής εξίσωσης να μην περιγράφει ικανοποιητικά την περιοχή που εξετάζεται. Εκτός από την ανάλυση διακύμανσης μπορεί να εφαρμοστεί για την εκτίμηση της επάρκειας του μαθηματικού μοντέλου και η δοκιμή της έλλειψης προσαρμογής (*Lack of Fit*).

5. Βέλτιστες συνθήκες

Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης *(Response Surface Methodology)* είναι ένα σύνολο από μαθηματικές και στατιστικές τεχνικές οι οποίες εφαρμόζονται για την ανάπτυξη, βελτίωση και αριστοποίηση διεργασιών. Ο όρος επιφάνεια απόκρισης προέρχεται από την τρισδιάστατη γραφική αντιμετώπιση ενός προβλήματος βελτιστοποίησης όπου εξετάζεται η επίδραση δυο παραγόντων. Η χρήση του όρου επεκτείνεται και για την μελέτη παραπάνω παραγόντων. Το πεδίο της RSM περιλαμβάνει τεχνικές σχεδιασμού

πειραμάτων για την εξέταση της επίδρασης των τιμών των παραμέτρων στη μεταβλητή απόκρισης, τεχνικές στατιστικής μοντελοποίησης για τη διατύπωση ενός προσεγγιστικού μοντέλου μεταξύ της μεταβλητής απόκρισης και των παραγόντων και τεχνικές βελτιστοποίησης για την εύρεση των τιμών των παραγόντων που παράγουν την επιθυμητή απόκριση [56, 73].

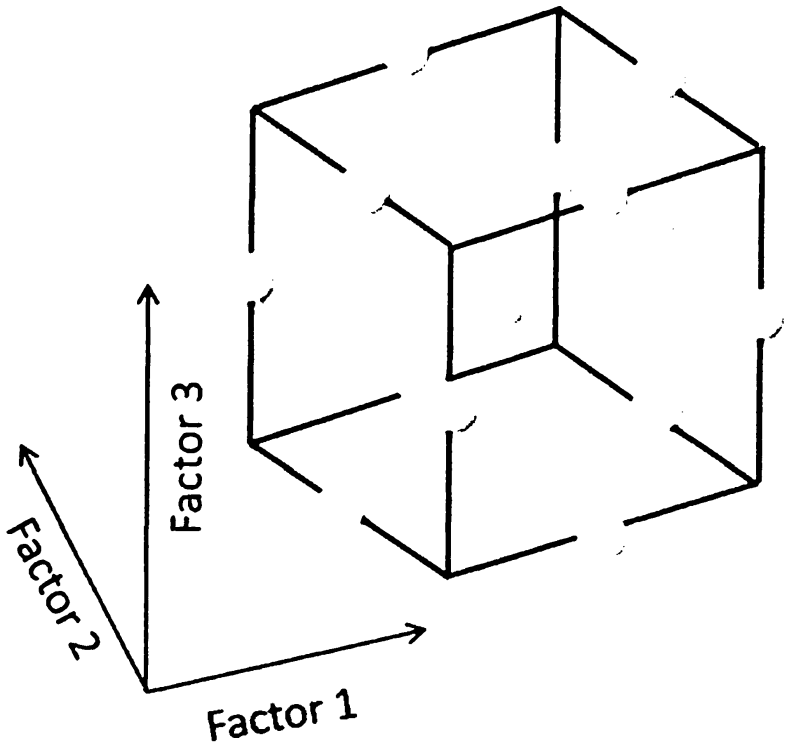
Κυριότεροι πειραματικοί σχεδιασμοί

- Πλήρως παραγοντικό σχέδιο (*full factorial design*)
- Κλασματικό παραγοντικό σχέδιο (*fractional factorial design*)
- Σχέδιο Plackett- Burman
- Λατινικά και Ελληνο- Λατινικά τετράγωνα (*Latin/Greco- Latin squares*)
- D- optimal designs
- Fully nested/hierarchical designs
- Τα σχέδια των επιφανειών απόκρισης (*response surface designs*)
    - central composite design
    - Box-Benken design

2.7.4 Πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken (BBD)

Οι επιλογές σχετικά με τον πειραματικό σχέδιο που θα χρησιμοποιηθεί μειώνονται όταν παραπάνω από δύο παράγοντες εισέρχονται σ' αυτόν γιατί απαιτείται μεγάλος αριθμός πειραματικών δοκιμών. Για το λόγο αυτό οι παραγοντικοί σχεδιασμοί 3k, (όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων (factors)), όπως ο πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken, χρησιμοποιούν μικρότερο αριθμό πειραματικών σημείων. Ένα τέτοιο πειραματικό σχέδιο μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταβλητών οι οποίες μπορεί να είναι γραμμικές (*linear*) ή τετραγωνικές (*quadric*).

Ο πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken (*three level factor- quadratic design*), χρησιμοποιεί τρία ή περισσότερα επίπεδα (*levels*) και εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που μελετώνται τρεις ή περισσότεροι παράγοντες. Δεν λαμβάνει υπόψη ακραία σημεία (extreme points) όπως συμβαίνει στον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (*Central Composite Design, CCD*). Η ειδική διάταξη των επιπέδων του BBD δίνει τη δυνατότητα αύξησης των σημείων του σχεδίου αναλογικά με τον αριθμό των πολυωνυμικών συντελεστών και απαιτεί 2k (k-1) + C_0 σημεία, όπου C_0 ο αριθμός των κεντρικών σημείων. Τα πειραματικά σημεία βρίσκονται στα μεσοδιαστήματα των ακμών ενός κύβου και στο κέντρο (*κεντρικά σημεία, central points*) (*Εικόνα 2.17*) [74-75].



***Εικόνα 2.17**: Πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken για τρεις παράγοντες. Κάθε σημεία αναπαριστά τις τιμές του παράγοντα για ένα πείραμα (run).*

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 3°

Οργανολογία- Χρωματογραφικός προσδιορισμός και αναλυτικά χαρακτηριστικά

3.1.Πρότυπες ενώσεις και διαλύματα αυτών

Σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκαν 20 οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (*OCPs*) και συγκριμένα τα: aldrin, endrin, dieldrin, α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC, α-chlordane, γ-chlordane, p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulfate, endrin aldehyde, heptachlor, heptachlor epoxide, endrin ketone και methoxychlor. Από τα συμπαράγωγα των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (*PCBs congeners*) μελετήθηκαν 6 και συγκεκριμένα τα: PCB 28, 52, 101, 138, 153 και 180. Οι παραπάνω πρότυπες ενώσεις (αναλυτικής καθαρότητας >99%) αγοράστηκαν από τον οίκο Fluka (*Darmstadt, Germany*). Το πρότυπο μίγμα (*standard mix*) των OCPs, συγκέντρωσης 500 μg mL^{-1}, παρασκευάστηκε σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL σε διάλυμα τολουολίου:n-εξανίου (*50:50, v/v*). Κατά τον ίδιο τρόπο, παρασκευάστηκε και το πρότυπο διάλυμα εργασίας των PCBs συγκέντρωσης 500 μg mL^{-1}, σε διαλύτη όμως ισοοκτάνιο.

Από τα διαλύματα αυτά πραγματοποιήθηκαν οι απαιτούμενες αραιώσεις και εμβολιασμοί. Όλα τα παραπάνω πρότυπα φυλάσσονταν στους 4 °C αφού οι προσδιοριζόμενες ουσίες δεν υφίστανται διάσπαση για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρ' όλα αυτά η σταθερότητα των διαλυμάτων ελεγχόταν και καμία μεταβολή στη συγκέντρωσή τους δεν παρατηρήθηκε.

3.2. Αντιδραστήρια- Διαλύτες

Ο χλωριούχος σίδηρος ($FeCl_3$) αγοράστηκε από την εταιρεία Fluka (*Milwaukee, WI,USA*) και ο τετραένυδρος-χλωριούχος σίδηρος ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)

από την εταιρεία Ferak (*Berlin, Germany*). Το τετρα(αιθυλ)-ορθο-πυριτικό (*TEOS*) και το τριμεθοξυ(οκταδεκυλ)σιλάνιο (99%) αγοράστηκαν από την εταιρεία Aldrich. Το φορμικό οξύ και η αμμωνία προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Merck (Darmstadt, Γερμανία). Το διάλυμα Carrez 1 παρασκευάστηκε διαλύοντας 1.5 g τριενυδρου- σιδηροκυανιούχου καλίου (II) (*Sigma-Aldrich*) σε 10.0 mL νερό και το διάλυμα Carrez 2 διαλύοντας 3.0 g επταένυδρου θειικού ψευδαργύρου (*Sigma-Aldrich*) σε 10.0 mL νερού. Οι διαλύτες n-εξάνιο, ισοοκτάνιο, αιθανόλη, μεθανόλη και ακετόνη που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν υψηλής καθαρότητας και αγοράστηκαν από τον οίκο Labscan (*Dublin, Ireland*).

3.3. Λοιπά υλικά

Για τον καθαρισμό των δειγμάτων πριν από την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα μεμβράνης (*PVDF, 0.45 μm*) αγοράστηκαν του οίκου Millipore (*Ireland*).

3.4. Όργανα- Συσκευές

Για τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των συντιθέμενων μαγνητικών νανοϋλικών χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και συσκευές:

- παρασκευαστικός ζυγός
- λουτρό υπερήχων μοντέλο S30H, του οίκου *Elmasonic*
- συσκευή εξάτμισης αζώτου με θέρμανση
- θερμαινόμενος αναδευτήρας
- συσκευή reflux
- ξηραντήρας κενού
- ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (*SEM*) με επικάλυψη χρυσού (*JSM-5600, JEOL*)

- φασματοφωτόμετρο υπερύθρου (*FT-IR, Perkin Elmer, spectrum 100*)
- στοιχειακός αναλυτής Vario Macro CNS (*Elemental Analyzensysteme GmbH, Germany*)
- πολωσίμετρο Autosorb-1 (*QUANDACHROM, Bouton Beach, FL, USA*)
- διαθλασίμετρο (*D8 Advance Brüker*) που λειτουργεί με ακτινοβολία CuKα (λ = 1.5406 Å) και δευτερογενή μονοχρωμάτορα γραφίτη
- μαγνητόμετρο (*LakeShore 7300, Westerville, OH, USA*)

Κατά την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και συσκευές:

- σύστημα αέριας χρωματογραφίας *Trace GC Ultra Instrument* με ανιχνευτή μάζας *ISQ mass spectrometer* με αυτόματο δειγματολήπτη *AI/AS* της Thermo Scientific
- αναμείκτης περιδίνησης (*vortex mix*)
- αναλυτικός ζυγός
- συσκευή φυγοκέντρησης
- λουτρό υπερήχων μοντέλο S30H, του οίκου *Elmasonic*
- συσκευή εξάτμισης αζώτου με θέρμανση
- κοινός μαγνήτης του εμπορίου

3.5 Χρωματογραφικές συνθήκες

Αέριος χρωματογράφος συζευγμένος με φασματομετρία μάζας (*GC-MS*)

Πραγματοποιήθηκε χρωματογραφική ανάλυση σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας *Trace GC Ultra Instrument* με ανιχνευτή μάζας *ISQ mass*

spectrometer με αυτόματο δειγματολήπτη *AI/AS* της Thermo Scientific. Το σύστημα ελεγχόταν μέσω υπολογιστή με τη χρήση λογισμικού *XCalibur*. Το σύστημα του χρωματογράφου ήταν εφοδιασμένο με μια DB-5 τριχοειδή στήλη πυριτίου πάχους 0.25 μm (*30 m x 0.25 mm Sigma Aldrich, Supelco, Bellefonte, PA, USA*). Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με ροή 1.5 mL min^{-1} (*συνεχής ροή*). Η έγχυση κάθε δείγματος έγινε στην θέση splitless (*η βαλβίδα παρέμεινε ανοικτή για 30 sec*) με όγκο έγχυσης 1.5 μL. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 250 °C ενώ η πηγή ιόντων είχε θερμοκρασία 225 °C και τα φάσματα μάζας ελήφθησαν στα 70 eV (*Πίνακας 3.1*).

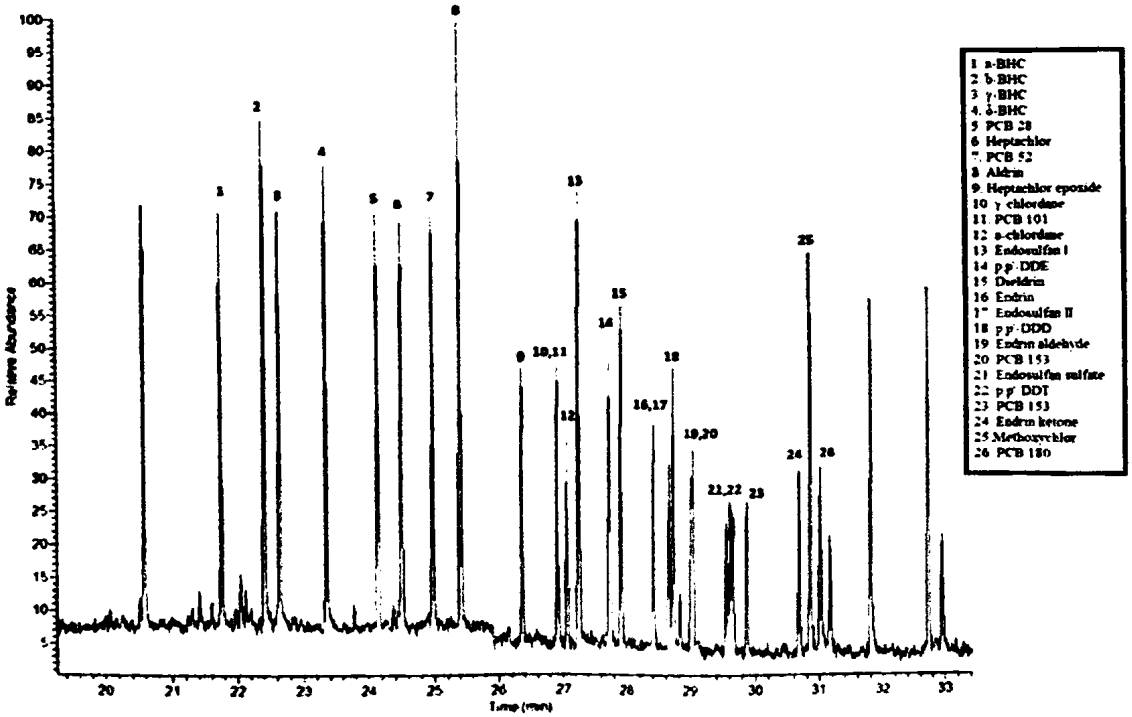
Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν διάρκειας 45 λεπτών και περιγράφεται παρακάτω:

- Αρχική θερμοκρασία φούρνου 60 °C. Παραμονή στην συγκεκριμένη θερμοκρασία για 5 λεπτά.
- Αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 8 °C ανά λεπτό μέχρι τους 300 °C
- Παραμονή στους 300 °C για 2 λεπτά

Η μέθοδος επιλεγμένων ιόντων (*Selected ion Monitoring, SIM*) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ενώσεων. Η επιλογή των ιόντων βασίστηκε στα δομικά χαρακτηριστικά της κάθε ένωσης, στη σχετική ένταση του ιόντος στο φάσμα κάθε ένωσης και στην απουσία παρεμφερών ιόντων άλλης ένωσης στην περιοχή ανίχνευσης. Για την ανάλυση με τη μέθοδο της ανίχνευσης επιλεγμένων ιόντων (*SIM*) επιλέχθηκαν 3 ιόντα για κάθε ουσία. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα χωρίστηκε σε τέσσερις ομάδες ιόντων. Ο πίνακας 3.2 περιλαμβάνει τους χρόνους κατακράτησης και τα επιλεγμένα ιόντα ανά για τους επιλεγμένους αναλύτες. Με έντονο χρώμα είναι τα ιόντα που επιλέχτηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό. Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα προτύπου των 26 αναλυτών με ανάλυση στο GC-MS. Τα φάσματα μάζας για κάθε αναλύτη παρατίθενται στο Παράρτημα II, III.

Πίνακα 3.1: Χρωματογραφικές συνθήκες

Φούρνος	60°C(5min), 8°C/min, 300°C(10min)
Χρόνος εξισορρόπησης	0.5 min
Εισαγωγέας	275 °C, Spitless (1 min)
Ροή (Split Flow)	30 mL/min
Ροή στήλης	Ήλιο (He), 1.5mL/min (συνεχής ροή)



Εικόνα 3.1: *Τυπικό χρωματογράφημα προτύπου των 26 ενδοκρινικών διαταρακτών ανάλυσης με GC-MS συγκέντρωσης 500 μg L^{-1}. Οι κορυφές και η αρίθμηση τους είναι σύμφωνα με την σειρά έκλουσης των αναλυτών*

Πίνακας 3.2: Χρόνοι κατακράτησης και ιόντα ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης των επιλεγμένων αναλυτών

Ομάδες ιόντων (SIM) t (min)	EDCs	t_R	Μοριακό βάρος	m/z
10	a-BHC	21,37	288	**181**, 219, 183
	b-BHC	22,03	288	**181**, 219, 183
	γ-BHC	22,26	288	**181**, 219, 183
	δ-BHC	22,97	288	**181**, 219, 183
23,10	PCB 28	23,76	256	**256**, 258, 260
	Heptachlor	24,12	373	**337**, 339, 272
	PCB 52	24,61	290	**220**, 292, 294
	Aldrin	25,02	362	**263**, 265, 293
25,20	Heptachlor epoxide	25,97	386	**353**, 355, 357
	γ-chlordane	26,53	406	**373**, 375, 377
	PCB 101	26,69	324	**326**, 324, 328
	a-chlordane	26,86	406	**373**, 375, 377
	endosulfan I	26,86	407	**339**, 341, 279
	p,p'- DDE	27,36	316	**246**, 316, 318
	Dieldrin	27,52	378	**263**, 380, 382
27,90	Endrin	28,02	378	**263**, 317, 345
	Endosulfan II	28,26	318	**341**, 279, 195
	p,p'-DDD	28,34	407	**235**, 165, 237
	Endrin aldehyde	28,61	358	**250**, 173.345
	PCB 153	28,65	378	**360**, 290.362
	Endosulfan sulfate	29,15	358	**389**, 237,274
	p,p'-DDT	29,22	420	**235**,165, 237
	PCB 138	29,26	355	**360**,358, 362
30	Endrin ketone	30,27	378	**317**, 209, 281
	Methoxychlor	30,48	344	**227**, 169, 228
	PCB180	30,78	392	**396**, 392, 394

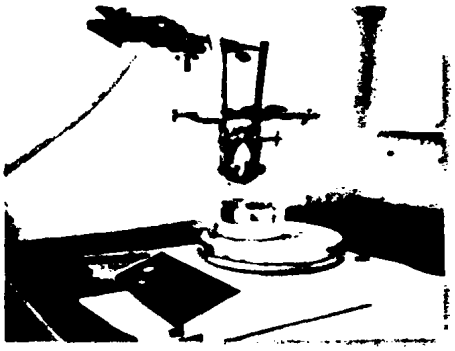
3.6 Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων

Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων και η επικύρωση της μεθόδου έγινε με βιολογικό ημιαποβουτυρωμένο δείγμα γάλακτος (*περιεκτικότητας σε λίπος <1.5% w/w*), αγορασμένο από τοπικό σουπερμάρκετ το οποίο βρέθηκε ότι δεν περιείχε κανέναν από τους επιλεγμένους αναλύτες. Τα δείγματα γάλακτος διατηρούνταν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

3.7 Σύνθεση μαγνητικών νανοϋλικών

3.7.1 Σύνθεση μαγνητίτη (Fe_3O_4)

Τα σωματίδια του μαγνητίτη συντέθηκαν με τη μέθοδο της θερμικής συγκαταβύθισης ιόντων δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου (*Fe^{2+} και Fe^{3+}*) σε αλκαλικές συνθήκες και με υδροθερμική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, 0.7 g $FeCl_3$ και 0.42 g $FeCl_2 \cdot H_2O$ διαλύονται σε 100 mL απεσταγμένο νερό, το οποίο προηγουμένων έχει απαερωθεί σε ήπιο ρεύμα αζώτου (*N_2*) για να αποφευχθεί η οξείδωση των ιόντων του δισθενούς σιδήρου (*Εικόνα 3.2*). Μετά από 10 λεπτά ανάδευση υπό N_2 προστίθενται 5 mL αμμωνία (*NH_3 25% w/w*) και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 80°C. Στη συνέχεια αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και τα μαύρα σωματίδια οξειδίων του σιδήρου που σχηματίστηκαν εκπλύνονται με αποσταγμένο νερό και αιθανόλη (*EtOH*).



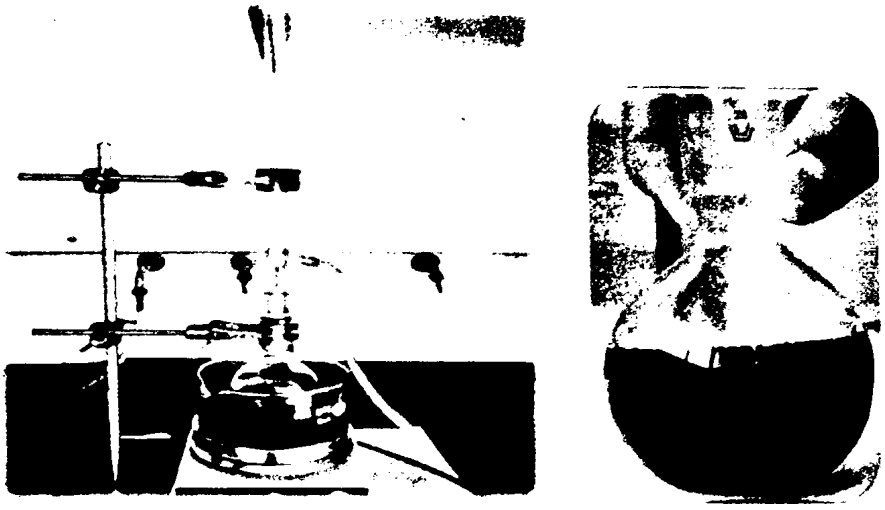
Εικόνα 3.2: Σύνθεση μαγνητίτη.

3.7.2 Τροποποίηση μαγνητίτη με διοξείδιο του πυριτίου ($Fe_3O_4@SiO_2$)

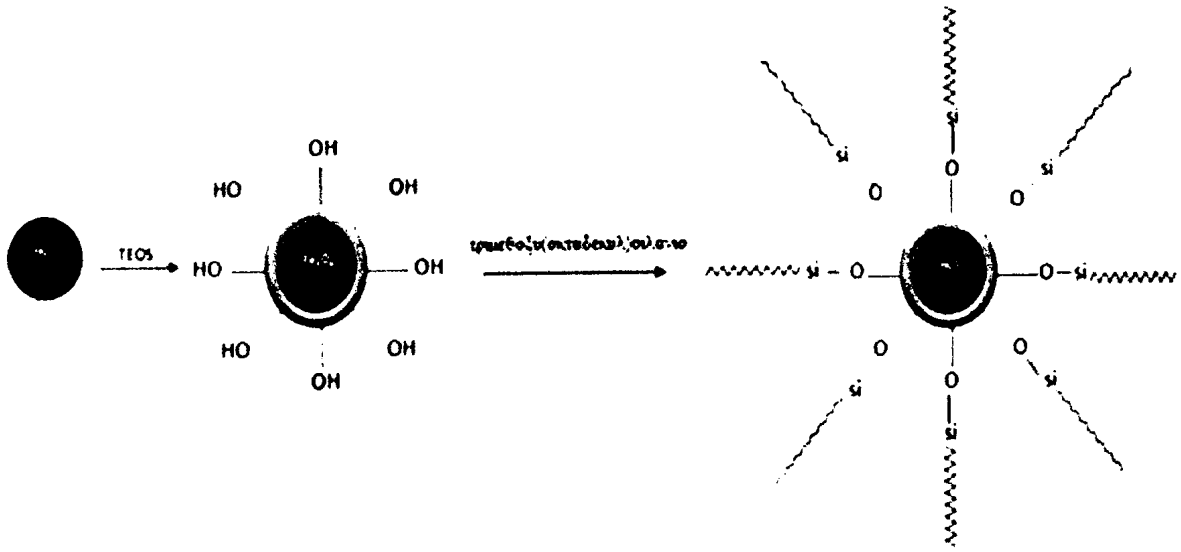
Η τροποποίηση του μαγνητίτη για να επικαλυφθεί με στρώμα διοξειδίου του πυριτίου *(silica)*, έγινε με μερικές παραλλαγές της μεθόδου Stober [76-77]. Αρχικά, 0.5 g Fe_3O_4 διασπείρονται σε διάλυμα που αποτελείται από 12.5 mL EtOH και 4 mL απεσταγμένο νερό με τη βοήθεια υπερήχων, για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 250 μL TEOS και 500 μL NH_3 (25% w/w) και το μίγμα αναδεύεται για λεπτά σε ήπιο ρεύμα N_2. Το μίγμα αναδεύεται για 12 ώρες για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Τέλος, τα γκρι- μαύρα σωματίδια που σχηματίστηκαν εκπλένονται με απεσταγμένο νερό και EtOH και ξηραίνονται σε ξηραντήρα κενού. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται δύο φόρες.

3.7.3 Τροποποίηση σιλανοποιημένου μαγνητίτη με αλκυλομάδα C18 ($Fe_3O_4@SiO_2@C18$)

Το C18 επιλέχθηκε ως συνδεδεμένη φάση εξαιτίας του λιπόφιλου χαρακτήρα του που επιτρέπει την κατακράτηση λιπόφιλων ομάδων όπως είναι τα PCBs και τα OCPs. Η αλυσίδα του C18 συνδέθηκε αποτελεσματικά στην επιφάνεια του σιλανοποιημένου μαγνητίτη μέσω των ενεργών θέσεων Si-OH [78]. Αρχικά, 0.2 g $Fe_3O_4@SiO_2$ διαλύονται σε 70 mL άνυδρο τολουόλιο με τη βοήθεια υπερήχων. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μL τριμεθοξυ(οκταδεκυλ)σιλάνιο υπό ανάδευση και η αντίδραση αφήνεται να ολοκληρωθεί για 12 ώρες στους 80°C (*Εικόνα 3.3*). Το μίγμα αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλένεται με τολουόλιο και αιθανόλη. Τα μαύρα σωματίδια που σχηματίστηκαν ξηραίνονται υπό κενό, πριν την χρήση.



Εικόνα 3.3: *Σύνθεση Fe_3O_4@SiO_2@C18.*



Εικόνα 3.4: *Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης τροποποιημένων μαγνητικών υλικών.*

Κεφάλαιο 4

Κεφάλαιο 4°

Χαρακτηρισμός Μαγνητικών Νανοϋλικών- Ανάπτυξη Αναλυτικής Μεθοδολογίας

4.1Χαρακτηρισμός συντιθέμενων τροποποιημένων μαγνητικών υλικών

Τα συντιθέμενα μαγνητικά υλικά (*Fe_3O_4, Fe_3O_4@SiO_2 και Fe_3O_4@SiO_2@C18)* χαρακτηρίστηκαν με διάφορες τεχνικές. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (*Scanning Electron Microscopy, SEM*) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της εξωτερικής μορφολογίας των συντιθέμενων υλικών, ενώ η στοιχειακή ανάλυση (*Elemental Analysis, EA*) για τον προσδιορισμό του ποσοστού του άνθρακα στο τελικό προϊόν (*Fe_3O_4@SiO_2@C18*). Με τη φασματοσκοπία υπερύθρου (*Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR*) μελετήθηκε η παρουσία λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των συντιθέμενων υλικών γεγονός που επιβεβαιώνει αν έχει πραγματοποιηθεί επιτυχώς η τροποποίησή τους. Η κρυσταλλική φάση των υλικών μελετήθηκε με τη κρυσταλλογραφία περίθλασης κόνεως (*X-Ray diffraction, XRD*), ενώ η ειδική τους επιφάνεια υπολογίστηκε από τις καμπύλες προσρόφησης- εκρόφησης N_2 βάση της μεθόδου BET (*Brunauer–Emmett–Teller*). Τέλος, οι μαγνητικές ιδιότητες των συντιθέμενων υλικών μελετήθηκαν με τις καμπύλες μαγνητισμού σε θερμοκρασία δωματίου (*magnetization curves*).

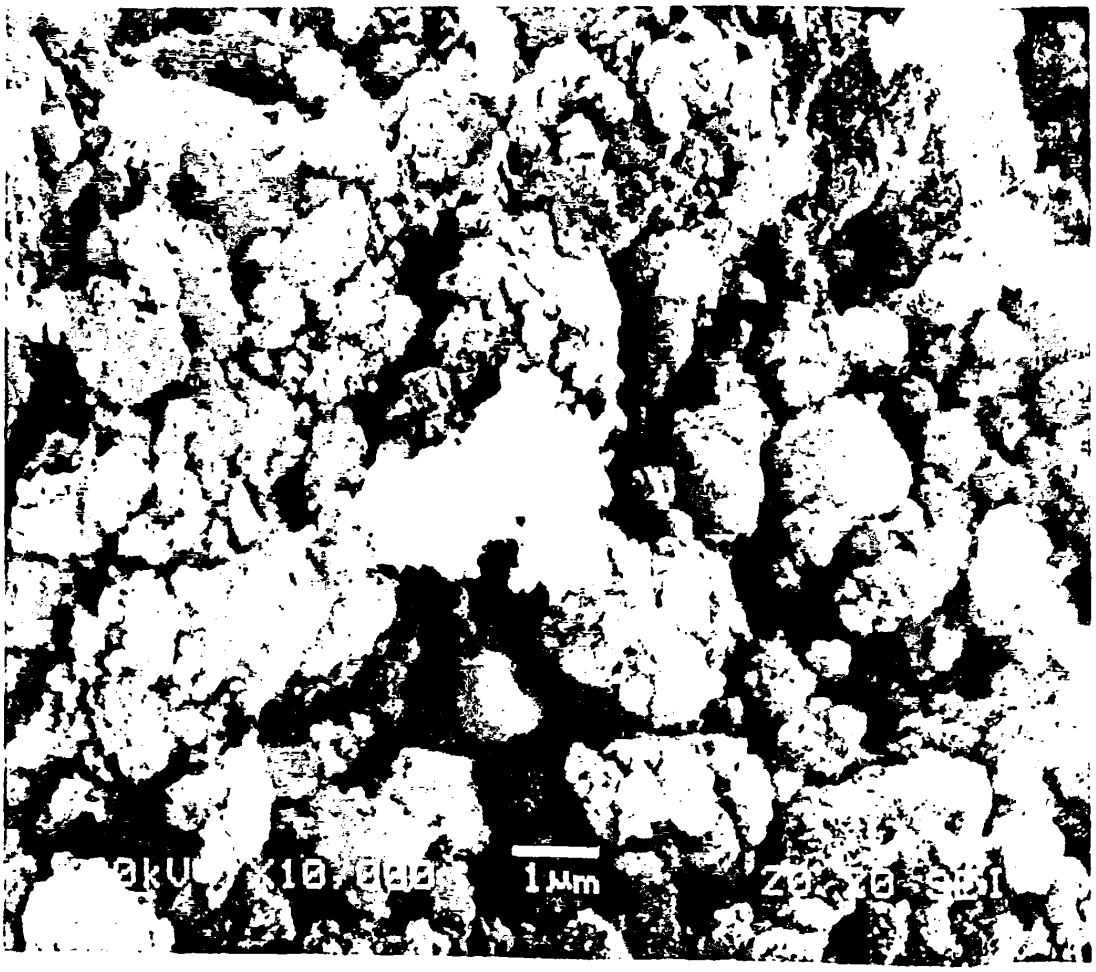
4.1.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (*SEM*) και Στοιχειακή Ανάλυση (*EA*)

Από τις φωτογραφίες SEM παρατηρούμε ότι ο μαγνητίτης (*Fe_3O_4*) έχει ακανόνιστο σχήμα, ενώ ο τροποποιημένος με διοξείδιο του πυριτίου μαγνητίτης (*Fe_3O_4@SiO_2*) και ο τροποποιημένος με διοξείδιο του πυριτίου και

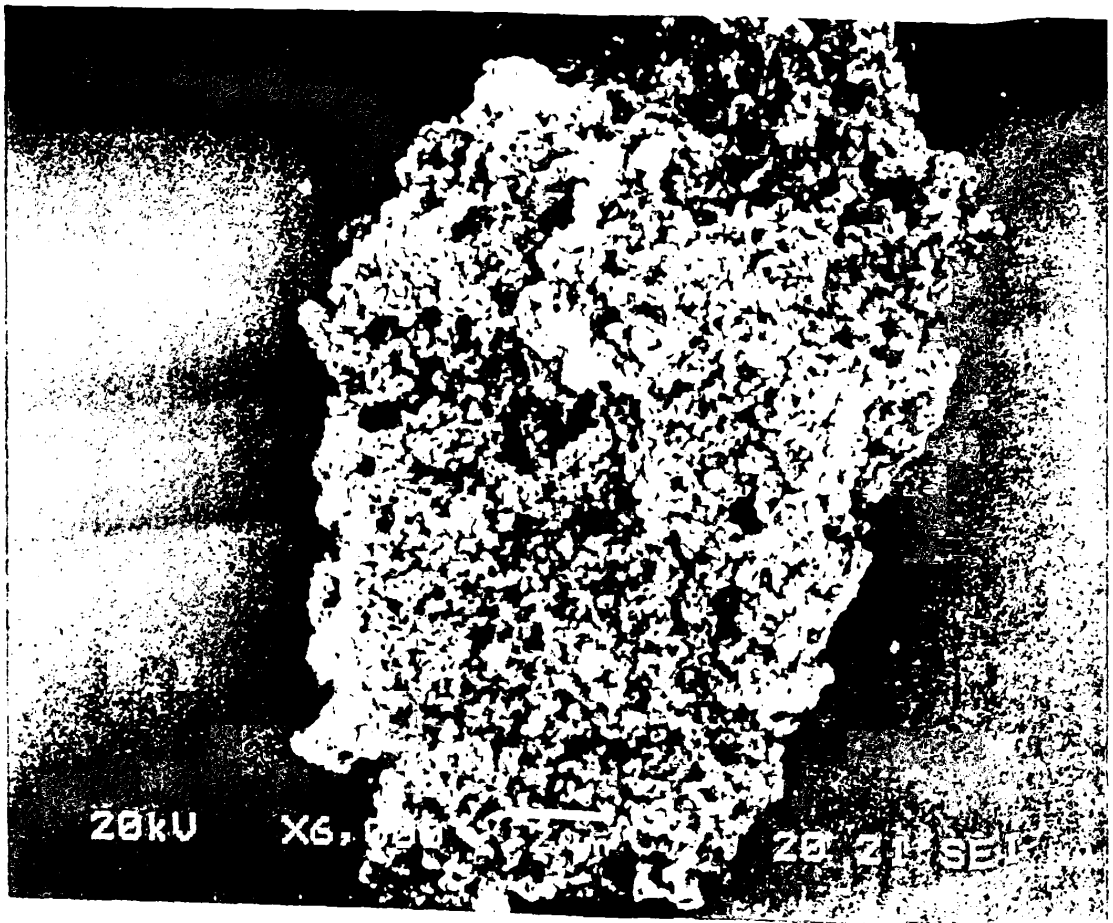
νητίτης (Fe_3O_4@SiO_2@C18) έχουν σχεδόν σφαιρικό σχήμα (

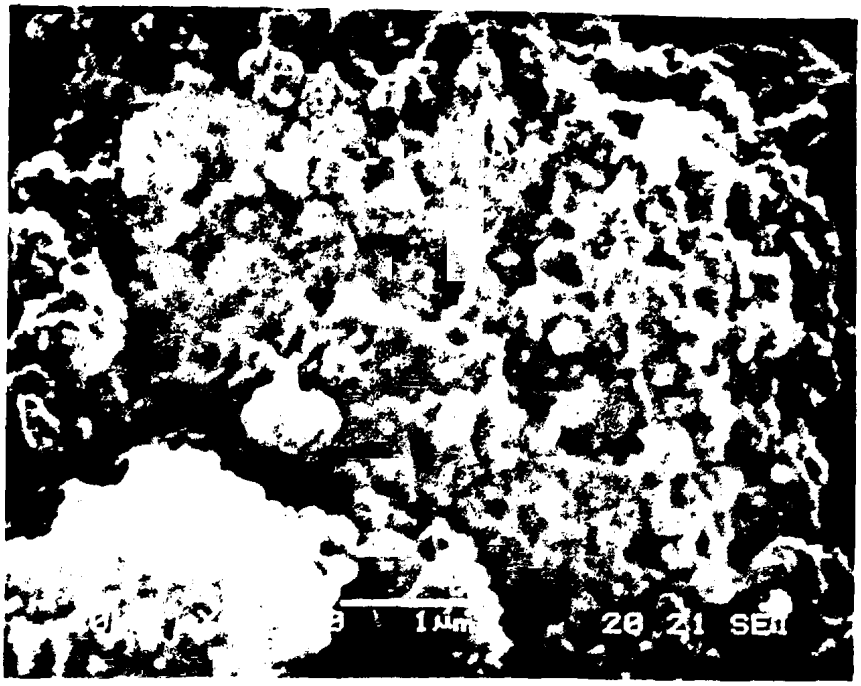
στοιχειακή ανάλυση έδειξε ότι το ποσοστό του άνθρακ

ενα Fe_3O_4@SiO_2@C18 υλικά είναι 7%.



(α)





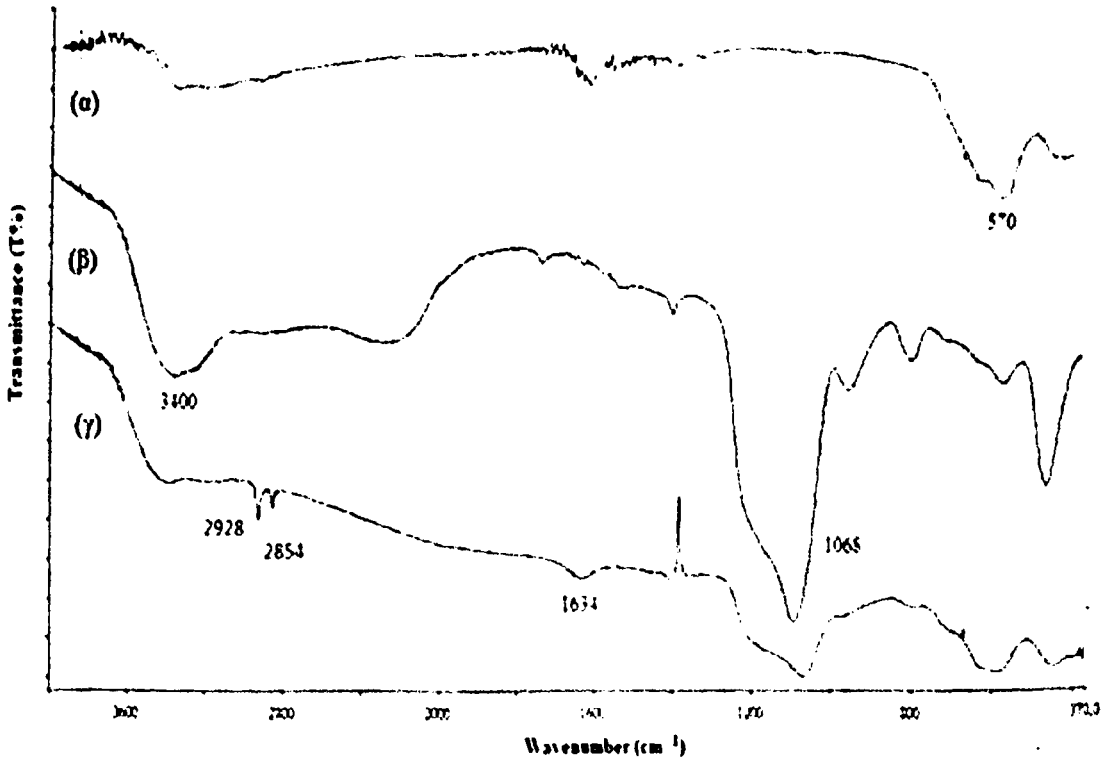
(γ)

Εικόνα 4.1: *Φωτογραφίες SEM (α) Fe_3O_4, (β) $Fe_3O_4@SiO_2$ και (γ) $Fe_3O_4@SiO_2@C18$.*

4.1.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου (*FT-IR*)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου χρησιμοποιήθηκε για να διασφαλίσει την ορθή τροποποίηση των μαγνητικών υλικών. Το φάσμα FT- IR των συντιθέμενων υλικών φαίνεται στην εικόνα 4.2. Η κορυφή απορρόφησης στα 570 cm^{-1} (*Εικόνα 4.2α*)αναπαριστά τη δόνηση Fe-O-Fe του μαγνητίτη. Η κορυφή στα 1068 cm^{-1} (*Εικόνα 4.2β και 4.2γ*) αναπαριστά τη δόνηση τάσης Si-O-Si, ενώ οι κορυφές στα 1634 cm^{-1} και 3400 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στην απορρόφηση νερού ή ομάδων σιλανόλης (Si-OH) του διοξείδιο του πυριτίου. Αυτές οι κορυφές αποδεικνύουν τον σχηματισμό στρώματος οξειδίου του πυριτίου στην επιφάνεια του μαγνητίτη. Τέλος, οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 2928 και 2854 cm^{-1} (*Εικόνα 4.2γ*) διαφοροποιούν το φάσμα του $Fe_3O_4@SiO_2$ από το φάσμα του $Fe_3O_4@SiO_2@C18$. Ειδικότερα, οι κορυφές αυτές αντιπροσωπεύουν την ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης της ομάδας του μεθυλενίου ($-CH_2$)

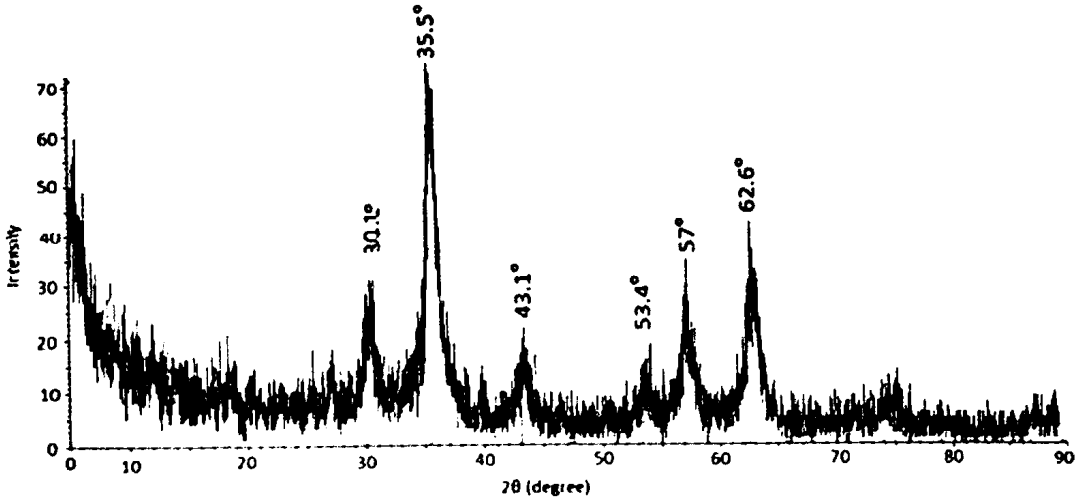
στην αλυσίδα $-(CH_2)_{17}CH_3$, αντίστοιχα, και αποδεικνύουν την προσκόλληση των ομάδων C18 στην επιφάνεια του $Fe_3O_4@SiO_2$.



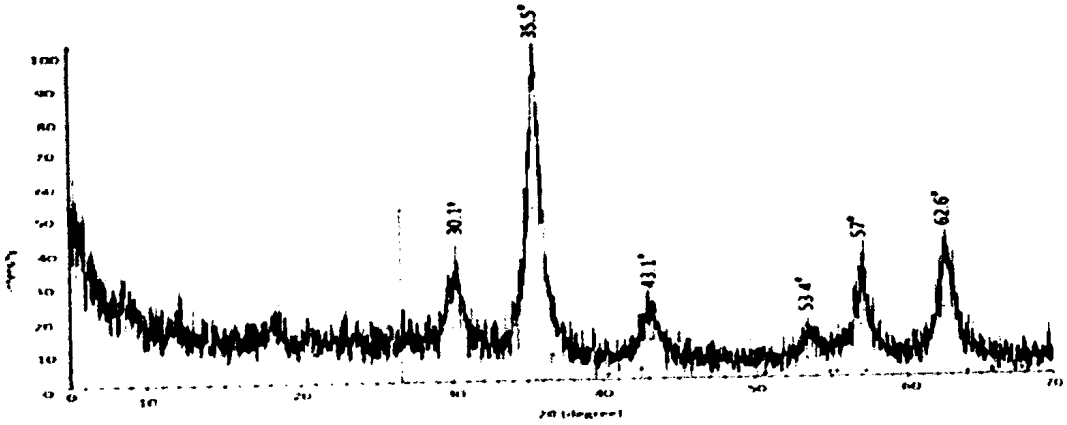
Εικόνα 4.2: *Φάσμα FT- IR (α) Fe_3O_4, (β) $Fe_3O_4@SiO_2$ και (γ) $Fe_3O_4@SiO_2@C18$.*

4.1.3 Κρυσταλλογραφία περίθλασης κόνεως (*XRD*)

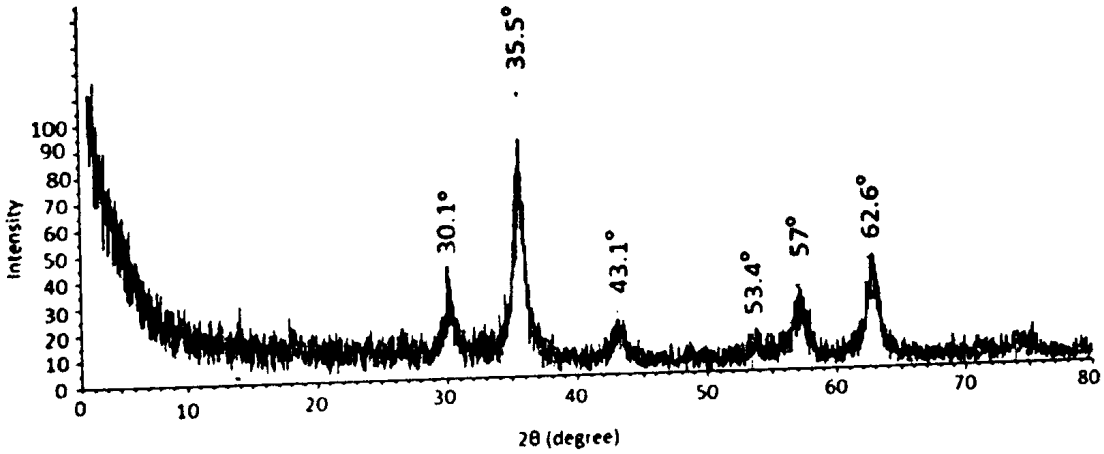
Στην εικόνα 4.3 φαίνονται τα φάσματα XRD των συντιθέμενων υλικών (*Fe_3O_4, $Fe_3O_4@SiO_2$ και $Fe_3O_4@SiO_2@C18$*). Στο φάσμα XRD του Fe_3O_4 εμφανίζονται έξι χαρακτηριστικές κορυφές σε 2θ των 30.01°, 35.5°, 43.1°, 53.4°, 57° και 62.6°. Παρατηρούμε ότι και στα φάσματα XRD των $Fe_3O_4@SiO_2$ και $Fe_3O_4@SiO_2@C18$ εμφανίζονται οι ίδιες κορυφές γεγονός που αποδεικνύει ότι η τροποποίηση του Fe_3O_4 για το σχηματισμό $Fe_3O_4@SiO_2$ και $Fe_3O_4@SiO_2@C18$ δεν προκαλεί καμία αλλαγή φάσης στον κυβικό κρύσταλλο των σωματιδίων του μαγνητίτη.



(α)



(β)



(γ)

Εικόνα 4.3: *Φάσματα XRD (α) Fe_3O_4, (β) $Fe_3O_4@SiO_2$ και (γ) $Fe_3O_4@SiO_2@C18$.*

Το μέσο μέγεθος του Fe_3O_4@SiO_2@C18 υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση Scherrer, η οποία είναι μία εμπειρική εξίσωση που προκύπτει με μαθηματική επεξεργασία του φάσματος XRD [79].

Εξίσωση Scherrer: $$D = (K\,\lambda) / (\beta \cos\theta)$$

Όπου:

- θ είναι η γωνία Bragg πρόσπτωσης των ακτίνων X
- λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας στο δείγμα ακτινοβολίας. Το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας Cu-Ka που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις είναι 1.5406 Å
- B το εύρος (*πλάτος*) της κορυφής στο ήμισυ του μεγίστου (*FWHM-σε μονάδες rad*) της κύριας κορυφής του φάσματος περίθλασης
- K είναι μια σταθερά που εξαρτάται από το σχήμα του κρυστάλλου. Η πιο συνηθισμένη τιμή του K είναι 0.94 για σφαιρικούς κρυστάλλους με κυβική συμμετρία

Ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία των φασμάτων XRD του Fe_3O_4@SiO_2@C18 προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

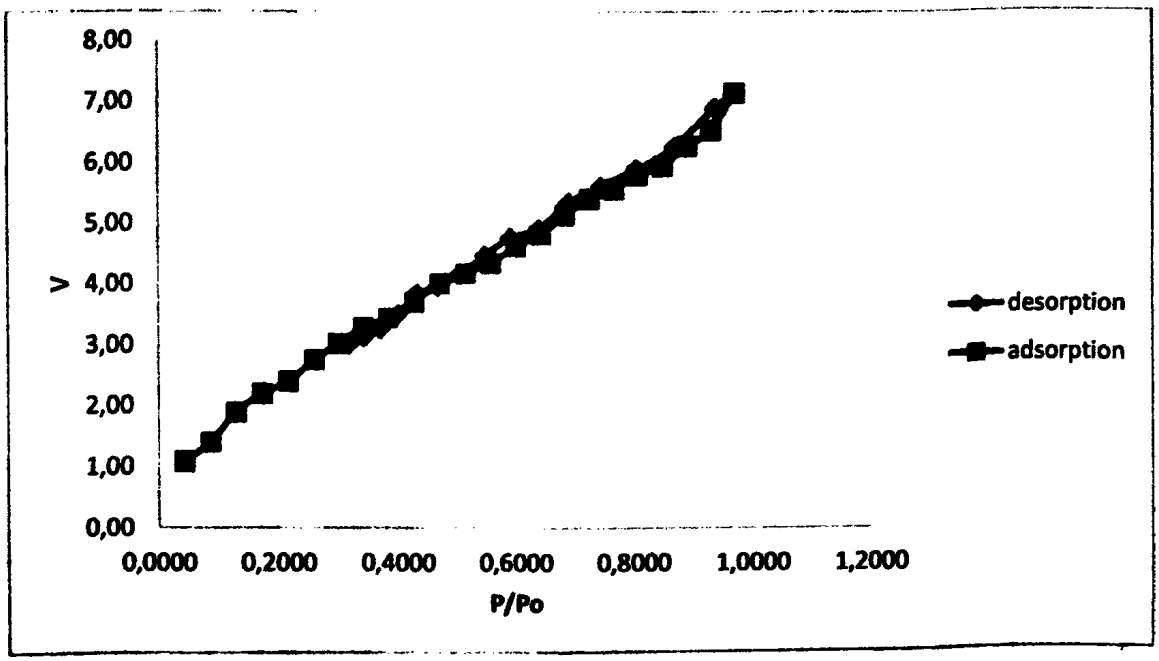
2θ (°)	FWHM(°)	Cosθ	FWHM (rad)	D (nm)
35,4952	0,68425	0,952409	0,023885	6,4
62,8058	0,6555	0,853524	0,022881	7,4
30,173	0,7414	0,965534	0,025880	5,8
57,1344	0,693	0,878257	0,024190	6,8
			Μέση τιμή μεγέθους D (nm) =	**6,6**
			Τυπική απόκλιση (nm) =	**0,7**

Άρα, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το μέσο μέγεθος των Fe_3O_4@SiO_2@C18 είναι περίπου 7 nm, δηλαδή μπορούν να χαρακτηριστούν ως νανοϋλικά.

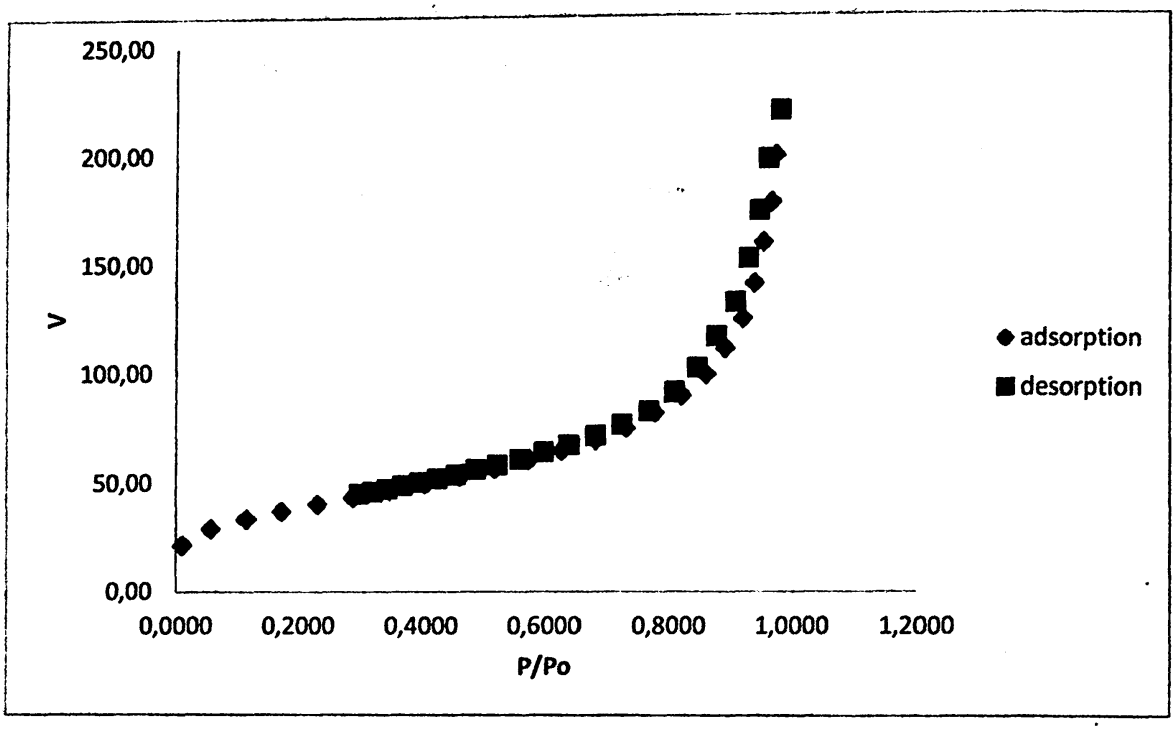
4.1.4 Ισόθερμος BET

Η ειδική επιφάνεια των συντιθέμενων νανοϋλικών (Fe_3O_4, Fe_3O_4@SiO_2 και Fe_3O_4@SiO_2@C18) υπολογίστηκε από τις καμπύλες προσρόφησης- εκρόφησης N_2 βάση της μεθόδου BET (*Brunauer–Emmett–Teller*).

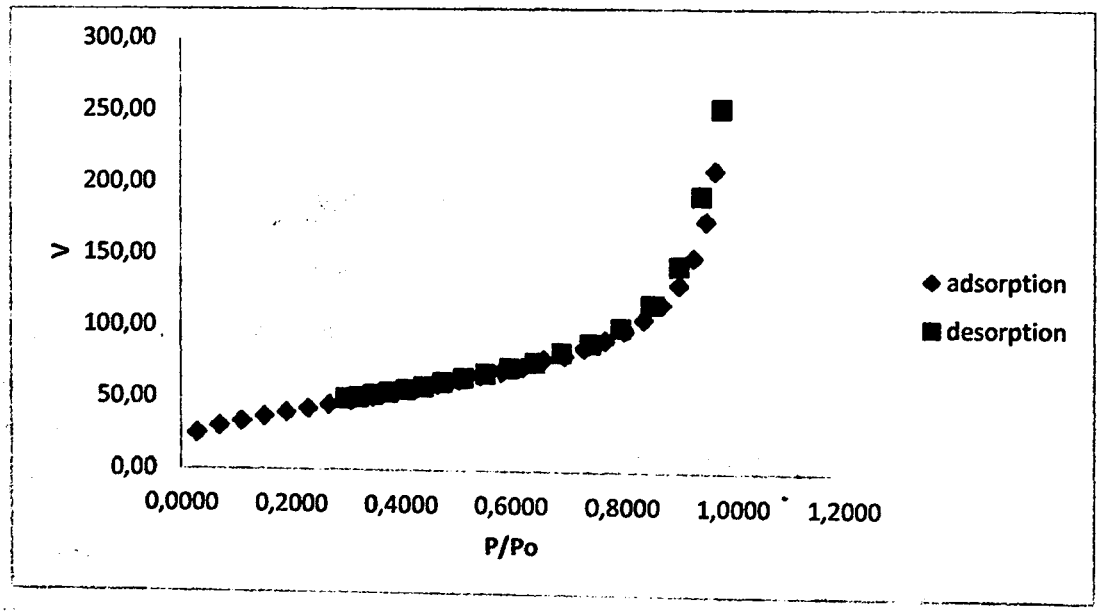
α) Ισόθερμη BET Fe_3O_4



β) Ισόθερμη BET $Fe_3O_4@SiO_2$



γ) Ισόθερμη BET $Fe_3O_4@SiO_2@C18$



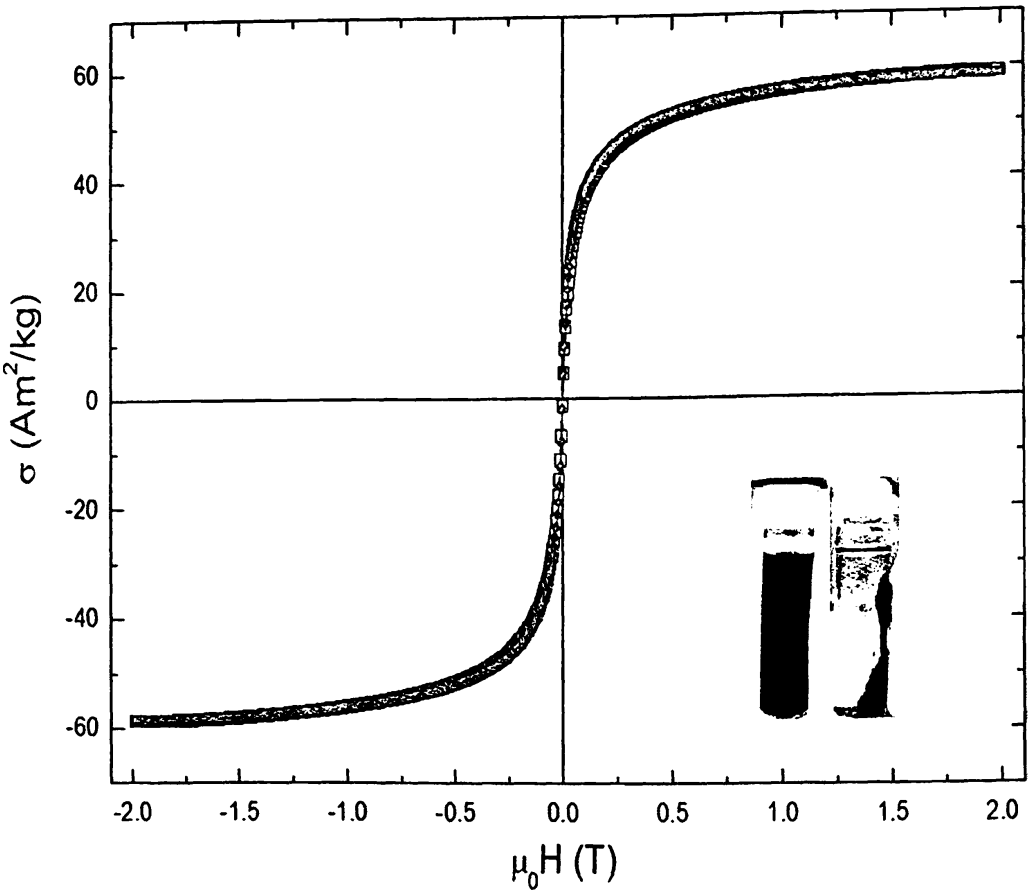
Πίνακας 4.1: Ειδική επιφάνεια συντιθέμενων νανοϋλικών

BET	Fe_3O_4	Fe_3O_4-SiO_2	Fe_3O_4-SiO_2-C18
Ειδική επιφάνεια (m^2/g)	11	134	151

Η ειδική επιφάνεια των Fe_3O_4@SiO_2@C18 είναι 151 m^2/g (*Πίνακας 4.1*), τιμή ιδανική για τη μεταφορά μάζας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.

4.1.5 Μαγνητικές ιδιότητες

Είναι σημαντικό για τα μαγνητικά νανοϋλικά να εμφανίζουν δυνατές μαγνητικές ιδιότητες έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μαγνητικό διαχωρισμό. Οι μαγνητικές ιδιότητες των συντιθέμενων νανοϋλικών μελετήθηκαν με τη βοήθεια καμπυλών μαγνητισμού σε θερμοκρασία δωματίου. Στο σχήμα 4.4 φαίνονται οι καμπύλες μαγνητισμού του Fe_30_4 και Fe_3O_4@SiO_2@C18. Αρχικά, η έλλειψη υστέρησης αποδεικνύει ότι εμφανίζουν παραμαγνητικές ιδιότητες. Οι τιμές μαγνητικού κορεσμού είναι σχεδόν 60 Am^2/kg και 52 Am^2/kg αντίστοιχα. Παρατηρούμε ότι η τιμή μαγνητικού κορεσμού αυτών μαγνητικών νανοϋλικών μειώνεται με την αύξηση της επικάλυψης. Επιπλέον ο παραμένοντας μαγνητισμός και η απομαγνήτιση (remanence and coercivity) είναι σχεδόν μηδέν, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα συντιθέμενα υλικά ανταποκρίνονται μαγνητικά στην εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και επαναδιασπείρονται γρήγορα στο διάλυμα όταν απομακρυνθεί το μαγνητικό πεδίο.



Εικόνα 4.4: *Καμπύλες μαγνητισμού Fe_3O_4 και Fe_3O_4@SiO_2@C18*

4.2 Διαδικασία της μεθόδου εκχύλισης MSPE

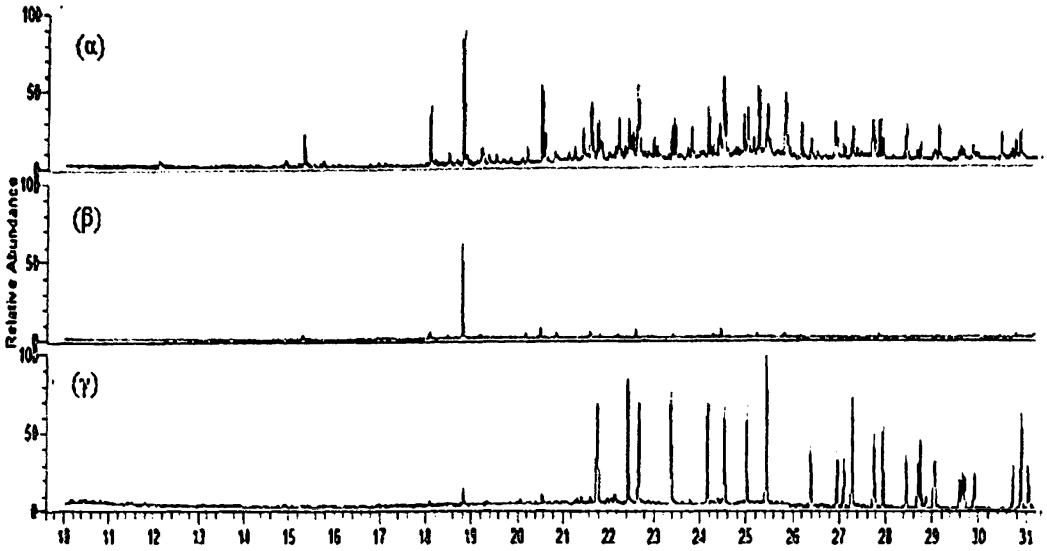
Τρία (3) mL γάλακτος αραιώνονται με απεσταγμένο νερό (1:1, v/v) και αναμειγνύονται με 2 mL φορμικού οξέος και 125 μL ακετονιτριλίου. Το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά [48]. Έπειτα, προστίθενται 100 μL διαλύματος Carrez 1 και 100 μL διαλύματος Carrez 2 για να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 2 λεπτά και φυγοκεντρείται (*4000rpm*) για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 17 mg Fe_3O_4@SiO_2@C18 τα οποία προηγουμένως έχουν ενεργοποιηθεί με μεθανόλη. Το διάλυμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 6 λεπτά και αφήνεται στην ηρεμία για 5 λεπτά. Τα μαγνητικά νανοϋλικά

διαχωρίζονται από τα διάλυμα με την χρήση μαγνήτη στα εξωτερικά τοιχώματα και το υπερκείμενο αποχύνεται. Οι αναλύτες εκλούονται από τα Fe_3O_4@SiO_2@C18 με 2.3 ml εξάνιο. Το διάλυμα μεθανόλης φιλτράρεται μέσα από φίλτρα μεμβράνης 0.45 μm, συμπυκνώνεται μέχρι τα 50 μL σε ήπιο ρεύμα ζώτου και μεταφέρεται σε κατάλληλο φιαλίδιο για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (*GC- MS*).

4.3Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της MSPE

4.3.1 Εκτίμηση προκατεργασίας δείγματος

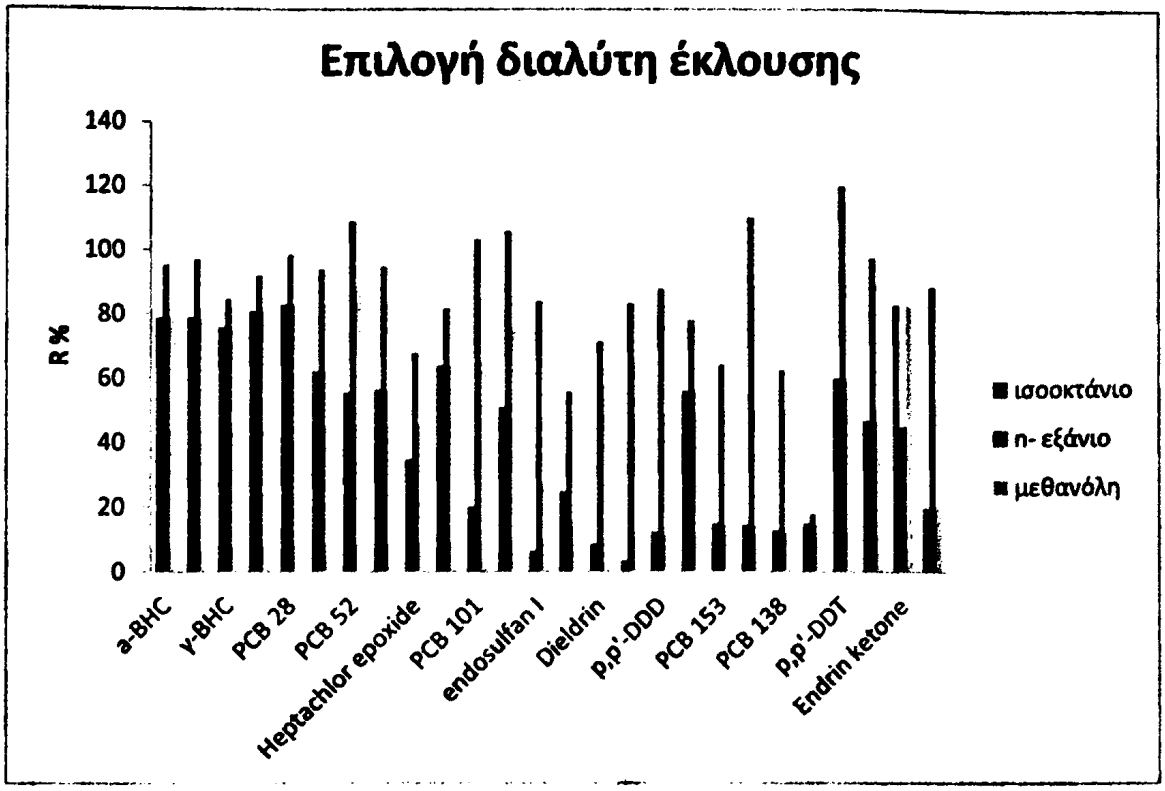
Το γάλα είναι μια περίπλοκο δείγμα γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η επεξεργασία του πριν την εκχύλιση για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και άλλων παρεμποδιζουσών ουσιών με σκοπό την απελευθέρωση των επιλεγμένων αναλυτών από τις πρωτεΐνες και το σπάσιμο των σφαιριδίων λίπους. Η επεξεργασία με θειικό οξύ είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος [48]. Αν και ορισμένα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα είναι ευαίσθητα στην χρήση οξέων, έχει αποδειχθεί ότι είναι σταθερά όταν χρησιμοποιούνται ασθενή οξέα [35] όπως το φορμικό οξύ. που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία. Επιπλέον, προστίθεται ακετονιτρίλιο γιατί θεωρείται ότι διασπά τους δεσμούς μεταξύ των λιπόφιλων OCPs και των σφαιριδίων λίπους του γάλακτος [47]. Τέλος, προστίθενται μικρές ποσότητες διαλυμάτων Carrez 1 και Carrez 2 για να διαλυθούν τυχόν γαλακτώματα. Η διαδικασία προκατεργασίας που περιγράφηκε παραπάνω μειώνει την επίδραση μήτρας (*matrix effect*) (*Εικόνα 4.5*) – που είναι η Αχίλλειος πτέρνα της ποσοτικής ανάλυσης- και συντελεί στον υψηλότερο εμπλουτισμό των επιλεγμένων αναλυτών. Στην παρούσα εργασία, για την καταπολέμηση των επιδράσεων μήτρας στο GC- MS, εκτός από την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν και καμπύλες βαθμονόμησης συνδυασμένες με τις επιδράσεις μήτρας (matrix- matched calibration curves).



Εικόνα 4.5 *: Χρωματογραφήματα MSPE-GC-MS (α) τυφλού δείγματος χωρίς προκατεργασία, (β) τυφλού δείγματος μετά την προκατεργασία και (γ) εμβολιασμένου δείγματος γάλακτος (100 μg/ L).*

4.3.2 Προκαταρκτικά πειράματα (Preliminary Experiments)

Προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της μεθανόλης, του *n*- εξανίου και του ισοοκτάνιου ως διαλύτες έκλουσης. Σε όλες τις περιπτώσεις, πριν από την έκλουση, τα μαγνητικά νανοϋλικά Fe_3O_4@SiO_2@C18 ξηράθηκαν σε ήπιο ρεύμα αζώτου. Τα πειραματικά αποτελέσματα (*Εικόνα 4.6*) έδειξαν ότι η εκλουστική δύναμη του *n*- εξανίου είναι ισχυρότερη σε σχέση με αυτή της μεθανόλης και του ισοοκτάνιου. Έτσι, το *n*- εξάνιο επιλέχθηκε ως διαλύτης έκλουσης.



Εικόνα 4.6 : Διάγραμμα επιλογής διαλύτη

4.3.3 Πειράματα διαλογής- αξιολόγησης (Screening Experiments)

Για την επιλογή και την αξιολόγηση των υπόλοιπων παραγόντων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, εφαρμόστηκε ένας κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός δύο βημάτων, 2^{7-4}. Οι παράγοντες που συμπεριλήφθηκαν στον σχεδιασμό αυτό είναι:

1. Ποσότητα προσροφητικού $Fe_3O_4@SiO_2@C18$
2. Χρόνος εκχύλισης
3. Όγκος διαλύτη έκλουσης
4. Χρόνος έκλουσης
5. Όγκος δείγματος

Για να συμπληρωθεί το πειραματικό σχέδιο που απαιτεί την ύπαρξη 7 παραμέτρων χρησιμοποιήθηκαν και δύο μεταβλητές dummy.

Κάθε παράγοντας εξετάστηκε σε τρία επίπεδα, -1 για το χαμηλό, 0 για το μηδενικό και +1 για το υψηλό επίπεδο. Το συγκεκριμένο πειραματικό σχέδιο στο σύνολό του απαιτούσε οχτώ πειράματα και τρία κεντρικά σημεία (μηδενικά) για την εκτίμηση του πειραματικού σφάλματος (*Πίνακας 4.2*).

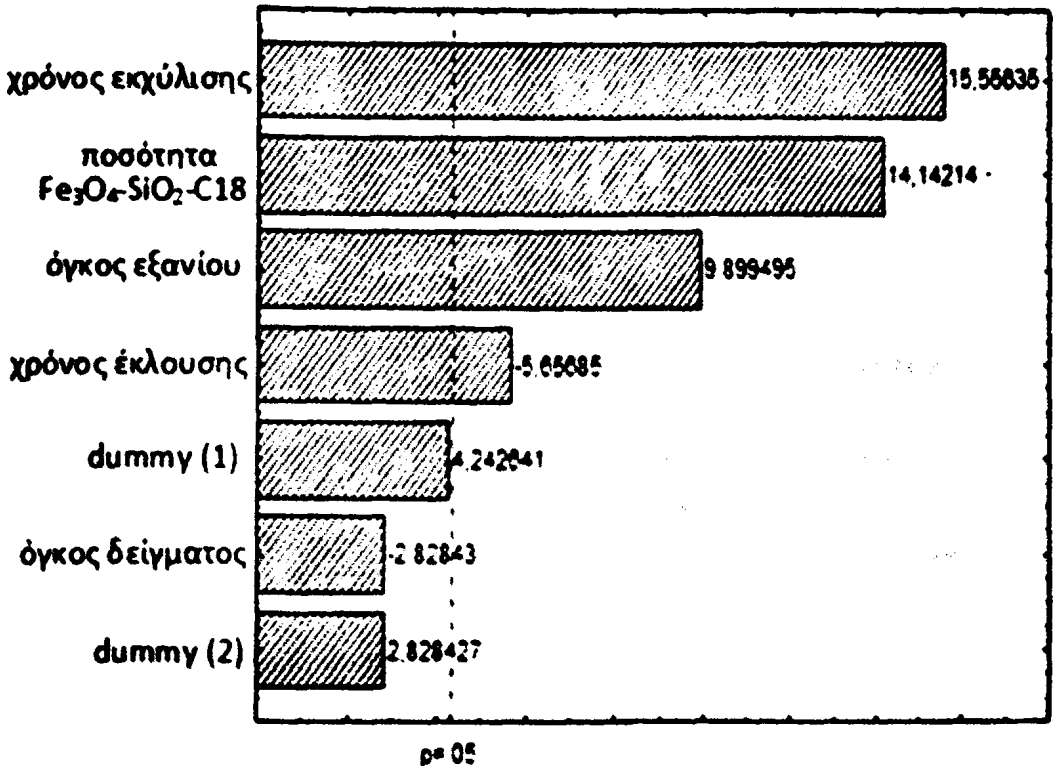
Πίνακας 4.2: *Το σχέδιο 2^{7-4}, οι παράγοντες που εξετάστηκαν και οι αποκρίσεις του (μέση ανάκτηση-R%)*

Παράγοντες	**Επίπεδα**		
	(-1)	**(0)**	**(+1)**
(X_1) dummy 1			
(X_2) Ποσότητα Fe_3O_4@SiO_2@C18 (mg)	5	10	15
(X_3) Όγκος *n*- εξανίου (mL)	1	1.5	2
(X_4) Χρόνος έκλουσης (min)	2	4	6
(X_5) Χρόνος εκχύλισης (min)	2	4	6
(X_6) Όγκος δείγματος (mL)	3	6	9
(X_7) dummy 2			

Πειράματα	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**X_4**	**X_5**	**X_6**	**X_7**	**R%**
1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	77
2	0	0	0	0	0	0	0	86.5
3	-1	1	1	-1	-1	1	-1	87
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	89
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	81
6	0	0	0	0	0	0	0	87
7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	86
8	-1	1	-1	-1	1	-1	1	84
9	1	-1	-1	-1	-1	1	1	86
10	0	0	0	0	0	0	0	86
11	1	1	1	1	1	1	1	91

Στα πειραματικά αποτελέσματα εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA), για να εξεταστεί ποιοι από τους παράγοντες επιδρούν στατιστικά

σημαντικά στην απόκριση της μεθόδου. Μία επίδραση θεωρείται σημαντική όταν ξεπερνά το σταθερό σφάλμα (standard error) που σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% έχουμε $p<0.05$, το οποίο υποδηλώνεται με κάθετη γραμμή στο διάγραμμα Pareto (*Σχήμα 4.7*).



***Σχήμα 4.7:** Διάγραμμα Pareto του σχεδίου 2^{7-4} για τα πειράματα διαλογής-αξιολόγησης, η κάθετη γραμμή ορίζει το διάστημα εμπιστοσύνης 95%.*

Στην πειραματική περιοχή που μελετήθηκε, τέσσερις παράγοντες αποδείχθηκαν στατιστικά σημαντικοί σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Το θετικό σήμα ενός παράγοντα υποδηλώνει πως καθώς αυξάνεται η τιμή του ακολουθεί και αύξηση της απόκρισης (*μέση ανάκτηση αναλυτών*), ομοίως, μείωση της τιμής έχει ως αποτέλεσμα μείωση της απόκρισης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο όγκος δείγματος δεν θεωρείται σημαντικός παράγοντας ($p= 0.10$), ενώ θετικές επιδράσεις παρατηρήθηκαν για τον χρόνο εκχύλισης ($p= 0.004$), την ποσότητα προσροφητικού ($p= 0.005$) και τον όγκο *n*- εξανίου ($p= 0.001$) και αρνητική επίδραση για τον χρόνο έκλουσης ($p= 0.003$). Η τιμή του

χρόνου εκχύλισης κρατήθηκε σταθερή στην υψηλότερη τιμή (6 min), ενώ η ποσότητα του προσροφητικού, ο όγκος του *n*- εξανίου και ο χρόνος έκλουσης αξιολογήθηκαν περαιτέρω με τη βοήθεια του σύνθετου σχεδιασμού τριών επιπέδων Box- Behnken (*BBD*) .

4.3.4 Πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken (*BBD*)

Με την ολοκλήρωση του προηγούμενου σχεδίου, το επόμενο βήμα ήταν η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της αναλυτικής μεθοδολογίας. Αυτό πραγματοποιήθηκε εξετάζοντας την επίδραση της ποσότητας του προσροφητικού (X_2- C18-NPs), του όγκου του *n*- εξανίου (X_3- Vsolv) και του χρόνου έκλουσης (X_4- Telut) στην απόκριση (Y, R%), με εφαρμογή του σύνθετου πειραματικού σχεδιασμού Box- Behnken.

Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό BBD, πραγματοποιήθηκαν 15 πειράματα. Στον πειραματικός σχεδιασμός BBD (*three- level- four- factor BBD)* τα πειραματικά σημεία βρίσκονται στα μεσοδιαστήματα των ακμών του κύβου και στο κέντρο (*κεντρικά σημεία*) [74]. Κάθε παράγοντας εξετάστηκε σε τρία επίπεδα, -1 για το χαμηλό, 0 για το μηδενικό και +1 για το υψηλό επίπεδο (*Πίνακας 4.3*).

Πίνακας 4.3: Ο πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken, οι τρεις παράγοντες που εξετάστηκαν και οι αποκρίσεις του (μέση ανάκτηση-R%)

Παράγοντες	**Επίπεδα**		
	(-1)	**(0)**	**(+1)**
(X_2) Ποσότητα Fe_3O_4@SiO_2@C18 (mg)	12	16	20
(X_3) Όγκος *n*- εξανίου (ml)	1,5	2	2,5
(X_4) Χρόνος έκλουσης (min)	4	5	6

Πειράματα	X_1	X_2	X_3	**R%**
1	1	1	0	86
2	-1	-1	0	82
3	0	0	0	52
4	0	-1	1	51
5	0	1	1	56
6	0	-1	-1	55
7	1	0	1	97
8	1	-1	0	55
9	0	0	0	124
10	-1	0	1	86
11	0	0	0	75
12	-1	1	0	79
13	-1	0	-1	108
14	1	0	-1	69
15	0	1	-1	113

Οι κύριες επιδράσεις, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων όπως και οι επιδράσεις δευτέρου βαθμού (*quadratic, Q*) εκτιμήθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης (*ANOVA*) (*Πίνακας 4.4*). Οι τιμές P που υπολογίστηκαν με τη χρήση του STATISTICA 7.0 δείχνουν τη σημαντικότητα κάθε μεταβλητής στην απόδοση της εκχύλισης των επιλεγμένων ενδοκρινικών διαταρακτών από δείγματα γάλακτος. Μια χαμηλή τιμή P υποδηλώνει υψηλή σημαντικότητα για διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Τα αποτελέσματα τη στατιστικής ανάλυσης έδειξαν ότι η ποσότητα του προσροφητικού (Fe_3O_4@SiO_2@C18) (X_2: $P = 0.03843$) είναι σημαντική παράμετρος για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενδοκρινικών διαταρακτών ($P < 0.05$).

Επιπρόσθετα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων X_3X_4 (*P = 0.031443*) και X_2X_3 (*P = 0.043986*) έχουν σημαντική συνεισφορά στην εκχύλιση των αναλυτών (*Εικόνα 4.8).*

Η ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος STATISTICA 0.7 (*StatSoft Inc., Tulsa, USA*), για διάστημα εμπιστοσύνης 95%, οδήγησε στην εξαγωγή μιας ημι-εμπειρικής μαθηματικής έκφρασης-εξίσωσης (Ε*ξίσωση. 4.2*),

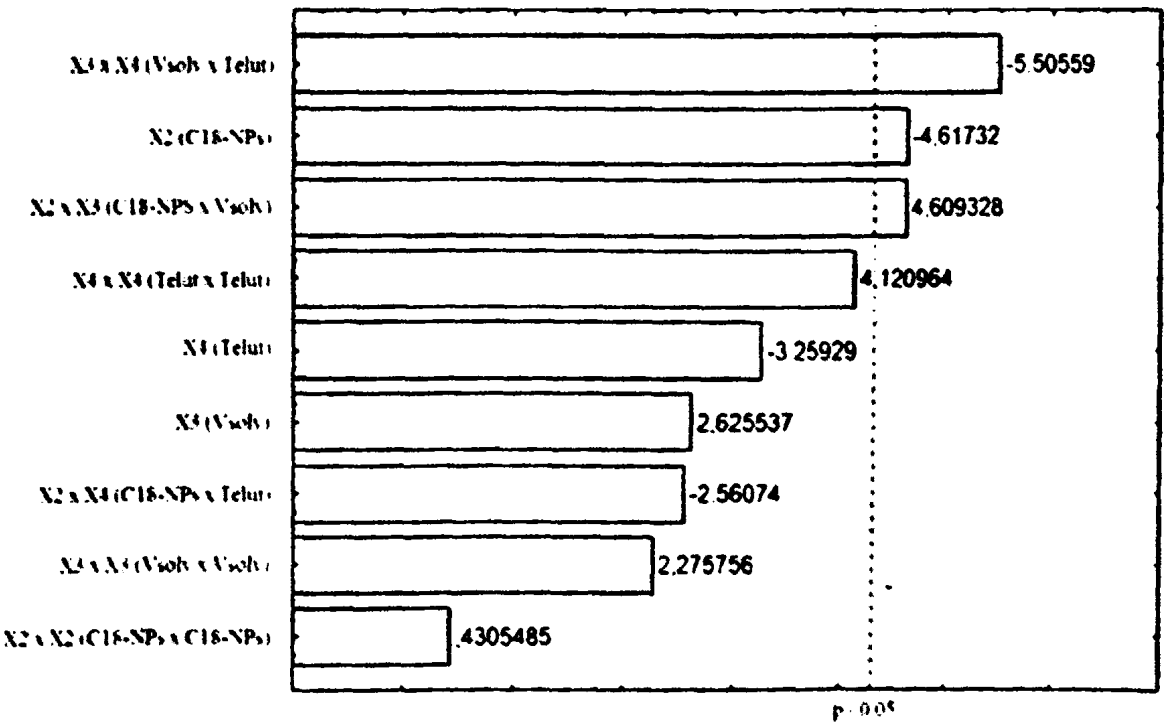
$$Y = 89.60 - 10.2X_2 + 14.4X_2X_3 - 17.2X_3X_4 \qquad (Εξ.4.2)$$

όπου, X_2 είναι η ποσότητα του προσροφητικού (*Fe_3O_4@SiO_2@C18*), X_3 είναι όγκος του διαλύτη έκλουσης (*n*-εξανίου) και X_4 είναι ο χρόνος έκλουσης.

Ο θετικός συντελεστής, υποδηλώνει ότι η αποδοτικότητα της εκχύλισης ευνοείται με την παρουσία υψηλών τιμών στις αντίστοιχες παραμέτρους, ενώ το αρνητικό πρόσημο υποδεικνύει ότι η απόδοση ευνοείται με την παρουσία χαμηλών τιμών. Ο θετικός συντελεστές δευτέρου βαθμού, μεταξύ ποσότητας Fe_3O_4@SiO_2@C18 - όγκου *n*-εξανίου (X_2X_3) δηλώνει συνεργιστική αλληλεπίδραση, ενώ ο αρνητικός συντελεστής στην περίπτωση όγκου *n*-εξανίου – χρόνου έκλουσης (X_3X_4), δηλώνει ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των παραμέτρων αυτών.

Πίνακας 4.4: Πίνακας των δεδομένων ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) για το μαθηματικό μοντέλο του BBD

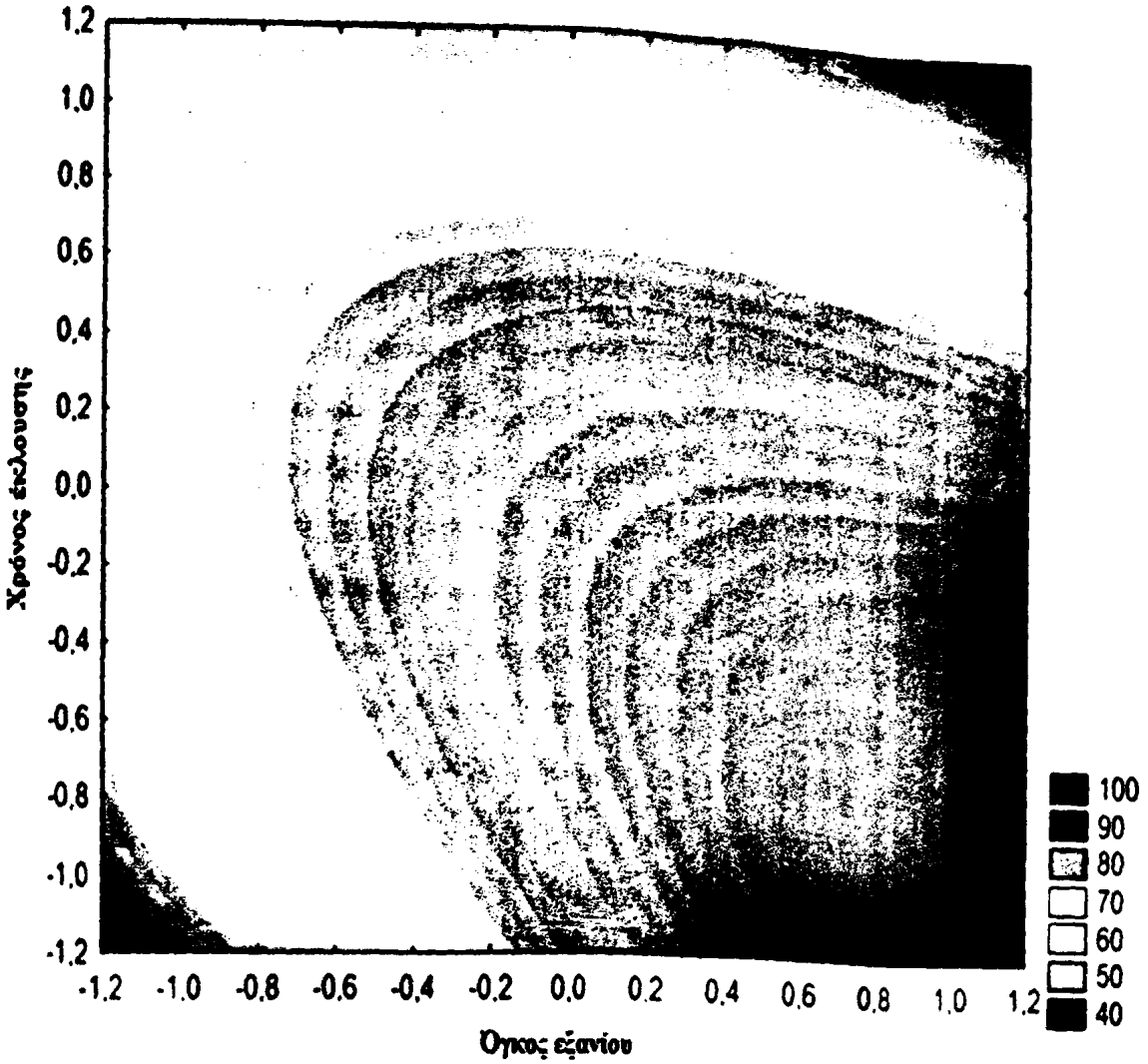
Παράγοντες (κωδικοποιημένοι)	Άθροισμα τετραγώνων (SS)	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Μέσα τετραγώνων (MS)	Δοκιμασία F	Τιμή P
X_2	832.32	1	832.32	21.31967	0.043843
X_2^2	7.237	1	7.237	0.18537	0.708754
X_3	269.12	1	269.12	6.89344	0.119594
X_3^2	202.191	1	202.191	5.17907	0.15064
X_4	414.72	1	414.72	10.62295	0.082635
X_4^2	662.991	1	662.991	16.98235	0.054146
X_2X_3	829.44	1	829.44	21.2459	0.043986
X_2X_4	256	1	256	6.55738	0.124624
X_3X_4	1183.36	1	1183.36	30.31148	0.031443
Έλλειψη προσαρμογής	113.28	3	37.76	0.96721	0.544537
Καθαρό σφάλμα	78.08	2	39.04		
Συνολικό SS	4790.016	14			



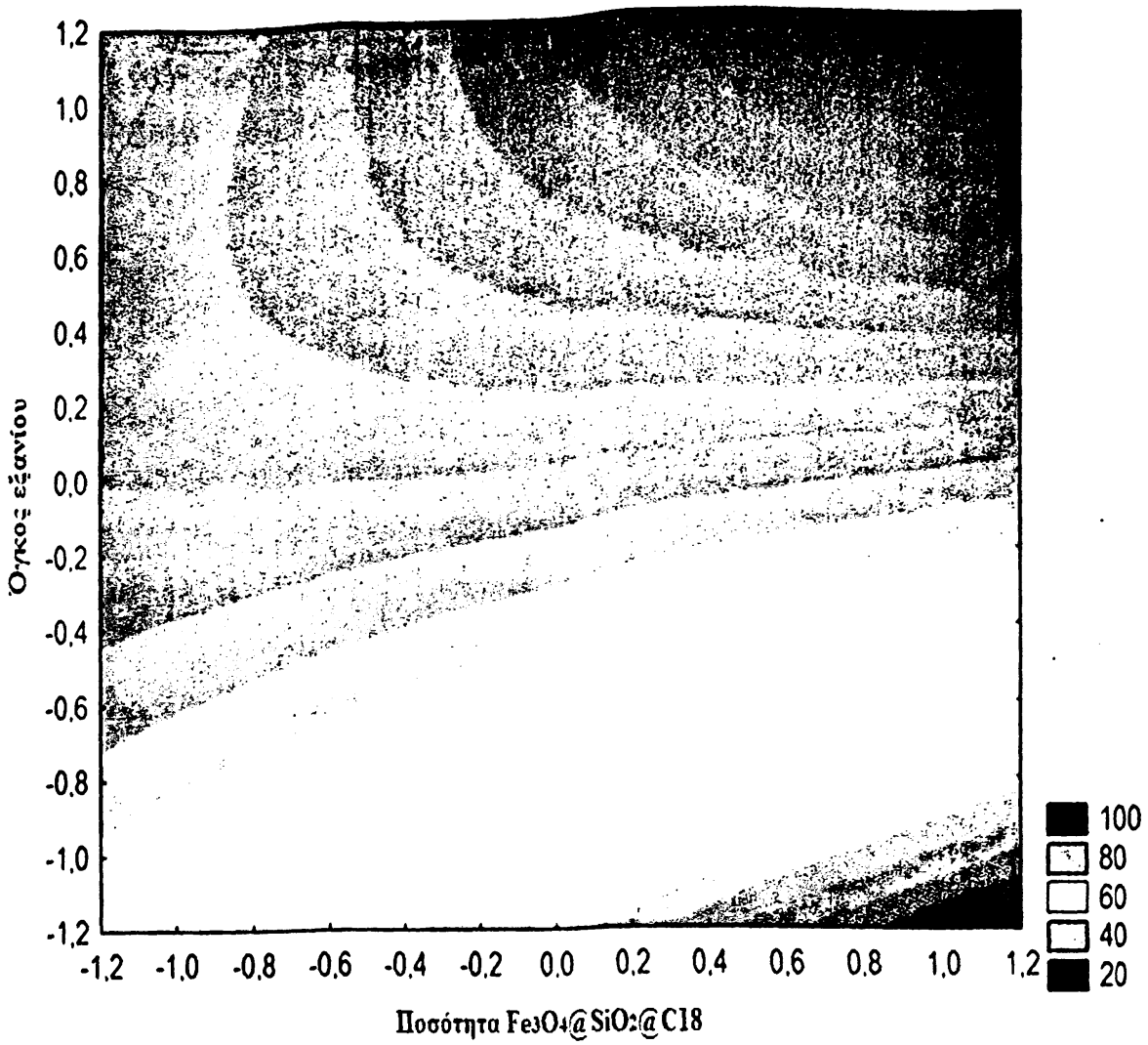
Εικόνα 4.8: *Διάγραμμα Pareto του πειραματικού σχεδιασμού Box- Behnken, η κάθετη γραμμή ορίζει το διάστημα εμπιστοσύνης 95%*

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε δοκιμή της έλλειψης προσαρμογής (*Lack of Fit*) που εκτιμά την επιτυχία ή όχι του μοντέλου να αναπαραστήσει τα δεδομένα στην πειραματική περιοχή, σε σημεία που δεν περιλαμβάνονται στην απόκριση. Ο έλεγχος έδειξε ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα (*pure error*), υποδεικνύοντας την επάρκεια του μαθηματικού μοντέλου (*Πίνακας 4.4*). Επίσης, ο συντελεστής παλινδρόμησης του μοντέλου (*regression coefficient-*R^2), 0.96000, βρίσκεται σε λογική συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι 96% της μεταβλητότητας μπορεί να εκφραστεί από το μοντέλο και 4% αποτελεί το υπόλοιπο μεταβλητότητας (*residual variability*).

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εξεταζόμενων μεταβλητών αναπαριστώνται μέσω των δισδιάστατων διαγραμμάτων προβολής της επιφάνειας απόκρισης και δίνονται στη εικόνα 4.9 και 4.10 για κάθε μια από τις αλληλεπιδράσεις. Η μορφή των διαγραμμάτων επιφάνειας απόκρισης απεικονίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των μελετώμενων παραγόντων X_2X_3 (ποσότητα Fe_3O_4@SiO_2@C18 - όγκος *n*-εξανίου) και X_3X_4 (όγκος *n*-εξανίου – χρόνος έκλουσης), αντίστοιχα. Όταν προστίθενται μικροί όγκοι *n*- εξανίου, η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μειώνεται ανεξάρτητα από τον χρόνο επαφής μεταξύ του προσροφητικού (Fe_3O_4@SiO_2@C18) και του διαλύτη έκλουσης (*n*- εξάνιο), ο οποίος είναι ο χρόνος έκλουσης (*Εικόνα 4.9*). Ακόμα, από το διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης της εικόνας 4.10 , παρατηρούμε ότι η μέγιστη απόδοση της μεθόδου παρατηρείται όταν χρησιμοποιούνται οι υψηλότερες τιμές και των δύο παραμέτρων (ποσότητα Fe_3O_4@SiO_2@C18 και όγκος *n*- εξανίου).



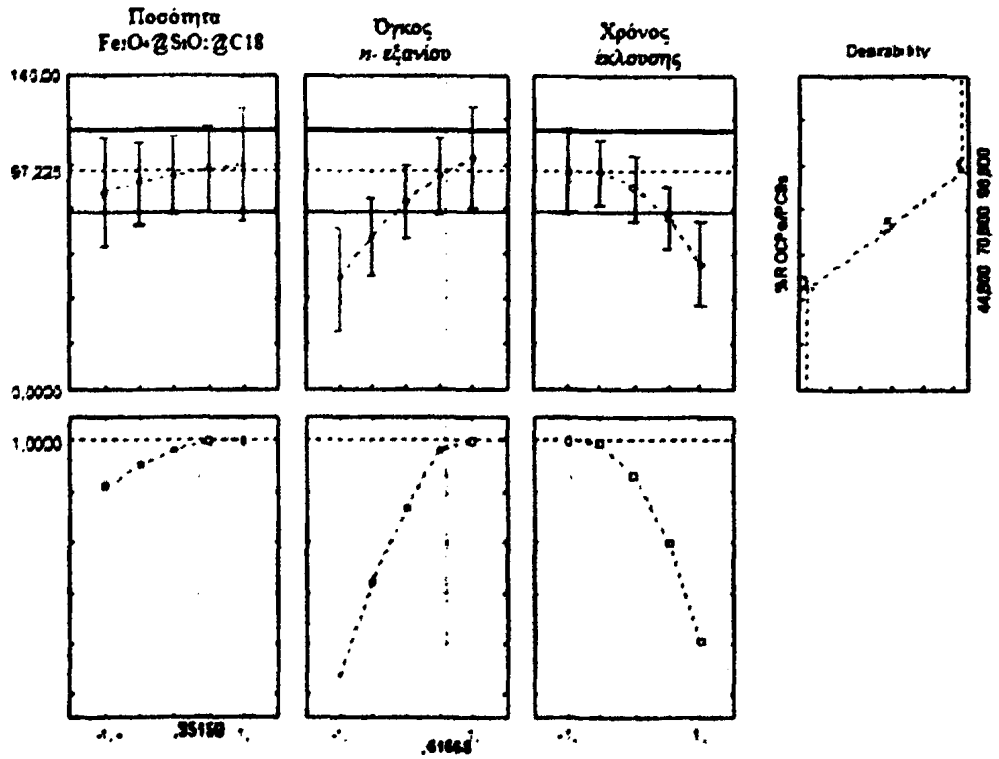
Εικόνα 4.9: *Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης για την αλληλεπίδραση του όγκου του n- εξανίου με τον χρόνο έκλουσης για τον πειραματικό σχεδιασμό Box- Behnken. Ο άξονας Z αναπαριστά τη μέση ανάκτηση για όλους τους επιλεγμένους αναλύτες (R%)*



Εικόνα 4.10: *Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης για την αλληλεπίδραση της ποσότητα Fe_3O_4@SiO_2@C18 με τον όγκο του n- εξανίου για τον πειραματικό σχεδιασμό Box- Behnken. Ο άξονας Z αναπαριστά τη μέση ανάκτηση για όλους τους επιλεγμένους αναλύτες (R%)*

Τέλος, οι βέλτιστες συνθήκες της προτεινόμενης μεθοδολογίας εκχύλισης, υπολογίστηκαν μέσω της συνάρτησης επιθυμητότητας (97% μέση ανάκτηση αναλυτών) (*Εικόνα 4. 11*) και τελικώς η συνολική εικόνα των βέλτιστων τιμών των πειραματικών παραμέτρων για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενδοκρινικών διαταρακτών από δείγματα γάλακτος είναι η ακόλουθη:

- Διαλύτης έκλουσης: *n*- εξάνιο
- Όγκος δείγματος: 3 mL
- Ποσότητα προσροφητικού Fe_3O_4@SiO_2@C18: 17 mg
- Χρόνος εκχύλισης: 6 min
- Όγκος διαλύτη έκλουσης: 2.3 Ml
- Χρόνος έκλουσης: 4 min



Εικόνα 4.11: *Το προφίλ των προβλεπόμενων τιμών και της συνάρτησης επιθυμητότητας για τη μέση ανάκτηση (R%) των αναλυτών. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν τις βέλτιστες τιμές των συγκεκριμένων παραμέτρων.*

Για λόγους επαλήθευσης εκτελέστηκαν τρεις πειραματικές δοκιμές βάση των προτεινόμενων από το μοντέλο βελτιστοποίησης συνθηκών. Τα πειραματικά αποτελέσματα (93% μέση ανάκτηση αναλυτών) έδειξαν υψηλή συσχέτιση με τα δεδομένα που ελήφθησαν από το μοντέλο βελτιστοποίησης, υποδεικνύοντας τόσο την αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου στην εκχύλιση των επιλεγμένων ενδοκρινικών διαταρακτών, όσο και την ικανότητα του μοντέλου να προβλέψει με επιτυχία την απόδοση της εκχύλισης.

4.3.5 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας (Method Validation)

Το τελικό στάδιο μετά την κατάληξη στις βέλτιστες συνθήκες είναι η επικύρωση της μεθόδου MSPE για τον προσδιορισμό των OCPs και PCBs σε δείγματα γάλακτος. Το σύστημα επικύρωσης που ακολουθήθηκε βασίστηκε στις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (*SANCO/12571/2013 European Guidelines*) [80]. Οι ποιοτικοί παράμετροι που μελετήθηκαν συμπεριλαμβάνουν την ειδικότητα (specificity), την γραμμική περιοχή (*linear range),* την επαναληψιμότητα (*RSDr*) και την αναπαραγωγιμότητα (RSD_{WR}) όπως και τα όρια ανίχνευσης (*LODs*) και ποσοτικοποίησης (*LOQs*).

- ***Ειδικότητα (specificity)***

Η ειδικότητα της μεθόδου δοκιμάστηκε με την ανάλυση τυφλών δειγμάτων (*blank samples*). Η απουσία, στη μήτρα, οποιασδήποτε χρωματογραφικής κορυφής στους χρόνους κατακράτησης που εκλούονται τα επιλεγμένα φυτοφάρμακα, έδειξε ότι δεν υπήρχαν επιδράσεις μήτρας (*matrix effects*) που μπορεί να δώσει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα στα τυφλά δείγματα.

- ***Γραμμικότητα (Linearity)***

Η γραμμικότητα μιας μεθόδου είναι η μέτρηση του εύρους εντός του οποίου η απόκριση του ανιχνευτή είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη σε πρότυπα διαλύματα ή δείγματα. Η μέθοδος της γνωστής

προσθήκης (*standard addition method*) χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των καμπύλων βαθμονόμησης: δείγμα βιολογικού γάλακτος- απαλλαγμένο από τους επιλεγμένους αναλύτες- εμβολιάστηκε με γνωστές συγκεντρώσεις των επιλεγμένων αναλυτών (η χαμηλότερη συγκέντρωση εμβολιασμού αντιστοιχεί στην τιμή LOQ του κάθε αναλύτη) πριν από την προετοιμασία του δείγματος (*επτά σημεία*). Αυτή η μέθοδος βαθμονόμησης επιλέχθηκε προκειμένου να αντισταθμιστούν οι πιθανές επιδράσεις μήτρας (*matrix effects*) που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του δείγματος και της ανάλυσης. Κάθε επίπεδο εμβολιασμού αναλύθηκε επί τρεις φορές. Οι συντελεστές προσδιορισμού (*coefficients of determination*, R^2) για όλες τις ενώσεις κυμαίνονται στο εύρος από 0.9950 ως 0.9999 (*Πίνακας 4.5*).

Πίνακας 4.5 : Συντελεστές προσδιορισμού και γραμμική περιοχή των EDCs

EDCs	R^2 (n=3)	Γραμμική περιοχή (μg L^{-1})
a-BHC	0.9984	0.9-500
b-BHC	0.998	0.8-500
γ-BHC	0.9976	0.4-500
δ-BHC	0.9988	0.9-500
PCB 28	0.9986	0.2-500
Heptachlor	0.9975	0.2-500
PCB 52	0.9968	0.3-500
Aldrin	0.9974	0.3-500
Heptachlor epoxide	0.9984	0.2-500
γ-chlordane	0.9961	0.3-500
PCB 101	0.9982	0.4-500
a-chlordane	0.9981	0.2-500
endosulfan I	0.9978	0.2-500
p,p'- DDE	0.995	0.4-500
Dieldrin	0.9958	0.4-500
Endrin	0.9982	0.2-500
Endosulfan II	0.9974	1-500
p,p'-DDD	0.9955	0.5-500
Endrin aldehyde	0.9999	0.8-500
PCB 153	0.9992	0.3-500
Endosulfan sulfate	0.9994	0.3-500
p,p'-DDT	0.9974	0.7-500
PCB 138	0.9985	0.3-500
Endrin ketone	0.9995	1.1-500
Methoxychlor	0.9986	0.5-500
PCB180	0.999	0.3-500

➢ ***Ακρίβεια (Accuracy)***

Η ακρίβεια αναφέρεται στη διαφορά μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων και της αληθής τιμής (μ). Στις αναλυτικές μεθοδολογίες μέτρο της ακρίβειας αποτελεί η ανάκτηση (*recovery-R%*) που υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση 4.3,

$$\boldsymbol{R}\% = \{\frac{[\boldsymbol{Αναλύτη}]_{\boldsymbol{ανιχν}}}{[\boldsymbol{Αναλύτη}]_{\boldsymbol{εμβολ}}}\} \times 100\% \quad (\textit{Εξ. 4.3})$$

όπου, $[\text{Αναλύτη}]_{\text{ανιχν.}}$ η συγκέντρωση του αναλύτη που τελικά ανιχνεύθηκε στο εμβολιασμένο υπόστρωμα και $[\text{Αναλύτη}]_{\text{εμβολ.}}$ η συγκέντρωση εμβολιασμού. Τα πειράματα ανάκτησης πραγματοποιήθηκαν σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (MRL *και LOQ κάθε αναλύτη*), με λαμβανόμενες ανακτήσεις από 79% έως 116% (*Πίνακας 4.6*). Η χαμηλότερη ανάκτηση αντιστοιχεί στο γ-BHC (*Lindane*) ενώ η υψηλότερη στο Endrin. Οι ανακτήσεις για όλους τους αναλύτες είναι σε αποδεκτά όρια σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής οδηγίας SANCO (*R % 70–120%).*

➢ ***Πιστότητα (Precision)***

Η πιστότητα εκφράζει τη συμφωνία των τιμών ανεξάρτητων επαναλαμβανόμενων μετρήσεων. Μέτρο της πιστότητας αποτελεί η επαναληψιμότητα (*intra-day repeatability, RSDr*) και η αναπαραγωγιμότητα (*inter-day reproducibility,* RSD_{WR}) εκφραζόμενες ως εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (*relative standard deviation, RSD%*). Ο έλεγχος πιστότητας της προτεινόμενης μεθοδολογίας και για τις δύο περιπτώσεις έγινε με πέντε επαναλήψεις, σε δύο επίπεδα εμβολιασμού (*MRL και LOQ κάθε αναλύτη*). Έτσι, η RSDr% κυμαινόταν από 2% έως 12%, ενώ για την $RSDw_R$% από 4% έως 14%. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αποδεκτά σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής οδηγίας SANCO (*R % 70–120%, RSDr, RSDWR≤ 20%*).

➢ ***Ανιχνευσιμότητα (Detectability)- Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)***

Η ανιχνευσιμότητα υποδηλώνει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει- ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών. Η ικανότητα αυτή εκφράζεται με τα όρια ανίχνευσης (*limits of detection-LODs*) και ποσοτικοποίησης (*limits of quantification-LOQs*). Η προτεινόμενη αναλυτική μέθοδος φάνηκε να ήταν αρκετά ευαίσθητη, για την ανάλυση πολύ μικρών ποσοτήτων των επιλεγμένων αναλυτών σε δείγματα γάλακτος. Τα LODs και LOQs στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας το GC-MS/SIM, με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 (*S/N=3*) και 10 (*S/N=10*), αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, τα LODs κυμαίνονταν από 0.1 μg L^{-1} έως 0.3 μg L^{-1} και τα LOQs κυμαίνονταν από 0.2 μg L^{-1} έως 1 μg L^{-1}. Παρά το γεγονός ότι αυτοί οι όροι αναφέρονται συνήθως στα όρια της μεθόδου, στην περίπτωση αυτή, οι αναφερόμενες τιμές αντιπροσωπεύουν τα LODs και LOQs της μεθόδου, λαμβάνοντας υπόψη και τις σχετικές επιδράσεις της μήτρας. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα LOQs είναι χαμηλότερα από θεσπισμένα από την Ευρωπαϊκή Ένωση [33] και την επιτροπή Codex Alimentarius [32] ανώτατα όρια υπολειμματικότητας των συγκεκριμένων αναλυτών στο γάλα (*Maximum Residue Limitis, MRLs*) (*Πίνακας 4.6*).

Πίνακας 4.6:.Πιστότητα, ακρίβεια και όρια ανίχνευσης της μεθόδου MSPE

	Σε επίπεδο εμβολιασμού ίσο με το LOQ			Σε επίπεδο εμβολιασμού ίσο με το MRL			LOD	LOQ
	Rec (%)	RSDr (%)	RSDwr (%)	Rec (%)	RSDr (%)	RSDwr (%)	(μg/L)	(μg/L)
a-BHC	98	4	8	99	4	11	0.3	0.9
b-BHC	95	4	5	89	3	6	0.2	0.8
γ-BHC	79	10	12	84	10	12	0.1	0.4
δ-BHC	93	4	9	96	5	7	0.3	0.9
PCB 28	91	5	6	86	5	6	0.1	0.2
Heptachlor	91	4	5	92	4	7	0.1	0.2
PCB 52	92	4	5	96	2	5	0.1	0.3
Aldrin	94	6	7	98	6	7	0.1	0.3
leptachlor epoxide	100	7	11	88	7	13	0.1	0.2
γ-chlordane	89	5	8	90	6	8	0.1	0.3
PCB 101	94	3	5	95	3	7	0.1	0.4
a-chlordane	94	3	4	96	4	4	0.1	0.2
endosulfan I	101	5	8	88	5	9	0.1	0.2
p,p'- DDE	90	6	8	82	6	8	0.1	0.4
Dieldrin	91	8	11	96	9	13	0.1	0.4
Endrin	103	10	11	116	10	11	0.1	0.2
Endosulfan II	97	2	4	104	3	6	0.3	1
p,p'-DDD	82	12	14	82	12	14	0.1	0.5
Endrin aldehyde	107	4	6	95	4	6	0.2	0.8
PCB 153	91	4	5	87	6	8	0.1	0.3
ndosulfan sulfate	82	5	5	84	5	5	0.1	0.3
p,p'-DDT	81	4	6	87	4	10	0.2	0.7
PCB 138	102	4	7	101	5	7	0.1	0.3
Endrin ketone	96	4	8	99	3	8	0.3	1
Methoxychlor	96	5	9	93	8	11	0.1	0.5
PCB180	92	7	8	98	5	8	0.1	0.3

4.3.6 Επαναχρησιμοποίηση των νανοϋλικών $Fe_3O_4@SiO_2@C18$

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μαγνητικών προσροφητικών υλικών $Fe_3O_4@SiO_2@C18$ για την εκχύλιση των επιλεγμένων αναλυτών. Τα $Fe_3O_4@SiO_2@C18$ εκπλένονται δύο φορές με ακετόνη, μετά από κάθε κύκλο προσρόφησης- έκλουσης. Μ' αυτόν τον τρόπο, παρατηρείται μεταφορά του αναλυτών από το προσροφητικό (*carry- over effect*). Από τα πειραματικά αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι οι ανακτήσεις των OCPs και PCBs και ως εκ τούτου, η ικανότητα εκχύλισης τους παρέμεινε σταθερή μετά από τρεις διαδοχικούς κύκλους, δείχνοντας καλή σταθερότητα και δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης. Όμως, μετά από τρεις διαδοχικούς κύκλους παρατηρήθηκε μείωση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης για όλους τους επιλεγμένους αναλύτες.

4.3.7 Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα

Η επικυρωμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των 26 επιλεγμένων διαταρακτών σε 20 δείγματα γάλακτος από σουπερμάρκετ της περιοχής των Ιωαννίνων (Β.Δ. Ελλάδα). Στα δείγματα γάλακτος που αναλύθηκαν περιλαμβάνονται:

- Φρέσκο γάλα με περιεκτικότητα σε λίπος 1.5%
- Γάλα μακράς διάρκειας με περιεκτικότητα σε λίπος 1.5%
- Γάλα υψηλής παστερίωσης με περιεκτικότητα σε λίπος 1.5%
- Συμπυκνωμένο γάλα με περιεκτικότητα σε λίπος 2.2- 4%
- Γάλατα πρώτης και δεύτερης βρεφικής ηλικίας (πλήρες)
- Συμπυκνωμένα γαλατά πρώτης και δεύτερης βρεφικής ηλικίας (πλήρες)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα δείγματα γάλακτος που αναλύθηκαν δεν περιείχε υπολείμματα των επιλεγμένων ενδοκρινικών διαταρακτών.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η ακρίβεια της μεθόδου MSPE, συγκρίθηκε με τη με μικροεκχύλιση στερεής φάσης (*Solid-phase microextraction, SPME*) που αναπτύχθηκε από την επιστημονική ομάδα της Fernandez- Alvarez [33]. Για τον σκοπό αυτό τυφλά δείγματα (*blank samples*) γάλακτος εμβολιάστηκαν σε συγκέντρωση 5g/ L και αναλύθηκαν και με τις δύο μεθόδους. Η δοκιμασία t-test που εφαρμόστηκε σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% έδειξε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων.

Βιβλιογραφία

[1]. Qingling Li, Michael H.W. Lam, Rudolf S.S. Wu, Biwang Jiang, «*Rapid magnetic-mediated solid-phase extraction and pre-concentration of selected endocrine disrupting chemicals in natural waters by poly(divinylbenzene-co-methacrylic acid) coated Fe_3O_4 core-shell magnetite microspheres for their liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination*», Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 1219- 1226.

[2]. U.S. Environmental Protection Agency (EPA), http://www.epa.gov.

[3]. Vasiliki I. Boti, Vasilios A. Sakkas, Triantafyllos A. Albanis, «*Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples: Part I: Ultrasonic extraction from diverse sediment matrices*», Journal of Chromatography A, 1146 (2007) 139- 147.

[4]. Vasiliki I. Boti, Vasilios A. Sakkas, Triantafyllos A. Albanis, «*An experimental design approach employing artificial neural networks for the determination of potential endocrine disruptors in food using matrix solid-phase dispersion*», Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 1296-1304.

[5]. Pesticide Action Network UK, The List of Lists (2005), http://www.pan-uk.org.

[6]. Βασιλική Ι. Μπότη, «*Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό επιλεγμένων ενώσεων με ενδοκρινική διαταρακτική δράση (EDCs) σε φυσικά νερά, ιζήματα και τρόφιμα- Εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων*», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (2009), Διδακτορική διατριβή.

[7]. Guillete, L.J. and Crain, D.A., «*Environmental Endocrine Disrupters: an evolutionary perspective*», (2000), Taylor & Francis, Inc

[8]. Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, I. and Wenze, A. «*IUPAC Technical Report: Endocrine disruptors in the environment*», Pure and Applied Chemistry, 75 (2003) 631-681.

[9]. Jon C. Cook, Linda S. Mullin, Steven R. Frame, and Lisa B. Biegel, «*Investigation of a Mechanism for Leydig Cell Tumorigenesis by linuron in*

Rats Toxicology and Applied Pharmacology», Toxicology and Applied Pharmacology, 119(2) (1993) 195-104.

[10]. Wade V. Welshons, Kristina A. Thayer, Barbara M. Judy, Julia A. Taylor, Edward M. Curran, and Frederick S. vom Saal, «*Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity*», Environ Health Perspectives, 111(8) (2003) 994–1006.

[11]. Wikipedia (free encyclopedia), http://www.wikipedia.org

[12]. Μαρία Ρεκλείτη, Παναγιώτης Κυλούδης, «*Φυτοφάρμακα: Οι Επιπτώσεις τους στην Υγεία και η Αντιμετώπιση Δηλητηρίασης στην Πρωτοβάθμια Φροντίδα*», Hellenic Journal of Nursing, 51(4) (2012) 364–374.

[13]. Α.Ι. Μαρούλης, Κ. Χατζηαντωνίου-Μαρούλη , Α. Τσιομλεκτσής, Σ. Χρηστίδης, «*Χημεία και Καθημερινή Ζωή. Φυτοφάρμακα και Λιπάσματα. Η πράσινη προσέγγιση*», Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης ,Τμήμα Χημείας.

[14]. Γεώργιος Ράλλης, «*Χρωματογραφικός προσδιορισμός ξενοβιοτικών ενώσεων με χημειομετρικές μεθόδους βελτιστοποίησης σε πνεύμονα από νεκροτομικό υλικό*», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (2012), Μεταπτυχιακή διατριβή.

[15]. British Columbia, Ministry of Agriculture, http://www.gov.bc.ca/agri.

[16]. E.A. Kerle, J.J. Jenkins and P.A.Vogue, «*Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection*», Oregon State University, (2007).

[17]. Georgios N. Rallis, Vasilios A. Sakkas, Vassiliki A. Boumba, Theodore Vougiouklakis, Triantafyllos A. Albanis, «*Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in post-mortem human lung by matrix solid-phase dispersion with the aid of response surface methodology and desirability function*», Journal of Chromatography A, 1227 - (2012) 1-9.

[18]. Hans Ragnar Norli, Agnethe Christiansen, Ermias Deribe, «*Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry*», Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 7234-7241.

[19]. Abdelkader Derouiche, Mohamed Ridha Driss, Jean-Pierre Morizur, Marie-Helene Taphanel, «*Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography–tandem mass spectrometry*», Journal of Chromatography A, 1138(2007) 231-243.

[20]. Martial LeDoux, «*Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades*», Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 1021.

[21]. Simone Machado Goulart, Maria Eliana L.R. de Queiroz, Antonio Augusto Neves, Jose Humberto de Queiroz, «*Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection*», Talanta, 75 (2008) 1320-1323.

[22]. Alfonso Di Muccio, Patrizia Pelosi, Danilo Attard Barbini, Tiziana Generali, Antonella Ausili, Fabio Vergori, «*Selective extraction of pyrethroid pesticide residues from milk by solid-matrix dispersion*», Journal of Chromatography A, 765 (1997) 51- 60.

[23]. Sara Bogialli, Roberta Curini, Antonio Di Corcia, Aldo Laganà, Manuela Nazzari, Michela Tonci, «*Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry*», Journal of Chromatography A, 1054 (2004) 351- 357.

[24]. Blus JL. Organochlorine pesticides. In : Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J, Jr. Handbook of Ecotoxicology. Lewis Publishers, Bocan Raton, FL,1995: 275-300.

[25]. P.C. Jepson, «*Pesticides, uses and effects*», Oregon State University, (2001).

[26]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), http://www.atsdr.cdc.gov.

[27]. G.W.A. Milne, «*Pesticides: An International Guide to 1800 Pest Control Chemicals*», Ashgate, Second Edition, (2004).

[28]. Huntzinger O, Safe S, Zitko V. The Chemistry of PCB's. CRC Press, Boca Raton, FL, 1974: 253.

[29]. Jensen S. The PCB Story. AMBIO, 1: 123-128 (1972) Kimbrough RD, Jensen AA, eds. Halogenated Biphenyls, Napthalenes, Dibenzodioxins and Related Compounds Elsevier, Amsterdam, 1989, chapt. 15.

[30]. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, http://www.pops.int/documents/convtext/context-en.pdf.

[31]. G.W.A. Milne, «*Pesticides: An International Guide to 1800 Pest Control Chemicals*», Ashgate, Second Edition, (2004).

[32]. Codex Alimentarius Commission, International Food Standards, URL:http://www.codexalimentarius.org.

[33]. Maria Fernandez- Alvarez, Maria Llompart, J. Pablo Lamas, Marta Lores, Carmen Garcia-Jares, Rafael Cela, Thierry Dagnac, «Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk», Analytica Chimica Acta, 617 (2008) 37–50.

[34]. Hiroyuki Kataoka, Heather L. Lord, Janusz Pawliszyn, «*Applications of solid-phase microextraction in food analysis*», Journal of Chromatography A, 880 (2000) 35–62.

[35]. Joana Gomes Martins, Araceli Amaya Chαvez, Stefan M. Waliszewski, Arturo Colvn Cruz, Marva Magdalena Garcva Fabila, «*Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk*», Chemosphere 92 (2013) 233–246.

[36]. Ζώτου Αναστασία, Μεταπτυχιακή Διατριβή: «*Μελέτη της τεχνολογίας παρασκευής και φυσικοχημικών, μικροβιολογικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών φρέσκου μαλακού τυριού από νωπό, παστεριωμένο και μικροδιηθημένο αγελαδινό γάλα*», Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Ιούνιος 2009.

[37]. Γενικό Χημείο του Κράτους, www.gcsl.gr.

[38]. Food and Agriculture Organization of United Nations, www.fao.org.

[39]. World Health Organization, www.who.int.

[40]. Μάντης Α. (2000): «*Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του*» (Εκδόσεις Κυριακίδη).

[41]. Food science, University of Guelph, www.uoguelph.ca.

[42]. International Livestock Research Institute (*ILRI*), www.ilri.org.

[43]. Edwige Kampire, Bernard T. Kiremire, Steven A. Nyanzi, Michael Kishimba, «*Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets*», Chemosphere 84 (2011) 923–927.

[44]. S.M. Waliszewski, V.T. Pardío, K.N. Waliszewski, J.N. Chantiri, A.A. Aguirre, R.M.Infanzón, J. Rivera, «*Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico*», The Science of the Total Environment 208 (1997) 127-132.

[45]. Lina Kantiani, Marinella Farre, Damia Barcelo, «*Analytical methodologies for the detection of b-lactam antibiotics in milk and feed samples*», Trends in Analytical Chemistry, Vol. 28, No. 6 (2009).

[46]. Martial LeDoux, «Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades», Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 1021–1036.

[47]. Stephen W.C. Chung, Benedict L.S. Chen, «*Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: a critical review on the analytical methods and their testing capabilities*», Journal of Chromatography, A 1218 (2011) 5555–5567.

[48]. A. Covaci, C. Hura, R. Schepens, «*Determination of Selected Persistent Organochlorine Pollutants in Human Milk Using Solid Phase Disk Extraction and Narrow Bore Capillary GC-MS*», Chromatographia 54 (2001) 247-252.

[49]. Jean-François Focant, Andreas Sjödin, Wayman E. Turner, Donald G. Patterson, «*Measurement of selected polybrominated diphenyl ethers, polybrominated and polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human serum and milk using comprehensive two-dimensional gas chromatography isotope dilution time-of-flight mass spectrometry*», Analytical Chemistry, 76 (2004) 6313–6320.

[50]. Aguilera-Luiz, M.M., Plaza-Bolapos, P., Romero-Gonzαlez, R., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., «*Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*», Analytical and Bioanalytical Chemistry, 399 (2011) 2863–2875.

[51]. Mezcua, M., Repetti, M.R., Agóera, A., Ferrer, C., Garcva-Reyes, J.F., Fernαndez-Alba, A.R., «*Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry*», Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389 (2007) 1833–184.

[52]. L. Rohrig, H-U. Meisch, «*Application of solid phase micro extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk*», Journal of Analytical Chemistry, 366 (2000) 106–111.

[53]. S.M. Waliszewski, V.T. Pardio, K.N. Waliszewski, J.N. Chantiri, A.A. Aguirre, R.M. Infanzhn, J. Rivera, «*Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico*», The Science of the Total Environment 208 (1997) 127-132.

[54]. Anoop Kumar, Preeti Dayal, Gangesh Shukla, Geeta Singh, P.E. Joseph, «*DDT and HCH residue load in mother's breast milk: a survey of lactating mother's from remote villages in Agra region*», Environment International, 32 (2006) 248–251.

[55]. Luque de Castro M.D., Priego-Capote F. «*Soxhlet extraction: Past and present panacea*», Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 2383–2389.

[56]. Ουρανία Χριστοπούλου «*Χρωματογραφικός προσδιορισμός Πολυαρωματικών Υδρογονανθράκων (ΠΑΥ) σε οικιακή σκόνη με τη συμβολή πολυπαραγοντικής ανάλυσης*», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (2012), Μεταπτυχιακή διατριβή.

[57]. Dimitra A. Lambropoulou, Triantafyllos A. Albanis, «*Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by*

chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review», Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389 (2007) 1663–1683.

[58]. Χρήστος Θ. Ραυτόπουλος, «*Ανάπτυξη και εφαρμογή νέων αναλυτικών τεχνικών για τον προσδιορισμό της υπολλειματικότητας φυτοφαρμάκων σε θερμοκηπιακά προϊόντα*», Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (2011), Μεταπτυχιακή διατριβή.

[59]. Amy Couch Schultz, «*Nanotechnology: Industrial Revolution or Emerging Hazard?*», Environmental Claims Journal, 19 (3) 199–205.

[60]. Σταυρούλα Λούρου, «*Νανοτεχνολογία και εφαρμογές*», Τεχνικό εκπαιδευτικό ίδρυμα Λαμίας (2012), Πτυχιακή εργασία.

[61]. R. Lucena, B.M.Simonet, S.Cárdenas, M.Valcárcel, «*Potential of nanoparticles in sample preparation*», Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 620–637.

[62]. Xiao-Shui Li, Gang-Tian Zhu, Yan-Bo Luo, Bi-Feng Yuan, Yu-Qi Feng, «*Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation*», Trends in Analytical Chemistry, Vol. 45, 2013.

[63]. Wei Wu, Quanguo He, Changzhong Jiang, «*Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies*», Nanoscale Res Lett, 3 (2008) 397–415.

[64]. Ευσταθία Βούλγαρη, «*Υβριδικά μαγνητικά νανοσωματίδια για τη στοχευμένη χορήγηση σισπλατίνης σε καρκινικούς όγκους*», Πανεπιστήμιο Πατρών (2013), Μεταπτυχιακή Διατριβή.

[65]. Jun Ding, Qiang Gao, Xiao-Shui Li, Wei Huang, Zhi-Guo Shi, Yu-Qi Feng, «*Magnetic solid-phase extraction based on magnetic carbon nanotube for the determination of estrogens in milk*», Journal of Separation Science, 34 (2011) 2498–2504.

[66]. Παπαδογιάννης, ΙΝ., Σαμανίδου, Β.Φ., «*Ενόργανη Χημική Ανάλυση*», Θεσσαλονίκη (2001).

[67]. Χατζηιωάννου, Θ.Π, Κουππάρης, Μ.Α., «*Ενόργανη Ανάλυση*», Αθήνα (2003).

[68]. Morgan E., «*Chemometrics: Experimental Design*», Thames Polyethnic, Analytical Chemistry By Open Learning, Wiley J. & Sons Ltd, England.

[69]. Ντζούφρας Ι., Καρλής Δ., «*Στοιχεία πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων: σημειώσεις για το μάθημα Ανάλυση Δεδομένων Ι*», Πανεπιστήμιο Αιγαίου, 2011.

[70]. Σακκάς Βασίλειος, Διδακτικές σημειώσεις.

[71]. Δημήτριος Π. Κομίλης «*Πειραματικός Σχεδιασμός και Στατιστική Ανάλυση*», Ξάνθη (2006).

[72]. Καχριμάνης Κ., Μαλαματάρης Σ.Χ., «*Τεχνικές Βελτιστοποίησης και Νοήμονα Προγράμματα στη Μορφοποίηση των Φαρμάκων. Φαρμακευτική*»14 III, (2001), 135-152.

[73]. Κανάρης Αθανάσιος Γ. « *Υπολογιστική και Πειραματική μελέτη για το βέλτιστο σχεδιασμό εναλλακτών θερμότητας τύπου πλακών*», Θεσσαλονίκη (2008) Διδακτορική διατριβή.

[74]. Constantine Stalikas, Yiannis Fiamegos, Vasilios Sakkas, Triantafyllos Albanis, « *Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction*», Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 175–189.

[75]. D. Brynn Hibbert, «*Experimental design in chromatography: A tutorial review*», Journal of Chromatography B, 910 (2012) 2– 13.

[76]. Chunzhu Jiang, Ying Sun, Xi Yu, Yan Gao, Lei Zhang, Yuanpeng Wang, Hanqi Zhang, Daqian Song, « Application of C18-functional magnetic nanoparticles for extraction of aromatic amines from human urine», Journal of Chromatography B, 947–948 (2014) 49–56.

[77]. Elham Tahmasebi, Yadollah, Morteza Moradi, Ali Esrafili, «*Polythiophene-coated Fe_3O_4 -superparamagnetic nanocomposite: Synthesis and application as a new sorbent for solid-phase extraction*», Analytica Chimica Acta, 770 (2013) 68- 74.

[78]. Bozorgmehr Maddah, Javad Shamsi, «*Extraction and preconcentration of trace amounts of diazinon and fenitrothion from environmental water by*

magnetite octadecylsilane nanoparticles», Journal of Chromatography A, 1256 (2012) 40–45.

[79]. Mauricio Morel, Francisco Martínez, Edgar Mosquera, «*Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles from mineral magnetite*», Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 343 (2013), 76-81.

[80]. European Commission Health & Consumer protection Directorate-General, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, in: SANCO/12571/2013, European Commission Health & Consumer protection Directorate-General, November2013.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πίνακας 1.

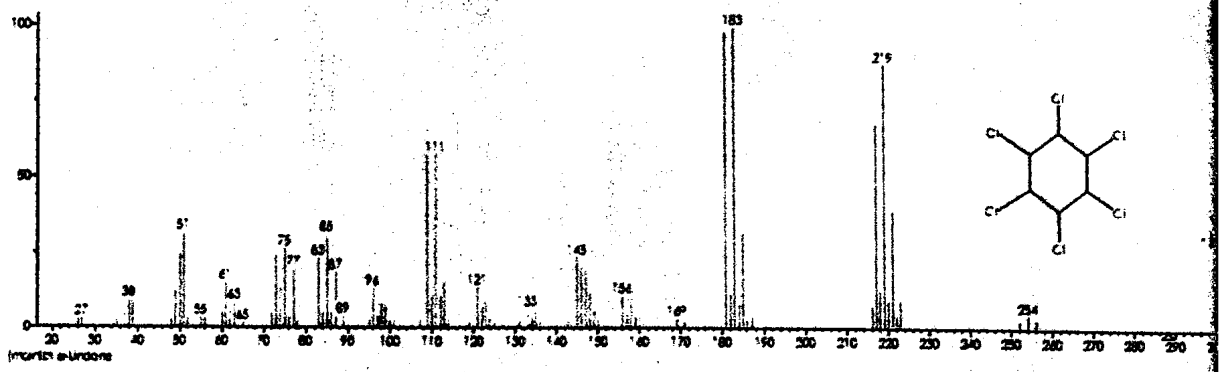
Άνω κρίσιμες τιμές της κατανομής Student t με ν βαθμούς ελευθερίας

	Πιθανότητα υπέρβασης της κρίσιμης τιμής					
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	2.635	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

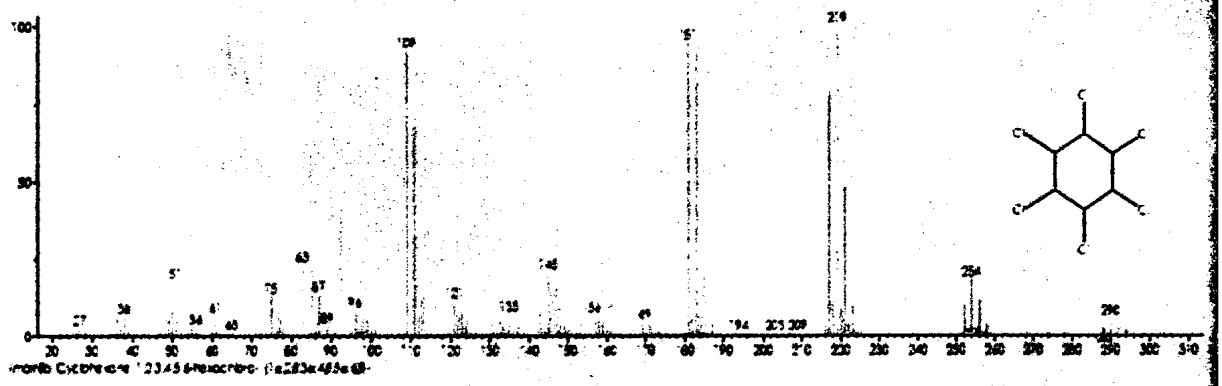
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Φάσματα μάζας οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων (OCPs)

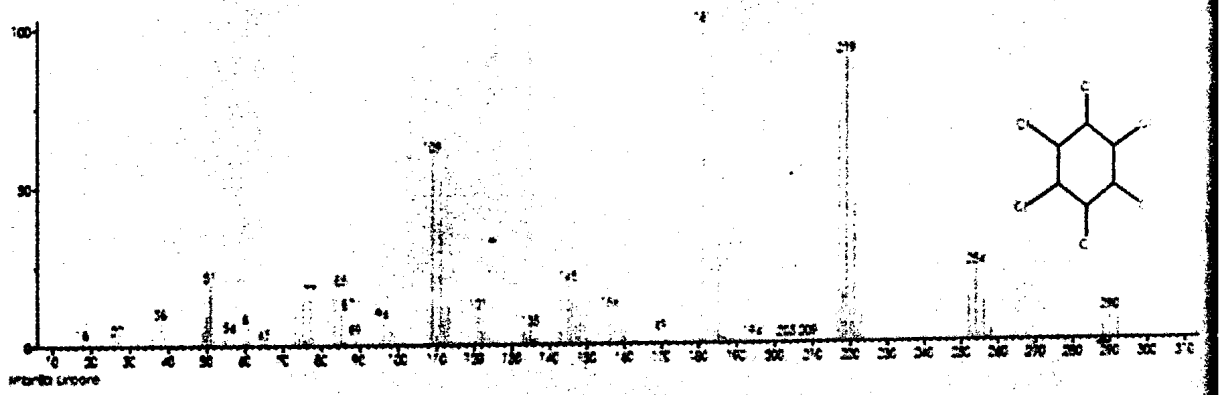
α- BHC



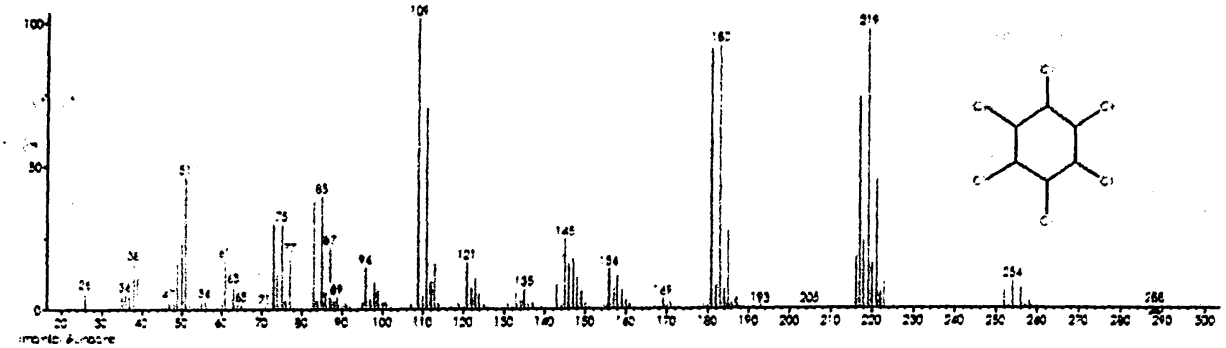
β- BHC



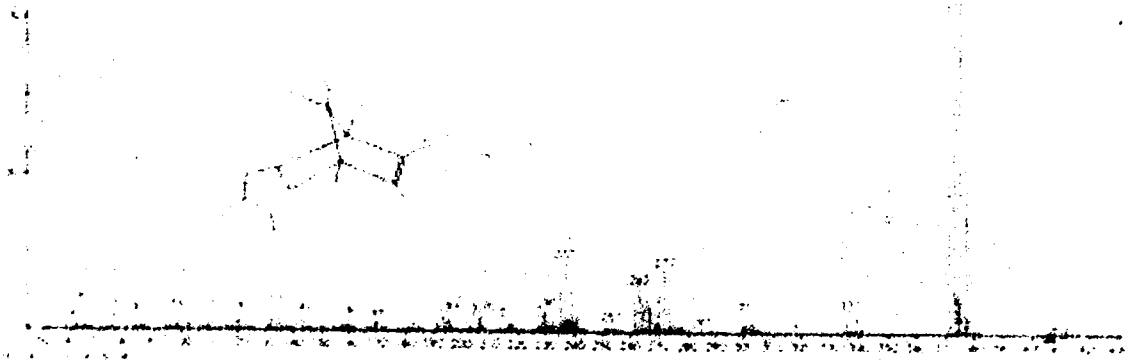
γ- BHC



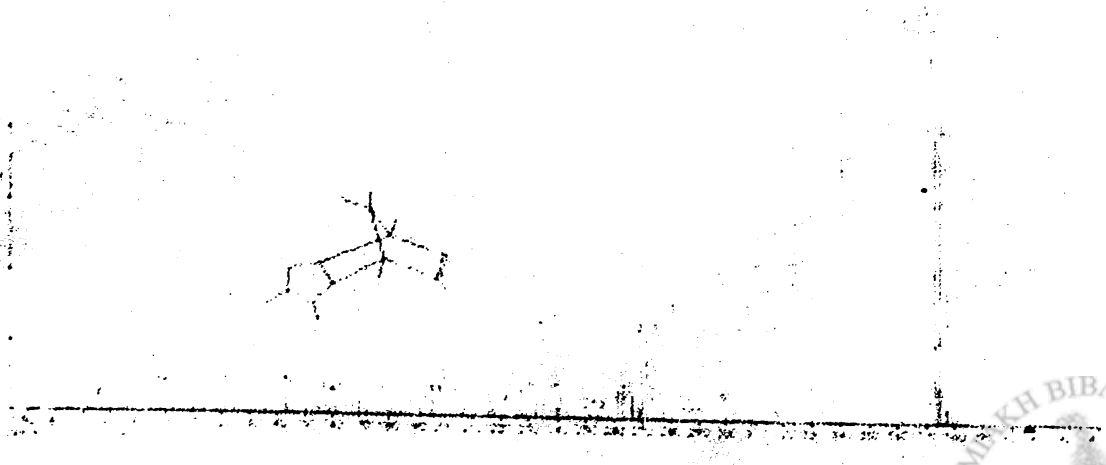
δ- BHC



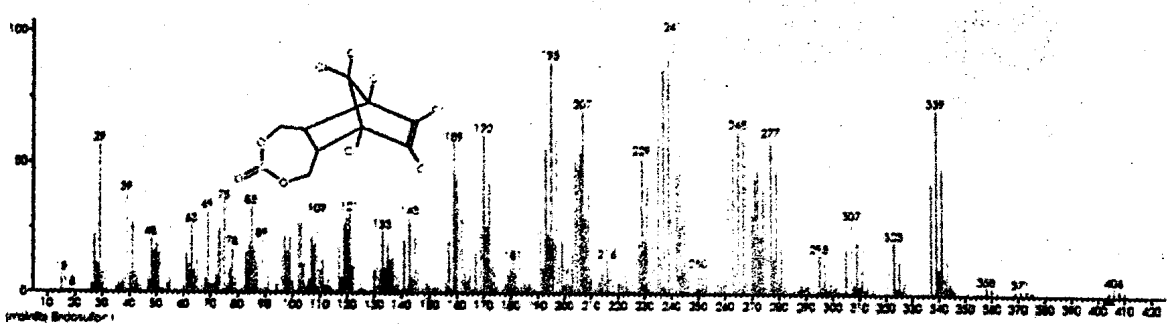
α- Chlordane



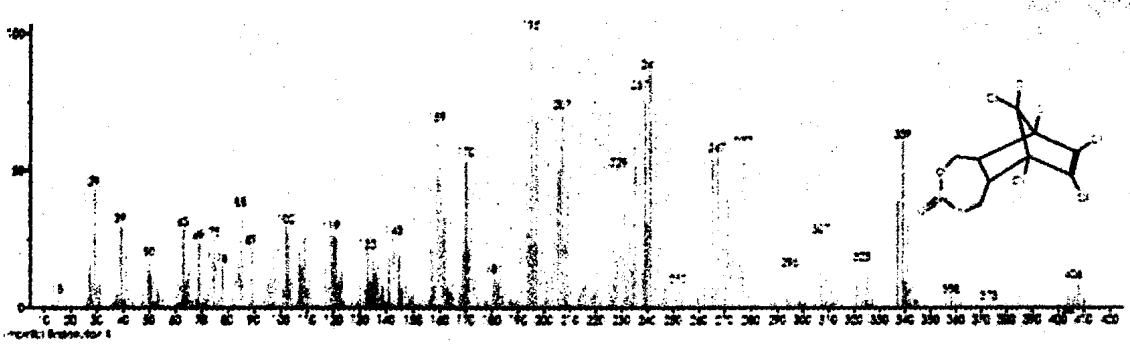
γ-Chlordane



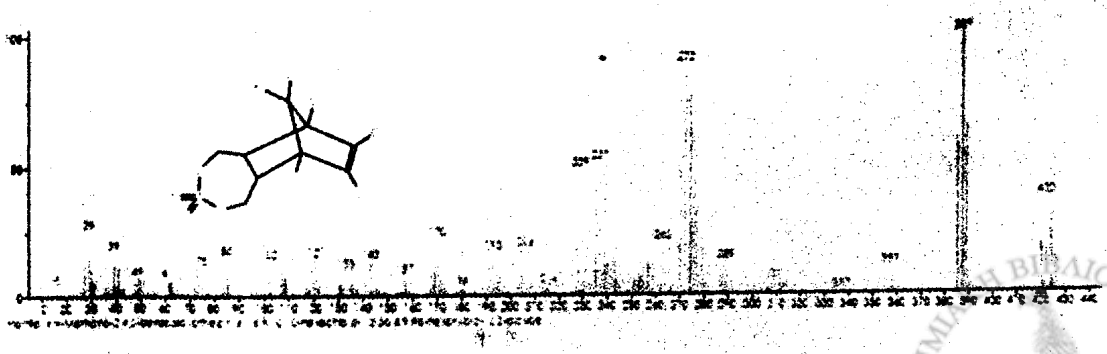
Endosulfan I



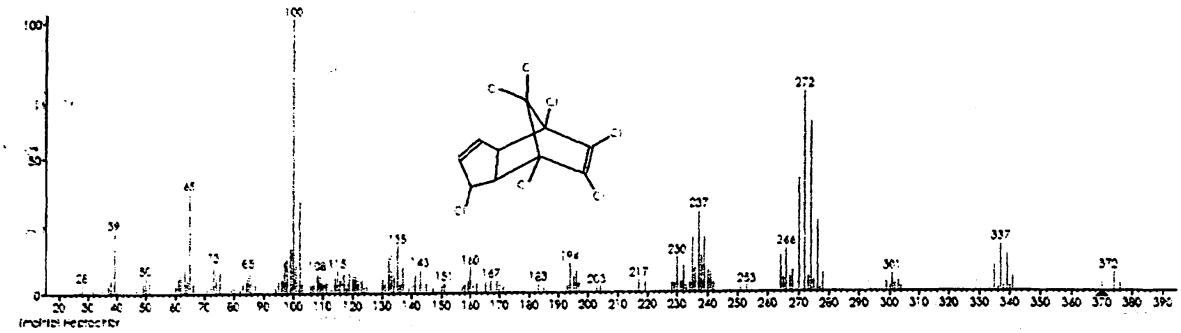
Endosulfan II



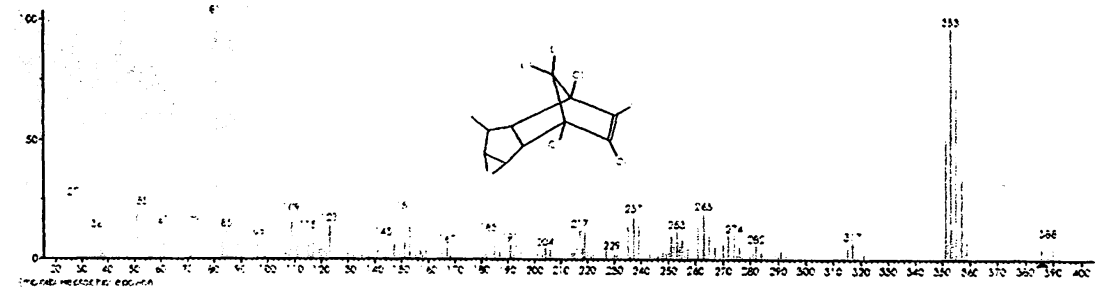
Endosulfan sulfate



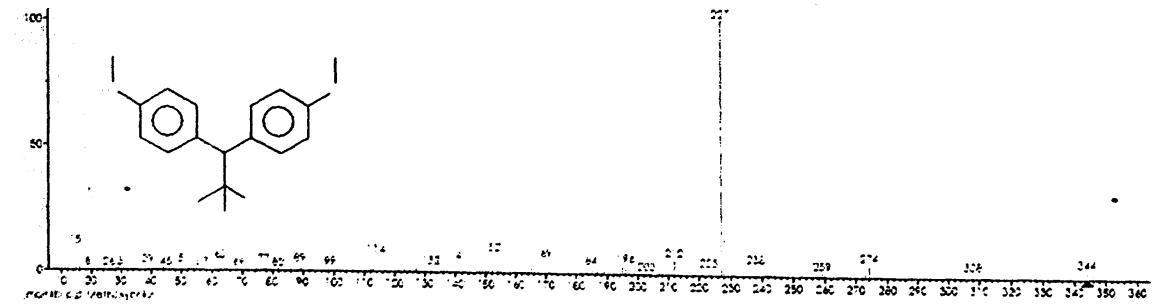
Heptachlor



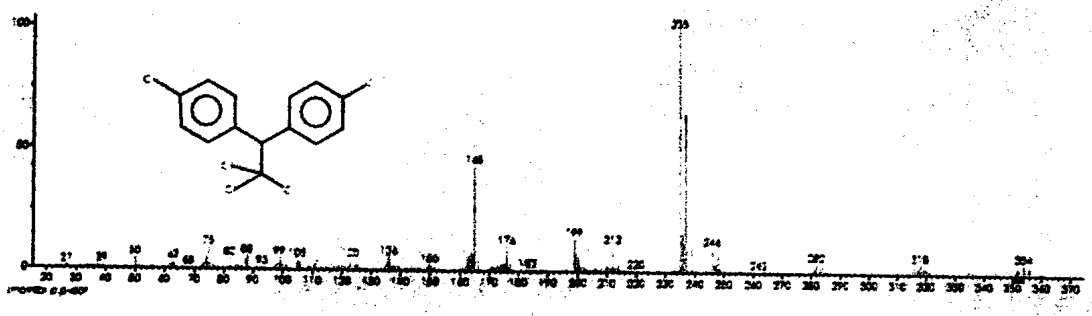
Heptachlor epoxide



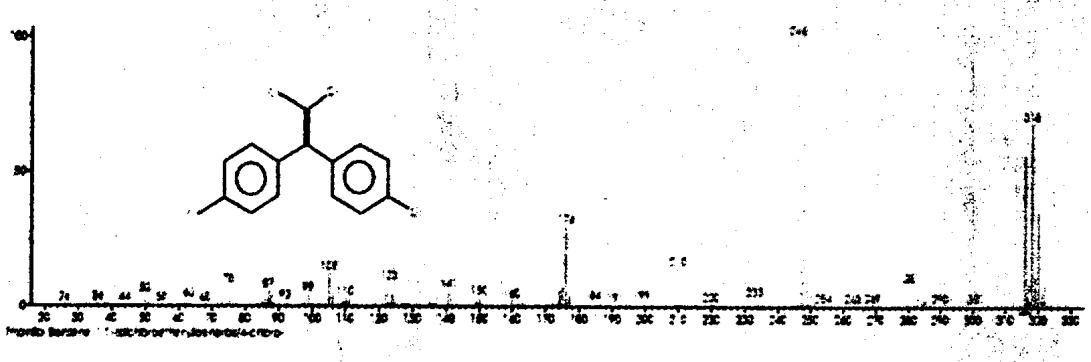
Methoxychlor



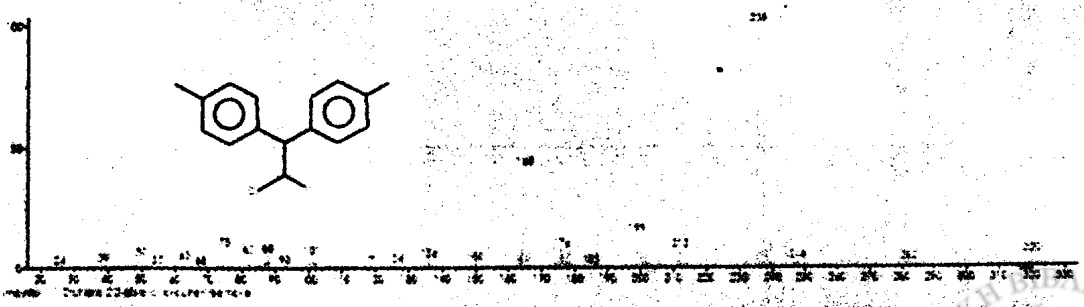
p,p'-DDT



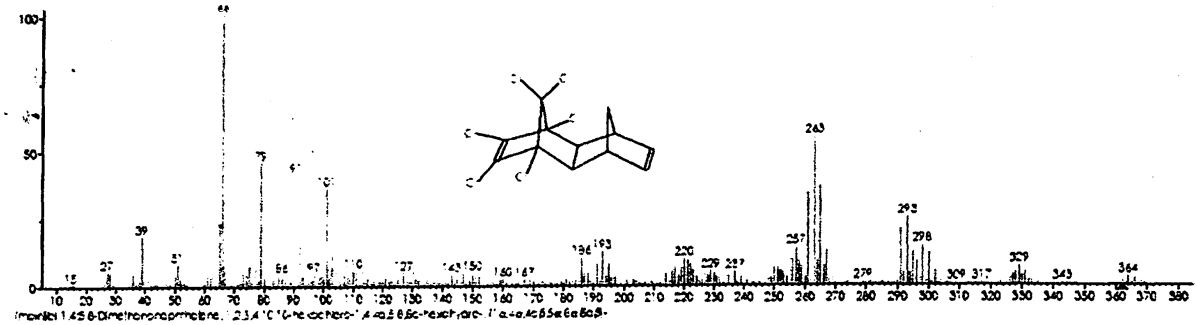
p,p'-DDE



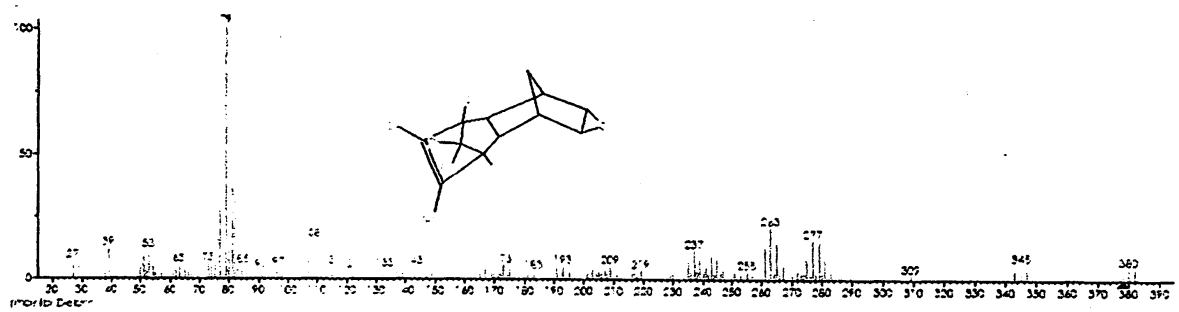
p,p'-DDD



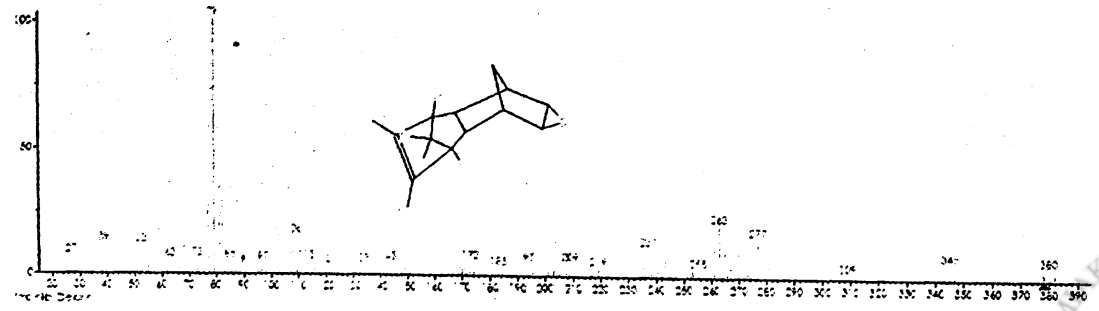
Aldrin



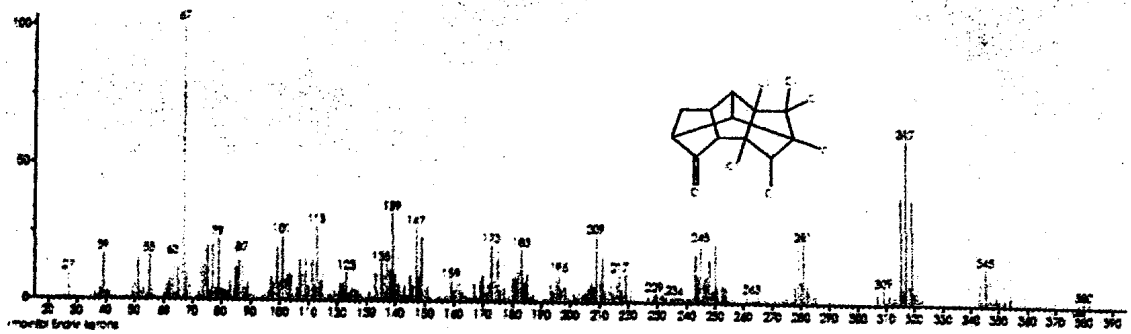
Dieldrin



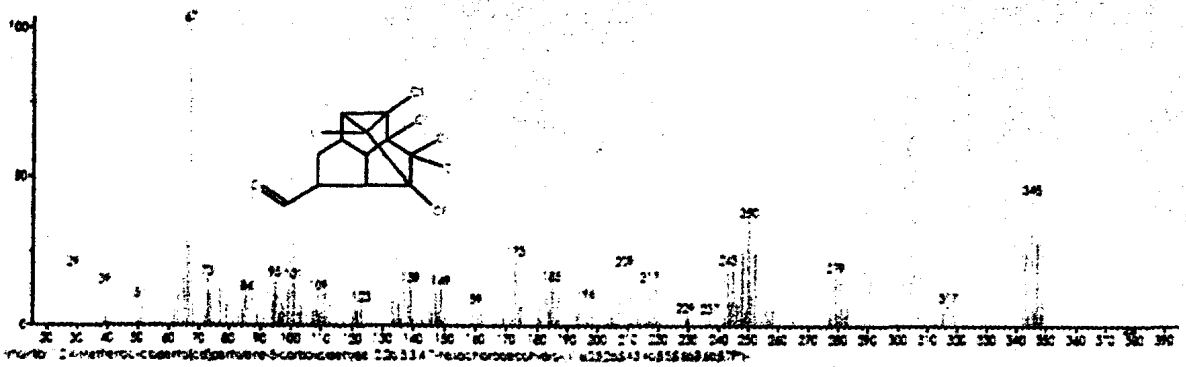
Endrin



Endrin ketone



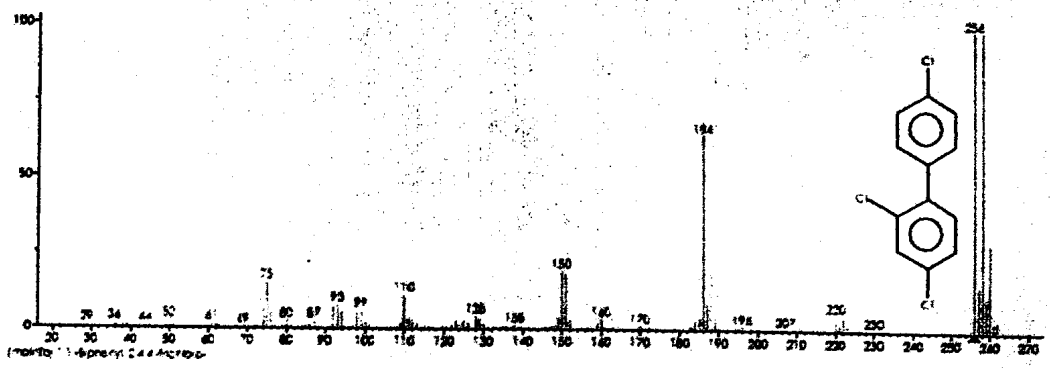
Endrin aldehyde



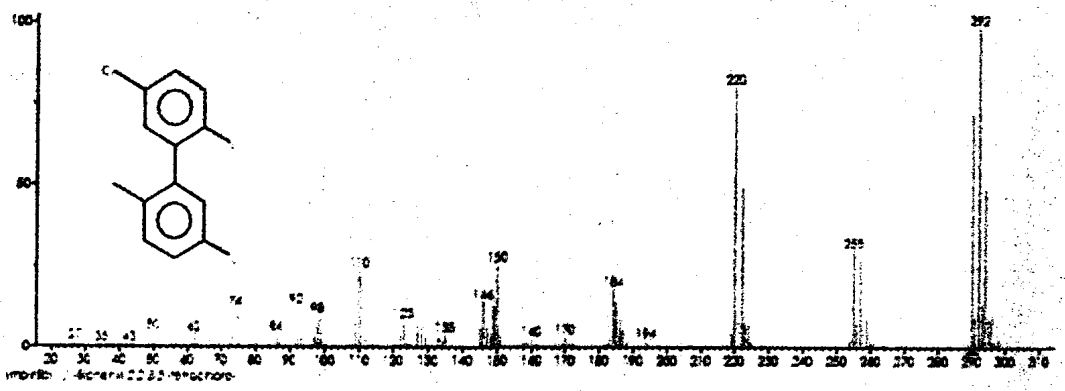
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Φάσματα μάζας πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs)

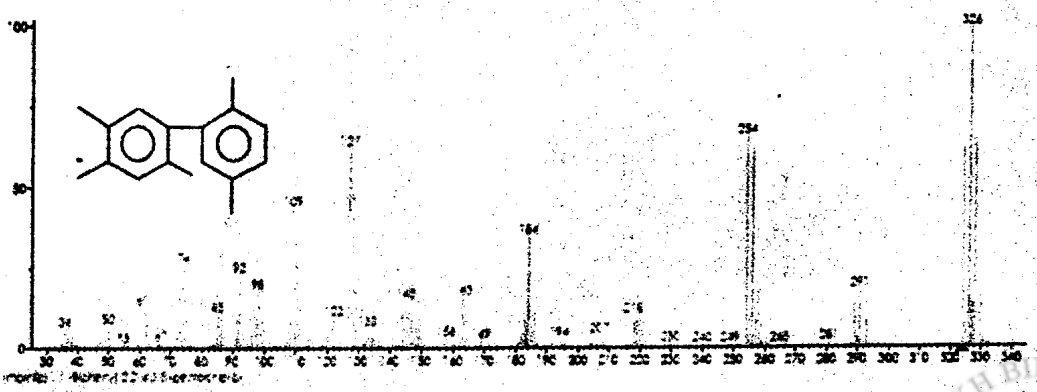
PCB 28



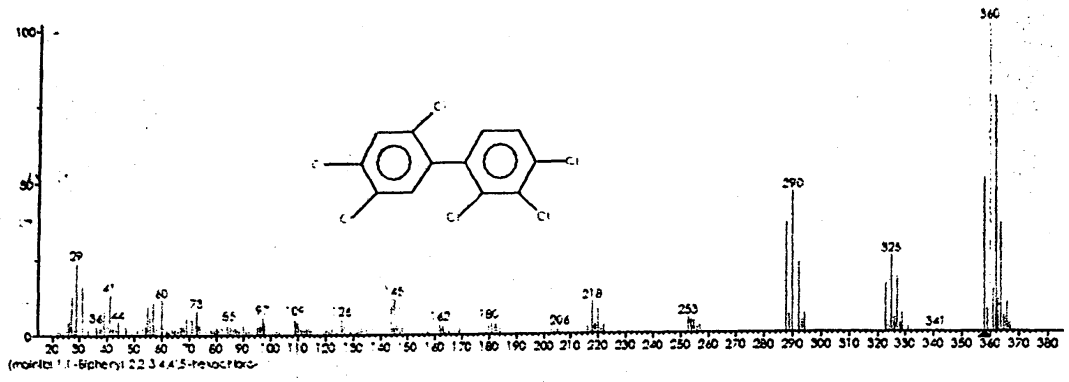
PCB 52



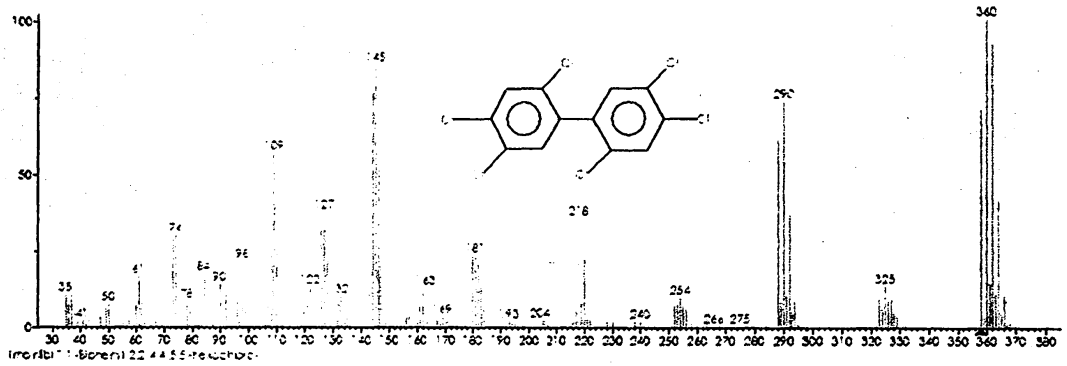
PCB 101



PCB 138



PCB 153



PCB 180