



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού
αναδυόμενων ρύπων και ρύπων προτεραιότητας σε
θαλάσσιους οργανισμούς με GC–MS/MS**

**Μανινάκη Ειρήνη
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

Ιανουάριος 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού αναδυόμενων ρύπων και ρύπων προτεραιότητας σε θαλάσσιους οργανισμούς με GC–MS/MS

ΜΑΝΙΝΑΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

A.M.: 11608

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Εμμανουήλ Δασενάκης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 25/02/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο προσδιορισμός επικίνδυνων ρύπων προτεραιότητας καθώς και των έμμεσων οργανικών ρύπων (persistent organic pollutants, POPs), σε υδρόβιους οργανισμούς μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη μεταφορά των ενώσεων αυτών στην τροφική αλυσίδα ενώ παράλληλα αποτελεί κριτήριο υποβάθμισης του υδροφόρου ορίζοντα.

Με την αποτελεσματική παρέμβαση των περιβαλλοντικών αρχών, τη δημιουργία Οδηγιών για την προστασία της ποιότητας του υδάτινου περιβάλλοντος και την εφαρμογή προγραμμάτων παρακολούθησης του, έχει περιοριστεί και σε πολλές περιπτώσεις απαγορευτεί η χρήση πολλών ρύπων προτεραιότητας, εδώ και αρκετές δεκαετίες. Ωστόσο, λόγω της ικανότητάς τους να παραμένουν στο περιβάλλον (σε αέρια, υγρή αλλά και στερεά φάση) αλλά και της τάσης τους να βιοσυσσωρεύονται στους ζώντες οργανισμούς, εξακολουθούν να εμφανίζονται πανταχού στα οικοσυστήματα.

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιείται ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων (organochlorine pesticides, OCPs) και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) σε δείγματα ιστού ψαριών, μυδιών και άλλων θαλάσσιων οργανισμών. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 19 πραγματικά δείγματα από διάφορα σημεία της Μαύρης Θάλασσας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζων τύπου τριπλού τετραπόλου (GC–EI–QQQ). Έγινε χρήση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC) και εσωτερικών προτύπων (IS) για τη διασφάλιση ποιότητας της μεθόδου και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας που μελετήθηκαν κατά την επικύρωση της μεθόδου είναι η γραμμικότητα, ακρίβεια, πιστότητα καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

Παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στην έκθεση των υδρόβιων οργανισμών σε ρύπους προτεραιότητας, με τις συγκεντρώσεις να ποικίλουν, ανάλογα με την περιεκτικότητα σε λίπος του δείγματος αλλά και το σημείο δειγματοληψίας. Χαρακτηριστική είναι η παρουσία του Pyrene από την ομάδα των PAHs, σε όλα

δείγματα, με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0.19 έως 16 $\mu\text{g/kg}$. Από την ομάδα των OCPs κυριαρχεί η παρουσία της οικογένειας των DDT (και παραγώγων του DDD και DDE) με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1.3 έως 18 $\mu\text{g/kg}$.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Περιβαλλοντική Αναλυτική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ρύποι προτεραιότητας, OCPs, PAHs, θαλάσσιοι οργανισμοί, GC-EI-QQQ

ABSTRACT

The determination of dangerous priority pollutants and persistent organic pollutants (POPs) in aquatic biota can provide with plenty information on the ability of those compounds to climb higher in the food chain while it is also a criterion for degradation of the aquifers.

Due to the effective intervention of environmental authorities, the past few decades, with the establishment of Framework Directives for the protection of water quality and initiation of monitoring programs, the use of priority substances is in many cases restricted or eliminated. However, it is well known that such compounds are resilient, thus persist in air, aquatic and solid phase resulting in a tendency to bioaccumulate in living organisms and still be ubiquitous in ecosystems.

In the present thesis, a method for the determination of organochlorine pesticides (OCPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aquatic biota samples is being developed and validated. This method was applied to 19 real specimens, from various sampling sites of Black Sea. The analysis of the aforementioned compounds was performed using gas chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry (GC-EI-QQQ). Quality assurance and quantitation was achieved with the use of Quality Control samples (QC) and Internal Standards (IS) for each analyte. Accuracy, Precision, Matrix Effect and Limits of Detection and Quantitation were used as performance characteristics.

The exposure extent of each biota sample varied not only depending on the lipid content of the sample but the sampling site as well. Some of the most characteristic analytes present in all the biota samples, were: Pyrene from PAHs group, with concentrations ranging from 0.19 to 16 µg/kg and DDT group (including DDD and DDE compounds) with concentrations ranging from 1.3 to 18 µg/kg.

SUBJECT AREA: Environmental Analytical Chemistry

KEYWORDS: priority pollutants, OCPs, PAHs, aquatic biota, GC–EI–QQQ

*Στον πατέρα μου και τον Απόλλωνα,
που έφυγαν πολύ νωρίς
και δεν πρόλαβαν να δουν την ολοκλήρωση αυτής της πορείας.*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	19
1. Θεωρητικό Μέρος	21
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	23
1.1 Γενικά	23
1.2 OCPs: Κυριότεροι αναλύτες και ιδιότητες	26
1.3 PAHs: Κυριότεροι αναλύτες και ιδιότητες.....	29
1.4 Νομοθεσία	31
1.4.1 Ρύποι προτεραιότητας	31
1.4.2 Περιοχή Μαύρης Θάλασσας (Black Sea Region).....	38
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	41
2.1 Τεχνικές εκχύλισης Ρύπων Προτεραιότητας.....	46
2.1.1 QuEChERS.....	46
2.1.2 Εκχύλιση Soxhlet	47
2.1.3 Lipid-freezing (κρυογενής εκχύλιση).....	47
2.1.4 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων	47
2.2 Προσδιορισμός Ρύπων Προτεραιότητας με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας	48
2.2.1 Ανάλυση με GC–ECD	49
2.2.2 Ανάλυση με GC–MS και GC – MS/MS.....	49
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ	53
Πειραματικό Μέρος.....	55
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	57
4.1 Αντιδραστήρια – Πρότυπα – Διαλύτες	57
4.2 Δείγματα	58

4.3	Μέθοδος Προκατεργασίας	60
4.3.1	Δοκιμές	60
4.3.2	Τελική μέθοδος προκατεργασίας	62
4.4	Επικύρωση μεθόδου	63
4.5	Οργανολογία	65
4.6	Κριτήρια Ταυτοποίησης	66
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
5.1	Γενικές παρατηρήσεις	69
5.2	Ταυτοποίηση Αναλυτών	69
5.3	Επιλογή Εσωτερικού προτύπου	71
5.4	Επικύρωση της μεθόδου	73
5.4.1	Γραμμικότητα	73
5.4.2	Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	77
5.4.3	Ακρίβεια	82
5.4.3.1	Πιστότητα	83
5.4.3.2	Ορθότητα.....	85
5.4.4	Επίδραση Μήτρας.....	87
5.5	Αποτελέσματα	90
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	93
7.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	99
8.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	103
9.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	107
10.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ.....	117
11.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	123

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Η επιλογή εσωτερικού προτύπου για το Hexachlorobenzene με βάση τον συντελεστή συσχέτισης	72
Σχήμα 2: καμπύλη βαθμονόμησης του pyrene, με το πρόγραμμα TASQ 1.4	74
Σχήμα 3: Κατανομή των πιο διαδεδομένων οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων στα δείγματα που εξετάστηκαν	94
Σχήμα 4: Κατανομή των πιο διαδεδομένων οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων στα δείγματα που εξετάστηκαν	95

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η πορεία των παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον [4].....	25
Εικόνα 2: Οι δομές μερικών, από την κατηγορία των OCPs, ενώσεων που θα μελετηθούν	29
Εικόνα 3: Οι δομές μερικών, από την κατηγορία των PAHs, ενώσεων που θα μελετηθούν [9]	31
Εικόνα 4: Η Μαύρη Θάλασσα, με τα σημεία απορροής από το πρόγραμμα ATLAS [12]39	
Εικόνα 5: Το τριπλό τετράπολο (QqQ) [58].....	50
Εικόνα 6: Όργανο GC – MS/MS [56]	51
Εικόνα 7: Το σύστημα GC – MS/MS.....	65
Εικόνα 8: χρωματογραφική εικόνα του benzo(a)anthracene με τις αντίστοιχους λόγους μετάπτωσης του ιόντος ταυτοποίησης (α) στο διάλυμα προτύπων και (β) στο εμβολιασμένο (spike) δείγμα	70
Εικόνα 9: προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό ανάκτησης και επίδρασης μήτρας [53]	85
Εικόνα 10: Σημεία δειγματοληψίας των δειγμάτων	93

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ρύποι προτεραιότητας, όπως δίνονται από την Οδηγία 2013/39/EK [11].....	33
Πίνακας 2: Βιβλιογραφικές αναφορές για τον προσδιορισμό ουσιών προτεραιότητας σε θαλάσσιους οργανισμούς.....	42
Πίνακας 3: Τα δείγματα (<i>biota</i>) που αναλύθηκαν με τον αναγνωριστικό κωδικό.....	59
Πίνακας 4: Σύγκριση τιμών του λόγου <i>Relative Area</i> , για το <i>Hexachlorobenzene</i>	72
Πίνακας 5: Εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης των προτύπων μιγμάτων	75
Πίνακας 6: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου (<i>IDL</i> , <i>IQL</i>)	78
Πίνακας 7: Εξισώσεις παλινδρόμησης για τα εμβολιασμένα δείγματα	79
Πίνακας 8: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου (<i>MDL</i> , <i>MQL</i>) για τα δείγματα, με και χωρίς υγρασία (<i>ww – dw</i>)	81
Πίνακας 9: Η αναπαραγωγιμότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου	83
Πίνακας 10: Οι ανακτήσεις (<i>R%</i>) των αναλυτών στο εμβολιασμένο δείγμα	86
Πίνακας 11: Τιμές επίδρασης μήτρας των εξεταζόμενων αναλυτών.....	88
Πίνακας 12: Οι τελικές συγκεντρώσεις ($\mu\text{g/kg}$) των αναλυτών για <i>PAHs</i> , σε δείγματα με υπολογισμένη την υγρασία (<i>ww</i>).....	91
Πίνακας 13: Οι τελικές συγκεντρώσεις ($\mu\text{g/kg}$) των αναλυτών για <i>OCPs</i> , σε δείγματα με υπολογισμένη την υγρασία (<i>ww</i>).....	92
Πίνακας 14: Συντμήσεις και η ανάπτυξή τους.....	99
Πίνακας 15: Η μέθοδος <i>SRM</i> , όπως εφαρμόστηκε στο σύστημα <i>GC – EI – QQQ</i> για την ταυτοποίηση των αναλυτών.	103
Πίνακας 16: Πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος, σύμφωνα με την 2013/39/EK	117

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας (Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Νικόλαου Σ. Θωμαΐδη.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, Δρ. Νικόλαο Θωμαΐδη, για την επιστημονική γνώση που μου μεταλαμπάδευσε στην πορεία αυτής της ερευνητικής εργασίας, τις πολύτιμες συμβουλές του και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ και να γίνω μέλος της επιστημονικής του ομάδας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω δύο άλλα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τους κυρίους Αναστάσιο Οικονόμου, καθηγητή στο ΕΚΠΑ και Χρήστο Κόκκινο, επίκουρο καθηγητή ΕΚΠΑ, για τις εύστοχες παρατηρήσεις και επισημάνσεις τους.

Επιπλέον, θέλω από καρδιάς να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτριο Δαμάλα για την εποικοδομητική συνεργασία, τη συνεχή του επίβλεψη και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε. Καθώς επίσης και τον συνάδελφο μεταπτυχιακό συμφοιτητή Κοκολάκη Στέφανο για την καταπληκτική συνεργασία στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και για τις ξένοιαστες στιγμές και εκτός αυτού.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για όλους τους συναδέλφους και φίλους, της ομάδας μας TrAMS group, για την προθυμία να βοηθήσουν, να συμβουλέψουν και να κάνουν πάντοτε την ατμόσφαιρα στο εργαστήριο, ευχάριστη.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά μου ευγνωμοσύνη στη μητέρα μου, τον αδερφό μου και τους φίλους μου για την τεράστια υποστήριξη στην απόφαση για συνέχιση των σπουδών μου, σε μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης και την ειλικρινή συμπαράστασή τους για όσα περάσαμε αυτά τα δυο χρόνια μέχρι την ολοκλήρωση αυτής της πορείας.

Θεωρητικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Το καθαρό νερό είναι ζωτικής σημασίας όχι μόνο για την ανθρώπινη υγεία, αλλά και για τα ίδια τα οικοσυστήματα. Οι χημικές ουσίες που καταλήγουν στα ύδατα μπορεί να προέρχονται από διάφορες πηγές ανθρώπινης κυρίως, δραστηριότητας, ωστόσο η έμφαση δίνεται στην εξάλειψη ή μείωσή τους.

Ρυπογόνος ουσία, είναι κάθε ουσία που εμπεριέχει τον κίνδυνο να προκαλέσει ρύπανση, με έμμεση ή άμεση εισαγωγή στον αέρα, το νερό ή το έδαφος και μπορεί να είναι επιζήμια για την υγεία του ανθρώπου ή την ποιότητα των υδατικών οικοσυστημάτων. Ρύποι ή ουσίες προτεραιότητας, ονομάζονται οι επικίνδυνες ενώσεις οι οποίες είναι γνωστές για καρκινογόνο, μεταλλαξογόνο ή τοξική δράση τους για τους έμβιους οργανισμούς ή το περιβάλλον. Η επικινδυνότητά τους καθορίζεται από τη νομοθεσία, και με βάση αυτή ορίζεται η προτεραιότητα στην ανάληψη δράσης για την εξάλειψή τους [10]. Στους ρύπους προτεραιότητας ανήκουν αρκετές κατηγορίες ενώσεων, μεταξύ των οποίων:

- Οργανοαλογονούχες ενώσεις και ενώσεις οι οποίες δύνανται να σχηματίσουν τέτοιες ενώσεις στο υδάτινο περιβάλλον
- Οργανοφωσφορικές ενώσεις (OPPs)
- Οργανοκασσιετρικές ενώσεις
- Ουσίες και παρασκευάσματα ή προϊόντα αποικοδόμησής τους που αποδεδειγμένα έχουν καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες δράσεις ή ιδιότητες ορμονικού διαταράκτη, μέσα στο περιβάλλον ή μέσω αυτού
- Παραμένοντες υδρογονάνθρακες και παραμένουσες και βιοσυσσωρεύσιμες οργανικές τοξικές ουσίες
- Κυανιούχες ενώσεις
- Αρσενικό και οι ενώσεις του
- Βιοκτόνα και φυτοπροστατευτικά προϊόντα (OCPs, pesticides)
- Ουσίες που συμβάλλουν στον ευτροφισμό (κυρίως νιτρικές και φωσφορικές ενώσεις)
- Ουσίες που επηρεάζουν δυσμενώς το ισοζύγιο οξυγόνου [10]

Κάποιοι από τους ρύπους προτεραιότητας είναι γνωστοί και ως έμμονοι οργανικοί ρύποι (persistent organic pollutants, POPs). Είναι εκείνες οι οργανικές ενώσεις οι οποίες παραμένουν ανέπαφες για μεγάλα χρονικά διαστήματα μετά την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον, βιοσυσσωρεύονται δια μέσου της τροφικής αλυσίδας και είναι τοξικές για το περιβάλλον και την υγεία [1]. Οι ουσίες αυτές, χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες:

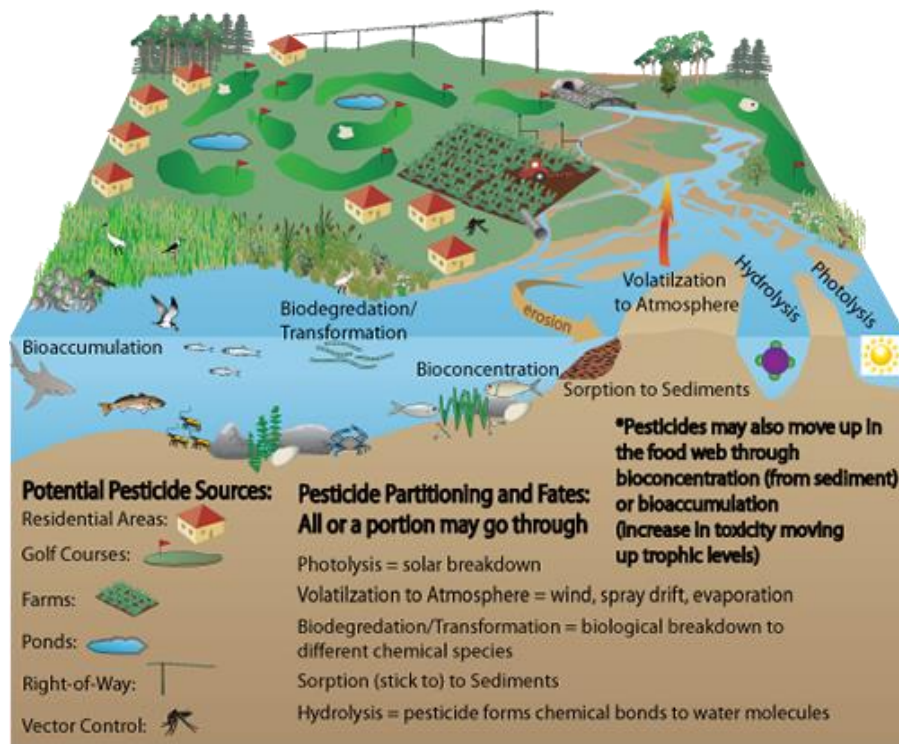
1. Φυτοφάρμακα – Παρασιτοκτόνα
2. Χημικά βιομηχανίας
3. Παραπροϊόντα ή προϊόντα αποικοδόμησης των παραπάνω

Ως παρασιτοκτόνα ή βιοκτόνα, ορίζονται οι χημικές ή βιολογικές ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την εξόντωση ή τον έλεγχο του πληθυσμού των παράσιτων. Χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον οργανισμό στόχο (εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα) ή σε συστηματικά και μη συστηματικά παρασιτοκτόνα, ανάλογα με το σημείο δράσης (εσωτερικό ή εξωτερικό τμήμα του φυτού αντίστοιχα). Συστημικά είναι αυτά που διαπερνούν την επιφάνεια των καρπών/ φυλλωμάτων και εισέρχονται στο αγγειακό σύστημα του φυτού.

Παρ' όλο που η χρήση των ουσιών αυτών έγινε εκτενής με την αύξηση της παγκόσμιας γεωργικής παραγωγής, η χρήση διάφορων ουσιών με σκοπό την προστασία των σοδειών από παράσιτα, χρονολογείται από την αρχαιότητα, με το Θείο (Sulfur, S) και ανόργανες ενώσεις του Αρσενικού (Arsenic, As) να έχουν την πρωτιά, από το 1000 π.Χ. Τα πρώτα συνθετικά παρασιτοκτόνα αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1940 αλλά εφαρμόστηκαν ευρέως μετά το 1950. Έκτοτε, λόγω της μεγάλης αποτελεσματικότητάς τους στην καταπολέμηση των παράσιτων, υιοθετήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν με ραγδαίους ρυθμούς. Τυπικά παραδείγματα των εν λόγω παρασιτοκτόνων είναι το aldrin, dieldrin, endrin και heptachlor, τα οποία πλέον δεν χρησιμοποιούνται, λόγω της έντονης τοξικότητας που παρουσιάζουν στο περιβάλλον [2, 3].

Η πορεία που θα ακολουθήσει μια ουσία, εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητές της αλλά και από τον τόπο, τον χρόνο και τον τρόπο που η τελευταία απελευθερώνεται στο περιβάλλον, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Ουσιαστικά, η κατάληξη που θα έχει η ουσία θα περιβάλλον θα είναι:

- Μερική ή όλη η ποσότητα δύναται να παραμείνει ανέπαφη στο σημείο απόθεσης.
- Μερική ή όλη η ποσότητα μπορεί να μετακινηθεί διαμέσου των συστημάτων μεταφοράς του περιβάλλοντος (μεταφορά από το υδατικό περιβάλλον στο έδαφος ή σε ιζήματα, μεταφορά στην αέρια φάση λόγω πτητικότητας).
- Μερική ή όλη η ποσότητα μπορεί να μετατραπεί σε άλλη ένωση μέσω χημικών ή βιολογικών διαδικασιών (υδρόλυση, φωτόλυση, βιομετατροπή, βιοσυσσώρευση στους ζώντες οργανισμούς).



Εικόνα 1: Η πορεία των παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον [4]

Οι δυσμενείς επιδράσεις των επικίνδυνων ουσιών προτεραιότητας τόσο στο περιβάλλον όσο και στην υγεία του ανθρώπου είναι πλέον γεγονός. Εκτός από τα παρασιτοκτόνα, σημαντική κατηγορία ουσιών προτεραιότητας είναι και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs). Οι ενώσεις αυτές αποτελούν σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα παράγωγα βιομηχανικών διαδικασιών (κυρίως καύσης ή ανάφλεξης, βιομηχανικά απόβλητα) ή ατυχημάτων (μόλυνση με εδαφών ή υδάτων με παράγωγα πετρελαίου). Η

πορεία των ενώσεων αυτών στο περιβάλλον ποικίλει ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιλαμβάνει. Οι ενώσεις με περισσότερους από τέσσερις αρωματικούς δακτυλίους, προσροφώνται σε σωματίδια σκόνης ενώ τα ελαφρύτερα παραμένουν στην αέρια φάση. Όλες, όμως, οι παραπάνω ενώσεις συσσωρεύονται στο έδαφος και τα ιζήματα [5].

Η επικινδυνότητα των περισσότερων από αυτές τις ουσίες δεν συνίσταται στην τοξικότητα καθ'αυτής της ένωσης, αλλά στην ικανότητά τους να συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό και να αυξάνεται η συγκέντρωσή τους μακροχρόνια, προκαλώντας διάφορα είδη καρκίνου, βλάβες στο ανοσοποιητικό και το αναπαραγωγικό σύστημα ή δρώντας ως ενδοκρινικοί διαταράκτες [3, 6].

1.2 OCPs: Κυριότεροι αναλύτες και ιδιότητες

Οι περισσότερες οργανοχλωριωμένες ενώσεις, έβρισκαν ευρεία εφαρμογή ως βιοκτόνα ή φυτοπροστατευτικές ουσίες. Είναι ενώσεις συνθετικές, πολυχλωριωμένες, με ή χωρίς αρωματικούς δακτυλίους, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2. Στην πλειοψηφία τους είναι αρκετά πτητικές και λιποφιλικές ενώσεις με σχετικά μικρή διαλυτότητα στο νερό και τάση συσσώρευσης στον λιπιδικό ιστό των οργανισμών. Κάποια από τα κυριότερα οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα, είναι:

Aldrin (1R, 4S, 4aS, 5S, 8R, 8R aR)–(1, 2, 3, 4, 10, 10–Hexachloro–1, 4, 4a, 5, 8, 8a–hexahydro–1,4:5,8–dimethanonaphthalene): Πρόκειται παρασιτοκτόνο/ εντομοκτόνο, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του πληθυσμού εντόμων και παράσιτων που ζουν στο έδαφος, όπως είναι οι τερμίτες, ακρίδες κλπ., καθώς και ως μέσο συντήρησης ξύλου, λόγω της δράσης κατά των επιδρομών εντόμων. Το aldrin μετατρέπεται σε dieldrin τόσο από τα φυτά όσο και από τα ζώα, με αποτέλεσμα κατάλοιπά του να εντοπίζονται σε πολύ μικρές ποσότητες. Η χρήση του Aldrin έχει απαγορευτεί σε πολλές χώρες ή είναι εξαιρετικά περιορισμένη [8].

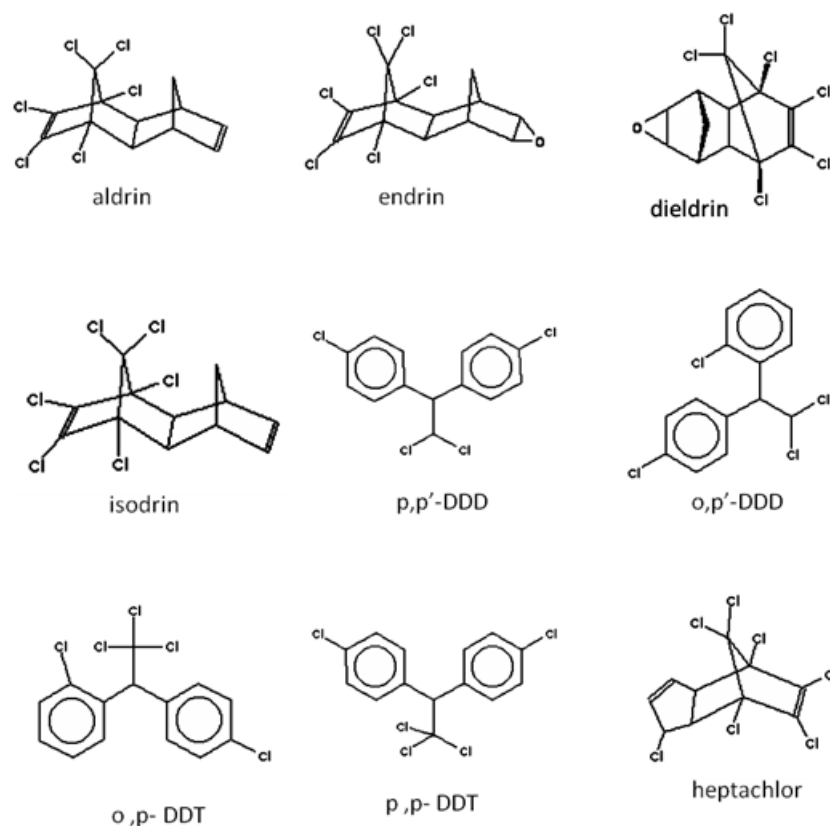
Dieldrin (1R, 4S, 4aS, 5R, 6R, 7S, 8S, 8aR)–(1, 2, 3, 4, 10, 10–hexachloro–1, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a–octahydro-6,7–epoxy–1,4:5,8-dimethanonaphthalene): Πρόκειται για ένα μη-συστημικό εντομοκτόνο. Χρησιμοποιήθηκε στη γεωργία κατά των εντόμων του εδάφους και των φορέων τροπικών ασθενειών. Οι βιομηχανικές χρήσεις του περιλαμβάνουν: προφύλαξη της ξυλείας και ξύλινων κατασκευών από τερμίτες και κάλυψη πλαστικών και ελαστικών υλικών (π.χ. καλώδια τηλεπικοινωνιών). Το Dieldrin προσδένεται στα σωματίδια του εδάφους με αποτέλεσμα να είναι αρκετά δύσκολη η έκπλυσή του στο νερό [8].

Endrin (1R, 4S, 5S, 6S, 7R, 8R, 8aR)–(1, 2, 3, 4, 10, 10–hexachloro–1, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a–octahydro–6, 7–epoxy–1, 4, 5, 8–dimethanonaphthalene) εντομοκτόνο με δράση στο φύλλωμα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε κυρίως σε καλλιέργειες με βαμβάκι και σιτηρά, αλλά και ως μυοκτόνο. Η χρήση του έχει απαγορευτεί σε πολλές χώρες ή είναι εξαιρετικά περιορισμένη [8].

DDT (1, 1, 1–Trichloro–2, 2–bis (4–chlorophenyl) ethane) Το DDT χρησιμοποιήθηκε ευρέως κατά το δεύτερο Παγκόσμιο για την προστασία των στρατευμάτων και των πολιτών από τη διάδοση ασθενειών προερχόμενες από έντομα φορείς ασθενειών όπως είναι η ελονοσία και ο τύφος. Μετά τον πόλεμο, χρησιμοποιήθηκε και ως παρασιτοκτόνο στις φυτείες, με κυριότερη εφαρμογή του στο βαμβάκι. Ωστόσο, οι δυσμενείς επιδράσεις του στο περιβάλλον και κυρίως στα άγρια πτηνά, έφεραν αυστηρούς περιορισμούς στη χρήση του, ήδη από τη δεκαετία του '70. Μια από τις σημαντικότερες αρνητικές επιδράσεις του στην πανίδα ήταν η επίδρασή του στο μηχανισμό μεταβολισμού του ασβεστίου των άγριων πτηνών. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τα κελύφη των αυγών τους να γίνονται πολύ λεπτά, να σπάζουν πρόωρα και ο πληθυσμός τους μειώθηκε δραματικά [7]. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η τοξικότητα του μορίου DDT είναι όση και της ασπιρίνης. Η διαφορά είναι ότι κατανάλωση 10 δισκίων ασπιρίνης δεν θα επιφέρει κάποια βλάβη, ενώ η αντίστοιχη ποσότητα σε DDT είναι επικίνδυνη, διότι το τελευταίο συγκρατείται (παραμένει) στον οργανισμό [3,8].

Heptachlor (1,4,5,6,7,8,8-Heptachloro-3a,4,7,7a-tetrahydro-4,7-methanoindene): Είναι ένα μη – συστημικό εντομοκτόνο το οποίο αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να καταπολεμήσει έντομα του εδάφους. Οι εφαρμογές του κάλυπταν ακόμη καλλιέργειες βαμβακιού, ακρίδες και άλλα έντομα φορείς ελονοσίας. Μεταβολίζεται σε heptachlor epoxide, το οποίο επίσης αποθηκεύεται στο λίπος και η τοξικότητά του είναι όμοια της αρχική ένωσης [8].

Hexachlorobenzene (HCB) Κατατάσσεται στους βιομηχανικούς POPs, παρόλο που έχει χρησιμοποιηθεί και ως παρασιτοκτόνο, καθώς αποτελεί παραπροϊόν της σύνθεσης βιομηχανικών χημικών όπως είναι ο τετραχλωράνθρακας αλλά και άλλων οργανικών ενώσεων όπως perchloroethylene, trichloroethylene, pentachlorobenzene. Εμφανίζεται, επίσης, ως πρόσμιξη στη σύνθεση των παρασιτοκτόνων pentachlorophenol και dichloram, αλλά και άλλων. Έχει απαγορευτεί στις περισσότερες χώρες και έχει αποσυρθεί από τις αγορές. Εξαίρεση αποτελούν συγκεκριμένοι μόνο βιομηχανικοί τομείς, στους οποίους βρίσκει ακόμη εφαρμογή [8].



Εικόνα 2: Οι δομές μερικών, από την κατηγορία των OCPs, ενώσεων που θα μελετηθούν

Όλες οι παραπάνω ενώσεις, είναι εξαιρετικά ανθεκτικές, όπως και οι μεταβολίτες ή τα προϊόντα διάσπασής τους, γι' αυτό και ήταν από τις πρώτες ενώσεις που εντάχθηκαν στη λίστα των υπό απαγόρευση ή σταδιακή μείωση ουσιών, στη συνθήκη της Στοκχόλμης [24, 26].

1.3 PAHs: Κυριότεροι αναλύτες και ιδιότητες

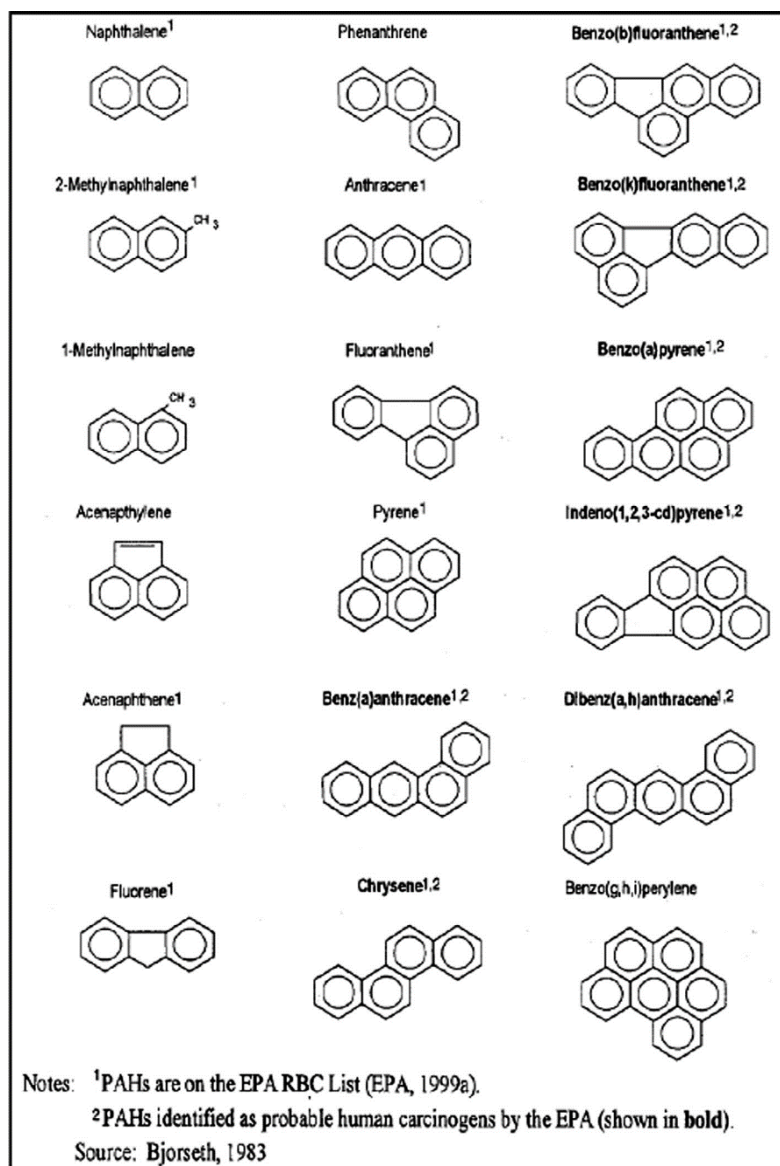
Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) είναι χημικές ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από δυο ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, διατεταγμένους γραμμικά (linear), υπό γωνία (angular) ή σε συστάδες (clusters). Είναι συνήθως άχρωμες είτε λευκά ή υποκίτρινα στερεά. Παράγονται κυρίως από ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως ατελή καύση πετρελαίου και ορυκτών

υλικών, εκπομπές αυτοκινήτων κ.α. αλλά και μέσω βιολογικών διαδικασιών όπως είναι η αποσύνθεση οργανικής ύλης. Ως εκ τούτου, πρόκειται για ενώσεις που απαντώνται ευρέως σε αέρα, νερό και γη. Η ατμόσφαιρα είναι το κυριότερο μέσο διασποράς των PAHs στο περιβάλλον. Μόλις απελευθερωθούν στην ατμόσφαιρα, χωρίζονται σε δυο φάσεις την αέρια και τη στερεή, στην οποία προσροφώνται σε αιωρούμενα σωματίδια. Κατά κανόνα, οι PAHs δεν συντίθενται για εμπορική χρήση. Ωστόσο, αρκετοί από αυτούς εξυπηρετούν κάποιες βιομηχανικές διεργασίες:

- Acenaphthene: παρασκευή χρωμάτων και βαφών, παρασιτοκτόνων, φαρμακευτικών προϊόντων
- Anthracene: διαλύτης για συντηρητικά ξυλείας, παρασκευή βαφών και χρωμάτων
- Fluorene: παρασκευή βαφών, χρωμάτων, παρασιτοκτόνων και θερμοσκληρυνόμενων πλαστικών
- Fluoranthene: παρασκευή αγροχημικών προϊόντων και βαφών
- Phenanthrene: παρασκευή ρητίνων και φυτοφαρμάκων

Στην Εικόνα 3 απεικονίζονται οι πιο κοινοί από τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Τα γενικά χαρακτηριστικά των PAHs, είναι υψηλά σημεία τήξης και βρασμού, πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και χαμηλή τάση ατμών. Αντίστοιχα, είναι ευδιάλυτοι σε οργανικούς διαλύτες λόγω της λιποφιλικότητάς τους, είναι ευαίσθητοι στο φως και εμφανίζουν χαρακτηριστικά φάσματα υπεριώδους (UV).

Παρά το γεγονός ότι οι PAHs είναι μετρίως ανθεκτικοί, η τοξικότητά τους οφείλεται κυρίως στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη και τα ένζυμα που σχετίζονται με αυτή, έχοντας συνδεθεί με διάφορα είδη καρκίνου, βλάβες στο αναπαραγωγικό και το ανοσοποιητικό σύστημα, τερατογενέσεις, ελλιπή ανάπτυξη και άλλες δυσμενείς επιδράσεις [5, 9].



Εικόνα 3: Οι δομές μερικών, από την κατηγορία των PAHs, ενώσεων που θα μελετηθούν [9]

1.4 Νομοθεσία

1.4.1 Ρύποι προτεραιότητας

Η έντονη παρουσία των POPs στο περιβάλλον και οι αρνητικές τους επιπτώσεις στην υγεία στην ποιότητα του υδάτινου κόσμου, του αέρα και της υγείας όλων των έμβιων

οργανισμών, έχει προκαλέσει κινητοποίηση σε παγκόσμιο επίπεδο. Στις μέρες μας, γίνεται μια συλλογική προσπάθεια για την σταδιακή μείωση και τελική εξάλειψη των ενώσεων αυτών από το περιβάλλον. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, έχουν τεθεί νομοθετικές ρυθμίσεις για την παρακολούθηση και την ανάληψη δράσεων υπέρ της ποιότητας του υδροφόρου ορίζοντα, όπως είναι η Οδηγία Πλαίσιο για το Νερό (Water Framework Directive, WFD), οι οποία εναρμονίστηκε με τη νομοθεσία του κάθε κράτους μέλους. Σύμφωνα με την Οδηγία 2000/60/EK του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου, της 23^{ης} Οκτωβρίου 2000, ορίζονται οι επικίνδυνοι ρύποι προτεραιότητας, ο βαθμός επικινδυνότητας αυτών και η στρατηγική για την αντιμετώπιση της ρύπανσης. Για τον προσδιορισμό και την κατηγοριοποίηση των ουσιών, ακολουθήθηκε η μέθοδος COMMPS (combined monitoring-based and modeling-based priority setting), η οποία αναπτύχθηκε έπειτα από μελέτη και αξιολόγηση δεδομένων παρακολούθησης από δείγματα υδάτων και ιζημάτων από όλες τις χώρες της Ευρώπης. Με την απόφαση αριθ. 2455/2001/EK του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου, της 20^{ης} Νοεμβρίου 2001, για τη θέσπιση καταλόγου ουσιών προτεραιότητας στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, καταρτίστηκε ο πρώτος κατάλογος με τις 33 ουσίες ή ομάδες ουσιών που χαρακτηρίστηκαν ως ουσίες προτεραιότητας προκειμένου να συμπεριληφθούν στο παράρτημα Χ της Οδηγίας 2000/60/EK. Μερικά παραδείγματα πρότυπων ουσιών προτεραιότητας που εξετάζονται είναι το alachlor, το ανθρακένιο, η ατραζίνη και το βενζόλιο.

Προκειμένου να ακολουθηθεί κοινή πορεία στη ρύθμιση των εκπομπών των ουσιών προτεραιότητας, το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο, θέσπισε τα πρότυπα περιβαλλοντικής ποιότητας (ΠΠΠ, EQS), αρχικά για τις 33 ουσίες ή ομάδες ουσιών και για οκτώ επιπλέον, οι οποίες καλύπτονταν από προηγούμενες νομοθετικές πράξεις, τον Δεκέμβριο του 2008 με την Οδηγία 2008/105/EK [25]. Τα ΠΠΠ είναι πρότυπα χημικών ουσιών, που έχουν καθοριστεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή ύστερα από εντατικές μελέτες που αφορούν κυρίως τη ρύπανση επιφανειακών υδάτων. Καθορίζονται δύο είδη προτύπων ποιότητας περιβάλλοντος για τις ουσίες προτεραιότητας: ετήσιες μέσες συγκεντρώσεις και μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις. Με τις πρώτες προστατεύονται τα ύδατα από μακροπρόθεσμα, χρόνια προβλήματα ρύπανσης και με τις δεύτερες από βραχυπρόθεσμα, οξείας μορφής ρύπανση. Με αυτό τον τρόπο, τα ΠΠΠ λειτουργούν ως

μέτρο αναφοράς επικινδυνότητας, και με βάση αυτά προσδιορίζονται και οι νέες ουσίες που θα ενταχθούν στη λίστα των «απαγορευμένων» [6].

Τον Αύγουστο του 2013, με μια νέα Οδηγία την 2013/39/EK, η οποία βασίστηκε στις ήδη υπάρχουσες νομοθεσίες για τις ουσίες προτεραιότητας και την προστασία των υδάτων, εκδόθηκε ο τροποποιημένος κατάλογος των ουσιών προτεραιότητας της Οδηγίας 2000/60/EK και σύμφωνα με αυτόν, εκδόθηκαν νέα πρότυπα EQS (ΠΠΠ) και αναθεωρήθηκαν κάποια από τα πρότυπα για τις ήδη υπάρχουσες ουσίες, ώστε να εναρμονίζονται με τα νέα δεδομένα και την επιστημονική πρόοδο.

Πίνακας 1: Ρύποι προτεραιότητας, όπως δίνονται από την Οδηγία 2013/39/EK [11]

Number	CAS Number ⁽¹⁾	Όνομα ουσίας προτεραιότητας ⁽²⁾	πιστοποιημένη ως επικίνδυνη ουσία προτεραιότητας
1	15972-60-8	Alachlor	
2	120-12-7	Anthracene	X*
3	1912-24-9	Atrazine	
4	71-43-2	Benzene	
5	not applicable	Brominated diphenylethers	X ⁽³⁾
6	7440-43-9	Cadmium and its compounds	X
7	85535-84-8	Chloroalkanes, C 10-13	X
8	470-90-6	Chlorfenvinphos	
9	2921-88-2	Chlorpyrifos (Chlorpyrifos-ethyl)	
10	107-06-2	1,2-dichloroethane	

11	75-09-2	Dichloromethane	
12	117-81-7	Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)	X
13	330-54-1	Diuron	
14	115-29-7	Endosulfan	X
15	206-44-0	Fluoranthene	
16	118-74-1	Hexachlorobenzene	X
17	87-68-3	Hexachlorobutadiene	X
18	608-73-1	Hexachlorocyclohexane	X
19	34123-59-6	251-835-4	
20	7439-92-1	Lead and its compounds	
21	7439-97-6	Mercury and its compounds	X
22	91-20-3	Naphthalene	
23	7440-02-0	Nickel and its compounds	
24	not applicable	Nonylphenols	X ⁽⁴⁾
25	not applicable	Octylphenols ⁽⁵⁾	
26	608-93-5	Pentachlorobenzene	X
27	87-86-5	Pentachlorophenol	
28	not applicable	Polyaromatic hydrocarbons (PAH) ⁽⁶⁾	X
29	122-34-9	Simazine	

30	not applicable	Tributyltin compounds	X ⁽⁷⁾
31	12002-48-1	Trichlorobenzenes	
32	67-66-3	Trichloromethane (chloroform)	
33	1582-09-8	Trifluralin	X
34	115-32-2	Dicofol	X
35	1763-23-1	Perfluorooctane sulfonic acid and its derivatives (PFOS)	X
36	124495-18-7	Quinoxifen	X
37	not applicable	Dioxins and dioxin-like compounds	X ⁽⁸⁾
38	74070-46-5	Aclonifen	
39	42576-02-3	BifenoX	
40	28159-98-0	Cybutryne	
41	52315-07-8	Cypermethrin ⁽⁹⁾	
42	62-73-7	Dichlorvos	
43	not applicable	Hexabromocyclododecanes (HBCDD)	X ⁽¹⁰⁾
44	76-44-8/ 1024-57-3	Heptachlor and heptachlor epoxide	X
45	886-50-0	Terbutryn	

Σχολιασμός Πίνακα

*Το Χ υποδηλώνει τις ενώσεις ή ομάδες ενώσεων με τον μεγαλύτερο βαθμό επικινδυνότητας.

*Στις παραπάνω κατηγορίες αναφέρονται μεμονωμένες ενώσεις (π.χ. *alachlor*) ή ολόκληρες ομάδες ενώσεων (π.χ. *PAHs*), με κάποιες από αυτές να ανήκουν στη συνομοταξία των φυτοφαρμάκων. Τέτοιες ενώσεις (ή ομάδες) είναι τα: *aclonifen*, *alachlor*, *chlorpyrifos ethyl*, *isomers of cypermethrin* και *quinoxifen*.

- [1] CAS: Chemical Abstracts Service
- [2] Όπου έχουν επιλεγεί ομάδες ουσιών, χρησιμοποιείται μια από τις εν λόγω ουσίες ως εκπρόσωπος της συγκεκριμένης ομάδας στα πλαίσια του ορισμού προτύπων ποιότητας περιβάλλοντος (EQS), εκτός εάν αναφέρεται ρητά συγκεκριμένη ένωση.
- [3] Από το σύνολο των *bromodiphenylethers* μόνο οι *Tetra*, *Penta*, *Hexa* και *Hepta bromodiphenylethers* ανήκουν στην κατηγορία των επικίνδυνων ουσιών προτεραιότητας.
- [4] Στην κατηγορία *Nonylphenols* συμπεριλαμβάνονται τα ισομερή της 4- *Nonylphenol* και της διακλαδισμένης 4- *Nonylphenol*.
- [5] Στην κατηγορία *octylphenol* συμπεριλαμβάνεται το ισομερές της 4-(1,1',3,3'-*tetramethylbutyl*)-*phenol*
- [6] Στα *PAHs* (πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες) συμπεριλαμβάνονται το *benzo(a)pyrene*, το *benzo(b)fluoranthene*, το *benzo(g,h,i)perylene*, το *benzo(k)fluoranthene* και το *indeno(1,2,3-cd)pyrene* και εξαιρούνται το *anthracene*, το *fluoranthene* και το *naphthalene*, τα οποία παρατίθενται ως μεμονωμένες κατηγορίες.
- [7] Στις ενώσεις του *tributyltin* συμπεριλαμβάνεται το κατιόν του.
- [8] Αυτή η κατηγορία αφορά τις ακόλουθες ενώσεις: 7 *polychlorinated dibenzo-p-dioxins* (PCDD): 2,3,7,8-T4CDD, 1,2,3,7,8-P5CDD, 1,2,3,4,7,8-H6CDD, 1,2,3,6,7,8-H6CDD, 1,2,3,7,8,9-H6CDD, 1,2,3,4,6,7,8-H7CDD, 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD
10 *polychlorinated dibenzofurans* (PCDFs): 2,3,7,8-T4CDF, 1,2,3,7,8-P5CDF, 2,3,4,7,8-P5CDF, 1,2,3,4,7,8-H6CDF, 1,2,3,6,7,8-H6CDF, 1,2,3,7,8,9-H6CDF, 2,3,4,6,7,8-H6CDF, 1,2,3,4,6,7,8-H7CDF, 1,2,3,4,7,8,9-H7CDF, 1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF
12 *polychlorinated biphenyls* παρόμοια με τις διοξίνες (PCB-DL): 3,3', 4,4'-T4CB (PCB 77, CAS 32598-13-3), 3,3', 4', 5-T4CB (PCB 81, CAS 70362-50-4), 2,3,3', 4,4'-P5CB (PCB 105, CAS 32598-14-4), 2,3,4,4', 5-P5CB (PCB 114, CAS 74472-37-0), 2,3', 4,4', 5-P5CB (PCB 118, CAS (PCB 123, CAS 65510-44-3), 3,3', 4,4', 5-P5CB (PCB 126, 31508-00-6), 2,3', 4,4' CAS 57465-28-8), 2,3,3', 4,4', 5-H6CB (PCB 156, CAS 38380-08-4), 2,3,3', 4,4', 5'-HP6B (PCB 157, CAS 69782-90-7), 2,3', 4,4', 5,5'-H6CB (PCB 167, CAS 52663-72-6), 3,3', 4,4', 5,5'-H6CB (PCB 169, CAS 32774-16-6), 2,3,3', 4,4', 5,5'-H7CB (PCB 189, CAS 39635-31-9).
- [9] Περιλαμβάνεται μείγμα ισομερών *cypermethrin*, *alpha-cypermethrin*, *beta-cypermethrin*, *theta-cypermethrin* και *zeta-cypermethrin*.

[10] Αυτή η κατηγορία αναφέρεται στο 1,3,5,7,9,11 Hexabromocyclododecane, 1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane, α -Hexabromocyclododecane, β -Hexabromocyclododecane και γ -Hexabromocyclododecane [11].

Η πανταχού παρουσία των ρύπων προτεραιότητας ή έμμονων οργανικών ρύπων (POPs) και η ανθεκτικότητά τους, κατέστησε σαφές, ότι πρέπει να γίνει συλλογική προσπάθεια για τη μείωση των εκπομπών, καθώς μεμονωμένες ενέργειες σε επίπεδο κρατών ήταν ανεπαρκείς. Ορόσημο σε αυτή την προσπάθεια, αποτελεί η συνθήκη της Στοκχόλμης (Stockholm Convention) η οποία πραγματοποιήθηκε τον Μάιο του 2001 στη Στοκχόλμη και τέθηκε σε εφαρμογή το Μάιο του 2004, με σκοπό την προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος [19]. Τα μέλη δεσμεύτηκαν να απαγορεύσουν τη χρήση, παραγωγή ή εισαγωγή των 12 ουσιών, οι οποίες περιλαμβάνονταν στην πρώτη λίστα. Στη λίστα, τον Μάιο του 2017, με συμφωνία των 181 μελών, προστέθηκαν 16 ακόμη ουσίες και κάποιες ακόμη, όπως το Dicofol βρίσκονται υπό εξέταση [1, 27].

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση και σε ουσίες δεν έχουν ενταχθεί ακόμη σε νομοθετικά πλαίσια και οι οποίες μπορούν να δημιουργήσουν, μελλοντικά, περιβαλλοντικά ζητήματα ή να αποτελέσουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Ιδιαίτερο ρόλο, σε αυτό το κομμάτι, διαδραματίζει η συνεργασία μεταξύ εργαστηρίων αναφοράς, ερευνητικών κέντρων και περιβαλλοντικών οργανισμών στην παρακολούθηση και ανταλλαγή δεδομένων και γνώσεων για χημικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να θεωρηθούν αναδυόμενοι περιβαλλοντικοί ρύποι [17]. Τέτοια δίκτυα, όπως είναι για την Ευρώπη το Norman network, δημιουργούν τις συνθήκες για την ανάπτυξη επικυρωμένων μεθόδων προσδιορισμού και τη σύνταξη και δημοσιοποίηση λιστών και βάσεων δεδομένων αναδυόμενων ρύπων [18].

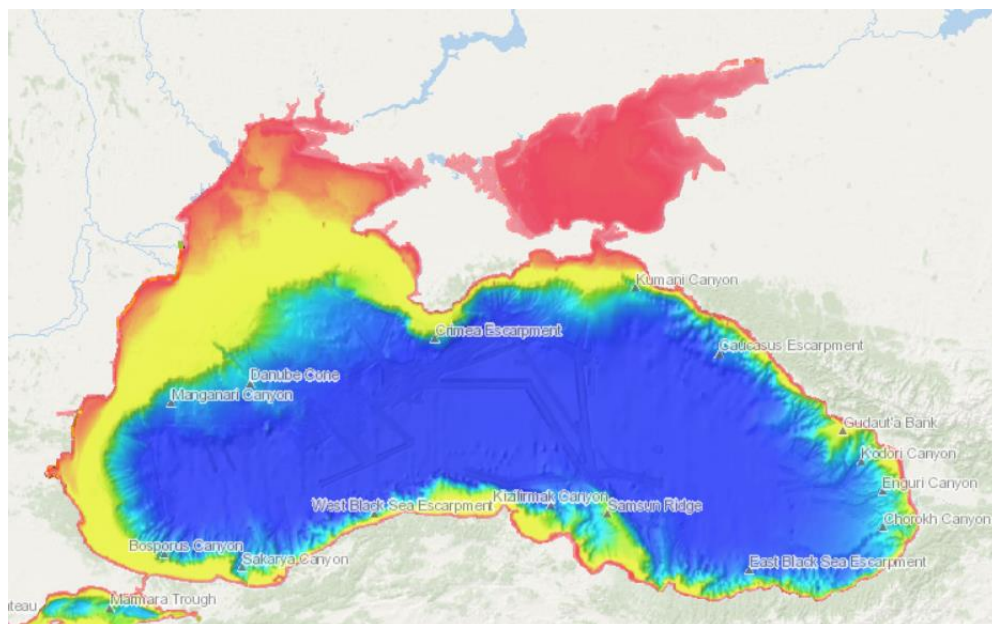
1.4.2 Περιοχή Μαύρης Θάλασσας (Black Sea Region)

Στα πλαίσια εφαρμογής της Οδηγίας WFD, περιλαμβάνεται και το οικοσύστημα της Μαύρης Θάλασσας. Με τη σύμβαση της Μαύρης Θάλασσας (Black Sea Convention, BSC ή Bucharest Convention) κατέστη εφικτή η συνεργασία των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την προστασία του ευαίσθητου οικοσυστήματος της Μαύρης Θάλασσας [14 ,15]. Στην προσπάθεια αυτή, σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε η Επιτροπή για την προστασία της Μαύρης Θάλασσας (The Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution) με τη στρατηγική δράσης (Strategic Action Plan for the Environmental Protection and Rehabilitation of the Black Sea) [15, 19] η οποία υιοθετήθηκε από τις χώρες που συνορεύουν με τη Μαύρη Θάλασσα (Βουλγαρία, Ρουμανία, Γεωργία, Ρωσία, Τουρκία και Ουκρανία), στη Σόφια στις 17 Απριλίου 2009, με σκοπό να προστατευτεί το οικοσύστημά της από τρεις βασικούς κινδύνους:

- Ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα από την ανθρωπογενή (αγροτική και βιομηχανική) δραστηριότητα.
- Ανεξέλεγκτη αλιεία, η οποία διαταράσσει το οικοσύστημα.
- Μόλυνση από ατυχήματα κατά τις μεταφορές καυσίμων και ορυκτών υλών.

Στην Εικόνα 4 φαίνονται τα σημεία απορροής ποταμών στη Μαύρη Θάλασσα, αλλά και η σημαντική γεωγραφική της θέση. Πρόκειται για έναν χώρο που συνορεύει με αρκετές χώρες και διασυνδέεται μέσω της θάλασσας του Μαρμαρά και με τη Μεσόγειο.

Σύμφωνα με την ΕΕΑ (European Environment Agency) η περιοχή της Μαύρης Θάλασσας έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όχι μόνο λόγω της σύνδεσής της με δυο χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Βουλγαρία και Ρουμανία) καθώς πρόκειται για έναν κόμβο στις μεταφορές πετρελαίου και αερίου και μια περιοχή με έντονες πολιτικές διαμάχες. Από το 2008 που εκδόθηκε η τελευταία αναφορά (State of Environment Report for the Black Sea) για την κατάσταση του οικοσυστήματος της Μαύρης Θάλασσας, έχουν τεθεί σε εφαρμογή αρκετά προγράμματα (EMBLAS, project MONIFO, MSFD project, PEGASO κ.α.) για την εκτίμηση της κατάστασης και τη βελτίωση της ποιότητας του υδροφόρου ορίζοντα [16].



Εικόνα 4: Η Μαύρη Θάλασσα, με τα σημεία απορροής από το πρόγραμμα ATLAS [12]

Το τελευταίο πρόγραμμα ξεκίνησε το 2017 με χρονικό ορίζοντα μέχρι το 2022 (Black Sea Integrated Monitoring And Assessment Program, BSIMAP 2017 – 2022) με στόχο τη ροή επιστημονικής γνώσης και πληροφορίας μεταξύ των συμβαλλόμενων κρατών και την ουσιαστική εφαρμογή της Στρατηγικής δράσης για την προστασία της Μαύρης Θάλασσας (BS SAPIR). Λαμβάνοντας υπ' όψη Οδηγίες όπως οι UN Global Integrated Marine Assessment (Regular Process) και European Union' Marine Strategy Framework Directive (MSFD), θα προσπαθήσει να απαντήσει σε καίρια ζητήματα που αφορούν την ποιότητα του ύδατος, την έκταση της μόλυνσης των θαλάσσιων οργανισμών και πώς επιδρούν στην ανθρώπινη υγεία, εκτίμηση της βιοποικιλότητας της περιοχής και της ρύπανσης από ορυκτά καύσιμα κ.α.[13, 14]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Η επιστημονική γνώση σχετικά με την πορεία και τις επιδράσεις των ρυπογόνων ουσιών στα υδάτινα οικοσυστήματα έχει βελτιωθεί σημαντικά τα τελευταία έτη. Πλέον είναι γνωστά περισσότερα σχετικά με ό,τι αφορά το υδάτινο περιβάλλον (π.χ. ύδατα, ιζήματα ή ζωντανοί οργανισμοί) στο οποίο είναι πιθανό να απορριφθεί μια ουσία-ρύπος. Επομένως, καθίσταται εφικτή ανίχνευση, ταυτοποίηση ή και η μέτρηση της συγκέντρωσής της. Ωστόσο, για ορισμένες πολύ υδρόφοβες ουσίες, οι οποίες έχουν την τάση να συγκεντρώνονται σε ζωντανούς οργανισμούς καθίσταται δύσκολη η ανίχνευσή τους, ακόμα και με τη χρήση των πιο προηγμένων αναλυτικών τεχνικών.

Ο προσδιορισμός έμμενων ρύπων προτεραιότητας σε θαλάσσιους οργανισμούς, αποτελεί ένα από τα κριτήρια ελέγχου της ποιότητας των υδάτων σύμφωνα με την WFD. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν γίνει πολλές μελέτες και δημοσιεύσεις για τον προσδιορισμό OCPs, PAHs, PCBs και πολλών άλλων ομάδων ουσιών που ανήκουν στις κατηγορίες των ρύπων προτεραιότητας, σε δείγματα ψαριών και άλλων θαλάσσιων οργανισμών (μύδια και άλλα οστρακοειδή, γαρίδες, καβούρια κλπ.) από διάφορους υδροβιότοπους, στους οποίους απορρέουν κατάλοιπα ανθρωπογενούς δραστηριότητας (αστικά λύματα, βιομηχανικά απόβλητα, φυτοφάρμακα – παρασιτοκτόνα και λιπάσματα από αγροτικές δραστηριότητες), με στόχο την ανάδειξη μεθόδων ικανοποιητικού ταυτόχρονου προσδιορισμού των ενώσεων αυτών.

Στον Πίνακα 2 φαίνονται, ταξινομημένες ανάλογα με τη βασική μέθοδο προκατεργασίας, κάποιες από τις κυριότερες βιβλιογραφικές αναφορές για τον προσδιορισμό ουσιών προτεραιότητας, σε δείγματα θαλάσσιων οργανισμών.

Πίνακας 2: Βιβλιογραφικές αναφορές για τον προσδιορισμό ουσιών προτεραιότητας σε θαλάσσιους οργανισμούς

Οργανισμός	Ενώσεις υπό προσδιορισμό	Βασική μέθοδος εκχύλισης	Μέθοδοι ανάλυσης	LOD	LOQ	Βιοβλ. αναφορά
<i>Μυϊκοί ιστοί ιχθύων (carp, sturgeon)</i>	α-HCH, β-HCH, Lindane, Diazinon, Disulfoton, δ-HCH, Methyl parathion, Heptachlor, Malathion, Aldrin, Parathion, Heptachlor epoxide, γ-chlordane, Endosulfan, α-chlordane, o,p'-DDE, Dieldrin, Endrin, 4,4'-DDD, Ethion, Endrin aldehyde, Endosulfan sulfate, 4,4'-DDT, Methoxychlor	QuEChERS modified	(GC/Q-MS), SIM mode	0,001-0,003 mg/kg	0,004-0,009 mg/kg	[28]
<i>Φιλέτο ιχθύος χωρίς δέρμα, γαρίδες</i>	PCBs, PBDEs, and PAHs	QuEChERS AcCN	GC–EI–TOFMS DART–TOFMS		PCBs: 0.1–0.5 g kg ⁻¹ , PBDEs: 0.5 g kg ⁻¹ , and PAHs: 0.05–0.25 g kg ⁻¹	[31]
<i>Δείγματα ιχθύων (trout, pangasius, salmon, whiting, cod)</i>	18 polychlorinated biphenyls, 16 organochlorinated pesticides, 14 brominated flame retardants and 25 polycyclic aromatic hydrocarbons	QuEChERS EthAc	GC–EI–MS/MS (QqQ)		0,005 - 1 µg/kg	[40]
<i>Φιλέτο ατλαντικού σολομού, μαλακός ιστός από κυανά μύδια (blue mussels)</i>	PCBs, PAHs, PBDEs, PCDD/Fs	QuEChERS modified	GPC	MDLs lower than 0.05 µg/Kg for PCBs, 0.2 µg/Kg for PAHs and PBDEs and 1 ng/Kg for PCDD/Fs		[39]
<i>Δείγματα ιχθύων (redbelly tilapia and catfish)</i>	a-, b-, c- and d-HCH; o,p'- and p,p'-DDD, o,p'- and p,p'-DDE, o,p'- and p,p'-DDT; heptachlor; cis- and trans-chlordane, cis- and trans-nonachlor; oxychlordane; octachlorostyrene; DI PCBs, and PCDD/Fs congeners.	Soxhlet (DCM)	HRGC/HRMS	0,01-0,3ng/g lipid wt		[32]

Μυϊκός ιστός ιχθύος	OCPs including DDTs (o, p'-DDE, p, p'-DDE, o, p'-DDD, p, p'-DDD, o, p'-DDT, p, p'-DDT), HCHs (α-HCH, β-HCH, δ-HCH and γ-HCH), heptachlor, dieldrin, and HCB, cis-chlordane (CC), trans-chlordane (TC) and trans-nonachlordane (non-trans), PCBs (sum of the following 24 congeners: PCB-28, PCB-74, PCB-70, PCB-44, PCB-49, PCB-37, PCB-60, PCB-66, PCB-82, PCB-87, PCB-99, PCB-101, PCB-138, PCB-153, PCB-187, PCB-179, PCB-128, PCB-166, PCB-158, PCB-183, PCB-198, PCB-189, PCB-170 and PCB-180)	Soxhlet (DCM:aceto ne)2:1 (48h)	GC-MS- SIM mode	0.01 and 0.5 ng/g		[30]
Ιστός ιχθύος, γαρίδας, καβουριού	DDTs, HCHs and CHLs	Soxhlet (DCM:aceto ne)2:1 (48h)	GC-MS- SIM mode	-----	-----	[44]
Άγρια μύδια	OCPs	Soxhlet (DCM:penta ne) 1:1 (8h)	GC-ECD & GC-ITD		Instrumental LOQ: 0,02-0,52 ng/g	[48]
Μαλακοί ιστοί οστρακειδών, γαρίδων, βρώσιμα τμήματα ιχθύος	α-HCH, b-HCH, γ-HCH, δ-HCH, Heptachlor, Aldrin, Heptachlor epoxide, p,p'-DDE, Dieldrin, Endrin, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT	Soxhlet (hexane: acetone) 3:1 (8h)	GC-ECD	0,1-0,6 ng/g ww		[29]
Ολόκληροι ιχθύες	OCPs: α-HCH, HCH, γ-HCH, β-HCH, Alachlor, Heptachlor, Aldrin, Mirex Heptachlorepoxyde, o,p-DDE, a-endosulphan, p,p-DDE, Dieldrin, o,p-DDD, Endrin, o,p-DDT, b-endosulphan, p,p-DDD, p,p-DDT, Endosulphan, Methoxychlor, PCBs: PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 99, PCB 149, PCB 118, PCB 153, PCB 138, PCB 187, PCB 156, PCB 180, PCB 170	Soxhlet (hexane:ace tone) 3:1 (2h)	GC-ECD GC-MS	0,1-0,5 ng/g fat		[46]
Μυϊκοί ιστοί ιχθύων (sea bass, mullet)	OCPs: HCB, b-HCH, c-HCH, p,p-DDE, o,p-DDD, p,p-DDD, p,p-DDT PCBs: PCB-18 , PCB-28 + 31, PCB-52, PCB-44, PCB-101, PCB-118 , PCB-149, PCB-138, PCB-153 , PCB-180, PCB-194	Soxhlet (hexane:ace tone) 4:1 (6h)	GC-ECD GC-MS-SIM mode	0,5-1,0 ng/g lipid wt		[38]
Δείγματα μυδιών	α-BHC, b-BHC, c-BHC, d-BHC, DDT, DDE, DDD, Endosulfan-I, Endosulfan sulphate, Endrin, Endrin aldehyde, Heptachlor, Heptachlor epoxide, HCB, Lindane, Aldrin, Endosulfan-II PCBs	Soxhlet (hexane: DCM) 1:1 (8h)	GC-ECD	DL: 24 pg/g		[51]

<i>Δείγματα ιχθύων (10g)</i>	a-, b-, c- and d- HCH, p,p'-DDD, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT, hexachlorobenzene (HCB), quintozene, dicofol, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan-sulphate, aldrin, heptachlor, heptachlor epoxide, endrin, dieldrin, deltamethrin, thiobencarb	cryogenic extraction	GC-MS-SIM mode	0.5 µg/kg to 20 µg/kg		[34]
<i>Δείγματα ιχθύων (One salmon and one mackerel) (20g)</i>	α-HCH, β-HCH, HCB, γ-HCH, Heptachlor, Aldrin, Heptachlor-epoxide, Oxylchlordane, γ-Chlordane, o,p-DDE, α-Endosulfan, α-Chlordane, p,p-DDE, Dieldrin, o,p-TDE, Endrin, p,p-TDE, o,p-DDT, p,p-DDT, o,p-Dicofol, Dicofol, PCB 28, 18, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 153, PCB 138, PCB 180, λ-Cyhalothrin, Permethrin, Cyfluthrin 1,2,3,4, Cypermethrin 1,2,3,4, Fenvalerate 1,2, Deltamethrin	cryogenic extraction	GC-ECD		1,9 - 11,7 ng/g	[42]
<i>fish and mussels (20g)</i>	OCPs: a-, b-, g-HCH, HCB, aldrin, 2,4-DDE, 4,4-DDE, 2,4-DDT, 4,4-DDT PCBs (28, 70, 74, 81, 99, 101, 105, 118, 128, 138, 153, 156, 170, 180, 183, 187)	cryogenic extraction	GC-ECD	0.31 to 1.13 ng/g PCBs 0.01-0,59 ng/g OCPs		[49]
<i>Δείγματα ιχθύων</i>	OCPs: hexachlorobenzene (HCB), hexachlorocyclohexane (HCH with a-, b-, and g isomers), heptachlor, cisheptachlor epoxide, transheptachlor epoxide, endosulfan(a- and b isomers), sulfate endosulfan, o,p-DDT, p,p-DDT, o,p-DDE, p,p-DDE, o,p-DDD, p,p-DDD, alachlor, chlorothalonil, aldrin, dieldrin, methoxychlor, oxy-chlordane, a-chlordane, g-chlordane, p,p-dicofol, and o,p-dicofol PCBs: 28,52,101,118,138,153, and 180	cryogenic extraction	GC-ECD	PCBs: 0,1 ng/g OCPs: 0,03 ng/g	PCBs: 0,3 ng/g OCPs: 0,1 ng/g	[41]
<i>Γαρίδες, ιχθύες (Emperors, Greasy Grouper, Rabbitfish, Doublebar Bream)</i>	PAHs: benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indo(1,2,3,cd)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene	extraction with mixture 2:1 acetone: methanol	GC-Q	0.414 µg/l for BaA, 0.158 µg/l for Ch, 0.314 µg/l for BbF and 0.366 µg/l for BaP		[33]
<i>Δείγματα ιστού ιχθύων</i>	α-HCH, HCB, β-HCH, γ-HCH, δ-HCH, Heptachlor, Aldrin, Dicofol, Methoxychlor, Octachlorstyrene, Heptachlor epoxide B, trans-Chlordane, o,p -DDE, Endosulfan I, cis-Chlordane, trans-Nonachlor, Dieldrin, p,p -DDE, o,p -DDD, Endrin, Endosulfan II, p,p -DDD, o,p -DDT, p,p -DDT	SE (sonication) (acetone:n-hexane) 5:2	GC-MS-SIM mode (FAB MS)	method LOD: 0,5-20 ng/g instr.LOD: 0,05-1,0 ng/g		[37]
<i>Δείγματα ιστού ιχθύων</i>	alkylphenols and bisphenol A (4-tert-Butylphenol, 4-n-Butylphenol, 4-Pentylphenol, 4-n-Hexylphenol, 4-tert-Octylphenol, 4-n-Heptylphenol, Nonylphenol, 4-Octylphenol, Bisphenol A)	SE (sonication) with methanol	GC-MS-SIM mode	0.02-0.42 ng/g		[43]

<i>Μύδια</i>	PCBs, PBDEs, PAHs & OCPs	SE (sonication)	GC-EI- MS/MS - SRM	<i>method</i> <i>DL:1,2-</i> <i>125 ng/g</i>		[47]
<i>Δείγματα ιχθύων</i>	PAHs	SE (sonication) hexane/DC M (1/1,v/v)	GC-QqQ - SRM mode	<i>0,024-0,06 µg/kg</i>	<i>0,08-0,2 µg/kg</i>	[45]
<i>Δείγματα ιστού ιχθύων χωρίς δέρμα</i>	OCPs	SE (sonication) hexane/acet on (9/1)	GC-ECD & GC-MS	<i>0.02 to 0.34 ng/mL</i>	<i>0.10 to 1.0 ng/mL</i>	[52]

Στον Πίνακα 2, βλέπουμε ότι υπάρχουν τέσσερις βασικές μέθοδοι προκατεργασίας των δειγμάτων:

- QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe): πρόκειται για μια εκχύλιση με ακετονιτρίλιο συνήθως, κατόπιν της κατεργασίας του δείγματος με άνυδρο θειικό μαγνήσιο και χλωριούχο νάτριο (anhydrous MgSO_4 και NaCl)
- Εκχύλιση Soxhlet: πρόκειται για μια εκχύλιση (liquid extraction, LE/ solid – liquid extraction, SLE) με παρατεταμένη θέρμανση (6 έως 48 ώρες)
- Κρυογενής εκχύλιση (Lipid-freezing/ Cryogenic extraction): πρόκειται για μια απλή μέθοδο καταβύθισης του λίπους των δειγμάτων, με χαμηλές θερμοκρασίες (από -24°C έως και -70°C)
- Εκχύλιση υπερήχων (Ultrasonic extraction, Sonication): εκχύλιση (LE, LSE) μίγματα διαλυτών, σε συσκευή υπερήχων με θερμοστατούμενο λουτρό.

2.1 Τεχνικές εκχύλισης Ρύπων Προτεραιότητας

Η προκλήσεις για την ανάπτυξη της μεθόδου προκατεργασίας, είναι αφ' ενός, ο περιορισμός της επίδρασης της μήτρας του δείγματος στην ανάλυση και αφ' ετέρου, η ποσοτική παραλαβή των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν από τον λιπώδη ιστό, στον οποίο όπως γνωρίζουμε έχουν την τάση να συσσωρεύονται.

2.1.1 QuEChERS

Η ονομασία της τεχνικής προέρχεται από τα αρχικά των λέξεων (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Η εκχύλιση και κατεργασία με την τεχνική QuEChERS, γίνεται συνήθως σε νωπά δείγματα θαλάσσιων οργανισμών (aquatic biota), καθώς δίνεται η δυνατότητα απομάκρυνσης της υγρασίας. Ωστόσο, παρατηρείται ότι μετά την κατεργασία των δειγμάτων με MgSO_4 και NaCl , απαιτούνται πολλαπλά στάδια καθαρισμού, όπως διπλή εκχύλιση στερεής φάσης με κατανομή (dispersive SPE) σε διάφορα μίγματα πληρωτικών υλικών, χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών με γέλη (Gel permeation

chromatography, GPC), καταβύθιση με άλατα (salting – out) κ. α. καθώς πρόκειται για περίπλοκα δείγματα με υψηλό ποσοστό υγρασίας και λίπους, γεγονός που αυξάνει την αβεβαιότητα της μεθόδου [28, 31, 39, 40].

2.1.2 Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση με συσκευή Soxhlet είναι μια εξαιρετικά αποδοτική μέθοδος εκχύλισης αλλά και πολύ χρονοβόρα. Οι εκχυλίσεις με τη συγκεκριμένη μέθοδο στη βιβλιογραφία είχαν διάρκεια έως και 48 ώρες [29, 30, 32, 28, 44, 46, 48]. Στην εν λόγω μέθοδο, εκχυλίζεται και μεγάλο ποσοστό του λίπους του δείγματος, γι' αυτό και σε δεύτερο στάδιο προκατεργασίας, υπάρχει και κατεργασία με κάποιο ισχυρά αλκαλικό μέσο, συνήθως KOH ή με κάποιο ισχυρά όξινο, συνήθως H₂SO₄ προκειμένου να υδρολυθούν τα λίπη. Ωστόσο, αρκετές από τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις είναι ευαίσθητες σε τέτοιες συνθήκες με αποτέλεσμα να αποικοδομούνται [46].

2.1.3 Lipid-freezing (κρυογενής εκχύλιση)

Η απομάκρυνση του λίπους με Lipid-freezing, είναι σχετικά απλή, καθώς πρόκειται για μια διαδικασία στην οποία σε χαμηλές θερμοκρασίες για ένα χρονικό διάστημα αρκετών ωρών (συνήθως παραμένουν τα δείγματα για τουλάχιστον 6 ώρες ή overnight), το λίπος καθιζάνει ή στερεοποιείται στα τοιχώματα του δοχείου και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό προς περεταίρω κατεργασία και ανάλυση. Από τη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι το λίπος δεν απομακρύνεται, πάντοτε, επαρκώς [37] ενώ στον καθαρισμό χρειάζονται διαφορετικές ποσότητες και αναλογίες διαλυτών για την έκλυση των ενώσεων [34].

2.1.4 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων

Η εκχύλιση σε συσκευή υπερήχων, είναι επίσης μια ήπια διαδικασία κατά την οποία το δείγμα μετά την προσθήκη των διαλυτών ή μίγματος αυτών,

αναδεύεται και τοποθετείται στη συσκευή. Η εκχύλιση κατ' αυτό τον τρόπο είναι σύντομη, χρειάζονται δηλαδή, περίπου 15min για την κάθε εκχύλιση, ενώ ταυτόχρονα δίνεται η δυνατότητα ορισμού της μέγιστης θερμοκρασίας στην οποία θα ολοκληρωθεί, καθώς πραγματοποιείται σε θερμοστατούμενο λουτρό. Από τις βιβλιογραφικές αναφορές, παρατηρούμε ότι η διαφορά στις ανακτήσεις μεταξύ εκχύλισης σε συσκευή υπερήχων και εκχύλισης σε συσκευή Soxhlet, είναι μικρή [52], ενώ και εδώ το λίπος φαίνεται να συνεκχυλίζεται σε ένα ποσοστό και να περνάει στα επόμενα στάδια [37].

2.2 Προσδιορισμός Ρύπων Προτεραιότητας με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας

Οι υπό προσδιορισμό ενώσεις, είναι πτητικές οργανικές ενώσεις, χαμηλής πολικότητας και ως εκ τούτου, η ανάλυσή τους γίνεται, κατά κύριο λόγο, με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC). Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στην κατανομή των αναλυτών μεταξύ της αέριας κινητής φάσης και της στατικής φάσης, η οποία μπορεί να είναι υγρή ή στερεά. Η κατανομή των αναλυτών εξαρτάται από την συγγένειά τους με τη στατική φάση και τη θερμοκρασία τη στήλης. Η συγκεκριμένη τεχνική προσφέρει σχετικά γρήγορους χρόνους ανάλυσης και καλούς διαχωρισμούς, βελτιστοποιώντας παραμέτρους όπως το υλικό της στήλης και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα [54], ενώ μπορεί να συζευχθεί με διάφορους τύπους ανιχνευτών, όπως:

- Ιοντισμού φλόγας (Flame Ionization, FID)
- Σύλληψης ηλεκτρονίων (Electron Capture, ECD)
- Θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity, TCD)
- Φασματόμετρο μάζας (Mass Spectrometer, MS)

Στη βιβλιογραφία, για τους προσδιορισμούς ρύπων προτεραιότητας, παρατηρείται, σε κάποιες περιπτώσεις, η χρήση αεριοχρωματογράφου με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC–ECD) [29, 38, 41, 42, 46, 48, 49, 52]

ενώ σε αρκετές άλλες περιπτώσεις έχει προτιμηθεί η σύζευξη του αεριοχρωματογράφου με ανιχνευτή μαζών (GC–MS) [28, 30, 33, 34, 37, 38, 43, 44, 46, 52] ή με ανιχνευτή μαζών τριπλού τετραπόλου (GC – MS/MS ή GC – QqQ) [40, 45, 47].

2.2.1 Ανάλυση με GC–ECD

Ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), είναι ένας μη καταστρεπτικός για το δείγμα ανιχνευτής και ευαίσθητος στη συγκέντρωση του αναλύτη (Concentration Sensitive Detector). Ο ECD μετρά την ηλεκτρική αγωγιμότητα του αερίου που φτάνει στο θάλαμο, κατόπιν ιονισμού. Πρόκειται για έναν εκλεκτικό ανιχνευτή, ιδιαίτερα για μόρια που έχουν την τάση να προσδένουν ηλεκτρόνια, όπως είναι οι οργανοαλογονούχες ενώσεις [55] και γι' αυτό ενδείκνυται η χρήση του στον προσδιορισμό ρύπων προτεραιότητας.

2.2.2 Ανάλυση με GC–MS και GC – MS/MS

Η ανάλυση με GC – MS συνδυάζει τη διαχωριστική ικανότητα που προσφέρει η αεριοχρωματογραφία (GC) με την εξαιρετική ικανότητα ανίχνευσης της φασματομετρίας μάζας (MS). Η ανάλυση σε MS/MS είναι στην πραγματικότητα δύο ή περισσότερες αναλύσεις σε MS. Στόχος μιας τέτοιας ανάλυσης, μπορεί να είναι είτε η εξαγωγή πληροφοριών για τη δομή της ένωσης, με θραυσματοποίηση των ιόντων που απομονώθηκαν στον πρώτο αναλυτή μαζών MS ή και επίτευξη καλύτερης εκλεκτικότητας και ευαισθησίας (για ποσοτική ανάλυση) επιλέγοντας αντιπροσωπευτικές μεταπτώσεις ιόντων (ion transitions), χρησιμοποιώντας και τους δυο αναλυτές μαζών. Η ανάλυση των παραγόμενων ιόντων (Product Ion MS/MS analysis) μπορεί να επιτευχθεί με σύζευξη πολλαπλών αναλυτών μαζών, ίδιου ή διαφορετικού τύπου.

Οι αναλυτές μαζών, δίνουν ποικιλία δυνατοτήτων στην καταγραφή δεδομένων. Ενδεικτικά, οι πιο χαρακτηριστικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες λειτουργίες είναι η πλήρης σάρωση (full scan mode), η παρακολούθηση συγκεκριμένου ιόντος (Selected/Single Ion Monitoring, SIM mode) και η παρακολούθηση

συγκεκριμένης αντίδρασης/μετάπτωσης (Selected Reaction Monitoring, SRM mode).

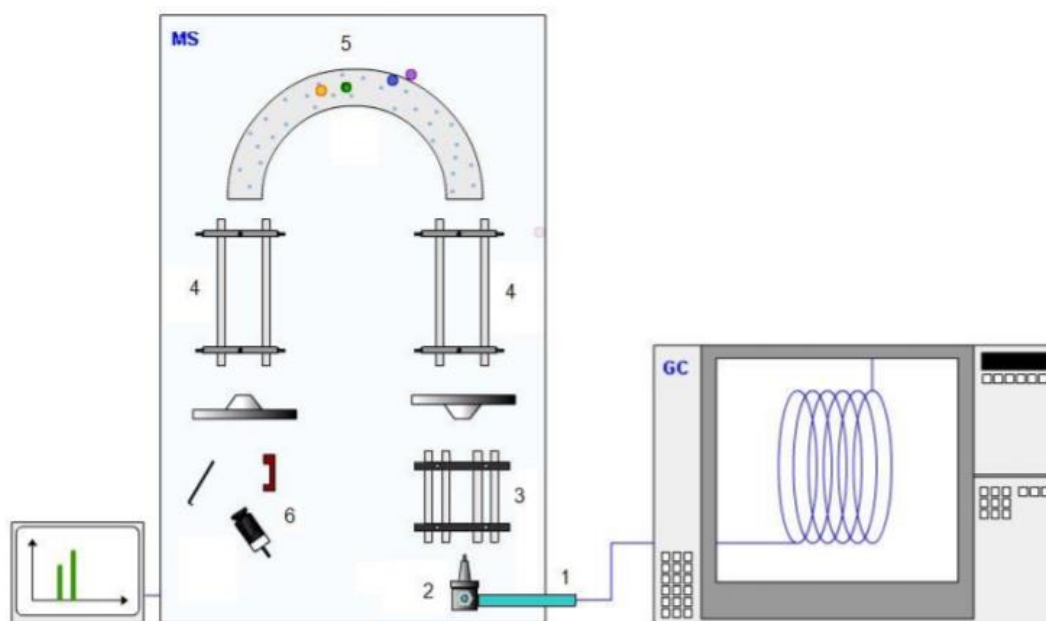
Η πλήρης σάρωση (Full scan), είναι μια επιλογή καταγραφής μαζών που δίνεται τόσο σε απλό όσο και σε τριπλό τετράπολο (αλλά και σε αναλυτές μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας) και προσφέρει μια ποιοτική ανίχνευση των αναλυτών ενός δείγματος. Σε αυτή την επιλογή, ο αναλυτής μαζών θα σαρώσει όλες τις μάζες από τη μικρότερη προς τη μεγαλύτερη, στο εύρος που θα ορίσουμε ανάλογα πάντοτε με το τι περιμένουμε να περιέχεται στο δείγμα [63]. Η πλήρης σάρωση χρησιμοποιείται κυρίως για μη στοχευμένη σάρωση, αλλά ενδείκνυται και ως πρώτη ένδειξη πριν από την προγραμματισμένη καταγραφή (για ποσοτική ανάλυση) που έχουμε επιλέξει για το δείγμα.

Μια άλλη επιλογή είναι η παρακολούθηση συγκεκριμένου ιόντος (SIM mode). Πρόκειται για σάρωση η οποία επιτρέπει στο φασματοφωτόμετρο μάζας να ανιχνεύει αναλύτες με μεγάλη ευαισθησία. Στη λειτουργία SIM ο αναλυτής μαζών προγραμματίζεται να συγκεντρώνει πληροφορίες μόνο για συγκεκριμένες μάζες. Εφόσον παρακολουθούνται μόνο κάποιες μάζες, αυτές που ο χειριστής έχει ορίσει, το όργανο αφιερώνει περισσότερο χρόνο σε κάθε μια από αυτές, σε σχέση με μια πλήρη σάρωση, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας του αναλυτή μαζών, αλλά και αύξηση της ακρίβειας και της πιστότητας της μεθόδου, καθώς επιτρέπει τη λήψη περισσότερων σημείων στις χρωματογραφικές κορυφές των συγκεκριμένων αναλυτών [64].



Εικόνα 5: Το τριπλό τετράπολο (QqQ) [58]

Η παρακολούθηση συγκεκριμένης αντίδρασης (SRM) είναι μια τεχνική δυο σταδίων, απαιτείται, δηλαδή, όργανο MS/MS, όπως το τριπλό τετράπολο της Εικόνας 5, κατά την οποία παρακολουθούνται ζεύγη πρόδρομου και παραγόμενου ιόντος (parent – product ion pairs). Σε αυτή τη λειτουργία, τα ιόντα που σχηματίζονται στην πηγή, συγκεντρώνονται στον αναλυτή μαζών. Τα πρόδρομα ιόντα (parent ions), που έχουν επιλεγεί για παρακολούθηση προωθούνται στον θάλαμο συγκρούσεων ενώ όλα τα υπόλοιπα απορρίπτονται. Στη συνέχεια, μετά τη θραυσματοποίηση των πρόδρομων ιόντων, μόνο τα επιλεγμένα παραγόμενα ιόντα (product ions) σαρώνονται ώστε να προκύψει το φάσμα μάζας SRM. Με τη λειτουργία SRM επιτυγχάνεται πολύ καλή εκλεκτικότητα και βέλτιστος λόγος σήματος προς θόρυβο ($\frac{signal}{noise} ratio$). Πρόκειται για μια πολύ διαδεδομένη τεχνική, η οποία παρέχει τη δυνατότητα για ποσοτικούς προσδιορισμούς αναλυτών σε πολύπλοκες μήτρες.



Εικόνα 6: Όργανο GC – MS/MS [56]

Η αρίθμηση αντιστοιχεί στα επιμέρους τμήματα του οργάνου: 1) γραμμή μεταφοράς, 2) πηγή ιοντισμού, 3) οκτάπολο, 4) τετράπολο, 5) θάλαμος συγκρούσεων, 6) ανιχνευτής

Τα πιο συνήθη όργανα, είναι εκείνα που συνδυάζουν αναλυτές τετραπόλου με έναν θάλαμο συγκρούσεων [56], σε μια δομή όπως εκείνη που φαίνεται στην Εικόνα 5.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 6, οι εκλούμενες ουσίες μεταφέρονται στον αναλυτή μαζών, μέσω της γραμμής μεταφοράς (transfer line) στην πηγή ιονισμού. Η τεχνική βασίζεται στον ιοντισμό των ενώσεων, είτε μέσω βομβαρδισμού τους με ηλεκτρόνια (EI) είτε με ιόντα αντιδρώντος αερίου (CI). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ενώσεις να διασπώνται σε χαρακτηριστικά ιόντα ή θραύσματα, τα οποία επιταχύνονται και οδηγούνται προς τον αναλυτή μαζών [57]. Η δέσμη ιόντων που παράγεται, μεταφέρεται αρχικά σε έναν προθάλαμο (οκτάπολο), όπου συγκεντρώνονται τα ιόντα πριν την εισαγωγή τους στο πρώτο τετράπολο. Στους αναλυτές μάζας τετραπόλου, ο διαχωρισμός των ιόντων πραγματοποιείται με βάση το λόγο μάζας – φορτίου (m/z), ενώ μεταξύ των δύο τετραπόλων, παρεμβάλλεται ένας θάλαμος συγκρούσεων στον οποίο τα ιόντα που έχουν περάσει από το πρώτο τετράπολο συγκρούονται και διασπώνται ή αντιδρούν με άλλα μόρια, πριν το δεύτερο «φιλτράρισμα» μαζών. Άλλοι συνδυασμοί οργάνων με πολλαπλούς αναλυτές μαζών μπορεί να περιλαμβάνουν τετράπολα με αναλυτή χρόνου πτήσης (Q – ToF MS) [56].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ

Η έντονη παρουσία των ρύπων προτεραιότητας στο περιβάλλον, τόσο στον υδροφόρο ορίζοντα όσο και στους υδρόβιους οργανισμούς είναι πλέον αδιαμφισβήτητη. Ο προβληματισμός για τις επιπτώσεις στην ποιότητα του ύδατος, στην υγεία των οργανισμών (θαλάσσιων και χερσαίων) αλλά και στην υγεία του ανθρώπου, λόγω αυξημένης κατανάλωσης ιχθύων [20] καθώς και η ανάγκη παρακολούθησης των ουσιών που συγκαταλέγονται στους ρύπους προτεραιότητας, έχει ωθήσει τις περιβαλλοντικές αρχές στη δημιουργία προγραμμάτων και νομοθετικών πλαισίων για την απαγόρευση ή τη σταδιακή εξάλειψή τους.

Η Αναλυτική Χημεία έχει παίξει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία ταυτοποίησης, ελέγχου και ποσοτικοποίησης των ενώσεων αυτών σε περιβαλλοντικά δείγματα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι, με μεγάλο εύρος τεχνικών κατεργασίας και ανάλυσης, για τον ταυτόχρονο και ποσοτικό προσδιορισμό οργανικών ρύπων προτεραιότητας, σε μεγάλο εύρος δειγμάτων [23].

Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού χαρακτηριστικών ενώσεων από δυο κατηγορίες ρύπων προτεραιότητας, τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (OCPs) και τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs). Επιπρόσθετα, η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα ψαριών και άλλων υδρόβιων οργανισμών από διάφορα σημεία δειγματοληψίας της Μαύρης Θάλασσας.

Το σημαντικότερο τμήμα της ανάλυσης δειγμάτων με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος και πολύπλοκη μήτρα, είναι η προετοιμασία τους πριν την ανάλυση [21, 22]. Προκειμένου να καταλήξουμε σε μέθοδο προκατεργασίας και να μπορέσει η τελευταία να εφαρμοστεί σε πραγματικά δείγματα, πραγματοποιήθηκαν τρεις δοκιμασίες, για την εύρεση της μεθόδου με την μικρότερη παρεμπόδιση λίπους και απώλειας αναλυτών.

Πραγματοποιήθηκε επικύρωση της μεθόδου, με προσδιορισμό παραμέτρων αξιολόγησης της μεθόδου όπως είναι η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα, η αναπαραγωγιμότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και η επίδραση

μήτρας. Η εφαρμογή της μεθόδου προκατεργασίας στα πραγματικά δείγματα, ακολουθήθηκε από την ανάλυσή τους σε αεριοχρωματογράφο συζευγμένο με αναλυτή μαζών τύπου τριπλού τετραπόλου (GC–MS/MS ή GC–QqQ). Για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκαν εσωτερικά πρότυπα (I.S.) για όλους τους υπό προσδιορισμό αναλύτες.

Καταλήγοντας, στο τέλος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ειδίκευσης, γίνεται συζήτηση των αποτελεσμάτων και προτάσεις για περεταίρω έρευνα.

Πειραματικό Μέρος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

4.1 Αντιδραστήρια – Πρότυπα – Διαλύτες

- Για το σύστημα GC – EI – MS/MS:
 - Εξάνιο (Hexane), for Pesticide residue analysis, της εταιρείας Honeywell
 - Ακετόνη (Acetone), PESTIPUR, for Pesticide residue analysis, της εταιρείας Carlo Erba

- Για την πειραματική πορεία:

Για τον προσδιορισμό των PAHs:

Διάλυμα εσωτερικών προτύπων, των αναλυτών: Naphthalene-d8, Acenaphthylene-d8, Acenaphthene-d10, Fluorene-d10, Phenanthrene-d10, anthracene-d10, Fluoranthene-d10, Pyrene-d10, Benzo (a) anthracene-d12, Chrysene-d12, Benzo (b) fluoranthene-d12, Benzo (k) fluoranthene-d12, Benzo (a) pyrene-d12, Indeno (1,2,3-c,d) pyrene-d12, Dibenzo (a,h) anthracene-d14, Benzo (g,h,i) perylene-d12, σε εξάνιο, συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\pm 1.5\%$), πιστοποιημένο ως CRM, από την εταιρεία CPASChem.

Πρότυπο διάλυμα των αναλυτών: naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo (a) anthracene, chrysene, benzo (b) fluoranthene, benzo (k) fluoranthene, benzo (a) Pyrene, indeno (1,2,3-c,d) pyrene, dibenzo (a,h) anthracene benzo (g,h,i) perylene, συγκέντρωσης 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ($\pm 5\%$) από την εταιρεία CPASChem.

Για τον προσδιορισμό των OCPs:

Πρότυπες ουσίες: Hexachlorobutadiene, Dichlorvos, alpha-HCH, Hexachlorobenzene, Beta-HCH, Lindane, delta-HCH, Heptachlor, Aldrin, Dicofol, Isodrin, Alpha-Endosulfan, Dieldrin, Endrin, 4,4'-DDT, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 2,4'-DDT, Endosulfan-sulfate και εσωτερικά πρότυπα: Triphenylphosphate(TPP), 2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene, PCB 209, καθαρότητας > 99%, από την εταιρεία Sigma – Aldrich.

- Για κάθε αναλύτη, παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα (stock solutions) των 1000 mg L^{-1} (1000ppm). Ζυγίστηκαν 0,01g πρότυπης ουσίας και διαλύθηκαν σε Εξάνιο, σε ογκομετρική φιάλη των 10mL. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν και φυλάχθηκαν σε καταψύκτη, στους -20°C .
- Παρασκευάστηκαν δυο διαλύματα εργασίας, ένα διάλυμα προτύπων το οποίο περιείχε όλους τους αναλύτες PAHs και OCPs και ένα διάλυμα Εσωτερικών προτύπων, το οποίο περιείχε όλα τα εσωτερικά πρότυπα των PAHs (PAHs I.S.) και τα εσωτερικά πρότυπα των OCPs (OCPs I.S.), συγκέντρωσης 50 mg L^{-1} (50 ppm) το κάθε ένα, λαμβάνοντας 0.5 mL, αραιώνοντας με Εξάνιο σε ογκομετρική φιάλη μέχρι τα 10mL. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν και φυλάχθηκαν σε καταψύκτη στους -20°C .
 - Διχλωρομεθάνιο (DCM) Dichloromethane stabilized with ~ 20ppm amylene, for pesticide analysis, της εταιρείας Panreac AppliChem
 - Ακετόνη pro analysis (Acetone p.a.) της εταιρείας Honeywell

Όλες οι απαραίτητες αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε μητρικά διαλύματα και διαλύματα εργασίας, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της πειραματικής διαδικασίας, σύμφωνα με τη μέθοδο που ακολουθήθηκε.

Όλα τα διαλύματα εργασίας διατηρήθηκαν σε καταψύκτη.

4.2 Δείγματα

Προκειμένου να είναι εφικτή η καλύτερη δυνατή διαχείριση και φύλαξη των δειγμάτων, τα τελευταία ομογενοποιήθηκαν και υπέστησαν λυοφιλίωση (freeze dry) για την πλήρη απομάκρυνση της υγρασίας, μετατράπηκαν σε σκόνη και φυλάχθηκαν σε υπερκαταψύκτη, στους -70°C . Τα 19 δείγματα που αναλύθηκαν, με τον αναγνωριστικό κωδικό τους και τη μήτρα που αναλύθηκε, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Τα δείγματα (biota) που αναλύθηκαν με τον αναγνωριστικό κωδικό

Είδος	Κωδικός	Σταθμός δειγματοληψίας	Μήτρα προς ανάλυση
Μαλάκια, <i>Mytilus galloprovincialis</i>	BSB1	Ουκρανία	Μαλακός ιστός
<i>Rapana thomasi</i>	BSB2	Ουκρανία	Μαλακός ιστός
<i>Rapana thomasi</i>	BSB3	Γεωργία	Μαλακός ιστός
Ιχθύς, <i>Barabulka</i>	BSB4	Γεωργία	ολόκληρο ψάρι
	BSB5		μυϊκός ιστός
Ιχθύς, <i>N. Melanostomus</i> (Round Goby)	BSB6	Ουκρανία	ολόκληρο ψάρι
	BSB7		μυϊκός ιστός
Ιχθύς	BSB8	Νήσος Zmiinyi Ουκρανία	ολόκληρο ψάρι
	BSB9		μυϊκός ιστός
Ιχθύς, <i>Mesogobius batrachocephalus</i>	BSB10	Ουκρανία	μυϊκός ιστός
Ιχθύς, <i>Platyichthys flesus</i>	BSB11	Ουκρανία	μυϊκός ιστός
Ιχθύς, <i>Mullus barbatus</i>	BSB12	Περιοχή Batumi gorochi, Γεωργία	μυϊκός ιστός
Ιχθύς, <i>Alosa kessleri portica</i>	BSB13	Περιοχή Batumi, Γεωργία	μυϊκός ιστός
Ιχθύς, <i>Uranoscopus scaber</i>	BSB14	Περιοχή Batumi gorochi, Γεωργία	μυϊκός ιστός
Ιχθύς, <i>Pomatomus saltatrix</i>	BSB15	Περιοχή Batumi, Γεωργία	μυϊκός ιστός

Ιχθύς, <i>Trachurus trachurus</i> (GE 7)	BSB16	Περιοχή Batumi gorochi, Γεωργία	μυϊκός ιστός
Ιχθύς, <i>Kefal-Mullet</i> (RU 8)	BSB17	Σότσι (Sochi), Ρωσία	μυϊκός ιστός
Νεκρό Δελφίνι (UA 10)	BSB18	Περιοχή Oksana, Ουκρανία	μυϊκός ιστός
Νεκρό Δελφίνι (UA 9)	BSB19	Περιοχή Oksana, Ουκρανία	μυϊκός ιστός

4.3 Μέθοδος Προκατεργασίας

Όπως είναι γνωστό, το σημαντικότερο τμήμα της ανάλυσης δειγμάτων με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος και πολύπλοκη μήτρα, είναι η προετοιμασία τους πριν την ανάλυση [21, 22]. Ο αριθμός των σταδίων της κατεργασίας καθώς και οι πορείες καθαυτές, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη χρωματογραφική εικόνα κατά την ανάλυση αλλά και στην τελική συγκέντρωση των αναλυτών.

4.3.1 Δοκιμές

Κατόπιν μελέτης της βιβλιογραφίας (Κεφάλαιο 2) σχετικά με προσδιορισμό ρύπων προτεραιότητας σε θαλάσσιους οργανισμούς και προκειμένου να αποφασίσουμε ποια πορεία προκατεργασίας θα ακολουθηθεί, έγιναν τρεις δοκιμασίες, ακολουθώντας τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές κατεργασίας.

Έγινε χρήση 1g από το δείγμα με κωδικό BSB5 (συνολικά 6g και για τις τρεις πορείες) και για κάθε πορεία που ακολουθήθηκε εξετάστηκε ένα απλό δείγμα και ένα εμβολιασμένο (spike).

Δοκιμή 1

Μετά την προσθήκη των εσωτερικών προτύπων και των προτύπων για το εμβολιασμένο δείγμα (spike), ακολούθησε προσθήκη 10ml μείγματος Hexane/DCM (1/1), ανάδευση για 1min σε συσκευή ανάδευσης (vortex), εκχύλιση του δείγματος σε συσκευή υπερήχων (sonication) για 10min σε θερμοκρασία 23°C και φυγοκέντρηση για 15min στις 4000 rpm. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε δυο ακόμη φορές με 10ml μείγματος Hexane/ Acetone (1/1) κάθε φορά. Εφόσον παρελήφθη το υπερκείμενο, στη συνέχεια, σε αυτό προστέθηκαν 2g οξινισμένης με H₂SO₄ silica, ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση για 10min στις 4000 rpm. (Παρατηρήθηκε μικρή αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος, έγινε ελαφρώς πιο σκούρο από την αρχική μορφή του). Ακολούθησε συμπύκνωση σε συσκευή εξάτμισης rotary μέχρι 1 – 2 ml και μεταφορά σε κατάψυξη για καταβύθιση του λίπους. Το επόμενο βήμα ήταν εκχύλιση στερεής φάσης SPE florisil. Παρελήφθη το έκλουσμα, συμπυκνώθηκε σε συσκευή εξάτμισης (rotary), εξαμίστηκε μέχρι ξηρού (ή σχεδόν μέχρι ξηρού) με N₂ και έγινε ανασύσταση του δείγματος με 200μL Hexane. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε sample vial μετά από φιλτράρισμα με syringe RC 20/15MS.

Δοκιμή 2

Μετά την προσθήκη των εσωτερικών προτύπων και των προτύπων για το εμβολιασμένο δείγμα (spike), ακολούθησε προσθήκη 10ml μείγματος Hexane/DCM (1/1), ανάδευση για 1min σε συσκευή ανάδευσης (vortex), εκχύλιση του δείγματος σε συσκευή υπερήχων (sonication) για 10min σε θερμοκρασία 23°C και φυγοκέντρηση για 15min στις 4000 rpm. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε δυο ακόμη φορές με 10ml μείγματος Hexane/ Acetone (1/1) κάθε φορά. Εφόσον παρελήφθη το υπερκείμενο, στη συνέχεια, σε αυτό προστέθηκαν 3ml π.Η₂SO₄ κατά σταγόνες. Με την προσθήκη του οξέος

παρατηρήθηκε έντονη καταβύθιση λίπους και αλλαγή του χρώματος του διαλύματος. Ακολούθησε συμπύκνωση σε συσκευή (rotary) μέχρι 1 – 2 ml και μεταφορά σε κατάψυξη για καταβύθιση του λίπους. Το επόμενο βήμα ήταν εκχύλιση στερεής φάσης από στηλάκι SPE florasil. Παρελήφθη το έκλουσμα, συμπυκνώθηκε σε rotary, εξαμίστηκε μέχρι ξηρού (ή σχεδόν μέχρι ξηρού) με N₂ και έγινε ανασύσταση του δείγματος με 200 µL Hexane. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε sample vial μετά από φιλτράρισμα με syringe RC 20/15MS.

Δοκιμή 3

Μετά την προσθήκη των εσωτερικών προτύπων και των προτύπων για το εμβολιασμένο δείγμα (spike), ακολούθησε προσθήκη 10ml μείγματος Hexane/DCM (1/1), ανάδευση για 1min σε συσκευή ανάδευσης (vortex), εκχύλιση του δείγματος σε συσκευή υπερήχων (sonication) για 10min σε θερμοκρασία 23°C και φυγοκέντρηση για 15min στις 4000 rpm. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε δυο ακόμη φορές με 10ml μείγματος Hexane/ Acetone (1/1) κάθε φορά. Εφόσον παρελήφθη το υπερκείμενο, ακολούθησε συμπύκνωση αυτού σε συσκευή εξάτμισης (rotary) μέχρι 1 – 2 ml και μεταφορά σε κατάψυξη για καταβύθιση του λίπους. Το επόμενο βήμα ήταν εκχύλιση στερεής φάσης SPE florasil. Παρελήφθη το έκλουσμα, συμπυκνώθηκε σε rotary, εξαμίστηκε μέχρι ξηρού (ή σχεδόν μέχρι ξηρού) με N₂ και έγινε ανασύσταση του δείγματος με 200µL Hexane. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε sample vial μετά από φιλτράρισμα με syringe RC 20/15MS.

4.3.2 Τελική μέθοδος προκατεργασίας

Για την προετοιμασία των δειγμάτων biota ακολουθήθηκε μια γενική μέθοδος προκατεργασίας, όπως αποφασίσθηκε με τη βοήθεια των δοκιμασιών, η οποία περιλαμβάνει εκχύλιση των αναλυτών με μίγμα διαλυτών και ένα στάδιο καθαρισμού μέσω στήλης SPE. Πιο συγκεκριμένα, ζυγίστηκε ποσότητα 2g λυοφιλιωμένου δείγματος και τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυπροπυλενίου των 50mL. 20mL μίγματος διαλυτών hexane: DCM (1/1)

προστέθηκε σε κάθε δείγμα. Ακολούθησε η ανάδευσή τους σε συσκευή ανάδευσης (vortex mix) για 1 λεπτό και στη συνέχεια η τοποθέτησή τους σε συσκευή εκχύλισης υπερήχων, για 20 λεπτά σε σταθερή θερμοκρασία 27° C. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε δυο ακόμη φορές, με μίγμα διαλυτών hexane: acetone (1/1) όγκου 20mL. Μεταξύ των εκχυλίσεων πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων και παραλαβή του υπερκείμενου υγρού σε σφαιρική φιάλη. Το ολικό μίγμα που παραλήφθηκε, συμπυκνώθηκε στα 1 – 2 mL και ο παραμένοντας όγκος παραλήφθηκε με βοήθεια γυάλινης πιπέτας, με προσθήκη 1 – 2 mL του μίγματος διαλυτών hexane: acetone (1/1). Ακολούθησε καθαρισμός σε στήλη SPE Florisil των 6g, σύμφωνα με την ακόλουθη πορεία: Η κάθε στήλη SPE εξισορροπήθηκε και ενεργοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα μίγματα διαλυτών, αρχικά με 20ml μίγματος hexane: DCM (1/1) και στη συνέχεια δυο φορές με μίγμα 20ml hexane: acetone (1/1). Έπειτα, ακολούθησε η φόρτωση των δειγμάτων και η έκλουση πραγματοποιήθηκε με 20ml μίγματος hexane: DCM (1/1) και δυο φορές με μίγμα 20ml hexane: acetone (1/1). Το έκλουσμα που συλλέχθηκε τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε στο 1mL. Ακολούθησε εξάτμιση μέχρι ξηρού, σε ήπια ροή αζώτου και ανασύσταση σε 200μL Hexane. Τέλος, με τη χρήση φίλτρων αναγεννημένης κυτταρίνης 0.22 μm pore size RC filter (για τη συγκράτηση παρεμποδίσεων μήτρας) τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια κατάλληλα για ανάλυση σε σύστημα GC – MS/MS.

4.4 Επικύρωση μεθόδου

Η επικύρωση της μεθόδου, η οποία πρόκειται να αναπτυχθεί σε ένα εργαστήριο, είναι το επόμενο βήμα, εφόσον έχουμε καταλήξει στην πορεία κατεργασίας των δειγμάτων. Πρόκειται για μια κρίσιμη και απαραίτητη διαδικασία, καθώς παρέχει στο εργαστήριο την αξιοπιστία επαναλήψιμων και συγκρίσιμων αποτελεσμάτων.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επικύρωση μιας μεθόδου, απαιτείται να ελεγχθούν και να αξιολογηθούν μια σειρά παραμέτρων επίδοσης της μεθόδου και του συστήματος. Οι παράμετροι που αξιολογήθηκαν είναι:

- Γραμμικότητα: για τα διαλύματα προτύπων ουσιών και εσωτερικών προτύπων, σε έξι επίπεδα συγκέντρωσης (1, 10, 50, 100, 200, 500 ppb), εξήχθησαν καμπύλες βαθμονόμησης και εξισώσεις παλινδρόμησης, με ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης των δεδομένων.
- Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης: Με τη βοήθεια των καμπυλών των προτύπων διαλυμάτων και των εξισώσεων παλινδρόμησης, έγινε προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου (IDL, IQL). Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου (MDL, MQL), έγινε η αντίστοιχη ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης σε εμβολιασμένα δείγματα σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (1, 5 και 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) από την οποία εξήχθησαν και οι καμπύλες εμβολισμένων δειγμάτων και οι εξισώσεις παλινδρόμησης αυτών.
- Πιστότητα: Για την αξιολόγηση της συγκεκριμένης παραμέτρου, μελετήθηκαν η επαναληψιμότητα (%RSD_r) και η αναπαραγωγιμότητα (%RSD_R) της μεθόδου. Για την πρώτη παράμετρο, παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρία αντίγραφα (replicates) του εμβολιασμένου δείγματος στην ενδιάμεση συγκέντρωση (5 $\mu\text{g L}^{-1}$) την ίδια ημέρα ενώ για την αναπαραγωγιμότητα παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν σε τρεις διαφορετικές ημέρες, τρία αντίγραφα του εμβολιασμένου δείγματος στην ενδιάμεση συγκέντρωση (5 $\mu\text{g L}^{-1}$).
- Ακρίβεια: Πρόκειται για την παράμετρο που περιλαμβάνει και αξιολογεί τα συστηματικά σφάλματα (bias) της μεθόδου, η οποία, αξιολογήθηκε με τη βοήθεια των εμβολιασμένων δειγμάτων που παρασκευάστηκαν, υπολογίζοντας τις ανακτήσεις (%R).
- Επίδραση Μήτρας: Για μεθόδους ανάλυσης δειγμάτων με πολύπλοκη μήτρα, όπως είναι αυτά που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της %ME. Η αξιολόγηση πραγματοποιείται με την παρασκευή δείγματος προσαρμοσμένου στη

μήτρα (matrix match sample) και σύγκριση αυτού με το λευκό αντίστοιχο δείγμα.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την επικύρωση της μεθόδου, περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 5.

4.5 Οργανολογία

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα GC-EI-QQQ αποτελούμενο από:

- αεριοχρωματογράφο Bruker 456-GC (με εισαγωγή τύπου PTV),
- αυτόματο δειγματολήπτη PAL RSI Sampler
- συζευγμένο φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου (EVOQ GC-TQ Premium).

Ο εισαγωγέας δείγματος λειτούργησε σε κατάσταση splitless (splitless mode). Η βαλβίδα εκκένωσης ενεργοποιήθηκε 1 λεπτό μετά την εισαγωγή του δείγματος, ενώ ο όγκος της ένεσης ήταν 1 μL . Χρησιμοποιήθηκε η στήλη 30 m Restek Rxi-5Sil MS column (0.25 mm i.d. x 0.25 μm film thickness) με Ήλιο (He) ως φέρον αέριο, σε συνεχή ροή του 1.5 mL min^{-1} .



Εικόνα 7: Το σύστημα GC – MS/MS

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αεριοχρωματογράφου GC ήταν το ακόλουθο:

55°C αρχική θερμοκρασία, διατήρηση για 3 min, αύξηση με ρυθμό 15°C min⁻¹ στους 180°C, έπειτα αύξηση με βήμα 6.5°C min⁻¹ στους 280°C και διατήρηση για 5 min ακολουθούμενη από αύξηση με ρυθμό 10°C min⁻¹ μέχρι τους 300°C και διατήρηση για 5.28 min. Η θερμοκρασίες οπής του splitless εισαγωγέα, της γραμμής μεταφοράς GC – MS και της πηγής του MS διατηρήθηκαν στους 280, 280 and 250°C αντίστοιχα.

Η πηγή ιονισμού ήταν EI (Electron Impact, Πρόσκρουσης Ιόντων).

Τα δεδομένα αποκτήθηκαν σε λειτουργία SRM (SRM mode) στον αναλυτή μαζών και η επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια των λογισμικών TASQ 1.4 και MSWorkStation (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

4.6 Κριτήρια Ταυτοποίησης

Για να είναι εφικτή η ταυτοποίηση των αναλυτών, η μέθοδος που πρόκειται να αναπτυχθεί, εκτός από την κατάλληλη προκατεργασία, περιλαμβάνει και κάποιες παραμέτρους επιβεβαίωσης στο όργανο GC – EI – QQQ. Έτσι, έχουν τεθεί κριτήρια ταυτοποίησης των εν λόγω ενώσεων.

Το πρώτο κριτήριο αφορά στο χρόνο ανάσχεσης (Retention Time, Rt) των αναλυτών στον αεριοχρωματογράφο. Πρέπει, δηλαδή, ο χρόνος ανάσχεσης της κάθε ένωσης να μην διαφέρει από τον θεωρητικά αναμενόμενο περισσότερο από ±0,20min. Στα πραγματικά δείγματα, αναμένονται διαφορές στους χρόνους σε σχέση με τα διαλύματα προτύπων, γι' αυτό και τέθηκε ένα επιπλέον κριτήριο: ο σχετικός χρόνος ανάσχεσης (Relative Retention Time, Rel.Rt) ο οποίος δίνεται από την εξίσωση:

$$Rel. Rt = \frac{Rt_{analyte}}{Rt_{I.S}}$$

Ο παραπάνω λόγος παραμένει σταθερός, ανεξάρτητα από τις διαφορές των απόλυτων χρόνων ανάλυσης, καθώς δεν επηρεάζεται από τυχόν ολισθήσεις ή μεταβολές λόγω επίδρασης της μήτρας του δείγματος.

Στο τμήμα του αναλυτή μαζών, η τεχνική συλλογής δεδομένων είναι SRM (Single Reaction Monitoring). Η συγκεκριμένη τεχνική, όπως έχει περιγραφεί και στο τμήμα 2.2.2, μας δίνει τη δυνατότητα να παρακολουθούμε συγκεκριμένες μεταπτώσεις ζευγών ιόντων (parent – product ion reactions). Για τους αναλύτες που θα ταυτοποιήσουμε, έχουν τεθεί τα παρακάτω κριτήρια:

1. Ανίχνευση μετάπτωσης ιόντος ποσοτικοποίησης
2. Ανίχνευση μετάπτωσης ιόντος ταυτοποίησης
3. ανίχνευση μιας επιπλέον μετάπτωσης, για κάποιους από τους αναλύτες,

Τέλος, επειδή η εμφάνιση των παραπάνω μεταπτώσεων δεν είναι επαρκής συνθήκη ταυτοποίησης, τίθεται ένας ακόμη περιορισμός: οι λόγοι των εντάσεων των ιόντων στις μεταπτώσεις 2 και 3, δεν πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από $\pm 30.0\%$ από την αναμενόμενη θεωρητική.

Αναλυτικά τα κριτήρια ταυτοποίησης, όπως εφαρμόστηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, στο σύστημα GC – EI – QQQ, μέσω του λογισμικού MSWorkStation και TASQ, δίνεται στο Παράρτημα Ι.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Γενικές παρατηρήσεις

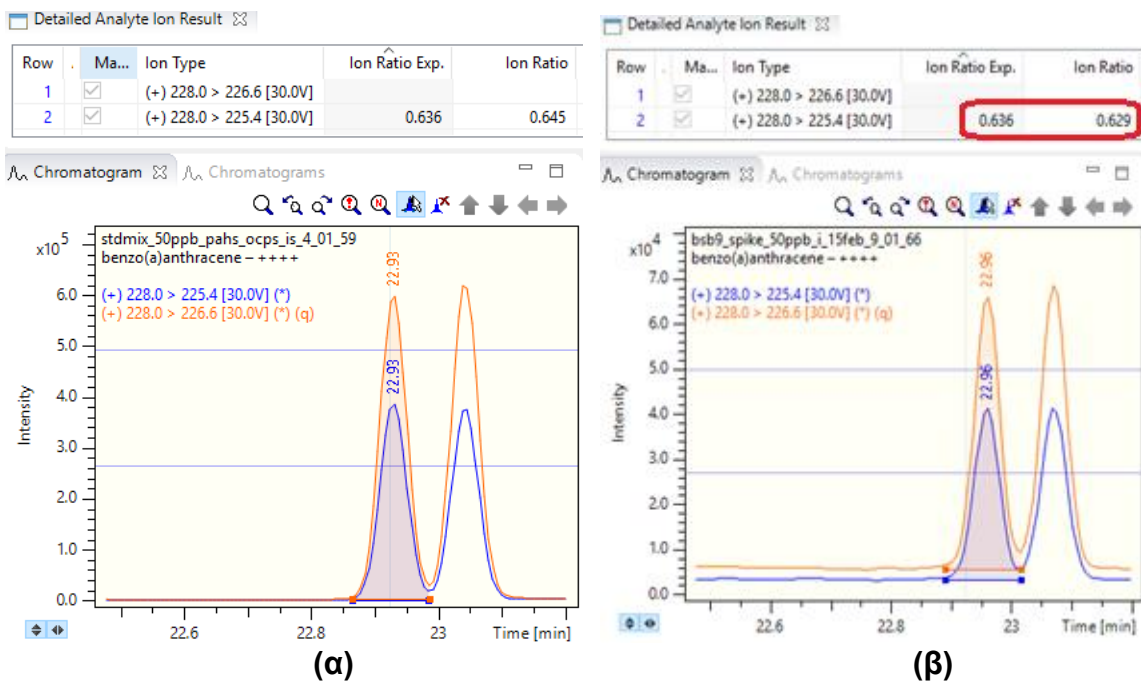
Μετά την ανάλυση όλων των παραπάνω δειγμάτων των δοκιμών, στο σύστημα GC – EI – QQQ, αποφασίστηκε ότι θα ακολουθηθεί η πορεία της Δοκιμής 3, διότι αποδείχθηκε η λιγότερο καταστρεπτική για τις υπό προσδιορισμό ουσίες. Είναι γνωστό ότι κάποιες από τις ενώσεις οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των OCPs, όπως dieldrin και endrin, είναι ευαίσθητες σε κατεργασίες με οξέα (2, 1Δ), με αποτέλεσμα να χαθεί μεγάλο μέρος κατά την προκατεργασία.

Πρέπει να τονιστεί ακόμη, ότι κατά την όξινη κατεργασία των δειγμάτων, περισσότερο στη δοκιμή 2 και λιγότερο στη δοκιμή 1 (καθώς ήταν πιο ήπια), προέκυψε έντονη καταβύθιση λίπους του δείγματος. Στη δοκιμή 2 μάλιστα, με έντονη αλλαγή του χρώματος από υποκίτρινο πριν την προσθήκη οξέος σε μαύρο ζελατινώδες στερεό. Η μορφή και η ποσότητα του λίπους ήταν τέτοια που αδυνατούσε να καθαριστεί με την εκχύλιση στερεάς φάσης (υπήρξε κορεσμός της στήλης) και το λίπος κατέληξε να περάσει στο έκλουσμα σε ποσοστό που να επηρεάσει τη χρωματογραφική εικόνα των δειγμάτων των δοκιμών 1 και κυρίως της 2.

5.2 Ταυτοποίηση Αναλυτών

Σύμφωνα με τα κριτήρια που τέθηκαν στην ανάπτυξη της μεθόδου του συστήματος GC – EI – QQQ, για να είναι αποδεκτή η ταυτοποίηση των αναλυτών, πρέπει να ικανοποιούνται και οι τρεις συνθήκες:

- Αποδεκτός χρόνος ανάλυσης
- Ανίχνευση των συγκεκριμένων μεταπτώσεων ιόντων
- Αποδεκτοί λόγοι εντάσεως των παραγόμενων ιόντων



Εικόνα 8: χρωματογραφική εικόνα του benzo(a)anthracene με τις αντίστοιχους λόγους μετάπτωσης του ιόντος ταυτοποίησης (α) στο διάλυμα προτύπων και (β) στο εμβολιασμένο (spike) δείγμα

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8, οι χρόνοι ανάσχεσης μεταξύ διαλύματος προτύπων και εμβολιασμένου δείγματος, διαφέρουν κατά 0,03min (22.93 min για το διάλυμα προτύπων και 22.96 min για το εμβολιασμένο δείγμα). Επιπλέον, βλέπουμε ότι ανιχνεύονται τόσο η μετάπτωση ποσοτικοποίησης (πορτοκαλί) όσο και η μετάπτωση ταυτοποίησης (μπλε). Επιπλέον, οι λόγοι των εντάσεων των δύο μεταπτώσεων είναι πολύ κοντά στο θεωρητικά αναμενόμενο: 0.645 για πρότυπο διάλυμα και 0.629 για το εμβολιασμένο δείγμα, έναντι 0.636 που είναι το θεωρητικό.

Σύμφωνα με τα κριτήρια ταυτοποίησης που αναφέρονται παραπάνω, έγινε αξιολόγηση της ταυτοποίησης όλων των υπό εξέταση αναλυτών στα δείγματα. Τα χρωματογράφημα όλων των αναλυτών, για το διάλυμα προτύπων, συγκέντρωσης $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, βρίσκονται στο Παράρτημα II.

5.3 Επιλογή Εσωτερικού προτύπου

Η μέθοδος εσωτερικού προτύπου χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της ακρίβειας ενός ποσοτικού προσδιορισμού. Για την ανάλυση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs), κάθε αναλύτης προσδιορίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε με το αντίστοιχο ισοτοπικά επισημασμένο (δευτεριωμένο) εσωτερικό του πρότυπο.

Για τα οργανοχλωριωμένα κατάλοιπα (OCPs), χρησιμοποιήθηκαν τρία εσωτερικά πρότυπα: 2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene, PCB 209 και το Triphenylphosphate (TPP). Το κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο, για τον κάθε αναλύτη, επιλέχθηκε συγκρίνοντας παραμέτρους ποιότητας όπως είναι ο συντελεστής γραμμικότητας, η επαναληψιμότητα και οι ανακτήσεις.

Ένας από τους δείκτες για την κατάλληλη επιλογή εσωτερικού προτύπου, ήταν ο συντελεστής συσχέτισης, των καμπυλών βαθμονόμησης γνωστής προσθήκης, για τα εμβολιασμένα δείγματα σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, με τη χρήση του λόγου:

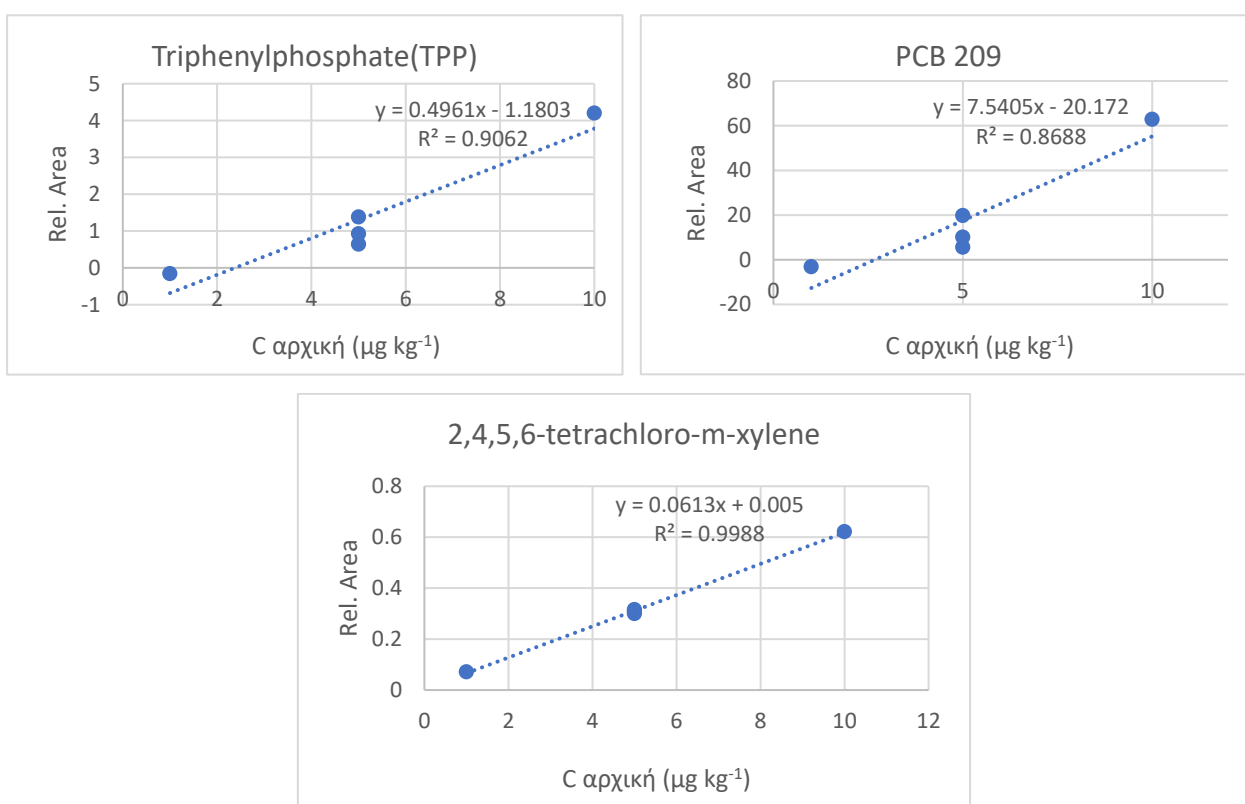
$$Relative\ Area = \frac{Analyte\ Area}{I.S.\ Area} \quad (1)$$

Τρία εμβολιασμένα δείγματα, τα οποία περιείχαν όλους τους αναλύτες και τα εσωτερικά πρότυπα αναλύθηκαν την ίδια ημέρα για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας. Ως εκ τούτου, η βελτίωση της επαναληψιμότητας (RSDr %) αποτέλεσε κριτήριο επιλογής του κατάλληλου εσωτερικού προτύπου.

Ακολουθεί ένα ενδεικτικό παράδειγμα, για την επιλογή με βάση τη γραμμικότητα για την ένωση Hexachlorobenzene. Στον Πίνακα 4 γίνεται σύγκριση τιμών του λόγου Relative Area και στο Σχήμα 1 παρουσιάζονται αντίστοιχα οι καμπύλες και οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης για τα τρία εμβολιασμένα δείγματα.

Πίνακας 4: Σύγκριση τιμών του λόγου Relative Area, για το Hexachlorobenzene

Hexachlorobenzene (Relative Area)					
Εσωτερικό Πρότυπο	bsb9_spike 1ppb	bsb9_spike 5ppb_i	bsb9_spike 5ppb_ii	bsb9_spike 5ppb_iii	bsb9_spike 10ppb
Triphenylphosphate (TPP)	-0.15	0.64	0.93	1.38	4.20
PCB 209	-3.12	5.61	10.1	19.8	62.8
2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene	0.07	0.30	0.31	0.32	0.62



Σχήμα 1: Η επιλογή εσωτερικού προτύπου για το Hexachlorobenzene με βάση τον συντελεστή συσχέτισης

Σύμφωνα με τις εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης, καλύτερη γραμμικότητα για τον αναλύτη Hexachlorobenzene δίνει η επιλογή του 2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene ως εσωτερικό πρότυπο.

5.4 Επικύρωση της μεθόδου

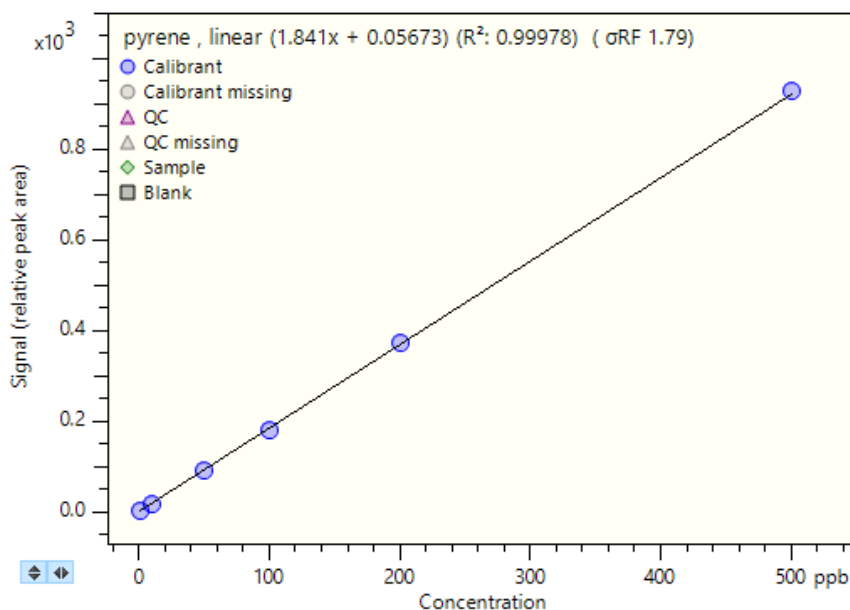
Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, κατέστη αναγκαίο να γίνει ανάπτυξη και επικύρωση μιας νέας μεθόδου, καθώς δεν υπήρχε άλλη αντίστοιχη ανεπτυγμένη και επικυρωμένη μέθοδος στο εργαστήριο. Η επικύρωση μιας μεθόδου, που αναπτύσσεται σε ένα εργαστήριο, είναι μια κρίσιμη και απαραίτητη διαδικασία, καθώς παρέχει τη δυνατότητα για επαναλήψιμα και συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Πιο συγκεκριμένα, για την επικύρωση της μεθόδου, ως χαρακτηριστικά επίδοσης αξιολογήθηκαν η γραμμικότητα, η πιστότητα, (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα), τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ), η ακρίβεια και η επίδραση μήτρας [59]. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν μίγματα προτύπων διαλυμάτων σε έξι επίπεδα συγκέντρωσης και εμβολιασμένα (spiked) δείγματα σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, από τα οποία εξήχθησαν καμπύλες βαθμονόμησης και γνωστής προσθήκης για την εκτίμηση των παραμέτρων επίδοσης της μεθόδου.

5.4.1 Γραμμικότητα

Γραμμικότητα είναι η ικανότητα μιας αναλυτικής πορείας να λαμβάνει αποτελέσματα τα οποία μπορούν απευθείας να μεταφραστούν σε συγκέντρωση αναλύτη στο δείγμα. Με άλλα λόγια, η εξαγωγή καμπυλών βαθμονόμησης, παρέχει τη δυνατότητα απευθείας μετατροπής του σήματος σε μονάδες συγκέντρωσης.

Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν μίγματα προτύπων διαλυμάτων σε έξι επίπεδα συγκέντρωσης (1, 10, 50, 100, 200, 500 ppb), από τα οποία εξήχθησαν οι καμπύλες βαθμονόμησης για όλους τους αναλύτες, με τη βοήθεια του λογισμικού TASQ 1.4. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα δεδομένα παρουσίασαν εξαιρετική γραμμικότητα, με τον συντελεστή R^2 να λαμβάνει τιμές 0,99. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται η καμπύλη του pyrene (ως προς relative peak area) όπως εξήχθη από το λογισμικό TASQ 1.4, με το οποίο έγινε η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.



Σχήμα 2: καμπύλη βαθμονόμησης του *pyrene*, με το πρόγραμμα TASQ 1.4

Για την επίτευξη βέλτιστης γραμμικότητας, κατά την εξαγωγή των καμπυλών βαθμονόμησης, δοκιμάστηκε η ζυγισμένη παλινδρόμηση με παράγοντες ζύγισης $1/x$ και $1/x^2$. Παρατηρήθηκε ότι με τον παράγοντα $1/x^2$ δίνεται μεγαλύτερη βαρύτητα (και κατ' επέκταση μεγαλύτερη ακρίβεια) στις μικρές συγκεντρώσεις, ενώ ο παράγοντας $1/x$ βελτίωνε καλύτερα το σύνολο των συγκεντρώσεων, στην πλειοψηφία των αναλυτών.

Στον Πίνακα 5 συνοψίζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης των διαλυμάτων προτύπων και εσωτερικών προτύπων, για την αξιολόγηση της γραμμικότητας του οργάνου αναφορικά με τους υπό προσδιορισμό αναλύτες. Να σημειωθεί πως η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για τα εσωτερικά πρότυπα έγινε με χρήση του απόλυτου εμβαδού (absolute peak area) των χρωματογραφικών κορυφών και επεξεργασία με τη βοήθεια του εργαλείου DataAnalysis του Microsoft Excel, ενώ για τους αναλύτες, έγινε χρήση του σχετικού εμβαδού (Relative Area) και οι καμπύλες εξήχθησαν με το λογισμικό TASQ 1.4, όπως η καμπύλη του Σχήματος 2.

Πίνακας 5: Εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης των προτύπων μιγμάτων

Αναλύτης	Παράγοντας Ζύγισης	Εξίσωση γραμμ. Παλινδρόμησης	R ²
Napthalene-d8		$y=(7,1\pm0.08)*10^4x+(19\pm18)*10^4$	0.9994
Acenaphthylene-d8		$y=(0.49\pm0.004)*10^4x+(1.0\pm0.88)*10^4$	0.9997
Acenaphthene-d10		$y=(1.8\pm0.01)*10^4x+(4.5\pm2.9)*10^4$	0.9998
Fluorene-d10		$y=(5.6\pm0.03)*10^4x+(5.7\pm6.2)*10^4$	0.9999
Phenathrene-d10		$y=(1.3\pm0.02)*10^4x+(3.3\pm3.4)*10^4$	0.9995
anthracene-d10		$y=(1.5\pm0.01)*10^4x+(0.7\pm2.3)*10^4$	0.9999
Fluoranthene-d10		$y=(1.9\pm0.02)*10^4x+(3.5\pm5.4)*10^4$	0.9994
Pyrene-d10		$y=(2.1\pm0.006)*10^4x+(0.87\pm1.3)*10^4$	0.9999
Benzo(a)anthracene-d12		$y=(2.3\pm0.02)*10^4x+(4.2\pm3.6)*10^4$	0.9998
Chrysene-d12		$y=(2.8\pm0.02)*10^4x-(0.91\pm4.4)*10^4$	0.9998
Benzo(b)fluoranthene-d12		$y=(2.0\pm0.01)*10^4x-(2.9\pm3.4)*10^4$	0.9998
Benzo(k)fluoranthene-d12		$y=(1.9\pm0.02)*10^4x-(2.5\pm5.5)*10^4$	0.9993
Benzo(a)pyrene-d12		$y=(1.2\pm0.005)*10^4x+(0.81\pm1.2)*10^4$	0.9999
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene-d12		$y=(0.93\pm0.008)*10^4x+(0.43\pm1.8)*10^4$	0.9997
Dibenzo(a,h)anthracene-d14		$y=(0.65\pm0.006)*10^4x-(1.4\pm1.3)*10^4$	0.9997
Benzo(g,h,i)perylene-d12		$y=(0.48\pm0.003)*10^4x-(0.40\pm0.6)*10^4$	0.9999
naphthalene	$1/x$	$y=0.53x+0.36$	0.9999
acenaphthylene	$1/x$	$y=3.0x+0.14$	0.99997
acenaphthene	$1/x$	$y=1.7x-9.9*10^{-4}$	0.99991
fluorene	$1/x$	$y=0.66x+0.09$	0.9999
phenanthrene	$1/x^2$	$y=2.1x+0.17$	0.99991
anthracene	$1/x^2$	$y=1.5x+0.02$	0.9994
fluoranthene	$1/x^2$	$y=2.1x+0.06$	0.9998
pyrene	$1/x^2$	$y=1.8x+0.16$	0.9996

benzo(a)anthracene	$1/x$	$y=1.6x-0.16$	0.9997
chrysene	$1/x$	$y=1.1x-0.01$	0.9999
benzo(b) fluoranthene	$1/x$	$y=1.3x-0.004$	0.9994
benzo(k) fluoranthene	$1/x$	$y=1.4x+0.22$	0.9995
benzo(a) Pyrene	$1/x$	$y=1.6x+0.08$	0.9999
indeno (1,2,3-c,d) pyrene	$1/x^2$	$y=1.1x+0.20$	0.99907
dibenzo(a,h)anthracene	$1/x$	$y=3.3x+0.30$	0.9993
benzo(g,h,i) perylene	$1/x$	$y=3.3x-0.27$	0.9999
2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene		$y=(1.8\pm0.2)*10^4x+(8.2\pm5.2)*10^4$	0.9993
Triphenylphosphate (TPP)		$y=(1.0\pm0.006)*10^4x+(0.23\pm1.4)*10^4$	0.9993
PCB 209		$y=(4.0\pm0.002)*10^4x+(0.04\pm0.52)*10^4$	0.9999
Hexachlorobutadiene	$1/x^2$	$y=0.17x-0.05$	0.9993
Dichlorvos	$1/x^2$	$y=0.38x-0.08$	0.9997
alpha-HCH	$1/x$	$y=0.78x-0.22$	0.9998
Hexachlorobenzene	$1/x$	$y=0.32x-0.075$	0.9998
Beta-HCH	$1/x^2$	$y=0.49x-0.08$	0.994
Lindane	$1/x^2$	$y=0.54x-0.08$	0.993
delta-HCH	$1/x$	$y=0.36x-0.10$	0.9994
Heptachlor	$1/x$	$y=0.37x-0.16$	0.9998
Aldrin	$1/x$	$y=0.14x-0.04$	0.9997
Dicofol	$1/x$	$y=1.8x-0.10$	0.996
Isodrin	$1/x$	$y=0.08x-0.002$	0.997
Alpha-Endosulfan	$1/x$	$y=0.08x-0.04$	0.9991
4,4'-DDE	$1/x$	$y=0.99x-0.22$	0.9993
Dieldrin	$1/x^2$	$y=0.06x-0.02$	0.995

Endrin	$1/x$	$y=0.29x-0.10$	0.9997
4,4'-DDD & 2,4'-DDT	$1/x^2$	$y=2.7x-0.17$	0.9907
Endosulfan-sulfate	$1/x$	$y=0.58x-0.13$	0.9992
4,4'-DDT	$1/x$	$y=0.85x-0.54$	0.997

5.4.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Για την επικύρωση της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε, είναι κρίσιμος και ο προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου και της μεθόδου. Ως όριο ανίχνευσης, ορίζουμε το ελάχιστο παρατηρούμενο σήμα, το οποίο με αξιοπιστία μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι σήμα προκαλούμενο από τον αναλύτη. Αντίστοιχα, ως όριο ποσοτικοποίησης, ορίζουμε τη χαμηλότερη συγκέντρωση, στην οποία μπορεί να επιτευχθεί μια αποδεκτή ακρίβεια ($\frac{signal}{noise} ratio \geq 10$).

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου (IDL, IQL) χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης των προτύπων διαλυμάτων, ενώ για τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου (MDL, MQL) στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες των εμβολιασμένων δειγμάτων.

Οι τύποι που χρησιμοποιήθηκαν για τους υπολογισμούς είναι οι παρακάτω:

$$LOD = \frac{SD_{intercept}}{slope} \times 3.3 \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{SD_{intercept}}{slope} \times 10 \quad (3)$$

Πίνακας 6: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου (IDL, IQL)

κατηγορία	Ένωση	IDL ($\mu\text{g L}^{-1}$)	IQL ($\mu\text{g L}^{-1}$)
PAHs	naphthalene	1.2	3.7
PAHs	acenaphthylene	1.9	5.9
PAHs	acenaphthene	1.5	4.4
PAHs	fluorene	2.7	8.3
PAHs	phenanthrene	1.3	3.9
PAHs	anthracene	1.9	5.7
PAHs	fluoranthene	1.9	5.8
PAHs	pyrene	2	6.1
PAHs	benzo(a)anthracene	3.2	9.7
PAHs	chrysene	2.9	8.8
PAHs	benzo(b) fluoranthene	1.2	3.5
PAHs	benzo(k) fluoranthene	2.1	6.2
PAHs	benzo(a) Pyrene	2.7	8.2
PAHs	indeno (1,2,3-c,d) pyrene	1.5	4.6
PAHs	dibenzo(a,h)anthracene	2.8	8.4
PAHs	benzo(g,h,i) perylene	2.6	7.8
OCPs	Hexachlorobutadiene	1.2	3.8
OCPs	Dichlorvos	1.1	3.3
OCPs	alpha-HCH	1.3	3.9
OCPs	Hexachlorobenzene	0.97	2.9
OCPs	Beta-HCH	3.3	10
OCPs	Lindane	0.62	1.9
OCPs	delta-HCH	1.4	4.1
OCPs	Heptachlor	0.99	3
OCPs	Aldrin	0.79	2.4
OCPs	Dicofol	1.5	4.5
OCPs	Isodrin	0.78	2.4
OCPs	Alpha-Endosulfan	1.3	3.8

OCPs	4,4'-DDE	2.3	6.9
OCPs	Dieldrin	1.6	4.8
OCPs	Endrin	1.3	3.8
OCPs	4,4'-DDD & 2,4'-DDT	1.3	4
OCPs	Endosulfan-sulfate	1.4	4.3
OCPs	4,4'-DDT	1.1	3.5

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου, έγιναν οι αντίστοιχοι υπολογισμοί στα εμβολιασμένα δείγματα. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης για τα εμβολιασμένα δείγματα και με βάση τα αποτελέσματα αυτής, προέκυψαν οι αντίστοιχες εξισώσεις, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7. Αντίστοιχα, με τις εξισώσεις (2) και (3) υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, με τα δεδομένα των εμβολιασμένων δειγμάτων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 7: Εξισώσεις παλινδρόμησης για τα εμβολιασμένα δείγματα

Κατηγορία	Αναλύτης	Εξίσωση παλινδρόμησης	R ²
PAHs	naphthalene	$y = (0.48 \pm 0.26)x - (0.1407 \pm 1.5)$	0.931
PAHs	acenaphthylene	$y = (0.56 \pm 0.03)x + (0.19 \pm 0.16)$	0.993
PAHs	acenaphthene	$y = (0.46 \pm 0.02)x - (0.18 \pm 0.14)$	0.9917
PAHs	fluorene	$y = (0.12 \pm 0.02)x + (0.07 \pm 0.16)$	0.9426
PAHs	phenanthrene	$y = (0.37 \pm 0.03)x + (1.3 \pm 1.6)$	0.9842
PAHs	anthracene	$y = (0.31 \pm 0.01)x - (0.15 \pm 0.07)$	0.9956
PAHs	fluoranthene	$y = (0.43 \pm 0.04)x - (0.07 \pm 0.23)$	0.9754
PAHs	pyrene	$y = (0.34 \pm 0.01)x - (0.13 \pm 0.08)$	0.9954
PAHs	benzo(a)anthracene	$y = (0.34 \pm 0.01)x - (0.15 \pm 0.06)$	0.9976
PAHs	chrysene	$y = (0.24 \pm 0.01)x - (0.20 \pm 0.08)$	0.9906

PAHs	benzo(b) fluoranthene	$y = (0.25 \pm 0.01)x + (0.02 \pm 0.04)$	0.998
PAHs	benzo(k) fluoranthene	$y = (0.28 \pm 0.01)x - (0.04 \pm 0.08)$	0.9926
PAHs	benzo(a) Pyrene	$y = (0.37 \pm 0.02)x - (0.12 \pm 0.09)$	0.9947
PAHs	indno (123 cd) pyrene	$y = (0.37 \pm 0.01)x + (0.07 \pm 0.06)$	0.9981
PAHs	dibenzo(ah)anthracene	$y = (0.92 \pm 0.12)x - (0.50 \pm 0.73)$	0.9491
PAHs	benzo(ghi) perylene	$y = (0.77 \pm 0.04)x - (0.11 \pm 0.25)$	0.9912
OCPs	Hexachlorobutadiene	$y = (0.035 \pm 0.002)x - (0.019 \pm 0.012)$	0.9892
OCPs	Dichlorvos	$y = (0.007 \pm 0.002)x + (0.004 \pm 0.009)$	0.9888
OCPs	alpha-HCH	$y = (0.15 \pm 0.01)x - (0.09 \pm 0.03)$	0.9957
OCPs	Hexachlorobenzene	$y = (0.061 \pm 0.001)x + (0.005 \pm 0.007)$	0.9988
OCPs	Beta-HCH	$y = (0.15 \pm 0.04)x - (0.14 \pm 0.22)$	0.9556
OCPs	Lindane	$y = (0.17 \pm 0.02)x - (0.18 \pm 0.11)$	0.9388
OCPs	delta-HCH	$y = (0.062 \pm 0.019)x + (0.040 \pm 0.043)$	0.961
OCPs	Heptachlor	$y = (0.067 \pm 0.001)x + (0.007 \pm 0.008)$	0.9987
OCPs	Aldrin	$y = (0.020 \pm 0.001)x - (0.005 \pm 0.007)$	0.9906
OCPs	Dicofol	$y = (0.19 \pm 0.02)x + (0.23 \pm 0.13)$	0.9649
OCPs	Isodrin	$y = (0.0081 \pm 0.0004)x + (0.0091 \pm 0.0022)$	0.9938
OCPs	Alpha-Endosulfan	$y = (0.85 \pm 0.15)x - (0.99 \pm 0.88)$	0.9689
OCPs	4,4'-DDE	$y = (46.6 \pm 12.6)x - (186 \pm 74.9)$	0.8192
OCPs	Dieldrin	$y = (0.004 \pm 0.001)x + (0.018 \pm 0.006)$	0.8633
OCPs	Endrin	$y = (0.005 \pm 0.002)x + (0.019 \pm 0.009)$	0.8441
OCPs	4,4'-DDD & 2,4'-DDT	$y = (61.9 \pm 13.5)x - (259 \pm 80.0)$	0.8756
OCPs	Endosulfan-sulfate	$y = (1.1 \pm 0.1)x - (1.3 \pm 0.7)$	0.9631
OCPs	4,4'-DDT	$y = (10 \pm 1.3)x + (19 \pm 7.5)$	0.9537

Πίνακας 8: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου (MDL, MQL) για τα δείγματα, με και χωρίς υγρασία (ww – dw)

		dw	dw	ww	ww
κατηγορία	Αναλύτης	MDL (μg/kg)	MQL (μg/kg)	MDL (μg/kg)	MQL (μg/kg)
PAHs	naphthalene	7.3*	22*	1.8*	5.5*
PAHs	acenaphthylene	0.95	2.87	0.24	0.72
PAHs	acenaphthene	1.0	3.1	0.26	0.78
PAHs	fluorene	2.8	8.5	0.70	2.1
PAHs	phenanthrene	1.4	4.4	0.36	1.1
PAHs	anthracene	0.75	2.3	0.19	0.57
PAHs	fluoranthene	1.8	5.4	0.45	1.4
PAHs	pyrene	0.77	2.3	0.19	0.58
PAHs	benzo(a)anthracene	0.55	1.7	0.14	0.42
PAHs	chrysene	1.1	3.3	0.28	0.83
PAHs	benzo(b) fluoranthene	0.51	1.5	0.13	0.38
PAHs	benzo(k) fluoranthene	0.98	3.0	0.24	0.74
PAHs	benzo(a) Pyrene	0.83	2.5	0.21	0.63
PAHs	indeno (1,2,3-c,d) pyrene	0.49	1.5	0.12	0.37
PAHs	dibenzo(a,h)anthracene	2.6	7.9	0.65	2.0
PAHs	benzo(g,h,i) perylene	1.1	3.2	0.27	0.81
OCPs	Hexachlorobutadiene	1.2	3.6	0.30	0.89
OCPs	Dichlorvos	4.6	14	1.2	3.5
OCPs	alpha-HCH	0.75	2.3	0.19	0.57
OCPs	Hexachlorobenzene	0.40	1.2	0.10	0.30
OCPs	Beta-HCH	5.1	15	1.3	3.8
OCPs	Lindane	2.4	7.4	0.61	1.9
OCPs	delta-HCH	2.3	6.9	0.57	1.7
OCPs	Heptachlor	0.41	1.2	0.10	0.31
OCPs	Aldrin	1.1	3.3	0.28	0.84
OCPs	Dicofol	2.2	6.5	0.54	1.6

OCPs	Isodrin	0.9	2.7	0.2	0.7
OCPs	Alpha-Endosulfan	3.4	10	0.85	2.6
OCPs	4,4'-DDE	5.3	16	1.3	4.0
OCPs	Dieldrin	4.5	14	1.1	3.4
OCPs	Endrin	6.5	20	1.6	4.9
OCPs	4,4'-DDD & 2,4'-DDT	4.3	13	1.1	3.2
OCPs	Endosulfan-sulfate	2.2	6.7	0.55	1.7
OCPs	4,4'-DDT	2.5	7.5	0.62	1.9

*Παρατηρήσαμε, με τη βοήθεια λευκών δειγμάτων (procedural blanks) ότι τα δείγματα παρουσίαζαν μεγάλη επιμόλυνση στον συγκεκριμένο αναλύτη (naphthalene), με αποτέλεσμα να μην μπορεί η μέθοδος να πετύχει επαρκώς χαμηλά όρια ανίχνευσης. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι η συγκεκριμένη ένωση έχοντας χαμηλό μοριακό βάρος και μεγάλη πτητικότητα, μπορεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα να βρίσκεται στην αέρια φάση [9] και να διαλυθεί πολύ εύκολα σε οργανικούς διαλύτες όπως αυτοί που χρησιμοποιήθηκαν για τις προκατεργασίες της πορείας της ανάλυσης των δειγμάτων.

Ωστόσο, αξίζει να σημειώσουμε ότι για το 71% των αναλυτών ήταν $MDL \leq 0.65 \mu g \cdot kg^{-1}$ και για το 80% των αναλυτών $MDL < 1.0 \mu g \cdot kg^{-1}$.

5.4.3 Ακρίβεια

Η ακρίβεια είναι μια καθοριστική παράμετρος η οποία πρέπει να αξιολογείται κατά την επικύρωση μιας μεθόδου καθώς περιλαμβάνει τα κοινά συστηματικά σφάλματα (bias) και εκτιμάται μέσω της πιστότητας (precision) και της ορθότητας (trueness).

5.4.3.1 Πιστότητα

Ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά ποιότητας και επίδοσης της μεθόδου είναι η πιστότητα, η οποία προκύπτει από την επαναληψιμότητα (repeatability/ intra-day precision) και την αναπαραγωγισμότητα ή ενδιάμεση πιστότητα (inter-day precision).

Σχετικά με την επαναληψιμότητα της μεθόδου, αναλύθηκαν τρία εμβολιασμένα παράγωγα του ίδιου δείγματος, στο ίδιο επίπεδο συγκέντρωσης ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$ αρχική συγκέντρωση), την ίδια ημέρα, ενώ για την αναπαραγωγισμότητα ή ενδιάμεση πιστότητα της μεθόδου, αναλύθηκε σε τρεις διαφορετικές μέρες από ένα παράγωγο του ίδιου εμβολιασμένου δείγματος.

Ο υπολογισμός της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD) έγινε και στις δυο περιπτώσεις διαιρώντας το μέσο όρο (mean) των λόγων Relative Area των τριών εμβολιασμένων δειγμάτων με την τυπική απόκλιση αυτών (SD).

$$\%RSD = \frac{\text{Mean (Rel. Area(Spike - Blank))}}{\text{SD (Rel. Area(Spike - Blank))}} \times 100\% \quad (4)$$

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την επαναληψιμότητα (% RSD_r) και της ενδιάμεσης πιστότητας (% RSD_R), με τη βοήθεια της εξίσωσης (4), παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Η αναπαραγωγισμότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου

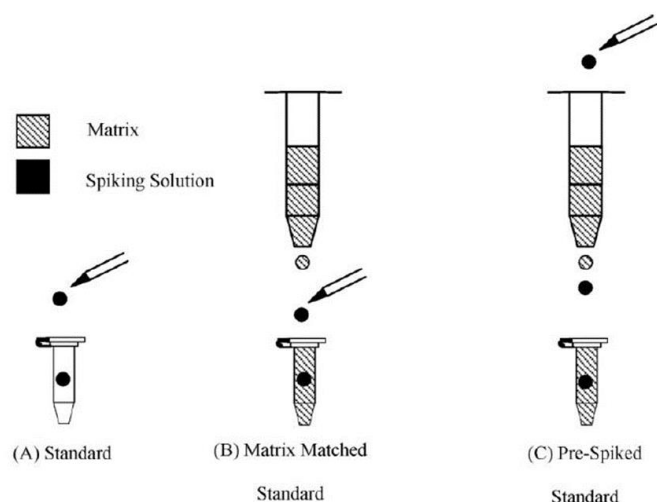
Αναλύτης	κατηγορία	RSD _R %	RSD _r %
naphthalene	PAHs	15	16
acenaphthylene	PAHs	5.7	8.8
acenaphthene	PAHs	2.7	3.6
fluorene	PAHs	10	6.8
phenanthrene	PAHs	4.5	6.4
anthracene	PAHs	2.5	5.9
fluoranthene	PAHs	3.7	9.8

pyrene	PAHs	3.8	1.8
benzo(a)anthracene	PAHs	3.0	9.9
chrysene	PAHs	3.0	7.9
benzo(b) fluoranthene	PAHs	3.0	9.9
benzo(k) fluoranthene	PAHs	6.1	3.7
benzo(a) Pyrene	PAHs	1.9	3.0
indeno (1,2,3-c,d) pyrene	PAHs	2.0	2.4
dibenzo(a,h)anthracene	PAHs	7.6	4.4
benzo(g,h,i) perylene	PAHs	7.0	10
Hexachlorobutadiene	OCPs	9.2	13
Dichlorvos	OCPs	19	17
alpha-HCH	OCPs	5.4	1.8
Hexachlorobenzene	OCPs	2.1	7.6
Beta-HCH	OCPs	19	14
Lindane	OCPs	6.5	8.3
delta-HCH	OCPs	8.2	2.8
Heptachlor	OCPs	7.3	6.1
Aldrin	OCPs	4.5	4.7
Dicofol	OCPs	9.0	2.1
Isodrin	OCPs	2.8	1.2
Alpha-Endosulfan	OCPs	5.8	7.3
4,4'-DDE	OCPs	18	13
Dieldrin	OCPs	14	81
Endrin	OCPs	5.8	2.3
4,4'-DDD & 2,4'-DDT	OCPs	18	19
Endosulfan-sulfate	OCPs	16	12
4,4'-DDT	OCPs	11	4.8

Για να είναι τα αποτελέσματα αξιόπιστα, θα πρέπει να είναι $\%RSD_R \leq 20\%$ [60], το οποίο επιτυγχάνεται, επομένως τα αποτελέσματα είναι αποδεκτά.

5.4.3.2 Ορθότητα

Κατά κανόνα, η ορθότητα εκτιμάται με τη χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRM) και όπου αυτό δεν είναι εφικτό, υπολογίζεται μέσω των ανακτήσεων, από γνωστή προσθήκη αναλυτών σε εμβολιασμένα δείγματα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο εμβολιασμός των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (1, 5, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), όπου για τη μέση συγκέντρωση (50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), δημιουργήθηκαν τρεις επαναλήψεις (αντίγραφα), με τον τρόπο που περιγράφεται και στην Εικόνα 8.



Εικόνα 9: προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό ανάκτησης και επίδρασης μήτρας [53]

Οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν σύμφωνα με την εξίσωση 5 [61]:

$$\%R = \frac{Relative\ area_{(spiked\ samples)} - Relative\ area_{(blank\ sample)}}{Relative\ area_{(M.M.\ samples)} - Relative\ area_{(blank\ sample)}} \times 100 \quad (5)$$

Οι ανακτήσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 10, όπου φαίνεται ότι κυμαίνονται από 70% - 109%

Γενικότερα, ανακτήσεις από 70% έως 120%, με σχετικές αποκλίσεις έως 20% είναι αποδεκτές σε πειράματα επικύρωσης [61]. Το χαμηλότερο ποσοστό ανάκτησης εμφανίζεται στο naphthalene. Λόγω της μεγάλης επιμόλυνσης που εμφάνιζε κατά την πορεία που ακολουθήθηκε, τα αποτελέσματα του είχαν μικρότερη αξιοπιστία.

Πίνακας 10: Οι ανακτήσεις (R%) των αναλυτών στο εμβολιασμένο δείγμα

Αναλύτης	κατηγορία	R %	SD
naphthalene	PAHs	70	0.490
acenaphthylene	PAHs	81	0.169
acenaphthene	PAHs	74	0.037
fluorene	PAHs	97	0.064
phenanthrene	PAHs	85	0.145
anthracene	PAHs	72	0.034
fluoranthene	PAHs	93	0.082
pyrene	PAHs	76	0.060
benzo(a)anthracene	PAHs	71	0.045
chrysene	PAHs	72	0.029
benzo(b) fluoranthene	PAHs	77	0.039
benzo(k) fluoranthene	PAHs	81	0.083
benzo(a) Pyrene	PAHs	73	0.031
indeno (1,2,3-c,d) pyrene	PAHs	72	0.014
dibenzo(a,h)anthracene	PAHs	76	0.277
benzo(g,h,i) perylene	PAHs	74	0.258
Hexachlorobutadiene	OCPs	76	0.001
Dichlorvos	OCPs	97	0.010
alpha-HCH	OCPs	94	0.035
Hexachlorobenzene	OCPs	78	0.006
Beta-HCH	OCPs	102	0.178
Lindane	OCPs	71	0.036
delta-HCH	OCPs	79	0.031
Heptachlor	OCPs	77	0.003
Aldrin	OCPs	94	0.005
Dicofol	OCPs	88	0.112
Isodrin	OCPs	88	0.001
Alpha-Endosulfan	OCPs	88	0.643

4,4'-DDE	OCPs	109	0.810
Dieldrin	OCPs	73	0.006
Endrin	OCPs	78	0.003
4,4'-DDD & 2,4'-DDT	OCPs	107	0.850
Endosulfan-sulfate	OCPs	86	0.620
4,4'-DDT	OCPs	74	0.780

5.4.4 Επίδραση Μήτρας

Ο υπολογισμός της επίδρασης της μήτρας (matrix effect, ME) του δείγματος, είναι μια σημαντική παράμετρος για την αξιολόγηση της εκλεκτικότητας της μεθόδου. Το «φαινόμενο μήτρας» μπορεί να προκαλέσει είτε αύξηση είτε μείωση στο παραγόμενο σήμα που φτάνει στον ανιχνευτή και μπορεί να οφείλεται σε διάφορες αιτίες. Παρ' όλο που ο μηχανισμός και προέλευση του φαινομένου, δεν έχει πλήρως κατανοηθεί, σύμφωνα με τους Frenich et. al. [62], η μείωση ή ενίσχυση του σήματος μπορεί να προέρχεται από τον ανταγωνισμό μεταξύ ενός υπό εξέταση αναλύτη και κάποιου μη ανιχνεύσιμου ή συνεκλουόμενου συστατικού της μήτρας του δείγματος, για να εισέλθει στα ενεργά τμήματα (εισαγωγέας, στήλη) του αεριοχρωματογράφου. Αντίστοιχα, σχετικά με τη μείωση του σήματος του αναλύτη, προτείνεται ότι προκύπτει πιθανότατα από μη πτητικά συνεκλουόμενα συστατικά της μήτρας του δείγματος τα οποία συσσωρεύονται μέσα στο αεριοχρωματογραφικό σύστημα. Ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται ο ιοντισμός και η μεταφορά των ιόντων στην αέρια φάση, αυτός ο ανταγωνισμός μπορεί να επηρεάσει, αυξάνοντας ή μειώνοντας, τον αποτελεσματικό σχηματισμό των επιθυμητών ιόντων του αναλύτη που βρίσκονται στο σημείο επαφής. Επομένως, είναι φανερό ότι η αποδοτικότητα στο σχηματισμό των επιθυμίων ιόντων του αναλύτη είναι εξαρτώμενη από τη μήτρα του δείγματος, γι' αυτό και κατά τις προκατεργασίες των δειγμάτων ακολουθείται μια σειρά από στάδια καθαρισμού των δειγμάτων πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα ανάλυσης [53].

Προκειμένου να υπολογιστεί η έκταση της επίδρασης της μήτρας του δείγματος, παρασκευάστηκε δείγμα, το οποίο εμβολιάστηκε με μίγμα προτύπων και εσωτερικών προτύπων τελικής συγκέντρωσης $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, μετά το τέλος της πορείας της προκατεργασίας και αμέσως πριν την ανάλυσή του, όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 8.

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης μήτρας (ME) είναι απαραίτητος και ο υπολογισμός του παράγοντα μήτρας (Matrix Factor, MF), βάσει των παρακάτω εξισώσεων (6) και (7) [53]:

$$MF = \frac{Area_{Matrix \text{ Matched sample}} - Area_{Blank \text{ Sample}}}{Area_{standrard}} \quad (6)$$

$$\% ME = (1 - MF) \times 100 \quad (7)$$

Πίνακας 11: Τιμές επίδρασης μήτρας των εξεταζόμενων αναλυτών

Αναλύτης	Κατηγορία	% Matrix Effect
naphthalene	PAHs	-18
acenaphthylene	PAHs	-22
acenaphthene	PAHs	-3
fluorene	PAHs	-21
phenanthrene	PAHs	-19
anthracene	PAHs	-17
fluoranthene	PAHs	-18
pyrene	PAHs	-15
benzo(a)anthracene	PAHs	-15
chrysene	PAHs	-16
benzo(b) fluoranthene	PAHs	-13
benzo(k) fluoranthene	PAHs	-9
benzo(a) Pyrene	PAHs	-14
indeno (1,2,3-c,d) pyrene	PAHs	-14
dibenzo(a,h)anthracene	PAHs	-21
benzo(g,h,i) perylene	PAHs	-14

Hexachlorobutadiene	OCPs	-24
Dichlorvos	OCPs	-20
alpha-HCH	OCPs	-11
Hexachlorobenzene	OCPs	-19
Beta-HCH	OCPs	-21
Lindane	OCPs	-12
delta-HCH	OCPs	-7
Heptachlor	OCPs	-12
Aldrin	OCPs	-7
Dicofol	OCPs	9
Isodrin	OCPs	-7
Alpha-Endosulfan	OCPs	-18
4,4'-DDE	OCPs	-6
Dieldrin	OCPs	-3
Endrin	OCPs	-4
4,4'-DDD & 2,4'-DDT	OCPs	-24
Endosulfan-sulfate	OCPs	-13
4,4'-DDT	OCPs	-29

Στην ιδανική περίπτωση, επίδραση μήτρας (%ME) ίση με μηδέν, σημαίνει ότι δεν παρατηρείται ενίσχυση ή μείωση του σήματος, και η έντασή του θα είναι απευθείας συγκρίσιμη με εκείνη των προτύπων σε καθαρό διαλύτη. Τονίζεται ότι, θετικές τιμές της %ME υποδεικνύουν μείωση του σήματος ενώ οι αρνητικές ενίσχυση.

Εξετάζοντας την επίδραση μήτρας %ME στη μέθοδο και παρατηρώντας Πίνακα 11, είναι φανερό ότι για την πλειοψηφία των αναλυτών προκαλείται ενίσχυση του παραγόμενου σήματος, εκτός από τον αναλύτη Dicofol για τον οποίο έχουμε μείωση. Συνοψίζοντας, οι τιμές της %ME κυμαίνονται από – 29% έως 9%.

5.5 Αποτελέσματα

Για την εξαγωγή των τελικών συγκεντρώσεων στα δείγματα, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται παρακάτω:

Αρχικά έγινε αξιολόγηση και επιλογή του κατάλληλου εσωτερικού προτύπου για τα OCPs που δεν υπήρχε διαθέσιμο το αντίστοιχο ισοτοπικά επισημασμένο εσωτερικό πρότυπο. Κατόπιν, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση τυχόν επιμολύνσεων που ανιχνεύθηκαν στα τρία λευκά δείγματα (Procedural Blank).

Με τη βοήθεια των καμπυλών και εξισώσεων γραμμικής παλινδρόμησης για τα εμβολιασμένα δείγματα, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των αναλυτών σε όλα δείγματα. Από τις τιμές αυτές, αφαιρέθηκαν αντίστοιχα οι επιμολύνσεις, και τα τελικά αποτελέσματα, υπολογίστηκαν σε δείγμα νωπό (wet weight), συνυπολογίζοντας και το ποσοστό υγρασίας του κάθε δείγματος.

Οι τελικές συγκεντρώσεις για τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) δίνονται στον Πίνακα 12 και για τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (OCPs) στον Πίνακα 13.

Πίνακας 12: Οι τελικές συγκεντρώσεις (μg/kg) των αναλυτών για PAHs, σε δείγματα με υπολογισμένη την υγρασία (ww)

	συγκέντρωση αναλυτών σε (μg/kg)																		
αναλύτης	bsb1	bsb2	bsb3	bsb4	bsb5	bsb6	bsb7	bsb8	bsb9	bsb10	bsb11	bsb12	bsb13	bsb14	bsb15	bsb16	bsb17	bsb18	bsb19
naphthalene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.1	<LOD	<LOD	5.9	2.0	49	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	9.1	18	<LOD	<LOD
acenaphthylene	<LOD	<LOD	0.52	<LOD	<LOD	0.26	<LOD	0.50	0.27	<LOD	<LOD	<LOD	0.28	<LOD	<LOD	0.34	0.27	<LOD	<LOD
acenaphthene	<LOD	0.42	0.59	<LOD	0.26	<LOD	<LOD	<LOD	0.29	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.33	0.34	<LOD	<LOD	<LOD
fluorene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.73	0.75	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.78	0.75	0.70	<LOD	<LOD
phenanthrene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.60	0.41	<LOD	0.74	<LOD	1.3	<LOD	1.2	<LOD	0.73	<LOD	<LOD
anthracene	<LOD	0.49	1.9	<LOD	<LOD	0.19	<LOD	0.34	0.26	<LOD	<LOD	<LOD	0.19	<LOD	0.21	0.21	<LOD	<LOD	<LOD
fluoranthene	<LOD	<LOD	0.79	0.46	<LOD	0.45	<LOD	0.57	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.52	<LOD	0.45	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
pyrene	0.19	0.26	1.6	0.35	0.19	0.54	0.21	0.43	0.32	<LOD	0.21	0.26	0.26	0.19	0.31	0.21	0.19	16	7
benzo(a)anthracene	<LOD	<LOD	0.31	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
chrysene	<LOD	0.28	0.59	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
benzo(b)fluoranthene	0.18	<LOD	0.24	<LOD	<LOD	0.18	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
benzo(k)fluoranthene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.28	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
benzo(a)Pyrene	<LOD	<LOD	0.28	0.32	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
indeno(1,2,3-c,d)pyrene	0.13	<LOD	0.17	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
dibenzo(a,h)anthracene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
benzo(g,h,i) perylene	<LOD	<LOD	0.28	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.27	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

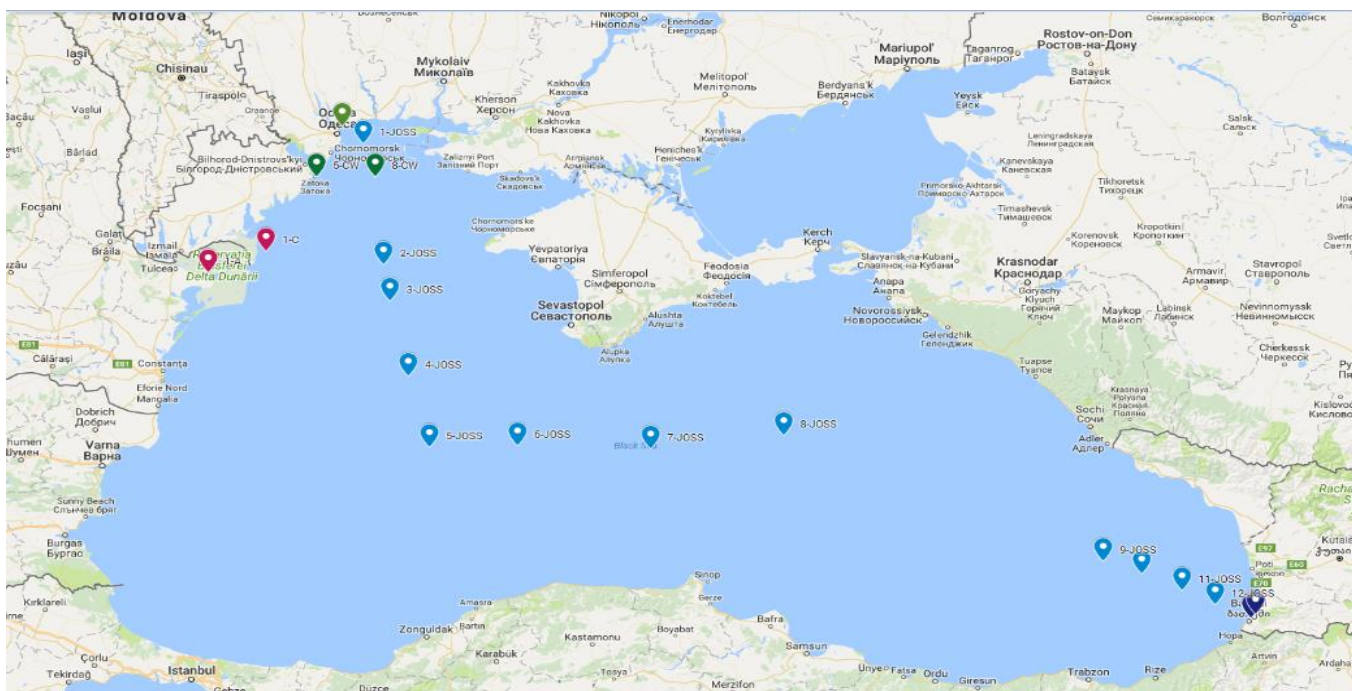
Πίνακας 13: Οι τελικές συγκεντρώσεις (µg/kg) των αναλυτών για OCPs, σε δείγματα με υπολογισμένη την υγρασία (ww)

	συγκέντρωση αναλυτών σε (µg/kg)																		
compound	bsb1	bsb2	bsb3	bsb4	bsb5	bsb6	bsb7	bsb8	bsb9	bsb10	bsb11	bsb12	bsb13	bsb14	bsb15	bsb16	bsb17	bsb18	bsb19
Hexachlorobutadiene	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Dichlorvos	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
alpha-HCH	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.28	0.19	<LOD	<LOD	<LOD	0.19	<LOD	0.20	0.19	<LOD	<LOD	<LOD
Hexachlorobenzene	<LOD	0.10	<LOD	0.10	<LOD	0.10	<LOD	0.57	0.46	<LOD	<LOD	0.16	0.53	<LOD	0.34	0.12	0.12	7.5	<LOD
Beta-HCH	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.6	<LOD	<LOD	2.5	3.3	<LOD	3.1	4.0	<LOD	<LOD	<LOD
Lindane	<LOD	0.61	<LOD	1.6	<LOD	1.6	<LOD	7.4	2.1	<LOD	<LOD	2.1	1.2	<LOD	4.1	1.2	1.3	<LOD	<LOD
delta-HCH	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Heptachlor	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.01	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Aldrin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.98	0.96	0.65	0.69	0.61	1.1	0.57	0.57	1.0	0.56	<LOD	<LOD
Dicofol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Isodrin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Alpha-Endosulfan	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4,4'-DDE	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.3	<LOD	2.0	1.7	<LOD	<LOD	<LOD	1.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4.2	2.6
Dieldrin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Endrin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4,4'-DDD & 2,4'-DDT	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.4	<LOD	5.3	3.4	<LOD	<LOD	<LOD	1.5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Endosulfan-sulfate	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4,4'-DDT	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.68	<LOD	0.62	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	18	2.0

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

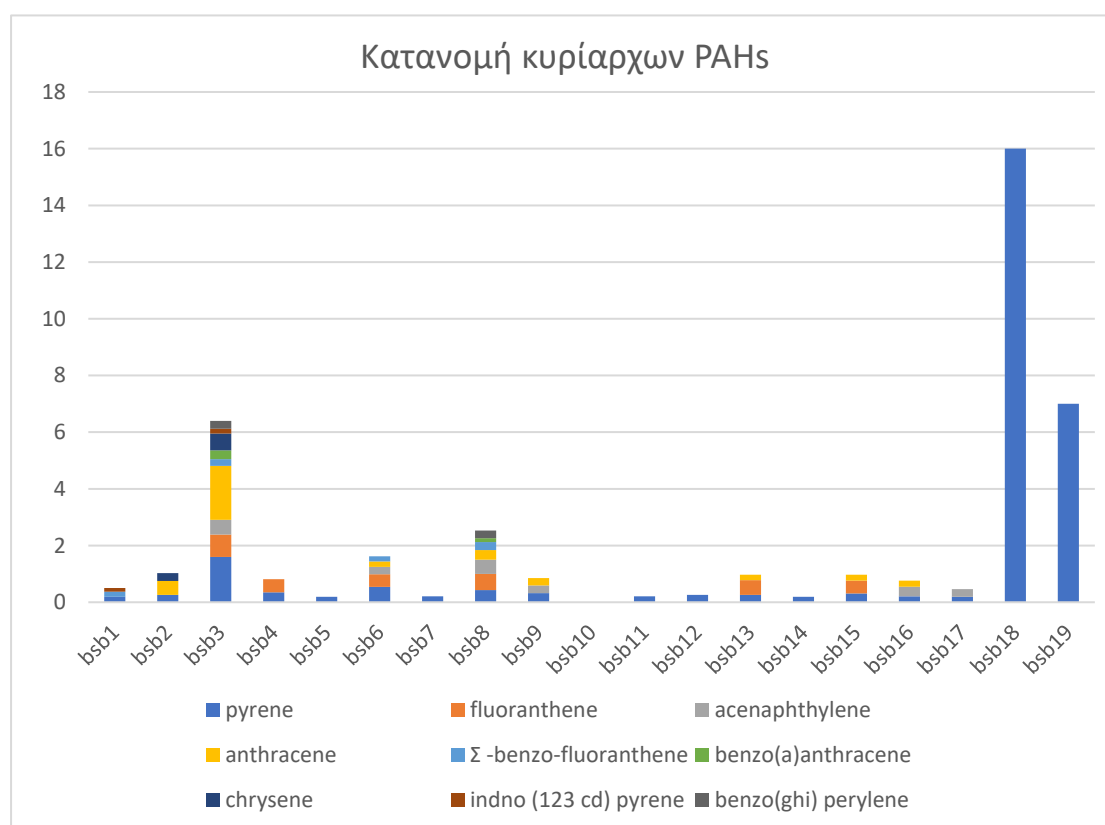
Η ολοένα και μεγαλύτερη παρουσία των θαλασσινών και ιχθύων στις διατροφικές μας συνήθειες σε συνδυασμό με τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες που επηρεάζουν την ποιότητα του υδάτινου περιβάλλοντος, έχουν κινητοποιήσει τις περιβαλλοντικές αρχές για την επιβολή ορίων στις εκπομπές επιβλαβών ουσιών. Οι θαλάσσιοι οργανισμοί αποτελούν ένα από τα βασικά κριτήρια αξιολόγησης της κατάστασης ενός υδάτινου οικοσυστήματος. Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της μεθόδου που αναπτύχθηκε για τη μελέτη 19 δειγμάτων θαλάσσιων οργανισμών από τη Μαύρη Θάλασσα. Σκοπός ήταν ο προσδιορισμός ρύπων προτεραιότητας, από τους οποίους προέκυψαν κάποια ενδιαφέροντα συμπεράσματα.

Οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα είχαν διακυμάνσεις, οι οποίες σχετίζονται τόσο με τον ιστό που αναλύθηκε (ολόκληρο το ψάρι ή μόνο μυϊκός ιστός) αλλά με και το ποσοστό του λίπους του δείγματος. Μια ακόμη ενδιαφέρουσα παρατήρηση, είναι η διακύμανση των συγκεντρώσεων ανάλογα με το σημείο δειγματοληψίας. Στην Εικόνα 9 φαίνονται τα σημεία από τα οποία ανακτήθηκαν τα υπό μελέτη δείγματα.



Εικόνα 10: Σημεία δειγματοληψίας των δειγμάτων

Αξίζει να επισημάνουμε ότι στην πλειοψηφία των δειγμάτων βρέθηκαν πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, σε ποικίλες συγκεντρώσεις. Το pyrene φαίνεται να έχει την κυρίαρχη θέση, καθώς εμφανίζεται έντονα σε όλα τα δείγματα, ενώ ακολουθούν fluoranthene και anthracene, με έντονη παρουσία στην πλειοψηφία των δειγμάτων που αναλύθηκαν, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί (σχήμα 3).

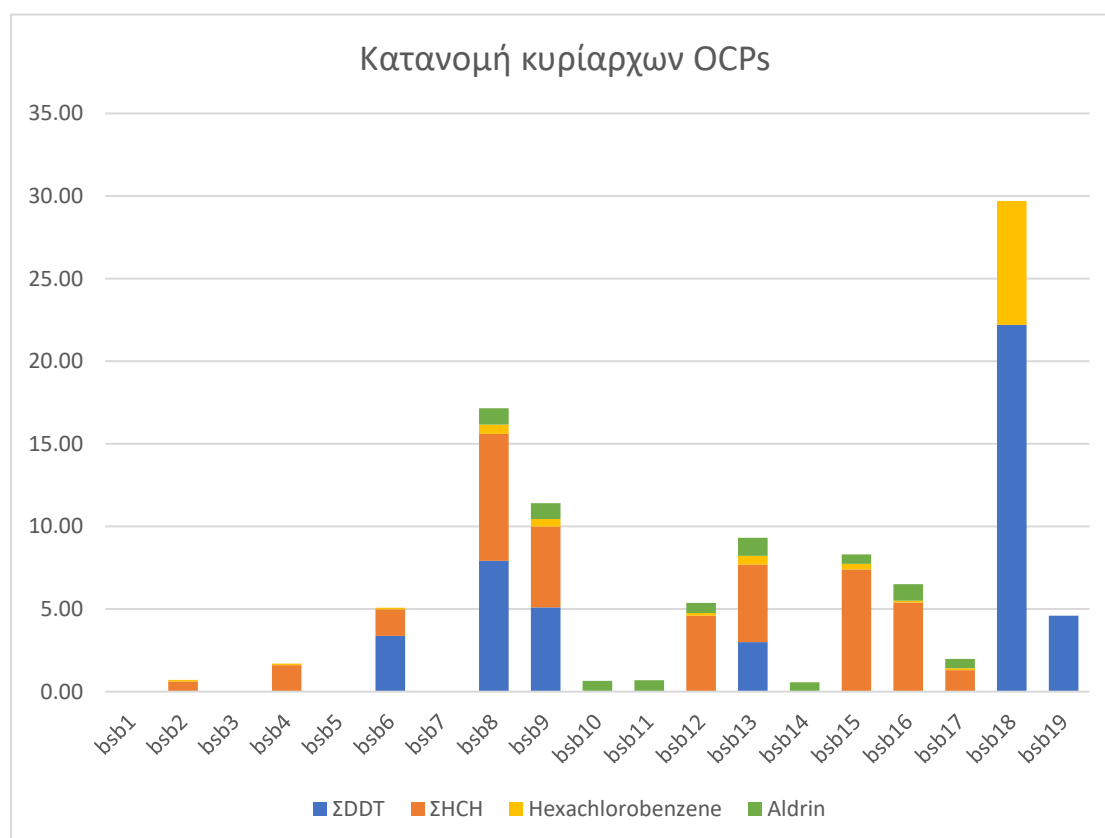


Σχήμα 3: Κατανομή των πιο διαδεδομένων οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων στα δείγματα που εξετάστηκαν

Από το Σχήμα 3, το δείγμα BSB3 δείχνει να έχει τη μεγαλύτερη επιβάρυνση σε αρκετούς πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Πρόκειται για δείγμα του οργανισμού *Rapana thomasiana* από την θαλάσσια περιοχή της Γεωργίας κοντά στο λιμάνι του Batumi.

Τα BSB18 και 19 είναι δείγματα από νεκρό δελφίνι, από την περιοχή της Ουκρανίας. Τα δυο αυτά δείγματα, αποτελούν ιδιαίτερη περίπτωση, καθώς ο οργανισμός ήταν ήδη νεκρός όταν πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, γεγονός που προκάλεσε αρκετές δυσκολίες στον προσδιορισμό των αναλυτών. Ωστόσο, είναι χαρακτηριστικό ότι το δείγμα BSB18 έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε pyrene ($16\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) αλλά και σε DDT, με τη συγκέντρωσή του να φτάνει τα 18 ($16\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Σε ό,τι αφορά τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις, οι ομάδα του DDT και των παραγώγων – μεταβολιτών του (DDD και DDE) έχουν την κυρίαρχη θέση, έχοντας τις υψηλότερες αθροιστικά συγκεντρώσεις, ενώ δε λείπουν τα ισομερή του α- / β- και δ – HCH καθώς και το Aldrin, όπως φαίνεται και στο παρακάτω ιστόγραμμα (σχήμα 4).



Σχήμα 4: Κατανομή των πιο διαδεδομένων οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων στα δείγματα που εξετάστηκαν

Αξίζει να σημειωθεί ότι, στα ζεύγη δειγμάτων BSB 4 και 5, BSB 6 και 7 και BSB 8 και 9, τα BSB 4,6, 8 είναι δείγμα ολόκληρου ιχθύος ενώ τα BSB5, 7, 9 είναι μυϊκός ιστός του ίδιου οργανισμού. Από τα ιστογράμματα των Σχημάτων 3 και 4 βλέπουμε ότι στα δείγματα ολόκληρου ιχθύος ανιχνεύθηκαν περισσότεροι αναλύτες και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απ' ότι στον μυϊκό ιστό. Γεγονός που συμφωνεί απόλυτα με τη συμπεριφορά των αναλυτών που εξετάζουμε. Όπως είναι γνωστό, οι εν λόγω ενώσεις, τείνουν να συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό των οργανισμών, λόγω των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Έτσι, τα δείγματα ολόκληρου ιχθύος, που περιλαμβάνουν τόσο τη σάρκα όσο και όλα τα όργανά του, παρουσιάζουν, όπως αναμενόταν, έντονη διαφοροποίηση από τα δείγματα μυϊκού ιστού.

Παρ' όλο που οι συγκεντρώσεις των αναλυτών δεν βρίσκονται σε ανησυχητικά επίπεδα, προβληματισμό δημιουργεί η έντονη παρουσία παρασιτοκτόνων όπως το DDT και το Aldrin, η δυσμενής δράση των οποίων είναι γνωστή εδώ και δεκαετίες. Επιπλέον, η παρουσία πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στους θαλάσσιους οργανισμούς που μελετήσαμε, δεν μπορεί να αγνοηθεί. Από τον πίνακα των προτύπων ποιότητας για το περιβάλλον [11], βλέπουμε ότι οι αναλύτες που έχουν ανιχνευθεί είναι κάτω από τα όρια που τίθενται για τους ζώντες οργανισμούς. Ωστόσο, παρατηρούμε ότι υπάρχουν ακόμα πολλά κενά στα όρια των ουσιών προτεραιότητας, σε ό,τι αφορά τους υδρόβιους οργανισμούς. Αναλυτικά, ο πίνακας των ΠΠΠ δίνεται στο Παράρτημα II.

Από τα παραπάνω, καθίσταται σαφές, ότι υπάρχουν ακόμα περιθώρια βελτίωσης των ΠΠΠ και επιβολής ορίων στους ζώντες οργανισμούς, για όσες από τις ουσίες προτεραιότητας δεν έχουν καθιερωθεί ακόμη. Καθώς επίσης και ότι η περιοχή της Μαύρης Θάλασσας, λόγω των εμπορικών, αλιευτικών και αστικών δραστηριοτήτων που λαμβάνουν χώρα, είναι μια περιοχή η οποία χρήζει συνεχούς παρακολούθησης.

Η ανάγκη για κατάλληλες μεθόδους προσδιορισμού αναδυόμενων ρύπων και ρύπων προτεραιότητας, σε θαλάσσιους οργανισμούς, γίνεται ολοένα και μεγαλύτερη.

Οι λίστες των επιβλαβών ουσιών και των εν δυνάμει/ αναδυόμενων ρύπων συνεχώς εμπλουτίζονται και ο ικανοποιητικός προσδιορισμός τους σε θαλάσσιους και άλλους υδρόβιους οργανισμούς, αποτελεί ένα από τα βασικά κριτήρια ποιότητας των υδάτινων οικοσυστημάτων. Ταυτόχρονα, εγείρεται και μια νέα πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα, για την επίτευξη βέλτιστων χαρακτηριστικών επίδοσης και χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης των εν λόγω ρύπων.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 14: Συντμήσεις και η ανάπτυξή τους

AcCN	Acetonitrile
BS SAPIR	Black Sea Strategic Action Plan for the Rehabilitation
BSC	Black Sea Convention
BSIMAP	Black Sea Integrated Monitoring And Assessment Program
CI	Chemical Ionization
COMMPS	combined monitoring-based and modeling-based priority setting
CRM	certified reference material
DCM	Dichloro Methane
DDD	Dichlorodiphenyldichloroethane
DDE	Dichlorodiphenyldichloroethylene
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
ECD	Electron Capture Detector
EEA	European Environment Agency
EI	Electron Impact
EQS	Environment Quality Standards
EthAc	Ethyl Acetate
FAB MS	Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatography
GC – ECD	gas chromatography-electron capture detection
GC – EI – QQQ	Gas Chromatography coupled with Electron Impact triple-Quadrupole Mass Spectrometry
GC – EI – ToFMS	Gas Chromatography coupled with Electron Impact Time of Flight Mass Spectrometry
GC - ITD	Gas Chromatography - Ion trap detector
GC – MS	Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
GC – MS/MS	Gas Chromatography coupled with tandem Mass Spectrometry
GC - Q - MS	Gas Chromatography coupled to Quadrupole Mass Spectrometry

GPC	Gel permeation chromatography
HCB	Hexachlorobenzene
HRGC	High Resolution Gas Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
I.S.	Internal Standard
IDL	Instrumental Detection Limit
IQL	Instrumental Quantitation Limit
LE	Liquid Extraction
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantitation
LSE	Liquid - Solid Extraction
MDL	Method Detection Limit
ME	Matrix Effect
MF	Matrix Factor
MQL	Method Quantitation Limit
MS	Mass Spectrometry
MSFD	Marine Strategy Framework Directive
OCPs	Organochlorine pesticides
OPPs	Organophosphoric pesticides
PAHs	Polycyclic aromatic compounds
PCBs	Polychlorinated Biphenyls
POPs	Persistent Organic Pollutants
PTV	Programmed Temperature Vaporizer
Q - ToF MS	Quadrupole tandem Time of Flight Mass Spectrometry
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RC	Regenerated Cellulose
RSD	Relative Standard Deviation
Rt	Retention Time
SD	Standard Deviation
SIM	Single Ion Monitoring
SLE	Solid - Liquid Extraction

SPE	Solid Phase Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
TCD	Thermal Conductivity Detector
TPP	Triphenyl Phosphate
UNEP	United Environment Program
UV	Ultra Violet
WFD	Water Framework Directive
ΠΠΠ	Πρότυπα Ποιότητας Περιβάλλοντος

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πίνακας 15: Η μέθοδος SRM, όπως εφαρμόστηκε στο σύστημα GC – EI – QQQ για την ταυτοποίηση των αναλυτών.

Class	Compound	Rt _{exp}	Rt tolerance	Parent Ion	Product Ion	Coll. Energy (V)	Ion Ratio	(+/-) Ion Ratio %
PAHs - IS	Naphthalene-d8	8.78	0.20	138.8	135.4	10.0		30.0
					108.6	20.0	0.384	
					107.7	20.0	0.381	
PAHs	naphthalene	8.82	0.20	128.0	127.0	15.0		30.0
					102.0	20.0	0.808	
OCPs	Hexachlorobutadiene	9.06	0.20	226.5	191.8	20.0		30.0
				189.8	117.7	30.0	0.865	
				189.8	154.7	10.0	1.309	
OCPs	Dichlorvos	9.31	0.20	185.0	93.0	10.0		30.0
					63.0	15.0	0.314	
					109.0	20.0	0.219	
PAHs - IS	Acenaphthylene-d8	11.37	0.20	159.7	132.6	40.0		30.0
					131.5	40.0	0.948	
					157.7	40.0	0.865	
PAHs	acenaphthylene	11.40	0.20	152.0	151.0	35.0		30.0
					150.0	35.0	0.874	
PAHs - IS	Acenaphthene-d10	11.64	0.20	164.0	159.8	40.0		30.0
				162.0	160.5	40.0	0.560	
				164.0	160.8	40.0	0.926	
PAHs	acenaphthene	11.69	0.20	154.0	152.0			30.0
				153.0	152.0	35.0	0.686	
PAHs - IS	Fluorene-d10	12.59	0.20	176.0	173.7	20.0		30.0
					174.7	20.0	1.053	
					172.4	20.0	0.085	
PAHs	fluorene	12.65	0.20	166.0	164.5	30.0		30.0
				165.0	163.5	30.0	0.550	
				166.0	165.0	40.0	0.429	
OCPs - IS	2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene	12.89	0.20	207.0	136.0	18.0		30.0
				242.0	207.0	15.0	0.518	
OCPs	alpha-HCH	13.71	0.20	181.0	145.0	15.0		30.0
				219.0	183.0	10.0	0.332	
				183.0	147.0	15.0	0.679	

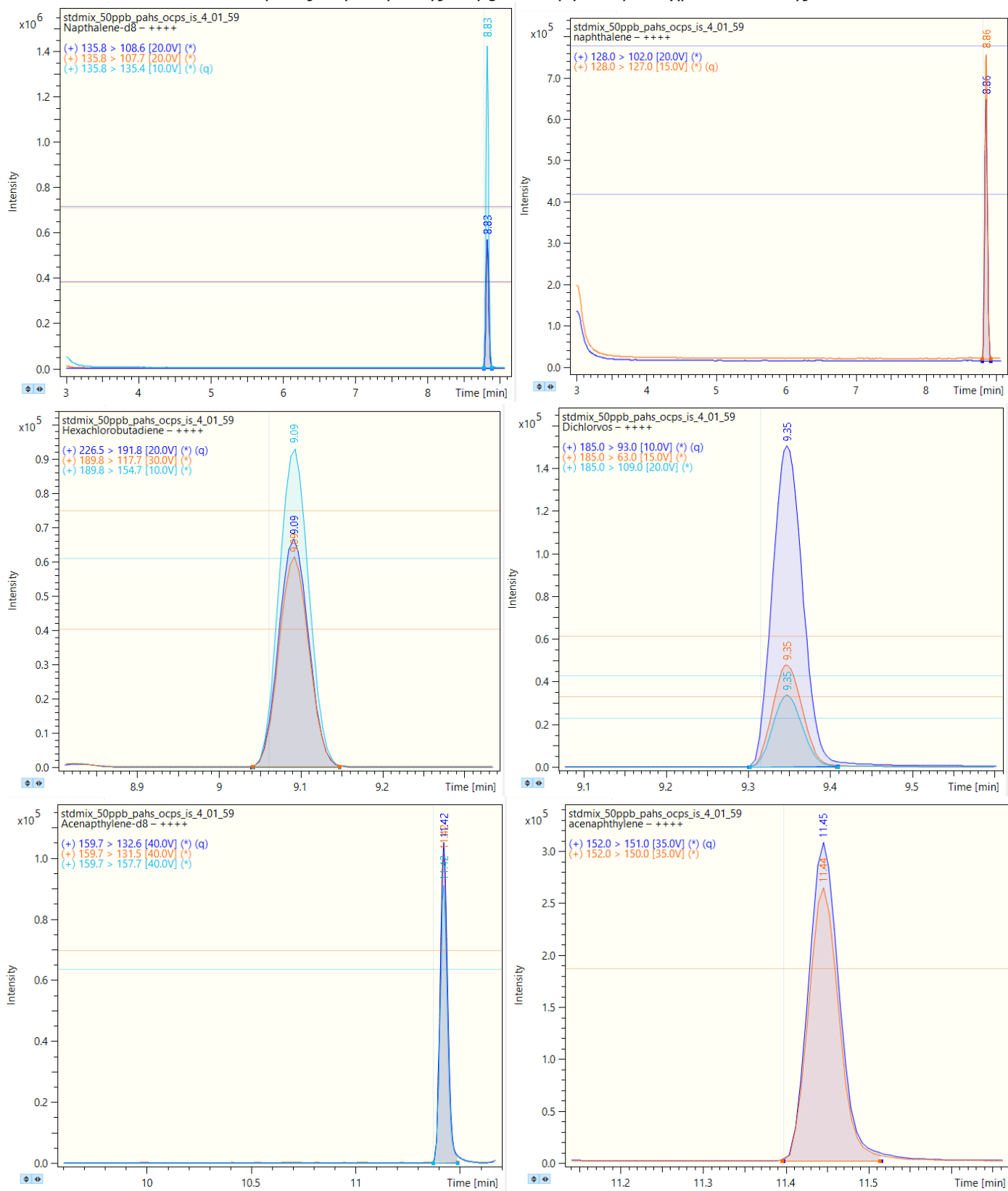
OCPs	Hexachlorobenzene	13.81	0.20	284.0	214.5	30.0		30.0
				282.0	212.0	30.0	0.891	
				282.0	247.0	20.0	0.782	
OCPs	Beta-HCH	14.23	0.20	181.0	145.0	15.0		30.0
				219.0	183.0	10.0	0.430	
				183.0	147.0	15.0	0.696	
OCPs	Lindane	14.41	0.20	181.0	145.0	15.0		30.0
				219.0	183.0	10.0	0.346	
				183.0	147.0	15.0	0.698	
PAHs - IS	Phenathrene-d10	14.71	0.20	187.6	159.7	30.0		30.0
					183.8	30.0	0.694	
PAHs	phenanthrene	14.77	0.20	178.0	152.0	30.0		30.0
					176.0	30.0	0.802	
PAHs - IS	anthracene-d10	14.85	0.20	187.8	160.1	30.0		30.0
					183.8	30.0	0.723	
PAHs	anthracene	14.90	0.20	178.0	152.0	30.0		30.0
					176.0	25.0	0.986	
OCPs	delta-HCH	15.01	0.20	181.0	145.0	15.0		30.0
				219.0	183.0	10.0	0.408	
				183.0	147.0	15.0	0.679	
OCPs	Heptachlor	16.06	0.20	272.0	237.0	18.0		30.0
				273.9	238.7	20.0	0.531	
				337.0	266.0	15.0	0.093	
OCPs	Aldrin	16.92	0.20	263.0	193.0	30.0		30.0
					228.0	20.0	0.494	
OCPs	Dicofol	17.20	0.20	139.0	111.5	10.0		30.0
					74.8	30.0	0.527	
					110.5	10.0	0.878	
OCPs	Isodrin	17.64	0.20	265.0	193.0	30.0		30.0
					230.0	20.0	0.377	
PAHs - IS	Fluoranthene-d10	18.06	0.20	212.0	207.8	35.0		30.0
					208.8	35.0	0.968	
					209.9	35.0	0.471	
PAHs	fluoranthene	18.11	0.20	202.0	201.0	20.0		30.0
					200.0	35.0	0.711	
					152.0	32.0	0.174	
PAHs - IS	Pyrene-d10	18.72	0.20	212.0	208.7	40.0		30.0
					210.2	40.0	0.507	

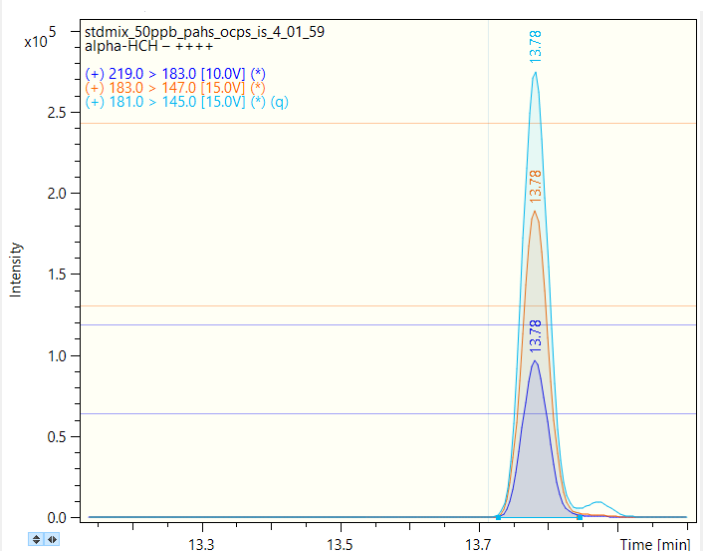
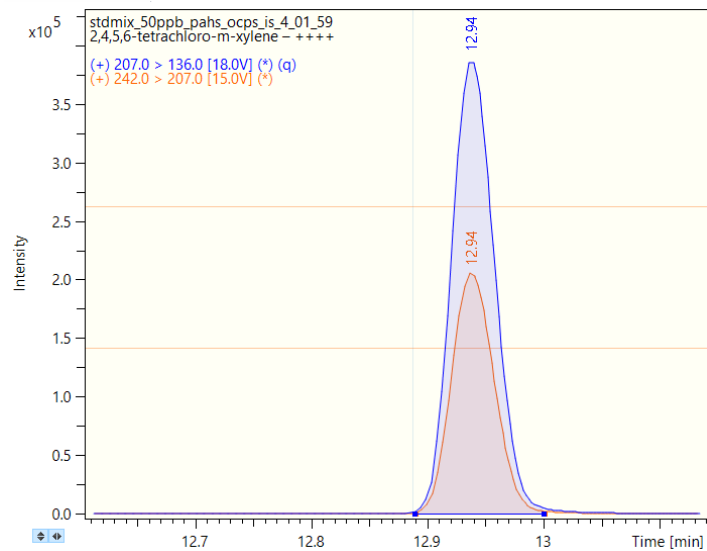
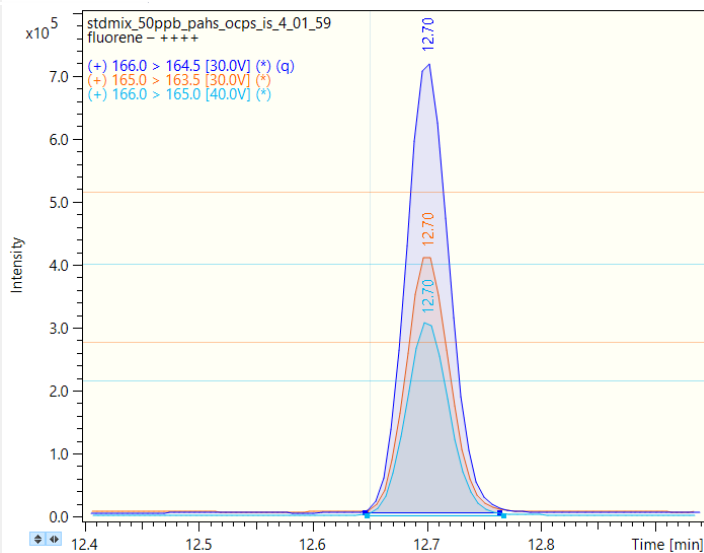
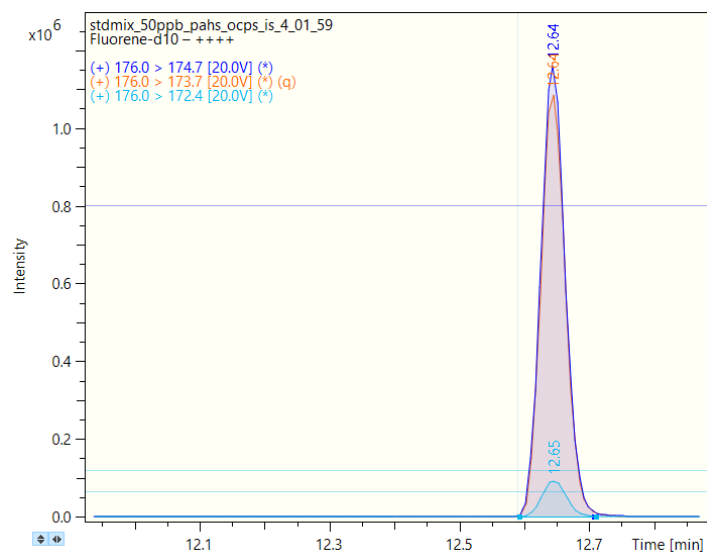
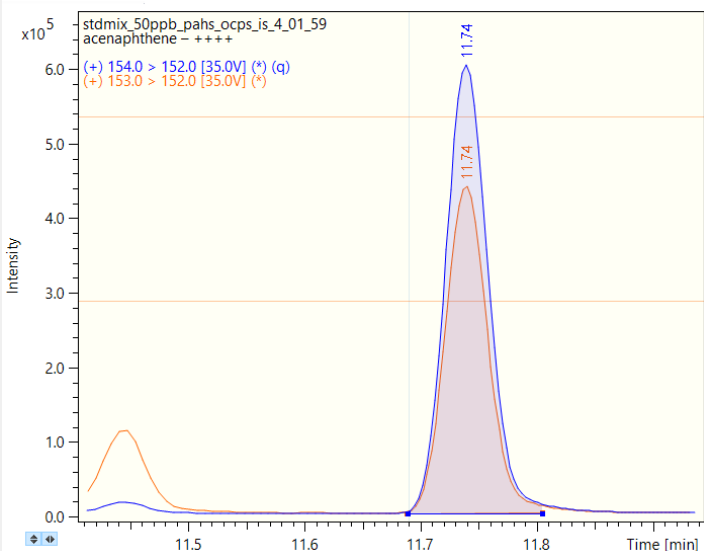
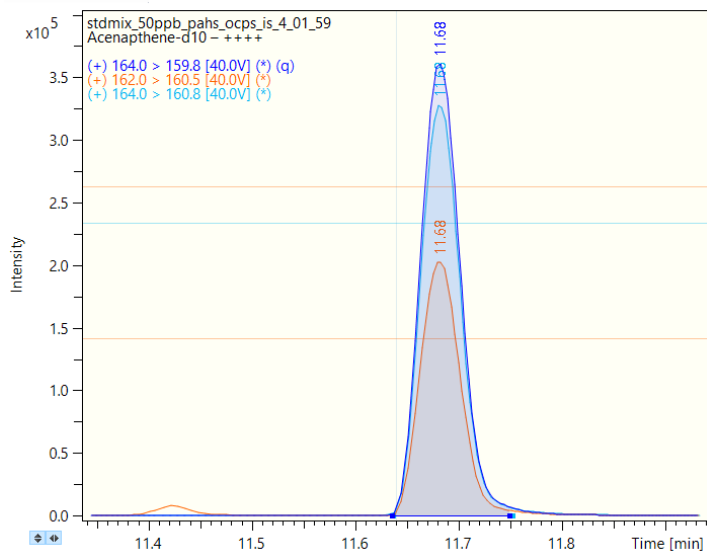
PAHs	pyrene	18.78	0.20	202.0	201.0	30.0		30.0
					200.0	40.0	0.817	
OCPs	Alpha-Endosulfan	18.82	0.20	241.0	206.0	15.0		30.0
					170.0	25.0	0.494	
				265.0	229.0	5.0	0.184	
OCPs	4,4'-DDE	19.39	0.20	246.0	176.0	25.0		30.0
				318.0	246.0	25.0	0.297	
				318.0	248.0	25.0	0.309	
OCPs	Dieldrin	19.51	0.20	263.0	193.0	35.0		30.0
				277.0	241.0	10.0	0.740	
				263.0	228.0	20.0	0.478	
OCPs	Endrin	20.05	0.20	263.0	193.0	35.0		30.0
				281.0	245.0	10.0	0.583	
				263.0	191.0	40.0	0.468	
OCPs	4,4'-DDD	20.49	0.20	235.0	165.0	20.0		30.0
					200.0	10.0	0.247	
				237.0	165.0	20.0	0.644	
OCPs	2,4'-DDT	20.55	0.20	235.0	165.0	20.0		30.0
					200.0	10.0	0.346	
				237.0	165.0	20.0	0.642	
OCPs	Endosulfan-sulfate	21.35	0.20	272.0	236.6	10.0		30.0
					237.4	10.0	1.086	
OCPs	4,4'-DDT	21.49	0.20	235.0	165.0	20.0		30.0
					200.0	10.0	0.245	
					199.0	15.0	0.216	
OCPs - IS	Triphenylphosphate(TPP)	21.96	0.20	325.0	169.0	20.0		30.0
					226.0	18.0	0.119	
					245.0	18.0	0.130	
PAHs - IS	Benzo(a)anthracene-d12	22.75	0.20	239.9	235.8	30.0		30.0
					236.7	30.0	0.994	
					212.3	30.0	0.207	
PAHs	benzo(a)anthracene	22.82	0.20	228.0	226.6	30.0		30.0
					225.4	30.0	0.663	
PAHs - IS	Chrysene-d12	22.85	0.20	240.0	236.7	30.0		30.0
					235.7	30.0	0.893	
PAHs	chrysene	22.93	0.20	228.0	226.1	40.0		30.0
					226.8	40.0	0.793	
					225.6	30.0	1.047	
PAHs - IS	Benzo(b)fluoranthene-d12	26.27	0.20	264.3	259.9	40.0		30.0
					260.7	40.0	1.048	
					232.2	40.0	0.176	

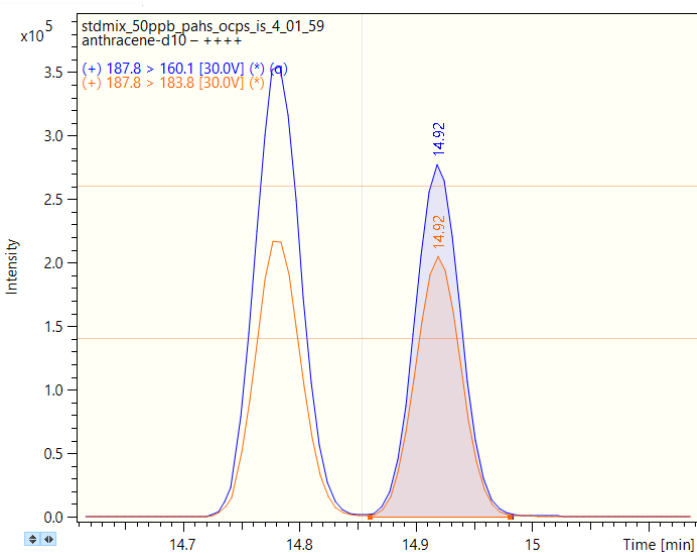
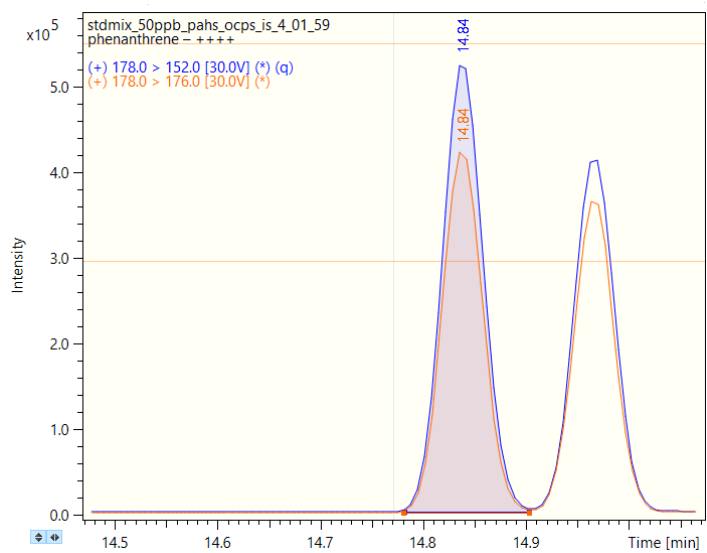
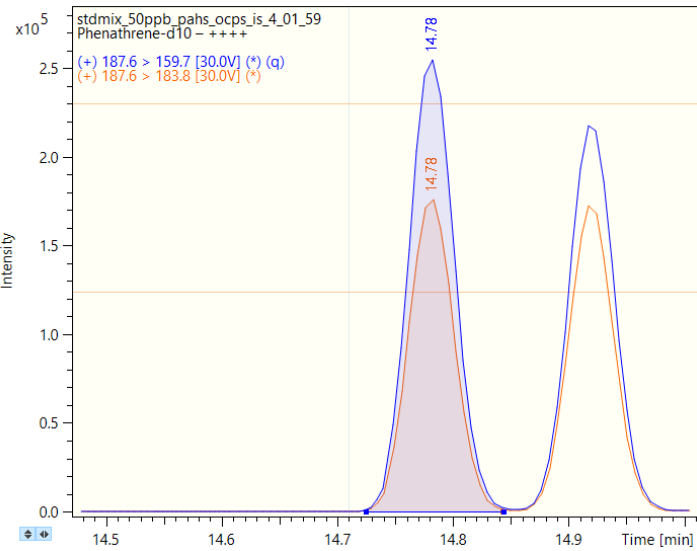
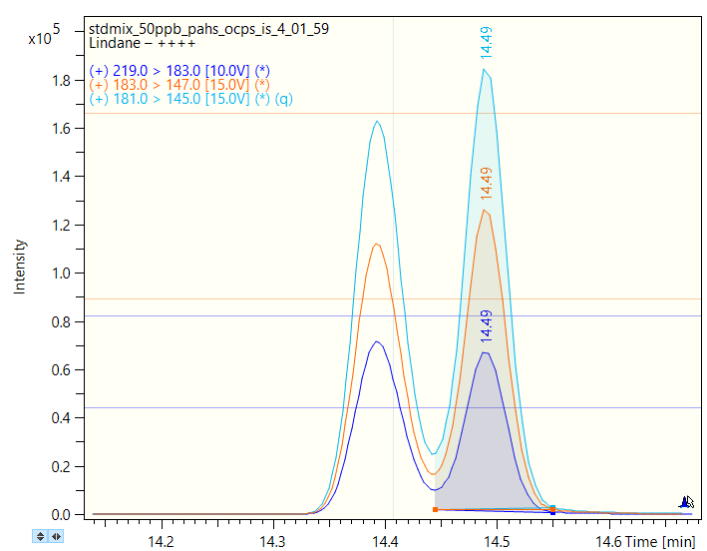
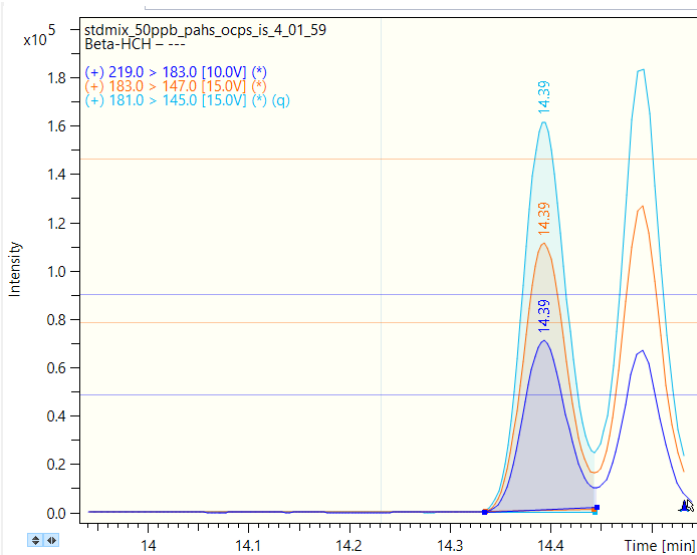
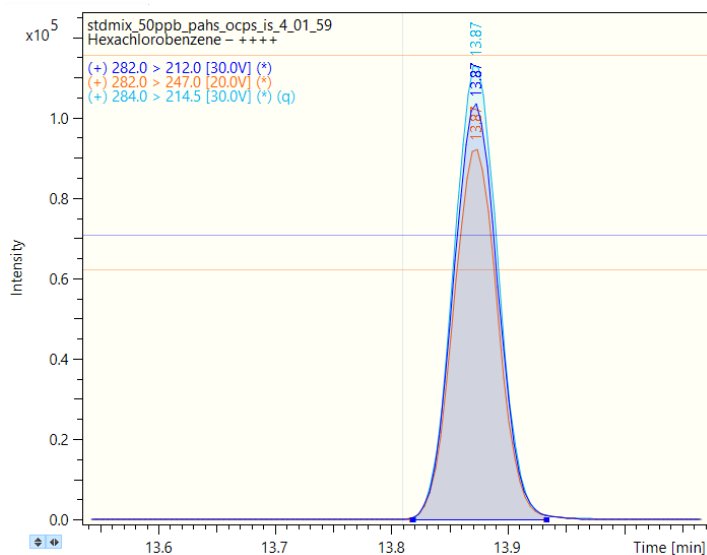
PAHs	benzo(b) fluoranthene	26.34	0.20	252.0	250.0	35.0		30.0
					248.0	60.0	0.347	
					249.0	45.0	0.411	
PAHs - IS	Benzo(k)fluoranthene-d12	26.36	0.20	264.3	260.7	40.0		30.0
					259.7	40.0	0.828	
PAHs	benzo(k) fluoranthene	26.43	0.20	252.0	250.0	35.0		30.0
					248.0	60.0	0.341	
					249.0	45.0	0.415	
PAHs - IS	Benzo(a)pyrene-d12	27.25	0.20	264.0	259.7	40.0		30.0
					261.7	40.0	0.113	
					234.3	60.0	0.183	
PAHs	benzo(a) Pyrene	27.33	0.20	252.0	250.0	35.0		30.0
					248.0	60.0	0.337	
OCPs - IS	PCB 209	27.36	0.20	497.7	427.7	25.0		30.0
				495.7	425.7	25.0	0.876	
PAHs - IS	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene-d12	31.80	0.20	288.0	288.0	30.0		30.0
					284.0	40.0	0.694	
					285.9	40.0	0.220	
PAHs	indeno (1,2,3-cd)pyrene	31.83	0.20	276.0	276.0	20.0		30.0
					274.0	40.0	0.475	
					275.0	22.0	0.420	
PAHs - IS	Dibenzo(a,h)anthracene-d14	31.91	0.20	292.0	288.6			30.0
					287.3	40.0	0.478	
					273.4	40.0	0.018	
PAHs	dibenzo(a,h)anthracene	32.06	0.20	278.0	278.0	15.0		30.0
					276.0	35.0	0.447	
PAHs - IS	Benzo(g,h,i)perylene-d12	32.79	0.20	288.0	284.5	50.0		30.0
					283.4	40.0	0.639	
PAHs	benzo(g,h,i) perylene	32.89	0.20	276.0	276.0	20.0		30.0
					274.0	40.0	0.139	
					272.0	68.0	0.254	

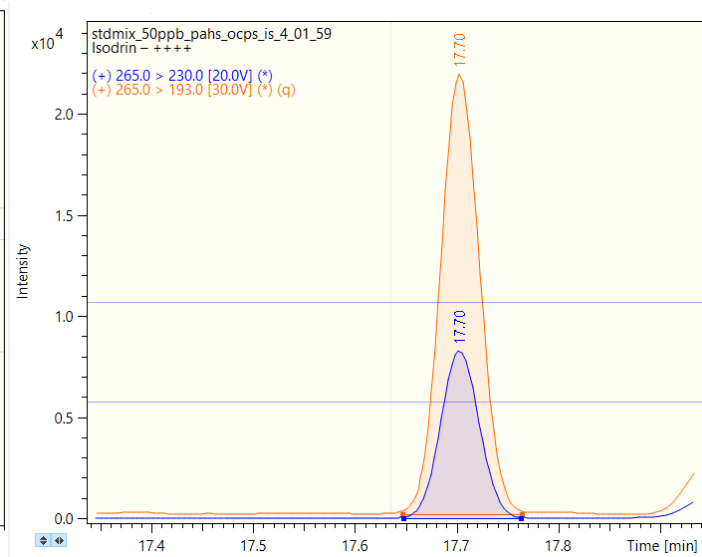
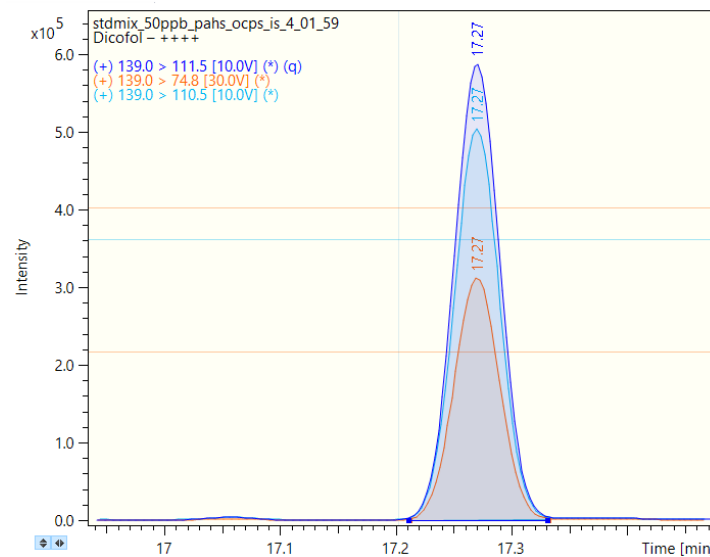
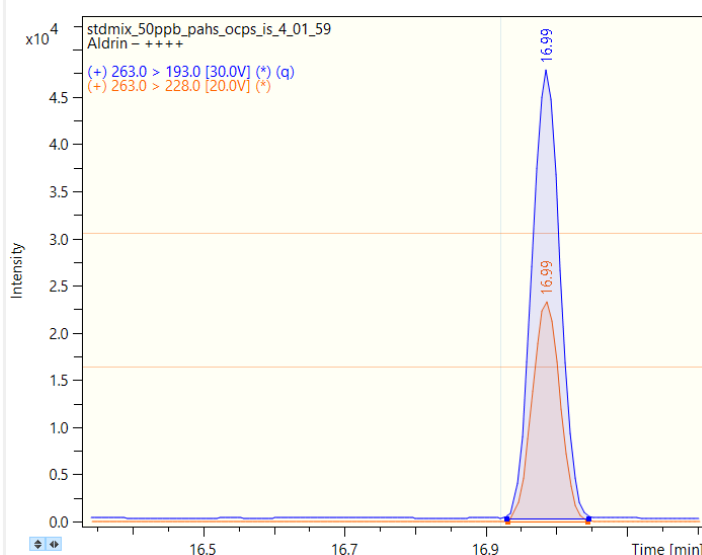
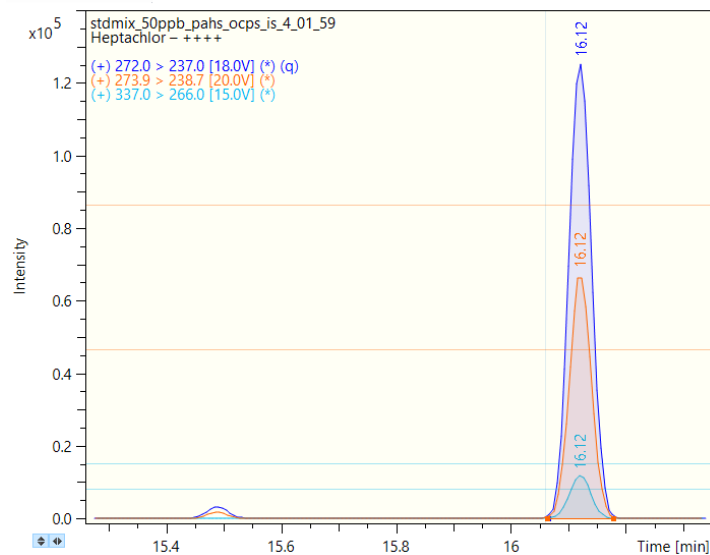
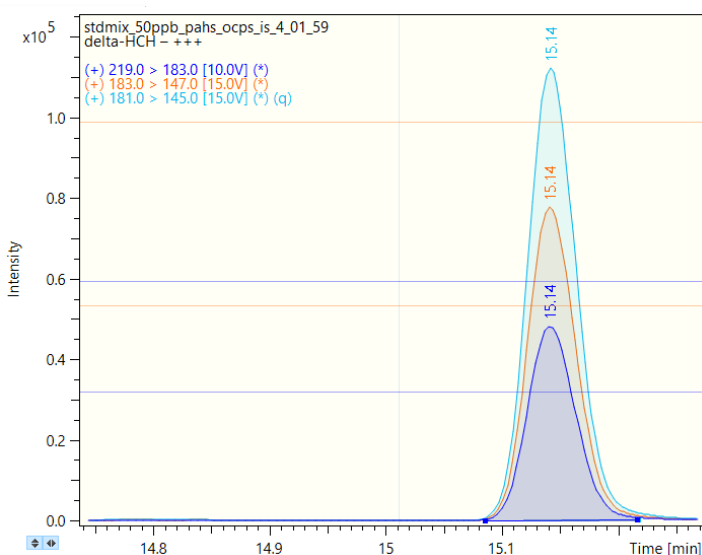
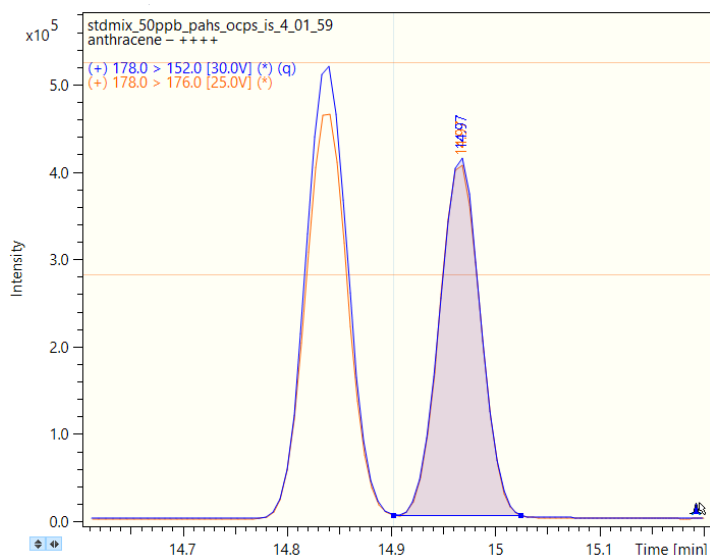
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

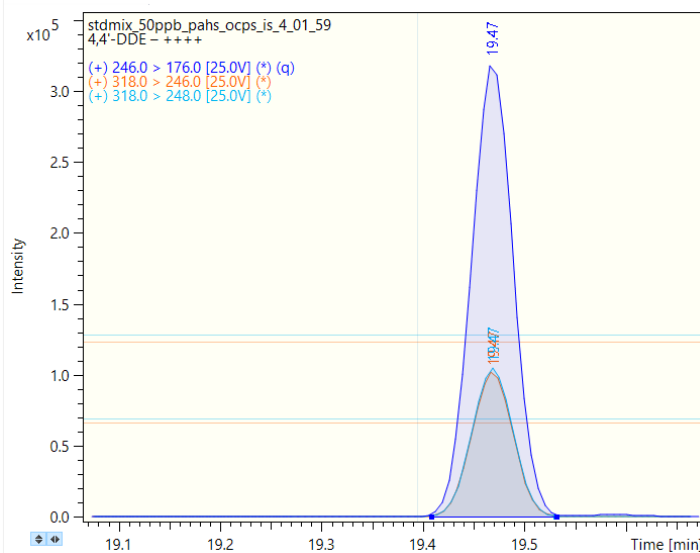
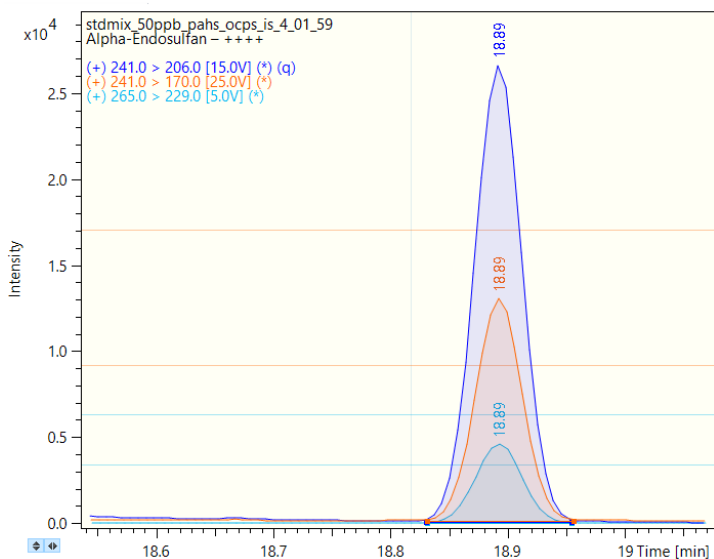
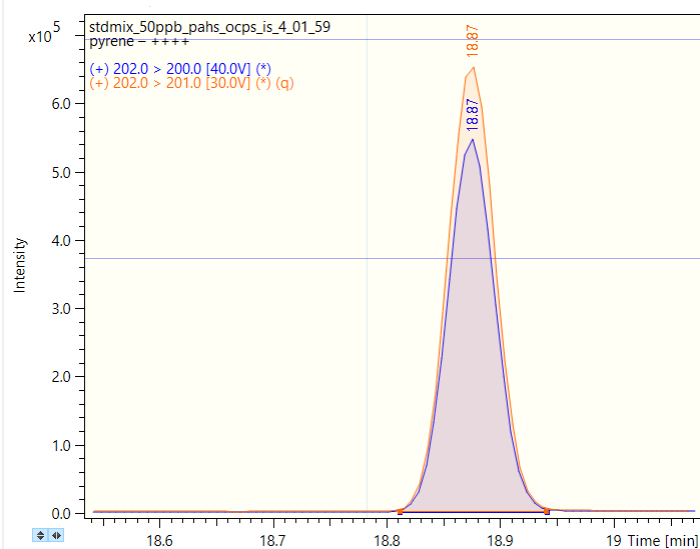
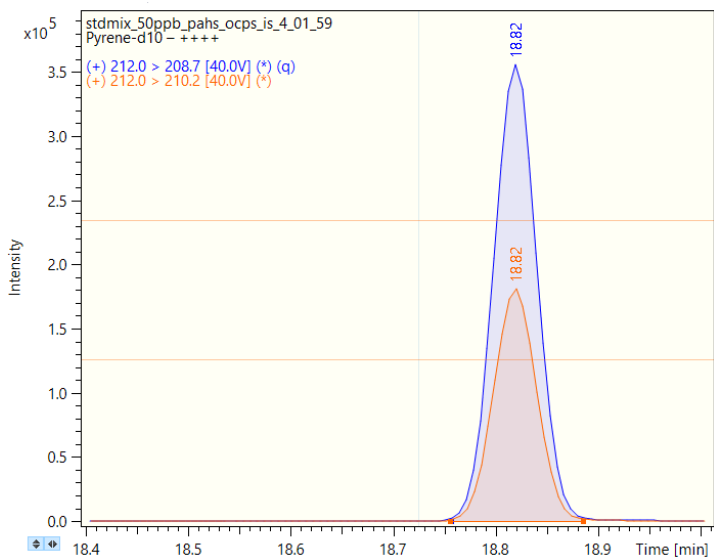
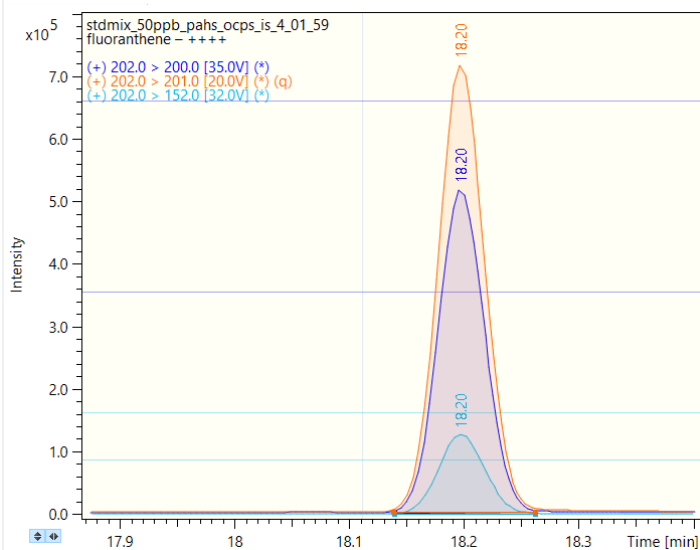
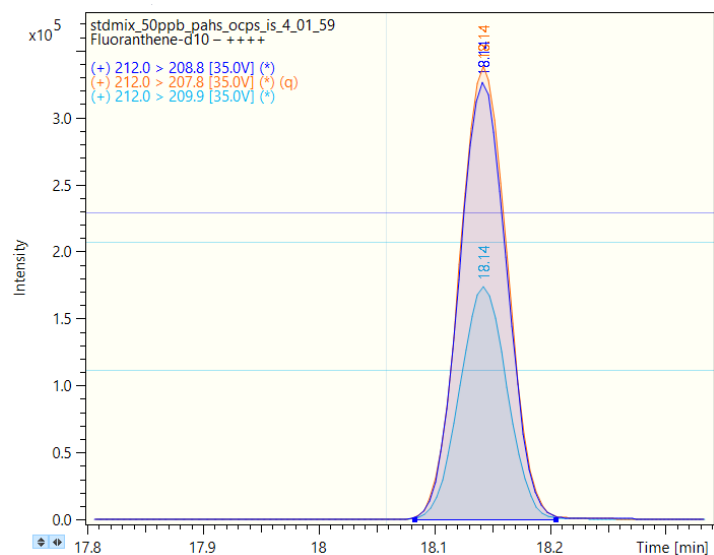
Χρωματογραφήματα όλων των αναλυτών, για το μίγμα προτύπων και εσωτερικών προτύπων, διαλύματος συγκέντρωσης $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, σύμφωνα με το χρόνο έκλουσης.

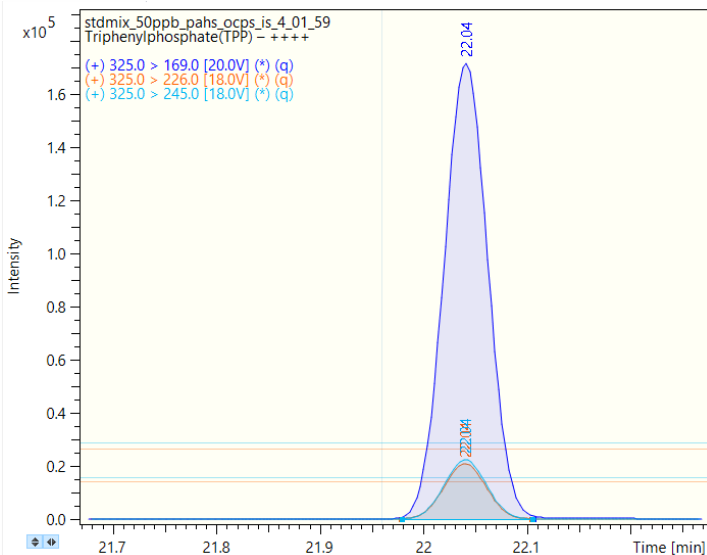
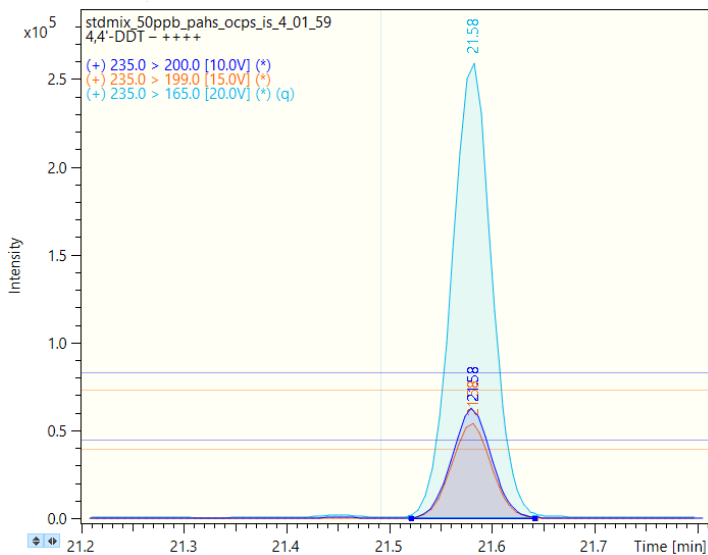
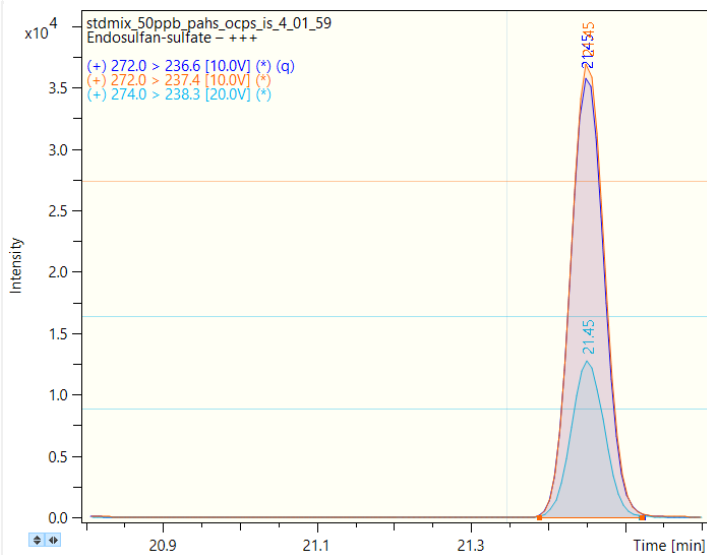
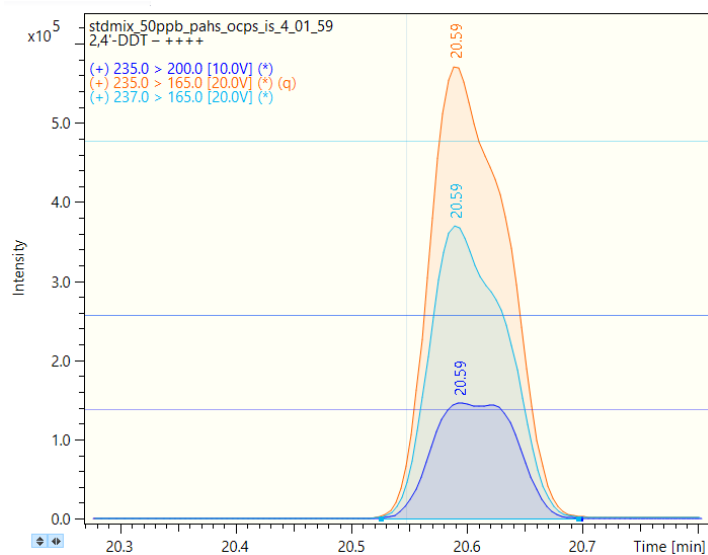
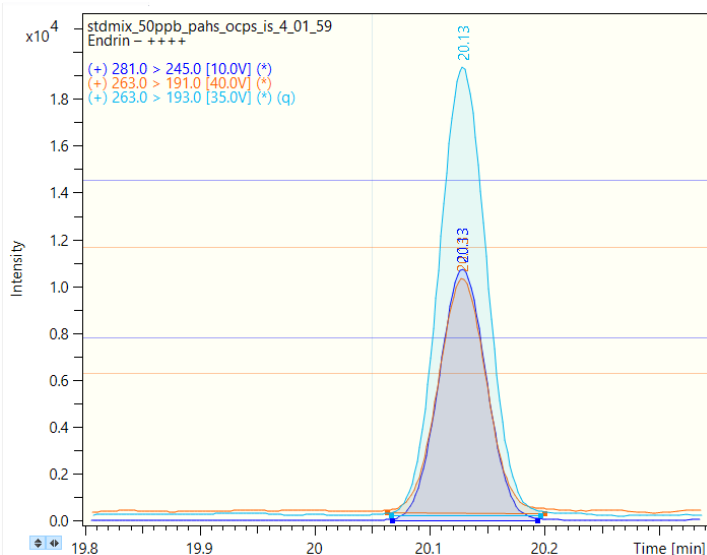
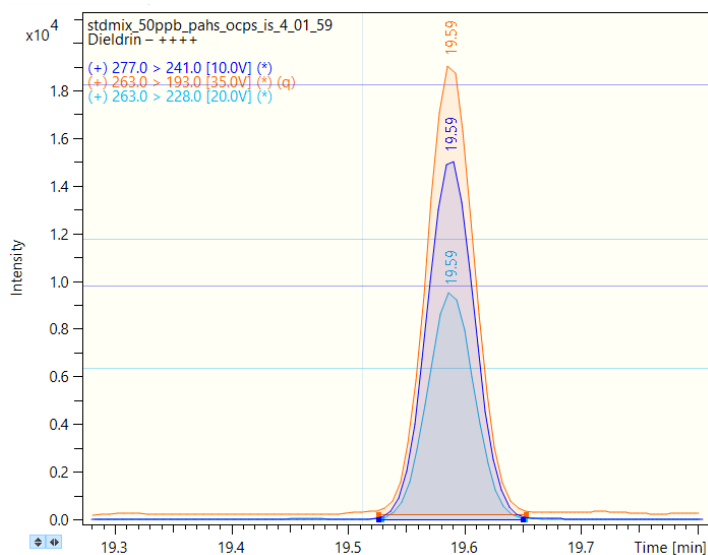


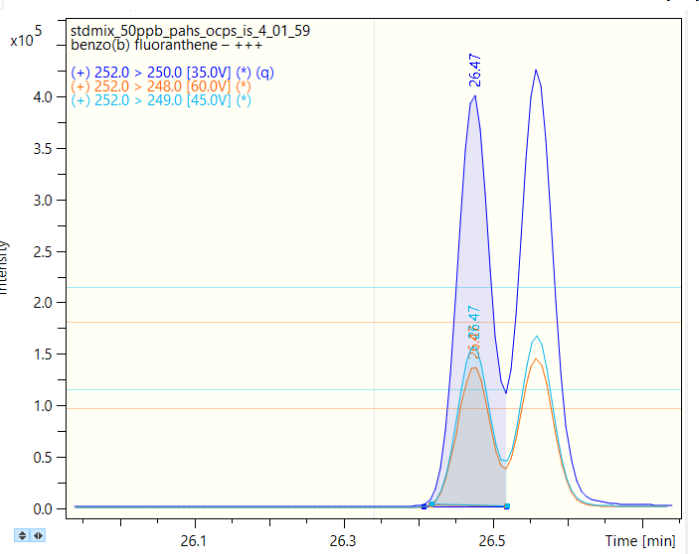
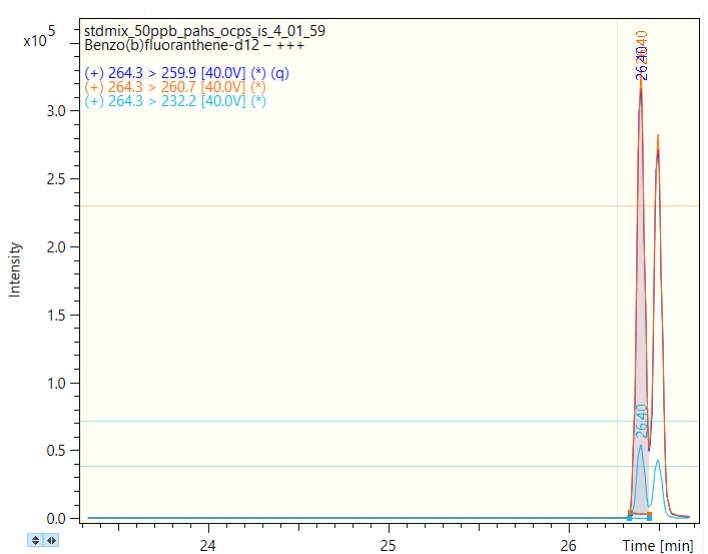
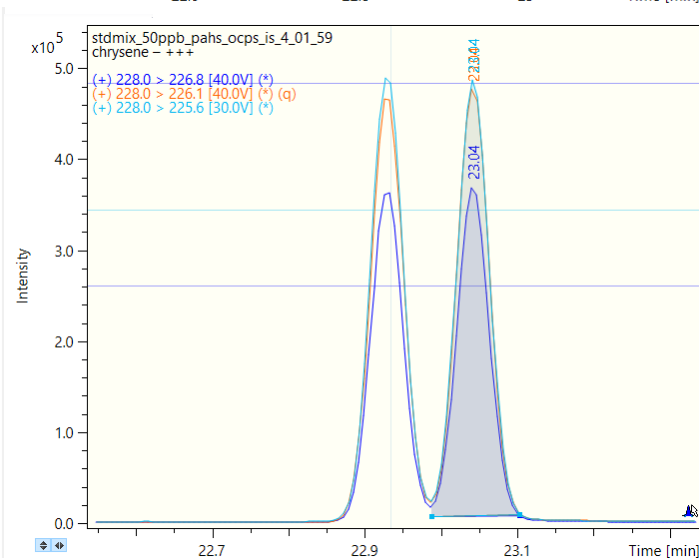
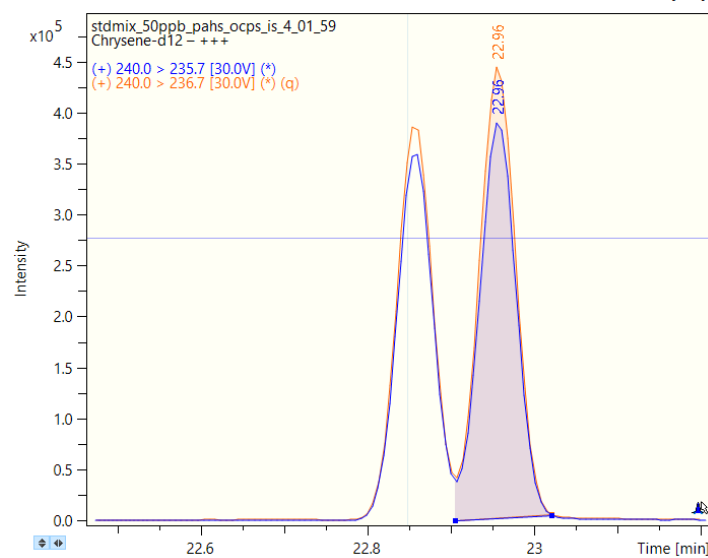
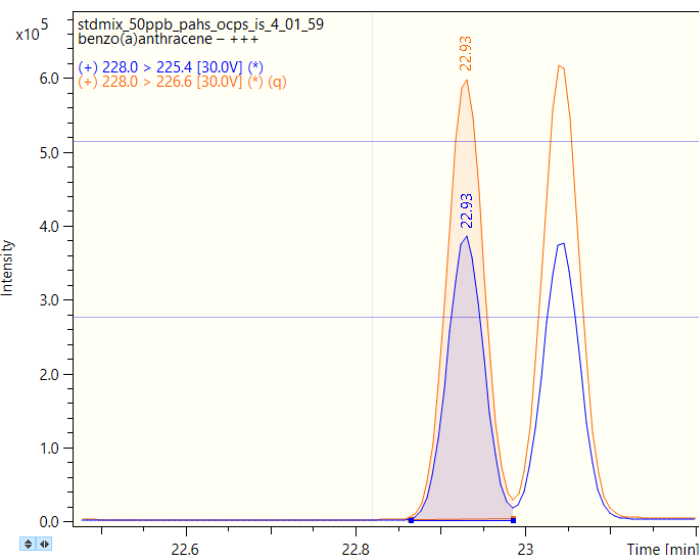
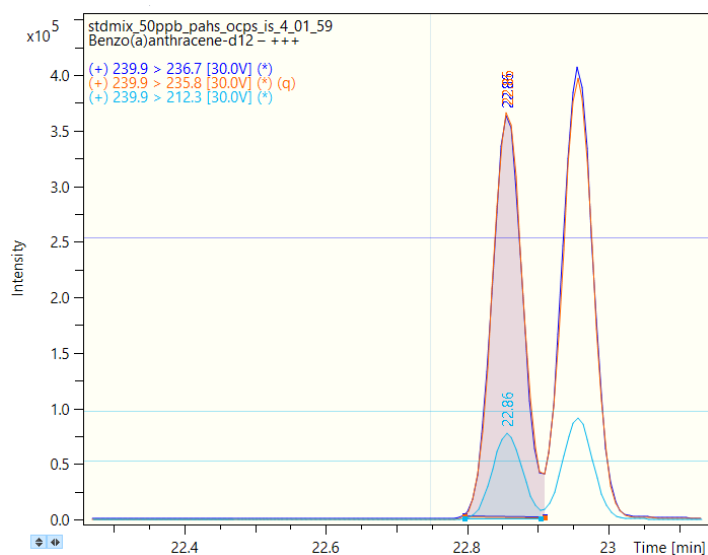


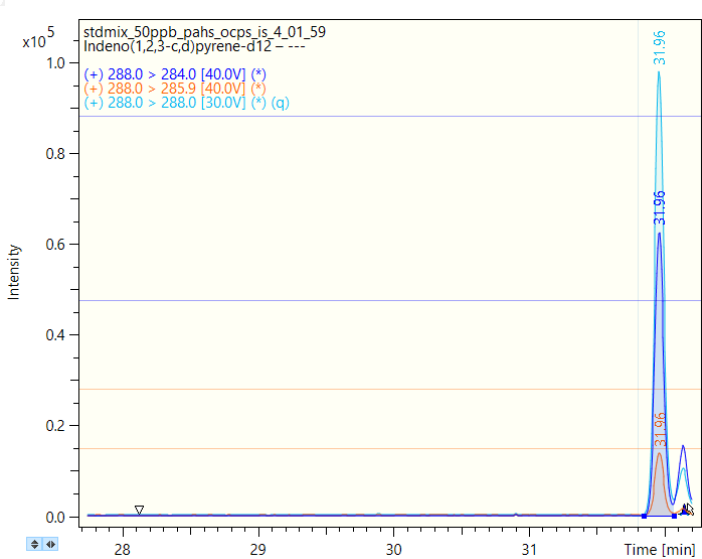
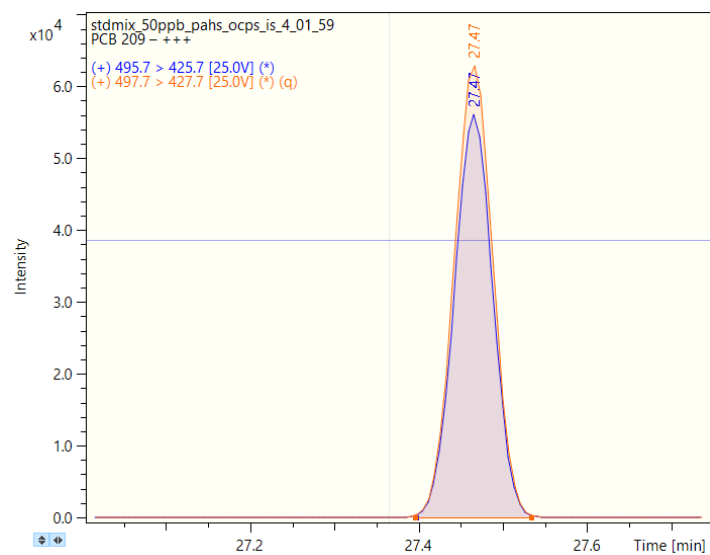
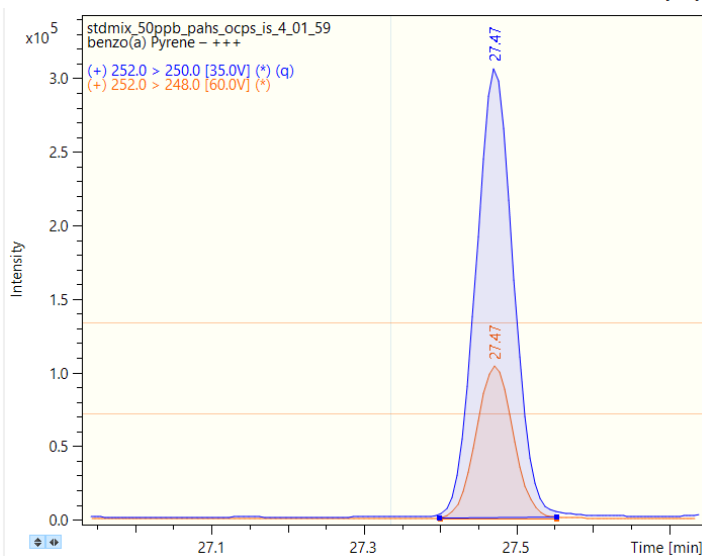
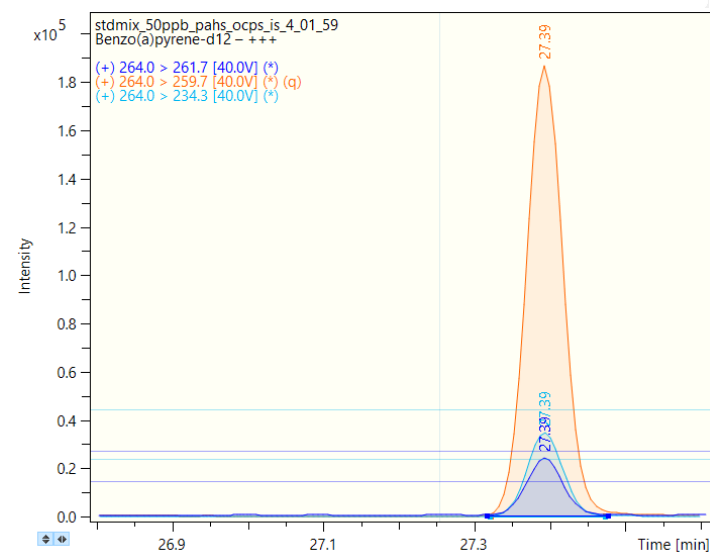
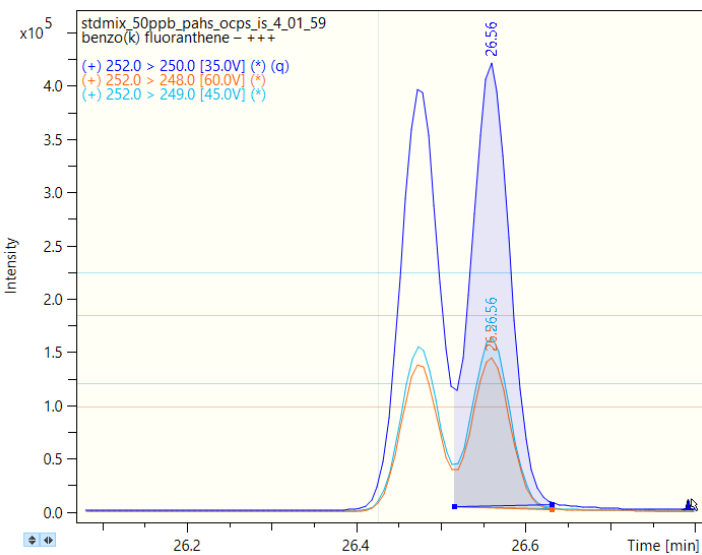
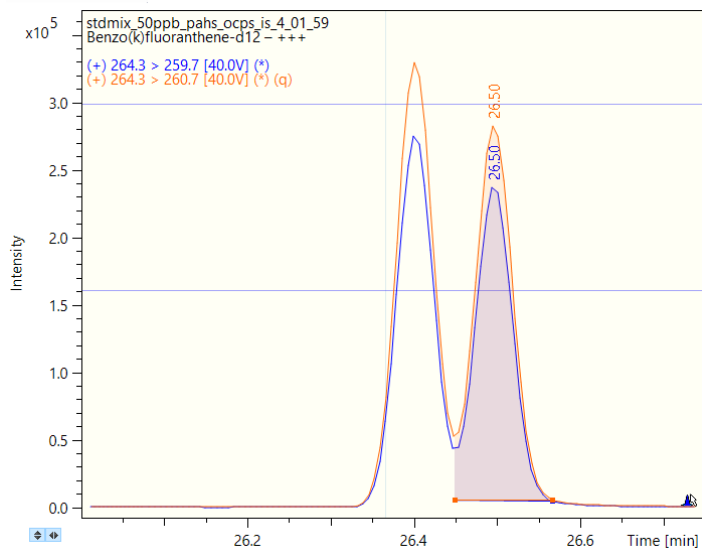


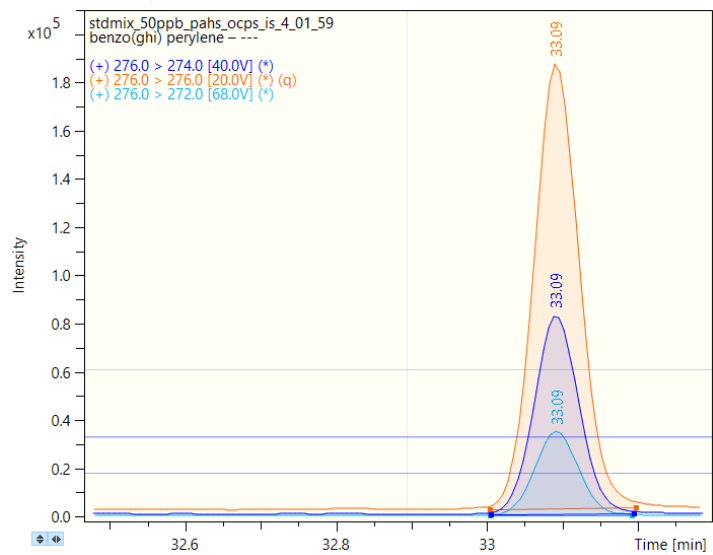
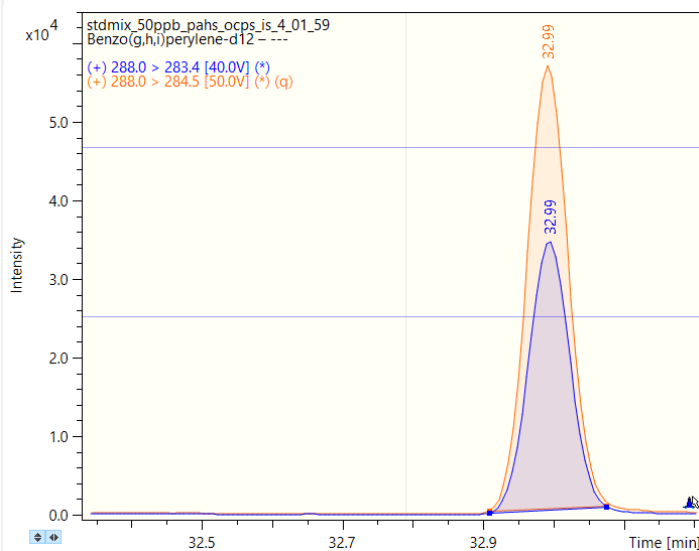
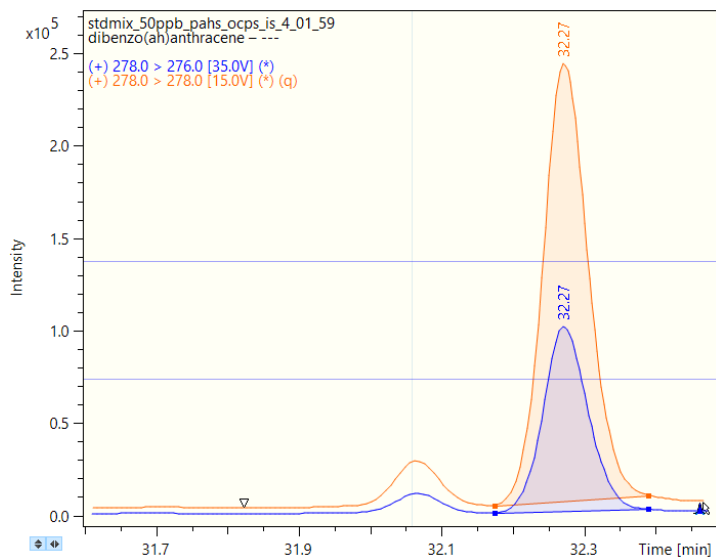
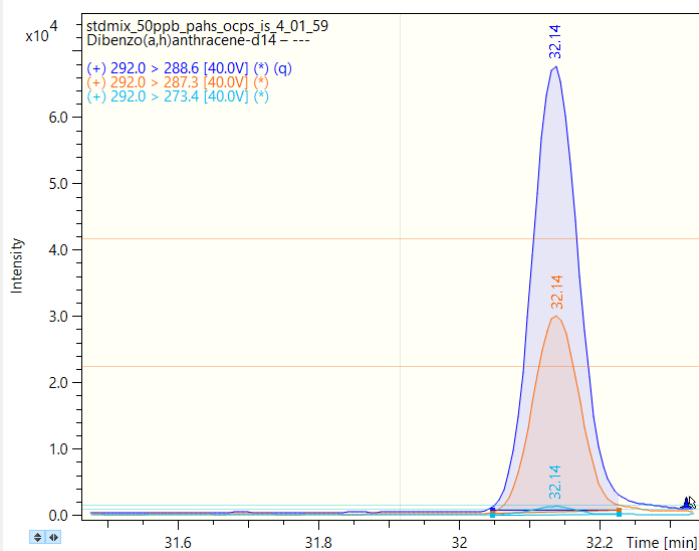
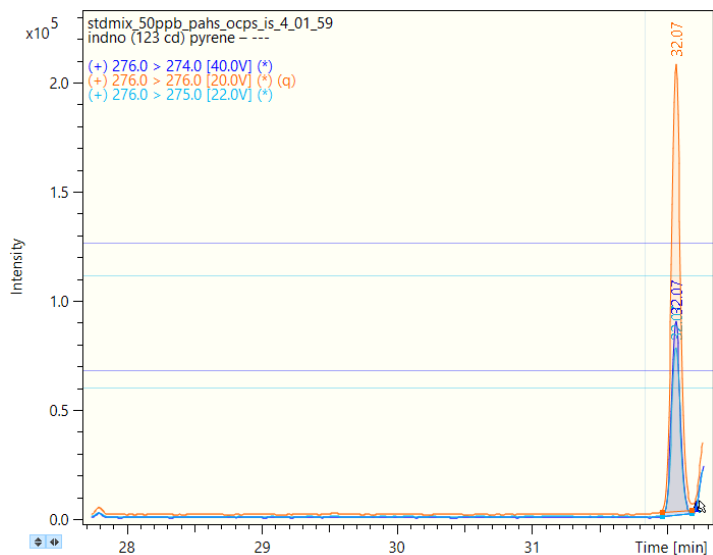












ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Πίνακας 16: Πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος, σύμφωνα με την 2013/39/ΕΚ

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Αριθ.	Ονομασία της ουσίας	Αριθμός CAS ⁽¹⁾	ΕΜΤ-ΠΠΠ ⁽²⁾ Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας ⁽³⁾	ΕΜΤ-ΠΠΠ ⁽²⁾ Λοιπά επιφανειακά ύδατα	ΜΕΣ-ΠΠΠ ⁽⁴⁾ Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας ⁽³⁾	ΜΕΣ-ΠΠΠ ⁽⁴⁾ Λοιπά επιφανειακά ύδατα	ΠΠΠ Ζώντες οργανισμοί ⁽¹²⁾
(1)	Alachlor	15972-60-8	0,3	0,3	0,7	0,7	
(2)	Ανθρακένιο	120-12-7	0,1	0,1	0,1	0,1	
(3)	Ατραζίνη	1912-24-9	0,6	0,6	2,0	2,0	
(4)	Βενζόλιο	71-43-2	10	8	50	50	
(5)	Βρωμιούχοι διφαινυλαιθέ- ρες ⁽⁵⁾	32534-81-9			0,14	0,014	0,0085
(6)	Κάδμιο και οι ενώσεις του (ανάλογα με τις κατηγορίες σκληρότητας νερού) ⁽⁶⁾	7440-43-9	≤ 0,08 (Κατηγορία 1) 0,08 (Κατηγορία 2) 0,09 (Κατηγορία 3) 0,15 (Κατηγορία 4) 0,25 (Κατηγορία 5)	0,2	≤ 0,45 (Κατηγορία 1) 0,45 (Κατηγορία 2) 0,6 (Κατηγορία 3) 0,9 (Κατηγορία 4) 1,5 (Κατηγορία 5)	≤ 0,45 (Κατηγορία 1) 0,45 (Κατηγορία 2) 0,6 (Κατηγορία 3) 0,9 (Κατηγορία 4) 1,5 (Κατηγορία 5)	
(6α)	Τετραχλωράν- θρακας ⁽⁷⁾	56-23-5	12	12	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(7)	Χλωροαλκάνια C10-13 ⁽⁸⁾	85535-84-8	0,4	0,4	1,4	1,4	
(8)	Chlorfenvinphos	470-90-6	0,1	0,1	0,3	0,3	
(9)	Chlorpyrifos (Chlorpyrifos- ethyl)	2921-88-2	0,03	0,03	0,1	0,1	
(9α)	Φυτοφάρμακα κυκλοδιενίου: Αλδρίνη ⁽⁷⁾ Διελδρίνη ⁽⁷⁾ Ενδρίνη ⁽⁷⁾ Ισοδρίνη ⁽⁷⁾	309-00-2 60-57-1 72-20-8 465-73-6	Σ = 0,01	Σ = 0,005	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Αριθ.	Ονομασία της ουσίας	Αριθμός CAS ⁽¹⁾	ΕΜΤ-ΠΠΠ ⁽²⁾ Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας ⁽³⁾	ΕΜΤ-ΠΠΠ ⁽²⁾ Λοιπά επιφανειακά ύδατα	ΜΕΣ-ΠΠΠ ⁽⁴⁾ Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας ⁽³⁾	ΜΕΣ-ΠΠΠ ⁽⁴⁾ Λοιπά επιφανειακά ύδατα	ΠΠΠ Ζώντες οργανισμοί ⁽¹²⁾
(9β)	Ολικό DDT ^{(7), (9)}	δεν εφαρμόζεται	0,025	0,025	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
	Παρα-παρα- DDT ⁽⁷⁾	50-29-3	0,01	0,01	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(10)	1,2-Διχλωροαιθάνιο	107-06-2	10	10	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(11)	Διχλωρομεθάνιο	75-09-2	20	20	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(12)	Φθαλικό δι(2-αιθυλεξύλιο) (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(13)	Diuron (Διουρόνη)	330-54-1	0,2	0,2	1,8	1,8	
(14)	Endosulfan (Ενδοσουλφάνη)	115-29-7	0,005	0,0005	0,01	0,004	
(15)	Φλουορανθένιο	206-44-0	0,0063	0,0063	0,12	0,12	30
(16)	Εξαχλωροβενζόλιο	118-74-1			0,05	0,05	10
(17)	Εξαχλωροβουταδιένιο	87-68-3			0,6	0,6	55
(18)	Εξαχλωροκυκλοεξάνιο	608-73-1	0,02	0,002	0,04	0,02	
(19)	Isoproturon (Ισοπροτουρόνη)	34123-59-6	0,3	0,3	1,0	1,0	
(20)	Μόλυβδος και οι ενώσεις του	7439-92-1	1,2 ⁽¹³⁾	1,3	14	14	
(21)	Υδράργυρος και οι ενώσεις του	7439-97-6			0,07	0,07	20
(22)	Ναφθαλίνιο	91-20-3	2	2	130	130	
(23)	Νικέλιο και οι ενώσεις του	7440-02-0	4 ⁽¹³⁾	8,6	34	34	
(24)	Εννεύλοφαινόλες (4-εννεύλοφαινόλη)	84852-15-3	0,3	0,3	2,0	2,0	
(25)	Οκτυλοφαινόλη ((4-(1,1',3,3'-τετραμεθυλβουτυλική)-φαινόλη))	140-66-9	0,1	0,01	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(26)	Πενταχλωροβενζόλιο	608-93-5	0,007	0,0007	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Αριθ.	Ονομασία της ουσίας	Αριθμός CAS (1)	ΕΜΤ-ΠΠΠ (2) Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας (3)	ΕΜΤ-ΠΠΠ (2) Λοιπά επιφανειακά ύδατα	ΜΕΣ-ΠΠΠ (4) Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας (3)	ΜΕΣ-ΠΠΠ (4) Λοιπά επιφανειακά ύδατα	ΠΠΠ Ζώντες οργανισμοί (12)
(27)	Πενταχλωροφαι- νόλη	87-86-5	0,4	0,4	1	1	
(28)	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζε- ται	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
	Βενζο(α)πυρένιο	50-32-8	$1,7 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$	0,27	0,027	5
	Βενζο(β)φλουο- ρανθένιο	205-99-2	βλέπε υποση- μείωση 11	βλέπε υπο- σημείωση 11	0,017	0,017	βλέπε υποσημεί- ωση 11
	Βενζο(κ)φλουο- ρανθένιο	207-08-9	βλέπε υποση- μείωση 11	βλέπε υπο- σημείωση 11	0,017	0,017	βλέπε υποσημεί- ωση 11
	βενζο(g,h,i)περυ- λένιο	191-24-2	βλέπε υποση- μείωση 11	βλέπε υπο- σημείωση 11	$8,2 \times 10^{-3}$	$8,2 \times 10^{-4}$	βλέπε υποσημεί- ωση 11
	Ινδενο(1,2,3- cd)πυρένιο	193-39-5	βλέπε υποση- μείωση 11	βλέπε υπο- σημείωση 11	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	βλέπε υποσημεί- ωση 11
(29)	Σιμαζίνη	122-34-9	1	1	4	4	
(29α)	Τετραχλωροαι- θυλένιο (7)	127-18-4	10	10	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(29β)	Τριχλωροαιθυλέ- νιο (7)	79-01-6	10	10	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(30)	Ενώσεις τριβου- τυλοκασσιτέρου (κατιόν τριβου- τυλοκασσιτέρου)	36643-28- 4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015	
(31)	Τριχλωροβενζόλια	12002-48- 1	0,4	0,4	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(32)	Τριχλωρομεθάνιο	67-66-3	2,5	2,5	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(33)	Τριφλουραλίνη	1582-09-8	0,03	0,03	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(34)	Dicofol	115-32-2	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$	δεν εφαρμόζε- ται (10)	δεν εφαρμόζε- ται (10)	33
(35)	Υπερφθοροκτα- νοσουλφονικό οξύ και τα παράγωγά του (PFOS)	1763-23-1	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2	9,1
(36)	Quinoxifen	124495-18- 7	0,15	0,015	2,7	0,54	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Αριθ.	Ονομασία της ουσίας	Αριθμός CAS ⁽¹⁾	ΕΜΤ-ΠΠΠ ⁽²⁾ Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας ⁽³⁾	ΕΜΤ-ΠΠΠ ⁽²⁾ Λοιπά επιφανειακά ύδατα	ΜΕΣ-ΠΠΠ ⁽⁴⁾ Επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας ⁽³⁾	ΜΕΣ-ΠΠΠ ⁽⁴⁾ Λοιπά επιφανειακά ύδατα	ΠΠΠ Ζώντες οργανισμοί ⁽¹²⁾
(37)	Διοξίνες και παρόμοιες με τις διοξίνες ενώσεις	Βλέπε υποσημείωση 10 στο παράρτημα Χ της οδηγίας 2000/60/ΕΚ			δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	Άθροισμα των PCDD + PCDF + PCB-DL 0,0065 µg.kg ⁻¹ TEQ ⁽¹⁴⁾
(38)	Aclonifen	74070-46-5	0,12	0,012	0,12	0,012	
(39)	Bifenox	42576-02-3	0,012	0,0012	0,04	0,004	
(40)	Cybutryne	28159-98-0	0,0025	0,0025	0,016	0,016	
(41)	Κυπερμεθρίνη	52315-07-8	8 × 10 ⁻⁵	8 × 10 ⁻⁶	6 × 10 ⁻⁴	6 × 10 ⁻⁵	
(42)	Dichlorvos	62-73-7	6 × 10 ⁻⁴	6 × 10 ⁻⁵	7 × 10 ⁻⁴	7 × 10 ⁻⁵	
(43)	Εξαβρωμοκυκλοωδεκάνιο (HBCDD)	Βλέπε υποσημείωση 12 στο παράρτημα Χ της οδηγίας 2000/60/ΕΚ	0,0016	0,0008	0,5	0,05	167
(44)	Heptachlor και εποξείδιο του heptachlor	76-44-8/ 1024-57-3	2 × 10 ⁻⁷	1 × 10 ⁻⁸	3 × 10 ⁻⁴	3 × 10 ⁻⁵	6,7 × 10 ⁻³
(45)	Τερβουτρίνη	886-50-0	0,065	0,0065	0,34	0,034	

Σχολιασμός πίνακα:

ΕΜΤ: ετήσια μέση τιμή, ΜΕΣ: μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση.

Μονάδα: [µg/l] για τις στήλες (4) έως (7)

[µg/kg υγρού βάρους] για τη στήλη (8)

- (1) CAS: Chemical Abstracts Service.
- (2) Η παράμετρος αυτή είναι το ΠΠΠ εκφραζόμενο ως ετήσια μέση τιμή (ΕΜΤ-ΠΠΠ). Εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά, ισχύει για την ολική συγκέντρωση όλων των ισομερών.
- (3) Τα επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας καλύπτουν τους ποταμούς και τις λίμνες, καθώς και τα συναφή τεχνητά ή ιδιαίτερος τροποποιημένα υδατικά συστήματα.
- (4) Η παράμετρος αυτή είναι το ΠΠΠ εκφραζόμενο ως μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση (ΜΕΣ-ΠΠΠ). Στις περιπτώσεις κατά τις οποίες για το ΜΕΣ-ΠΠΠ σημειώνεται "δεν εφαρμόζεται", οι τιμές ΕΜΤ-ΠΠΠ θεωρείται ότι προστατεύουν έναντι βραχυπρόθεσμων αιχμών ρύπανσης σε συνεχείς απορρίψεις, καθώς είναι σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με τις τιμές που προκύπτουν με βάση την οξεία τοξικότητα.
- (5) Για την ομάδα ουσιών προτεραιότητας που καλύπτεται από τους βρωμιούχους διφαινυλαίθρες (με αριθμό 5) το ΠΠΠ συγκρίνεται με το άθροισμα των συγκεντρώσεων των συγγενών ουσιών 28, 47, 99, 100, 153 και 154.
- (6) Για το κάδμιο και τις ενώσεις του (αριθ. 6) οι τιμές των ΠΠΠ διαφέρουν ανάλογα με τη σκληρότητα του νερού, που κατατάσσεται σε 5 κατηγορίες (κατηγορία 1: < 40 mg CaCO₃/l, κατηγορία 2: 40 έως < 50 mg CaCO₃/l, κατηγορία 3: 50 έως < 100 mg CaCO₃/l, κατηγορία 4: 100 έως < 200 mg CaCO₃/l, κατηγορία 5: ≥ 200 mg CaCO₃/l).
- (7) Η ουσία αυτή δεν είναι ουσία προτεραιότητας, αλλά ένας από τους άλλους ρύπους για τους οποίους τα ΠΠΠ ταυτίζονται με τα προβλεπόμενα στη νομοθεσία που ίσχυε πριν από τις 13 Ιανουαρίου 2009.
- (8) Δεν παρέχεται ενδεικτική παράμετρος γι' αυτή την ομάδα ουσιών. Η (οι) ενδεικτική(-ές) παράμετρος(-οι) πρέπει να καθορίζεται(-ονται) μέσω της αναλυτικής μεθόδου.
- (9) Το ολικό DDT περιλαμβάνει το άθροισμα των ισομερών 1,1,1-τριχλωρο2,2 δις(p-χλωροφαινυλ)-αιθάνιο (αριθμός CAS 50-29-3· αριθμός ΕΕ 200-024-3), 1,1,1-τριχλωρο2 (o-χλωροφαινυλο)2-(p-χλωροφαινυλ)-αιθάνιο (αριθμός CAS 789-02-6· αριθμός ΕΕ 212-332-5), 1,1-διχλωρο2,2 δις(p-χλωροφαινυλ)-αιθυλνίο (αριθμός CAS 72-55-9· αριθμός ΕΕ 200-784-6) και 1,1-διχλωρο2,2 δις(p-χλωροφαινυλ)-αιθάνιο (αριθμός CAS 72-54-8· αριθμός ΕΕ 200-783-0).
- (10) Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για να καθοριστεί ΜΕΣ-ΠΠΠ για τις ουσίες αυτές.
- (11) Για την ομάδα ουσιών προτεραιότητας των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAH) (με αριθμό

- 28), το ΠΠΠ στους ζώντες οργανισμούς και το αντίστοιχο EMT-ΠΠΠ στα ύδατα αναφέρονται στη συγκέντρωση βενζο(a)πυρενίου, στην τοξικότητα του οποίου βασίζονται. Το βενζο(a)πυρένιο μπορεί να θεωρηθεί ως δείκτης για τους άλλους ΡΑΗ, για τον λόγο αυτόν μόνον το βενζο(a)πυρένιο πρέπει να παρακολουθείται για να συγκρίνεται με το ΠΠΠ στους ζώντες οργανισμούς ή το αντίστοιχο EMT-ΠΠΠ στα ύδατα.
- (12) Το ΠΠΠ στους ζώντες οργανισμούς αναφέρεται στους ιχθύς, εκτός εάν ορίζεται διαφορετικά. Αντί των ιχθύων μπορεί να παρακολουθείται εναλλακτική ταξινομική ομάδα ζώντων οργανισμών, ή άλλος υλικός φορέας, με την προϋπόθεση ότι το εφαρμοζόμενο ΠΠΠ προσφέρει ισοδύναμο επίπεδο προστασίας. Για τις ουσίες με αριθμό 15 (Φλουορανθύνιο) και 28 (πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΡΑΗ), το ΠΠΠ σε ζώντες οργανισμούς αναφέρεται στα καρκινοειδή και τα μαλάκια. Για την αξιολόγηση της χημικής κατάστασης, η μέτρηση του φλουορανθυνίου και των ΡΑΗ σε ιχθύς δεν είναι σωστή. Για τις ουσίες με αριθμό 37 (Διοξίνες και παρόμοιες με τις διοξίνες ενώσεις), το ΠΠΠ σε ζώντες οργανισμούς αναφέρεται στους ιχθύς, στα καρκινοειδή και τα μαλάκια. σύμφωνα με το τμήμα 5.3 του παραρτήματος στον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 1259/2011 της Επιτροπής, της 2ας Δεκεμβρίου 2011, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 όσον αφορά τα μέγιστα επίπεδα διοξινών, παρόμοιων με τις διοξίνες PCB και μη παρόμοιων με τις διοξίνες PCB σε τρόφιμα (ΕΕ L 320 της 3.12.2011, σ. 18).
- (13) Αυτά τα ΠΠΠ αναφέρονται στις βιοδιαθέσιμες συγκεντρώσεις των ουσιών.
- (14) PCDD: πολυχλωριωμένες διβενζο-p-διοξίνες· PCDF: πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια· PCB-DL: παρόμοια με τις διοξίνες πολυχλωριωμένα διφαινύλια· TEQ: τοξικά ισοδύναμα σύμφωνα με τους συντελεστές τοξικής ισοδυναμίας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το 2005.»

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Stockholm Convention: The POPs:
<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/tabid/673/Default.aspx>
(last visited: Jan. 2019)
- [2] G.W.A. Milne, (1998), CRC Handbook of Pesticides, CRC Press, pp. 17–20
- [3] Leo M.L. Nollet, Hamir S. Rathore, (2010) Handbook of Pesticides, Methods of Pesticide Residues Analysis, CRC Press, pp. 1–4
- [4] South Carolina Environmental Knowledge and Decision–Making Toolbox:
http://www.scapesticides.org/knowledgebase/pesticide_movement_in_the_environment.php (last visited: Jan. 2019)
- [5] K. Skupińska, I. Misiewicz, T. Kasprzycka – Guttman, (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons: physiocochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms, Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, Vol. 61, No 3, pp. 233 – 240
- [6] 8η Ανακοίνωση για το Νερό:
<http://ec.europa.eu/environment/water/participation/pdf/waternotes/WN8-Pollution-EL.pdf> (last visited: Dec. 2019)
- [7] Falk, K., Moller, S., Mattox, W. G., (2006) A long-term increase in eggshell thickness of Greenlandic Peregrine Falcons *Falco peregrinus tundrius*. Science of the Total Environment 355: pp. 127-134
- [8] F. Ulberth, H. Fiedler, Persistent organic pollutants – chemical identity and properties, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2000, pp. 45–60
- [9] H.I. Abdel-Shafy, M. Mansour, (2016) A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, Egyptian Journal of Petroleum 25, pp.107–123

- [10] Regulation of the EU 2000/60/EC: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1546084641013&uri=CELEX:32000L0060> (last visited: Jan. 2019)
- [11] Regulation of the EU 2013/39/EC: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX:32013L0039> (last visited: Jan. 2019)
- [12] European Atlas of the Seas: https://ec.europa.eu/maritimeaffairs/atlas/maritime_atlas/#lang=EN;p=w;bkqd=5;theme=7:0.75,9:0.75,18:0.75,106:0.75,107:0.75;c=3908553.2882797513,5397952.68903467;z=6 (last visited: Jan. 2019)
- [13] BLACK SEA INTEGRATED MONITORING AND ASSESSMENT PROGRAM for years 2017-2022 (BSIMAP 2017-2022): http://ec.europa.eu/environment/marine/international-cooperation/regional-sea-conventions/bucharest/pdf/BSIMAP_2017_to_2022_en.pdf (last visited: Jan. 2019)
- [14] European Commission, The Black Sea: The Bucharest Convention on the Protection of the Black Sea against Pollution adopted in 1992: http://ec.europa.eu/environment/marine/international-cooperation/regional-sea-conventions/bucharest/index_en.htm (last visited: Jan. 2019)
- [15] The Commission on the Protection of the Black Sea Against Pollution: Strategic Action Plan for the Environmental Protection and Rehabilitation of the Black Sea: <http://www.blacksea-commission.org/bssap2009.asp> (last visited: Jan. 2019)
- [16] European Environment Agency: Black Sea region briefing - The European environment — state and outlook 2015: <https://www.eea.europa.eu/soer-2015/countries/black-sea> (last visited: Jan. 2019)
- [17] NORMAN network: <https://www.norman-network.net/?q=NORMAN%20Network> (last visited: Jan. 2019)

- [18] NORMAN network: NORMAN Suspect List Exchange
<https://www.norman-network.com/?q=node/236> (last visited: Jan. 2019)
- [19] Stockholm Convention: History of the Convention:
<http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/History/Overview/tabid/3549/Default.aspx> (last visited: Jan. 2019)
- [20] Greco L, Serrano R, Blanes MA, Serrano E, Capri E (2010), Bioaccumulation markers and biochemical responses in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) raised under different environmental conditions. *Ecotox Environ Saf* 73: pp. 38–45
- [21] Covaci A, Voorspoels S, Ramos L, Neels H, Blust R (2007) Recent developments in the analysis of brominated flame retardants and brominated natural compounds. *J Chromatogr A* 1153: pp. 145–71
- [22] K. M. Dimpe, P. N. Nomngongo, (2016) Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices, *Trends in Analytical Chemistry* 82, pp. 199–207
- [23] Martial LeDoux, (2011) Review: 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, pp. 1021–1036
- [24] Stockholm Convention: The POPs: The 12 Initial POPs:
<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx> (last visited: Jan. 2019)
- [25] Regulation of the EU 2008/105/EC: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008L0105&from=EN> (last visited: Jan. 2019)
- [26] Stockholm Convention: The POPs: The New POPs:
<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx> (last visited: Jan. 2019)

- [27] Stockholm Convention: Chemicals Proposed for listing: <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ChemicalsProposedforListing/tabid/2510/Default.aspx> (last visited: Jan. 2019)
- [28] J. M. Molina-Ruiz, E. Cieslik, I. Cieslik, I. Walkowska, (2015), Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography–mass spectrometry, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, pp. 369–378
- [29] R. Zhou, L. Zhu, Y. Chen, Q. Kong, (2008), Concentrations and characteristics of organochlorine pesticides in aquatic biota from Qiantang River in China, *Environmental Pollution* 151, pp.190-199
- [30] S. A. Eqani, R. N. Malik, A. Cincinelli, G. Zhang, A. Mohammad, A. Qadir, A. Rashid, H. Bokhari, K. C. Jones, A. Katsoyiannis, (2013), Uptake of organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) by river water fish: The case of River Chenab, *Science of the Total Environment* 450–451, pp. 83–91
- [31] K. Kalachova, J. Pulkrabova, L. Drabova, T. Cajka, V. Kocourek, J. Hajslova, (2011), Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps integrated into a single method, *Analytica Chimica Acta* 707 (2011) 84– 91
- [32] S. Adu-Kumi, M. Kawano, Y. Shiki, P.O. Yeboah, D. Carboo, J. Pwamang, M. Morita, N. Suzuki, (2010), Organochlorine pesticides (OCPs), dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzo furans (PCDD/Fs) in edible fish from Lake Volta, Lake Bosumtwi and Weija Lake in Ghana, *Chemosphere* 81, pp.675–684
- [33] I. Al-Saleh, I. Al-Doush, (2002), Gas chromatography-mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in five species of fish from three sites in the Arabian Gulf, *International Journal of Environmental Health Research* 12, pp. 193–200

- [34] S. Chen, X. Yu, X. He, D. Xie, Y. Fan, J. Peng, (2009), Simplified pesticide multiresidues analysis in fish by low-temperature cleanup and solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry, *Food Chemistry* 113, pp. 1297–1300
- [35] Lijun Han, Yelena Sapozhnikova, Steven J. Lehotay, (2014), Streamlined sample cleanup using combined dispersive solid-phase extraction and in-vial filtration for analysis of pesticides and environmental pollutants in shrimp, *Analytica Chimica Acta* 827 (2014) 40–46
- [36] R. Serrano, M. Barreda, E. Pitarch, F. Hernández, (2003), Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Separation Sci.*, 26, pp. 75–86
- [37] Jongki Hong, Hye-Young Kim, Do-Gyun Kim, Jungju Seo, Kang-Jin Kim, Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1038 (2004) 27–35
- [38] Walid Ben Ameer, Souad Trabelsi, Yassine El Megdiche, Sihem Ben Hassine, Badreddine Barhoumi, Béchir Hammami, Ethel Eljarrat, Damia Barceló, Mohamed Ridha Driss, Concentration of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from Bizerte Lagoon (Northern Tunisia), *Chemosphere* 90 (2013) 2372–2380
- [39] Pierre-Luc Cloutier, Frédéric Fortin, Paule Emilie Groleau, Pauline Brousseau, Michel Fournier, Mélanie Desrosiers, QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples, *Talanta* 165 (2017) 332–338
- [40] Kamila Kalachova & Jana Pulkrabova & Tomas Cajka & Lucie Drabova & Michal Stupak & Jana Hajslova, Gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry: a powerful tool for the (ultra)trace analysis of multiclass environmental contaminants in fish and fish feed, *Anal. Bioanal. Chem.* (2013) 405, pp. 7803–7815

- [41] Marielle Thomas, Angélique Lazartigues, Damien Banas, Jean Brun-Bellut, Cyril Feidt, Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediments and fish from fresh water cultured fishponds in different agricultural contexts in north-eastern France, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 77 (2012) pp. 35–44
- [42] FRANÇOIS BORDET, DARY INTHAVONG and JEAN-MARC FREMY, Interlaboratory Study of a Multiresidue Gas Chromatographic Method for Determination of Organochlorine and Pyrethroid Pesticides and Polychlorobiphenyls in Milk, Fish, Eggs, and Beef Fat, *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* VOL. 85, NO. 6, 2002
- [43] Yun Gyong Ahn, Jeoung Hwa Shin, Hye-Young Kim, Jeehyeong Khim, Mi-Kyoung Lee, Jongki Hon, Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish, *Analytica Chimica acta* 603 (2007) 67–75
- [44] Lingli Guo, Yaowen Qiu, Gan Zhang, Gene J. Zheng, Paul K.S. Lam, Xiangdong Li, Levels and bioaccumulation of organochlorine pesticides (OCPs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fishes from the Pearl River estuary and Daya Bay, South China, *Environmental Pollution* 152 (2008) 604-611
- [45] Hui–Dong Li, Lu–Ge Huo, Wen–Bo Wang, Zi–Lei Chen, Ding Ruiyan, Fang Liping, Wang Fengen, Xiao Lu, Guo–Sheng Yang, and Hassan Y. Aboul-Enein, The Determination of PAHs in Fish by GC-QqQ-MS/MS, *Polycyclic Aromatic Compounds*, 33:97–107, 2013
- [46] P. Manirakiza, A. Covaci, L. Nizigiyimana, G. Ntakimazi, P. Schepens, Persistent chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in selected fish species from Lake Tanganyika, Burundi, Africa, *Environmental Pollution* 117 (2002) 447–455
- [47] Juan Sánchez-Avila, María Fernandez-Sanjuan, Joana Vicente, Silvia Lacorte, Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas

- chromatography–tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 6799– 6811
- [48] N. Carro, J. Cobas, I. García, M. Ignacio, A. Mouteira, Distribution and trend of organochlorine pesticides in galicia coast using mussels as bioindicator organisms. Possible relationship to biological parameters, Chemosphere 102 (2014) 37–47
- [49] Abdurrahman Aksoy, Yavuz Kursad Das, Oguzhan Yavuz, Dilek Guvenc, Enes Atmaca Sema Agaoglu, Organochlorine Pesticide and Polychlorinated Biphenyls Levels in Fish and Mussel in Van Region, Turkey, Bull Environ Contam Toxicol (2011) 87:65–69
- [50] Hulya Boke Ozkoc, Gulfem Bakan, Sema Ariman, Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides along the Black Sea coast, Environ. Geochem. Health (2007) 29:pp. 59–68
- [51] Perihan Binnur Kurt, Hulya Boke Ozkoc , A survey to determine levels of chlorinated pesticides and PCBs in mussels and seawater from the Mid-Black Sea Coast of Turkey, Marine Pollution Bulletin 48 (2004) 1076–1083
- [52] Arunee Therdtteppitak, Kittima Yammeng, Determination of OCPs in commercial fish with GC with ECD and confirmation with GC-MS, Science Asia 29 (2003): 127 – 134
- [53] P. K. Sarkar, P. K. Prajapati, V. J. Shukla, B. Ravishankar, and A. K. Choudhary, Toxicity and recovery studies of two ayurvedic preparations of iron, Indian J. Exp. Biol., vol. 47, no. 12, 2009, pp. 987–992.
- [54] The ChromAcademy: Theory and Instrumentation of GC: <https://www.chromacademy.com/lms/sco10/04-Why-choose-Gas-Chromatography-b.html?fChannel=1&fCourse=2&fSco=10&fPath=sco10/04-Why-choose-Gas-Chromatography-b.html> (last visited: Jan. 2019)
- [55] The ChromAcademy: GC detectors: <https://www.chromacademy.com/frameset->

- [chromacademy.html?fChannel=1&fCourse=2&fSco=18&fPath=sco18/gc_2_6_10.asp](http://www.chromacademy.html?fChannel=1&fCourse=2&fSco=18&fPath=sco18/gc_2_6_10.asp) (last visited: Jan. 2019)
- [56] The ChromAcademy: Fundamental GC–MS: Tandem Mass Spectrometry, p.p.20-21:
https://www.chromacademy.com/lms/sco101/Fundamental_GC-MS_Introduction.pdf (last visited: Jan. 2019)
- [57] The ChromAcademy: Theory and Instrumentation of GC detectors, p.p.32:
https://www.chromacademy.com/lms/sco18/Theory_and_Instrumentation_Of_GC_Detectors.pdf (last visited: Jan. 2019)
- [58] Introduction to Triple Quadrupol MS, Bruker Corporation, Copyright 2012
- [59] F.J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, S. Cantarero-Malagón, J.L. Vílchez, Validation of a method for the analysis of 77 priority persistent organic pollutants in river water by stir bar sorptive extraction in compliance with the European Water Framework Directive, *Talanta* vol. 89 (2012) pp. 322– 334
- [60] Hui Zhang, Stéphane Bayen, Barry C. Kelly, Multi-residue analysis of legacy POPs and emerging organic contaminants in Singapore's coastal waters using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Science of the Total Environment*, vol. 523 (2015), pp. 219–232
- [61] A. Malachova, M. Sulyok, E. Beltrán, F. Berthiller, R. Krska, Optimization and validation of a quantitative 1 liquid chromatography – tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices, *J. Chromatogr. A*, vol. 1362, 2014, pp. 145-156.
- [62] A.G. Frenich, J. L. Martínez Vidal, J. L. F. Moreno, R. Romero-González, Compensation for matrix effects in gas chromatography–tandem mass spectrometry using a single point standard addition, *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, (2009) pp. 4798–4808

- [63] R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, M. Valcárcel, H.M. Widmer, (2004),
Analytical Chemistry, WILEY – VCH, p.p. 873-874
- [64] R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, M. Valcárcel, H.M. Widmer, (2004),
Analytical Chemistry, WILEY – VCH, p.p. 855, 874