



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΤΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη των επιπέδων υπερφθοριωμένων
οργανικών ενώσεων σε δείγματα τροφίμων**

**Ζαφειράκη Ευφροσύνη
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2011

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη των επιπέδων υπερφθοριωμένων οργανικών ενώσεων σε δείγματα τροφίμων

Ζαφειράκη Ευφροσύνη

A.M.: 93921

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δασενάκης Εμμανουήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δασενάκης Εμμανουήλ
Σκούλλος Μιχαήλ
Λεοντιάδης Λεόντιος

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 14/7/2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σουλφονικό υπερφθοροοκτάνιο (perfluorooctane sulfate, $C_8F_{17}SO_3H$, PFOS) και το υπερφθοροοκτανοϊκό οξύ (perfluorooctanoic acid, $C_7F_{15}CO_2H$, PFOA) ανήκουν στην ομάδα των υπερφθοριωμένων ενώσεων (perfluorinated compounds, PFCs). Για το PFOS και το PFOA έχει εκδοθεί έκθεση αξιολόγησης κινδύνου από την European Food Safety Authority (EFSA) το 2008 και έχουν θεσπιστεί ανεκτά όρια ημερήσιας πρόσληψης (tolerable daily intakes, TDI) και για τις δύο ενώσεις ($150ng/kg\text{ b.w.day}^{-1}$ για το PFOS και $1500ng/kg\text{ b.w.day}^{-1}$ για το PFOA). Το PFOS, όπως και τα άλατά του έχουν χαρακτηριστεί σύμφωνα με τη συνθήκη της Στοκχόλμης 2009 ως ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι (persistent organic pollutants, POPs).

Τα PFOS και PFOA αποτελούν ενώσεις με μεγάλη θερμική, χημική και βιολογική ανθεκτικότητα. Είναι μη εύφλεκτες ενώσεις, διαθέτουν επιφανειοδραστικές αμφίφιλες ιδιότητες και χρησιμοποιούνται σε πληθώρα βιομηχανικών και καταναλωτικών εφαρμογών. Τα PFOS και PFOA έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα αέρα, σκόνης, χρώματος, λάσπης, πόσιμου νερού, υδάτων λιμνών, ποταμών και θαλάσσης, καθώς και σε ζωντανούς οργανισμούς όπως ψάρια και θηλαστικά. Από το περιβάλλον εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα και ως εκ τούτου, μέσω της τροφής, της εισπνοής και της άμεσης επαφής με το δέρμα, στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα PFOS και PFOA έχουν επίσης προσδιοριστεί σε δείγματα τροφίμων, ορού του αίματος και μητρικού γάλακτος.

Παρόλο που η τοξικότητά των PFOS και PFOA στον άνθρωπο είναι ακόμη υπό διερεύνηση, από μελέτες σε τρωκτικά παρατηρείται πως έκθεση σε PFOS και PFOA μπορεί να έχει επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό, αναπτυξιακό και νευρικό σύστημα, επιπτώσεις στο ήπαρ, ορμονικές διαταραχές, ανάπτυξη αδενωμάτων, και κάποιες φορές καρκινογένεσης.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη εξειδικευμένης μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των PFOS και PFOA, η οποία θα διαθέτει την απαραίτητη ευαισθησία για την μέτρησή τους τόσο σε δείγματα υγρών όσο και στερεών τροφίμων. Η μέθοδος βασίστηκε στην χρήση LC-MS/MS και στη μέθοδο ισοτοπικής αραίωσης. Πραγματοποιήθηκε η επικύρωση της μεθόδου, όπου

εξετάστηκαν τα χαρακτηριστικά ποιότητας της ανάλυσης τα οποία εν συνεχεία αξιολογήθηκαν ανάλογα με τις απαιτήσεις της μεθόδου. Τέλος, η αναπτυχθείσα μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό PFOS και PFOA σε δείγματα τροφίμων από την Ελλάδα και την Κύπρο.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: φθοριωμένοι οργανικοί ρύποι

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: PFOS, PFOA, LC-MS/MS, μέθοδος ισοτοπικής αραίωσης, τρόφιμα

ABSTRACT

Perfluorooctane sulfate (PFOS, $C_8F_{17}SO_3H$) and perfluorooctanoic acid (PFOA, $C_7F_{15}CO_2H$) are the two most commonly found perfluorinated compounds (PFCs). European Safety Authority (EFSA) has established a health risk assessment for PFOS and PFOA in 2008, and has prescribed a Tolerable Daily Intake (TDI) (150ng/kg b.w. per day for PFOS and 1500ng/kg b.w. per day for PFOA) for the two chemical compounds as well. In accordance to the Stockholm Convention in 2009, PFOS and its salts have been characterized as persistent organic pollutants (POPs).

PFOS and PFOA possess thermal, chemical and biological stability, non-flammability and surface-active properties. Furthermore, PFOS and PFOA are widely used as industrial and consumer applications. PFOS and PFOA have been detected in air, dust, soil, sewage, drinking water, rivers, seas and living organisms such as fish and mammals. Through the environment PFOS and PFOA enter into the food chain and finally into human organism by inhalation, consumption of food products, and direct dermal contact. PFOS and PFOA have also been detected in food samples and in human serum and breast milk.

There is limited information available on the human toxicity of PFOS and PFOA and on their effects on human health. Despite this fact, it is known from the results of surveys on rodents, that PFOS and PFOA are responsible for hepatotoxicity, developmental toxicity, hormonal effects, neurological effects, immunological effects, occurrence of adenomas and sometimes cancer.

The aim of this study is the development of a specific, sensitive and quantitative method of analysis for the detection of PFOS and PFOA in food products. For the achievement of this objective LC-MS/MS and isotope dilution method were employed. In addition, validation of the method took place, through which the characteristics of the method were examined and evaluated depending on the requirements of the method. Finally, food samples from Greece and Cyprus were analyzed for the detection of PFOS and PFOA.

SUBJECT AREA: perfluorinated organic pollutants

KEYWORDS: PFOS, PFOA, LC-MS/MS, isotope dilution method, food

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε σε συνεργασία του εργαστηρίου 'Χημείας και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος' του τμήματος Χημείας και του εργαστηρίου 'Φασματομετρίας Μάζας και Ανάλυσης Διοξινών' του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών προϊόντων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος.

Με αφορμή την παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους καθηγητές Ε. Δασενάκη και Μ. Σκούλλο, για την ανάθεση του θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσαν να αποκομίσω γνώσεις και εμπειρίες σχετικές με τον κλάδο της Χημείας Περιβάλλοντος.

Μεϊζονος σημασίας ήταν η συνεισφορά του διευθυντή ερευνών Λ. Λεοντιάδη, υπεύθυνου του εργαστηρίου Διοξινών και Φασματομετρίας Μάζας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, χωρίς την καθοδήγηση του οποίου δεν θα είχα φέρει εις πέρας την παρούσα μελέτη. Με στήριξε και στάθηκε αρωγός καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειας μου. Είμαι ευγνώμων για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την εργαστηριακή εμπειρία που με βοήθησε να αποκτήσω.

Με την ευκαιρία που μου δίνεται θέλω επίσης να ευχαριστήσω τις ερευνήτριες Ε. Βασιλειάδου και Δ. Κωστοπούλου, οι οποίες συνέδραμαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης. Στάθηκαν δίπλα μου και με στήριξαν σε κάθε δυσκολία που συναντούσα τόσο σε θεωρητικό όσο και πειραματικό επίπεδο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 Υπερφθοριωμένες οργανικές ενώσεις, σουλφονικό υπερφθοροοκτάνιο και υπερφθοροοκτανοϊκό οξύ	14
1.2 Θεσμικό πλαίσιο	18
1.3 Παρασκευή των PFOS και PFOA	19
1.4 Παραγωγή και χρήση	22
1.5 Είσοδος στο περιβάλλον	25
1.5.1 Αέρας, αιωρούμενα σωματίδια και σκόνη	27
1.5.2 Επιφανειακά ύδατα και πόσιμο νερό	30
1.5.3 Χώμα, ιζήματα, λάσπη και λύματα	32
1.6 Είσοδος σε ζωικούς οργανισμούς	32
1.7 Είσοδος στον άνθρωπο	34
1.7.1 Επιπτώσεις στην υγεία	34
1.7.2 Μετρήσεις στο αίμα	39
1.8 Συγκέντρωση σε τρόφιμα	43
1.9 Μέθοδοι προσδιορισμού	47
2. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ / ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	50
3. ΜΕΘΟΔΟΣ ΙΣΟΤΟΠΙΚΗΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ (ISOTOPE DILUTION METHOD)	60
4. ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ (ACCELERATED SOLVENT EXTRACTOR, ASE)	64
5. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY, MS)	68
5.1 Δομή Φασματογράφου Μάζας	69
5.2 Διακριτική ικανότητα (Resolving Power, R)	74

5.3 Συζευγμένη / Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (Tandem MS)	75
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	78
6.1 Γυαλικά και όργανα	78
6.2 Μέθοδοι ανάλυσης	80
6.2.1 Εκχύλιση στερεών τροφίμων	80
6.2.2 Εκχύλιση υγρών τροφίμων	81
6.2.3 Καθαρισμός του δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction)	81
6.2.4 Μέτρηση σε φασματογράφο LC-MS/MS	82
6.2.5 Επικύρωση της μεθόδου	92
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	94
7.1 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου	94
7.2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων	100
7.3 Συμπεράσματα	102
8. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	106
9. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	109

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: PFOS (perfluorooctane sulfate)	15
Εικόνα 2: PFOA (perfluorooctanoic acid)	16
Εικόνα 3: Υγρή εκχύλιση υψηλής πίεσης (Accelerated Solvent Extractor, ASE 300)	64
Εικόνα 4: Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI)	72
Εικόνα 5: Τετραπολικός αναλυτής μαζών ή τετράπολο (Quadrupole, Q)	73

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Διαλύματα βαθμονόμησης	80
Πίνακας 2: Παράμετροι του ESI	83
Πίνακας 3: Ιοντικές μεταπτώσεις και ενέργειες διάσπασης των PFOS και PFOA	83
Πίνακας 4: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις PFOA	97
Πίνακας 5: Στατιστικά αποτελέσματα των δεδομένων επαναληψιμότητας του PFOA	98
Πίνακας 6: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις του PFOS	98
Πίνακας 7: Στατιστικά αποτελέσματα των δεδομένων επαναληψιμότητας του PFOS	98
Πίνακας 8: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA εμβολιασμένων δειγμάτων συγκέντρωσης 5 ng/g σε διαφορετικές ημέρες	99
Πίνακας 9: Στατιστικά αποτελέσματα των δεδομένων αναπαραγωγιμότητας των PFOS και PFOA	99
Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις PFOS και PFOA (ng/g δείγματος) στα διάφορα είδη τροφίμων	100
Πίνακας 11: Διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των PFOS και PFOA ανά κατηγορία τροφίμων	102
Πίνακας 12 : Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις PFOS και PFOA σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων ύστερα από μελέτες σε διάφορες χώρες	105

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Διαδικασία παραγωγής του PFOS με τη μέθοδο ECF	21
Σχήμα 2: Πηγές εισόδου των PFCAs στο περιβάλλον	26
Σχήμα 3: Διαδρομή των PFOS και PFOA στο περιβάλλον	27
Σχήμα 4: Συγκεντρώσεις (minimum, medium, maximum) των PFOS και PFOA σε δείγματα θαλάσσιων υδάτων, τόσο από παράκτιες περιοχές όσο και από σημεία ανοιχτά των ωκεανών. Συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης της κάθε μεθόδου δίνονται ως 1,5 φορά το όριο ανίχνευσης.	31
Σχήμα 5: Σχηματική λειτουργία του ASE	66
Σχήμα 6: Βασικά δομικά στοιχεία ενός φασματογράφου μάζας	70
Σχήμα 7: Συζευγμένη / Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (Tandem MS)	76
Σχήμα 8: Φάσμα μάζας (full scan) του PFOA	84
Σχήμα 9: Φάσμα μάζας MS/MS του PFOA	85
Σχήμα 10: Φάσμα μάζας (full scan) του PFOS	86
Σχήμα 11: Φάσμα μάζας MS/MS του PFOS	87
Σχήμα 12: Διάσπαση του PFOA και παραγωγή θραυσμάτων	88
Σχήμα 13: Διάσπαση του PFOS και παραγωγή θραυσμάτων	88
Σχήμα 14: Διάσπαση του ¹³ C ₄ -PFOA και παραγωγή θραυσμάτων	89
Σχήμα 15: Διάσπαση του ¹³ C ₄ -PFOS και παραγωγή θραυσμάτων	89
Σχήμα 16: Χρωματογράφημα του PFOA	90
Σχήμα 17: Χρωματογράφημα του PFOS	91
Σχήμα 18: Πρότυπη καμπύλη του PFOA	96
Σχήμα 19: Πρότυπη καμπύλη του PFOS	96

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υπερφθοριωμένες οργανικές ενώσεις, σουλφονικό υπερφθοροοκτάνιο και υπερφθοροοκτανοϊκό οξύ

Ως παραμένοντες οργανικοί ρύποι (**persistent organic pollutants, POPs**) αναφέρονται οι χημικές ενώσεις που είναι ανθεκτικές στην χημική και βιολογική διάσπαση με αποτέλεσμα να παραμένουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις και να βιοσυσσωρεύονται μέσω της τροφικής αλυσίδας στα ζώα και στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι POPs έχει αποδειχθεί ότι έχουν επιβλαβείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Για το λόγο αυτό υπάρχει πλέον μία διεθνής κινητοποίηση με σκοπό τη λήψη δραστικών μέτρων για την μείωση των ρυπογόνων αυτών ουσιών στο περιβάλλον.

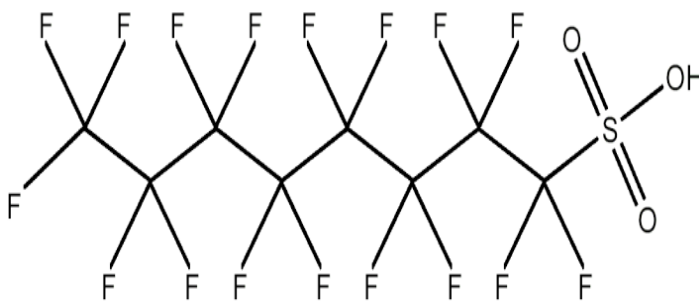
Οι υπερφθοριωμένες ενώσεις (**perfluorinated compounds, PFCs**) είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από μία ανθρακική αλυσίδα της οποίας τα άτομα του υδρογόνου έχουν αντικατασταθεί από φθόρια και περιέχουν ένα τουλάχιστον διαφορετικό άτομο ή μια λειτουργική ομάδα στη δομή τους. Η δομή αυτή των PFCs, και ο ισχυρός δεσμός μεταξύ φθορίου και άνθρακα, καθιστά τις ενώσεις αυτές εξαιρετικά σταθερές τόσο χημικά όσο και θερμικά, ενώ τους προσδίδει αρκετά χαμηλή επιφανειακή τάση. Επίσης, τα PFCs δεν είναι εύφλεκτα και εμφανίζουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες, ενώ λόγω των ιδιοτήτων τους βρίσκουν εφαρμογή σε πληθώρα βιομηχανικών και καταναλωτικών προϊόντων από το 1950. Οι PFCs έχουν την ικανότητα να βιοσυσσωρεύονται, με αποτέλεσμα κάποιες από αυτές να έχουν ήδη χαρακτηριστεί ως POPs όπως το

perfluorooctane sulfate (PFOS), τα άλατά του και το perfluorooctane sulfonyl fluoride (PFOS-F).

Μία κατηγορία των υπερφθοριωμένων ενώσεων που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι τα υπερφθοροαλκυλιωμένα οξέα (**perfluoroalkyl acids, PFAAs**). Τα PFAAs αποτελούνται από μια ανθρακική αλυσίδα τεσσάρων έως και δεκατεσσάρων ατόμων άνθρακα, και από μία λειτουργική ομάδα (κυρίως καρβοξυλική, σουλφονική και φωσφορική). Λόγω των ισχυρών δεσμών μεταξύ των ανθράκων και των φθορίων, τα PFAAs είναι σταθερά στον ατμοσφαιρικό αέρα σε υψηλές θερμοκρασίες (έως και 150°C), μη εύφλεκτα, μη διασπώμενα από ισχυρά οξέα, αλκάλια ή οξειδωτικούς παράγοντες και δεν υπόκεινται σε φωτόλυση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η περιεκτικότητα των PFAAs σε φθόρια, παρέχει εξαιρετικά χαμηλή επιφανειακή τάση, και συνεισφέρει σημαντικά στην υδρόφοβη και λιπόφοβη φύση τους [1].

Οι ενώσεις που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα μελέτη ανήκουν στην κατηγορία των PFAAs και είναι το σουλφονικό υπερφθοροοκτάνιο (**perfluorooctane sulfate, PFOS**) (Εικόνα 1) και το υπερφθοροοκτανοϊκό οξύ (**perfluorooctanoic acid, PFOA**), (Εικόνα 2) για τις οποίες έχει εκδοθεί έκθεση αξιολόγησης κινδύνου από την European Food Safety Authority (EFSA) το 2008.

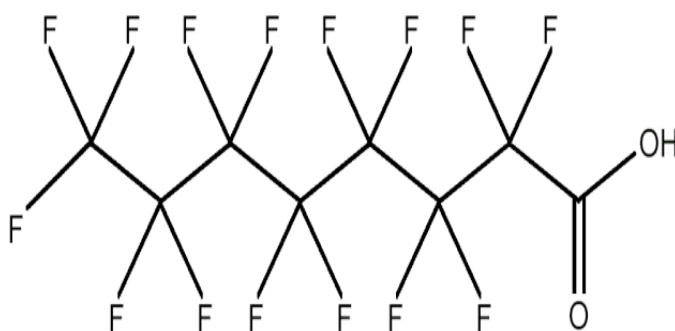
Το PFOS είναι μια υπερφθοριωμένη ένωση με μορφή άσπρης σκόνης. Αποτελείται από οκτώ άτομα άνθρακα, δεκαεπτά άτομα φθορίου, ένα άτομο θείου και τρία άτομα οξυγόνου



Εικόνα 1: PFOS (perfluorooctane sulfate)

($C_8F_{17}SO_3H$), και το μοριακό του βάρος είναι 500.13 g/mol. Η διαλυτότητα του PFOS στο νερό μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, σε θερμοκρασία 24-25°C είναι 570 mg/L, ενώ μειώνεται αισθητά παρουσία αλάτων (12.4 mg/L σε θαλασσινό νερό στους 22-23°C, και 20.0 mg/L σε διάλυμα NaCl θερμοκρασίας 22-24°C) [2].

Το PFOA είναι ένα υπερφθοριωμένο οργανικό οξύ και αποτελείται από οκτώ άτομα άνθρακα, δεκαπέντε άτομα φθορίου και δύο άτομα οξυγόνου ($C_7F_{15}CO_2H$). Έχει μοριακό βάρος 414.07g/mol και μορφή είτε άσπρης



Εικόνα 2: PFOA (perfluorooctanoic acid)

σκόνης είτε άσπρου στερεού με κέρινη υφή. Το σημείο τήξης του είναι 55-56°C, και το σημείο βρασμού του 189-192°C (736 mm Hg). Η διαλυτότητά του στο νερό μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία, και σύμφωνα με την EFSA ισούται με 3.4 g/L, ενώ σε θερμοκρασία 22°C με 4.1 g/L και σε θερμοκρασία 25°C με 9.5 g/L. Όσον αφορά στη διαλυτότητα του PFOA, αναμένεται πως το ελεύθερο οξύ θα διασπάται πλήρως στο νερό, με το καρβοξυλικό του τμήμα να είναι στραμμένο προς το νερό, και με την υπερφθοριωμένη ανθρακική αλυσίδα προς την επιφάνεια. Σε pH 4, υπολογίζεται πως περίπου το 6% της ένωσης παραμένει αδιάλυτο. Σε υδατικά διαλύματα, τα ανιοντικά μόρια του PFOA, προσανατολίζονται εν μέρει προς την επιφάνεια του νερού, και εν μέρει προς την επιφάνεια μεταξύ αέρα και νερού. Παρά το γεγονός πως έχει οριστεί τιμή διαλυτότητας για το PFOA στο νερό, παραμένει ασαφές κατά πόσο αυτή η τιμή αναφέρεται σε μικροδιασπορά μικυλλίων ή στην πραγματική διάλυση της ένωσης [3,4].

Το PFOS και το PFOA αποτελούν ενώσεις με μεγάλη θερμική, χημική και βιολογική ανθεκτικότητα. Επίσης, είναι μη εύφλεκτες ενώσεις και διαθέτουν επιφανειοδραστικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικό τους είναι πως αποτελούν αμφίφιλες ενώσεις (υδρόφοβες και λιπόφοβες), με την λιπόφοβη φύση τους να υπερτερεί έναντι της υδρόφοβης. Το γεγονός αυτό αποτρέπει την βιοσυσσώρευσή τους στον λιπώδη ιστό, όπου δεσμεύονται συνήθως τα περισσότερα POPs, ενώ ευνοεί την συσσώρευσή τους στο αίμα, το σπλήνα και τους νεφρούς που δεσμεύονται στις πρωτεΐνες [4,5,6,7,8,9].

Τα PFOS και PFOA λόγω των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές και καταναλωτικές εφαρμογές όπως στην αδιαβροχοποίηση και την προστασία υφασμάτων, σε απορρυπαντικά, εντομοκτόνα, καλλυντικά, αλλά και ως προστατευτική επικάλυψη έναντι λεκέδων και λιπαρών ουσιών σε υφάσματα, χαλιά, και συσκευασίες τροφίμων. Επίσης χρησιμοποιούνται σε αφρούς κατάσβεσης, λάδια μηχανών, και υδραυλικά υγρά. Χρησιμοποιούνται ως επιφανειοδραστικές ουσίες σε ορυχεία και πετρελαιοπηγές, καθώς και σε μηχανές στίλβωσης δαπέδων [10,11]. Βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας, όπως αυτός των αερομεταφορών, της φωτογραφίας, και των ημιαγωγών. Το PFOA χρησιμοποιείται κυρίως ως γαλακτοματοποιητής για τον πολυμερισμό φθοριούχων πολυμερών (Teflon) που προορίζονται για υφάσματα, ηλεκτρικά σκεύη και αντικολλητικά σκεύη μαγειρικής. Επισημαίνεται, πως η χρήση του PFOS έχει πλέον περιοριστεί κυρίως σε βιομηχανικές εφαρμογές [4, 12,13,14,15].

Η ευρεία χρήση τους και η χημική σταθερότητά τους οδηγεί στην αναπόφευκτη βιοσυσσώρευσή τους στο περιβάλλον. Τα PFOS και PFOA έχουν προσδιοριστεί σε δείγματα αέρα, χώματος, λάσπης, πόσιμου νερού, υδάτων λιμνών ποταμών και θαλάσσης, καθώς και σε ζωντανούς οργανισμούς όπως ψάρια και θηλαστικά. Από το περιβάλλον εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα και ως εκ τούτου στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα PFOS και PFOA έχουν επίσης προσδιοριστεί σε δείγματα ορού του αίματος και μητρικού γάλακτος. Υπάρχουν ενδείξεις για μεταφορά των PFOS και PFOA μέσω του πλακούντα και του μητρικού γάλακτος στα έμβρυα. Παρόλα αυτά ο τρόπος με τον οποίο μεταφέρονται από το περιβάλλον στον άνθρωπο δεν έχει καθοριστεί πλήρως, καθώς ελλειπείς παραμένουν και οι γνώσεις σχετικά με την έκθεση των ανθρώπων σε PFOS και PFOA και των επιπτώσεων αυτής στην ανθρώπινη υγεία. Ως εκ τούτου, η περαιτέρω έρευνα με σκοπό την αξιολόγηση του κινδύνου της έκθεσης των ανθρώπων στις ενώσεις αυτές, καθίσταται αναγκαία.

1.2 Θεσμικό πλαίσιο

Όσον αφορά στο PFOS, ο Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) εξέδωσε έκθεση αξιολόγησης κινδύνου το 2002, όπου αναφέρονται πληροφορίες σχετικά με την τοξικότητα του PFOS και τις επιπτώσεις που προκαλεί στην ανθρώπινη υγεία, κατόπιν μελετών τόσο σε τρωκτικά όσο και σε ανθρώπινης προέλευσης δείγματα (αίμα). Αναφορά επίσης γίνεται στον προσδιορισμό του PFOS σε περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και στα επίπεδα σταθερότητας, συσσώρευσης και τοξικότητας που εμφανίζει στα δείγματα αυτά [6].

Συγκεκριμένα για το PFOA και τα άλατά του η U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) εξέδωσε το 2005 έκθεση αξιολόγησης κινδύνου σχετικά με τις επιπτώσεις που προκαλούν οι ενώσεις αυτές στην ανθρώπινη υγεία (επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό, στο ορμονικό, στο νευρικό σύστημα, στο ήπαρ κλπ). Τα δεδομένα που αναφέρονται στην καρκινογενή φύση του PFOA από την έκθεση αυτή συνάδουν με αυτά μιας επιπλέον έκθεσης της U.S. EPA που εκδόθηκε το ίδιο έτος, η οποία αναφέρεται στην εμφάνιση καρκίνου ύστερα από έκθεση σε ορισμένους επικίνδυνους ρύπους ([16] και χαρακτηρίζει το PFOA ως πιθανώς καρκινογόνο ένωση για τον άνθρωπο [17].

Η EFSA το 2008 εξέδωσε έκθεση αξιολόγησης κινδύνου όπου χαρακτήρισε τις δύο ενώσεις ως επικίνδυνους ρύπους για τα τρόφιμα και θέσπισε ανεκτά όρια ημερήσιας πρόσληψης (tolerable daily intakes, TDI) και για τις δύο ενώσεις. Συγκεκριμένα για το PFOS το συνιστάμενο TDI είναι 150 ng/kg b.w. ανά ημέρα και για το PFOA 1500 ng/kg b.w. ανά ημέρα. Παρόλα αυτά σχετικά με το PFOS, το PFOA και την συγκέντρωσή τους στα τρόφιμα, η ίδια έκθεση αναφέρει πως η επίδραση στην υγεία του ευρύτερου ανθρώπινου πληθυσμού από την έκθεσή τους σε PFOS και PFOA μέσω των τροφίμων δεν θεωρείται πιθανή, ενώ διατηρούνται κάποιες επιφυλάξεις σχετικά με την επίδρασή τους στις αναπτυξιακές λειτουργίες. Το παραπάνω συμπέρασμα διεξήχθη ύστερα από την πραγματοποίηση πληθώρας ερευνών που είχαν ως πεδίο μελέτης την τοξικολογική δράση του PFOS και του PFOA σε ζώα [4,18,19].

Το PFOS, τα αντίστοιχα άλατά του, και το PFOS-F (perfluorooctanesulfonyl fluoride), σύμφωνα με την αναθεώρηση της συνθήκης της Στοκχόλμης που πραγματοποιήθηκε τον Μάιο του 2009, συμπεριλαμβάνονται στην λίστα των POPs, ύστερα από την ένταξη εννέα νέων ενώσεων [20].

Βασιζόμενη στην έκθεση της EFSA, η Ε.Υ. το 2010 εξέδωσε σύσταση (2010/161/ΕΕ) στα κράτη μέλη της την παρακολούθηση μεγάλης ποικιλίας τροφίμων για την παρουσία υπερφθοροαλκυλιωμένων ουσιών προκειμένου να ανιχνεύσουν PFOS και PFOA στα τρόφιμα κατά την διάρκεια των ετών 2010-2011 [21].

1.3 Παρασκευή των PFOS και PFOA

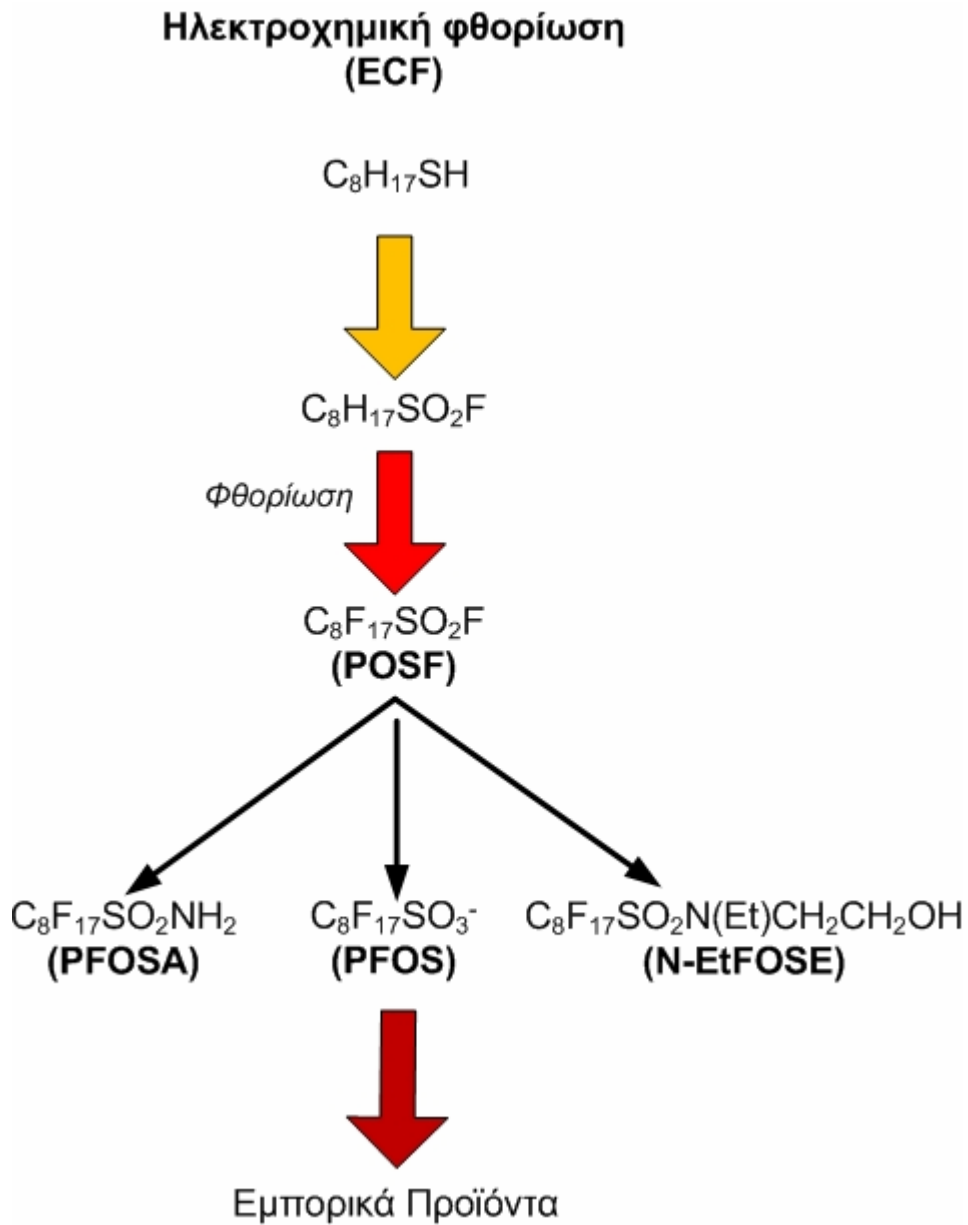
Η βιομηχανική παρασκευή των PFOS και PFOA, καθώς και άλλων PFAAs, πραγματοποιείται κυρίως με δύο μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος η οποία αναφέρεται ως Simon Electrochemical Fluorination (ECF), βασίζεται στην αντίδραση μεταξύ οργανικής πρώτης ύλης με άνυδρο υδροφθόριο. Οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιούνται παρουσία ηλεκτρικού ρεύματος, προκαλώντας την αντικατάσταση όλων των ατόμων υδρογόνου της ανθρακικής αλυσίδας από άτομα φθορίου. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας, λαμβάνει χώρα διάσπαση αλλά και ανακατανομή της ανθρακικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα την σύνθεση επιπλέον φθοριωμένων μορίων (παραπροϊόντων) διαφόρων μηκών ανθρακικής αλυσίδας, καθώς επίσης και μιγμάτων από γραμμικά, διακλαδισμένα και κυκλικά ισομερή.

Μία εναλλακτική μέθοδος σύνθεσης του PFOA είναι αυτή του τελομερισμού (telomerization, TM). Κατά τη διάρκεια του τελομερισμού, τετραφθοροαιθυλένιο αντιδρά με IF_5 με σκοπό την παραγωγή φθοροαλκυλοϊωδιδίων (fluorinated alkyl iodide) τα οποία διαθέτουν γραμμική ανθρακική αλυσίδα διαφόρων μηκών και μεγάλου μοριακού βάρους [1,22].

Όσον αφορά στο PFOS και τη σύνθεσή του σύμφωνα με την μέθοδο ECF, χρησιμοποιείται ως πρώτη οργανική ύλη οκτανοσουλφονυλο φθορίδιο (1-octanesulfonyl fluoride, $C_8H_{17}SO_2F$), και το αρχικό προϊόν της σύνθεσης αυτής είναι το υπερφθοροοκτανοσουλφονυλο φθορίδιο (perfluorooctanesulfonyl fluoride, POSF ή PFOS-F, $C_8F_{17}SO_2F$). Το POSF είναι διαθέσιμο ως εμπορικό προϊόν, και χρησιμοποιείται κυρίως ως ενδιάμεσο για την σύνθεση άλλων προϊόντων. Το απλούστερο προϊόν εξ αυτών είναι το PFOS, το οποίο αποτελεί προϊόν υδρόλυσης του POSF. Αναφέρεται επίσης πως η πλειοψηφία των μορίων POSF αντιδρά με ethyl carbonate με σκοπό τη σύνθεση N-MeFOSE και N-EtFOSE. Η μέθοδος ECF έχει ως μειονέκτημα την παράγωγή παραπροϊόντων, γεγονός που οδηγεί στη σύνθεση μη απόλυτα καθαρού τελικού προϊόντος (παρουσία υπολειμμάτων σε ποσοστό μικρότερο ή ίσο του 1%) [1].

Ακολουθεί σχήμα με την συνοπτική περιγραφή της πορείας παραγωγής του PFOS με την μέθοδο ECF (Σχήμα 1).

Το PFOA κυρίως παρασκευάζεται και χρησιμοποιείται ως αμμωνιακό άλας (ammonium perfluorooctanoate, APFO). Η παραγωγή γραμμικής ή διακλαδισμένης ανθρακικής αλυσίδας APFO εξαρτάται από τη μέθοδο παρασκευής, δηλαδή τελομερισμό ή μέθοδο ECF αντιστοίχως. Συγκεκριμένα, με την μέθοδο ECF το παραγόμενο APFO ευθύγραμμης ανθρακικής αλυσίδας αντιστοιχεί σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70%, ενώ με την μέθοδο του τελομερισμού το ποσοστό ισοδυναμεί με το 100% του παραγόμενου προϊόντος.

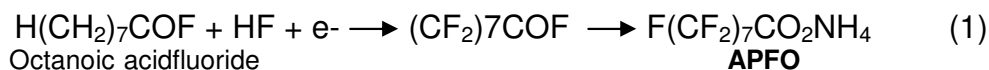


Σχήμα 1: Διαδικασία παραγωγής του PFOS με τη μέθοδο ECF

Αναλυτικότερα, κατά την παρασκευή PFOA με τη μέθοδο ECF, ηλεκτρικό ρεύμα περνά από διάλυμα υδροφθορίου και οργανικής πρώτης ύλης οκτανοϊκού οξέος ή παραγώγων του. Κατά τη διαδικασία αυτή αντικαθίστώνται οι δεσμοί άνθρακα-υδρογόνου της οργανικής ύλης με δεσμούς άνθρακα-φθορίου. Με την μέθοδο αυτή παράγονται 30-45% ευθύγραμμο υπεροκτανονυλοφθορίδια (perfluorooctanonyl fluorides, PFOF), και ένα μίγμα παραπροϊόντων. Ύστερα

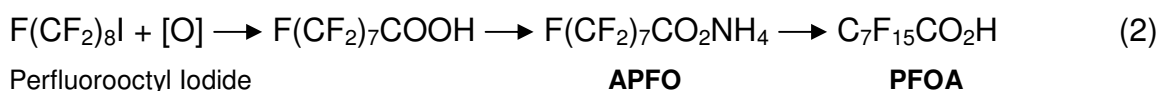
από απομάκρυνση των παραπροϊόντων το όξινο φθορίδιο υπόκειται σε υδρόλυση με αποτέλεσμα την παραγωγή του PFOA. Τα άλατα του PFOA παράγονται ύστερα από ουδετεροποίηση του οξέος με χρήση βάσης (αντίδραση 1).

Electrochemical Fluorination (ECF)



Κατά την μέθοδο του τελομερισμού, τετραφθοροαιθυλένιο (tetrafluoroethylene, C₂F₄) αντιδρά με χημικές ουσίες που περιέχουν φθόρια με σκοπό την παραγωγή φθοριωμένων ενδιάμεσων προϊόντων. Αυτά εν συνεχεία οξυνίζονται και παράγουν PFOA. Με αυτή την μέθοδο παράγονται οξέα ευθύγραμμης ανθρακικής αλυσίδας με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα. Για την παραλαβή καθαρότερων προϊόντων πραγματοποιείται απόσταξη. Τα εμπορικά παρασκευάσματα που προκύπτουν με την μέθοδο του τελομερισμού αναφέρονται συνήθως ως φθοροτελομερή (fluorotelomers) και αποτελούν μίγμα υπερφθοριωμένων ενώσεων με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα [23] (αντίδραση 2).

Perfluorooctyl Iodide Oxidation



1.4 Παραγωγή και χρήση

Η παραγωγή των PFAAs ξεκίνησε το 1947 και πραγματοποιείται κυρίως στην Αμερική αλλά και στην Ιταλία, Ιαπωνία, Γερμανία και Βέλγιο.

Επισημαίνεται πως η παραγωγή και η χρήση του PFOS υπερέβαινε αυτή του PFOA. Συγκεκριμένα το έτος 2000 η παραγωγή και χρήση του PFOS αντιστοιχούσε σε 3500 metric tons, ενώ αυτή του PFOA σε 500 metric tons.

Παρόλα αυτά, λόγω μείωσης της παραγωγής πολυφθοριωμένων ενώσεων από το κυριότερο εργοστάσιο παραγωγής του PFOS, την 3M Company στις Ηνωμένες Πολιτείες, το έτος 2002, η παγκόσμια παραγωγή του PFOS μειώθηκε κατακόρυφα και το έτος 2003 αντιστοιχούσε σε 175 metric tons [24]. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως η U.S. EPA εξέδωσε δύο κανονισμούς σχετικά με την χρήση του PFOS (Significant New Use Rules, SNURs) από την 3M Company, την μοναδική μονάδα παραγωγής PFOS στις Ηνωμένες Πολιτείες. Σύμφωνα με τον πρώτο κανονισμό SNURs το 2002 [25], επιτρέπονταν τρεις συγκεκριμένες χρήσεις του PFOS, οι οποίες αφορούσαν στην εφαρμογή του στην φωτογραφική βιομηχανία, στη βιομηχανία ημιαγωγών καθώς και στην αεροπορική βιομηχανία. Επιπλέον, επιτρεπτή ήταν η χρήση του ως ενδιάμεσο για την παραγωγή άλλων χημικών ενώσεων, οι οποίες θα χρησιμοποιούνταν στους προαναφερθέντες τομείς. Εν συνεχεία το 2007, εκδόθηκε νέος κανονισμός σύμφωνα με τον οποίο ίσχυαν οι περιορισμοί του προηγούμενου κανονισμού για το PFOS, ενώ επιβλήθηκε επιπλέον περιορισμός της χρήσης 183 συγγενών ενώσεων των PFAS [26].

Όσον αφορά τις Ευρωπαϊκές χώρες, σύμφωνα με την οδηγία 2006/122/EC επιβλήθηκε η μειωμένη χρήση του PFOS σε χρήσεις κρίσιμης σημασίας όπως η αεροπορική βιομηχανία, η βιομηχανία ημιαγωγών και η φωτογραφική βιομηχανία. Επίσης, επιβλήθηκε περιορισμός της χρήσης του PFOS στην βιομηχανία επιμετάλλωσης, με στόχο την μείωση σε σημαντικά χαμηλότερο επίπεδο, των εκπομπών κατά τη διάρκεια της επιμετάλλωσης. Επιπλέον περιορισμοί επιβλήθηκαν στα ημικατεργασμένα προϊόντα και είδη που περιέχουν PFOS με σκοπό την προστασία του περιβάλλοντος. Αναφέρεται πως τα προϊόντα που περιέχουν PFOS δεν πρέπει να διατίθενται στην αγορά ή να χρησιμοποιούνται ως ουσίες ή συστατικά παρασκευασμάτων σε συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη του 0.05% κατά μάζα. Καθώς επίσης δεν επιτρέπεται να διατίθενται στην αγορά ημικατεργασμένα προϊόντα ή είδη ή μέρη αυτών, εφόσον η συγκέντρωση PFOS είναι ίση ή μεγαλύτερη του 0.1% κατά μάζα. Στην παρούσα οδηγία γίνεται αναφορά και στο PFOA το οποίο εμφανίζει χαρακτηριστικά κινδύνου παρόμοια με αυτά του PFOS και ως εκ τούτου

απαιτείται να επανεξετάζονται διαρκώς οι εν εξελίξει δραστηριότητες αξιολόγησης του κινδύνου και η διαθεσιμότητα ασφαλέστερων εναλλακτικών λύσεων [27].

Σε αντίθεση με την φθίνουσα πορεία παραγωγής του PFOS, η παραγωγή του PFOA ακολούθησε αυξητική τάση, η οποία αντιστοιχεί σε ετήσια αύξηση της παραγωγής του κατά 1200 metric tons το 2004, με αποτέλεσμα το PFOA να κατατάσσεται στην πρώτη θέση των εμπορικά χρησιμοποιούμενων PFAA.

Με αφορμή την ραγδαία αύξηση παραγωγής και χρήσης του, το 2006 οι οχτώ μεγαλύτερες μονάδες παραγωγής του PFOA (3M/Dyneon, Arkema, Asahi, Ciba, Clariant, Daikin, DuPont and Solvay Solexis) εκλήθησαν να συμμετέχουν εθελοντικά σε ένα από τα παγκόσμια περιβαλλοντικά προγράμματα της U.S. EPA (Stewardship Program) με σκοπό τη μείωση των επιπέδων εκπομπής του από προϊόντα που περιέχουν PFOA, από τις πρόδρομες ενώσεις του και από τις συγγενείς χημικές ενώσεις, με εναρκτήριο έτος το 2000. Οι οχτώ μονάδες παραγωγής δεσμεύτηκαν να μειώσουν στο 95% τις εκπομπές PFOA έως το 2010, καθώς και να λειτουργούν με στόχο τον πλήρη περιορισμό των εκπομπών του PFOA, των πρόδρομων και συγγενών ενώσεών του, και των προϊόντων του έως το 2015. Σύμφωνα με το πρόγραμμα αυτό οι επιχειρήσεις δεν υποχρεούνται να ακολουθήσουν κάποιο συγκεκριμένο τρόπο λειτουργίας, αλλά ο τρόπος αντιμετώπισης ήταν στην διακριτική τους ευχέρεια [21, 23,28]

Στην προσπάθεια να μειωθεί η χρήση και η παραγωγή των PFOS και PFOA, χρησιμοποιήθηκαν αντικαταστάτες, η δομή των οποίων βασίζεται κυρίως στο υπερφθοροεξανοϊκό οξύ (perfluorohexanoic acid, PFHxA ή C6). Ως μειονέκτημα της χρήσης των αντικαταστατών εμφανίζεται η πολυφθοριωμένη τους φύση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα υγείας αλλά και περιβαλλοντικά, καθώς η συμπεριφορά των περισσότερων αντικαταστατών δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Πρόβλημα μείζονος σημασίας αποτελεί το γεγονός πως κάποιοι από τους αντικαταστάτες διασπώνται σε PFOS και PFOA, με αποτέλεσμα να αυξάνουν το ποσοστό των δύο ρύπων στο περιβάλλον [29].

1.5 Είσοδος στο περιβάλλον

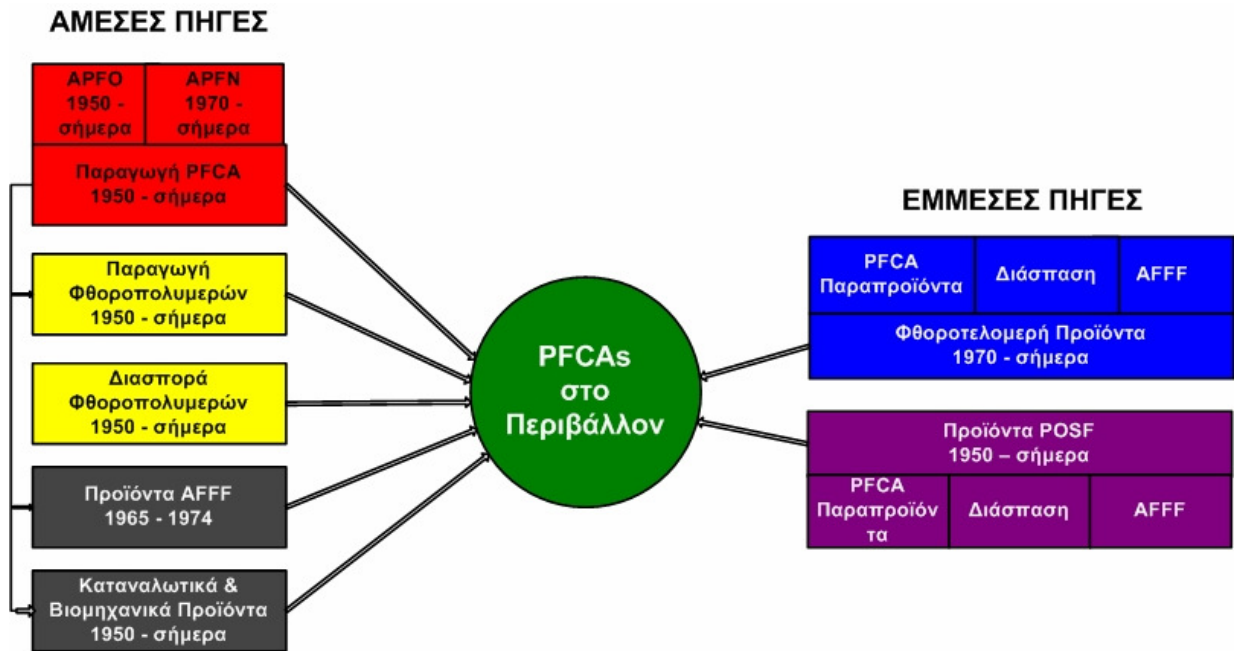
Η ευρεία χρήση των PFOS και PFOA σε παγκόσμιο επίπεδο, οι μηχανισμοί και οι πηγές παραγωγής τους, καθώς και οι χημικές τους ιδιότητες έχουν οδηγήσει στην αναπόφευκτη βιοσυσσώρευσή τους στο περιβάλλον [30,31]. Παρά το γεγονός πως το 2000 σταμάτησε η παραγωγή κάποιων υπερφθοριωμένων ενώσεων, μερικές από αυτές παραμένουν έως και σήμερα στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, υπερφθοριωμένες ενώσεις έχουν ανιχνευτεί σε δείγματα αέρα, πόσιμου και μη πόσιμου νερού, χώματος, λάσπης, ιζημάτων, αλλά και σε ύδατα ωκεανών και ποταμών.

Το PFOS και το PFOA μπορούν να εισέλθουν στο περιβάλλον καθ' όλη την διάρκεια της ζωής τους. Απελευθερώνονται στο περιβάλλον κατά την διαδικασία παραγωγής τους, κατά την εισαγωγή τους σε καταναλωτικά προϊόντα, καθώς και κατά την διανομή και χρήση αυτών. Πιθανή πηγή εισόδου θεωρούνται επίσης χωματερές όπου καταλήγουν καταναλωτικά προϊόντα που περιέχουν PFOS και PFOA [12]. Ως εξίσου σημαντική πηγή εισόδου των PFOS και PFOA στο περιβάλλον αναφέρεται η διάσπαση των πρόδρομων ενώσεών τους.

Αναλυτικότερα, το PFOA μπορεί να εισέλθει στο περιβάλλον με άμεσο ή έμμεσο τρόπο (Σχήμα 2). Ως άμεσος τρόπος θεωρείται κυρίως η βιομηχανική παραγωγή και η χρήση του αμμωνιακού άλατός του (APFO), ενώ αμελητέα είναι η συνεισφορά των υπόλοιπων αλάτων του (νιτρικά, άλατα του καλίου και μεταλλικά άλατα). Ως έμμεσος τρόπος θεωρείται η βιοδιάσπαση συγγενών ενώσεων. Ως έμμεσες πηγές στην βιβλιογραφία αναφέρονται το N-EtFOSE, το N-methyl perfluorooctane sulfonamidoethanol (N-MeFOSE), τα perfluorosulfonamides, και οι φθοροτελομερείς πρώτες ύλες [32]. Οι μηχανισμοί μετατροπής περιλαμβάνουν βιοδιάσπαση [33,34], αντίδραση με OH_x και οζονόλυση [35,36,37].

Το PFOS αντίστοιχα μπορεί να σχηματιστεί ύστερα από την διάσπαση συγγενών ενώσεων (PFOS-related substances) [4,6] οι οποίες είναι είτε άλατα του PFOS (αμμωνιακά, άλατα του καλίου ή του λιθίου), είτε πολυμερή τα οποία εμπεριέχουν την δομή του PFOS. Επισημαίνεται πως τα άλατα του PFOS και κυρίως τα άλατα καλίου, όντας μητρικές ενώσεις του PFOS, αποτελούν εξίσου

επικίνδυνους ρύπους, των οποίων η συμπεριφορά και οι επιπτώσεις που προκαλούν στην υγεία των ανθρώπων έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών. Ενδεικτικά αναφέρεται πως η πλειοψηφία των PFOS-related substances είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους, όπου το PFOS αποτελεί ένα κλάσμα του πολυμερούς.



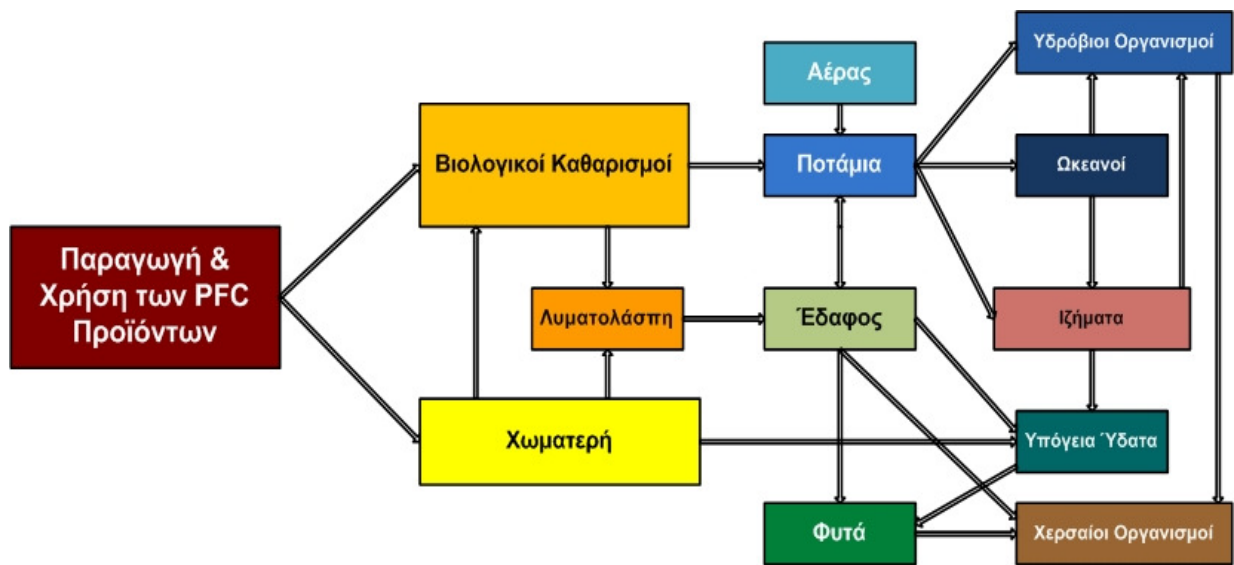
Σχήμα 2: Πηγές εισόδου των PFCAς στο περιβάλλον [23]

Οι πληροφορίες που διατίθενται σχετικά με την πορεία που ακολουθούν τα PFOS και PFOA κατά τη μεταφορά τους στο περιβάλλον είναι περιορισμένες. Πρόσφατα, έχουν αναπτυχθεί δύο θεωρίες σχετικά με την μεταφορά των PFOS και PFOA στο περιβάλλον. Η πρώτη [38], βασισμένη στα αποτελέσματα ερευνών που πραγματοποιήθηκαν στον Ατλαντικό και Ειρηνικό ωκεανό, στη Βόρεια θάλασσα της Κίνας, στην θάλασσα Sulu και στη θάλασσα του Λαμπραντόρ, όπου οι συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA ήταν της τάξεως των pg/l, αποδίδει τη μεταφορά του PFOS και του PFOA στα ωκεάνια ρεύματα.

Σύμφωνα με την δεύτερη θεωρία, η μεταφορά των PFOS και PFOA στο περιβάλλον πραγματοποιείται ύστερα από την μεταφορά των πρόδρομων

ενώσεων μέσω της ατμόσφαιρας και την μετέπειτα διάσπαση τους σε PFOS και PFOA. Η θεωρία αυτή βασίζεται στην μεταφορά των πτητικών πρόδρομων ενώσεων σε μεγάλες αποστάσεις, και εξηγεί τον προσδιορισμό των PFOS και PFOA σε απομονωμένες περιοχές, όπου λόγω της χαμηλής τάσης ατμών τους δεν θα έπρεπε να συναντώνται. Παρόλα αυτά καμία από τις δύο θεωρίες δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί [36, 39, 40,41,42,43,44].

Ως πιθανή διαδρομή των PFOS και PFOA στο περιβάλλον θεωρείται η εκπομπή τους στο σημείο παραγωγής τους, η μεταφορά τους σε κοντινές αποστάσεις μέσω του ανέμου, η εναπόθεσή τους στο έδαφος και η ακόλουθη είσοδός τους στον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα και μετέπειτα σε επιφανειακά ύδατα. Ακολουθεί σχηματική περιγραφή πιθανών διαδρομών των PFOS και PFOA στο περιβάλλον (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Διαδρομή των PFOS και PFOA στο περιβάλλον

1.5.1 Αέρας, αιωρούμενα σωματίδια και σκόνη

Από μελέτες που έχουν διεξαχθεί με σκοπό τον προσδιορισμό PFOS και PFOA σε δείγματα ατμοσφαιρικού αέρα, αιωρούμενων σωματιδίων και σκόνης, παρατηρείται συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των παραπάνω ρύπων και

της περιοχής (αστικής, αγροτικής, πλησίον σε εργοστάσιο παραγωγής τους κλπ) όπου πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία, αλλά και της τοποθεσίας της χώρας (νότιο, βόρειο ημισφαίριο). Ενδεικτικά αναφέρονται κάποιες μετρήσεις PFOS και PFOA και οι διακυμάνσεις των συγκεντρώσεών τους.

Στην πρώτη μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του PFOS σε δείγματα αέρα αστικών περιοχών της Ιαπωνίας, η συγκέντρωση του PFOS υπολογίστηκε $<LOD-21.8 \text{ pg/m}^3$. Η ίδια ερευνητική ομάδα στην Ιαπωνία προσδιόρισε PFOS και PFOA σε δείγματα αιωρούμενων σωματιδίων, όπου οι συγκεντρώσεις των ενώσεων παρουσίαζαν αποκλίσεις μεταξύ των διαφόρων περιοχών. Συγκεκριμένα, για το PFOA η συγκέντρωσή του προσδιορίστηκε ίση με 1.59 pg/m^3 στις αγροτικές περιοχές, ενώ αντίστοιχα στις αστικές βρέθηκε μεγαλύτερη των 919 pg/m^3 . Όμοια, η συγκέντρωση του PFOS στις αγροτικές περιοχές προσδιορίστηκε ίση με 0.46 pg/m^3 , ενώ στις αστικές ίση με 9.80 pg/m^3 [45,46,47].

Έρευνα διεξήχθη με σκοπό τον προσδιορισμό πολλών PFAS (polyfluorinated alkyl substances) σε δείγματα αέρα που συλλέχθηκαν στην ατμόσφαιρα μεταξύ της Γερμανίας (Bremerhaven 53° N) και της νότιας Αφρικής (Capetown 33° S) πάνω από τα παράλια του Ατλαντικού ωκεανού. Η έρευνα αυτή αποτέλεσε την πρώτη μελέτη που συμπεριλάμβανε περιοχές του νοτίου ημισφαιρίου και από τα αποτελέσματά της εξήχθη το συμπέρασμα πως οι συγκεντρώσεις των PFAS στις περιοχές της Αφρικής εμφανίζουν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές της Ευρώπης. Κατά τη διάρκεια της ίδιας μελέτης, προσδιορίστηκαν φορτισμένα PFAS (PFOS και PFOA) στα αιωρούμενα σωματίδια των δειγμάτων. Από τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα συγκέντρωσης των φορτισμένων PFAS ήταν περίπου δύο φορές χαμηλότερα από εκείνα των ουδέτερων PFAS. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του PFOS^- κυμαινόταν μεταξύ $0.1-2.5 \text{ pg/m}^3$, και του PFOA^- $<LOD-2 \text{ pg/m}^3$. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις των PFOS^- και PFOA^- αυτής της μελέτης στα αιωρούμενα σωματίδια, με άλλα έρευνας που διεξήχθη σε αστικές, ημι-αγροτικές περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου, παρατηρήθηκε πως οι συγκεντρώσεις του PFOS βρέθηκαν

50φορές χαμηλότερες από αυτές του Η.Β., ενώ του PFOA υπολογίστηκαν 200-800φορές χαμηλότερες [47]. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα πως κοντά στις περιοχές δειγματοληψίας του Ηνωμένου Βασιλείου πιθανότατα υπήρχε κάποια πηγή διάχυσης φορτισμένων PFAS.

Έρευνα [48] πραγματοποιήθηκε και σε δείγματα αέρα από δύο χωματερές στην Γερμανία, με σκοπό τον χαρακτηρισμό των περιοχών αυτών σχετικά με την συνεισφορά τους σε PFCs στην ατμόσφαιρα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν πως οι συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA στα δείγματα ατμοσφαιρικού αέρα που συλλέχθηκαν από εν λειτουργία χωματερή ήταν υψηλότερες συγκριτικά με αυτές ανενεργής χωματερής. Ως εκ τούτου, θεωρείται πως οι χωματερές αποτελούν πηγή PFCs στην ατμόσφαιρα. Συγκεκριμένα, PFCs προσδιορίστηκαν σε όλα τα δείγματα αέρα. Η συνολική συγκέντρωσή τους στην περιοχή της ανενεργής χωματερής κυμαινόταν μεταξύ 42-80 pg/m^3 , ενώ στην περιοχή της εν λειτουργία 134-706 pg/m^3 . Αντίστοιχα, φορτισμένα PFCs προσδιορίστηκαν σε όλα τα δείγματα αιωρούμενων σωματιδίων. Αναλυτικότερα, οι συγκεντρώσεις για τα δείγματα της εν λειτουργία χωματερής κυμαίνονταν μεταξύ $<\text{LOD}$ -42 pg/m^3 , και για την ανενεργή μεταξύ 6-15 pg/m^3 . Τα PFOS και PFOA εντοπίστηκαν σε όλα τα δείγματα. Οι προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις της μελέτης αυτής ήταν στο ίδιο επίπεδο με αυτές αστικών και ημι-αστικών περιοχών της Ευρώπης [49, 50, 51]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως ενώ οι συγκεντρώσεις των PFCs στην αέρια φάση ήταν σύμφωνες με αυτές άλλων ερευνών [49,50,51] οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στη σωματιδιακή φάση απέκλυαν σημαντικά.

Σε μετρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγματα ατμοσφαιρικού αέρα οι συγκεντρώσεις του PFOA κυμαίνονται από 0.07-0.9 ng/m^3 σε διάφορες πόλεις της Ιαπωνίας [53] έως 0.12-0.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ πλησίον εργοστασίου παραγωγής φθοριωμένων πολυμερών του Ηνωμένου Βασιλείου [54].

Αντίστοιχες μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί και για τον προσδιορισμό του PFOS σε δείγματα αέρα και σκόνης. Συγκεκριμένα, σε δείγματα σκόνης που συλλέχθηκαν από σπίτια της Ιαπωνίας, το PFOS ανιχνεύτηκε σε συγκέντρωση

11-2500 ng/g (M.O. 200 ng/g) [55]. Σε παρόμοια μελέτη που διεξήχθη σε δείγματα σκόνης από σπίτια στον Καναδά, το PFOS υπολογίστηκε να κυμαίνεται μεταξύ των <4.6-5065 ng/g (M.O. 443.68 ng/g) [56]. Όμοια, κατά τον προσδιορισμό PFOA σε δείγματα σκόνης, από έρευνες που διεξήχθησαν σε σπίτια της Ιαπωνίας, παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση του PFOA κυμαινόταν μεταξύ 69-3700 ng/g (M.O. 380 ng/g) [56], ενώ σε δείγματα λεπτής σκόνης σπιτιών του Καναδά βρέθηκε <2.3-1234 ng/g (M.O. 106.00 ng/g) [4].

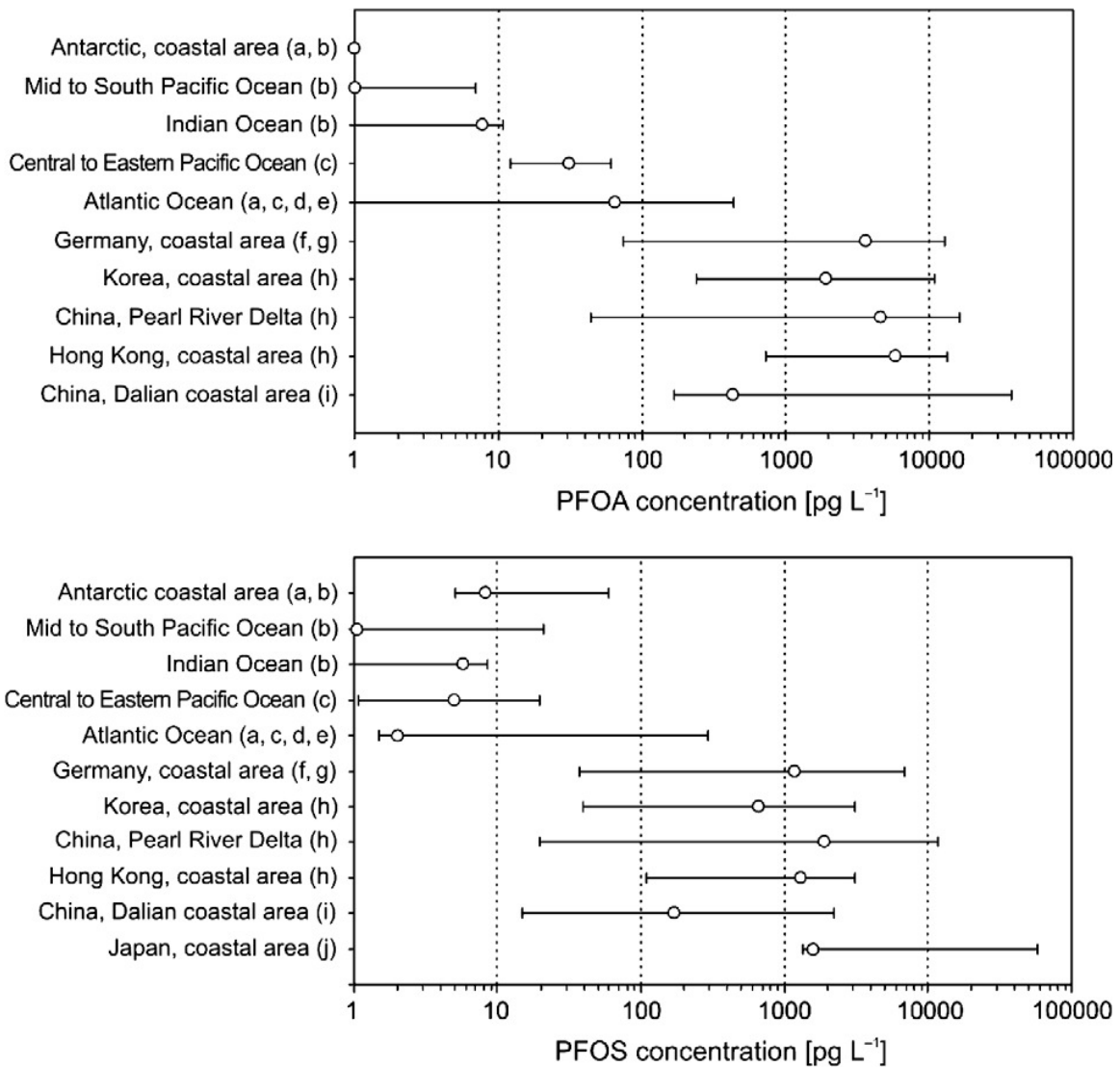
1.5.2. Επιφανειακά ύδατα και πόσιμο νερό

PFOS και PFOA έχουν προσδιοριστεί στα ύδατα του ποταμού Tennessi των ΗΠΑ κατόντι εργοστασίου παραγωγής φθοριωμένων χημικών, σε πηγές πόσιμου νερού πλησίον εργοστασίων στην δυτική Βιρτζίνια και τη Γερμανία, στις Μεγάλες λίμνες των ΗΠΑ, σε βρόχινα νερά από αστικές περιοχές του Καναδά, σε παράκτια ύδατα περιοχών της βόρειας Κίνας, της Ιαπωνίας και της Κορέας, καθώς επίσης και σε ύδατα των ποταμών Yangtze και Pearl της Κίνας [57, 58, 59, 60, 61, 62]. Επίσης, PFOS και PFOA έχουν προσδιοριστεί τόσο σε επιφανειακά ύδατα ποταμών της Γερμανίας, όσο και σε πόσιμο νερό που συλλέχθηκε από δημόσια κτίρια της ίδιας χώρας [63]. Το PFOS έχει επιπλέον εντοπισθεί σε επιφανειακά ύδατα αρκετών Ιαπωνικών πόλεων [64].

Ενδεικτικά αναφέρεται πως οι συγκεντρώσεις PFOA που ανιχνεύονται σε ύδατα είναι της τάξεως των ppq. Παρόλα αυτά το PFOA που προσδιορίστηκε στην δυτική Βιρτζίνια ήταν της τάξεως των ppt [58]. Άξιο αναφοράς είναι πως οι υψηλότερες συγκεντρώσεις (τάξεως ppb-ppm) των PFOS και PFOA προσδιορίστηκαν ύστερα από ένα περιστατικό απελευθέρωσης αφρού πυρόσβεσης, ο οποίος στην συνέχεια εισήχθη στη λίμνη Οντάριο [65].

Στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 4) παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις PFOS και PFOA που προσδιορίστηκαν σε δείγματα υδάτων από διάφορες μελέτες [38, 66, 67, 68, 69, 70] σε παγκόσμιο επίπεδο [71].

Ύστερα από μελέτες έχει βρεθεί πως τα PFOS και PFOA εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα παράκτια ύδατα παρά στα δείγματα που έχουν συλλεχθεί από τα ανοιχτά ύδατα ωκεανών, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην βιομηχανική ζώνη, η οποία λειτουργεί ως πηγή PFOS και PFOA και συνεισφέρει στη συγκέντρωση των παράκτιων υδάτων [62, 69, 72, 73, 74]



Σχήμα 4: Συγκεντρώσεις (minimum, medium, maximum) των PFOS και PFOA σε δείγματα θαλάσσιων υδάτων, τόσο από παράκτιες περιοχές όσο και από σημεία ανοιχτά των ωκεανών. Συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης της κάθε μεθόδου δίνονται ως 1,5 φορά το όριο ανίχνευσης. [71]

1.5.3. Χώμα, ιζήματα, λάσπη και λύματα

Τα PFOS και PFOA έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα χώματος, ιζημάτων και λάσπης πολλών χωρών [15, 33, 62, 75, 76, 77, 78, 79]. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα χώματος πλησίον εργοστασίου παραγωγής φθοριωμένων χημικών στην δυτική Βιρτζίνια, το PFOA προσδιορίστηκε μεταξύ των συγκεντρώσεων 0.017-700 ng/g. Το PFOA επίσης προσδιορίστηκε σε δείγματα χώματος δύο μήνες μετά από τη χρήση αφρού πυρόσβεσης για την εξάλειψη πυρκαγιάς σε εγκαταστάσεις αποθήκευσης λαδιού, η οποία εκδηλώθηκε κατόπιν σεισμού στην Ιαπωνία, και η συγκέντρωσή του υπολογίστηκε ίση με 2.87 ng/g.

PFOA έχει επίσης προσδιοριστεί σε δείγμα λυματολάσπης από περιοχή κοντά σε βιομηχανική εγκατάσταση στις Ηνωμένες Πολιτείες, σε βιομηχανική ζώνη στις Σκανδιναβικές χώρες, σε τοποθεσία απόθεσης λυμάτων στην Ιαπωνία, σε εργοστάσιο επεξεργασία λυμάτων στην Ισπανία, καθώς και σε λύματα εργοστασίων της Αυστρίας [80].

Όσον αφορά μετρήσεις PFOS και PFOA σε ιζήματα και λάσπη, από έρευνες που έχουν διεξαχθεί στον κόλπο του Σαν Φραντσίσκο είναι γνωστό πως οι συγκεντρώσεις των ενώσεων είναι της τάξεως ng/g. Όμοια, σε δείγματα ιζημάτων στις κεντρικές Σκανδιναβικές χώρες, την Ολλανδία και τις Ηνωμένες Πολιτείες, η συγκέντρωση του PFOA ήταν της κλίμακας των ng/g.

1.6 Είσοδος σε ζωικούς οργανισμούς

Ο τρόπος εισόδου σε ζωικούς οργανισμούς αποτελεί ένα περίπλοκο ζήτημα και ποικίλει μεταξύ των διαφόρων οργανισμών αλλά και των τοποθεσιών, υποδηλώνοντας την ύπαρξη πολλαπλών πηγών έκθεσης σε PFAAs. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως η πολυφθοριωμένη ένωση που συναντάται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι το PFOS, ενώ εξαίρεση αποτελούν κάποιες αστικές ή βιομηχανικές περιοχές όπου την πρώτη θέση καταλαμβάνει πλέον το PFOA [81].

Το 2001 οι Giesy και Kannan [82] έκαναν αναφορά στην παγκόσμια διασπορά του PFOS στους ζωικούς οργανισμούς, ύστερα από έρευνα που πραγματοποίησαν με σκοπό τον προσδιορισμό PFOS σε κατεψυγμένα δείγματα συκωτιού και αίματος από ζωικούς οργανισμούς. Έκτοτε, πληθώρα ερευνών έχει πραγματοποιηθεί όσον αφορά τον προσδιορισμό PFOS και PFOA σε ζωικούς οργανισμούς [83,84,85]. Από αυτές και άλλες έρευνες έχει διεξαχθεί το συμπέρασμα πως οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των PFAAs προσδιορίζονται στο ήπαρ ζώων τα οποία τρέφονται κυρίως με ψάρια και ζουν κοντά σε βιομηχανικές περιοχές. Συγκεκριμένα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην Βόρεια Αμερική οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στο ήπαρ ενός είδους δελφινιού (bottle-nose dolphin), πολικών αρκούδων, ενός είδους φώκιας (ringed seal), και ενός είδους κορμοράνων (Brandt's cormorant) [86, 87, 88, 89, 90, 91]. Αντίστοιχα, στην Ευρώπη οι υψηλότερες τιμές βρέθηκαν σε δείγματα ήπατος του ίδιου είδους φώκιας που αναφέρθηκε στις μετρήσεις της Αμερικής (ringed seal), σε ήπαρ χελιών και μπακαλιάρων [92, 93, 94]. Όμοια στην Ασία, μετρήσεις έδειξαν πως οι υψηλότερες τιμές PFAAs εντοπίστηκαν σε δείγματα ήπατος του κοινού κορμοράνου [95]. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως πολύ υψηλές συγκεντρώσεις PFOS προσδιορίστηκαν σε μια ομάδα τρωκτικών που ζούσαν κοντά σε εγκαταστάσεις παραγωγής φθοριωμένων χημικών στο Βέλγιο [96]. Τέλος PFAAs έχουν ανιχνευθεί και σε οργανισμούς απομονωμένων περιοχών της Αρκτικής [88, 89, 97, 98, 99, 100] και της Ανταρκτικής [82, 101].

Υπάρχουν διάφορες ενδείξεις από αποτελέσματα ερευνών, σχετικά με την βιοσυσσώρευση και την βιομεγέθυνση των PFOS και PFOA σε οργανισμούς που καταναλώνουν ψάρια [100, 102, 103]. Αναφέρεται επίσης πως παρατηρούνται προσωρινές μεταβολές (τόσο αύξηση όσο και μείωση της συγκέντρωσης) κυρίως σε δείγματα ήπατος ζωικών οργανισμών [87, 104, 105]. Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί το μοτίβο αυξανόμενων συγκεντρώσεων των PFAAs σε ιστούς σε σχέση με την ηλικία των οργανισμών [81, 99, 106].

1.7 Είσοδος στον άνθρωπο

Οι πληροφορίες που διατίθεται σχετικά με τις πηγές έκθεσης των ανθρώπων σε PFOS και PFOA και με τις επιπτώσεις της έκθεσης αυτής στην υγεία τους είναι περιορισμένες. Ως πιθανή πηγή εισόδου των PFOS και PFOA στον ανθρώπινο οργανισμό θεωρείται η τροφική αλυσίδα, χωρίς όμως να είναι γνωστή η σχετική συνεισφορά των διαφόρων τροφίμων. Παρόλα αυτά βάσει αρκετών μελετών θεωρείται πως η συνεισφορά των ψαριών και των θαλασσινών είναι υψηλότερη σε σχέση με τα άλλα είδη τροφίμων. Εναλλακτική πηγή εισόδου αποτελεί και η κατανάλωση πόσιμου νερού [107]. Εξίσου σημαντική θεωρείται η έκθεση των ανθρώπων σε σκόνη τόσο εσωτερικού όσο και εξωτερικού χώρου, η οποία εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της εισπνοής, της κατάποσης, και της άμεσης επαφής με το δέρμα [55, 56, 108]. Σύμφωνα με μελέτες ιδιαίτερα αυξημένη είναι η έκθεση στην οποία υπόκεινται οι εργαζόμενοι των εργοστασίων παραγωγής PFOS και PFOA ή προϊόντων τους, αλλά και η έκθεση των καταναλωτών ύστερα από χρήση των ποικίλων καταναλωτικών προϊόντων που περιέχουν PFCs [57, 61, 62, 109, 110, 111]. Επισημαίνεται πως η πρόσληψη των PFCs οφείλεται κυρίως στην κατάποση, ενώ η εισπνοή αποτελεί ένα πιο περιορισμένο τρόπο έκθεσης. Επίσης, έχει γίνει αναφορά σε πιθανή έκθεση των εμβρύων κατά την διάρκεια της κύησης μέσω του πλακούντα [112] αλλά και στην συνέχεια μέσω του θηλασμού [112, 113, 114].

1.7.1 Επιπτώσεις στην υγεία

Τα PFOS και PFOA λόγω της παρουσίας και παραμονής τους στο περιβάλλον, τα ζώα και τον ανθρώπινο οργανισμό, αποτελούν ρύπους μείζονος σημασίας για την ανθρώπινη υγεία και ως εκ τούτου η διεξαγωγή περαιτέρω ερευνών καθίσταται αναγκαία.

- **Επιπτώσεις στην υγεία των ζώων**

Από τοξικολογικές μελέτες [3, 6, 115, 116] που έχουν διεξαχθεί σε ζώα και κυρίως σε τρωκτικά έχει παρατηρηθεί πως επαναλαμβανόμενη έκθεσή τους σε PFOS και PFOA προκαλεί πληθώρα συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα, έκθεση τρωκτικών σε PFOS προκαλεί μείωση του βάρους του σώματος, αύξηση του βάρους του ήπατος, καθώς επίσης και μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα [115, 117, ,118, 119]. Επιπλέον, ύστερα από υψηλή δόση έκθεσης (20ppm) των τρωκτικών σε PFOS, παρατηρείται αύξηση των ηπατοκυτταρικών αδενωμάτων [119, 120]. Η έκθεση τρωκτικών σε PFOA επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα με αυτή σε PFOS, μόνο που δεν παρατηρείται μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης. Έκθεση σε PFOA προκαλεί ηπατοκυτταρικά αδενώματα, κυτταρικούς όγκους και όγκους των παγκρεατικών κυττάρων [121, 122, 123]. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως καμία από τις δύο ενώσεις έως τώρα δεν έχει προκαλέσει κάποιου είδους μετάλλαξη [2, 24, 115].

1. Τοξικότητα του ήπατος

Η έκθεση των τρωκτικών σε PFOS και PFOA σχετίζεται με αύξηση του ηπατικού βάρους καθώς και με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικών αδενωμάτων. Επιπλέον τα PFOS και PFOA είναι ικανά να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό υπεροξεισωμάτων [124, 125, 126, 127].

2. Επιπτώσεις στο αναπτυξιακό σύστημα

Από έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε τρωκτικά τα οποία εκτίθενται σε υψηλές δόσεις PFOS έχουν παρατηρηθεί πληθώρα συμπτωμάτων σχετικά με την ανάπτυξή τους. Μερικά από αυτά είναι η μείωση του βάρους των εμβρύων, το λυκόστομα, η καθυστερημένη οστεοποίηση, οι καρδιακές ανωμαλίες, και η μειωμένη αύξηση του βάρους των εγκύων.

Όταν τρωκτικά εκτίθενται σε PFOS κατά τη διάρκεια της κύησης, οι επιπτώσεις στην υγεία των νεογνών είναι ανάλογες της δόσης στην οποία εκτέθηκαν τα τρωκτικά. Σύμφωνα με μελέτη [128], τα βρέφη τρωκτικών που εκτέθηκαν σε δόση των 10mg/kg γεννιούνται ζωντανά, αλλά μέσα στο χρονικό

διάστημα 30-60λεπτών παρουσιάζουν ωχρότητα, αδράνεια και σύντομα πεθαίνουν. Αντίστοιχα τα βρέφη τρωκτικών που εκτέθηκαν σε 5mg/kg PFOS καταφέρνουν να επιβιώσουν για 8-12 ώρες. Γενικότερα, το 95% των βρεφών αποβιώνει εντός της πρώτης ημέρας, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό καταφέρνει να φτάσει στην ηλικία της εφηβείας.

Η νοσηρότητα και η θνησιμότητα των νεογνών έχει παρατηρηθεί πως σχετίζεται και με την επιβάρυνση του σώματός τους από πολυφθοριωμένες ενώσεις (αίμα και ήπαρ).

3. Επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα

Μελέτες έχουν διεξαχθεί με σκοπό τον προσδιορισμό των επιπτώσεων της έκθεσης τρωκτικών σε PFOA στο ανοσοποιητικό σύστημα [129, 130, 131, 132]. Τα αποτελέσματα αυτών έδειξαν πως η έκθεση αρσενικών τρωκτικών σε PFOA μέσω της διατροφής τους προκαλεί μείωση του βάρους του θύμου αδένος και του σπλήνα. Παράλληλα με τις προαναφερθείσες μεταβολές βάρους παρατηρήθηκε επίσης δραματική μείωση του βάρους του λιπώδους ιστού, η οποία εν συνεχεία προκαλεί απώλεια λίπους από τα λιποκύτταρα [133]. Ενδεικτικά αναφέρεται πως οι επιπτώσεις της έκθεσης σε PFOA είναι ανάλογες με την δόση στην οποία εκτίθενται κάθε φορά τα πειραματόζωα.

Επισημαίνεται πως ακόλουθη μείωση της χορηγούμενης ποσότητας PFOA οδηγεί σε επαναφορά του σπλήνα και του θύμου αδένος στο φυσιολογικό τους βάρος μέσα σε 5 και 10 ημέρες αντίστοιχα, σε αντίθεση με τις πιο επίμονες επιπτώσεις που παρατηρούνται στο βάρος του ήπατος και στον πολλαπλασιασμό των ηπατικών υπεροξεισωμάτων. Η σχετικά σύντομη ανάκτηση του ηπατικού βάρους καθώς και του βάρους του θύμου αδένος, είναι αναμενόμενη, λαμβανομένου υπόψη του χρόνου ημιζωής του PFOA, ο οποίος στα τρωκτικά κυμαίνεται μεταξύ των 5-20 ημερών [134].

Για την αξιολόγηση των επιπτώσεων της δερματικής έκθεσης των τρωκτικών σε PFOA χορηγήθηκε παράλληλα το αντιγόνο वालουμίνη και παρατηρήθηκε αύξηση των IgE. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων θεωρείται

πως το PFOA έχει ανοσοτοξική δράση και η έκθεση σε αυτό μπορεί να αυξήσει την απόκριση IgE σε περιβαλλοντικά αλλεργιογόνα [135].

4. Ορμονικές διαταραχές

Σύμφωνα με έρευνες [119, 128, 136, 137] που έχουν πραγματοποιηθεί έχει παρατηρηθεί πως έκθεση τρωκτικών σε PFOS προκαλεί καταστολή των ορμονών τριϊωδοθυρονίνη (T3) και θυροξίνη (T4) του θυρεοειδούς αδένου. Η ενδομήτρια (in utero) έκθεση τρωκτικών έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της T3 και T4, αλλά και την μειωμένη ανάπτυξη του εγκεφάλου των νεογνών καθώς οι ορμόνες του θυρεοειδούς είναι υπεύθυνες για αυτό [128, 136]. Παρόλα αυτά ύστερα από έκθεση των νεογνών σε PFOS δεν παρατηρείται επιρροή στην ικανότητα μάθησης και μνήμης τους. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως διαταραχές των ορμονών του θυρεοειδούς ύστερα από έκθεση σε PFOS και PFOA έχουν σημειωθεί μόνο σε τρωκτικά, ενώ στους ανθρώπους δεν παρατηρείται καμία μεταβολή [138, 139, 140].

Η έκθεση σε PFOS και PFOA προκαλεί επίσης διαταραχές στην βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών [122, 141, 142, 143, 144]. Συγκεκριμένα, αποτελέσματα διαφόρων μελετών έδειξαν πως έκθεση αρσενικών τρωκτικών σε PFOA για 14 ημέρες οδηγεί σε μείωση των επιπέδων τεστοστερόνης τόσο στο αίμα όσο και στους όρχεις. Αντίστοιχα, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων οιστραδιόλης στο αίμα. Η αύξηση της οιστραδιόλης σχετίζεται άμεσα με την αύξηση της ορμονικής σύνθεσης του ήπατος που διεξάγεται με ηπατική αρωματάση. Τα θηλυκού γένους τρωκτικά εμφανίζουν διαταραχές στην έμμηνο ρύση και αύξηση των επιπέδων κορτικοστερόνης στο αίμα τους, ενώ παρατηρείται μείωση των επιπέδων λεπτίνης στο αίμα και νορεπινεφρίνης στους υποθαλάμους [145].

Ως επακόλουθο αυτών των ορμονικών διαταραχών στα τρωκτικά που υπόκεινται σε χρόνια έκθεση σε PFOA αναφέρεται η δημιουργία κυτταρικών αδενωμάτων [122, 143, 146]. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων η EPA χαρακτηρίζει το PFOA ως πιθανή καρκινογόνο ένωση για τα ζώα [147].

5. Επιπτώσεις στο νευρικό σύστημα

Η έκθεση τρωκτικών σε PFOS και PFOA έχει επίσης συνδιαστεί με μαθησιακές και κινησιολογικές δυσλειτουργίες [148, 149, 150]. Ενήλικα τρωκτικά που εκτίθενται σε μικρές δόσεις εμφανίζουν νευρολογικές διαταραχές όπως αλλαγή συμπεριφοράς και συνήθους ικανότητας. Όσον αφορά έκθεση νεογνών σε PFOS και PFOA έχουν σημειωθεί αλλαγές σε πρωτεΐνες (tau, synaptophysin) οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου [151].

• Επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων

Μελέτες επιδημιολογικής και ιατρικής παρακολούθησης έχουν διεξαχθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες σε εργαζόμενους που εκτίθενται καθημερινά σε PFOS. Στα αποτελέσματα αυτών σημειώνεται αυξημένη θνησιμότητα, εμφάνιση κρουσμάτων καρκίνου [152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160] και ενδοκρινολογικές διαταραχές [161]. Παράλληλα εξετάζεται η συσχέτιση της παρουσίας PFOS και PFOA στο αίμα, με τις αιματολογικές, ορμονολογικές και κλινικές παραμέτρους [30, 138, 158, 163, 164]. Επισημαίνεται πως δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων υπερφθοριωμένων ενώσεων στον ορό του αίματος με συγκεκριμένες ασθένειες.

Αντίστοιχη μελέτη σε εργαζόμενους εκτιθέμενους σε PFOS έδειξε στατιστικά μη σημαντική επίδραση στη θνησιμότητα για τους περισσότερους τύπους καρκίνου και μη κακοήγη αίτια [155]. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε μία αυξανόμενη εμφάνιση καρκίνου του προστάτη σε άντρες εργαζόμενους οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε PFOS για τουλάχιστον ένα χρόνο [128, 155, 165, 166, 167, 168, 169].

Μελέτες σε εργαζόμενους καθημερινά εκτιθέμενους σε PFOA στις Ηνωμένες Πολιτείες, εστίαστηκαν κυρίως στον ανδρικό πληθυσμό. Αξιοσημείωτο είναι πως ενώ σε παλαιότερες μελέτες είχε παρατηρηθεί εμφάνιση καρκίνου του προστάτη σε άντρες εργαζόμενους οι οποίοι εκτίθενται σε PFOA, σε πιο πρόσφατη μελέτη δεν παρατηρείται αυτή η συσχέτιση. Σε μία άλλη μελέτη σχετικά με την εμφάνιση καρκίνου που πραγματοποιήθηκε σε ένα άλλο

εργοστάσιο, οι ρυθμοί εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης και των νεφρών παρουσίαζαν αύξηση.

Μελέτη σχετικά με τα επίπεδα των ορμονών έδειξε πως οι εργαζόμενοι με τα υψηλότερα επίπεδα PFOA στο αίμα τους παρουσίαζαν και μία αύξηση της οιστραδιόλης στο αίμα. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε επίσης πως τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων σχετίζονται με την έκθεση των ανθρώπων σε PFOA, γεγονός που δε συνάδει με υπολιπιδεμικές επιπτώσεις που εμφανίζουν τα τρωκτικά [170]. Επιπλέον παρατηρήθηκε πως η έκθεση των εργαζομένων σε PFOA προκαλεί αύξηση της τριϊωδοθυρονίνης (T3) [171].

Επισημαίνεται, πως στους ανθρώπους μόνο σε μία έρευνα αναφέρεται εμφάνιση νευροτοξικών παθήσεων ύστερα από έκθεση ανθρώπου σε PFOS και PFOA. Συγκεκριμένα, σε έρευνα όπου συλλέχθηκαν στοιχεία από την Danish International Birth Cohort για την κατάσταση της υγείας 1400 εγκυμονούντων γυναικών και των παιδιών τους, σημειώθηκε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PFOS της μητέρας και της καθυστερημένης κινησιολογικής ανάπτυξης των νεογνών. Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση των επιπέδων PFOS και PFOA των μητέρων με άλλους βασικούς δείκτες ανάπτυξης των νεογνών [172].

1.7.2. Μετρήσεις στο αίμα

Τα PFOS και PFOA εφόσον αποτελούν αμφίφιλες ενώσεις δεν βιοσυσσωρεύονται στον λιπώδη ιστό όπως τα άλλα POPs, αλλά απορροφώνται και δεσμεύονται στις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο αίμα και βιοσυσσωρεύονται κυρίως σε όργανα όπως το ήπαρ, ο νεφρός, ο σπλήνας, καθώς επίσης στους όρχεις και τον εγκέφαλο [5, 145, 173, 174]. Τα PFOS και PFOA λόγω μεγάλου χρόνου ημιζωής αποβάλλονται με πολύ αργό ρυθμό από τον οργανισμό. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ημιζωής στον ορό του αίματος έχει υπολογιστεί 3.8 και 5.4 χρόνια για το PFOA και το PFOS αντίστοιχα, ενώ ο χρόνος παραμονής τους σε όργανα είναι ακόμη μεγαλύτερος [175]. Ενδεικτικά αναφέρεται πως τα επίπεδα των PFOS και PFOA που παρατηρούνται στον ορό του αίματος είναι 2

με 3 φορές υψηλότερα από τα αντίστοιχα στα άλλα συστατικά του αίματος [176, 177].

Από έρευνα [178] που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα αίματος κατοίκων της Αθήνας (αστική περιοχή), κατοίκων ημιαστικών και αγροτικών περιοχών, αλλά και καρκινοπαθών στην Ελλάδα, παρατηρήθηκε πως τα PFOS και PFOA ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν. Οι συγκεντρώσεις του PFOS που προσδιορίστηκαν ήταν υψηλότερες συγκριτικά με αυτές του PFOA, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις και των δύο εμφανίστηκαν στα δείγματα αίματος των κατοίκων της Αθήνας (14.9 ng/ml για το PFOS και 3.9 ng/ml για το PFOA). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν να συμφωνούν με αυτά άλλων μελετών σε διάφορες Ευρωπαϊκές χώρες.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, έχουν αναλυθεί περισσότερα από 1000 δείγματα αίματος, καθώς και περισσότερα από 1800 αναμειγμένα δείγματα αίματος, συμπεριλαμβανομένων δειγμάτων δωρητών του ερυθρού σταυρού [31, 175, 179, 180, 181], συμμετεχόντων σε διεθνείς έρευνες [182] εργαζομένων εκτιθέμενων σε PFCs [183] και ηλικιωμένων [184]. Ύστερα από επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των προσδιορισθέντων τιμών για διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές, καθώς επίσης και για διαφορετικές ηλικίες και φύλων των ανθρώπων. Παρόλο που υπήρχε εμφανής διακύμανση μεταξύ των αποτελεσμάτων (συγκεντρώσεις κοντά στο όριο ανίχνευσης αλλά και συγκέντρωση 1600 ng/ml PFOS από δωρητές του ερυθρού σταυρού) η μέση συγκέντρωση του PFOS κυμαινόταν στα 20-30 ng/ml PFOS, ενώ η συγκέντρωση του PFOA κυμαινόταν σε χαμηλότερα επίπεδα.

Ωστόσο τα επίπεδα PFOS και PFOA έρευνας αντίστοιχου αριθμού δειγμάτων αίματος στην Ιαπωνία [185, 186, 187] και την Κίνα [188] κυμαίνονταν σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα.

Από μελέτη στην οποία αναλύθηκαν δείγματα αίματος από διάφορες χώρες παρατηρήθηκε πως εκτός από τις Ηνωμένες Πολιτείες, υψηλές συγκεντρώσεις εμφανίζονται και στα δείγματα που προέρχονται από την

Πολωνία (55 ng/ml για δείγμα άντρα και 33 ng/ml για δείγμα γυναίκας) και την Ινδία (3 ng/ml για δείγμα γυναίκας και άντρα).

Μεταξύ αυτών των δύο ακραίων συγκεντρώσεων ήταν και οι τιμές PFOS και PFOA που προσδιορίστηκαν στα δείγματα αίματος από το Βέλγιο, την Κορέα, την Μαλαισία, την Βραζιλία, την Ιταλία και την Κολομβία. Σε άλλες έρευνες που έχουν διεξαχθεί στην Γερμανία [189], τον Καναδά [190] και την Αυστραλία [191, 192], οι συγκεντρώσεις που έχουν προσδιορισθεί είναι υψηλότερες των 10ng/ml, αλλά αρκετά χαμηλότερες των συγκεντρώσεων από τα δείγματα των Ηνωμένων Πολιτειών.

Όσον αφορά στην Ευρώπη, αν εξαιρεθούν οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στα δείγματα της Πολωνίας, στις περισσότερες χώρες η μέση συγκέντρωση του PFOS κυμαίνεται μεταξύ 10-30 ng/ml, και του PFOA μεταξύ 3-10 ng/ml.

Ύστερα από στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων διαφόρων ερευνών έχει παρατηρηθεί διαφορά των συγκεντρώσεων PFOS και PFOA μεταξύ του αντρικού και γυναικείου πληθυσμού. Σε πληθώρα μελετών [181, 185, 186, 192, 193, 194] συμπεριλαμβανομένης έρευνας που πραγματοποιήθηκε στον ελληνικό πληθυσμό [178], αναφέρεται πως οι συγκεντρώσεις PFOS και PFOA σε δείγματα αίματος αντρών εμφανίζονται αισθητά υψηλότερες από αυτές στο αίμα των γυναικών. Παρόλα αυτά σε κάποιες άλλες μελέτες [184, 195, 196] δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά των επιπέδων PFOS και PFOA που να εξαρτάται από το φύλο του δότη. Αυτή η αμφιγνωμία πιθανότατα οφείλεται στο διαφορετικό σχεδιασμό των μελετών, στον διαφορετικό αριθμό δειγμάτων που αναλύονται αλλά και στο γεγονός πως σε κάποιες έρευνες τα δείγματα αίματος που χρησιμοποιούνται είναι αναμεμιγμένα, ενώ σε άλλες όχι.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται επίσης για πιθανή συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας των δοτών αίματος και των συγκεντρώσεων PFOS και PFOA στο αίμα αυτών. Τα αποτελέσματα των μελετών δίστανται καθώς κάποιες μελέτες αναφέρουν μία αύξηση της συγκέντρωσης των PFCs στο αίμα

ανάλογη με την ηλικία [191, 192, 196], ενώ στην πλειοψηφία των μελετών αναφέρεται πως δεν παρατηρείται καμία συσχέτιση [179, 181, 182, 184, 193, 194, 195]. Η ασυμφωνία αυτή μεταξύ των αποτελεσμάτων διαφόρων μελετών αποδίδεται στους προαναφερθέντες παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν και τη συσχέτιση μεταξύ του φύλου και των επιπέδων PFCs στο αίμα. Η μη συσχέτιση της ηλικίας με την βιοσυσσώρευση των PFCs στον άνθρωπο, μπορεί ακόμα να αποδοθεί στην συγγένεια των ενώσεων αυτών με τις λιποπρωτεΐνες, γεγονός που τις καθιστά ικανές να ανταγωνίζονται επιτυχώς τους φυσικούς υποκαταστάτες, όπως η χοληστερόλη, και τα ηπατικά λιπαρά οξέα για την πρόσδεσή τους σε πρωτεΐνες (liver fatty acid binding protein, L-FABP) [5].

Αξιοσημείωτη είναι η προσπάθεια καταγραφής των χρόνιων τάσεων των επιπέδων PFCs στον άνθρωπο, ως μέσο αξιολόγησης της περιβαλλοντικής ρύπανσης και της εξέλιξής της. Οι μελέτες αυτές έχουν καλύψει αρκετές χρονικές περιόδους ξεκινώντας από την δεκαετία του 1980. Μία εξ αυτών είναι η μελέτη Νορβηγών ερευνητών η οποία κατέγραψε τις τάσεις αύξησης και μείωσης των PFOS και PFOA 57 αναμεμιγμένων δειγμάτων αίματος για χρονική περίοδο 30 ετών [196]. Σύμφωνα με την μελέτη αυτή σημειώθηκε τάση αύξησης των συγκεντρώσεων των PFOS και PFOA από το έτος 1976 έως το 2001, με τις υψηλότερες καταγραφόμενες συγκεντρώσεις να είναι 4.9 ng/ml για το PFOA το έτος 2001 και 30 ng/ml για το PFOS το έτος 2000. Τα επόμενα χρόνια ακολούθησε μείωση των συγκεντρώσεων και των δύο ενώσεων.

Αντίστοιχες παρατηρήσεις αναφέρθηκαν σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον ερυθρό σταυρό της Αμερικής, όπου σημειώθηκε μείωση των επιπέδων των PFOS και PFOA στον ορό και το πλάσμα του αίματος από έτος 2000 έως το 2006 [181, 193].

Έρευνα της Ιαπωνίας αναφέρει αύξηση των επιπέδων του PFOS έως τα τέλη της δεκαετίας του 1980 και στην συνέχεια μείωση, ενώ σταθερή αύξηση των επιπέδων του PFOA σημειώνεται από το 1983 έως το 2004 [187].

1.8 Συγκέντρωση σε τρόφιμα

Τα PFOS και PFOA, όπως προαναφέρθηκε, εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό με διάφορους τρόπους, κυρίως όμως μέσω της κατάποσης (διατροφή, πόσιμο νερό και σκόνη). Παρά το γεγονός πως τα PFOS και PFOA χαρακτηρίζονται εν γένει ως μέτριας τοξικότητας χημικά προϊόντα, κατά την κατάποση μετατρέπονται σε ιδιαίτερα επιβλαβείς ενώσεις (“harmful if swallowed”) [197, 198, 199, 200, 201]. Στα πλαίσια αυτά, παρόλο που η κατανάλωση ψαριών συνεισφέρει ιδιαίτερα στην παρουσία PFOS και PFOA στον ανθρώπινο οργανισμό, η σχετική συνεισφορά του κάθε τροφίμου δεν έχει καθοριστεί πλήρως, γεγονός που κατά ένα ποσοστό οφείλεται στην ποικιλία των τρόπων μέσω των οποίων μπορεί ένα τρόφιμο να επιβαρυνθεί. Αναλυτικότερα, τα τρόφιμα μπορεί να περιέχουν PFCs λόγω της προέλευσής τους, δηλαδή εξαιτίας του γεγονότος πως προέρχονται από ζώα που έχουν επιμολυνθεί με PFCs λόγω της έκθεσής τους στον ατμοσφαιρικό αέρα, στο νερό, είτε και σε τροφές με PFCs. Τα τρόφιμα μπορούν επίσης να μολυνθούν λόγω διαφόρων διαδικασιών στις οποίες υπόκεινται (μαγειρική, συσκευασία, μεταφορά). Αύξηση της περιεκτικότητας των τροφίμων σε PFOS και PFOA προκαλεί και η παρουσία πρόδρομων ενώσεών τους σε ένα από τα προαναφερθέντα στάδια. Συγκεκριμένα η παρουσία PFOSAs σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης συμβάλει στην περιεκτικότητα των τροφίμων σε PFOS, εφόσον μεταβολίζεται σε αυτό. Επιπλέον, η παρουσία N-ethyl PFOSA στις συσκευασίες τροφίμων μπορεί να λειτουργήσει ως πηγή PFOS [198]. Τέλος, οι βολβοί και οι ρίζες (καρότα, κρεμμύδια κλπ) μπορούν να μολυνθούν με PFCs μέσω του εδάφους, εάν το τελευταίο είναι επιβαρυνμένο με τις ενώσεις αυτές.

Επιπλέον η γεωγραφική προέλευση εμφανίζεται να συνεισφέρει στη μεταβολή των συγκεντρώσεων των PFOS και PFOA στα διάφορα είδη τροφίμων [202].

Παρά την σημαντικότητα της έκθεσης των ανθρώπων σε PFOS και PFOA μέσω της διατροφής, ο αριθμός των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί σε

διάφορα είδη τροφίμων μέχρι σήμερα είναι περιορισμένος, με μερικές εξ αυτών να αναφέρονται ακολούθως.

Το 2001 η U.S. EPA προσδιόρισε PFOS και PFOA σε μια ποικιλία τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων φασολιών, μήλων, γάλακτος, κοτόπουλου, αυγών, χοίρου, ψωμιού, hot dog, ψαριών και βοδιών. Στα περισσότερα δείγματα η συγκέντρωση των PFOS και PFOA προσδιορίστηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης (0.5 ng/g). Η υψηλότερη συγκέντρωση PFOA (2.35 ng/g ww) ανιχνεύτηκε σε δείγμα μήλου το οποίο προερχόταν από την περιοχή της Alabama όπου υπάρχει εγκατάσταση παραγωγής PFOA (3M company). Αντίστοιχα, η υψηλότερη συγκέντρωση του PFOS (0.85 ng/g ww) προσδιορίστηκε σε δείγμα γάλακτος προερχόμενο από τη Φλόριντα και την Pensacola [203].

Όσον αφορά σε Ευρωπαϊκές χώρες, το 2006 δημοσιεύτηκαν από την UK Food Agency τα αποτελέσματα έρευνας στην οποία αναλύθηκαν 20 δείγματα τροφίμων τα οποία συλλέχθηκαν το 2004. Το PFOS προσδιορίστηκε άνω του ορίου ανίχνευσης στα δείγματα πατάτας, κονσερβοποιημένων λαχανικών, αυγών, και ζάχαρης, με την υψηλότερη συγκέντρωση στις πατάτες (10 ng/g ww) (φρέσκιες, συσκευασμένες-chips, τηγανιτές, και κροκέτες). Το PFOS επίσης προσδιορίστηκε σε κονσερβοποιημένα λαχανικά σε συγκέντρωση 2 ng/g, σε αυγά 1 ng/g και στη ζάχαρη και τα γλυκά 1 ng/g. Το PFOA προσδιορίστηκε μόνο σε δείγματα πατάτας (1 ng/g ww), ενώ στα υπόλοιπα δείγματα η συγκέντρωσή του ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης. Η υπολογιζόμενη μέση ημερήσια πρόσληψη (Total Dietary Intake, TDI) για το PFOS σε ενήλικες ήταν ίση με 130 ng/kg ανά ημέρα, ενώ η μέγιστη ημερήσια πρόσληψη ήταν 220 ng/kg ανά ημέρα. Αντίστοιχα για το PFOA η μέση ημερήσια πρόσληψη ήταν 70 ng/kg ανά ημέρα και η μέγιστη 130 ng/kg ανά ημέρα. Παρατηρείται πως οι υπολογιζόμενες ημερήσιες προσλήψεις είναι χαμηλότερες από τα θεσπισμένα ανεκτά όρια ημερήσιας πρόσληψης (tolerable daily intakes, TDI) [204].

Στην επόμενη μελέτη της U.K. Food Agency αναλύθηκαν κατά τη διάρκεια των ετών 2008-2009 199 δείγματα διαφόρων τροφίμων, με έμφαση σε αυτά που

στην προηγούμενη μελέτη είχαν παρουσιάσει PFOS και PFOA (πατάτες και λαχανικά), καθώς και σε αυτά που η παρουσία των PFOS και PFOA ήταν αναμενόμενη (ψάρια και εντόσθια ζώων). Σε όλα σχεδόν τα δείγματα κρέατος, συμπεριλαμβανομένων και των εντοσθίων οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν κάτω του LOD (1 µg/kg). Το PFOS ανιχνεύθηκε στα περισσότερα είδη τροφίμων, με αυξημένη συγκέντρωση κυρίως στα ψάρια, τα καβούρια, καθώς επίσης και στο ήπαρ και οι νεφροί διαφόρων δειγμάτων. Οι δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στα δείγματα καπνιστού χελιού (59 µg/kg f.w.) και μαρίδας (40 µg/kg f.w.). Επισημαίνεται πως το PFOS δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα δείγμα κρέατος, πατάτας, popcorn, δημητριακών, φυτικών ελαίων ή ιχθυελαίων. Το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκε PFOS στα δείγματα πατάτας και των παραγώγων της, ενώ στην προηγούμενη μελέτη ήταν από τα λίγα είδη τροφίμων στα οποία προσδιορίστηκε αποτελεί ένα αναπάντητο ερώτημα. Η αυξημένη συγκέντρωση του PFOS στην προηγούμενη μελέτη πιθανόν να οφείλεται στη σημαντική συνεισφορά ενός μικρού πολύ ρυπασμένου τμήματος του δείγματος. Το PFOA ανιχνεύθηκε σε ένα δείγμα μαρίδας, έξι δείγματα μπακαλιάρου και τρία ήπατος, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-8 µg/kg). Η υπολογιζόμενη μέση ημερήσια πρόσληψη για το PFOS και για το PFOA ήταν ίση με 100 µg/kg bodyweight/day, ενώ η ανώτερη ημερήσια πρόσληψη ήταν ίση με 200 µg/kg bodyweight/day και για τις δύο ενώσεις [205].

Σε αντίστοιχη μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο αναλύθηκαν 10 δείγματα ωμών τροφίμων με σκοπό τον προσδιορισμό PFOS και PFOA. Το PFOS ανιχνεύθηκε στα δείγματα γάλακτος και σε ένα δείγμα βοδιού που αναλύθηκαν (0.573-0.852ng/g), και το PFOA στα δύο δείγματα βοδιού, δύο μήλων, ενός ψωμιού και πράσινου φασολιού σε συγκεντρώσεις μεταξύ των 0.504-2.35 ng/g [206].

Σε παρόμοια μελέτη αναλύθηκαν 54 δείγματα τροφίμων τα οποία αποτελούσαν τμήμα των δειγμάτων της Canadian Total Diet Study (TDS) και συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των ετών 1992-2004 [198]. Η δειγματοληψία συνεχίστηκε έως και το 2004, παρά την μείωση της παραγωγής του PFOS το έτος 2002. Τα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ψάρια, θαλασσινά, κρέας,

πουλερικά, κατεψυγμένα εντόσθια, Microwave popcorn και fast food, και οι συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA κυμαίνονταν στα ίδια επίπεδα με αυτά των προαναφερθέντων μελετών που είχαν διεξαχθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο [206]. Αναλυτικότερα, το PFOA εμφάνισε υψηλές συγκεντρώσεις στα δείγματα microwave popcorn (3.6 ng/g ww) και σε ψητό βοδινό (2.6 ng/g ww), ενώ το PFOS σε βοδινή μπριζόλα (2.7 ng/g ww) και ψάρια αλμυρού νερού (2.6 ng/g ww). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 0.4-0.5 ng/g ww και η υπολογιζόμενη μέση ημερήσια πρόσληψη για το PFOS ήταν 110 ng/day και για το PFOA 70 ng/day.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Καταλονία της Ισπανίας, το έτος 2006 [207], το PFOS προσδιορίστηκε στα 25 από τα 36 δείγματα που αναλύθηκαν, με υψηλότερη συγκέντρωση 0.064 ng/g ww σε ένα μίγμα ωμών ψαριών, το οποίο περιείχε σολομό, τόνο και σαρδέλα. Το PFOA προσδιορίστηκε μόνο σε δείγμα γάλακτος σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (0.055 και 0.058 ng/g ww). Η ημερήσια πρόσληψη PFOS ενός ανθρώπου 70kg προσδιορίστηκε μεταξύ 62.5 και 74.2 ng/day.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της παραπάνω έρευνας στην Ισπανία παρουσίασε μελέτη [201] που πραγματοποιήθηκε στη Νορβηγία σε 21 δείγματα τροφίμων. Σε αυτή παρατηρήθηκε πως οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του PFOS και του PFOA εμφανίζονταν στα δείγματα ήπατος του μπακαλιάρου (PFOS 300 pg/g f.w. και PFOA 51 pg/g f.w.), στον μπακαλιάρo (PFOS 100 pg/g f.w. και PFOA 30 pg/g f.w.), στον σολωμό (PFOS 55 pg/g f.w. και PFOA 46 pg/g f.w.), και στον κολιό (PFOS 43 pg/g f.w. και PFOA 24 pg/g f.w.). Επισημαίνεται πως τα επίπεδα των PFOS και PFOA που προσδιορίστηκαν στην μελέτη αυτή κυμαίνονται στο ίδιο εύρος με αυτά δύο ερευνών στην Ισπανία [207, 208] αλλά σε λίγο χαμηλότερα συγκριτικά με αυτά της UK Total Diet [205] και σε δύο μελέτες του Καναδά [198, 209]. Επίσης οι συγκεντρώσεις που παρουσιάστηκαν σε αυτή την έρευνα ήταν χαμηλότερες συγκριτικά με έρευνα της Σουηδίας [210], του Καναδά [211], της Νορβηγίας [212], και της Μεσογείου [213], ενώ τα αποτελέσματα μιας έρευνας στην Ολλανδία [214] ήταν σε συγκρίσιμα επίπεδα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρατηρείται πως το PFOS εμφανίζεται σε μεγαλύτερη αφθονία σε δείγματα ζωικής προέλευσης. Αντίθετα το PFOA εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις 3-10 φορές υψηλότερες από του PFOS σε δείγματα μη ζωικής προέλευσης. Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν με την παρατηρούμενη αυξημένη βιοσυσσώρευση του PFOS σε σχέση με το PFOA σε ζωικούς οργανισμούς [215].

1.9 Μέθοδοι προσδιορισμού

Λαμβάνοντας υπόψη την επικινδυνότητα της έκθεσης των ανθρώπων μέσω της διατροφής σε PFOS και PFOA, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη εξειδικευμένης μεθόδου προσδιορισμού των δύο ενώσεων σε διάφορα είδη τροφίμων.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του PFOS και του PFOA σε διάφορα είδη τροφίμων βασίζεται στην υγρή χρωματογραφία και στην χρήση φασματογράφου μάζας, μετά από κατάλληλη εκχύλιση και καθαρισμό του δείγματος [216]. Το στάδιο εκχύλισης πραγματοποιείται συνήθως με χρήση διαλυτών (κυρίως MeOH) σε μη αυτοματοποιημένες τεχνικές (soxhlet) [198, 201, 205, 207], ενώ το καθαρισμό πραγματοποιείται συνήθως με χρήση στηλών OASIS WAX (weak anion exchange) [201, 205, 207]. Σε κάποιες μελέτες πραγματοποιείται και δεύτερο στάδιο καθαρισμού με χρήση στηλών ENVI-carb [201, 207], ενώ σε άλλες μελέτες δεν αναφέρεται στάδιο καθαρισμού [198].

Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων με LC-MS/MS όπου ως μέθοδος ιονισμού εφαρμόζεται ο αρνητικός ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI) και ως αναλυτής μάζας χρησιμοποιείται τριπλό τετράπολο (triple quadrupole). Σύμφωνα με τον Ericson et al., 2008 [207] ο προσδιορισμός με LC-MS δεν αποτελεί εξειδικευμένη μέθοδο καθώς λαμβάνει χώρα ταυτόχρονη έκλυση και άλλων ουσιών εκτός του PFOS σε m/z 499. Αντίστοιχα, η χρήση GC-MS δεν αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για τον προσδιορισμό των PFOS και PFOA, καθώς η μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία. Επιπλέον, για τον προσδιορισμό με GC-MS το στάδιο

καθαρισμού του δείγματος καθίσταται αρκετά περίπλοκο. Ως εκ τούτου, το LC-MS/MS αποτελεί την καταλληλότερη μέθοδο για τον προσδιορισμό των PFOS και PFOA καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση.

Στην παρούσα εργασία ύστερα από δοκιμές των τεχνικών που προαναφέρθηκαν τόσο στο στάδιο εκχύλισης όσο και στο καθαρισμού, βρέθηκε πως καλύτερη επεξεργασία του δείγματος πραγματοποιείται με την σύγχρονη αυτοματοποιημένη μέθοδο εκχύλισης ASE (accelerated solvent extractor), και με καθαρισμό SPE (solid phase extraction) με στήλες C₁₈. Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του PFOS και του PFOA με LC-MS/MS (ESI negative mode ionization και triple quadrupole detection).

Η ανάπτυξη της τελικής μεθόδου, καθώς και των προηγούμενων δοκιμαστικών, βασίστηκε στην μέθοδο ισοτοπικής αραίωσης, με τη χρήση επισημασμένων εσωτερικών προτύπων, η οποία παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ / ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Η επικύρωση (**validation**) της μεθόδου αποτελεί μια απαραίτητη διαδικασία για τον χαρακτηρισμό και την αξιολόγηση μιας μεθόδου, αλλά και την σύγκριση ή επιλογή μεταξύ δύο μεθόδων. Κατά την επικύρωση εξετάζονται τα χαρακτηριστικά ποιότητας αναλύσεως της μεθόδου, τα οποία εν συνεχεία αξιολογούνται ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε μεθόδου. Μία μέθοδος μπορεί να χαρακτηριστεί ως επικυρωμένη, όταν τα χαρακτηριστικά ποιότητάς της εμφανίζονται επαρκή και κατάλληλα για την αντιμετώπιση ενός αναλυτικού προβλήματος.

Η επικύρωση της μεθόδου διεξάγεται με χρήση κατάλληλου και επαρκώς βαθμονομημένου εξοπλισμού, από έμπειρους αναλυτές. Ως αποτέλεσμα, καθίσταται δυνατή η σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, καθώς και η λήψη αποφάσεων σχετικών με τον τρόπο εφαρμογής της μεθόδου.

Επικυρώνονται:

- Μη πρότυπες μέθοδοι
- Μέθοδοι που σχεδιάζονται από το Εργαστήριο (In house methods)
- Πρότυπες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται εκτός αντικειμένου
- Ενισχυμένες και τροποποιημένες πρότυπες μέθοδοι

Η έκταση της επικύρωσης συνήθως εξαρτάται από τις ανάγκες της δεδομένης εφαρμογής ή του πεδίου εφαρμογής. Για την διεξαγωγή της πραγματοποιείται:

- Χρήση προτύπων αναφοράς ή υλικών αναφοράς
- Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες πρότυπες μεθόδους αναφοράς
- Διεργαστηριακές συγκρίσεις

- Συστηματική αξιολόγηση παραγόντων που επηρεάζουν το αποτέλεσμα
- Αξιολόγηση αβεβαιότητας αποτελεσμάτων με βάση τις θεωρητικές αρχές και πρακτική εμπειρία

Απαραίτητη, επίσης, θεωρείται και η διεξαγωγή **επαλήθευσης (verification)**, όπου μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης αποδεικνύεται πως η επικυρωμένη μέθοδος εξακολουθεί να ανταποκρίνεται προς τις απαιτούμενες προδιαγραφές.

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας μιας μεθόδου που εξετάζονται προκειμένου αυτή να επικυρωθεί είναι τα ακόλουθα:

- **Ειδικότητα και Εκλεκτικότητα (specificity and selectivity)**

Μία μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ειδική για έναν αναλύτη, εάν η συγκέντρωσή του μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια, χωρίς να υπάρχει επίδραση από τα άλλα συστατικά του δείγματος (παρεμποδιστές). Αναλυτικότερα, ο έλεγχος ειδικότητας πραγματοποιείται με σκοπό την αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου ως προς την ικανότητά της να διακρίνει τον αναλύτη από γνωστές προσμίξεις, υπολλείματα πρώτων υλών της σύνθεσης, μεταβολίτες, προϊόντα διασπάσεως και συστατικά του μητρικού υλικού του δείγματος. Όλα τα συστατικά του δείγματος, εκτός του αναλύτη, δεν παράγουν αναλυτικό σήμα. Η διερεύνηση της ειδικότητας μιας μεθόδου είναι απαραίτητη κυρίως σε ελέγχους ταυτοποίησης, προσδιορισμών προσμίξεων και ποσοτικών προσδιορισμών. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως αυτό το χαρακτηριστικό είναι κατά κύριο λόγο συνάρτηση της χρησιμοποιούμενης τεχνικής μέτρησης, μπορεί όμως να ποικίλει ανάλογα με την κατηγορία της ένωσης ή της μήτρας.

Αντίστοιχα, η εκλεκτικότητα μιας μεθόδου χαρακτηρίζει τη δυνατότητα της μεθόδου να παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μείγματος χωρίς να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως αρκετές φορές η διάκριση μεταξύ των δύο όρων δεν είναι ευκρινής και ως εκ τούτου χρησιμοποιούνται ισοδύναμα.

Η εξειδίκευση και η ειδικότητα της μεθόδου αποτελούν δύο από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά μιας μεθόδου καθώς η καταγραφή του σήματος που έχει αποδοθεί στην προσδιορισθείσα ουσία, πρέπει να αποτελεί αποκλειστικά καταγραφή του σήματος αυτής και όχι κάποιας φυσικά ή χημικά παρόμοιας ουσίας που υπάρχει στο δείγμα. Το ποσοστό επιρροής άλλων ουσιών κατά την μέτρηση της προσδιορισθείσας ουσίας, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την διαδικασία απομόνωσης της ουσίας κατά την αναλυτική επεξεργασία της, καθώς επίσης και από το βαθμό ευαισθησίας και επιλεκτικότητας του οργάνου.

- **Γραμμικότητα (linearity)**

Η γραμμικότητα εξετάζεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) μιας αναλυτικής μεθόδου. Αποδεικνύεται είτε απευθείας στην καθαρή προσδιοριζόμενη ουσία, είτε/και με ξεχωριστές ζυγίσεις συνθετικού μείγματος των συστατικών ενός προϊόντος, και εφαρμογή της ελεγχόμενης αναλυτικής μεθόδου (εξετάζεται κατά τον έλεγχο της περιοχής συγκεντρώσεων). Επιπλέον, η γραμμικότητα μπορεί να αποδειχθεί με οπτική εξέταση του διαγράμματος 'αναλυτικό σήμα ως προς συγκέντρωση ή περιεκτικότητα του αναλύτη'.

- **Εύρος εργασίας (working & linear ranges)**

Το εύρος εργασίας ή αναλυτική περιοχή, ορίζεται από το ανώτερο και κατώτερο όριο συγκεντρώσεων ή ποσοτήτων της προσδιορισθείσας ουσίας, που μπορούν να προσδιοριστούν με προκαθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Το κατώτερο όριο του εύρους αντιστοιχεί συνήθως στις τιμές της συγκέντρωσης του ορίου ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης, ενώ αντίστοιχα το ανώτερο όριο της συγκέντρωσης του εύρους ποικίλει ανάλογα με τον ηλεκτρονικό εξοπλισμό που χρησιμοποιείται.

- **Ακρίβεια (Accuracy)**

Η ακρίβεια μιας μεθόδου δείχνει την εγγύτητα μιας πειραματικής τιμής x_i (ή της μέσης τιμής μιας σειράς μετρήσεων, x_{mean}) προς την αληθή τιμή μ , η οποία γίνεται δεκτή ως η αληθής (true) ή ορθή (correct) τιμή της μετρούμενης ποσότητας. Η απόλυτη ακρίβεια του μέσου όρου δίνεται από τη διαφορά:

$$E = x_{\text{mean}} - \mu$$

ενώ μιας ιδιαίτερης τιμής από τη διαφορά:

$$E = x_i - \mu$$

Οι κύριοι περιορισμοί στην ακρίβεια οφείλονται είτε σε τυχαίο σφάλμα (random error) είτε σε συστηματικό σφάλμα (bias) μιας αναλυτικής μεθόδου (θετική ή αρνητική απόκλιση του μέσου αναλυτικού αποτελέσματος από τη γνωστή ή θεωρούμενη αληθή τιμή). Ως ακριβής (accurate) μέτρηση χαρακτηρίζεται αυτή που στερείται συστηματικού σφάλματος και είναι επαναλήψιμη (precise).

Η ακρίβεια παρουσιάζεται ως η εκατοστιαία ανάκτηση (%Recovery) της γνωστής ποσότητας του αναλύτη που προστέθηκε στο δείγμα ή ως η διαφορά μεταξύ του μέσου όρου των τιμών που βρέθηκαν από την εφαρμογή της ελεγχόμενης μεθόδου σε ένα δείγμα και της παραδεκτής αληθούς τιμής (accepted true value) (τιμή του δείγματος αναφοράς ή τιμή που βρέθηκε από την εφαρμογή μιας ανεξάρτητης μεθόδου) μαζί με τα όρια εμπιστοσύνης.

Πιστότητα (precision)

Η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου. Μπορεί να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά (dispersion) των αποτελεσμάτων όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα.

Η διασπορά των αποτελεσμάτων προκαλείται από διάφορες τυχαίες πηγές και θα βρίσκεται γύρω από την αναμενόμενη τιμή του αποτελέσματος εάν δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα. Στην ανάλυση θεωρείται ότι η διασπορά είναι τέτοια, έτσι ώστε να περιγράφεται ως μια τυχαία κατανομή (normal distribution ή Gaussian).

Η πιστότητα διαιρείται σε δύο υποσύνολα:

1. Επαναληψιμότητα (Repeatability)
2. Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)

Επαναληψιμότητα (repeatability)

Η επαναληψιμότητα αποτελεί το μέτρο της διασποράς των τιμών των αναλυτικών αποτελεσμάτων μιας σειράς διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα.

Η επαναληψιμότητα μπορεί να χαρακτηριστεί ως:

Εντός προσδιορισμού επαναληψιμότητα (Within run precision): αναφέρεται στην επαναληψιμότητα μιας σειράς μετρήσεων του ίδιου διαλύματος εργασίας ενός δείγματος (επομένως είναι μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων του σταδίου της μέτρησης της αναλυτικής παραμέτρου). Αναφέρεται και ως επαναληψιμότητα συστήματος (System Precision)

Μεταξύ προσδιορισμών επαναληψιμότητα (Between run precision): αναφέρεται σε σειρά προσδιορισμών διαφορετικών τμημάτων του ίδιου δείγματος στα οποία εφαρμόζονται όλα τα στάδια της αναλυτικής μεθόδου.

Η επαναληψιμότητα εκφράζεται συνήθως με την τυπική απόκλιση, s (standard deviation) πολλαπλών μετρήσεων, η οποία παρέχεται από τη σχέση:

$$SD = \sqrt{\sum (x_i - x_{\text{mean}})^2 / (N - 1)}$$

Χρήσιμο μέτρο της επαναληψιμότητας για μικρό αριθμό μετρήσεων είναι και το εύρος ή η δειγματική διακύμανση (range), R , που ορίζεται ως η διαφορά της ελάχιστης από τη μέγιστη τιμή της σειράς των μετρήσεων :

$$R = X_{\text{max}} - X_{\text{min}}$$

Επισημαίνεται πως οι αποκλίσεις και το εύρος έχουν τις ίδιες μονάδες με το μετρούμενο μέγεθος, ενώ συχνά είναι απαραίτητη η σύγκριση μεγεθών εκφρασμένων με διαφορετικές μονάδες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται οι σχετικές τιμές τους ως προς το μετρούμενο μέγεθος, δηλαδή η %σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD% ($SD/x_{\text{mean}}*100$), η οποία είναι γνωστή και ως συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV), η σχετική μέση απόκλιση και το σχετικό εύρος.

Επιπλέον, ως **όριο επαναληψιμότητας (Repeatability Limit “r”)** ορίζεται η μέγιστη απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο αποτελεσμάτων δοκιμών με συνθήκες επαναληψιμότητας.

Ως συνθήκες επαναληψιμότητας νοούνται οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα ανεξάρτητων δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων δειγμάτων δοκιμής στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή που χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό.

Αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)

Ως αναπαραγωγιμότητα ορίζεται το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, δηλ. διαφορετικός αναλυτής, διαφορετικές συσκευές, διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαφορετικούς χρόνους.

Η αναπαραγωγιμότητα μπορεί να χαρακτηριστεί ως:

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (στο ίδιο εργαστήριο)

Διεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (σε διαφορετικά εργαστήρια)

Αντίστοιχα με το όριο επαναληψιμότητας, προσδιορίζεται και το **όριο αναπαραγωγιμότητας (Reproducibility Limit “R”)**, το οποίο ορίζεται ως η μέγιστη απόλυτη διαφορά μεταξύ δύο αποτελεσμάτων δοκιμών με συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.

Ως συνθήκες αναπαραγωγιμότητας νοούνται οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων δειγμάτων δοκιμής σε διαφορετικά εργαστήρια με διαφορετικούς χειριστές που χρησιμοποιούν διαφορετικό εξοπλισμό.

- **Ευαισθησία (sensitivity, S)**

Η ευαισθησία εκφράζει τη μεταβολή του σήματος προς τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη και έχει μονάδες σήματος προς συγκέντρωση. Συνήθως εκφράζεται από την κλίση (slope) της καμπύλης αναφοράς.

Σταθερή τιμή ευαισθησίας συνεπάγεται γραμμική σχέση μετρούμενης παραμέτρου και αναλυτικής πληροφορίας. Η αντίστοιχη περιοχή όπου η ευαισθησία θα παρουσιάζει σταθερή τιμή ονομάζεται γραμμική δυναμική περιοχή (linear dynamic range). Αντίστοιχα, η περιοχή στην οποία υπάρχει ευαισθησία και έχει μια σαφή τιμή, καλείται δυναμική περιοχή (dynamic range).

Τέλος, αναφέρεται πως η ευαισθησία είναι χαρακτηριστικό οργανολογικού χαρακτήρα και ως εκ τούτου δεν είναι δυνατό να συγκριθούν οι τιμές ευαισθησίας δύο τελείως διαφορετικών μεθόδων, εφόσον δεν εκφράζονται στις ίδιες μονάδες. Αντίθετα, είναι δυνατόν να συγκριθούν, ως προς την ευαισθησία, παραλλαγές μιας δεδομένης ενόργανης μεθόδου για δεδομένο προσδιοριζόμενο συστατικό, ή η ευαισθησία μιας μεθόδου, ως προς διάφορα προσδιοριζόμενα συστατικά.

- **Ανιχνευσιμότητα (detectability)**

Η ανιχνευσιμότητα εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει/ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Η περιοχή των σημάτων/συγκεντρώσεων χωρίζεται σε τρεις περιοχές:

1) Περιοχή στην οποία η ανίχνευση του αναλύτη δεν είναι δυνατή (θόρυβος)

2) Περιοχή στην οποία η ανίχνευση του αναλύτη είναι αξιόπιστη και το σήμα του αναλύτη διακρίνεται από το θόρυβο

3) Περιοχή στην οποία η ποσοτικοποίηση του αναλύτη είναι αξιόπιστη (ξεκάθαρη διάκριση σήματος αναλύτη από θόρυβο)

Η ικανότητα της ανιχνευσιμότητας ποσοτικοιείται με δύο εκφράσεις:

α) Όριο ανιχνεύσεως (Detection Limit, DL ή LOD)

Το όριο ανίχνευσης ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση ή ποσότητα της προσδιορισθείσας ουσίας, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί με καθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Επίσης, το όριο ανίχνευσης ισούται με τη συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του τυφλού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του τυφλού.

Το όριο ανίχνευσης αποτελεί ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά μιας μεθόδου και θεωρείται απαραίτητο για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων σε χαμηλά επίπεδα και κυρίως σε ιχνοαναλύσεις (trace analysis).

β) Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, QL ή LOQ)

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση της προσδιορισθείσας ουσίας, η οποία μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Επίσης, το όριο ποσοτικοποίησης αποτελεί τη συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του τυφλού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του τυφλού.

- **Ανθεκτικότητα (ruggedness)**

Ανθεκτικότητα μιας μεθόδου είναι η ευαισθησία που έχει μια αναλυτική μέθοδος έναντι προκαθορισμένων μικρομεταβολών στις πειραματικές παραμέτρους (πχ. αλλαγές στους αναλυτές, στις συνθήκες αποθήκευσης, στις περιβαλλοντικές συνθήκες προετοιμασίας κ.α.). Κάθε μεταβολή που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα της ανάλυσης θα πρέπει να υποδεικνύεται, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αξιοπιστία της εφαρμογής της μεθόδου.

Επιπλέον, η ανθεκτικότητα μιας μεθόδου σχετίζεται με την αντοχή (robustness) της σε τυχαίες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων που αντιστοιχούν στον έλεγχο της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

- **Ορθότητα (trueness)**

Ως ορθότητα ονομάζεται η συμφωνία μεταξύ της μέσης τιμής μιας σειράς μετρήσεων και μιας αποδεκτής τιμής αναφοράς (reference value).

Η ορθότητα μιας μεθόδου ελέγχεται είτε σε σύγκριση με υλικό αναφοράς (reference material) για τη συγκεκριμένη ουσία, είτε σε σύγκριση με άλλες μεθόδους.

Για την διερεύνηση της ορθότητας μιας μεθόδου με χρήση ουσιών αναφοράς, υπολογίζεται ο μέσος όρος (mean) και η τυπική απόκλιση μιας σειράς μετρήσεων και εν συνεχεία συγκρίνεται με τις τιμές των υλικών αναφοράς.

Ως ιδανικό υλικό αναφοράς θεωρείται το αντίστοιχο πιστοποιημένο (certified reference material, CRM), το οποίο αποτελεί ένα φυσικό υλικό αναφοράς, πανομοιότυπο με το δείγμα. Στην πραγματικότητα όμως η διαθεσιμότητα των πιστοποιημένων υλικών αναφοράς είναι περιορισμένη. Ως εκ τούτου τα υλικά αναφοράς που χρησιμοποιούνται για την επικύρωση μεθόδων είτε προετοιμάζονται με εμβολιασμό των τυπικών υλικών με καθαρό πιστοποιημένο υλικό αναφοράς ή άλλο υλικό αντίστοιχης καθαρότητας και σταθερότητας, είτε αποτελούν τυπικά, ενδοεργαστηριακά ελεγμένα για την σταθερότητά τους υλικά.

- **Ανάκτηση (Recovery)**

Ανάκτηση ονομάζεται το ποσοστό της πραγματικής ποσότητας μιας ουσίας, η οποία ανακτάται κατά τη διάρκεια μιας αναλυτικής μεθόδου. Ο υπολογισμός της ανάκτησης απαιτείται για την επικύρωση της μεθόδου όταν δεν υπάρχει αντίστοιχο CRM.

$$R\% = [(CF - CU) / CA] * 100$$

Όπου:

CF : η συγκέντρωση της προσδιορισθείσας ουσίας στο επιμολυσμένο δείγμα

CU : η συγκέντρωση της προσδιορισθείσας ουσίας στο μη επιμολυσμένο δείγμα

CA : η συγκέντρωση της προσδιορισθείσας ουσίας που προστέθηκε στο επιμολυσμένο δείγμα.

[217, 218]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΣ ΙΣΟΤΟΠΙΚΗΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ (ISOTOPE DILUTION METHOD)

Η μέθοδος ισοτοπικής αραιώσης αποτελεί μία από τις πιο ακριβείς και εξειδικευμένες μεθόδους ανάλυσης πολύπλοκων δειγμάτων. Συγκεκριμένα, δείγμα το οποίο περιέχει τον αναλύτη (φυσική προς μέτρηση ουσία) εμβολιάζεται με συγκεκριμένη, γνωστή συγκέντρωση της ισοτοπικά επισημασμένης ουσίας. Ακολούθως, πραγματοποιείται ένεση του ισοτοπικά επισημασμένου δείγματος στο LC-MS/MS και λήψη χρωματογραφήματος και φάσματος μάζας. Ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία των αποτελεσμάτων και όντας γνωστή η συγκέντρωση του ισοτόπου, πραγματοποιείται η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση του αναλύτη.

Η μέθοδος ισοτοπικής αραιώσης απαιτεί αρχικά την παρασκευή μιας ποσότητας αναλύτη με εμπλουτισμένη σύνθεση σε ένα από τα άτομά του (^{13}C , D). Η ισοτοπικά επισημασμένη ουσία ενός αναλύτη έχει την ιδιότητα να εμφανίζει όμοια ή σχεδόν όμοια χημική συμπεριφορά με αυτή του αναλύτη.

Η αρχή της μεθόδου ισοτοπικής αραιώσης, καθώς και κάθε τεχνικής εσωτερικού προτύπου (internal standard technique), βασίζεται στην παραδοχή, πως εάν για οποιοδήποτε λόγο αυξηθεί ή μειωθεί η ευαισθησία της μετρητικής διατάξεως κατά τον προσδιορισμό της επισημασμένης ουσίας, κατά το ίδιο ποσοστό θα αυξηθεί ή θα ελαττωθεί η ευαισθησία της μετρητικής διατάξεως και για τον αναλύτη, του οποίου η μέτρηση βασίζεται στην ίδια αρχή και μπορεί να πραγματοποιηθεί με την ίδια διάταξη. Βασική προϋπόθεση είναι η αναλογική σχέση μεταξύ της μετρούμενης παραμέτρου και της αναλυτικής πληροφορίας και για τα δύο συστατικά. Ως εκ τούτου, η ανάκτηση των δύο ουσιών είναι η ίδια καθώς ακολουθούν την ίδια αναλυτική επεξεργασία και διαθέτουν παρόμοια χημική συμπεριφορά.

Χρησιμοποιώντας την επισημασμένη ουσία ως εσωτερικό πρότυπο και διατηρώντας τη συγκέντρωσή της σταθερή, καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση του αναλύτη, χωρίς να απαιτείται διόρθωση της προσδιορισθείσας τιμής της συγκέντρωσης με το ποσοστό της ανάκτησης.

Αναλυτικότερα, με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων υπολογίζεται ο λόγος της έντασης του σήματος της μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης της προς ανάλυση ουσίας προς την ένταση της σταθερής ποσότητας επισημασμένης ουσίας, προσδιορίζοντας έτσι τον παράγοντα RF (Response Factor) για κάθε συγκέντρωση. Εν συνεχεία και με την βοήθεια καμπύλης αναφοράς (με άξονα y τον RF και x την συγκέντρωση του φυσικού αναλύτη) υπολογίζεται η άγνωστη συγκέντρωση του αναλύτη βάσει του λόγου της έντασης των σημάτων της φυσικής ουσίας προς την προστεθείσα επισημασμένη, χωρίς να απαιτείται να ληφθεί υπόψη η ανάκτηση της μεθόδου.

Επιπλέον, η μέθοδος ισοτοπικής αραίωσης παρέχει την δυνατότητα εξειδικευμένης ταυτοποίησης του αναλύτη βάσει του σχετικού χρόνου κατακράτησης, καθώς η επισημασμένη ουσία εξέρχεται από την στήλη του χρωματογράφου στο ίδιο εύρος χρόνου με αυτό του αναλύτη.

Αναγκαίες προϋποθέσεις για την εφαρμοσιμότητα της τεχνικής του εσωτερικού προτύπου είναι :

- Η εμπορική διαθεσιμότητα του επισημασμένου προτύπου
- Η δυνατότητα σύγχρονης μετρήσεως των σημάτων του προσδιοριστέου συστατικού και του εσωτερικού προτύπου
- Η ανυπαρξία διαφορετικής επιδράσεως της μήτρας στην φυσική και επισημασμένη ουσία, που ίσως διαφοροποιήσει τον λόγο του RF με τα διάφορα υποστρώματα

Η μέθοδος ισοτοπικής αραίωσης αποτελεί μία από τις πιο εκλεκτικές μεθόδους όσον αφορά στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση χημικών οργανικών ενώσεων, παρέχοντας παράλληλα πολύ αξιόπιστα αποτελέσματα.

Η εφαρμογή της μεθόδου ισοτοπικής αραίωσης, παρουσιάζει εξίσου κάποια μειονεκτήματα. Ένα από τα βασικότερα θεωρείται το υψηλό κόστος εφαρμογής της καθώς και η περιορισμένη διαθεσιμότητα ισοτοπικών μορφών. Επιπλέον, μείζονος σημασίας είναι το γεγονός πως ακόμα και στην περίπτωση χρήσης του καταλληλότερου ισότοπου, υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης παρεμπόδισης κατά την λήψη του σήματος εξαιτίας επιδράσεως της μήτρας (background).

▪ Μαθηματικοί τύποι για την ποσοτικοποίηση του αναλύτη

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα τα οποία περιέχουν διάφορες συγκεντρώσεις του αναλύτη και σταθερή συγκέντρωση της επισημασμένης ουσίας. Η σταθερή συγκέντρωση της επισημασμένης ουσίας εξασφαλίζει την εκθετική αύξηση του λόγου της συγκέντρωσης του αναλύτη προς την συγκέντρωση της επισημασμένης ουσίας. Ως εκ τούτου, για κάθε συγκέντρωση του αναλύτη υπολογίζεται σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο ο Response Factor:

$$RF_{Cx} = (Area_x / Area_R) * C_R$$

Όπου RF_{Cx} : Response Factor για την συγκέντρωση x του αναλύτη.

$Area_x$: το λαμβάνον σήμα για την συγκέντρωση x του αναλύτη.

$Area_R$: το λαμβάνον σήμα για την συγκέντρωση της επισημασμένης ουσίας (παραμένει σταθερό).

C_R : η συγκέντρωση της επισημασμένης ουσίας (παραμένει σταθερή)

Ομοίως υπολογίζονται τα RF και για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις και κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, οι άξονες της οποίας είναι ο RF (y) και η συγκέντρωση C (x).

Η συγκέντρωση του αναλύτη στα άγνωστα δείγματα υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης:

$$RF = \beta + \alpha C_x$$

και ισούται με:

$$C_x = (RF - \beta) / \alpha$$

Όπου Cx: η συγκέντρωση του αναλύτη (άγνωστο)

RF: response factor

α, β: σταθερές της εξίσωσης

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης παρασκευάζονται δύο διαλύματα. Το πρώτο αποτελεί ένα πρότυπο διάλυμα το οποίο έχει επισημανθεί με συγκεκριμένη συγκέντρωση επισημασμένης ουσίας και εν συνεχεία εμβολιάζεται απευθείας στο LC-MS/MS. Το δεύτερο διάλυμα αποτελεί δείγμα το οποίο έχει επισημανθεί με ίδια συγκέντρωση επισημασμένης ουσίας, έχει υποστεί όλη την διαδικασία ανάλυσης και ακολούθως εμβολιάζεται στο LC-MS/MS. Η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ανάκτησης είναι η ακόλουθη:

$$\text{Recovery \%} = (\text{AreaR}' / \text{AreaR}) * 100$$

Όπου Area R': η περιοχή του σήματος της επισημασμένης ουσίας σε δείγμα.

Area R: η περιοχή του σήματος της επισημασμένης ουσίας σε πρότυπο διάλυμα.

Όπως προαναφέρθηκε ο υπολογισμός του ποσοστού της ανάκτησης δεν είναι απαραίτητος για την ποσοτικοποίηση του αναλύτη, παρόλα αυτά καθίσταται απαραίτητος για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου. Αναλυτικότερα, κάθε αναλυτική μέθοδος υποχρεούται να παρέχει αποτελέσματα εντός ενός συγκεκριμένου εύρους ανάκτησης (συνήθως 60-120%). Κάτω από το χαμηλότερο ποσοστό ανάκτησης του εύρους αυτού, παρατηρείται μείωση του ληφθέντος σήματος, μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου καθώς και αυξημένη τιμή τυπικής απόκλισης (standard deviation, SD).

[219, 220]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

(ACCELERATED SOLVENT EXTRACTOR, ASE)

Το ASE (Accelerated Solvent Extractor) (Εικόνα 3) αποτελεί μία από τις πιο εύχρηστες αυτόματες τεχνικές εκχύλισης και βρίσκει εφαρμογή σε πληθώρα δειγμάτων τόσο περιβαλλοντικών (φυτοφάρμακα, εντομοκτόνα, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinated bisphenyl, PCBs), διοξίνες, φουράνια, βρωμιωμένα επιβραδυντικά φλόγας (Brominated flame retardants, BFRs) κ.α.), όσο και σε τρόφιμα (βιταμίνες, αντιβιοτικά, φυσικά προϊόντα, φυτοφάρμακα και ζιζανιοκτόνα στα τρόφιμα, συμπληρώματα διατροφής κ.α.). Επίσης χρήση της ASE συναντάται και σε αναλύσεις πολυμερών, καταναλωτικών προϊόντων (χαρτί, βιοκαύσιμα, υφάσματα κ.α.) και φαρμακευτικών προϊόντων.



Εικόνα 3: Υγρή εκχύλιση υψηλής πίεσης (Accelerated Solvent Extractor, ASE 300) [221]

Η τεχνική αφορά στην εκχύλιση οργανικών συστατικών από στερεά ή ημιστερεά δείγματα με χρήση υγρών διαλυτών. Κατά την διαδικασία της εκχύλισης χρησιμοποιούνται κοινοί υγροί διαλύτες σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση, με σκοπό την αύξηση της αποδοτικότητας. Λεπτομερέστερα αυξανόμενης της θερμοκρασίας, αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, ενώ αυξανόμενης της πίεσης, διατηρείται ο διαλύτης σε κατάσταση χαμηλότερη του σημείου βρασμού του, παρέχοντας έτσι ασφαλή και γρήγορη εκχύλιση. Αξιοσημείωτη είναι η εξίσου ικανοποιητική διαχείριση τόσο όξινων όσο και αλκαλικών δειγμάτων.

Η λειτουργία της ASE βασίζεται στην μεταφορά του διαλύτη εκχύλισης μέσω μιας κυψελίδας (cell), στην οποία εμπεριέχεται το δείγμα. Η εκχύλιση πραγματοποιείται με άμεση επαφή του δείγματος με τον διαλύτη σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, τόσο σε στατικό όσο και σε δυναμικό επίπεδο. Μετά το πέρας της εκχύλισης, συμπιεσμένο άζωτο ωθεί τον διαλύτη που βρίσκεται στο cell σε φιαλίδιο (vial) ανάλυσης. Το φιλτραρισμένο εκχύλισμα συλλέγεται ξεχωριστά από το δείγμα, και είναι έτοιμο προς ανάλυση. Ο κύκλος αυτός μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές.

Αναλυτικότερα, η διαδικασία της εκχύλισης που πραγματοποιείται στο ASE, περιλαμβάνει οκτώ βασικά στάδια:

- ***Loading the cell into the oven***

Η κυψελίδα που περιέχει το προς εκχύλιση δείγμα μεταφέρεται μέσα στο φούρνο του ASE, όπου και της ασκείται πίεση.

- ***Filling the cell with solvent***

Η αντλία ξεκινά και γεμίζει την κυψελίδα με τον διαλύτη που έχουμε επιλέξει. Όταν η κυψελίδα είναι γεμάτη και στο φιαλίδιο ανάλυσης έχουν συλλεχθεί περίπου 7 ml διαλύτη, η στατική βαλβίδα κλείνει και η ροή σταματά.

- ***Heating the cell***

Η κυψελίδα θερμαίνεται για συγκεκριμένο χρόνο έως ότου καταστεί βέβαιο πως έχει επέλθει θερμική ισορροπία.

- ***Static extraction***

Πραγματοποιείται εκχύλιση του δείγματος. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, η στατική βαλβίδα ανοίγει περιοδικά με σκοπό την διατήρηση της πίεσης στην κυψελίδα στο ρυθμιζόμενο επίπεδο.

- ***Flushing with solvent from the system***

Η στατική βαλβίδα ανοίγει και το εκχύλισμα συλλέγεται στο φιαλίδιο ανάλυσης. Ακολούθως πραγματοποιείται έκπλυση με νέα ποσότητα διαλύτη.

- ***Purging solvent from the system***

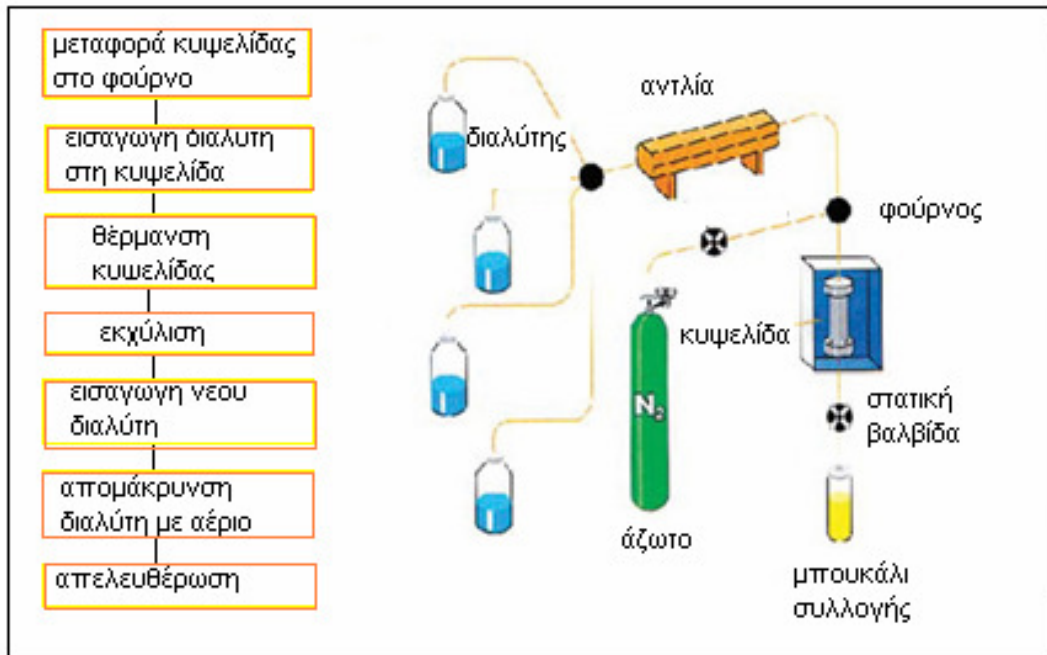
Ο εναπομένον διαλύτης απομακρύνεται από την κυψελίδα με την βοήθεια αερίου, με αποτέλεσμα το μπουκάλι συλλογής να περιέχει πλέον όλη την ποσότητα του εκχυλίσματος.

- **End relief**

Η πίεση που έχει απομείνει στην κυψελίδα απελευθερώνεται (end relief).

- **Uploading the cell**

Η κυψελίδα απομακρύνεται από τον φούρνο.



Σχήμα 5: Σχηματική λειτουργία του ASE [221]

Η τεχνική ASE παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Ένα από τα βασικότερα είναι ο κατά πολύ μειωμένος χρόνος διάρκειας της εκχύλισης σε σχέση με άλλες μεθόδους (soxhlet κλπ). Συγκεκριμένα, εκχυλίσεις που συνήθως απαιτούν ώρες για την διεξαγωγή τους, κατά την εφαρμογή ASE διαρκούν μερικά λεπτά. Επιπλέον, το κόστος που απαιτείται για την πραγματοποίηση της εκχύλισης με ASE είναι αρκετά χαμηλότερο σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, λόγω της δραματικής μείωσης της κατανάλωσης διαλυτών.

[221]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MASS SPECTROMETRY, MS)

Η Φασματομετρία Μάζας είναι μία τεχνική προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού χημικών ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του σήματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο (m/z).

Η φασματομετρία μαζών είναι ίσως η τεχνική που μπορεί να βρεί τη μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, σε σχέση με όλες τις άλλες αναλυτικές τεχνικές. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με:

- Τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του δείγματος
- Τη δομή ανόργανων, οργανικών, οργανομεταλλικών και βιολογικών μορίων
- Την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων
- Τη δομή και σύσταση στερεών επιφανειών
- Την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα

Ο πρώτος φασματογράφος μάζας δημιουργήθηκε το 1912 από τον J.J. Thomson, ενώ η πρώτη εφαρμογή της φασματομετρίας μάζας σε χημικές αναλύσεις ρουτίνας πραγματοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1940, όταν η τεχνική άρχισε να υιοθετείται από τη βιομηχανία αργού πετρελαίου. Στις αρχές της δεκαετίας του 1950 οι χημικοί χρησιμοποιούσαν την τεχνική για τον προσδιορισμό της δομής μιας μεγάλης ποικιλίας οργανικών ενώσεων. Οι εφαρμογές αυτές του φασματογράφου μάζας, σε συνδιασμό με την ανακάλυψη του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και την ανάπτυξη της φασματομετρίας υπερύθρου, έφεραν επανάσταση στον προσδιορισμό της δομής των μορίων.

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως περί το 1990, πραγματοποιήθηκε μία σημαντική ανάπτυξη όσον αφορά στη βιολογική φασματομετρία μαζών, ως αποτέλεσμα της εξέλιξης των μεθόδων ιοντισμού. Σήμερα, η φασματομετρία μαζών χρησιμοποιείται ευρέως και είναι κατάλληλη τεχνική για τον προσδιορισμό της δομής πρωτεϊνών, πεπτιδίων και άλλων ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους.

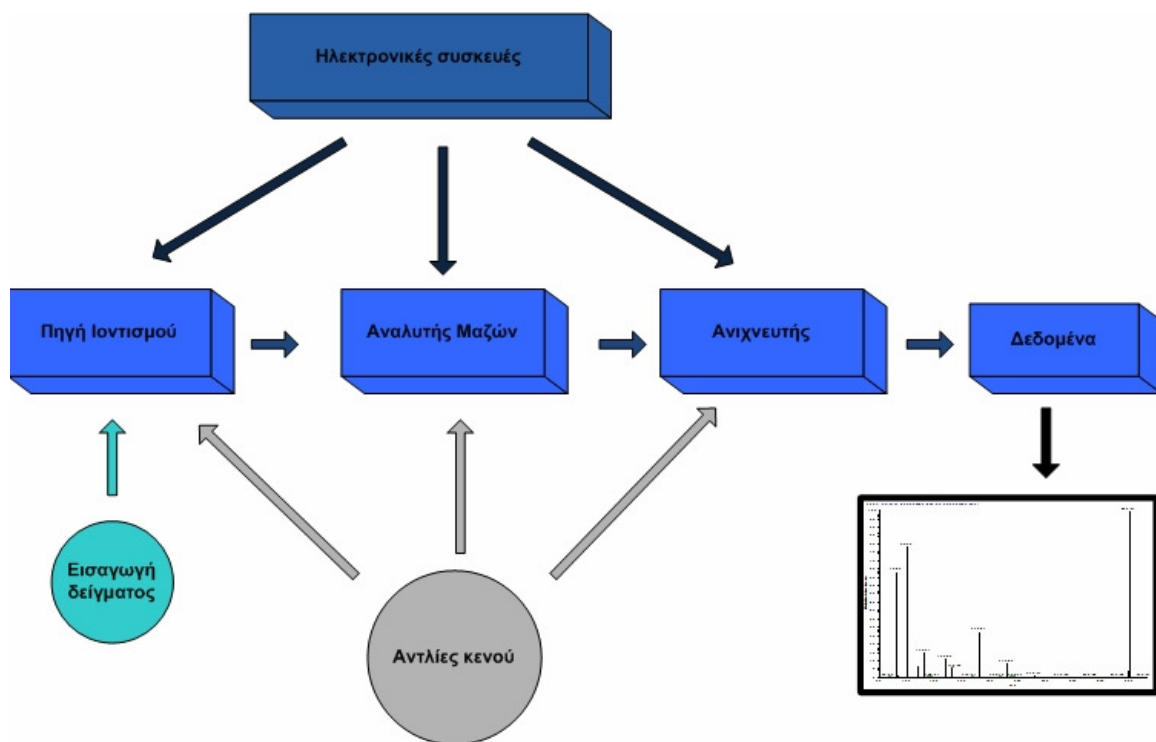
Επιπλέον, βρίσκει εφαρμογή σε όλες τις κατηγορίες δειγμάτων, πτητικά-μη πτητικά, πολικά-μη πολικά, υγρά-στερεά-αέρια. Τέλος, παρουσιάζει μοριακή εξειδίκευση, μεγάλη ευαισθησία, καθώς επίσης μπορεί να συνδεθεί με GC, HPLC και CE (capillary electrophoresis) με αποτέλεσμα να προσφέρει τεράστιες δυνατότητες ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού φυσικών δειγμάτων.

5.1 Δομή Φασματογράφου Μάζας

Ο φασματογράφος μάζας είναι μία αναλυτική συσκευή που προσδιορίζει το MB χημικών ενώσεων διαχωρίζοντας τα μοριακά ιόντα με βάση τη σχέση μάζα/φορτίο. Τα ιόντα προκύπτουν με απώλεια ή κέρδος ενός φορτίου (πχ. πρωτονίωση ή αποπρωτονίωση, απώλεια ηλεκτρονίων). Τη δημιουργία των ιόντων ακολουθεί διαχωρισμός τους βάσει του λόγου m/z και ταυτοποίησή τους. Ως τελικό αποτέλεσμα παραλαμβάνεται το φάσμα μάζας, το οποίο παρέχει τις προαναφερθείσες πληροφορίες.

Τα βασικά δομικά στοιχεία ενός φασματογράφου μάζας είναι τα ακόλουθα (Σχήμα 6):

1. εισαγωγή δείγματος
2. πηγή ιόντων
3. αναλυτής μάζας, ο οποίος διαχωρίζει τα ιόντα σύμφωνα με το λόγο m/z
4. ανιχνευτής ιόντων



Σχήμα 6: Βασικά δομικά στοιχεία ενός φασματογράφου μάζας [222]

Οι **πηγές ιοντισμού** ενός φασματογράφου μάζας αποτελούν το αρχικό στάδιο σε μία μέτρηση με φασματομετρία μαζών και σκοπός τους είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αερίου αναλύτη, διαδικασία καθοριστικής σημασίας για τους στόχους της μέτρησης.

Οι πηγές ιοντισμού χωρίζονται σε δύο κατηγορίες :

- *Πηγές αέριας φάσης*

Το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται.

- Πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)
- Χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization CI)
- Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI

- *Πηγές εκρόφησης*

Το δείγμα, σε υγρή ή στερεή κατάσταση, μετατρέπεται σε αεριώδη ιόντα.

- Βομβαρδισμός με ταχεία άτομα (Fast Atom Bombardment, FAB)
- Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization, MALDI)
- Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI)
- Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (Thermospray ionization, TSI)

Πλεονεκτήματα των πηγών εκρόφησης είναι ότι μπορούν να εφαρμοστούν σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα.

Στην παρούσα μελέτη, θα χρησιμοποιηθεί ως πηγή ιοντισμού η ESI, της οποίας η αρχή λειτουργίας είναι η εξής:

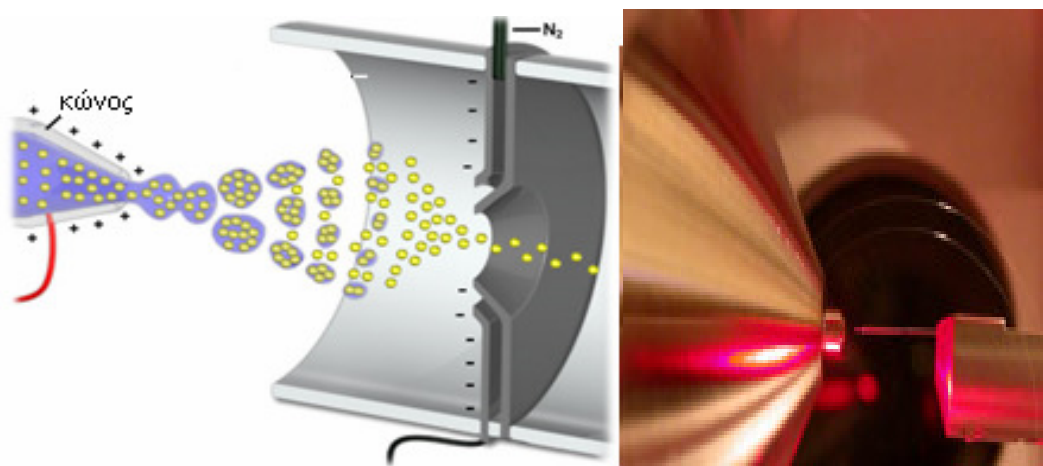
- **Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI)**

Η φασματομετρία μαζών με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1984 και σήμερα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις βιομορίων, με μοριακά βάρη μεγαλύτερα των 100.000 Da. Επιπλέον, η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή και στον χαρακτηρισμό ανόργανων ουσιών και συνθετικών πολυμερών. Ο Dr.Bennet Fenn βραβεύτηκε για την ανάπτυξη της τεχνικής ιοντισμού ESI και την εφαρμογή της στην ανάλυση βιολογικών μορίων με το βραβείο Nobel το 2002.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό αποτελεί μία ήπια μέθοδο ιοντισμού και χρησιμοποιείται για την παραγωγή αερίων ιοντισμένων μορίων από διαλύματα.

Το διάλυμα του δείγματος ψεκάζεται από μια περιοχή ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου (3000-5000V) και συγκεκριμένα από την άκρη μιας ακίδας. Στη συνέχεια οι φορτισμένες σταγόνες οδηγούνται ηλεκτροστατικά στην είσοδο του φασματογράφου μάζας. Στις σταγόνες πρώτου εισέλθουν στο φασματογράφο μάζας εφαρμόζεται ρεύμα θερμού αζώτου, με σκοπό την εξάτμιση του διαλύτη από την επιφάνειά τους. Όσο περισσότερο μειώνεται το μέγεθος της σταγόνας, τόσο περισσότερο αυξάνεται η πυκνότητα του ηλεκτρικού πεδίου στην επιφάνειά της. Ως αποτέλεσμα η απώθηση μεταξύ των φορτίων σε τόσο μικρή επιφάνεια γίνεται τόσο ισχυρή που ξεπερνά την επιφανειακή τάση. Ως εκ τούτου τα ιόντα

αρχίζουν σιγά σιγά να εγκαταλείπουν την σταγόνα μέσω του 'κώνου του Taylor'. Εν τέλει τα ιόντα κατευθύνονται ηλεκτροστατικά στον αναλυτή μάζας. (Εικόνα 4)

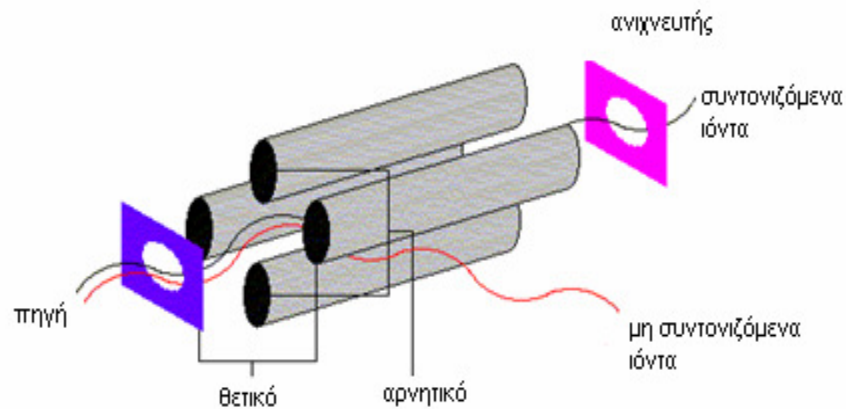


Εικόνα 4: Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI) [223]

Με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό είναι δυνατόν να ανιχνευτούν και να προσδιοριστούν μόρια μεγάλου ΜΒ (έως 70.000) μέσω οργάνων με μικρό σχετικά εύρος μαζών. Αυτό επιτυγχάνεται λόγω της δημιουργίας πολλαπλών φορτισμένων μορίων της ως προς ανάλυση ουσίας κατά την εφαρμογή της τεχνικής. Επιπλέον, με την ESI καθίσταται δυνατή η μελέτη θερμικά ασταθών μορίων, σε αντίθεση με την EI, εφόσον οι θερμοκρασίες ιοντισμού που εφαρμόζονται είναι σχετικά χαμηλές. Εκτός των θερμικά ασταθών μορίων, η τεχνική εφαρμόζεται με επιτυχία σε ποικιλία μορίων (μετρίως πολικών και απολίπων). Η ESI διαθέτει καλή ευαισθησία, καθώς επίσης και την δυνατότητα να συνδέεται απευθείας με LC και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Ενδεικτικά αναφέρεται πως η απευθείας σύνδεση HPLC με φασματογράφο που διαθέτει πηγή ESI χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων.

Οι **αναλυτές μαζών** διαχωρίζουν τα ιόντα με βάση το λόγο m/z . Το σήμα που καταγράφεται οφείλεται σε ένα μόνο m/z κάθε στιγμή. Οι τύποι αναλυτών μαζών χωρίζονται κυρίως στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Αναλυτές διπλής εστίασης μαγνητικού τομέα (double-focusing magnetic sector)
- Τετραπολικός αναλυτής μαζών ή τετράπολο (quadrupole, Q) (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Τετραπολικός αναλυτής μαζών ή τετράπολο (quadrupole, Q) [223]

- Τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT)
- Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time Of Flight, TOF)
- Αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR)

Οι **ανιχνευτές ιόντων** επιτρέπουν στον φασματογράφο μάζας να επάγει σήμα από τα προκύπτοντα ιόντα, επάγοντας δευτερεύοντα ηλεκτρόνια, ή επάγοντας ρεύμα που προκύπτει από κινούμενο φορτίο. Οι τύποι ανιχνευτών ιόντων που χρησιμοποιούνται είναι οι ακόλουθοι :

- Faraday Cup
- Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής
- Μετρητής σπινθηρισμού
- Δύνοδος υψηλής ενέργειας (Hey Energy Dynode, HED)
- Ανιχνευτής Array

- FT-MS

5.2 Διακριτική ικανότητα (Resolving Power, R)

Ο υπολογισμός της διακριτικής ικανότητας αποτελεί απαραίτητο εργαλείο για τον ακριβή προσδιορισμό του σημείου στο οποίο δύο κορυφές διαφορετικών μαζών διαχωρίζονται πλήρως. Για λόγους ευκολίας του προσδιορισμού αυτού, χρησιμοποιείται η μέτρηση της ‘κοιλιάδας’ μεταξύ των δύο κορυφών. Συγκεκριμένα, δύο κορυφές (m/z) ίσης έντασης, θεωρείται πως διαχωρίζονται πλήρως όταν η επικάλυψή τους δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους τους. Η ικανότητα διαχωρισμού από έναν φασματογράφο μάζας δύο μαζών M1 και M2 συμβολίζεται με R και υπολογίζεται βάσει του ακόλουθου τύπου:

$$R = M / \Delta M$$

$$\text{Όπου : } \Delta M = M1 - M2$$

$$\text{και } M = M1 \approx M2$$

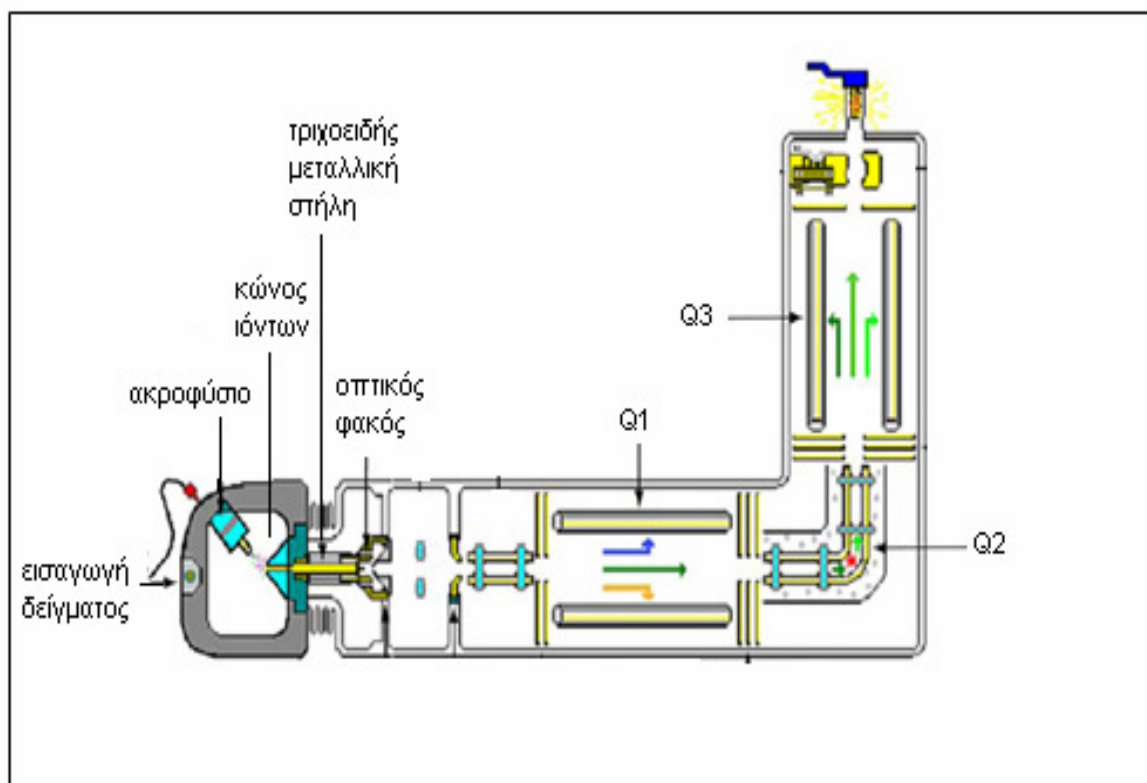
Η διακριτική ικανότητα (R) των φασματομέτρων μάζας διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τον αναλύτη μάζας που χρησιμοποιείται κάθε φορά. Αναλυτικότερα:

- Τα τετράπολα και οι παγίδες ιόντων έχουν σταθερό FWHM (Full Width at Half Maximum) σε όλο το εύρος μαζών (συνήθως 0.4 – 1.4 u). Αυτά τα όργανα χαρακτηρίζονται ως **όργανα χαμηλής διακριτικής ικανότητας (Low Resolution MS, LRMS)**.
- Τα TOF και οι μαγνητικοί αναλυτές έχουν σταθερό R σε όλο το εύρος μαζών.
- Αντίστοιχα ο μαγνητικός τομέας διπλής εστίασης (double-focusing magnetic sectors mass spectrometer) και ο FTICR (Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance) σε σταθερό χρόνο ανίχνευσης έχουν R ανάλογο του M. Αυτά τα όργανα χαρακτηρίζονται ως **όργανα υψηλής διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS, HRMS)**.

5.3 Συζευγμένη / Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (Tandem MS)

Μία σημαντική τεχνική προκύπτει με σύζευξη τριών αναλυτών μάζας. Στην τεχνική αυτή ο πρώτος αναλυτής χρησιμοποιείται για την απομόνωση των μοριακών ιόντων των διαφόρων συστατικών ενός μίγματος. Στην συνέχεια τα ιόντα αυτά εισάγονται σε ένα δεύτερο αναλυτή μαζών, όπου θραύονται για να δώσουν μια σειρά φασμάτων μαζών, ένα για κάθε μοριακό ιόν που παράγεται στο φασματόμετρο. Τέλος στον τρίτο αναλυτή πραγματοποιείται η ανίχνευση των ιόντων. Η τεχνική αυτή καλείται συζευγμένη φασματομετρία μαζών.

Σήμερα, τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα συζευγμένα φασματόμετρα μαζών έχουν την διάταξη QQQ (triple quadrupole). Σύμφωνα με την συγκεκριμένη διάταξη, το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το πρώτο τετράπολο (MS1). Στην συνέχεια οδηγείται στο δεύτερο τετράπολο (κυψελίδα συγκρούσεων) όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar ή He), παράγοντας θυγατρικά ιόντα (daughter or product ions). Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων πραγματοποιείται στο τρίτο τετράπολο (MS2) (Σχήμα 7).



Σχήμα 7: Συζευγμένη / Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (Tandem MS) [Thermo Fisher Scientific Inc.]

Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών συνδιάζεται με αέρια και υγρή χρωματογραφία, σημειώνοντας εκπληκτική πρόοδο στην ανάλυση πολύπλοκων οργανικών και βιολογικών μιγμάτων. Συγκεκριμένα η συζευγμένη φασματομετρία μαζών βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων, όπως είναι τα τρόφιμα, καθώς χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία (εμφανίζει συνήθως μικρότερο χημικό θόρυβο συγκριτικά με άλλες μεθόδους). Επίσης, η συζευγμένη φασματομετρία μαζών διαθέτει μεγαλύτερη εξειδίκευση, καθώς παρέχει την δυνατότητα αναγνώρισης του αναλύτη με μεγάλη βεβαιότητα. Αναλυτικότερα, κατά την χρήση LC-MS/MS εμφανίζονται τουλάχιστον δύο θραύσματα της προσδιορισθείσας ουσίας στο χρωματογράφημα, γεγονός που μας δίνει την δυνατότητα να υπολογίσουμε τον λόγο της έντασης (εύρους περιοχής εμφάνισης) των δύο θραυσμάτων ο οποίος είναι μοναδικός για την

κάθε χημική ένωση. Ως εκ τούτου, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός του αναλύτη με μεγάλη εξειδίκευση, καθώς πλέον θεωρείται αδύνατος ο συνυπολογισμός προσμίξεων κατά την ποσοτικοποίηση του αναλύτη. Επισημαίνεται επίσης πως η συζευγμένη φασματομετρία μαζών εμφανίζει καλύτερη γραμμικότητα συγκριτικά με άλλες τεχνικές.

Παρά τα πλεονεκτήματα της τεχνικής σε σχέση με τις χρωματογραφικές τεχνικές, σημαντικός αρνητικός παράγοντας είναι το υψηλό κόστος εξοπλισμού που απαιτεί η συζευγμένη φασματομετρία μαζών.

[222, 223, 224]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

6.1 Γυαλικά και όργανα

- **Γυαλικά**

1. Ποτήρι ζέσεως 50 ml
2. Σφαιρικές φιάλες 50 ml
3. Σφαιρικές φιάλες 100 ml
4. Φιαλίδια 1.5 ml κατάλληλα για LC-MS
5. Inserts 100 µL

- **Όργανα**

1. Ζυγός A&D GF-1200-B2- (0.5-120g/0.01g)
2. Συσκευή υπερκαθαρού νερού Barnstead (U)
3. Φυγόγεντρος Hettich Universal 32R
4. Rotary evaporator Buchi Rotavapor R-200 (E1-2)
5. Πιπέττα Hamilton 300 µl
6. Πιπέττα Gilson 100 µl
7. Πιπέττα Gilson 20 µl
8. Vortex (V1-4)
9. Αναδευτήρας Heidolph Vibramax 100
10. Accelerated Solvent Extractor System Dionex ASE 300
11. Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) Finnigan Surveyor MS Plus (Thermo) εξοπλισμένη με στήλη HyPurity Advance C18 5µm, 50mm * 2.1mm i.d (Thermo) συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετραπόλων (LC-MS/MS triple quadrupole) Finnigan TSQ QUANTUM ULTRA (Thermo).

- **Αντιδραστήρια**

1. PFOS – Wellington Laboratories L – PFOS
2. PFOA – Wellington Laboratories PFOA
3. $^{13}\text{C}_4$ -PFOS (internal standard) – Wellington Laboratories MPFOS
4. $^{13}\text{C}_4$ -PFOA (internal standard) – Wellington Laboratories MPFOA
5. MEOH, Merck 1.06009.2511
6. MEOH Lichrosolv Merck 1.060072500
7. Ultra pure water Nanopure (Barnstead)
8. Sea sand, Merck 1.07711.5000
9. Octadecyl (C_{18}) solid-phase extraction (SPE) cartridges (500mg/5ml) Altech
10. Phosphate buffer solution (PBS) 0.05, pH: 7.8
11. Ammonium acetate 5 mM, pH: 6.86

- **Διαλύματα**

1. *πρότυπα διαλύματα*

Παρασκευάζονται PFOS, PFOA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS κα $^{13}\text{C}_4$ -PFOA stock solutions σε συγκεντρώσεις των 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ σε μεθανόλη και αποθηκεύονται στους 4°C. Επίσης, παρασκευάζονται PFOS, PFOA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS κα $^{13}\text{C}_4$ -PFOA working solutions, τα οποία χρησιμοποιούνται για spiking και για τα διαλύματα βαθμονόμησης. Τα διαλύματα βαθμονόμησης παρασκευάζονται με αραιώση έως 100 ng/ml.

2. *διαλύματα βαθμονόμησης*

Τα διαλύματα βαθμονόμησης (Calibration solutions) παρασκευάζονται με ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων από τα working solutions PFOS, PFOA, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS κα $^{13}\text{C}_4$ -PFOA, εξάτμιση μέχρι ξηρού και διάλυση σε 200 μl MeOH – 5 mM ammonium acetate (20:80, v/v) ώστε να προκύψει διάλυμα με τις παρακάτω τελικές συγκεντρώσεις για κάθε αντιδραστήριο (Πίνακας 1):

Πίνακας 1: Διαλύματα βαθμονόμησης

	Std 0ng	Std 1ng	Std 5ng	Std 10ng	Std 20ng
¹³ C ₄	200μL	200μL	200μL	200μL	200μL
PFOS	0μL	10μL	50 μL	100 μL	200 μL
PFOA	0μL	10μL	50 μL	100 μL	200 μL

3. διάλυμα ελέγχου απόκρισης οργάνου

Το διάλυμα ελέγχου απόκρισης του οργάνου (standard 10) παρασκευάζεται με ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων από τα working solutions PFOS, PFOA, ¹³C₄-PFOS και ¹³C₄-PFOA: 100, 100 και 200 μl αντίστοιχα, εξάτμιση μέχρι ξηρού και διάλυση σε 200 μl MeOH – 5 mM ammonium acetate (20:80, v/v).

4. ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer solution, PBS)

Το phosphate buffer solution, PBS 0.05 mM, pH: 7.8 παρασκευάζεται με ανάμιξη 0.28 g KH₂PO₄ και 3.265 g Na₂HPO₄ σε 500 ml H₂O.

5. διάλυμα HPLC : 5 mM ammonium acetate

Το ammonium acetate 5 mM παρασκευάζεται με διάλυση 0.3854 g ammonium acetate σε 1 L υπερκαθαρού νερού.

6.2 Μέθοδοι ανάλυσης

Η ανάλυση για τον προσδιορισμό PFOS και PFOA σε δείγματα τροφίμων πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια:

6.2.1 Εκχύλιση στερεών τροφίμων

5 g ομογενοποιημένου δείγματος μεταφέρονται σε ποτήρι ζέσεως των 50 ml και προστίθενται με επαναληπτική αυτόματη πιπέττα 200 μL από μείγμα 100 ng/ml ¹³C₄-PFOS και ¹³C₄-PFOA working solution. Ύστερα από 30 min περίπου, αναμιγνύουμε το δείγμα με 25 g ξηραντικού Sea sand. Στη συνέχεια το δείγμα

τοποθετείται σε κατάλληλου μεγέθους cell (34 ml) και μεταφέρεται στο Accelerated Solvent System (ASE). Ως διαλύτης χρησιμοποιείται νερό και εκτελούνται τρεις κύκλοι εκχύλισης για το κάθε δείγμα. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 110°C για 7 min και πίεση 1500 psi.

Επισημαίνεται πως η ανάλυση αρχικά πραγματοποιήθηκε με χρήση soxhlet και MeOH ως διαλύτη. Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκε ASE επίσης με διαλύτη MeOH και τα αποτελέσματα της ανάλυσης δεν ήταν ικανοποιητικά (υψηλός θόρυβος). Ως εκ τούτου προτιμήθηκε η χρήση H₂O. Ενδεικτικά αναφέρεται πως επιλέχθηκε πολικός διαλύτης διότι το PFOS και το PFOA εμφανίζουν περισσότερο λιπόφοβη παρά υδρόφοβη συμπεριφορά.

6.2.2 Εκχύλιση υγρών τροφίμων

Σε σωλήνα falcon 50 ml ζυγίζουμε περίπου 1 ml δείγματος και προσθέτουμε με επαναληπτική αυτόματη πιπέττα 200 µL από 100 ng/ml ¹³C₄-PFOS και ¹³C₄-PFOA working solution. Προσθέτουμε περίπου 20 ml ACN και αναδεύουμε σε vortex για 1min περίπου σε 300rpm. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρεται σε αναδευτήρα όπου αναδεύεται για 20min. Φυγοκεντρούμε σε 5000rpm στους 25°C για 5 min περίπου. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σφαιρική φιάλη των 50 ml και εξατμίζουμε μέχρι ξηρού το διαλύτη σε rotary evaporator στους 30°C. Το υπόλειμμα διαλύεται σε περίπου 5 ml phosphate buffer (PBS) 0.05 M, pH: 7.8.

6.2.3 Καθαρισμός του δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction)

Το διάλυμα που παραλαμβάνεται μετά το πέρας της εκχύλισης με ASE ή το διάλυμα που περιέχει το υπόλειμμα του δείγματος διαλυμένο σε phosphate buffer, μεταφέρεται σε στήλη C₁₈ SPE που έχει ενεργοποιηθεί με περίπου 2.5ml MeOH και περίπου 5 ml H₂O. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης C₁₈ SPE με περίπου 5 ml H₂O, ξήρανση υπό κενό και τέλος έκλουση με 5 mL MeOH. Η ταχύτητα ροής των διαλυτών και του δείγματος στη στήλη C₁₈ είναι 1-2 σγ/sec. Ο διαλύτης εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε flash evaporator στους 35°C και το

υπόλειμμα διαλύεται σε 200 μL MeOH – 5 mM ammonium acetate (20:80, v/v) και μεταφέρεται σε φιαλίδιο 1.5 mL που έχει μέσα insert 100 μL .

Επισημαίνεται πως αρχικά χρησιμοποιήθηκαν στήλες OASIS WAX για την εκχύλιση των PFOS και PFOA, και οι διαλύτες ενεργοποίησης, έκλουσης και έκπλυσης ήταν διαφορετικοί. Το στάδιο της εκχύλισης των δειγμάτων παρουσίαζε προβλήματα και η χρήση των συγκεκριμένων στηλών απορρίφθηκε.

6.2.4 Μέτρηση σε φασματογράφο LC-MS/MS

Πριν την έναρξη της ανάλυσης πραγματοποιείται έλεγχος της βαθμονόμησης του οργάνου. Σε περίπτωση που απαιτείται επαναβαθμονόμηση του οργάνου γίνεται με χρήση πρότυπης ουσίας (polytyrosine). Για κάθε σειρά ανάλυσης τοποθετούμε στον αυτόματο δειγματολήπτη τα φιαλίδια με την ακόλουθη σειρά: calibration standard 0, calibration standard 1, calibration standard 5, calibration standard 10, calibration standard 20, blank solvent, std 10, blank method, άγνωστα και προγραμματίζουμε τον αυτόματο δειγματολήπτη ώστε να εισάγει τα δείγματα με αυτή τη σειρά.

Η κινητή φάση A είναι διάλυμα MeOH – 5 mM ammonium acetate (20:80, v/v), η B MeOH και η D Isopropanol. Η έκλουση της στήλης γίνεται σε 5 min με gradient από 80% A - 20% D σε 50% B - 50% D σε 3 min και στη συνέχεια για 2 min 50% B – 50% D, ροή 250 $\mu\text{L}/\text{min}$, injection volume: 35 μL , column temperature: 26°C.

Στον φασματογράφο μάζας συστοιχίας τριών τετραπόλων, χρησιμοποιείται ESI για τον αρνητικό ιονισμό του δείγματος. Οι παράμετροι του ESI που εφαρμόστηκαν κατά την ανάλυση των δειγμάτων εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Παράμετροι του ESI

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΤΙΜΗ
ESI needle voltage	-3500 V
Sheath gas pressure	40 arbitrary units
Auxillary gas pressure	10 arbitrary units
Ion sweep gas pressure	0 arbitrary units
Ion transfer capillary temperature	350°C
Source CID offset	7 V
Scan mode	Selected Reaction Monitoring
Q2 pressure	1.0 mTorr argon
Scan width	0.5 m/z
Q1, Q3 resolution	Unit (0.7 μ FWHM)
Time of run	7.00 min

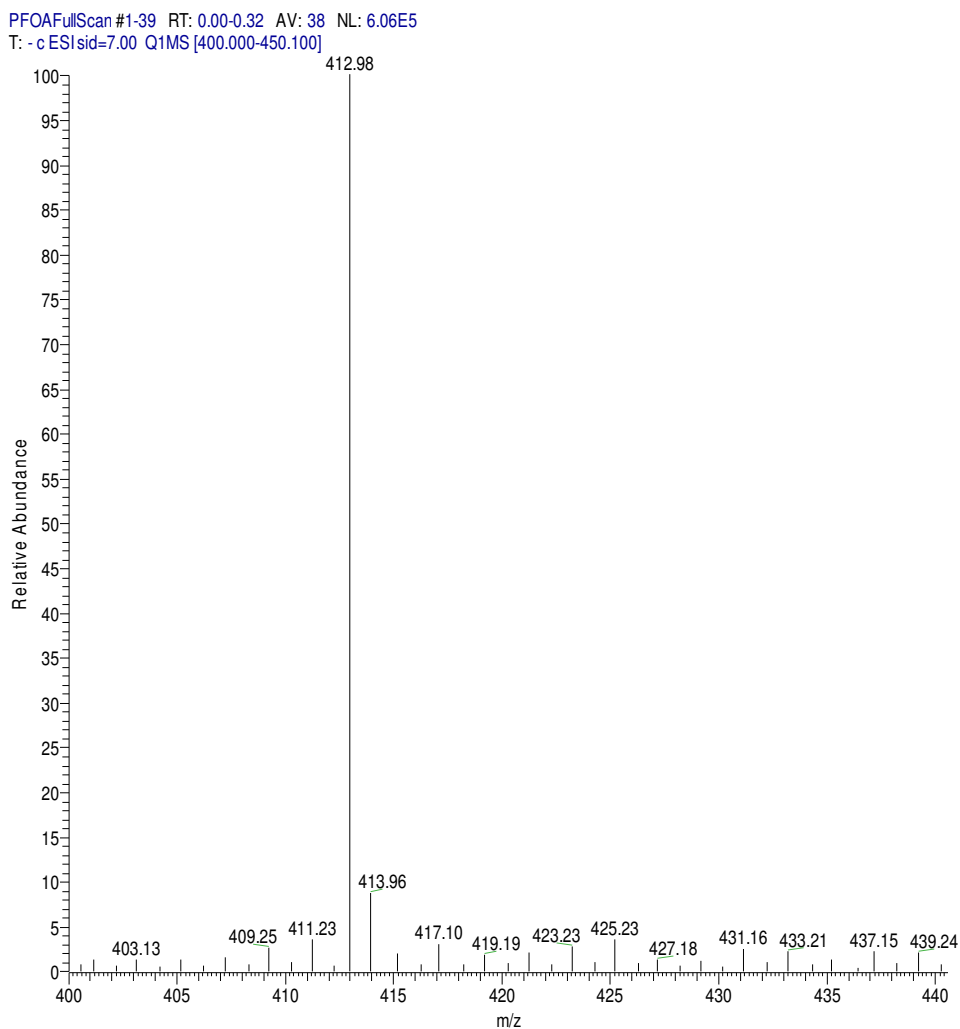
Οι ιοντικές μεταπτώσεις και οι αντίστοιχες ενέργειες διάσπασης και το δυναμικό στο tube lens που χρησιμοποιήθηκαν για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενώσεων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) :

Πίνακας 3: Ιοντικές μεταπτώσεις και ενέργειες διάσπασης των PFOS και PFOA

	Ιοντικές μεταπτώσεις (m/z)	Δυναμικό διάσπασης (eV)	Tube lens (eV)
PFOA	413.0 \longrightarrow 219.0	40	90
	413.0 \longrightarrow 369.0	30	90
¹³ C ₄ -PFOA	417.0 \longrightarrow 168.9	30	90
	417.0 \longrightarrow 372.0	30	90
PFOS	498.9 \longrightarrow 80.0	57	146
	498.9 \longrightarrow 98.9	41	146
¹³ C ₄ -PFOS	502.9 \longrightarrow 80.0	57	146
	502.9 \longrightarrow 98.9	41	146

Επισημαίνεται πως πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της ενέργειας διάσπασης και του δυναμικού του tube lens για κάθε ιόν ξεχωριστά, και οι τιμές που αναγράφονται στον πίνακα 3 αποτελούν τις βέλτιστες.

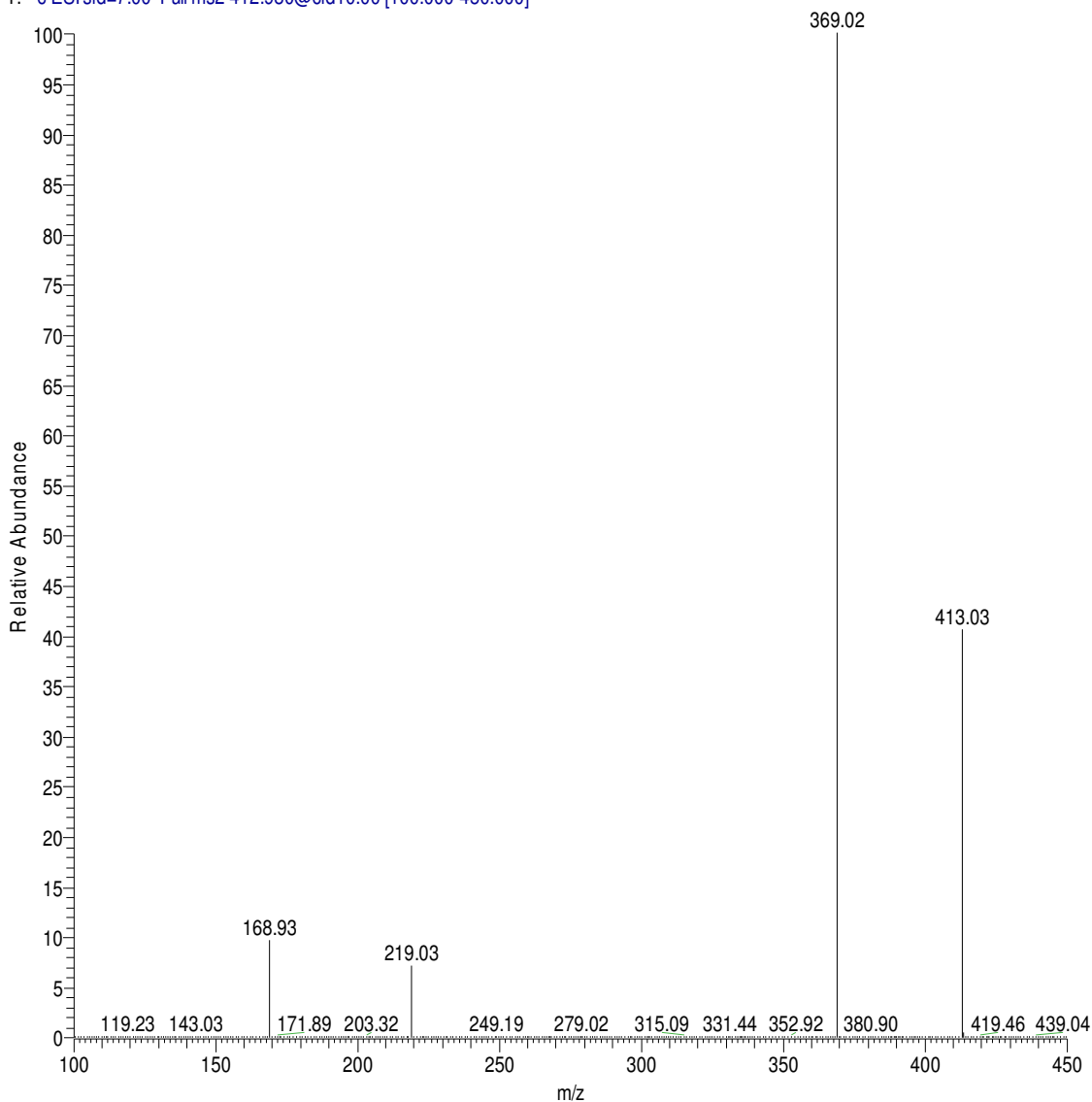
Ακολούθως εμφανίζονται τα φάσματα μάζας και τα χρωματογραφήματα των ενώσεων PFOS και PFOA που παραλαμβάνονται μετά το πέρας της ποσοτικής ανάλυσης με το LC-MS/MS. (Σχήμα 8, Σχήμα 9, Σχήμα 10, Σχήμα 11, Σχήμα 12, Σχήμα 13, Σχήμα 14, Σχήμα 15). Επισημαίνεται πως τα θραύσματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους βασικούς μηχανισμούς θραυσματοποίησης των ιόντων που αναφέρει ο Fred W. McLafferty [224].



Σχήμα 8 : Φάσμα μάζας (full scan) του PFOA

Στα φάσματα μάζας του PFOA παρατηρείται η κορυφή του μητρικού ιόντος καθώς και οι κορυφές των θραυσμάτων της ένωσης. Αναλυτικότερα, στο full scan φάσμα μάζας (Σχήμα 8) εμφανίζεται η κορυφή 412.98 η οποία αντιστοιχεί στο αποπρωτονιωμένο μητρικό ιόν ($[M-H]^-$), καθώς και η κορυφή 413.96 η οποία αντιστοιχεί στο αποπρωτονιωμένο ισοτοπικό μητρικό ιόν ($[M+1-H]^-$).

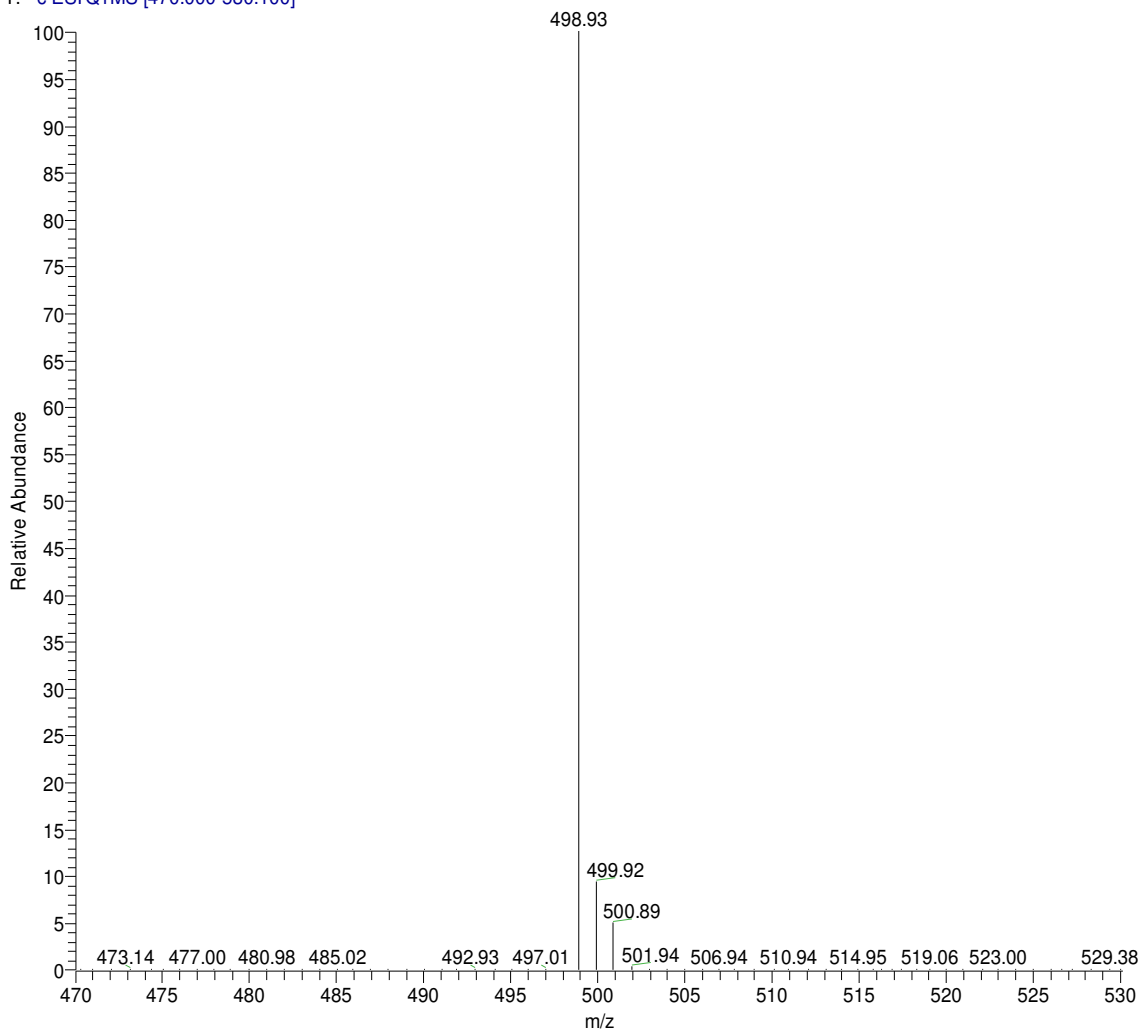
PFOAMS_MS #1-43 RT: 0.01-0.37 AV: 43 NL: 2.11E5
T: -c ESI sid=7.00 Full ms2 412.980@cid10.00 [100.000-450.000]



Σχήμα 9: Φάσμα μάζας MS/MS του PFOA

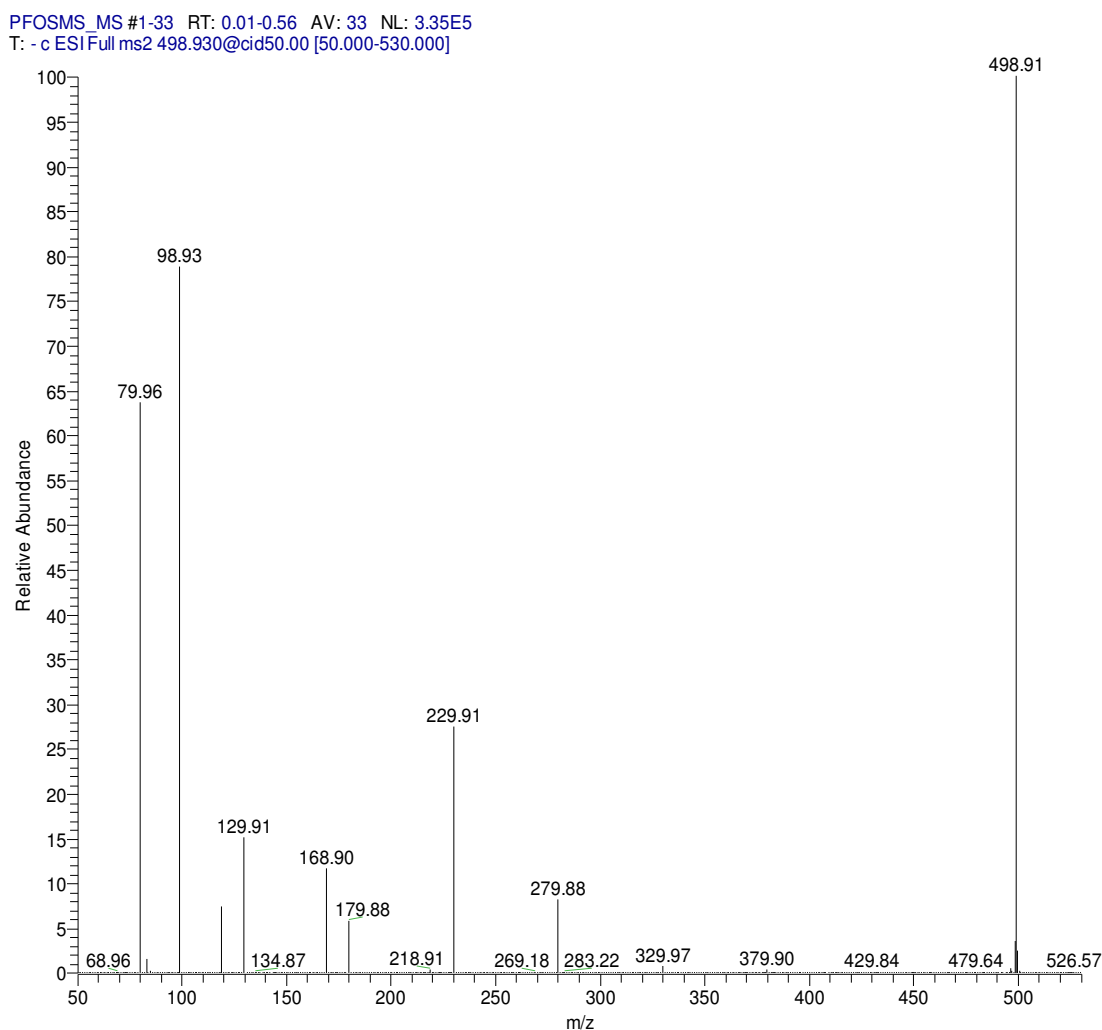
Στο φάσμα μάζας MS/MS (Σχ. 9) εμφανίζονται εκτός από την κορυφή του μητρικού ιόντος (413.03), οι κορυφές των θραυσμάτων του PFOA ύστερα από την διάσπαση αυτού. Οι κορυφές των θραυσμάτων είναι οι 168.93, 219.03 και 369.02, και αντιστοιχούν στη διάσπαση της ένωσης και την αποχώρηση συγκεκριμένων ομάδων από αυτή (βλ. σχήμα 12). Τέλος, επισημαίνεται πως για την ποιοτική ανάλυση του δείγματος επιλέγονται δύο κορυφές θραυσμάτων των οποίων υπολογίζεται ο λόγος έντασης, που είναι μοναδικός για κάθε ένωση. Ο λόγος έντασης των ιόντων ποσοτικοποίησης ($m/z=219.03$ και $m/z=369.02$) είναι 3.75.

PFOSfulscan#2-21 RT: 0.02-0.34 AV: 20 NL: 2.14E7
T: - c ESIQ1MS [470.000-530.100]



Σχήμα 10: Φάσμα μάζας (full scan) του PFOS

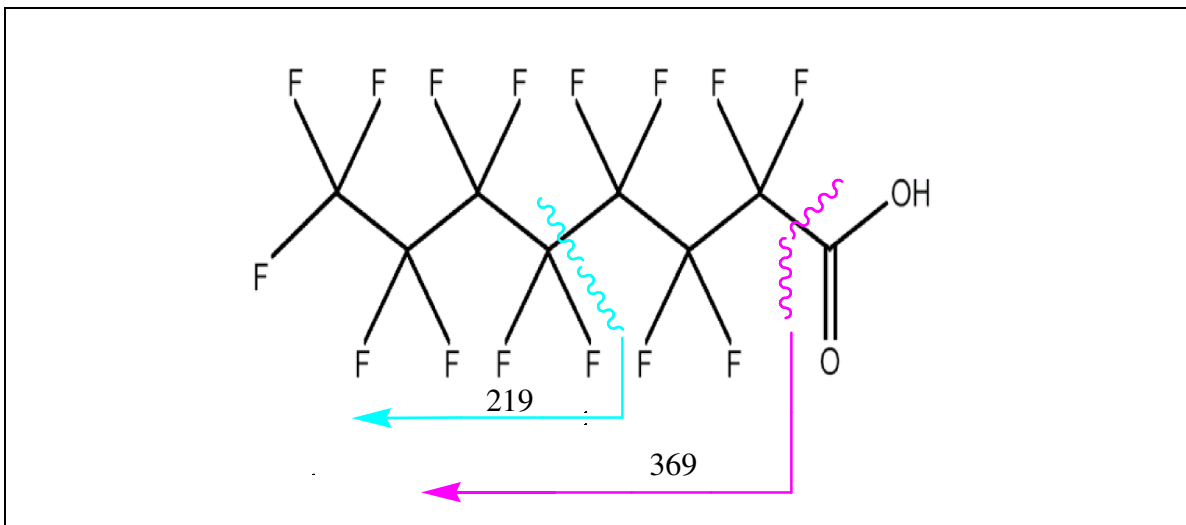
Στα φάσματα μάζας του PFOS παρατηρείται η κορυφή του μητρικού ιόντος καθώς και οι κορυφές των θραυσμάτων της ένωσης. Αναλυτικότερα, στο full scan φάσμα μάζας (Σχ. 10) εμφανίζεται η κορυφή 498.93 η οποία αντιστοιχεί στο αποπρωτονιωμένο μητρικό ιόν ($[M-H]^-$), καθώς και η κορυφή 499.92 η οποία αντιστοιχεί στο αποπρωτονιωμένο ισοτοπικό μητρικό ιόν ($[M+1-H]^-$) και η κορυφή 500.89 που αντιστοιχεί σε ένα δεύτερο ισοτοπικό ιόν ($[M+2-H]^-$).



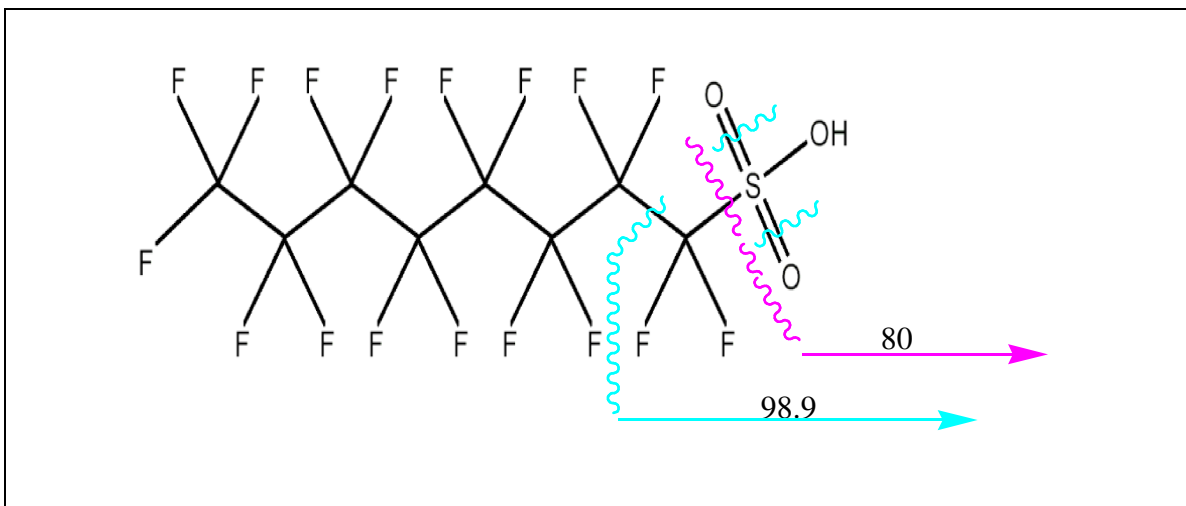
Σχήμα 11: Φάσμα μάζας MS/MS του PFOS

Στο φάσμα μάζας MS/MS (Σχ. 11) εμφανίζονται εκτός από την κορυφή του μητρικού ιόντος (498.91), οι κορυφές των θραυσμάτων του PFOS ύστερα από την διάσπαση αυτού. Οι κορυφές των θραυσμάτων είναι οι 79.95 και 98.93 και αντιστοιχούν στη διάσπαση της ένωσης και την αποχώρηση συγκεκριμένων ομάδων από αυτή (βλ. σχήμα 13). Ο λόγος των εντάσεων των ιόντων ποσοτικοποίησης ($m/z = 79.95$ και $m/z = 98.93$) είναι 1.26.

Τα θραύσματα των επισημασμένων και μη PFOS και PFOA, των οποίων οι κορυφές προαναφέρθηκαν, εμφανίζονται ακολούθως:

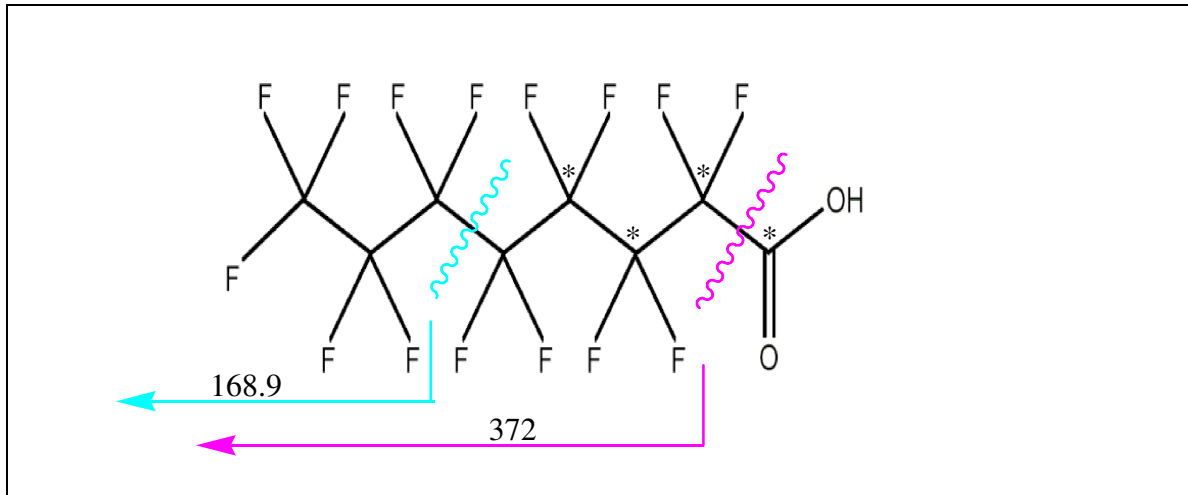


Σχήμα 12: Διάσπαση του PFOA και παραγωγή θραυσμάτων

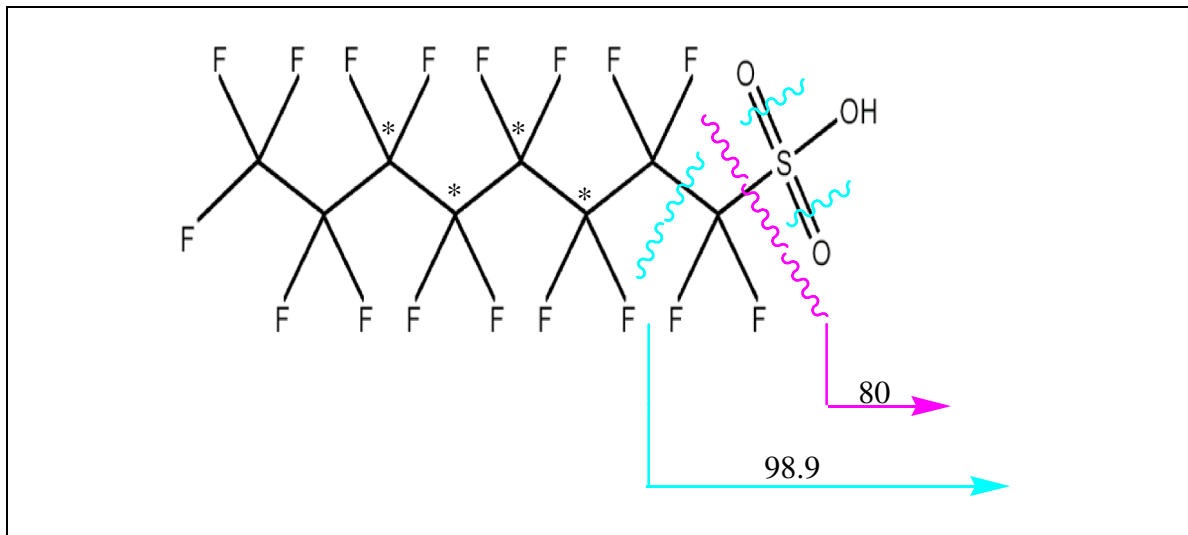


Σχήμα 13: Διάσπαση του PFOS και παραγωγή θραυσμάτων

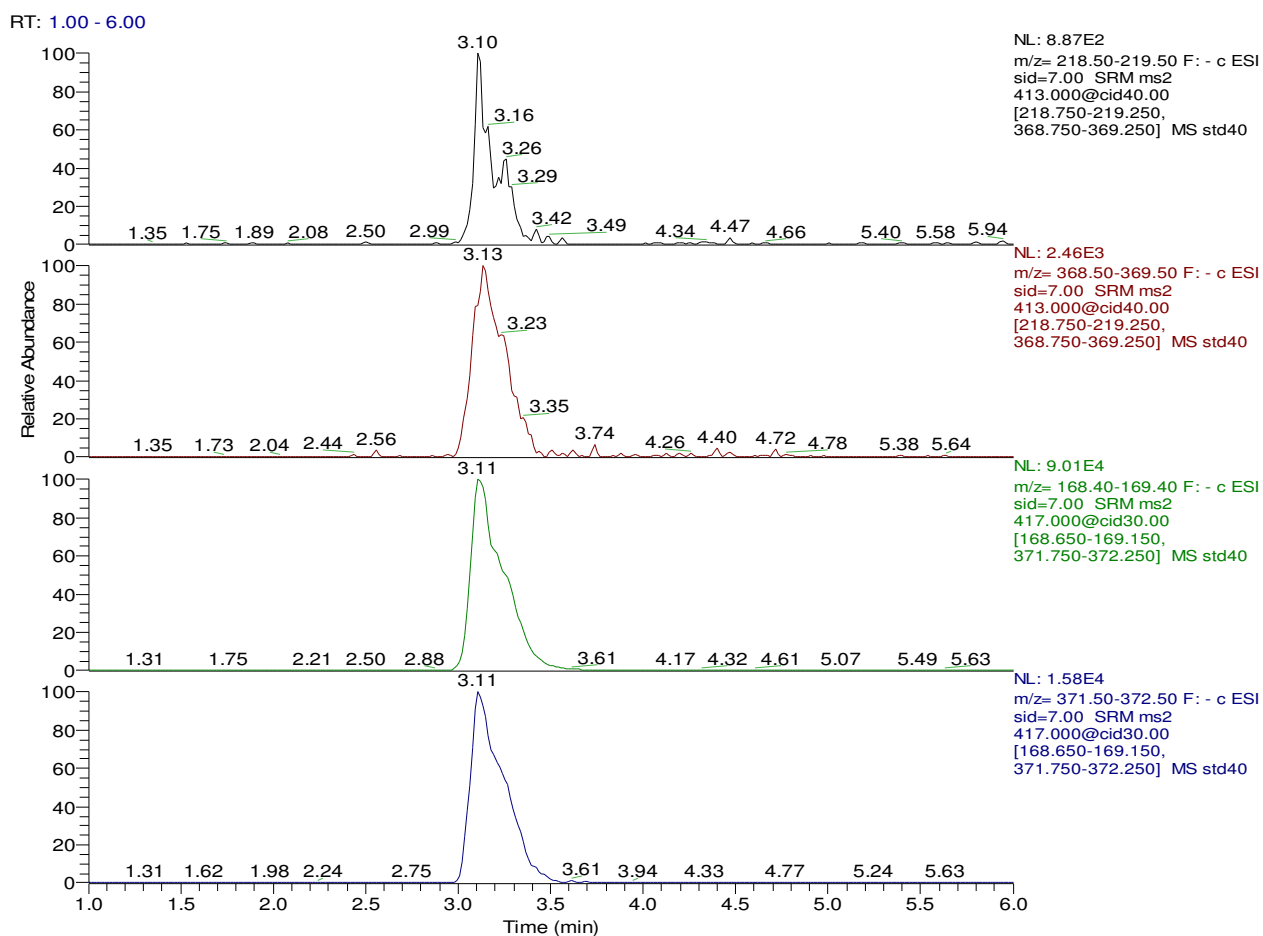
Αντίστοιχα στα σχήματα 14, 15 εμφανίζονται τα σημεία του μορίου όπου λαμβάνει χώρα η διάσπαση των επισημασμένων PFOS και PFOA.



Σχήμα 14: Διάσπαση του $^{13}\text{C}_4$ -PFOA και παραγωγή θραυσμάτων

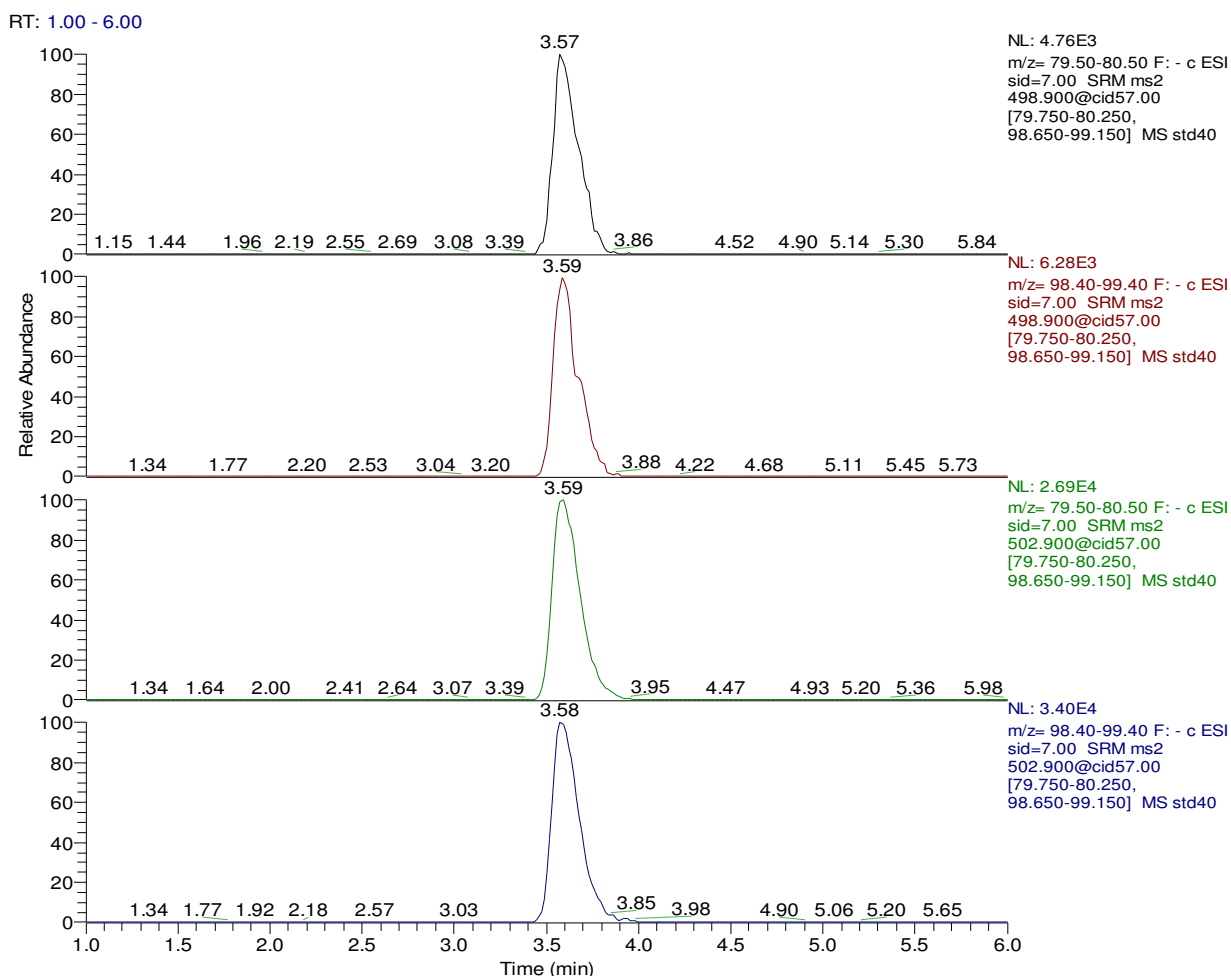


Σχήμα 15: Διάσπαση του $^{13}\text{C}_4$ -PFOS και παραγωγή θραυσμάτων



Σχήμα 16: Χρωματογράφημα του PFOA

Στο χρωματογράφημα του PFOA (Σχ. 16) εμφανίζονται σε χρόνο 3.13 οι κορυφές (δύο πάνω) των δύο θραυσμάτων του μητρικού ιόντος (m/z : 219 και m/z : 369), καθώς επίσης και οι κορυφές (δύο κάτω) των θραυσμάτων του αντίστοιχου επισημασμένου μητρικού ιόντος, $^{13}\text{C}_4\text{-PFOA}$, σε χρόνο 3.11 οι οποίες αντιστοιχούν σε m/z ίσο με 168.9 και 372 αντίστοιχα.



Σχήμα 17: Χρωματογράφημα του PFOS

Στο χρωματογράφημα του PFOS (Σχ. 17) εμφανίζονται σε χρόνο 3.57 οι κορυφές (δύο πάνω) των δύο θραυσμάτων του μητρικού ιόντος (m/z : 80 και m/z : 98.9), καθώς επίσης και οι κορυφές (δύο κάτω) των θραυσμάτων του αντίστοιχου επισημασμένου μητρικού ιόντος, $^{13}\text{C}_4$ -PFOS, σε χρόνο 3.59 οι οποίες ισοδυναμούν με $m/z = 80$ και $m/z = 98.9$ αντίστοιχα.

Μετά το τέλος της ανάλυσης γίνεται ποιοτική και ποσοτική επεξεργασία των χρωματογραφημάτων με το πρόγραμμα Quan και ελέγχονται τα κριτήρια που περιγράφονται στον έλεγχο ποιότητας της μεθόδου.

6.2.5 Επικύρωση της μεθόδου

Σύμφωνα με την οδηγία (2002/657/EC) το 2002 και την οδηγία της EURACHEM "The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics" χρησιμοποιήθηκαν ένα δείγμα γνωστής συγκέντρωσης σε PFOA και PFOS, ένα δείγμα μηδενικής συγκέντρωσης (blank sample) όπου προστέθηκαν γνωστές ποσότητες PFOS και PFOA και πρότυπα διαλύματα για να προσδιοριστούν οι παρακάτω παράμετροι:

- **Επιβεβαίωση της ταυτότητας του αναλύτη / ειδίκευση**
- **Εύρος εργασίας πρότυπης καμπύλης**
- **Όριο ανίχνευσης – όριο ποσοτικοποίησης**
- **Επαναληψιμότητα**
- **Αναπαραγωγιμότητα**
- **Ανάκτηση**
- **Έλεγχος επιμόλυνσης**
- **Αβεβαιότητα**
- **Εσωτερικός έλεγχος**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου

- **Επιβεβαίωση της ταυτότητας του αναλύτη / ειδίκευση**

Εξασφαλίζεται με τη χρήση επισημασμένων προτύπων $^{13}\text{C}_4$ -PFOS και $^{13}\text{C}_4$ -PFOA και φασματομετρίας μάζας. Η ανοχή στο σχετικό χρόνο κατακράτησης των PFOS και PFOA σε σχέση με τον χρόνο κατακράτησης του αντίστοιχου επισημασμένου προτύπου είναι ± 0.2 . Ακόμη ελέγχεται ότι ο λόγος της έντασης των ιόντων ποσοτικοποίησης προς αυτών της ταυτοποίησης m/z 219/369 και 80/98.9 είναι εντός των ορίων $\pm 20\%$ του λόγου των ιόντων προτύπων PFOS και PFOA ίδιας συγκέντρωσης.

- **Ανάκτηση**

Εξασφαλίζεται με τη χρήση επισημασμένων προτύπων (isotope dilution method).

- **Έλεγχος επιμόλυνσης**

Ο έλεγχος επιμόλυνσης έγινε με την έγχυση στον φασματογράφο μάζας τυφλού δείγματος (blank solvent) μετά από πυκνό πρότυπο, οπότε δεν ανιχνεύθηκε επιπλέον κορυφή. Επίσης, αναλύθηκε τυφλό (blank method) που ακολούθησε όλα τα στάδια της ανάλυσης και για το οποίο δεν ανιχνεύθηκαν κορυφές των PFOS και PFOA στον φασματογράφο μάζας.

- **Αβεβαιότητα**

Για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας ελήφθησαν υπόψη τόσο τυχαίες όσο και συστηματικές επιδράσεις. Συγκεκριμένα τα δεδομένα του υπολογισμού προέκυψαν από:

- Τα δεδομένα αναπαραγωγιμότητας.
- Τα συστηματικά σφάλματα που προκύπτουν από τη χρήση του εξοπλισμού (στοιχεία κατασκευαστών υάλινου εξοπλισμού, στοιχεία από τη διακρίβωση του εξοπλισμού).
- Τα δεδομένα των προτύπων υλικών (στοιχεία σύστασής τους από τον κατασκευαστή).

▪ **Εσωτερικός έλεγχος**

Με σκοπό την διασφάλιση ποιότητας των αποτελεσμάτων σε κάθε σειρά δειγμάτων χρησιμοποιείται:

- Δείγμα μηδενικής συγκέντρωσης, στο οποίο ακολουθείται όλη η διαδικασία απομόνωσης και clean up, ώστε να διασφαλιστεί ότι τα αντιδραστήρια και τα γυαλικά που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας είναι ελεύθερα από PFOS και PFOA.
- Διάλυμα ελέγχου απόκρισης του οργάνου (standard 10). Τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού παρακολουθούνται μέσω control chart. Τα όρια αποδοχής της μέτρησης είναι η διευρημένη αβεβαιότητα ($\pm 2\sigma$).
- Εσωτερικό πρότυπο επισημασμένο με άνθρακα 13: το σχετικό πρότυπο χρησιμοποιείται ως οδηγός για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό του PFOA και PFOS. Επιπλέον, με την ανακτώμενη ποσότητα του επισημασμένου προτύπου διαπιστώνεται αν υπήρξε πρόβλημα κατά την επεξεργασία του δείγματος.

▪ **Εύρος εργασίας πρότυπης καμπύλης**

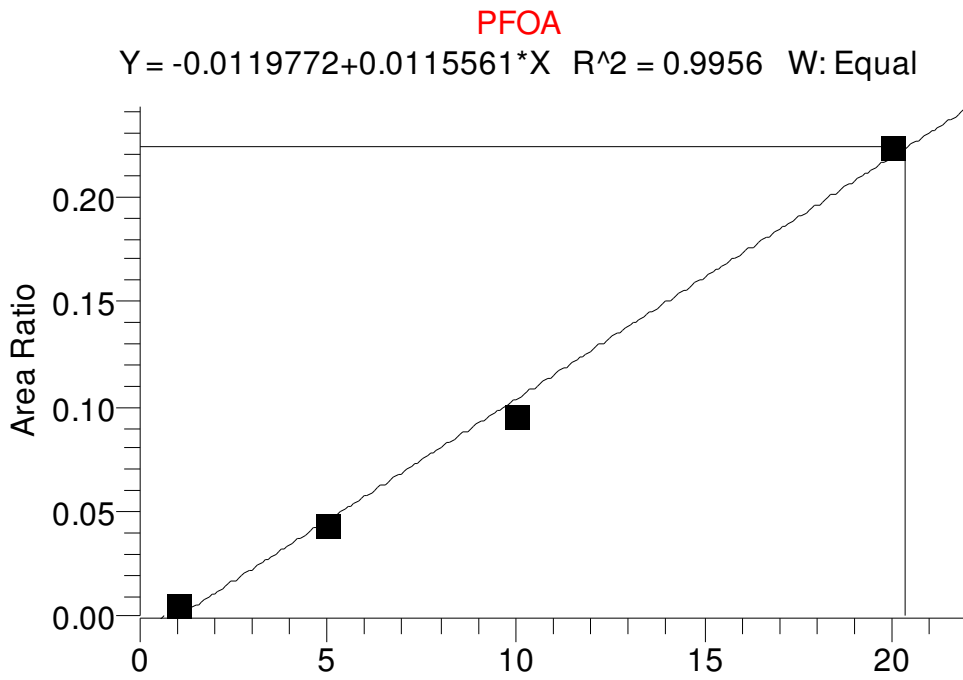
Η πρότυπη καμπύλη του PFOA έχει εξίσωση

$$y = -0.0119772 + 0.0115561 * x \text{ και } r^2 = 0.9956 \quad (\text{Σχήμα 18}).$$

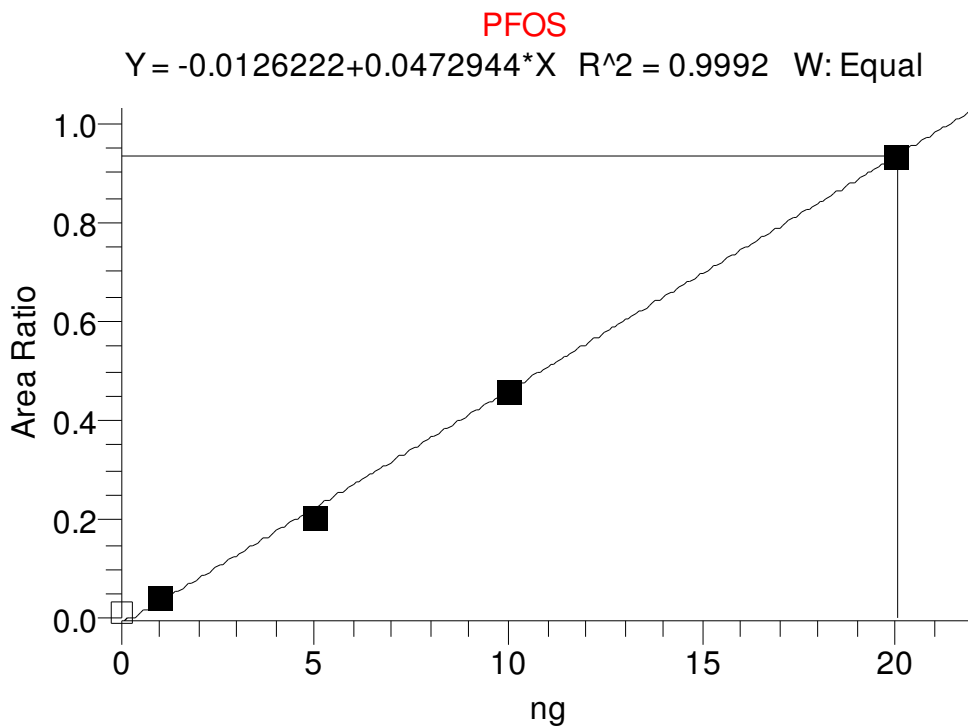
Αντίστοιχα η πρότυπη καμπύλη του PFOS έχει εξίσωση

$$y = -0.0126222 + 0.0472944 * x \text{ και } r^2 = 0.9992 \quad (\text{Σχήμα 19}).$$

Ως κριτήριο αποδοχής της καμπύλης ορίζεται $r \geq 0.99$.



Σχήμα 18: Πρότυπη καμπύλη του PFOA



Σχήμα 19: Πρότυπη καμπύλη του PFOS

- **Όριο ανίχνευσης – όριο ποσοτικοποίησης**

Όριο απόφασης (CCα) = 0,11 ng/g

Όριο ανίχνευσης (CCβ) = 0.13 ng/g

LOD = 0.15 (συγκέντρωση που δίνει σήμα τριπλάσιο του θορύβου)

LOQ = 0.50 (συγκέντρωση που δίνει σήμα δεκαπλάσιο του θορύβου)

- **Επαναληψιμότητα**

Μετρήθηκαν 6 δείγματα (5 g) μηδενικής συγκέντρωσης (blank sample) στα οποία προστέθηκαν 5.0 ng (1.0 ppb) PFOA και PFOS, 6 δείγματα μηδενικής συγκέντρωσης (blank sample) στα οποία προστέθηκαν 25.0 ng (5ppb) PFOS και PFOA και 6 δείγματα μηδενικής συγκέντρωσης (blank sample) στα οποία προστέθηκαν 50.0 ng (10.0 ppb) PFOS και PFOA. Οι προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις για το κάθε δείγμα, καθώς και οι αντίστοιχες τιμές των μέσων όρων, της τυπικής απόκλισης, της εκατοστιαίας τυπικής απόκλισης και του επί τοις εκατό σφάλματος εμφανίζονται στους ακόλουθους πίνακες (Πίνακας 4, 5, 6, 7):

Πίνακας 4: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις PFOA

Αριθμός δείγματος	1.0ng/g	5.0ng/g	10.0ng/g
1	1,03	5,03	10,20
2	1,04	5,05	10,30
3	1,01	5,05	10,11
4	1,02	5,03	10,16
5	1,18	5,00	10,16
6	1,04	5,03	10,15

Πίνακας 5: Στατιστικά αποτελέσματα των δεδομένων επαναληψιμότητας του PFOA

Fortification level	1.0ng/g	5.0ng/g	10.0ng/g
Average	1,05	5,03	10,18
SD	0,06	0,02	0,07
%RSD	6,13	0,36	0,66
%ER	5,30	0,64	1,80

Πίνακας 6: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις PFOS

Αριθμός δείγματος	1.0ng/g	5.0ng/g	10.0ng/g
1	1,02	5,07	10,18
2	1,03	5,12	10,32
3	1,02	5,19	10,19
4	1,02	5,16	10,22
5	1,03	5,05	10,13
6	1,02	5,14	10,08

Πίνακας 7: Στατιστικά αποτελέσματα των δεδομένων επαναληψιμότητας του PFOS

Fortification level	1.0ng/g	5.0ng/g	10.0ng/g
Average	1,02	5,12	10,19
SD	0,01	0,05	0,08
%RSD	0,51	0,99	0,79
%ER	2,30	2,41	1,87

- **Αναπαραγωγικότητα**

Δείγμα μηδενικής συγκέντρωσης (blank sample) στο οποίο προστέθηκε συγκέντρωση PFOS και PFOA 5ng/g μετρήθηκε 6 φορές σε διαφορετικές ημέρες. Ακολούθως εμφανίζονται οι προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις τόσο για το PFOS όσο και για το PFOA, καθώς επίσης και τα στατιστικά αποτελέσματα αυτών (Πίνακας 8,9).

Πίνακας 8: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA εμβολισμένων δειγμάτων συγκέντρωσης 5 ng/g σε διαφορετικές ημέρες.

Ημέρα ανάλυσης	PFOA (ng/g)	PFOS (ng/g)
1	5,03	5,07
2	5,20	5,18
3	5,37	5,60
4	5,46	5,31
5	5,57	5,16
6	5,31	5,17

Πίνακας 9: Στατιστικά αποτελέσματα των δεδομένων αναπαραγωγικότητας των PFOS και PFOA

Fortification level	PFOA Interday	PFOS Interday
Average	5,32	5,25
SD	0,19	0,19
%RSD	3,56	3,57
%ER	6,47	5.00

Από όλα τα δεδομένα προκύπτει ότι η σχετική τυπική απόκλιση της μεθόδου είναι περίπου 7%.

7.2 Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού PFOS και PFOA στα δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 10). Για λόγους ευκολίας τα αποτελέσματα έχουν κατηγοριοποιηθεί βάση του είδους των δειγμάτων.

Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις PFOS και PFOA (ng/g δείγματος) στα διάφορα είδη τροφίμων

ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	PFOA	PFOS	ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ
ΚΡΕΑΣ ΧΟΙΡΙΝΟ			
1	ND	ND	Ελλάδα
2	ND	ND	Ελλάδα
3	ND	ND	Ελλάδα
4	0.83	ND	Κύπρος
ΚΡΕΑΣ ΒΟΔΙΝΟ			
1	ND	ND	Ελλάδα
2	ND	0.89	Ελλάδα
3	ND	ND	Ελλάδα
4	ND	ND	Ελλάδα
5	ND	1.71	Κύπρος
6	0.72	ND	Κύπρος
7	ND	ND	Ελλάδα
ΚΡΕΑΣ ΠΡΟΒΕΙΟ			
1	ND	ND	Ελλάδα
2	ND	ND	Ελλάδα
3	ND	1.74	Ελλάδα
ΚΟΤΟΠΟΥΛΟ			
1	ND	ND	Ελλάδα
2	1	ND	Ελλάδα
3	ND	ND	Ελλάδα
4	ND	ND	Ελλάδα
5	ND	ND	Κύπρος

ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	PFOA	PFOS	ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ
ΨΑΡΙΑ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΑΛΙΕΙΑΣ			
1 μπακαλιάρος	ND	ND	Ελλάδα
2 μπακαλιάρος	6.19	5.8	Ελλάδα
3 μπαλάδες	ND	ND	Ελλάδα
4 σκορπιός	ND	2.23	Κύπρος
5 σαφρίδια	1.99	4.09	Ελλάδα
ΨΑΡΙΑ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΕΙΟΥ			
1 χέλι	ND	ND	Ελλάδα
2 τσιπούρα	ND	ND	Κύπρος
3 πέστροφα	ND	ND	Ελλάδα
4 τσιπούρα	ND	ND	Ελλάδα
ΓΑΛΑ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ			
1	ND	ND	Ελλάδα
2	ND	ND	Ελλάδα
3	ND	ND	Ελλάδα
4	ND	ND	Ελλάδα
5	ND	ND	Κύπρος
6	ND	ND	Κύπρος
ΓΑΛΑ ΠΡΟΒΕΙΟ			
1	ND	ND	Ελλάδα
2	ND	ND	Ελλάδα
3	ND	ND	Ελλάδα
ΑΥΓΟ			
1	0.62	2.42	Κύπρος
ΚΑΡΟΤΟ			
1	ND	1.22	Κύπρος
ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ			
1	ND	ND	Κύπρος
ΠΑΙΔΙΚΕΣ ΤΡΟΦΕΣ			
1	ND	ND	Κύπρος

N.D.: Not detected, LOD: 0.15, LOQ: 0.50

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται πως οι συγκεντρώσεις PFOS και PFOA για κάθε κατηγορία κυμαίνονται μεταξύ των εξής τιμών (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Διακυμάνσεις των συγκεντρώσεων των PFOS και PFOA ανά κατηγορία τροφίμων

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ	PFOA	PFOS
Κρέας χοιρινό (n=4)	ND - 0.83	ND
Κρέας βοδινό (n=7)	ND – 0.72	ND – 1.71
Κρέας πρόβειο (n=3)	ND	ND – 1.74
Κοτόπουλο (n=5)	ND - 1.00	ND
Ψάρια ελεύθερης αλιείας (n=5)	ND – 6.19	ND – 5.80
Ψάρια ιχθυοτροφείου (n=4)	ND	ND
Γάλα αγελαδινό (n=6)	ND	ND
Γάλα πρόβειο (n=3)	ND	ND
Αυγό (n=1)	0.62	2.42
Καρότο (n=1)	ND	1.22
Πόσιμο νερό (n=1)	ND	ND
Παιδικές τροφές (n=1)	ND	ND

N.D.: Not detected, LOD: 0.15, LOQ: 0.50

7.3 Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδος, κατάλληλη για τον προσδιορισμό PFOS και PFOA τόσο σε υγρά όσο και σε στερεά δείγματα τροφίμων. Στο στάδιο εκχύλισης της συγκεκριμένης μεθόδου χρησιμοποιήθηκε σύγχρονη αυτοματοποιημένη τεχνική εκχύλισης (ASE). Όσον αφορά στο στάδιο ποσοτικοποίησης των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και συζευγμένη φασματομετρία μάζας (MS/MS). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η επικύρωση της μεθόδου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οποίας η μέθοδος χαρακτηρίζεται κατάλληλη για τον

προσδιορισμό PFOS και PFOA σε τρόφιμα. Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διάφορα είδη τροφίμων από την Ελλάδα και την Κύπρο.

Παρατηρείται πως στα περισσότερα δείγματα τροφίμων τόσο της Ελλάδας όσο και της Κύπρου, οι συγκεντρώσεις του PFOS και του PFOA ήταν χαμηλότερες από το όριο ανίχνευσης ($LOD=0.15$ ng/g). Αναλυτικότερα το PFOS δεν προσδιορίστηκε σε κανένα δείγμα χοιρινού κρέατος, κοτόπουλου, γάλακτος, και ψαριού ιχθυοτροφείου. Δεν προσδιορίστηκε επίσης στο δείγμα πόσιμου νερού και παιδικής τροφής, από τα οποία όμως δεν μπορεί να διεξαχθεί αξιόπιστο συμπέρασμα καθώς ο αριθμός δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν πολύ μικρός. Το PFOS προσδιορίστηκε σε 8 δείγματα και η συγκέντρωσή του κυμαινόταν μεταξύ 0.89-5.80 ng/g w.w. Η μέγιστη συγκέντρωση του PFOS προσδιορίστηκε σε δείγμα ψαριού ελεύθερης αλιείας (5.8 ng/g).

Όσον αφορά στο PFOA προσδιορίστηκε συνολικά σε 6 δείγματα και η συγκέντρωσή του κυμαινόταν μεταξύ 0.62-6.19 ng/g w.w. Το PFOA δεν προσδιορίστηκε σε κανένα δείγμα πρόβειου κρέατος, γάλακτος και ψαριού ιχθυοτροφείου. Επίσης η συγκέντρωσή του ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης στο δείγμα του καρότου, του πόσιμο νερού και της παιδικής τροφής. Η μέγιστη συγκέντρωση του PFOA προσδιορίστηκε σε δείγμα ψαριού ελεύθερης αλιείας και ήταν ίση με 6.19 ng/g.

Παρατηρείται πως τόσο για το PFOS όσο και για το PFOA η μεγαλύτερη συγκέντρωση προσδιορίστηκε σε δείγμα ψαριού ελεύθερης αλιείας. Αναφέρεται πως τα ψάρια, πέραν της διατροφής τους, προσλαμβάνουν καθημερινά μεγάλες ποσότητες υδάτων μέσω των βραγχίων που διαθέτουν. Αναλυτικότερα, το νερό που εισέρχεται από το στόμα τους περιβρέχει τα βράγχια και συγκεκριμένα τους αγγειοφόρους ιστούς των βραγχίων, και στη συνέχεια εξέρχεται από τις βραγχιακές σχισμές. Ως εκ τούτου, τα βράγχια των ψαριών λειτουργούν ως 'φίλτρα' για τους οργανικούς ρύπους τόσο των θαλάσσιων όσο και των γλυκών υδάτων. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, καθώς και το γεγονός πως τα PFOS και PFOA χαρακτηρίζονται από υδροφιλικότητα και έχουν ανιχνευτεί τόσο σε δείγματα υδάτων όσο και σε δείγματα του πυθμένα, αναμένεται οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών αν προσδιορίζονται στα ψάρια.

Επισημαίνεται πως στα δείγματα ψαριών ιχθυοτροφείου οι προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις για το PFOS και το PFOA ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, γεγονός που πιθανότατα συνδέεται με την διατροφή τους, η οποία διαφέρει από την αντίστοιχη των ψαριών ελεύθερης αλιείας.

Γενικότερα, τα χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων (κάτω από το όριο ανίχνευσης στα περισσότερα δείγματα) των PFOS και PFOA στα δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν αποδίδονται κυρίως στην περιορισμένη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων που περιέχουν PFCs στην Ελλάδα και την Κύπρο.

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός πως οι συγκεντρώσεις των PFOS και PFOA που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα (τάξη των ng/g δείγματος) σε σύγκριση με αυτά άλλων χωρών, όπως ο Καναδάς [198], η Ισπανία [207], η Νορβηγία [201], και το Ηνωμένες Βασίλειο [205]. Ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 12) όπου εμφανίζονται τα αποτελέσματα της παρούσας αλλά και άλλων αντίστοιχων μελετών, ύστερα από τον προσδιορισμό του PFOS και του PFOA σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων.

Πίνακας 12: Προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις PFOS και PFOA σε διάφορες κατηγορίες τροφίμων ύστερα από μελέτες σε διάφορες χώρες

Κατηγορία τροφίμων	Ελλάδα-Κύπρος		Νορβηγία		Ισπανία		Ην. Βασίλειο		Καναδάς	
	PFOS M.O.	PFOA M.O.	PFOS M.O.	PFOA M.O.	PFOS M.O.	PFOA M.O.	PFOS M.O.	PFOA M.O.	PFOS M.O.	PFOA M.O.
Ψάρια	1,68	1,29	0,077	0,038	0,339	0,095	3,50	1,80	2,00	0,60
Κρέας	0,65	0,55	0,032	0,044	0,033	0,056	2,50	1,10	1,80	1,20
Γαλακτοκομικά	0,50	0,50	0,007	0,005	0,121	0,04	1,00	1,00		
Λαχανικά	1,22	0,50	0,0006	0,009	0,022	0,027	1,00	1,00		
Βιβλιογραφία	Παρούσα μελέτη		Haug L.S., et al., 2010		Ericson I., et al., 2008		Mortimer D.N., et al., 2009		Tittlemier S.A., et al., 2007	

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APFO	Ammonium perfluorooctane
ASE	Accelerated Solvent Extractor
BFRs	Brominated Flame Retardants Βρωμιωμένα επιβραδυντικά φλόγας
CE	Capillary electrophoresis
CI	Chemical Ionization Χημικός ιοντισμός
CRM	Certified Reference Material Πιστοποιημένο υλικό αναφοράς
DL ή LOD	Detection Limit Όριο ανιχνεύσεως
ECF	Simon Electrochemical Fluorination
EFSA	European Food Safety Authority
EI	Electron Ionization Πρόσκρουση ηλεκτρονίων
EPA	Environmental Protection Agency
ER	Error Σφάλμα
ESI	ElectroSpray ionization Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
FAB	Fast Atom Bombardment Βομβαρδισμός με ταχεία άτομα
FTICR	Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance Αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier
FWHM	Full Width at Half Maximum
GC-MS	Gas chromatography – Mass spectrometry
HED	Hey Energy Dynode Δύνοδος υψηλής ενέργειας

HPLC	High Performance Liquid Chromatography Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
HRMS	High Resolution MS Όργανα υψηλής διακριτικής ικανότητας
IT	Ion trap Τετραπολική παγίδα ιόντων
LC-MS	Liquid chromatography- mass spectrometry
L-FABP	liver fatty acid binding protein
LRMS	Low Resolution MS Όργανα χαμηλής διακριτικής ικανότητας
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας
N-MeFOSE	N-methyl perfluorooctane sulfonamidoethanol
OASIS WAX	OASIS weak anion exchange
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCBs	Polychlorinated bisphenyl Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
PFAAs	Perfluoroalkyl Acids Υπερφθοροαλκυλιωμένα οξέα
PFAS	Polyfluorinated alkyl substances
PFCs	Perfluorinated compounds Υπερφθοριωμένες ενώσεις
PFHxA ή C6	Perfluorohexanoic acid Υπερφθοροεξανοϊκό οξύ
PFOA	Perfluorooctanoic acid Υπερφθοροοκτανοϊκό οξύ
PFOF	Perfluorooctanonyl fluorides
PFOS	Perfluorooctane sulfate Σουλφονικό υπερφθοροοκτάνιο
PFOS-F ή POSF	Perfluorooctane sulfonyl fluoride
POPs	Persistent organic pollutants Ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι
Q	Quadrupole Τετραπολικός αναλυτής μαζών ή τετράπολο
QL ή LOQ	Quantitation Limit Όριο ποσοτικοποίησης

QQQ	Triple quadrupole Τριπλό τετράπολο
r	Repeatability Limit Όριο επαναληψιμότητας
R	Reproducibility Limit Όριο αναπαραγωγιμότητας
R	Resolving Power Διακριτική ικανότητα
RF	Response Factor
RSD	Relative Standard Deviation Σχετική τυπική απόκλιση
S	Sensitivity Ευαισθησία
SD	Standar deviation
Tandem MS	Συζευγμένη / Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας
TDI	Tolerable daily intakes Ανεκτά όρια ημερήσιας πρόσληψης
TDI	Total Dietary Intake Συνολική ημερήσια πρόσληψη
TDS	Total diet study
TM	Telomerization Τελομερισμός
TOF	Time Of Flight Αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης
TSI	Thermospray ionization Ιοντισμός με θερμοψεκασμό
US EPA	United States Environmental Protection Agency
T3	Τριϊωδοθυρονίνη
T4	Θυροξίνη

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. C. Lau, K. Anitole, C. Hodes, D. Lai, A. Pfahles-Hutchens, and J. Seed, Perfluoroalkyl Acids: A Review of Monitoring and Toxicological Findings, *Toxicological Sciences*, vol. 99, no. 2, 2007, pp. 366-394.
2. *Water Solubility in Natural Seawater and 3.5% Sodium Chloride Solution - Shake Flask Method*, Environmental Laboratory Project Number EOO-1716, 3M Company, St Paul, MN, 2001a.
3. *Draft Risk Assessment of the Potential Human Health Effects Associated with Exposure to Perfluorooctanoic Acid and its Salts*, US EPA (US Environmental Protection Agency), 2005.
4. *Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain*, EFSA (European Safety Authority), 2008.
5. D. Luebker, K.J. Hansen, N.M. Bass, J.L. Butenhoff, A.M. Seacat, Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein, *Toxicology*, vol. 176, 2002, pp. 175-185.
6. Co-operation on Existing Chemicals, *Hazard Assessment of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and its Salts*, OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2002.
7. P.D. Jones, W. Hu, W. de Coen, J.L. Newsted, J.P. Giesy, Binding of Perfluorinated Fatty Acids to Serum Proteins, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, 2003, pp. 2639-2649.
8. J.P. Vanden Heuvel, B.I. Kuslikis, M.J. Van Rafelghem, R.E. Peterson, Tissue distribution, metabolism, and elimination of perfluorooctanoic acid in male and female rats, *Journal of Biochemical Toxicology*, vol. 6, 1991a, pp. 83-92.
9. J.P. Vanden Heuvel, B.I. Kuslikis, M.J. Van Rafelghem, R.E. Peterson, Disposition of Perfluorodecanoic Acid in Male and Female rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 107, 1991b, pp. 450-459.
10. R. Renner, Growing concern over perfluorinated chemicals, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, 2001, pp. 154A-160A.

11. M.M. Schultz, D.F. Barovsky, J.A. Field, Fluorinated Alkyl Surfactants, *Environ. Eng. Sci.*, vol. 20, 2003, pp. 487-501.
12. S. Bull, K. Foxall, *PFOS and PFOA: Toxicological overview*, CHAPD HQ, HPA (Health Protection Agency, U.K.), version 1, 2009.
13. T.H. Begley, K. White, P. Honigfort, M.L. Twaroski, R. Neches, R.A. Walker, Perfluorochemicals: Potential sources of and migration from food packaging, *Food Add Contam*, vol. 22, 2005, pp. 1023-1031.
14. C.A. Moody, G.N. Hebert, S.H. Strauss, J.A. Field, Occurrence and persistence of perfluorooctanesulfonate and other perfluorinated surfactants in groundwater at a fire-training area at Wurtsmith Air Force Base, Michigan, ESA, *Environ. Monit.*, vol. 5, 2003, pp. 341-345.
15. N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, N. Hanari, T. Okazawa, G. Petrick, Environmental Contamination by Perfluorinated Carboxylates and Sulfonates following the use of fire-fighting foam in Tomakomai, Japan, *Organohalogen Compounds*, vol. 66, 2004, pp. 4063-4068.
16. *Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*, US EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2005.
17. *Perfluorooctanoic Acid and Fluorinated Telomers*, Risk Assessment, US EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2005.
18. C.Y. Lin, P.C. Chen, Y.C. Lin, L.Y. Lin, Association among serum perfluoroalkyl chemicals, glucose homeostasis and metabolic syndrome in adolescents and adults, *Diabetes Care*, vol. 32, 2009, pp. 701-708.
19. G.W. Olsen, J.L. Butenhoff, L.R. Zobel, Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: an epidemiological review with clinical and toxicological perspectives, *Reprod. Toxicol.*, vol. 27, 2009, pp. 212-230.
20. *The 9 new POPs under the Stockholm Convention*, Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs).
21. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 17^{ης} Μαρτίου 2010 σχετικά με την παρακολούθηση των υπερφθοροαλκυλιωμένων ουσιών στα τρόφιμα. (2010/161/ΕΕ).

22. E. Kissa, *Fluorinated Surfactants and Repellents*, second edition, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
23. Final Report (20.12.2008-20.10.2009), *Analysis of the risks arising from the industrial use of Perfluorooctanoic acid (PFOA) and Ammonium Perfluorooctanoate (APFO) and from their use in consumer articles. Evaluation of the risk reduction measures for potential restrictions on the manufacture, placing on the market and use of PFOA and APFO*, RPS Advies B.V., 2010, pp. 1-82.
24. *Environmental and health assessment of perfluorooctanesulfonate and its salts*, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 3M Company, 2003.
25. *Perfluoroalkyl Sulfonates; Significant New Use Rule*, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), vol. 67, no. 47, 2002, pp. 11007-11013,
26. *Perfluoroalkyl Sulfonates; Significant New Use Rule*, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), vol. 72, no.194, 2007, pp. 57222-57235.
27. ΟΔΗΓΙΑ 2006/122/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 12^{ης} Δεκεμβρίου 2006
28. S.L. Johnson, *Announcement of Stewardship Program*, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2006.
- 29., Fact Sheet: *Perfluorinated Compounds (PFCs) and Human Health Concerns*, Global Health & Safety Initiative, 2009, pp. 1-6.
30. G.W. Olsen, J.M. Burriss, J.H. Mandel, L.R. Zobel, Serum Perfluorooctane Sulfonate and Hepatic and Lipid Clinical Chemistry tests in Fluorochemical Production employees, *J. Occup. Environ. Med.*, vol. 9, 1999, pp. 799-806.
31. G.W. Olsen, K.J Hansen, L.A. Stevenson, J.M. Burriss, J.H. Mandel, Human donor liver and serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other perfluorochemicals, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 37, 2003b, pp. 888-891.

32. K. Prevedouros, I.T. Cousins, R.C. Buck, S.H. Korzeniowski, Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006, pp. 32-44.
33. N. Wang, B. Szostek, P.W. Folsom, L.M. Sulecki, V. Capka, R.C. Buck, W.R. Berti, J.T. Gannon, Aerobic biotransformation of ¹⁴C-labeled 8-2 telomer B alcohol by activated sludge from a domestic sewage treatment plant, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005a, pp. 531-538.
34. N. Wang, B. Szostek, R.C. Buck, P.W. Folsom, L.M. Sulecki, V. Capka, W.R. Berti, J.T. Gannon, Fluorotelomer alcohol biodegradation-direct evidence that perfluorinated carbon chains breakdown, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005b, pp. 7516-7528.
35. D.A. Ellis, S.A. Mabury, Chemical ionization pathways of polyfluorinated chemicals-a connection to environmental atmospheric processes, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 14, 2003, pp. 1177-1191.
36. D.A. Ellis, J.W. Martin, A.O. De Silva, S.A. Mabury, M.D. Hurley, M.P. Sulbaek Andersen, T.J. Wallington, Degradation of fluorotelomer alcohols: a likely atmospheric source of perfluorinated carboxylic acids, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, 2004, pp. 3316-3321.
37. E. Vésine, V. Bossoutrot, A. Mellouki, G. Le Bras, J. Wenger, H. Sidebottom, Kinetic and Mechanistic Study of OH- and Cl-Initiated Oxidation of Two Unsaturated HFCs: C₄F₉CH=CH₂ and C₆F₁₃CH=CH₂, *J. Phys. Chem. A.*, vol. 104, 2000, pp. 8512-8520.
38. N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, G. Petrick, T. Gamo, A global survey of perfluorinated acids in oceans, *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 51, 2005, pp. 658-668.
39. J.C. D'Eon, M.D. Hurley, T.J. Wallington, S.A. Mabury, Atmospheric chemistry of N-methyl perfluorobutane sulfonamidoethanol, C₄F₉SO₂N(CH₃)CH₂CH₂OH: Kinetics and mechanism of reaction with OH, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006, pp. 1862-1868.

40. D.A. Ellis, J.W. Martin, S.A. Mabury, M.D. Hurley, M.P. Sulbaek-Andersen, T.J. Wallington, Atmospheric lifetime of fluorotelomer alcohols, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 37, 2003, pp. 3816-3820.
41. J.W. Martin, D.A. Ellis, S.A. Mabury, Atmospheric chemistry of perfluoroalkanesulfonamides: Kinetic and product studies of the OH radical and Cl atom initiated oxidation of N-ethyl perfluorobutanesulfonamide, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006, pp. 864-872.
42. N.L. Stock, F.K. Lau, D.A. Ellis, J.W. Martin, D.C. Muir, S.A. Mabury, Polyfluorinated telomere alcohols and sulfonamides in the North American troposphere, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 66, 2002, pp. 991-996.
43. C.J. Young, V.I. Furdui, J. Franklin, R.M. Koerner, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, Perfluorinated acids in arctic snow: New evidence for atmospheric formation, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, 2007, pp. 3455-3461.
44. T.J. Wallington, M.D. Hurley, J. Xia, D.J. Wuebbles, S. Sillman, A. Ito, J.E. Penner, D.A. Ellis, J. Martin, S.A. Mabury, Formation of C7F15COOH (PFOA) and other perfluorocarboxylic acids during the atmospheric oxidation of 8:2 fluorotelomer alcohol, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 3, 2006, pp. 924-930.
45. K. Sasaki, K. Harada, N. Saito, T. Tsutsui, S. Nakanishi, H. Tsuzuki, A. Koizumi, Impact of Airborne Perfluorooctane Sulfonate on the Human Body Burden and the Ecological System, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 71, 2003, pp. 408-413.
46. K. Harada, S. Nakanishi, N. Saito, T. Tsutsui, A. Koizumi, Airborne Perfluorooctanoate may be a Substantial Source Contamination in Kyoto Area, Japan, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 64, 2005, pp. 64-69.
47. A. Jahnke, U. Berger, R. Ebinghaus, C. Temme, Latitudinal gradient of airborne polyfluorinated alkyl substances in the marine atmosphere

- between Germany and South Africa (53° N-33° S), *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 9, 2007, 3055-3061.
48. I. Weinberg, A. Dreyer, R. Ebinghaus, Landfills as sources of perfluorinated compounds, polybrominated diphenyl ethers and musk fragrances to ambient air, *Atmospheric Environment*, vol. 46, 2011, pp. 935-941.
49. J.L. Barber, U. Berger, C. Chaemfa, S. Huber, A. Jahnke, C. Temme, K.C. Jones, Analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in air samples from Northwest Europe, *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 9, 2007, pp. 530-541.
50. A. Dreyer, V. Matthias, C. Temme, R. Ebinghaus, Annual time series of air concentrations of polyfluorinated compounds, *Environmental Science & Technology*, vol. 43, 2009b, pp. 4029-4036.
51. A. Jahnke, L. Ahrens, R. Ebinghaus, C. Temme, Urban versus remote air concentrations of fluorotelomer alcohols and other polyfluorinated alkyl substances in Germany, *Environmental Science & Technology*, vol. 41, 2007, 745-752.
52. A. Dreyer, R. Ebinghaus, Polyfluorinated compounds in ambient air from ship- and land-based measurements in northern Germany, *Atmospheric Environment*, vol. 43, 2009, pp. 1527-1535.
53. K. Harada, S. Nakasanishi, K. Sasaki, K. Furuyama, S. Nakayama, N. Saito, K. Yamakawa, A. Koizumi, Particle size distribution and respiratory deposition estimates of airborne perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate in Kyoto area, Japan, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 76, 2006b, pp. 306-310.
54. C.A. Barton, L.E. Butler, C.J. Zarzecki, J. Flaherty, M. Kaiser, Characterizing perfluorooctanoate in ambient air near the fence line of a manufacturing facility: Comparing modeled and monitored values, *J. Air Waste Manag. Assoc.*, vol. 56, 2006, pp. 48-55.
55. H. Moriwaki, Y. Takata, R. Arakawa, Concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in vacuum cleaner

- dust collected in Japanese homes, *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 5, 2003, pp. 753–757.
56. C. Kubwabo, B. Stewart, J. Zhu, L. Marro, Occurrence of perfluorosulfonates and other perfluorochemicals in dust from selected homes in the city of Ottawa, Canada, *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 7, 2005, pp. 1074–1078.
57. B. Boulanger, J.D. Vargo, J.L. Schnoor, K.C. Hornbuckle, Detection of perfluorooctane surfactants in Great Lakes water, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, 2004, pp. 4064-4070.
58. E.A. Emmett, F.S. Shofer, H. Zhang, D. Freeman, C. Desai, L.M. Shaw, Community exposure to perfluorooctanoate: Relationships between serum concentrations and exposure sources, *J. Occup. Environ. Med.*, vol. 48, 2006a, pp. 759-770.
59. K.J. Hansen, H.O. Johnson, J.S. Eldridge, J.L. Butenhoff, L.A. Dick, Quantitative characterization of trace-levels of PFOS and PFOA in the Tennessee River, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 36, 2002, pp. 1681-1685.
60. M. Loewen, T. Halldorson, F. Wang, G. Tomy, Fluorotelomer carboxylic acids and PFOS in rainwater from the urban center in Canada, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005, pp. 2944-2951.
61. N. Saito, K. Harada, K. Inoue, K. Sasaki, T. Yoshinaga, A. Koizumi, Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate concentrations in surface water in Japan, *J. Occup. Health*, vol. 46, 2004, pp. 49-59.
62. M.K. So, S. Taniyasu, N. Yamashita, J.P. Giesy, J. Zheng, Z. Fang, S.H. Im, P.K.S. Lam, Perfluorinated compounds in coastal waters of Hong Kong, South China, *Korea Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, 2004, pp. 4056-4063.
63. D. Skutlarek, M. Exner, H. Farber, Perfluorinated Surfactants in Surface and Drinking Waters, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 13, no. 5, 2006, pp. 299-307S.
64. Taniyasu, K. Kannan, Y. Horii, N. Hanari, N. Yamashita, A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds

- in water, fish, birds, and human from Japan, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 37, 2003, pp. 2634-2639.
65. C.A. Moody, J.W. Martin, W.C. Kwan, D.C. Muir, S.A. Mabury, Monitoring perfluorinated surfactants in biota and surface water samples following an accidental release of fire-fighting foam into Etobicoke Creek, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 36, 2002, pp. 545-551.
66. N. Theobald, W. Gerwinski, A. Jahnke, *Occurrence of perfluorinated organic acids in surface sea-water of the East Atlantic Ocean between 53° north and 30° south*. In: Poster presentation at the SETAC Europe Annual Meeting 20–24 May 2007 in Porto, Portugal.
67. S. Wei, L.Q. Chen, S. Taniyasu, M.K., So, M.B. Murphy, N. Yamashita, L.W.Y. Yeung, P.K.S. Lam, S. Wei, L.Q. Chen, Distribution of perfluorinated compounds in surface seawaters between Asia and Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 54, 2008, pp. 1813–1838.
68. N. Yamashita, S. Taniyasu, G. Petrick, S. Wei, T. Gamo, P.K.S. Lam, K. Kannan, Perfluorinated acids as novel chemical tracers of global circulation of ocean waters, *Chemosphere*, vol. 70, 2008, pp. 1247–1255.
69. L. Ahrens, J.L. Barber, Z. Xie, R. Ebinghaus, Longitudinal and latitudinal distribution of perfluoroalkyl compounds in the surface water of the Atlantic Ocean, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, 2009a, pp. 3122–3127.
70. A. Lutz, X. Zhiyong, E. Ralf, Distribution of perfluoroalkyl compounds in seawater from Northern Europe, Atlantic Ocean, and Southern Ocean, *Chemosphere*, vol. 78, 2010, pp. 1011-1016.
71. L. Ahrens, Z. Xie, R. Ebinghaus, Distribution of Perfluoroalkyl compounds in seawater from Northern Europe, Atlantic Ocean, and Southern Ocean, *Chemosphere*, vol. 78, 2010, pp. 1011-1016.
72. S. Taniyasu, K. Kannan, Y. Horii, N. Hanari, N. Yamashita, A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds, and humans from Japan, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 37, 2003, pp. 2634–2639.

73. C. Caliebe, W. Gerwinski, H. Hühnerfuss, N. Theobald, Occurrence of perfluorinated organic acids in the water of the North Sea, *Organohalogen Compd.*, vol. 66, 2004, pp. 4074–4078.
74. X. Ju, Y. Jin, K. Sasaki, N. Saito, Perfluorinated surfactants in surface, subsurface water and microlayer from Dalian coastal waters in China, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, 2008, pp. 3538–3542.
75. B. Boulanger, J.D. Vargo, J.L. Schnoor, K.C. Hornbuckle, Evaluation of perfluorooctane surfactants in a waste water treatment system and in a commercial surface protection product, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005, pp. 5524-5530.
76. DuPont, *Sampling investigation results little hocking water association well field Washington County, Ohio*, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2003a.
77. DuPont, *DuPont global PFOA strategy*, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2005.
78. C.P. Higgins, J.A. Field, C.S. Criddle, R.G. Luthy, Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 37, 2005, pp. 3946-3956.
79. M.M. Schultz, D.F. Barofsky, J.A. Field, Quantitative determination of fluorinated alkyl substances by large-volume-injection liquid chromatography tandem mass spectrometry-Characterization of municipal wastewater, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006, pp. 289-295.
80. R. Alzaga, J.M. Bayone, Determination of perfluorocarboxylic acids in aqueous matrices by ion-pair solid-phase microextraction-in-port derivatization-gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, vol. 1042, 2004, pp. 155-162.
81. M. Houde, R.S. Wells, P.A. Fair, G.D. Bossart, A.A. Hohn, T.K. Rowles, J.C. Sweeney, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, Polyfluoroalkyl compounds in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Gulf of

- Mexico and the Atlantic Ocean, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005, pp. 6591–6598.
82. J.P. Giesy, K. Kannan, Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, 2001, pp. 1339–1342.
83. J.T. Gannon, R.A. Hoke, M.A. Kaiser, T. Mueller, Review II: *Perfluorooctanoic acid (PFOA) in the environment. White paper by DuPont Wilmington, DE. Report Number: DuPont–19567, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), May 23, 2006.*
84. M. Houde, J.W. Martin, R.J. Letcher, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006a, pp. 3463–3473.
85. R. Kallenborn, U. Berger, U. Jarnberg, Perfluorinated alkylated substances (PFAS) in the Nordic environment. TemaNord 2004:552. Nordic Council of Ministers, 2004.
86. R. Bossi, F.F. Riget, R. Dietz, C. Sonne, P. Fauser, M. Dam, K. Vorkamp, Preliminary screening of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and other fluorochemicals in fish, birds, and marine mammals from Greenland and Faroe Islands, *Environ. Pollut.*, vol. 136, 2005a, pp. 323–329.
87. R. Bossi, F.F. Riget, Temporal and spatial trends of perfluorinated compounds in ringed seal (*Phoca hispida*) from Greenland, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005b, pp. 7416–7422.
88. A.O. De Silva, S.A. Mabury, Isolating isomers of perfluorocarboxylates in polar bears (*Ursus maritimus*) from two geographical locations, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, 2004, pp. 6538–6545.
89. K. Kannan, J.C. Franson, W.W. Bowerman, K.J. Hansen, J.D. Jones, J.P. Giesy, Perfluorooctane sulfonate in fish-eating water birds including bald eagles and albatrosses, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, 2001a, pp. 3065–3070.
90. K. Kannan, J. Koistinen, K. Beckmen, T. Evans, J.F. Gorzelany, K.J. Hansen, P.D. Jones, E. Helle, M. Nyman, J.P. Giesy, Accumulation of

- perfluorooctane sulfonate in marine mammals, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 35, 2001b, pp. 1593–1598.
91. K. Kannan, J.W. Choi, N. Iseki, K. Senthilkumar, D.H. Kim, S. Masunaga, J.P. Giesy, Concentrations of perfluorinated acids in livers of birds from Japan and Korea, *Chemosphere*, vol. 49, 2002a, pp. 225–231.
92. J. Falandysz, S. Taniyasu, A. Gulkowska, N. Yamashita, U. Schulte-Oehlmann, Is fish a major source of fluorinated surfactants and repellents in humans living on the Baltic Coast? *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006, pp. 748–751.
93. P.T. Hoff, K. Van de Vijver, T. Dauwe, A. Covaci, J. Maervoet, M. Eens, R. Blust, W. de Coen, Evaluation of biochemical effects related to perfluorooctane sulfonic acid exposure in organohalogencontaminated great tit (*Parus major*) and blue tit (*Parus caeruleus*) nestlings, *Chemosphere*, vol. 61, 2005b, pp. 1558–1569.
94. K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Oehme, S. Focardi, J.P. Giesy, Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in marine mammals, fishes, and birds from coasts of the Baltic and the Mediterranean Seas, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 36, 2002b, pp. 3210–3216.
95. K. Kannan, J. Newsted, R.S. Halbrook, J.P. Giesy, Perfluorooctanesulfonate and related fluorinated hydrocarbons in mink and river otters from the United States, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 36, 2002c, pp. 2566–2571.
96. P.T. Hoff, J. Scheirs, K. Van de Vijver, W. Van Dongen, E.L. Esmans, R. Blust, W. de Coen, Biochemical effect evaluation of perfluorooctane sulfonic acid-contaminated wood mice (*Apodemus sylvaticus*), *Environ. Health Perspect.*, vol. 112, 2004, pp. 681–686.
97. J.W. Martin, M.M. Smithwick, B.M. Braune, P.F. Hoekstra, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, Identification of long-chain perfluorinated acids in biota

- from the Canadian Arctic, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, 2004b, pp. 373–380.
98. J.W. Martin, D.M. Whittle, D.C. Muir, S.A. Mabury, Perfluoroalkyl contaminants in a food web from Lake Ontario, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, 2004c, pp. 5379–5385.
99. M. Smithwick, S.A. Mabury, K.R. Solomon, C. Sonne, J.W. Martin, E.W. Born, R. Dietz, A.E. Derochem, R.J. Letcher, T.J. Evans, et al., Circumpolar study of perfluoroalkyl contaminants in polar bears (*Ursus maritimus*), *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005, pp. 5517–5523.
100. G.T. Tomy, W. Budakowski, T. Halldorson, P.A. Helm, G.A. Stern, K. Friesen, K. Pepper, S.A. Tittlemier, A.T. Fisk, Fluorinated organic compounds in an eastern arctic marine food web, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, 2004, pp. 6475–6481L.
101. Tao, K. Kannan, N. Kajiwara, M. Costa, G. Fillman, S. Takahashi, S. Tanabe, Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in albatrosses, elephant seals, penguins, and polar skuas from the Southern Ocean, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006, pp. 7642–7648.
102. M. Houde, T.A.D. Bujas, J. Small, R.S. Wells, P.A. Fair, G.D. Bossart, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) food web, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006b, pp. 4138–4144.
103. J. Verreault, M. Houde, G.W. Gabrielsen, U. Berger, M. Haukas, R.J. Letcher, D.C.G. Muir, Perfluorinated alkyl substances in plasma, liver, brain and eggs of glaucous gull (*Larus hyperboreus*) from the Norwegian Arctic, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005, pp. 7439–7445.
104. K.E. Holmstrom, U. Jarnberg, A. Bignert, Temporal trends of PFOS and PFOA in guillemot eggs from the Baltic Sea, 1968–2003, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2004, pp. 80–84.
105. M. Smithwick, R.J. Norstrom, S.A. Mabury, K.R. Solomon, T.J. Evans, I. Stirling, M.K. Taylor, D.C.G. Muir, Temporal trends of perfluoroalkyl contaminants in polar bears (*Ursus maritimus*) from two

- locations in the North American Arctic, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006, pp. 1139–1143.
106. K.I. Van de Vijver, P. Hoff, K. Das, S. Brasseur, W. Van Dongen, E. Esmans, P. Reijnders, R. Blust, W. de Coen, Tissue distribution of perfluorinated chemicals in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the Dutch Wadden Sea, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, 2005, pp. 6978–6984.
107. J. Holzer, O. Midasch, K. Rauchfuss, M. Kraft, R. Reupert, J. Angerer, et al., Biomonitoring of perfluorinated compounds in children and adults exposed to perfluorooctanoate-contaminated drinking water, *Environ. Health Perspect.*, vol. 116, 2008, pp. 651–657.
108. M. Shoeib, T. Harner, B.H. Wilford, K.C. Jones, J. Zhu, Perfluorinated sulfonamides in indoor and outdoor air and indoor dust: occurrence, partitioning, and human exposure, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, no. 17, 2005, pp. 6599–6606.
109. K. Steenland, C. Jin, J. MacNeil, C. Lally, A. Ducatman, V. Vieira, et al., Predictors of PFOA levels in a community surrounding a chemical plant, *Environ. Health Perspect.*, vol. 117, 2009, pp. 1083–1088.
110. N.L. Stock, F.K. Lau, D.A. Ellis, J.W. Martin, D.C. Muir, S.A. Mabury SA., Polyfluorinated telomer alcohols and sulfonamides in the North American troposphere, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 4, 2004, pp. 991–996.
111. K. Hoffman, F.T. Webster, G.M. Weisskopf, J. Weinberg, V.M. Vieira, Exposure to Polyfluoroalkyl Chemicals and Attention Deficit/Hyperactivity. Disorder in U.S. Children 12-15 Years of Age, *Environmental Health Perspectives*, vol. 118, no. 12, 2010, pp. 1762-1767.
112. O. Midasch, H. Drexler, N. Hart, M.W. Beckmann, J. Angerer, Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 80, 2007, pp. 643–648.

113. L. Tao, J. Ma, T. Kunisue, E.L. Libelo, S. Tanabe, K. Kannan, Perfluorinated compounds in human breast milk from several Asian countries, and in infant formula and dairy milk from the United States, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, 2008, pp. 8597–8602.
114. W. Voelkel, O. Genzel-Boroviczeny, H. Demmelmair, C. Gebauer, B. Koletzko, D. Twardella, U. Raab, H. Fromme, Perfluorooctane sulphonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in human breast milk: results of a pilot study, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 211, 2008, pp. 440–446.
115. G.L. Kennedy, J.L. Butenhoff, G.W. Olsen, J.G. O'Connor, A.M. Seacat, R.G. Perkins, L.B. Biegel, S.R. Murphy, D.G. Farrar, The toxicology of perfluorooctanoate, *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 34, 2004, pp. 351–384.
116. C. Lau, J.L. Butenhoff, J.M. Rogers, The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 198, 2004, pp. 231–241.
117. E.I. Goldenthal, Final report, ninety day subacute rat toxicity study on Fluorad_ Fluorochemical FC-143, International Research and Development Corporation, Study No. 137F-089, 3M Reference No. T-3141, November 6, 1978a, US EPA,.
118. E.I. Goldenthal, Final report, ninety day subacute rhesus monkey toxicity study, International Research and Development Corporation, Study No. 137- 090, November 10, 1978b, US EPA.
119. A.M. Seacat, P.J. Thomford, K.J. Hansen, L.A. Clemen, S.R. Eldridge, C.R. Elcombe, J.L. Butenhoff, Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats, *Toxicology*, vol. 183, 2003, pp. 117–131.
120. *104-Week dietary chronic toxicity and carcinogenicity study with perfluorooctane sulfonic acid potassium salt (PFOS; T-6295) in rats.* Final Report. 3M Company, St. Paul, US EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2002.

121. L.B. Biegel, M.E. Hurtt, S.R. Frame, J.C. O'Connor, J.C. Cook, Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats, *Toxicol. Sci.*, vol. 60, 2001, pp. 44–55.
122. J.C. Cook, S.M. Murray, S.R. Frame, M.E. Hurtt, Induction of Leydig cell adenomas by ammonium perfluorooctanoate: A possible endocrine-related mechanism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 113, 1992, pp. 209–217.
123. L.J. Sibinski, *Two year oral (diet) toxicity/carcinogenicity study of fluorochemical FC-143 in rats*, Experiment No. 0281CR0012, 3M Company/ Riker Laboratories, Inc., St Paul, MN. U.S. EPA (Environmental Protection Agency), 1987.
124. 3M *Comparative molecular biology of perfluorooctanesulfonate (PFOS, T-6295), N-Ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol (N-EtFOSE, T-6316), N-ethyl- perfluorooctanesulfonamide (N-EtFOSA, T-6868), perfluorooctanesulfonamido acetate (FOSAA, T-7071), and/or perfluorooctanesulfonamide (FOSA, T-7132) in rats and guinea pigs following oral dosing*, Final Report, U.S. EPA Company. July 16, 2004.
125. J. Berthiaume, K.B. Wallace, Perfluorooctanoate, perfluorooctanesulfonate, and N-ethyl perfluorooctanesulfonamido ethanol: Peroxisome proliferation and mitochondrial biogenesis, *Toxicol. Lett.*, vol. 129, 2002, pp. 23–32.
126. A.K. Sohlenius, K. Andersson, J.W. DePierre, The effects of perfluoro-octanoic acid on hepatic peroxisome proliferation and related parameters show no sex-related differences in mice, *Biochem. J.*, vol. 285, 1992, pp. 779–783.
127. A.K. Sohlenius, A.M. Eriksson, C. Hogstrom, M. Kimland, J.W. DePierre, Perfluorooctane sulfonic acid is a potent inducer of peroxisomal fatty acid β -oxidation and other activities known to be affected by peroxisome proliferators in mouse liver, *Pharmacol. Toxicol.*, vol. 72, 1993, pp. 90–93.

128. C. Lau, J.R. Thibodeaux, R.G. Hanson, J.M. Rogers, B.E. Grey, M.E. Stanton, J.L. Butenhoff, L.A. Stevenson, Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II. Postnatal evaluation, *Toxicol. Sci.*, vol. 74, 2003, pp. 382–392.
129. Q. Yang, Y. Xie, J.W. DePierre, Effects of peroxisome proliferators on the thymus and spleen of mice, *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 122, 2000, pp. 219–226.
130. Q. Yang, Y. Xie, A.M. Eriksson, B.D. Nelson, J.W. DePierre, Further evidence for the involvement of inhibition of cell proliferation and development in thymic and splenic atrophy induced by the peroxisome proliferator perfluorooctanoic acid in mice, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 62, 2001, pp. 1133–1140.
131. Q. Yang, Y. Xie, S.E.H. Alexson, B.D. Nelson, J.W. DePierre, Involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the immunomodulation caused by peroxisome proliferators in mice, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 63, 2002a, pp. 1893–1900.
132. Q. Yang, M. Abedi-Valugerdi, Y. Xie, X. Zhao, G. Moller, B.D. Nelson, J.W. DePierre, Potent suppression of the adaptive immune response in mice upon dietary exposure to the potent peroxisome proliferator, perfluorooctanoic acid, *Int. Immunopharmacol.*, vol. 2, 2002b, pp. 289–397.
133. Y. Xie, Q. Yang, B.D. Nelson, J.W. DePierre, Characterization of the adipose tissue atrophy induced by peroxisome proliferation in mice, *Lipids*, vol. 37, 2002, pp. 139–146.
134. C. Lau, M.J. Strynar, A.B. Lindstrom, R.G. Hanson, J.R. Thibodeaux, H.A. Barton, Pharmacokinetic evaluation of perfluorooctanoic acid in the mouse, *Toxicologist*, vol. 84, 2005, pp. 252 (abstract)
135. K.J. Fairley, R. Purdy, S. Kearns, S.E. Anderson, B.J. Meade, Exposure to the immunosuppressant, perfluorooctanoic acid, enhances

- the murine IgE and airway hypersensitivity response to ovalbumin, *Toxicol. Sci.*, vol. 97, 2007, pp. 375–383.
136. D.J. Luebker, R.G. York, K.J. Hansen, J.A. Moore, J.F. Butenhoff, Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: Dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters, *Toxicology*, vol. 215, 2005b, pp. 149–169.
137. J.R. Thibodeaux, R.G. Hanson, J.M. Rogers, B.E. Grey, B.D. Barbee, J.H. Richards, J.L. Butenhoff, L.A. Stevenson, C. Lau, Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. I. Maternal and prenatal evaluations, *Toxicol. Sci.*, vol. 74, 2003, pp. 369–381.
138. E.A. Emmett, H. Zhang, F.S. Shofer, D. Freeman, N.V. Rodway, C. Desai, L.M. Shaw, Community exposure to perfluorooctanoate: Relationships between serum levels and certain health parameters, *J. Occup. Environ. Med.*, vol. 48, 2006b, pp. 771–779.
139. G.W. Olsen, T.R. Church, J.P. Miller, J.M. Burris, K.J. Hansen, J.K. Lundberg, J.B. Armitage, R.H. Herron, Z. Medhdizadehkashi, J.B. Nobiletti, Perfluorooctanesulfonate (PFOS) and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross adult blood donors, *Environ. Health Perspect.*, vol. 111, 2003b, pp. 1892–1901.
140. K. Inoue, F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, S. Nakajima, A. Uno, Y. Saijo, F. Sata, Y. Yoshimura, et al., Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: Assessment of PFOS exposure in a susceptible population during pregnancy, *Environ. Health Perspect.*, vol. 112, 2004, pp. 1204–1207.
141. L.B. Biegel, R.C.M. Liu, M.E. Hurtt, J.C. Cook, Effects of ammonium perfluorooctanoate on Leydig cell function: In vitro, in vivo, and ex vivo studies, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 134, 1995, pp. 18–25.

142. R.C. Bookstaff, R.W. Moore, G.B. Ingall, R.E. Peterson, Androgenic deficiency in male rats treated with perfluorodecanoic acid, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 104, 1990, pp. 322–333.
143. R.C.M. Liu, M.E. Hurtt, J.L. Cook, L.B. Biegel, Effect of the peroxisome proliferators, ammonium perfluorooctanoate (C8), on hepatic aromatase activity in adult male Crl:CD BR (CD) rats, *Fundam. Appl. Toxicol.*, vol. 30, 1996, pp. 220–228.
144. Z. Shi, H. Zhang, Y. Liu, M. Xu, J. Dai, Alterations in gene expression and testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid, *Toxicological Sciences*, vol. 98, 2007, pp. 206-215.
145. M.E. Austin, B.S. Kasturi, M. Barber, K. Kannan, P.S. MohanKumar, S.M.J. MohanKumar, Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats, *Environmental Health Perspectives*, vol. 111, 2003, pp. 1485-1489.
146. L.B. Biegel, M.E. Hurtt, S.R. Frame, J.C. O'Connor, J.C. Cook, Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats, *Toxicol. Sci.*, vol. 60, 2001, pp. 44–55
147. *Perfluorooctyl sulfonates; proposed significant new use rule*, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2000.
148. S. Fuentes, M.T. Colomina, P. Vicens, J.L. Domingo, Influence of maternal restraint stress on the long-lasting effects induced by prenatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) in mice, *Toxicol. Lett.*, vol. 171, no. 3, 2007a, pp. 162–170.
149. S. Fuentes, P. Vicens, M.T. Colomina, J.L. Domingo, Behavioral effects in adult mice exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS), *Toxicology*, vol. 242, no. 1–3, 2007b, pp. 123–129.
150. N. Johansson, A. Fredriksson, P. Eriksson, Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice, *Neurotoxicology*, vol. 29, no. 1, 2008, pp. 160–169.

151. N. Johansson, P. Eriksson, H. Viberg, Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain, *Toxicol. Sci.*, vol. 108, no. 2, 2009, pp. 412–418.
152. B.H. Alexander, *Mortality study of workers employed at the 3M Cottage Grove facility. Final Report. April 26, 2001. Division of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, University of Minnesota*, U.S. EPA (U.S. Environment Protection Agency), 2001a.
153. B.H. Alexander, *Mortality study of workers employed at the 3M Decatur facility. Final Report. April 26, 2001. Division of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, University of Minnesota*, U.S. EPA (U.S. Environment Protection Agency), 2001b.
154. B.H. Alexander, *Bladder cancer in perfluorooctanesulfonyl fluoride: Manufacturing workers*, University of Minnesota, Minneapolis, MN. US EPA (U.S. Environment Protection Agency), 2004.
155. B.H. Alexander, G.W. Olsen, J.M. Burriss, J.H. Mandel, J.S. Mandel, Mortality of employees of a perfluorooctanesulfonyl fluoride manufacturing facility, *Occup. Environ. Med.*, vol. 60, 2003, pp. 722–729.
156. DuPont, *Epidemiology surveillance report: Cancer incidence for Washington Works site 1959-2001*, U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2003b.
157. DuPont, *Ammonium perfluorooctanoate: Phase II. Retrospective cohort mortality analyses related to a serum biomarker of exposure in a polymer production plant*, U.S. EPA (U.S. Environment Protection Agency), 2006.
158. F.D. Gilliland, J.S. Mandel, Mortality among employees of a perfluorooctanoic acid production plant. *J. Occup. Med.*, vol. 35, 1993, pp. 950–954.

159. M.E. Karns, W.E. Fayerweather, *A case-control study of leukemia at the Washington Works site*, Final Report. Dupont Company, U.S. EPA (U.S. Environment Protection Agency), December 31, 1991.
160. J. Walrath, C. Burke, *An investigation into the occurrence of leukemia at Washington Works*, E.I. Dupont De Nemours and Company, U.S. EPA (U.S. Environment Protection Agency), April 1989.
161. G.W. Olsen, F.D. Gilliland, M.M. Burlew, J.M. Burris, J.S. Mandel, J.H. Mandel, An epidemiologic investigation of reproductive hormones in men with occupational exposure to perfluorooctanoic acid, *J. Occup. Environ. Med.*, vol. 40, 1998, pp. 614–622.
162. F.D. Gilliland, J.S. Mandel, Serum perfluorooctanoic acid and hepatic enzymes, lipoproteins, and cholesterol: A study of occupationally exposed men, *Am. J. Ind. Med.*, vol. 29, 1996, pp. 560–568.
163. G.W. Olsen, J.M. Burris, M.M. Burlew, J.H. Mandel, Plasma cholecystikinin and hepatic enzymes, cholesterol and lipoproteins in ammonium perfluorooctanoate production workers, *Drug Chem. Toxicol.*, vol. 23, 2000, pp. 603–620.
164. G.W. Olsen, J.M. Burris, M.M. Burlew, J.H. Mandel, Serum perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) concentrations and medical surveillance examinations, *J. Occup. Environ. Med.*, 45, 2003a, pp. 260–270.
165. R.C. Grasty, B.E. Grey, C. Lau, J.M. Rogers, Prenatal window of susceptibility to perfluorooctane sulfonate-induced neonatal mortality in the Sprague Dawley rat, *Birth Defects Res.*, vol. 68, Part B, 2003, pp. 465–471.
166. H.Y. Son, S.H. Kim, H.I. Shin, H.I. Bae, J.H. Yang, Perfluorooctanoic acid-induced hepatic toxicity following 21-day oral exposure in mice, *Arch. Toxicol.*, vol. 82, 2008, pp. 239–246.
167. C. Fei, J.K. McLaughlin, L. Lipworth, J. Olsen, Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity, *Hum. Reprod.*, vol. 24, 2009, pp. 1200–1205.

168. U.N. Joensen, R. Bossi, H. Leffers, A.A. Jensen, N.E. Skakkebaek, N. Jorgensen, Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality?, *Environ. Health Perspect.*, vol. 117, 2009, pp. 923–927A.
169. A.A. Jensen, H. Leffers, Emerging endocrine disrupters: perfluoroalkylated substances, *International Journal of Andrology*, vol. 31, 2008, pp. 161-169.
170. G.W. Olsen, M.M. Burlew, J.M. Burris, J. H. Mandel, A longitudinal analysis of serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) levels in relation to lipid and hepatic clinical chemistry test results from male employee participants of the 1994/95, 1997, and 2000 fluorochemical medical surveillance program, 3M Company, Final Report, U.S. EPA (U.S. Environment Protection Agency), October 11, 2001a.
171. G.W. Olsen, M.M. Burlew, J.M. Burris, J.H. Mandel, *A cross-sectional analysis of serum perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in relation to clinical chemistry, thyroid hormone, hematology and urinalysis results from male and female employee participants of the 2000 Antwerp and Decatur fluorochemical medical surveillance program*, U.S. EPA (U.S. Environment Protection Agency), 3M Company. Final Report. October 11, 2001b.
172. C. Fei, J.K. McLaughlin, L. Lipworth, J. Olsen, Prenatal exposure to perfluorooctanoate (PFOA) and perfluorooctanesulfonate (PFOS) and maternally reported developmental milestones in infancy, *Environ. Health Perspect.*, vol. 116, 2008, pp. 1391–1395
173. J.P. Vander Heuvel, B.I. Kuslikis, R.E. Peterson, Covalent binding of perfluorinated fatty acids to proteins in the plasma, liver and testes of rats, *Chemico-Biological Interactions*, vol. 82, 1992, pp. 317-328.
174. P.D. Jones, W. Hu, W. De Coen, J. Newsted, J.P. Giesy, Binding of perfluorinated fatty acids to serum proteins, *Environmental Toxicology Chemistry*, vol. 22, 2003, pp. 2639-2649.

175. A.M. Olsen, J.M. Ehresman, D.J. Froelich, A.M. Seacat, J.L. Butenhoff, L.R. Zobel, Half-life of serum elimination of perfluorooctane sulfonate, perfluorohexane sulfonate and perfluorooctanoate in retired fluorochemicals production workers, *Environmental Health Perspectives*, vol. 115, 2007, pp. 1298-1305.
176. S. Taniyasu, K. Kannan, Y. Horii, N. Hanari, N. Yamashita, A survey of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated organic compounds in water, fish, birds, and human from Japan, *Environmental Science and Technology*, vol. 37, 2003, pp. 2634-2639.
177. D.J. Ehresman, J.W. Froelich, G.W. Olsen, S.C. Chang, J.L. Butebhoff, Comparison of whole blood, plasma, and serum matrices for the determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and other fluorochemicals, *Environmental Research*, vol. 103, 2007, pp. 176-184.
178. I. Vassiliadou, D. Costopoulou, A. Ferderigou, L. Leondiadis, Levels of perfluorooctanesulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) in blood samples from different groups of adults living in Greece, *Chemosphere*, vol. 80, 2010, pp. 1199-1206.
179. G.W. Olsen, T.R. Church, J.P. Miller, J.M. Burris, K.J. Hansen, J.K. Lundberg, J.B. Armitage, R.M. Herron, Z. Medhdizadehkashi, J.B. Nobiletti, E.M. O'Neill, J.H. Mandel, L.R. Zobel, Perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in the serum of American Red Cross adult blood donors, *Environ. Health Perspect.*, vol. 111, 2003a, pp. 1892–1901.
180. G.W. Olsen, H.Y. Huang, K.J. Helzlsouer, K.J. Hansen, J.L. Butenhoff, J.H. Mandel, Historical comparison of perfluorooctanesulfonate, perfluorooctanoate, and other fluorochemicals in human blood, *Environ. Health Perspect.*, vol. 113, 2005, pp. 539– 545.
181. G.W. Olsen, D.C. Mair, T.R. Church, M.E. Ellefson, W.K. Reagen, T.M. Boyd, R.M. Herron, Z. Medhdizadehkashi, J.B. Nobiletti, J.A. Rios, J.L. Butenhoff, L.R. Zobel, Decline in perfluorooctanesulfonate and other

- polyfluoroalkyl chemicals in American Red Cross adult blood donors, 2000–2006, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, 2008, pp. 4989–4995
182. A.M. Calafat, Z. Kuklennyik, S.P. Caudill, J.A. Reidy, L.L. Needham, Perfluorochemicals in pooled serum samples from United States residents in 2001 and 2002, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, 2006, pp. 2128–2134.
183. D.J. Ehresman, J.W. Froehlich, G.W. Olsen, S.C. Chang, J.L. Butenhoff, Comparison of human whole blood, plasma, and serum matrices for the determination of perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and other fluorochemicals, *Environ. Res.*, vol. 103, 2006, pp. 176–184.
184. G.W. Olsen, T.R. Church, E.B. Larson, G. van Belle, J.K. Lundberg, K.J. Hansen, J.M. Burris, J.H. Mandel, L.R., Zobel, Serum concentrations of perfluorooctanesulfonate and other fluorochemicals in an elderly population from Seattle, Washington, *Chemosphere*, vol. 54, 2004, pp. 1599–1611.
185. K. Harada, T. Saito, K. Inoue, T. Yoshinaga, T. Watanabe, S. Sasaki, The influence of time, sex and geographic factors on levels of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in human serum over the last 25 years, *J. Occup. Health*, vol. 46, 2004, pp. 141–147.
186. K. Harada, K. Inoue, A. Morikawa, T. Yoshinaga, T. Saito, A. Koizumi, Renal clearance of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoate in humans and their species-specific excretion, *Environ. Res.*, vol. 99, 2005, pp. 253–261.
187. K. Harada, A. Koizumi, N. Saito, K. Inoue, T. Yoshinaga, C. Date, S. Fujii, N. Hachiya, I. Hirose, S. Koda, Y. Kusaka, K. Murata, K. Omae, S. Shimbo, K. Takenaka, T. Takeshita, H. Todoriki, Y. Wada, T. Watanabe, M. Ikeda, Historical and geographical aspects of the increasing perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate contamination in human serum in Japan, *Chemosphere*, vol. 66, 2007, pp. 293–301.

188. Y. Jin, N. Saito, K.H. Harada, K. Inoue, A. Koizumi, Historical trends in human serum levels of perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate in Shenyang, China, *Tohoku J. Exp. Med.*, vol. 212, 2007, pp. 63–70.
189. O. Midasch, T. Schettgen, J. Angerer, Pilot study on the perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate exposure of the German general population, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 209, 2006, pp. 489–496.
190. S. Tittelmier, J.J. Ryan, J. Van Oostdam, Presence of anionic perfluorinated organic compounds in serum collected from northern Canadian populations, *Organohalogen Compd.*, vol. 66, 2004, pp. 4009–4014.
191. A. Karrman, J.F. Mueller, B. van Bavel, F. Harden, L.M. Toms, G. Lindstrøm, Levels of 12 perfluorinated chemicals in pooled Australian serum, collected 2002–2003, in relation to age, gender, and region, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 15, 2006, pp. 3742–3748.
192. L.M. Toms, A.M. Calafat, K. Kato, J. Thompson, F. Harden, P. Hobson, A. Sjødin, J.F. Mueller, Polyfluoroalkyl chemicals in pooled blood serum from infants, children, and adults in Australia, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, 2009, pp. 4194–4199.
193. A.M. Calafat, Z. Kuklennyik, J.A. Reidy, S.P. Caudill, J.S. Tully, L.L. Needham, Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the US population: data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, 2007, pp. 2237–2242.
194. I. Ericson, M. Gomez, M. Nadal, B. van Bavel, G. Lindstrom, J.L., Domingo, Perfluorinated chemicals in blood residents in Catalonia (Spain) in relation to age and gender: a pilot study, *Environ. Int.*, vol. 33, 2007, pp. 616–623.
195. K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Fillmann, K.S. Kumar, B.G. Loganathan, M.A. Mohd, J. Olivero, N. Van Wouwe, J.H. Yang,

- K.M. Aldoust, Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, 2004, pp. 4489–4495.
196. L. Haug, C. Thomsen, G. Becher, Time trends and the influence of age and gender on serum concentrations of perfluorinated compounds in archived human samples, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, 2009b, pp. 2131–2136.
197. H. Fromme, S.A Tittlemier, W. Vølkkel, M. Wilhelm, D. Twardella, Perfluorinated compounds – exposure assessment for the general population in western countries, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 212, 2009, pp. 239–270.
198. S.A Tittlemier, K. Pepper, C. Seymour, J. Moisey, R. Bronson, X.L. Cao, R.W. Dabeka, Dietary exposure of Canadians to perfluorinated carboxylates and perfluorooctane sulfonate via consumption of meat, fish, fast foods, and food items prepared in their packaging, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, 2007, pp. 3203–3210.
199. D. Trudel, L. Horowitz, M. Wormuth, M. Scheringer, I.T. Cousins, K. Hungerbühler, Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA, *Risk Anal.*, vol. 28, 2008, pp. 251–269.
200. R. Vestergren, I.T. Cousins, Tracking the pathways of human exposure to perfluorocarboxylates, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, 2009, pp. 5565–5575.
201. L.S. Haug, S. Samira, I.E. Jogsten, C. Thomsen, B. van Bavel, G. Lindstrom, G. Becher, Levels in food and beverages and daily intake of perfluorinated compounds in Norway, *Chemosphere*, vol. 80, 2010, pp. 1137-1143.
202. G. Brambilla, E. Dellate, A. de Domenico, G. Heinemeyer, W. D'Hollander, D. Herzke, S. van Leeuwen, W.P. De Voogt, Retrospective and prospective intake assessment of perfluorinated chemicals within the European Union: the perfood project, *Organohalogen Compounds*, vol. 72, 2010, pp. 1644-1647.

203. Schecter, J. Colacino, D. Haffner, K. Patel, M. Opel, O. Papke, Perfluorinated compounds, Polychlorinated biphenyls, and Organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA, *Environmental Health Perspectives*, vol. 118, no. 6, 2010, pp. 796-802.
204. Fluorinated Chemicals: UK Dietary Intakes. Food Survey Information Sheet 11/06. London: Food Standards Agency, 2006.
205. D.N. Mortimer, M. Gem, D.B. Clarke, A.S. Lloyd, S. Hird, PFOS, PFOA and other fluorinated organic chemicals in food, *Organohalogen Compounds*, vol. 71, 2009, pp. 1360-1365.
206. Inc. *Analysis of PFOS, FOSA and PFOA from Various Food Matrices Using HPLC Electrospray/Mass Spectrometry*; Centre Study Number 023-057; Centre Analytical Laboratories, Inc.: 2001.
207. I. Ericson R. Marti-Cid M. Nadal B. Van Bavel G. Lindstrom J.L. Domingo, Human exposure to perfluorinated chemicals through the diet: intake of perfluorinated compounds in foods from the Catalan (Spain) Market, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, 2008, pp. 1787–1794
208. I. Ericson Jogsten, G. Perello, X. Llebaria, E. Bigas, R. Marti-Cid, A. Karrman, J.L. Domingo, Exposure to perfluorinated compounds in Catalonia, Spain, through consumption of various raw and cooked foodstuffs, including packaged food, *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47, 2009, pp. 1577–1583.
209. S.K. Ostertag, H.M. Chan, J. Moisey, R. Dabeka, S.A. Tittlemier, Historic dietary exposure to perfluorooctane sulfonate, perfluorinated carboxylates, and fluorotelomer unsaturated carboxylates from the consumption of store-bought and restaurant foods for the Canadian population, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, 2009a, pp. 8534–8544.
210. U. Berger, A. Glynn, K.E. Holmstrom, M. Berglund, E.H. Ankarberg, A. Tornkvist, Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Sweden – analysis of edible fish from

- Lake Vattern and the Baltic Sea, *Chemosphere*, vol. 76, 2009, pp. 799–804.
211. L. Del Gobbo, S. Tittlemier, M. Diamond, K. Pepper, B. Tague, F. Yeudall, L. Vanderlinden, Cooking decreases observed perfluorinated compound concentrations in fish, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, 2008, pp. 7551–7559.
212. T. Bakke, E. Fjeld, B.B. Skaare, J.A. Berge, N. Green, A. Ruus, M. Schlabach, H. Botnen, *Mapping of Metals and Selected New Organic Contaminants, 2006. Chromium, Arsenic, Perfluorated substances, Dichloroethane, Chlorinated benzenes, Pentachlorophenol, HCB and DEHP*, Report TA-2284/2007. Norwegian Pollution Control Authority, 2007.
213. V. Nania, G.E. Pellegrini, L. Fabrizi, G. Sesta, P. De Sanctis, D. Lucchetti, M. Di Pasquale, E. Coni, Monitoring of perfluorinated compounds in edible fish from the Mediterranean Sea, *Food Chem.*, vol. 115, 2009, pp. 951–957.
214. S.P.J. Van Leeuwen, M.J.M. van Velzen, C.P. Swart, I. van der Veen, W.A. Traag, J. de Boer, Halogenated contaminants in farmed salmon, trout, tilapia, pangasius, and shrimp, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, 2009b, pp. 4009–4015.
215. J.W. Martin, S.A. Mabury, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 22, 2003, pp. 189–195. A.
216. Jahnke, U. Berger, Trace analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in various matrices-How do current methods perform?, *Journal of Chromatography A*, vol. 1216, 2009, pp. 410-421
217. Απόφαση της Επιτροπής για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/EK του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (2002/657/EK), Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 2002.

218. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, Eurachem. 1998.
219. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Αρχές της ενόργανης ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκης, 2005.
220. Method 1613. *Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dillution HRGC/HRMS*. U.S. Environmental Protection Agency Office of water. 1994.
221. *ASE 300 Accelerated Solvent Extractor. Operator's manual*. Document No. 031672, revision 1, April 2000.
222. D.M. Desiderio, N.M.M. Nibbering, *Principles and Practixe of Biological Mass Spectrometry*, Wiley-Interscience, 2001.
223. G. Siuzdak, *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press, 1996.
224. F.W. McLafferty, F. Turecek, *Interpretation of Mass Spectra*, University Science Books, Fourth edition, 1993.