



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ-ΔΙΑΣΦΑΛΙΣΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Προσδιορισμός αναδυόμενων ρύπων σε δείγματα
ψαριών από το Δούναβη με φασματομετρία μάζας
υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-ESI-QTOF)**

**ΔΕΝΑΡΔΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2021

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός αναδυόμενων ρύπων σε δείγματα ψαριών από το Δούναβη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-ESI-QTOF)

Δενάρδου Μαρία

A.M.: 192206

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Γκίκας, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 21/10/21

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης επέτρεψε τον εκτεταμένο έλεγχο αναδυόμενων ρύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Μελέτες έχουν δείξει, πως υφίσταται μεγάλος κίνδυνος αυτές οι ενώσεις να επιδρούν αρνητικά τόσο στο υδάτινο περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη υγεία. Επομένως, η παρακολούθηση τους κρίνεται αναγκαία, ώστε να μελετηθεί η παρουσία τους, η συμπεριφορά τους και η τύχη τους στο υδάτινο περιβάλλον.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στοχευμένη και ύποπτη σάρωση για τον προσδιορισμό αναδυόμενων ρύπων, σε δείγματα ψαριών τα οποία συλλέχθηκαν από διάφορα σημεία που διατρέχει ο ποταμός Δούναβης και οι παραπόταμοί του. Συνολικά αναλύθηκαν 22 δείγματα ψαριών με στόχο την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αναδυόμενων ρύπων καθώς και την εκτίμηση του κινδύνου για κάθε έναν από αυτούς.

Χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση με την βοήθεια λουτρού υπερήχων για την προκατεργασία δείγματος και τα εκχυλίσματα αναλύθηκαν με υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας τύπου τετραπόλου-χρόνου πτήσης (RP)LC-QTOF-MS. Στη συνέχεια, έγινε ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών καθώς και εκτίμηση του κινδύνου των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν, αξιολογώντας τις συγκεντρώσεις των αναδυόμενων ρύπων και συγκρίνοντας τις με βάση την τιμή της Προβλεπόμενης Συγκέντρωσης Χωρίς Επίδραση (Predicted No Effect Concentration, PNEC) για κάθε ένωση, που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων οικοτοξικολογίας NORMAN. Σύμφωνα με τις παραπάνω διαδικασίες ταυτοποιήθηκαν συνολικά 97 ενώσεις.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Υγροχρωματογραφία-Φασματομετρία μάζας

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: αναδυόμενοι ρύποι, ψάρια, LC-ESI-QTOF, εκτίμηση κινδύνου

ABSTRACT

In recent years, the development of new detection methods has allowed the extensive control of emerging contaminants in environmental samples. Studies have shown that there is a high risk of these compounds adversely affecting both the aquatic environment and human health. Therefore, their monitoring is considered necessary in order to study their presence, behavior and fate in the aquatic environment.

In the present study, target screening and suspect screening were performed to identify emerging contaminants in fish samples collected from various points along the Danube River and its tributaries. A total of 22 fish samples, were analyzed aiming to detect, identify and quantify emerging contaminants as well as assessing the risk for each one of them.

An ultrasonic assisted extraction was used for the sample preparation and the extracts were analyzed with reversed-phase liquid-chromatography high resolution mass spectrometry (quadrupole time-of-flight mass spectrometry) (RP)LC-QTOF-MS . The identified compounds were quantified and then risk assessment of the detected compounds was performed in order to evaluate the concentrations of the emerging pollutants by comparing them with the Predicted No Effect Concentration (PNEC) value for each identified compound. PNECs were obtained from NORMAN ecotoxicology database. According to the above procedures, a total of 97 compounds were identified.

SUBJECT AREA: Liquid chromatography-Mass spectrometry

KEYWORDS: emerging pollutants, fish, LC-ESI-QTOF, risk assessment

Στην οικογένειά μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας και κατά συνέπεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή Νικόλαο Θωμαΐδη, Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ που με δέχτηκε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στην ερευνητική του ομάδα, για την συνεχή καθοδήγηση και την ενθάρρυνση που μου παρείχε από την πρώτη μέχρι την τελευταία στιγμή. Η υποστήριξη και διαθεσιμότητά του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αποτέλεσε σπουδαία βοήθεια, συμβάλλοντας ποικιλοτρόπως στην ολοκλήρωσή της, παρέχοντας μεταξύ άλλων πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγηση όπου κρίθηκε αναγκαίο. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το μεταδιδακτορικό ερευνητή Νικηφόρο Αλυγιζάκη και την υποψήφια διδάκτωρ Κατερίνα Γαλάνη για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε, την καθοδήγηση και την υποστήριξη που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα ώστε να υλοποιήσω την παρούσα εργασία. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αποδίδονται και στην ερευνητική ομάδα Trams Group για την ομαλή και ευχάριστη ένταξη στο εργαστηριακό περιβάλλον καθώς και για την εκπαίδευση που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τις ευχαριστίες μου εκφράζω και στους καθηγητές Ευάγγελο Γκίκα και Αναστάσιο Οικονόμου που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής εργασίας. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου, για την συνεχή συμπαράσταση τους, τις συμβουλές τους και για όλα όσα μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια της ζωής μου αλλά και των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	18
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
1.1 Δούναβης.....	18
1.2 Αναδυόμενοι ρύποι	20
1.3 Έκθεση των ψαριών σε αναδυόμενους ρύπους	22
1.4 Κατηγορίες αναδυόμενων ρύπων	23
1.4.1 Φαρμακευτικές ενώσεις	23
1.4.2 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις	24
1.4.3 Βιομηχανικά χημικά	25
1.5 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	27
ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	27
2.1 Χρωματογραφία.....	27
2.1.1 Χρωματογραφία κατανομής	27
2.1.2 Ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες χρωματογραφικών κορυφών 28	
2.1.3 Οργανολογία υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	29
2.2 Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS)	31
2.2.1 Οργανολογία φασματομετρίας μαζών	32
2.2.2 Πηγές ιόντων	33
2.2.3 Αναλυτές μαζών	36

2.2.4 Διαδοχική φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) με QTOF.....	39
2.2.5 Υβριδικός Αναλυτής Τετραπόλου-Χρόνου πτήσης (Q-TOF)	40
2.3 Σύζευξη LC-MS.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	51
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	53
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	53
5.1 Σύστημα υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας τεχνολογίας τετραπόλου-αναλυτή χρόνου πτήσης Q-TOF (LC-HRMS)	53
5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός	54
5.3 Αντιδραστήρια-Διαλύτες	55
5.4 Πρότυπες ουσίες-Πρότυπα Διαλύματα	56
5.5 Δείγματα	57
5.5.1 Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση LC-QTOF-MS.....	59
5.6 Τεχνικές σάρωσης	60
5.7 Εκτίμηση κινδύνου	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	66
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
6.1 Στοχευμένη σάρωση.....	66
6.1.1 Φαρμακευτικές ενώσεις	76
6.1.2 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις	79

6.1.3 Χημικά από την βιομηχανία	79
6.1.4 Εκτίμηση κινδύνου.....	80
6.2 Ύποπτη σάρωση.....	96
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	104
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	106
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	107

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Κατηγορίες ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα.....	66
Σχήμα 2: Κατηγορίες φαρμακευτικών ενώσεων.....	76
Σχήμα 3: Ραβδόγραμμα με τις συχνότερα εμφανιζόμενες φαρμακευτικές ενώσεις.	77
Σχήμα 4: Ραβδόγραμμα με τις συνολικές συγκεντρώσεις ανά κατηγορία φαρμακευτικών ενώσεων.....	78
Σχήμα 5: Ραβδόγραμμα για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις στα δείγματα.....	79
Σχήμα 6: Ραβδόγραμμα για τα χημικά από την βιομηχανία στα δείγματα.....	80
Σχήμα 7: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση DEHP.....	85
Σχήμα 8: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση PFOS.....	87
Σχήμα 9: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Methoprene	89
Σχήμα 10: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Vigabatrin.	90
Σχήμα 11: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Trapidil.	91
Σχήμα 12: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση 4-tert- Octylphenol.....	92
Σχήμα 13: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Cytarabin.	93
Σχήμα 14: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Sulpiride..	94
Σχήμα 15: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Pyrethrin I.	96
Σχήμα 16: Συγκέντρωση αναδυόμενων ρύπων που εντοπίστηκαν με στοχευμένη σάρωση στα δείγματα.	104
Σχήμα 18: Ραβδόγραμμα με τις συνολικές συγκεντρώσεις ανά κατηγορία αναδυόμενων ρύπων που εντοπίστηκαν με στοχευμένη σάρωση.	105
Σχήμα 17: Συγκέντρωση αναδυόμενων ρύπων που εντοπίστηκαν με ύποπτη σάρωση στα δείγματα.	106

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Χώρες τις οποίες διατρέχει ο ποταμός Δούναβης	18
Εικόνα 2: Απεικόνιση μελετών στο ποταμό Δούναβη με χρονολογική σειρά.	20
Εικόνα 3: Πηγές προέλευσης αναδυόμενων ρύπων.	21
Εικόνα 4: Είδη ψαριών από το ποταμό Δούναβη τα οποία μελετήθηκαν σε αυτήν την έρευνα	26
Εικόνα 5: Συνοπτικό διάγραμμα με τα επιμέρους μέρη ενός οργάνου υγροχρωματογραφίας	29
Εικόνα 6: Τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών	33
Εικόνα 7: Συσκευή για ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό	36
Εικόνα 8: Λειτουργία τετραπολικού αναλυτή μαζών	37
Εικόνα 9: Λειτουργία αναλυτή χρόνου πτήσης	38
Εικόνα 10: Σωλήνας πορείας με χρήση ανακλαστήρα	39
Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή Q-TOF	40
Εικόνα 12: Σύστημα υγροχρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας τετραπόλου-αναλυτή χρόνου πτήσης (Q-ToF)...	54
Εικόνα 13: Απεικόνιση των δειγμάτων στον χάρτη.	58
Εικόνα 14 Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων εμπιστοσύνης όπως προτάθηκε από Schymanski et al.	61
Εικόνα 15: Χρωματογραφήματα των ουσιών N-methyl-2-pyrrolidone, allopurinol και vigabatrin, με τη χρήση του λογισμικού Data Analysis.	71
Εικόνα 16: Δομή Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP)	84
Εικόνα 17: Δομή Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS).....	86
Εικόνα 18: Δομή Methoprene.....	88
Εικόνα 19: Δομή Vigabatrin.....	89
Εικόνα 20: Δομή trapidil.	91
Εικόνα 21: Δομή 4-tert-Octylphenol (4-t-OP)	92
Εικόνα 22: Δομή Cytarabin	93
Εικόνα 23: Δομή Sulpiride.....	94
Εικόνα 24: Δομή Pyrethrin I	95

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μέθοδοι προκατεργασίας δειγμάτων ψαριών από ποταμούς.	43
Πίνακας 2: Μέθοδοι προκατεργασίας δειγμάτων ψαριών από θάλασσες, λίμνες και άλλες πηγές.....	48
Πίνακας 3: Κατάλογος των ενώσεων που περιέχονται στο εσωτερικό πρότυπο μείγμα	56
Πίνακας 4: Πληροφορίες δειγμάτων: Όνομα, Χώρα/Περιοχή προέλευσης, Ημερομηνία συλλογής δείγματος.	57
Πίνακας 5: Φαρμακευτικές ενώσεις: Κατηγορία ταξινόμησης, όνομα, όριο ποσοτικοποίησης και όριο ανίχνευσης για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με στοχευμένη σάρωση στα δείγματα.....	67
Πίνακας 6: Φυτοπροστατευτικές ενώσεις: Κατηγορία ταξινόμησης, όνομα, όριο ποσοτικοποίησης και όριο ανίχνευσης για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με στοχευμένη σάρωση στα δείγματα.....	69
Πίνακας 7: Ενώσεις που προέρχονται από την βιομηχανία: Κατηγορία ταξινόμησης, όνομα, όριο ποσοτικοποίησης και όριο ανίχνευσης για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με στοχευμένη σάρωση στα δείγματα.	70
Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις για κάθε ένωση στα δείγματα 2 έως 29. Οι ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδα μεταξύ LOD και LOQ υπογραμμίζονται με πορτοκαλί χρώμα και αντικαταστάθηκαν με LOQ/2 σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία.	71
Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις για κάθε ένωση στα δείγματα 30 έως 49. Οι ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδα μεταξύ LOD και LOQ υπογραμμίζονται με πορτοκαλί χρώμα και αντικαταστάθηκαν με LOQ/2 σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία.	74
Πίνακας 10: Αναλύτες που ανιχνεύτηκαν στα δείγμα με στοχευμένη σάρωση και οι τιμές PNEC τους.	81
Πίνακας 11: Ενώσεις που εντοπίστηκαν με τιμή > 1,01 βαθμό κινδύνου.	83

Πίνακας 12: Ενώσεις που υπερέβησαν τα PNEC τους.	83
Πίνακας 13: Αναλύτες που ανιχνεύτηκαν στα δείγμα με ύποπτη σάρωση και οι τιμές PNEC τους.	96
Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με ύποπτη σάρωση στα δείγματα 2 έως 29.	98
Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με ύποπτη σάρωση στα δείγματα 30 έως 49. Συνέχεια από προηγούμενο πίνακα.	99
Πίνακας 16: Εκτίμηση κινδύνου για τις ενώσεις που εντοπίστηκαν με ύποπτη σάρωση στα δείγματα.	101
Πίνακας 17: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.	103
Πίνακας 18: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.	103

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας στον τομέα Αναλυτικής Χημείας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Χημική Ανάλυση-Διασφάλιση Ποιότητας». Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή του ΕΚΠΑ Νικόλαο Θωμαΐδη.

Στο πρώτο κεφάλαιο πραγματοποιείται εισαγωγή στο θέμα που διαπραγματεύεται η διπλωματική ενώ στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζονται οι αναλυτικές τεχνικές και η οργανολογία που χρησιμοποιείται, η οποία μας επιτρέπει την ανίχνευση πληθώρας αναλυτών. Στο τρίτο κεφάλαιο αποτυπώνονται τα ευρήματα της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, ενώ στο τέταρτο κεφάλαιο καθίσταται σαφής ο σκοπός της διπλωματικής εργασίας. Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο περιγράφεται το εργαστηριακό πειραματικό μέρος και στο έκτο και τελευταίο κεφάλαιο γίνεται η συζήτηση επί των αποτελεσμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δούναβης

Ο Δούναβης είναι ο δεύτερος μεγαλύτερος ποταμός στην Ευρώπη, μετά τον Βόλγα και 29^{ος} στον κόσμο. Έχει τις πηγές του στην πόλη Ντοναουέσινγκεν, που βρίσκεται στο Μέλανα Δρυμό της Γερμανίας στη συμβολή των ποταμών Μπρίγκαχ και Μπρεγκ. Ο Δούναβης ρέει έπειτα προς τα ΝΑ για 2.872 χλμ. διαρρέοντας τέσσερις πρωτεύουσες χωρών της κεντρικής Ευρώπης προτού εκβάλει στον Εύξεινο Πόντο μέσω του Δέλτα του σε Ρουμανία και Ουκρανία. Διαρέει μέσα από πολλές χώρες όπως είναι η Γερμανία, Αυστρία, Σλοβακία, Ουγγαρία, Κροατία κ.α. [1].

Η λεκάνη απορροής του Δούναβη είναι η δεύτερη μεγαλύτερη λεκάνη απορροής της Ευρώπης, με συνολική έκταση τα 801.463 km². Περισσότεροι από 80 εκατομμύρια άνθρωποι από 19 χώρες συνολικά, μοιράζονται τον Δούναβη ως λεκάνη απορροής, καθιστώντας την πιο διεθνή λεκάνη απορροής στον κόσμο. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται οι χώρες μέσα από τις οποίες ρέει ο ποταμός Δούναβης [1] [2].



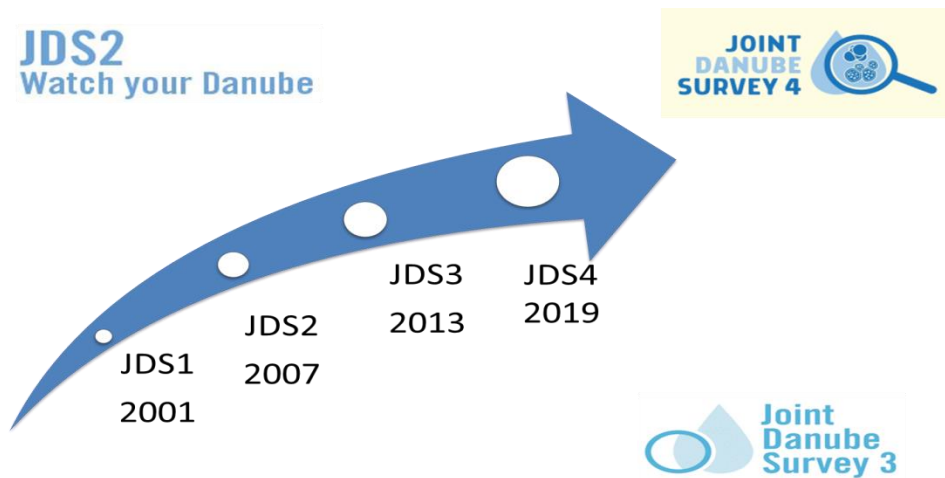
Εικόνα 1: Χώρες τις οποίες διατρέχει ο ποταμός Δούναβης [3].

Ο Δούναβης είναι ένας από τους ποταμούς με τον υψηλότερο αριθμό διαφορετικών ειδών ψαριών στην Ευρώπη, με καταγεγραμμένα έως και 102 διαφορετικά είδη. Μέσω του ποταμού μεταφέρονται εμπορεύματα σε όλη την Ευρώπη ενώ αποτελεί πόρο παροχής νερού, αφού σε όλη του την πορεία είναι πηγή πόσιμου νερού για περίπου 20 εκατομμύρια ανθρώπους. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικός για τη γεωργία, τη βιομηχανία, την αναψυχή, τον τουρισμό και την ψυχαγωγική και εμπορική αλιεία. Ως εκ τούτου, οι διάφορες περιβαλλοντικές παρεμβάσεις που προέκυψαν από ποικίλες ανθρώπινες δραστηριότητες είχαν σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στα οικοσυστήματα του Δούναβη, συμπεριλαμβανομένων και των κοινοτήτων ψαριών [1].

Η συνεργασία των χωρών που διατρέχει ο Δούναβης για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού του ποταμού ξεκίνησε επίσημα το 1985 όπου θεσπίστηκε ένα κοινό πρόγραμμα παρακολούθησης και συμφωνήθηκε βάσει της Διακήρυξης του Βουκουρεστίου από την Αυστρία, τη Βουλγαρία, την πρώην Τσεχοσλοβακία, τη Γερμανία, την πρώην Γιουγκοσλαβία, τη Ρουμανία, την Ουγγαρία και την πρώην Σοβιετική Ένωση. Ξεκίνησε λοιπόν, η συλλογή δειγμάτων σε διασυνοριακές τοποθεσίες για τον προσδιορισμό κάποιων παραμέτρων καθώς και τη καταγραφή του ρυθμού ροής σε μηνιαία βάση. [4]

Το 2001 πραγματοποιήθηκε μια κοινή έρευνα για το Δούναβη (Joint Danube Survey, JDS1) στην οποία παρουσιάστηκαν συγκρίσιμα στοιχεία για ολόκληρη την πορεία του ποταμού που κάλυπταν περισσότερες από 140 διαφορετικές βιολογικές, χημικές και βακτηριολογικές παραμέτρους, δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν ως βασική πηγή πληροφοριών για την πρώτη ανάλυση της περιοχής της λεκάνης απορροής του ποταμού Δούναβη. Έξι χρόνια αργότερα, η δεύτερη κοινή έρευνα για το Δούναβη (JDS2) δημιούργησε μια ολοκληρωμένη βάση δεδομένων για την κατάσταση του υδάτινου οικοσυστήματος του Δούναβη και τους κύριους παραπόταμούς του. Για πρώτη φορά, η έρευνα για τα ψάρια πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρο τον ποταμό φέρνοντας στο φως ένα μοναδικό σύνολο δεδομένων και συμβάλλοντας επίσης στη μεθοδολογική εναρμόνιση

μεταξύ χωρών εντός και εκτός ΕΕ. Το 2013 πραγματοποιήθηκε η τρίτη κοινή έρευνα για το Δούναβη (JDS3), η οποία παρείχε τις περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη ρύπανση των υδάτων του ποταμού. Εφαρμόστηκαν αρκετές νέες αναλυτικές και στρατηγικές τεχνικές με στόχο εκατοντάδες οργανικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να παραχθούν οι πιο ολοκληρωμένες πληροφορίες που αποκτήθηκαν ποτέ. Το 2019 ξεκίνησε μια τέταρτη έρευνα για τον ποταμό Δούναβη (JDS4) με στόχο την παραγωγή συγκρίσιμων και αξιόπιστων πληροφοριών για όλο το μήκος του χρησιμοποιώντας προηγμένες αναλυτικές μεθοδολογίες και υπολογιστικά μοντέλα [5]



Εικόνα 2: Απεικόνιση μελετών στο ποταμό Δούναβη με χρονολογική σειρά.

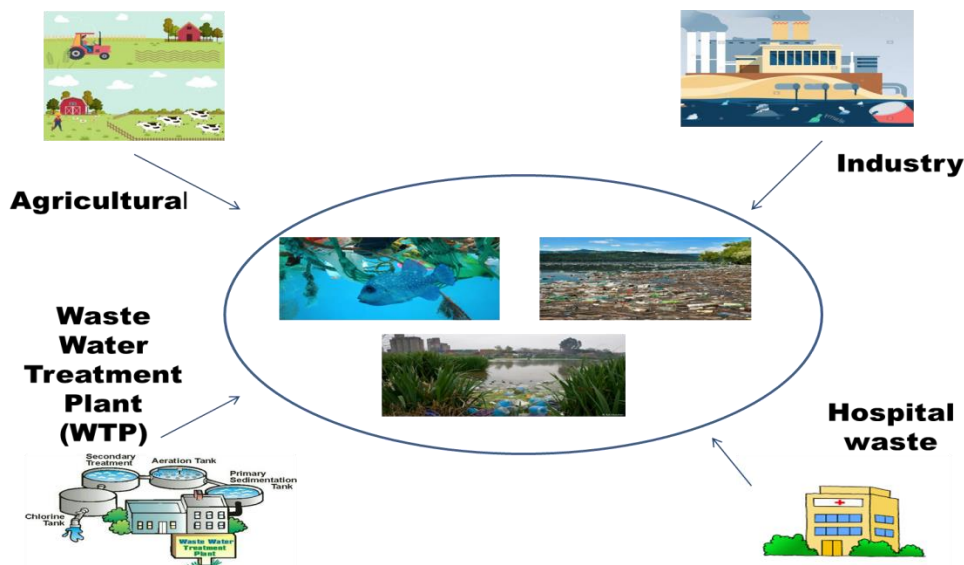
1.2 Αναδυόμενοι ρύποι

Οι αναδυόμενοι ρύποι (emerging contaminants), αποτελούν σημαντικό κίνδυνο τόσο για το υδάτινο οικοσύστημα όσο και την ανθρώπινη υγεία. Μελέτες έχουν δείξει πως η βιοποικιλότητα καθώς και η ανθρώπινη υγεία επιβαρύνονται από τις τοξικές ενώσεις που υπάρχουν στο περιβάλλον. Πολλές ενώσεις από αυτές, εισάγονται στο υδάτινο οικοσύστημα και κατ'επέκταση στην τροφική αλυσίδα. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η παρακολούθηση τους και η μελέτη της τοξικής δράσης τους [6] [7].

Ο όρος αναδυόμενοι ρύποι αναφέρεται σε οργανικούς ρύπους, οι οποίοι ανιχνεύθηκαν σε φυσικά περιβάλλοντα, όπως λίμνες, ποτάμια, θαλάσσια ύδατα

και μέχρι σήμερα δεν έχουν θεσπιστεί κανονισμοί για την περιβαλλοντική τους παρακολούθηση. Αποτελούν χημικές ενώσεις φυσικής και ανθρωπογενούς προέλευσης, όπως είναι τα φαρμακευτικά προϊόντα (pharmaceuticals), προϊόντα προσωπικής υγιεινής (personal care products), ενώσεις που προέρχονται από τη βιομηχανία (industrial chemicals), ενδοκρινικοί διαταράκτες (endocrine disrupting compounds), φυτοπροστατευτικά προϊόντα (plant protection products), πλαστικοποιητές (plasticizers) , ορμόνες (hormones), στεροειδή (steroids) κ.α. [6] [7].

Οι αναδυόμενοι ρύποι ανιχνεύονται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από $\mu\text{g/L}$ έως ng/L και μερικές φορές ακόμη χαμηλότερες, αλλά η παρακολούθηση τόσο χαμηλών συγκεντρώσεων ήταν δυνατή μόνο την τελευταία δεκαετία λόγω της ανάπτυξης νέων μεθόδων ανίχνευσης και αναλυτικών τεχνολογιών. Οι συγκεντρώσεις αυτών των ενώσεων μπορούν να έχουν αρνητική επίδραση τόσο στα υδάτινα οικοσυστήματα όσο και στην ανθρώπινη υγεία. Κάποιες από τις πηγές προέλευσης των αναδυόμενων ρύπων είναι τα νοσοκομειακά απόβλητα, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, οι γεωργικές δραστηριότητες και τα απόβλητα βιομηχανιών [8]



Εικόνα 3: Πηγές προέλευσης αναδυόμενων ρύπων.

1.3 Έκθεση των ψαριών σε αναδυόμενους ρύπους

Στο υδάτινο περιβάλλον, τα ψάρια μπορούν να εκτεθούν σε αναδυόμενους ρύπους μέσω της πρόσληψης τροφής ή της αναπνοής μέσω των βραγχίων. Κάποιοι από αυτούς μεταβολίζονται εν μέρει και μπορούν στην συνέχεια να συσσωρευτούν στον ιστό των ψαριών ή να απεκκριθούν αμετάβλητοι. Η βιοσυσσώρευση των ρύπων στον ιστό των ψαριών, παρατηρείται τακτικά σε ολόκληρη την τροφική αλυσίδα και δημιουργεί πολλά ερωτήματα σχετικά με τις επιπτώσεις που μπορεί να υπάρχουν στην υγεία των καταναλωτών ψαριών. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως ορισμένες φαρμακευτικές ενώσεις όπως είναι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, μπορούν να μεταβάλλουν τις φυσιολογικές λειτουργίες των ψαριών [9]. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον κόλπο Todos os Santos στη Βραζιλία, η μείωση του αριθμού των ειδών και της ποικιλίας των βενθικών οργανισμών συσχετίστηκε με τον εντοπισμό αλειφατικών υδρογονανθράκων και πολυαρωματικών υδρογονανθράκων σε ιζήματα [10].

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται μείωση των αποθεμάτων ψαριών του Δούναβη, ενώ πολλά είδη απειλούνται να εξαφανιστούν. Τα ψάρια έχουν μεγάλη περιβαλλοντική και οικονομική σημασία, αφού είναι αναπόσπαστο κομμάτι της ισορροπίας των οικοσυστημάτων και μια από τις πιο σημαντικές πηγές τροφίμων. Επιπλέον είναι ένας σημαντικός δείκτης του αποτυπώματος που αφήνει η ανθρώπινη δραστηριότητα στο περιβάλλον. Συμπερασματικά, η έκθεση των ψαριών σε αναδυόμενους ρύπους μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις τόσο στα οικοσυστήματα όσο και στην ανθρώπινη υγεία, λόγω της ανθεκτικότητας τους και της τάσης τους να βιοσυσσωρεύονται [5]. Η εξέλιξη των αναλυτικών τεχνικών τα τελευταία χρόνια καθώς και η ικανότητα ταυτοποίησης των αναδυόμενων ρύπων, μας επιτρέπουν την αξιολόγηση της τοξικότητας αυτών των ενώσεων και τη μελέτη των πιθανών επιπτώσεων τους στο περιβάλλον. Φυσικά, δεν αποτελούν όλες οι ενώσεις κίνδυνο για τα υδάτινα οικοσυστήματα άρα είναι σημαντικό να διαχωρίζονται οι τοξικές από τις αβλαβείς. Για το λόγο αυτό, κρίνεται σημαντική η μελέτη δειγμάτων ψαριών κατά μήκος ολόκληρης της

πορείας του ποταμού, ο προσδιορισμός των αναδυόμενων ρύπων όπως και η εκτίμηση του κινδύνου για κάθε ένωση-ρύπο [11] [12].

Με τον όρο βιοσυσσώρευση αναφερόμαστε στη συνεχή απόθεση ενός στοιχείου ή μίας χημικής ένωσης και την αύξηση της συγκέντρωσής τους στους ιστούς ενός οργανισμού. Η διεργασία αυτή, μπορεί να διαφοροποιείται με την ηλικία, αφού ο ρυθμός βιοσυσσώρευσης είναι μεγάλος σε μικρές ηλικίες με σταδιακή μείωση τα επόμενα χρόνια, ενώ σε μεγάλες ηλικίες κάποια στιγμή σταθεροποιείται ή αποκτά αρνητικό πρόσημο. Η βιοσυσσώρευση χημικών ενώσεων σε υδρόβιους οργανισμούς προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στα οικοσυστήματα. Δεδομένου ότι πολλές από αυτές τις επιδράσεις δύσκολα μπορούν να προβλεφθούν, συνιστά από μόνη της οικολογικό κίνδυνο [13] [14].

1.4 Κατηγορίες αναδυόμενων ρύπων

Οι αναλύτες που εντοπίστηκαν στα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες με βάση τη χρήση τους, τις φαρμακευτικές ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων και των προϊόντων προσωπικής υγιεινής), τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις και τα βιομηχανικά χημικά. Στη συνέχεια αναλύονται οι συγκεκριμένες κατηγορίες αναδυόμενων ρύπων.

1.4.1 Φαρμακευτικές ενώσεις

Τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα προϊόντα προσωπικής υγιεινής αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες χημικών ενώσεων που ανήκουν στους αναδυόμενους ρύπους. Σε αυτήν την κατηγορία υπάρχουν ενώσεις που προέρχονται από διαφορετικές φαρμακευτικές κλάσεις όπως είναι τα αντιυπερτασικά, τα αντιεπιληπτικά, τα αναισθητικά, τα αναλγητικά, τα αντιλιπιδαιμικά, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, τα αντιβιοτικά, τα αντιψυχωσικά, τα αντικαταθλιπτικά, τα στεροειδή αλλά και κατηγορίες ενώσεων που ανήκουν στα προϊόντα προσωπικής φροντίδας όπως για παράδειγμα ουσίες που χρησιμοποιούνται στα αρώματα, στα σαμπουάν και τα φίλτρα UV. Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί παγκοσμίως ραγδαία αύξηση στην παραγωγή και κατανάλωση φαρμακευτικών προϊόντων. Οι συγκεκριμένες ουσίες

δύναται να εισέλθουν στα υδάτινα οικοσυστήματα λόγω της μη αποτελεσματικής απομάκρυνσής τους από τις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Οι ενώσεις αυτές, οι μεταβολίτες τους και τα προϊόντα μετασχηματισμού τους, ενδέχεται να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στη χλωρίδα και στην πανίδα ενός ποταμού, να συσσωρευτούν σε υδρόβιους οργανισμούς όπως είναι τα ψάρια και σταδιακά να επηρεάσουν την ανθρώπινη υγεία μέσω της τροφικής αλυσίδας [15]. Τα ψάρια συχνά θεωρούνται ως οι πιο κατάλληλοι οργανισμοί παρακολούθησης της ρύπανσης σε υδρόβια συστήματα. Η συνεχής έκθεσή τους σε χαμηλές συγκεντρώσεις ρύπων, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικών ενώσεων, δύναται να οδηγήσει στη συσσώρευσή τους κυρίως στους ιστούς των ψαριών [16] [17].

1.4.2 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις είναι μια κατηγορία ενώσεων που καταλήγουν στο περιβάλλον μέσω της χρήσης τους στη γεωργία για την προστασία των φυτών, η οποία μας έχει επιτρέψει μεγάλη αύξηση στην παραγωγή και καλύτερη ποιότητα των τροφίμων. Οι ενώσεις αυτές καταλήγουν στα ψάρια και βιοσυσσωρεύονται. Θεωρούνται από τις πιο τοξικές ενώσεις για το περιβάλλον και αποτελούν μεγάλο κίνδυνο για τα οικοσυστήματα και την ανθρώπινη υγεία [18].

Είναι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν τα παράσιτα και τα έντομα που προσβάλλουν τις καλλιέργειες και τις βλάπτουν. Τα παράσιτα μπορεί να είναι έντομα, ζιζάνια, μικρόβια που φθείρουν την καλλιέργεια, ή φορείς μεταδοτικών και μη ασθενειών κ.α.. Χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες: ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, νηματωδοκτόνα, μαλακιοκτόνα, ιχθυοκτόνα, πτηνοκτόνα, τρωκτικοκτόνα, βακτηριοκτόνα, εντομοαπωθητικά, απωθητικά ζώων, αντιμικροβιακά, μυκητοκτόνα, απολυμαντικά και αποστειρωτικά. Εδώ και αιώνες, έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικά είδη φυτοφαρμάκων για την προστασία των φυτών. Ωστόσο, επιφέρουν σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Για παράδειγμα, η υπερβολική χρήση φυτοφαρμάκων μπορεί να

οδηγήσει στην καταστροφή της βιοποικιλότητας. Πολλά είδη όπως πουλιά, υδρόβιοι οργανισμοί και ζώα απειλούνται από τα επιβλαβή φυτοφάρμακα [19].

1.4.3 Βιομηχανικά χημικά

Οι βιομηχανίες είναι μία από τις σημαντικότερες πηγές ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων, καθώς τα απόβλητά τους περιέχουν μεγάλο πλήθος χημικών ενώσεων οι οποίες θεωρούνται τοξικές για το περιβάλλον. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οι υπερφθοριωμένες ενώσεις (perfluorinated substances) που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ανθεκτικών προϊόντων στη θερμότητα, το λάδι, τους λεκέδες, το λίπος και το νερό. Είναι ενώσεις με εξαιρετικό χημικό ενδιαφέρον, καθώς είναι υδρόφοβες και λιπόφοβες και περιέχουν έναν από τους ισχυρότερους δεσμούς (C-F). Ο τρόπος που προσβάλλουν την υγεία του ανθρώπου δεν είναι ακόμη γνωστός, ωστόσο πιθανολογείται ότι προκαλούν μεταξύ άλλων και ενδοκρινικές διαταραχές. Άλλες ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα και ανήκουν στην ίδια κατηγορία είναι οι φθαλικοί εστέρες, οι φαινόλες και ενώσεις που ανήκουν στα επιφανειοδραστικά [8] [20].

Ενδοκρινικοί διαταράκτες (Endocrine disrupting chemicals) είναι συνθετικές ενώσεις οι οποίες είχαν αρχικά σχεδιαστεί για να χρησιμοποιούνται ως πλαστικοποιητές, φυτοφάρμακα ή διαλύτες. Ωστόσο, βρέθηκε ότι διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα, προκαλώντας αναπτυξιακές, αναπαραγωγικές, νευρολογικές, καρδιαγγειακές, μεταβολικές και ανοσολογικές επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την παραγωγή και την απελευθέρωση ορμονών, προκαλώντας διαταραχές στον άνθρωπο [21]. Αρκετές μελέτες, έχουν αναφέρει συσχέτιση μεταξύ αναπαραγωγικών ανωμαλιών στα ψάρια και της έκθεσής τους σε ενδοκρινικούς διαταράκτες μέσω των λυμάτων [22].

1.5 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον

Λόγω της ταχέως αυξανόμενης χρήσης των χημικών στη βιομηχανία, τις μεταφορές και τη γεωργία, οι αναδυόμενοι ρύποι εισέρχονται στο περιβάλλον σε αυξημένα επίπεδα. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για τη

συμπεριφορά και τη μοίρα τους στο περιβάλλον και τις απειλές για την οικολογία και την ανθρώπινη υγεία [23].

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες συσχέτισης της έκθεσης σε υπερφθοριωμένες ενώσεις και της αύξησης της πιθανότητας καρκίνου, αναπαραγωγικών δυσλειτουργιών, υπογονιμότητας, νόσου του θυρεοειδούς και μεταβολικών ασθενειών. Τα περισσότερα ανθρώπινα και κτηνιατρικά φάρμακα, απαντώνται στο περιβάλλον σε χαμηλές συγκεντρώσεις που δεν προκαλούν οξείες τοξικές επιδράσεις. Ωστόσο, ορισμένοι οργανισμοί εκτίθενται σε χαμηλές δόσεις για μεγάλα χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της ζωής τους, προκαλώντας τους αξιοσημείωτες τοξικές επιδράσεις. Είναι έκδηλη η ανάγκη για περεταίρω έρευνα, με στόχο την εξακρίβωση ενός ακριβούς προφίλ των πιθανών κινδύνων των φαρμακευτικών προϊόντων [23] [24].

Οι άνθρωποι και το οικοσύστημα στο σύνολό του, εκτίθενται σε αναδυόμενους ρύπους μέσω διαφορετικών μεθόδων, γνωστών και άγνωστων. Δεδομένων των συνθηκών, θα πρέπει να γίνει εκτίμηση των επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία, λαμβάνοντας υπόψη τη συγκέντρωση, την κατηγορία και τις ιδιότητες των ρύπων. Η εξάλειψη των αναδυόμενων ρύπων στο περιβάλλον και στο ανθρώπινο σώμα εξαρτάται από μελλοντικές τεχνικές και μελέτες για την καθιέρωση συνολικών θεωριών και μεθόδων αποκατάστασης. Ο κύριος στόχος της εκτίμησης κινδύνου είναι η συνολική προστασία των οικολογικών κοινοτήτων στο υδάτινο περιβάλλον και στον άνθρωπο [23] [24].



Bleak (*Alburnus alburnus*)



Asp (*Leuciscus aspius*)



Chub (*Squalius cephalus*)

Εικόνα 4: Είδη ψαριών από το ποταμό Δούναβη τα οποία μελετήθηκαν σε αυτήν την έρευνα [2].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.1 Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία περιλαμβάνει μία σειρά τεχνικών, οι οποίες αποσκοπούν στο διαχωρισμό και τον προσδιορισμό συστατικών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας κινητής φάσης και μιας στατικής που βρίσκεται στη χρωματογραφική στήλη. Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα διαλύεται σε μια κινητή φάση, η οποία μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή υπερκρίσιμο ρευστό. Το όνομα της τεχνικής εξαρτάται από το είδος της κινητής φάσης: Αεριοχρωματογραφία (gas chromatography GC) , υγροχρωματογραφία (liquid chromatography LC) και χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (supercritical fluid chromatography SFC).

Στην περίπτωση της υγροχρωματογραφίας, η κινητή φάση είναι ένα υγρό που εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας στατικής φάσης. Οι δύο φάσεις επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά που κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται, συνήθως εξέρχονται από την στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, οπότε στη συνέχεια καθίσταται δυνατό να προσδιοριστούν ποιοτικά ή και ποσοτικά, εάν στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού [25] [26] [27] [28].

2.1.1 Χρωματογραφία κατανομής

Στη χρωματογραφία κατανομής η στατική φάση είναι ένα δεύτερο υγρό που δεν αναμειγνύεται με την υγρή κινητή φάση. Στους πρώτους τύπους

χρωματογραφίας κατανομής χρησιμοποιούνταν στήλες υγρού-υγρού, οι οποίες στα σύγχρονα συστήματα LC, αντικαταστάθηκαν με στήλες υγρής-συνδεδεμένης-φάσης (liquid-bonded-phase). Στη χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού, η υγρή στατική φάση κατακρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση, ενώ στη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης, η στατική φάση δεσμεύεται με χημικό δεσμό στην επιφάνεια του υλικού στήριξης.

Τα υλικά στήριξης για την πλειονότητα των υλικών πλήρωσης στη χρωματογραφία κατανομής συνδεδεμένης φάσης, παρασκευάζονται από άκαμπτη πυριτία (ή αλλιώς silica) ή σύνθεση που βασίζεται σε πυριτία. Αυτά τα στερεά απαρτίζονται/διαμορφώνονται από ομοιόμορφα, πορώδη και μηχανικώς σκληρά σωματίδια με συνήθη διάμετρο 3-5 μm .

Η χρωματογραφία κατανομής χωρίζεται σε δύο τύπους, τη χρωματογραφία κανονικής φάσης και την χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Η διάκριση γίνεται ανάλογα με την σχετική πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης.

Στην περίπτωση της κανονικής φάσης, η στατική φάση είναι πολικότερη της κινητής φάσης, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, τετραχλωράνθρακας κ.ά.. Αντιθέτως, στην περίπτωση της αντίστροφης φάσης η κινητή φάση είναι πολική και αποτελείται από κάποιον πολικό διαλύτη (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ύδωρ κ.ά.), ενώ η στατική φάση είναι μη πολική (συνήθως ένας υδρογονάνθρακας C8 ή C18). Σε αυτήν τη περίπτωση, το πολικότερο συστατικό εμφανίζεται πρώτο ενώ η αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου έκλουσης. Το αντίθετο συμβαίνει στη χρωματογραφία κανονικής φάσης [25] [28] [29].

2.1.2 Ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες χρωματογραφικών κορυφών

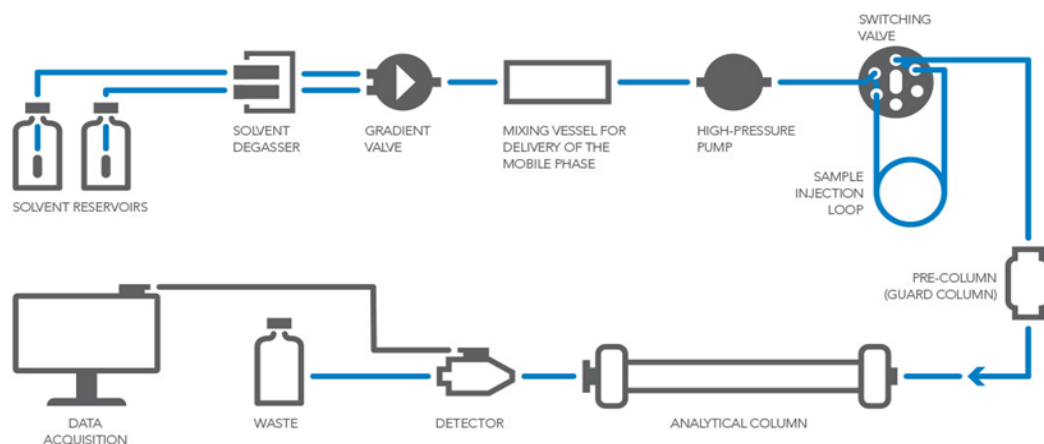
Αφού πραγματοποιηθεί η ανάλυση, οι χρωματογραφικές κορυφές στα ληφθέντα χρωματογραφήματα δίνουν σημαντικές πληροφορίες οι οποίες μας επιτρέπουν να κάνουμε ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ποιοτική ανάλυση είναι η ταυτοποίηση των ενώσεων η οποία βασίζεται στον χρόνο συγκράτησης του αναλύτη, ο οποίος κάτω από τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες παραμένει σταθερός όπως και ο παράγοντας χωρητικότητας. Με σύγκριση του χρόνου συγκράτησης του αναλύτη με τον χρόνο συγκράτησης ενός προτύπου κάτω από τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες είναι δυνατή η ταυτοποίηση του.

Ποσοτική ανάλυση είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός του αναλύτη και προκύπτει από την επιφάνεια της κορυφής στο χρωματογράφημα. Η επιφάνεια μιας χρωματογραφικής κορυφής είναι ανάλογη της ενιέμενης συγκέντρωσης του αναλύτη [26].

2.1.3 Οργανολογία υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ένα σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) περιλαμβάνει τα ακόλουθα : (α) δοχεία διαλυτών, (β) απαερωτές διαλυτών, (γ) αντλία, (δ) βαλβίδα έγχυσης, (ε) χρωματογραφική στήλη, (στ) ανιχνευτή, (ζ) καταγραφέα-σύστημα επεξεργασίας δεδομένων και (η) δοχείο αποβλήτων. Άλλα σημαντικά τμήματα που περιλαμβάνονται συχνά είναι: εσωτερικό φίλτρο διαλύτη, προστήλη και ρυθμιστής οπισθοπίεσης. Στην Εικόνα 5 φαίνεται ένα συνοπτικό διάγραμμα με τα επιμέρους μέρη ενός οργάνου υγροχρωματογραφίας.



Εικόνα 5: Συνοπτικό διάγραμμα με τα επιμέρους μέρη ενός οργάνου υγροχρωματογραφίας [30].

Αναφορικά με το σύστημα παροχής της κινητής φάσης και κατ' επέκταση τον τρόπο έκλουσης των ουσιών, διακρίνονται δύο κατηγορίες, η ισοκρατική έκλουση (isocratic elution) όπου ο διαλύτης έχει μία σταθερή σύσταση και η βαθμιδωτή έκλουση (gradient elution) όπου η σύσταση κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία ή κατά τακτά χρονικά διαστήματα, με βάση διάφορα προγράμματα. Τα σύγχρονα συστήματα HPLC συχνά είναι εφοδιασμένα με διατάξεις, οι οποίες εισάγουν διαλύτες από δύο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμιξης με ρυθμούς που μεταβάλλονται συνεχώς [26].

Τα δοχεία διαλυτών περιέχουν τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά του δείγματος μέσω του συστήματος της LC. Οι διαλύτες αρχικά πρέπει να διηθούνται από ειδικά φίλτρα υπό κενό για να απομακρύνονται σωματίδια που θα μπορούσαν δυνητικά να προκαλέσουν βλάβη στο σύστημα, όπως για παράδειγμα έμφραξη της στήλης. Οι αντλίες ωθούν τους διαλύτες μέσα στο χρωματογραφικό σύστημα μετά την απαέρωσή τους. Ακολουθεί η βαλβίδα έγχυσης, η οποία εισάγει το δείγμα μέσω βρόγχου. Επειδή το δείγμα συχνά περιέχει σωματίδια, είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται φίλτρο για την προστασία (και την πρόληψη ζημιάς) της βαλβίδας και της στήλης. Μετά την έγχυση του δείγματος, η αναλυτική στήλη το διαχωρίζει στα διάφορα συστατικά του. Αυτό βασίζεται στη διαφορική έλξη μεταξύ των συστατικών του δείγματος με το διαλύτη αλλά και το υλικό εντός της στήλης. Μια προσθήκη συχνά προηγείται της αναλυτικής στήλης για την απομάκρυνση όχι μόνο αιωρούμενων σωματιδίων και προσμίξεων από το διαλύτη, αλλά και συστατικών του δείγματος που συνδέονται με τη στατική φάση κατά μη αντιστρεπτό τρόπο. Μετά την αναλυτική στήλη, τα διαχωρισμένα συστατικά διέρχονται στον ανιχνευτή, πριν περάσουν στη δεξαμενή αποβλήτων. Κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα ανιχνευτών είναι: απορρόφησης, φθορισμού ή φασματομετρία μάζας. Μερικές φορές, χρησιμοποιείται ένας συνδυασμός διαφορετικών τύπων ανιχνευτών. Εξελεγχμένα συστήματα συλλογής και ανάλυσης δεδομένων είναι διαθέσιμα για όλους τους τύπους ανιχνευτών. Τέλος, συστήματα απαέρωσης διαλύτη και ρύθμισης οπισθοπίεσης συχνά εγκαθίστανται στο σύστημα της υγροχρωματογραφίας. Η

απαέρωση του διαλύτη εμποδίζει το σχηματισμό φυσαλίδων όταν τα συστατικά της κινητής φάσης αναμιγνύονται στο σύστημα και η ρύθμιση της οπισθοπίεσης περιορίζει την πτώση της πίεσης κατά μήκος της διαδρομής που θα μπορούσε να προκαλέσει περαιτέρω σχηματισμό φυσαλίδων [25] [30] [31].

2.2 Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS)

Η φασματομετρία μαζών είναι μια οικογένεια τεχνικών προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων στην αέρια φάση και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Αποτελεί ίσως την τεχνική με τη μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών και την πιο εντυπωσιακή ανάπτυξη την τελευταία δεκαετία και παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειακή σύσταση του μείγματος, την δομή ανόργανων, οργανικών, οργανομεταλλικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση των μιγμάτων, την δομή και σύσταση επιφανειών και την αναλογία ισοτόπων στοιχείων [32].

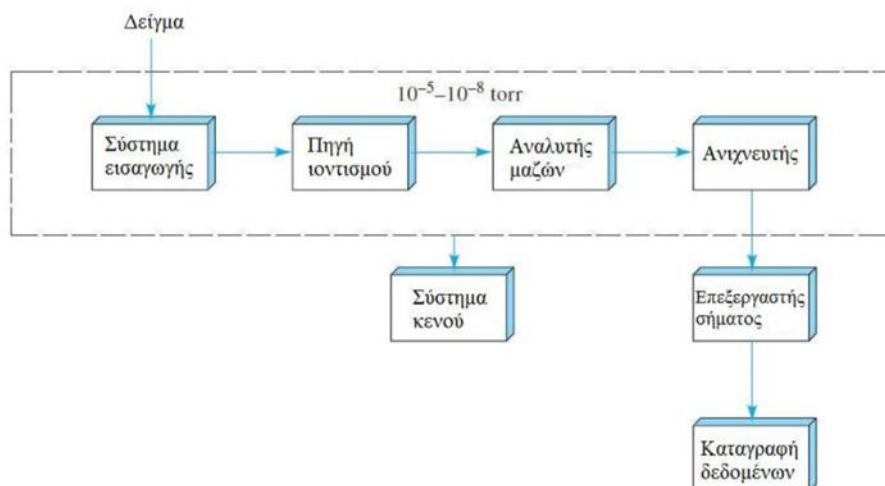
Φάσμα μαζών είναι το διάγραμμα που δείχνει την ένταση του μετρούμενου σήματος συναρτήσει του λόγου μάζα προς φορτίο (m/z). Η ένταση της κορυφής ενός ιόντος αντιστοιχεί στην αφθονία αυτού στο χώρο ανίχνευσης. Η κορυφή με τη μεγαλύτερη ένταση καλείται βασική κορυφή και σε αυτήν συνήθως αντιστοιχίζεται το 100% της έντασής αυτής. Συχνά, η κορυφή που βρίσκεται στο μεγαλύτερο m/z προκύπτει από την ανίχνευση του μοριακού ιόντος και συνήθως ακολουθείται από αρκετές κορυφές σε μικρότερα m/z , οι οποίες αντιστοιχούν σε ιόντα-θραύσματα του μοριακού ιόντος [25] [33].

Το φασματόμετρο μαζών λειτουργεί σε δυο βασικές λειτουργίες, την broadband collision- induced dissociation (bbCID) και την autoMS. Η bbCID τεχνική επιτρέπει να καταγράφονται τα φάσματα MS σε εύρος μαζών από 50 έως 1000Da. Επιπλέον καταγράφονται και φάσματα MS/MS στα οποία όμως θραυσματοποιούνται αδιακρίτως οι εκλουόμενοι αναλύτες χωρίς να προηγηθεί

απομόνωσή τους. Τα φάσματα MS λαμβάνονται σε χαμηλή ενέργεια θραυσματοποίησης (4 eV) και τα φάσματα MS/MS σε υψηλή ενέργεια θραυσματοποίησης (25 eV). Ο ρυθμός δειγματοληψίας φασμάτων είναι ίσος με 2Hz που σημαίνει ότι κάθε 1 δευτερόλεπτο παίρνεται ένα φάσμα MS και ένα bbCID. Τα δεδομένα που μετατράπηκαν σε mzXML και ακολούθησαν την προτεινόμενη μεθοδολογία ανεύρεσης τάσεων ήταν τα δεδομένα που πάρθηκαν σε bbCID λειτουργία, διότι κατά αυτήν την λειτουργία παίρνονται περισσότερα φάσματα MS από ότι η λειτουργία autoMS που περιγράφεται παρακάτω. Η λειτουργία autoMS διαφέρει από την bbCID κατά το γεγονός ότι απομονώνει τα ιόντα τα οποία έπειτα θραυσματοποιούνται και οδηγούμαστε στο φάσμα MS/MS συγκεκριμένων αναλυτών, ενώ το φάσματα MS/MS του bbCID περιέχει θραύσματα από όλα τα συνεκλούόμενα ιόντα [34].

2.2.1 Οργανολογία φασματομετρίας μαζών

Ένα φασματόμετρο μαζών αποτελείται από το σύστημα εισαγωγής δείγματος, την πηγή ιοντισμού, τον αναλυτή μαζών και τον ανιχνευτή. Επιπρόσθετα θα πρέπει να υπάρχει ένα σύστημα κενού ώστε να διατηρείται χαμηλή πίεση (10^{-4} - 10^{-8} torr) σε όλα τα τμήματα του οργάνου εκτός από το τμήμα του επεξεργαστή του σήματος και του οργάνου παρουσίασης των ενδείξεων ώστε να μην γίνονται συγκρούσεις με ατμοσφαιρικά συστατικά και να είναι εφικτή η παραγωγή ελεύθερων ηλεκτρονίων και ιόντων. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζονται τα τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών [25].



Εικόνα 6: Τμήματα ενός φασματομέτρου μαζών [25].

Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος αποτελεί το πρώτο τμήμα του οργάνου και επιτρέπει την εισαγωγή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος στην πηγή ιόντων. Στην συνέχεια ακολουθεί η πηγή ιοντισμού όπου τα συστατικά του μείγματος μετατρέπονται σε ιόντα. Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει τα παραγόμενα ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Τέλος, ο ανιχνευτής (μεταλλάκτης) μετατρέπει τη δέσμη ιόντων σε ηλεκτρικό σήμα το οποίο επεξεργάζεται, αποθηκεύεται στη μνήμη του υπολογιστή και παρουσιάζεται ή καταγράφεται με ποικίλους τρόπους [25].

2.2.2 Πηγές ιόντων

Οι πηγές ιόντων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στις πηγές αέριας φάσης και στις πηγές εκρόφησης. Στην πρώτη κατηγορία το δείγμα αρχικά εξαερώνεται και έπειτα ιοντίζεται, ενώ στη δεύτερη κατηγορία το δείγμα είναι σε υγρή ή στερεή κατάσταση και μετατρέπεται σε αεριώδη ιόντα. Στις πηγές αέριας φάσης ανήκουν ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact Ionization, EI) και ο χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization, CI). Στις πηγές εκρόφησης ανήκουν η πηγή βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment, FAB), ο ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Desorption Ionization, MALDI) και ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) [33].

Επίσης, ανάλογα με το βαθμό θραυσματοποίησης προκύπτει διαχωρισμός των πηγών σε σκληρές και μαλακές. Οι σκληρές πηγές μεταδίδουν στα μόρια του αναλύτη αρκετή ενέργεια ώστε να παραμείνουν σε έντονα διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση και έτσι κατά την αποδιέγερση έχουμε επιπλέον σπάσιμο δεσμών και σχηματισμό ιοντικών θραυσμάτων με λόγους m/z μικρότερους του μοριακού ιόντος. Στο φάσμα μαζών φαίνονται πολλές κορυφές και επομένως παρέχονται πληροφορίες για τη δομή των αναλυτών. Στις μαλακές πηγές η θραυσματοποίηση είναι περιορισμένη. Στο φάσμα μαζών φαίνεται η κορυφή του μοριακού ιόντος και λίγες επιπλέον κορυφές οπότε βρίσκεται με ακρίβεια το μοριακό βάρος των μορίων του αναλύτη [25].

Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)

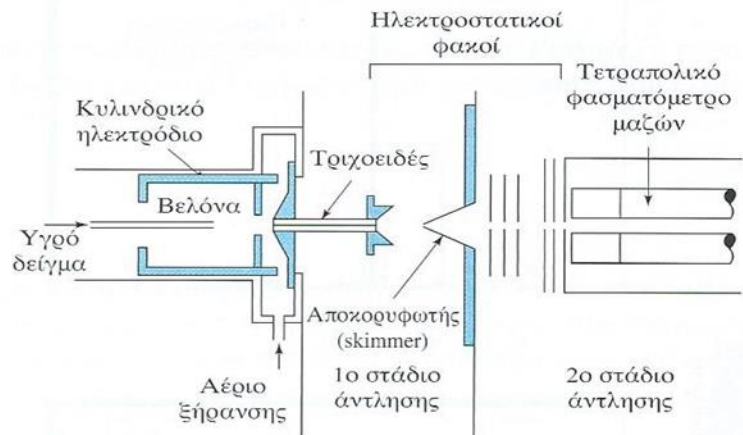
Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) είναι μαλακή πηγή εκρόφησης και πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Αποτελεί σήμερα μια από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές ιοντισμού και συνδυάζεται επιτυχώς με την υγροχρωματογραφία για την ανάλυση θερμοευαίσθητων και υψηλού μοριακού βάρους ενώσεων, ενώ εξελίσσεται συνεχώς και με ταχείς ρυθμούς.

Κάποια από τα πλεονεκτήματά του είναι πως επιτρέπει τον προσδιορισμό μοριακού βάρους χωρίς περιορισμούς στη μάζα, χρησιμοποιείται για ποικιλία μορίων (μετρίως πολικών και πολικών), οι σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες ιοντισμού επιτρέπουν την μελέτη θερμικά ασταθών μορίων, έχει καλή ευαισθησία και η ποσοτικοποίηση είναι εύκολη και τέλος συνδυάζεται με υγροχρωματογραφία και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Στα μειονεκτήματα της πηγής είναι ότι απαιτείται να είναι χαμηλή η ροή της κινητής φάσης, τα ιόντα του αναλύτη δημιουργούνται στην υγρή φάση, γίνεται καταστολή του σήματος (Ion Suppression) που παρατηρείται όταν το αναλυόμενο δείγμα περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις αλάτων ή άλλων αναλυτών που ιοντίζονται στις συνθήκες αυτές ή αν η κινητή φάση περιέχει υψηλές

συγκεντρώσεις αλάτων και τέλος σχηματίζονται ιόντα προσθήκης (adduct ions) [33] [35].

Αρχή της τεχνικής: Το διάλυμα διέρχεται μέσω μιας τριχοειδούς βελόνας, με ταχύτητα της τάξης μερικών $\mu\text{L}/\text{min}$, η οποία βρίσκεται σε υψηλό δυναμικό μερικών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο, με αποτέλεσμα την δημιουργία φορτισμένων σταγονιδίων. Τα σταγονίδια διέρχονται στη συνέχεια μέσω δεύτερου τριχοειδούς, στο οποίο ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλύτη. Η εξατμηση των φορτισμένων σταγονιδίων συντελείται με τη βοήθεια ροής θερμού αζώτου. Με τη μείωση του μεγέθους των σταγονιδίων λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη, η πυκνότητα φορτίου αυξάνει, τα ιόντα κινούνται στην επιφάνεια της σταγόνας και όταν οι απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων μέσα στη σταγόνα ξεπεράσουν την επιφανειακή τάση, η σταγόνα σπάει και ελευθερώνονται ιόντα. Τα ιόντα ανάλογα με τον ιοντισμό που έχουν υποστεί μπορεί να έχουν φορτιστεί θετικά ή αρνητικά. Στο θετικό ιοντισμό η σύγκρουση ιόντων και μορίων μεταφέρει ένα άτομο H στο ιόν και σχηματίζεται το πρωτονιωμένο ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$, αλλά και κάποια ιόντα προσθήκης μετά από προσκόλληση κατιόντων, όπως τα $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$, ενώ στον αρνητικό ιοντισμό αποσπάται ένα άτομο H από το ιόν και σχηματίζεται το αποπρωτονιωμένο ψευδομοριακό ιόν $[\text{M}-\text{H}]^-$. Από τον αποκορυφωτή θα περάσουν ιόντα θετικού ή αρνητικού φορτίου και θα οδηγηθούν στον αναλυτή, όπου επικρατούν συνθήκες κενού. Στην Εικόνα 7 απεικονίζεται μία συσκευή για ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό [25].



Εικόνα 7: Συσκευή για ιοντισμό με ηλεκτροψεκάσμο [25].

2.2.3 Αναλυτές μαζών

Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Το ιοντικό ρεύμα που καταγράφεται οφείλεται κάθε φορά σε ένα μόνο m/z .

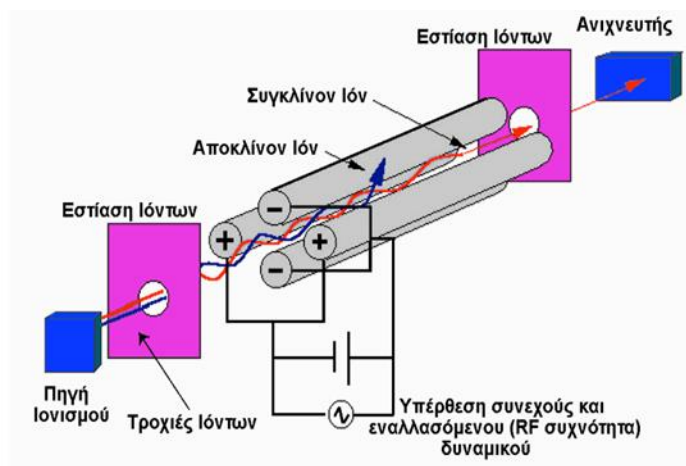
Οι αναλυτές μαζών διακρίνονται σε συνεχείς αναλυτές και παλμικούς αναλυτές. Στην πρώτη κατηγορία αναλύουν το m/z που φτάνει κάθε φορά από την πηγή ιόντων. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει ο τετραπολικός αναλυτής μαζών ή αλλιώς τετράπολο (quadrupole, Q) και ο αναλυτής μαγνητικού τομέα (magnetic sector). Στην κατηγορία των παλμικών αναλυτών μαζών, αναλύεται ομάδα ιόντων (παλμοί) που παράγονται στην πηγή ιόντων. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκει η τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT), οι αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (Time Of Flight, TOF), ο αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance, FTICR) και ο αναλυτής Orbitrap [33].

Τετραπολικός αναλυτής μαζών ή Τετράπολο (Quadrupole mass analyzer, Q)

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών αποτελείται από 4 παράλληλες κυλινδρικές ράβδους - ηλεκτρόδια τοποθετημένες ανά ζεύγη απέναντι σχηματίζοντας σταυρό. Σε κάθε ζεύγος εφαρμόζεται δυναμικό συνεχούς ρεύματος (dc) αντίθετης πολικότητας. Επιπλέον, σε κάθε ζεύγος εφαρμόζεται δυναμικό εναλλασσόμενου ρεύματος AC (με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοκυμάτων) με διαφορά φάσης

180°. Τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με δυναμικό 5-10V με το λόγο συνεχούς και μεταβλητού δυναμικού να παραμένει σταθερός. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φθάνουν στις ράβδους, εξουδετερώνονται και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Με αυτόν τον τρόπο φθάνουν στον μεταλλάκτη μόνο τα ιόντα των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z .

Είναι ο πιο συνηθισμένος αναλυτής, μικρού μεγέθους και κόστους, υψηλής ταχύτητας σάρωσης (<100 ms) και είναι ανθεκτικός. Κάποια από τα βασικά πλεονεκτήματά του είναι η αξιοπιστία του, η καταλληλότητα του για ποσοτική ανάλυση και ως ανιχνευτής χρωματογραφίας, είναι εύκολος στην χρήση, έχει μέτριες απαιτήσεις κενού (10^{-4} - 10^{-5} Torr) και τάσης λειτουργίας. Όσον αφορά τα μειονεκτήματά του, θεωρείται αναλυτής χαμηλής διακριτικής ικανότητας (FWHM: 0,5 u-R: 1000-2000) και έχει περιορισμένο εύρος m/z (μέγιστο 4000 u). Στην Εικόνα 8 φαίνεται η λειτουργία ενός τετραπολικού αναλυτή μαζών [25] [33].



Εικόνα 8: Λειτουργία τετραπολικού αναλυτή μαζών [36].

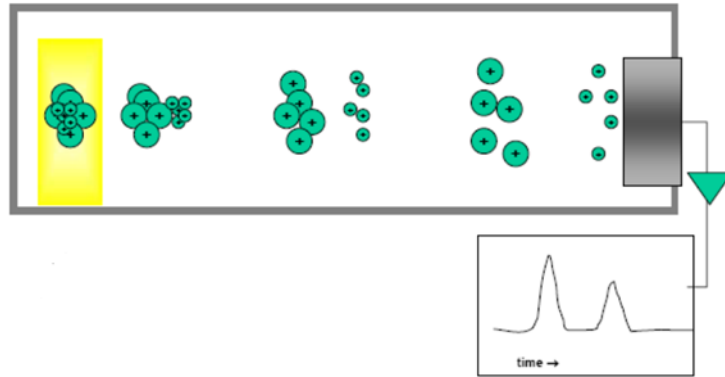
Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF):

Ο αναλυτής μαζών τύπου χρόνου πτήσης, διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το «χρόνο πτήσης» τους μέσα σε σωλήνα πορείας ή «πτήσης» απαλλαγμένο από πεδία με μήκος περίπου ένα μέτρο. Μία ομάδα ιόντων που παράγεται στην πηγή ιοντισμού επιταχύνεται στο σωλήνα πορείας με παλμικό ηλεκτρικό πεδίο 10^3 -

10^4V ίδιας συχνότητας με τον παλμό που προκαλεί τον ιοντισμό. Τα ιόντα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια όταν εισέρχονται στο σωλήνα, επομένως, η ταχύτητά τους θα είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους, δηλαδή τα στοιχεία με μικρότερη μάζα θα κινηθούν με μεγαλύτερη ταχύτητα και θα φτάσουν πρώτα στον ανιχνευτή. Οι τυπικοί χρόνοι πτήσης βρίσκονται στην περιοχή των μs (1-30 μs), για πτήση σε σωλήνα 1 μέτρου. Ο χρόνος πτήσης δίνεται από τη σχέση:

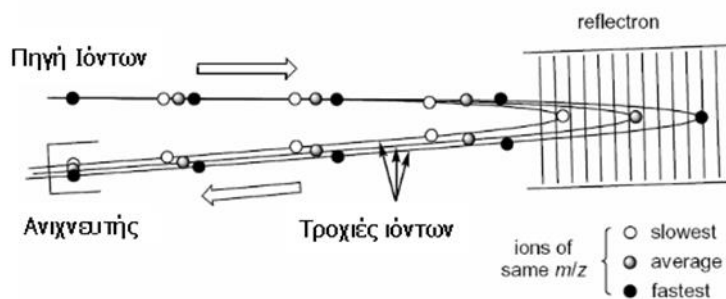
$$t_F = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

όπου L είναι η απόσταση της πηγής από το μεταλλάκτη. Στην Εικόνα 9 φαίνεται η λειτουργία ενός αναλυτή χρόνου πτήσης.



Εικόνα 9: Λειτουργία αναλυτή χρόνου πτήσης [33].

Στην πραγματικότητα, όλα τα ιόντα δεν ξεκινούν από την ίδια θέση του σωλήνα ούτε έχουν ακριβώς την ίδια κινητική ενέργεια. Έτσι, ιόντα με τον ίδιο λόγο m/z μπορεί να φτάσουν πιο αργά ή πιο γρήγορα στον ανιχνευτή (χαμηλή διακριτική ικανότητα). Για τη λύση του προβλήματος χρησιμοποιείται ανακλαστήρας (reflectron) που επιβραδύνει τα ιόντα ώστε να φτάσουν όλα μαζί στον ανιχνευτή. Στην Εικόνα 10 φαίνεται ένας σωλήνας πορείας με χρήση ανακλαστήρα.



Εικόνα 10: Σωλήνας πορείας με χρήση ανακλαστήρα [33].

Ανάμεσα στα πλεονεκτήματά του είναι η απλότητα της λειτουργίας του, το απεριόριστο (θεωρητικά) εύρος μαζών, έχει τη μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης, υψηλή διακριτική ικανότητα (R : 10000-40000), δυνατότητα για MS/MS (υβριδικό Q-TOF-MS) και είναι κατάλληλος για βιομόρια και μελέτη της δομής πρωτεϊνών. Στα αρνητικά του, είναι ότι έχει περιορισμένη δυναμική περιοχή σε ποσοτική ανάλυση, είναι περιορισμένης ευαισθησίας (βελτιώνεται σημαντικά ως QTOF) και έχει υψηλές απαιτήσεις κενού [25] [33].

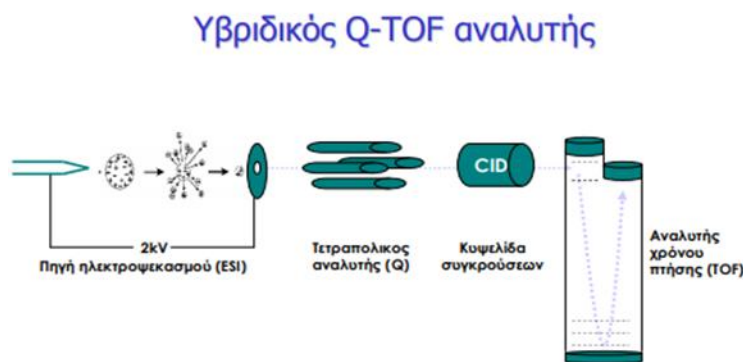
2.2.4 Διαδοχική φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) με QTOF

Το QTOF αποτελείται από τρία τμήματα σε σειρά: ένα τετράπολο (quadrupole, Q), μία κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell) και έναν αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης (time of flight, TOF). Κατά την ανάλυση ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion) παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το τετράπολο (MS_1).
2. Οδηγείται στο 2^ο τετράπολο (κυψελίδα συγκρούσεων) όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar ή He) παράγοντας θυγατρικά μόρια (daughter or product ions).
3. Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών μορίων γίνεται στον αναλυτή μαζών χρόνου πτήσης (MS_2) [33].

2.2.5 Υβριδικός Αναλυτής Τετραπόλου-Χρόνου πτήσης (Q-TOF)

Ο συγκεκριμένος αναλυτής μαζών αποτελεί ένα υβρίδιο τετραπολικού αναλυτή και αναλυτή χρόνου πτήσης. Ο συνδυασμός των δυο αναλυτών αυξάνει σημαντικά την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων καθώς έχει υψηλή διακριτική ικανότητα ($m/\Delta m \approx 10.000-20.000$ με μέγιστο 40.000), ακρίβεια μάζας καθώς και υψηλή ευαισθησία. Στην Εικόνα 11 απεικονίζεται ένας τέτοιος αναλυτής μαζών [33].



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή Q-TOF [33].

2.3 Σύζευξη LC-MS

Ο συνδυασμός της υγροχρωματογραφίας (LC) ως μια ευέλικτη τεχνική διαχωρισμού με τη φασματομετρία μαζών (MS) ως μία ευαίσθητη τεχνική ανίχνευσης και ταυτοποίησης οδηγεί σε ένα εξαιρετικά ισχυρό αναλυτικό εργαλείο.

Η τεχνική LC-MS, μας επιτρέπει τον προσδιορισμό μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ενώσεων που δεν μπορούν να προσδιοριστούν με GC-MS, τον προσδιορισμό της καθαρότητας χρωματογραφικής κορυφής καθώς και την ταυτοποίηση της δομής αγνώστων ενώσεων όπως είναι για παράδειγμα κάποιος μεταβολίτης φαρμάκου. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες δυσκολίες και προβλήματα στη σύζευξη, όπως είναι η ασυμβατότητα μεταξύ των μεγάλων όγκων διαλυτών της LC και των συνθηκών κενού που απαιτούνται από το MS, η ασυμβατότητα με τα μη πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα της κινητής φάσης της

υγροχρωματογραφίας και τέλος ο προβληματικός ιοντισμός των μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ενώσεων.

Τα παραπάνω προβλήματα μπορούν να λυθούν:

- 1 με χρήση στηλών μικρής διαμέτρου και μήκους (και ταυτόχρονη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού) και ελαχιστοποίηση του νεκρού όγκου
- 2 με διαχωρισμό της κινητής φάσης, ώστε μόνο ένα μικρό κλάσμα να εισάγεται στην πηγή ιόντων
- 3 με χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων και ρυθμιστών pH της κινητής φάσης και
- 4 με χρήση νέων τεχνικών ιοντισμού όπως είναι για παράδειγμα ο ηλεκτροψεκασμός (ESI) [33] [27].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Στο κεφάλαιο αυτό, πραγματοποιείται ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, μελετώντας έρευνες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε Ευρώπη, Κίνα, Αφρική και Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής. Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο προσδιορισμός και η μελέτη των αναδυόμενων ρύπων σε μήτρες όπως είναι τα ψάρια, έχει φέρει στο φως σημαντικά στοιχεία για το περιβάλλον. Τέτοια είναι η ρύπανση των υδάτινων οικοσυστημάτων από αναδυόμενους ρύπους, η βιοσυσσώρευση και η επίδρασή τους στους υδρόβιους οργανισμούς καθώς και οι ολέθριες συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία μέσω της κατανάλωσης ψαριών.

Παρακάτω, θα παρατεθούν πληροφορίες από διάφορες ερευνητικές ομάδες οι οποίες έχουν ασχοληθεί με τον προσδιορισμό αναδυόμενων ρύπων σε υδρόβιους οργανισμούς. Στον πρώτο πίνακα παρουσιάζονται ερευνητικές ομάδες που ανέλυσαν δείγματα ψαριών, τα οποία προέρχονταν από ποταμούς, ενώ στον δεύτερο πίνακα παρουσιάζονται ερευνητικές ομάδες που ασχολήθηκαν με δείγματα ψαριών από άλλες πηγές προέλευσης όπως θάλασσες, λίμνες, σούπερ μάρκετ κ.ά.. Οι αναλύτες που προσδιορίζονται σε κάθε περίπτωση είναι είτε γενικά αναδυόμενοι ρύποι, είτε πιο συγκεκριμένες κατηγορίες όπως για παράδειγμα είναι οι φαρμακευτικές ενώσεις ή τα φυτοφάρμακα. Όλες οι εργασίες αποτελούν έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί από το έτος 2010 μέχρι σήμερα. Όπως θα δούμε στους Πίνακες 1 και 2, για την προκατεργασία, οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες επέλεξαν την εκχύλιση με λουτρό υπερήχων και την εκχύλιση στερεάς φάσης για τον καθαρισμό των δειγμάτων.

Οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιούνται ποικίλλουν σε είδος και διαστάσεις και η επιλογή εξαρτάται από τις ενώσεις που πρόκειται να διαχωριστούν. Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιούνται, κατά κύριο λόγο, ακετονιτρίλιο (ACN), μεθανόλη (MeOH) και νερό (H₂O) ενώ σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται κάποιο αμμωνιακό άλας αλλά και φορμικό ή οξικό

οξύ. Στο κομμάτι της φασματομετρίας μαζών, κυρίαρχο όργανο είναι το τριπλό τετράπολο (QQQ) ενώ η πηγή ιοντισμού που επιλέγεται είναι συνήθως ο ηλεκτροψεκασμός (ESI) θετικός, αρνητικός ή και τα δυο ανάλογα με τους αναλύτες που μελετώνται κάθε φορά.

Πίνακας 1: Μέθοδοι προκατεργασίας δειγμάτων ψαριών από ποταμούς.

Μήτρα	Αναλύτες	Προκατεργασία δείγματος	Αναλυτική τεχνική	Βιβλιογραφία
Δείγματα ψαριών από τον ποταμό Δούναβη (συκώτι ψαριών)	Υπερφθορο αλκυλικές ενώσεις (perfluoroalkyl substances, PFOS)	Σε 1 g αποξηραμένων (freeze-dried) δειγμάτων προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο (I.S.) $^{13}\text{C}_4$ -PFOS και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων (ultra-sonication) με μεθανόλη και καθαρισμός με εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας ENVI-Carb προσροφητικό (sorbent).	UHPLC-MS-MS Στήλη: Acquity® UPLC® BEH C18, particle size 1,7 μm , 50 $\times$ 2,1 mm Κινητή φάση : ροή 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ A: H_2O –MeOH (95:5%, v/v) 0,1% CH_3COOH B: ACN–MeOH (50:50%, v/v) 0,1% CH_3COOH	[37]
Δείγματα ψαριών από ποταμούς στην Γερμανία (Δούναβη ς, Σάαρ, Ρήνο, Ζάα λ, Έλβας)	Υπερφθορο αλκυλικές και πολυφθορο αλκυλικές ενώσεις (Per- and polyfluoroalkyl substances)	Σε 0,5 g δείγματος προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο, 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος (0,25 M Na_2CO_3 και NaHCO_3), 1 mL 0,5 M tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate σε νερό (προσαρμοσμένο σε pH 10) και 5 mL methyl tert-butyl ether. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (4700 rpm), ενώ η οργανική στιβάδα μεταφέρθηκε σε έναν επιπλέον σωλήνα φυγοκέντρωσης. Το εκχύλισμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και ανασυστάθηκε σε 1mL μεθανόλης/νερού (1/1, v/v). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν ξανά σε λουτρό υπερήχων και διηθήθηκαν μέσω φίλτρου RC 0,45 μm .	UHPLC-HRMS Στήλη: Acquity UPLC BEH C18 column 2,1 mm $\times$ 100 mm, 1,7 μm Κινητή φάση: ροή 0,3 mL/min A: $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (95/5 v/v) 2 mM $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}_3$ B: MeOH 2 mM $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}_3$	[38]
Δείγματα ψαριών (μύες) από Αδίκη (Ιταλία), Ευρώτα (Ελλάδα), Λιοβρεγάτ (Ισπανία) και Σάβο (Σλοβενία, Κροατία,	Φαρμακευτικές ενώσεις	Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων με οξινοποιημένο μείγμα ακετονιτρίλιου και ισοπροπυλικής αλκοόληςH (3:1) + 0.1% μυρμηκικό οξύ και στη συνέχεια καθαρισμός με εκχύλιση στερεάς φάσης διασποράς (dispersive solid phase extraction d-SPE) χρησιμοποιώντας Z-Sep / C18 προσροφητικό (sorbent).	LC-QToF-MS Στήλη : αντίστροφης φάσης EVO C18 KINETEX 50 $\times$ 2,1 mm, particle size 2,6 μm Κινητή φάση : ροή 0,8 mL/min A: 5 mM $\text{AcOONH}_4/0,05\%$ MeOOH σε H_2O B: 0,05 % MeOOH σε	[15]

Βοσνία-Ερζεγοβίνη ή Σερβία)			MeCN	
Δείγματα ψαριών από τον ποταμό Λιοβρεγάτ (Ισπανία)	Οργανοφωσφορικές ενώσεις και πλαστικοποιητές (organophosphorus flame retardants and plasticizers)	Τα αποξηραμένα δείγματα εκχυλίστηκαν σε λουτρό υπερήχων με διαλύτη μείγμα εξανίου:ακετόνης (1:1) , έγινε καθαρισμός με εκχύλιση στερεάς φάσης και τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν σε ρεύμα αζώτου(30 °C)και έγινε ανασύσταση με 200 µL MeOH. Πριν την ανάλυση έγινε προσθήκη εσωτερικού προτύπου : 10 ng των TCEP-d12, TDCPP-d15, TBP-d27, TPHP-d15 and ¹³ C ₂ -TBOEP.	LC-MS/MS Στήλη : Purosphere Star RP-18 125 mm × 2,0 mm, particle size 5 µm Κινητή φάση: ροή 0,25 mL/min A: H ₂ O (0,1% HCOOH) B: MeOH (10 mM NH ₄ CH ₃ CO ₂)	[39]
Δείγματα ψαριών (συκώτι) από τον ποταμό Scioto (Οχάιο , USA)	Φαρμακευτικές ενώσεις	Σε 0,5 g κάθε δείγματος προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο και 2.5 mL (84:16 v/v) ACN/H ₂ O με 1% CH ₃ COOH και ακολούθησε vortex 1 λεπτό. Προστέθηκαν 0,50 g MgSO ₄ και 0,15 g CH ₃ COONa, vortex και ακολούθησε φυγοκέντρηση (4400 rpm). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα που περιείχε 150 mg MgSO ₄ , 50 mg PSA, 50 mg C ₁₈ και έγινε φυγοκέντρηση (4400 rpm). Τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν χρησιμοποιώντας 0,22 µm φίλτρα και αποθηκεύτηκαν σε vials στους -20 °C.	UHPLC-QTOF-ESI (+/-) -MS Στήλη : Phenyl-Hexyl, 3,0 × 100 mm, 2,7 µm Κινητή φάση: ροή 0,2 mL/min positive A: H ₂ O-0,1% HCOOH B: ACN negative A: 0.05 M NH ₄ CH ₃ CO ₂ B: ACN	[40]
Δείγματα ψαριών από τον ποταμό Γουαδαλκίβιρ (Ισπανία)	Φυτοφάρμακα (pesticides)	Η προκατεργασία του δείγματος έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο QuEChERS όπου σε 1 g δείγματος προστίθενται 10 mL ACN και πραγματοποιείται υγρό-υγρό εκχύλιση με προσθήκη 6 g άνυδρου MgSO ₄ και 1,5 g NaCl. Ο καθαρισμός γίνεται με εκχύλιση στερεάς φάσης διασποράς (dispersive solid phase extraction d-SPE) με 150 mg άνυδρου MgSO ₄ , 50 mg PSA, C ₁₈ 50 mg και 15 mg ενεργού άνθρακα.	LC-MS/MS Στήλη: Luna C18: 15,0 cm × 0.21 cm, 3 µm particle size Κινητή φάση : ροή 0,4 mL/min A:H ₂ O – 10 mM NH ₄ HCO ₂ B: MeOH-10 mM NH ₄ HCO ₂	[41]
Δείγματα ψαριών από τον ποταμό Júcar (Ισπανία)	Φυτοφάρμακα (pesticides)	Η προκατεργασία του δείγματος έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο QuEChERS όπου σε 2 g του δείγματος προστίθενται 8 mL H ₂ O MiliQ και 15 mL ACN και αναδεύονται. Στην συνέχεια προστίθενται 6 g άνυδρου MgSO ₄ και 1,5 g NaCl και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 4 λεπτά (4000 rpm). 2 mL από το υπερκείμενο	LC-MS/MS Στήλη : Luna C18 ,150 mm × 2.0 mm, 3 µm particle size Κινητή φάση : ροή 0,4	[42]

		μεταφέρονται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα και καθαρίζονται με 0,3 g MgSO ₄ , 0,1 g PSA, 0,1 g C18 και 0,015 g ενεργού άνθρακα. Ο σωλήνας αναδεύεται, φυγοκεντρείται για 4 λεπτά (4000 rpm) και το υπερκείμενο φιλτράρεται χρησιμοποιώντας 0,22 μm φίλτρα και αποθηκεύεται σε vial.	mL/min A: MeOH-10 mM HCOOH B: MeOH-10 mM HCOOH	
Δείγματα από ψάρια, μαλάκια και γαρίδες από τον ποταμό Γιαγκ-Τσέ (Κίνα)	Ενδοκρινικοί διαταράκτες (φθαλικοί εστέρες, αλκυλοφαινόλες, διφαινόλη Α)	Σε 2 g του δείγματος προστέθηκαν 2 mL H ₂ O και αναδεύτηκαν με vortex. Στην συνέχεια προστέθηκαν 10 mL ACN, ο σωλήνας αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά. Προστίθεται 1 g NaCl και γίνεται φυγοκέντρηση (2500 rpm). Η άνω στοιβάδα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και τα υπερκείμενα ενώνονται και ξηραίνονται έως 1,5 mL σε ρεύμα αζώτου (38 °C.) Για τον καθαρισμό γίνεται εκχύλιση στερεάς φάσης με ProElut PSA (1 g/6 mL) φυσίγγεια και τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν σε ρεύμα αζώτου (38 °C) στα 200 μL και έγινε ανασύσταση με 1 mL ACN και φιλτράρισμα με 0,22 μm φίλτρα.	LC-MS/MS Στήλη: Για τις αλκυλοφαινόλες Waters Xbridge C18 ,5 μm, 100 mm × 2,1 mm Κινητή φάση: ροή 0,25 mL/min A: 0.3% NH ₄ OH-MilliQ H ₂ O B : MeOH Στήλη: για φθαλικούς εστέρες και διφαινόλη A Agilent Eclipse XDB C8 column, 5 μm, 100 mm × 4.6 mm Κινητή φάση: ροή 0,25 mL/min A: 0.01% CH ₃ COOH – MilliQ H ₂ O B : ACN	[43]
Δείγματα ψαριών (μύες) από τον ποταμό Αδίγη (Ιταλία)	Φυτοφάρμακα (pesticides)	Η προκατεργασία του δείγματος έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο QuEChERS όπου 10 g δείγματος τοποθετούνται σε φυγοκεντρικό σωλήνα ο οποίος περιέχει τα εξής : 4 g MgSO ₄ , 1 g NaCl, 1 g NaCitrate και 0,5 g disodium citrate sesquihydrate (DCS), προστίθεται μείγμα εσωτερικού προτύπου και ανακινείται. Ακολουθεί εκχύλιση στερεάς φάσης διασποράς (dispersive solid phase extraction d-SPE) χρησιμοποιώντας ACN ως διαλύτη εκχύλισης 1:1 w/v. Γίνεται vortex, φυγοκέντρηση (4000 rpm) για 5 λεπτά και 7 mL από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα και καθαρίζονται με Bekolut® PSA-Kit-04A (1200 mg MgSO ₄ , 400 mg PSA, 400 mg C18). Vortex και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (4000 rpm) το υπερκείμενο μεταφέρεται σε vial.	LC-MS/MS Στήλη: Purospher STAR RP-18e column, 150 × 2.1 mm, 2 μm particle diameter Κινητή φάση: ροή 0,2 mL/min 10% ACN-H ₂ O	[18]
Δείγματα ψαριών από τον	υπερφθοροαλκυλικές ενώσεις	Κάθε δείγμα αποτελείται από 3-5 ψάρια ίδιου είδους τεμαχισμένα και ομογενοποιημένα ώστε να φτιαχτεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα. 2 g κάθε δείγματος	LC-MS/MS Στήλη : Cyclone P-C18 ,2.1 × 20 mm, 12	[44]

ποταμό Júcar (Ισπανία)	(perfluoroalkyl substances, PFAS)	μεταφέρθηκαν σε σωλήνα πολυπροπυλενίου των 50 mL και προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο. Ακολούθησε προσθήκη 2 mL MeOH και ανακίνηση, προσθήκη 8 mL NaOH (10 mM σε MeOH) και ανακίνηση για 4 ώρες σε αναδευτήρα (orbital shaker) σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (4000 rpm) και 20 µL υπερκείμενου εγχύθηκαν απευθείας στο χρωματογραφικό σύστημα τυρβώδους ροής (turbulent flow chromatographic system, TFC)	µm particle size Κινητή φάση : ροή 0.4 mL/min A: NH ₄ Ac 20 mM σε H ₂ O B NH ₄ Ac 20 mM σε MeOH	
Δείγματα ψαριών (μύες) από ποταμούς της Γαλλίας	πολυχλωριωμένα επιβραδυντικά κά φλόγας (polychlorinated flame retardants , FRs)	4g δείγματος εκχυλίστηκαν με εκχύλιση υπό πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE) στα 100 bar και στους 120° C με περίπου 120 mL μίγματος τολουολίου / ακετόνης 7: 3 (v/v). Στα εκχυλίσματα προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο και εφαρμόστηκαν δύο διαδικασίες καθαρισμού. Πρώτα τα εκχυλίσματα φορτώθηκαν σε μια πολυστρωματική στήλη πυριτικής πηκτής ενώ η έκλουση έγινε με 120 mL n-εξάνιο και ανασυστάθηκαν σε 500 mL μίγματος οξικού αιθυλεστέρα /κυκλοεξάνιο 1: 1 (v/v). Κατά την δεύτερη διαδικασία τα εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε στήλη χρωματογραφίας διαπέρασης γέλης (Gel Permeation Chromatography column ,58 cm x 24.4 mm) χρησιμοποιώντας μίγμα οξικό αιθυλεστέρα / κυκλοεξάνιο 1: 1 (v/v) ως κινητή φάση με ρυθμό ροής 5 mL/min. Τέλος τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου και ανασυστάθηκαν σε 20 mL τολουολίου.	GC-HRMS Στήλη: HT8-PCB 30 m x 0.25 mm, άγνωστο πάχος φιλμ Κινητή φάση: Ήλιο ροή 1 mL/min	[45]
Δείγματα ψαριών από τον ποταμό Λιοβρεγάτ (Ισπανία)	Υπερφθοροαλκυλικές ενώσεις (perfluoroalkyl substances, PFAS)	Κάθε δείγμα αποτελείται από 3-5 ψάρια ίδιου είδους τεμαχισμένα και ομογενοποιημένα ώστε να φτιαχτεί ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα. 2 g κάθε δείγματος μεταφέρθηκαν σε σωλήνα πολυπροπυλενίου των 50 mL και προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο. Ακολούθησε προσθήκη 2 mL MeOH και ανακίνηση, προσθήκη 8 mL NaOH (10 mM σε MeOH) και ανακίνηση για 4 ώρες σε αναδευτήρα (orbital shaker) σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (4000 rpm) και 20 µL υπερκείμενου εγχύθηκαν απευθείας στο χρωματογραφικό σύστημα τυρβώδους ροής (turbulent flow chromatographic system, TFC.)	LC-MS/MS Στήλη : Cyclone P-C18 ,2.1 × 20 mm, 12 µm particle size Κινητή φάση : ροή 0.4 mL/min A: NH ₄ Ac 20 mM σε H ₂ O B NH ₄ Ac 20 mM σε MeOH	[46]
Δείγματα ψαριών (κυρίως ισοί μυών και δέρματος)	πολυ- και υπερφθοροαλκυλικές ενώσεις (PFASs)	Σε 1g δείγματος προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο και αφέθηκε για 20 λεπτά σε ισορροπία. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση προσθέτοντας 10 mL MeOH και 10 mM NaOH και αφέθηκε για 2 ώρες σε αναδευτήρα (orbital shaker). Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε (4000 rpm , 17 ° C για 20 λεπτά) και 4	LC-MS/MS Στήλη : Hypersil GOLD PFP (3 × 50 mm, particle size 3 µm Κινητή φάση : ροή 0,4 mL/min	[47]

αλλά και ολόκληρα ψάρια) από τον ποταμό Έβρο (Ισπανία)		mL του υπερκείμενου εξατμίστηκαν σε ρεύμα αζώτου ενώ έγινε ανασύσταση με 100 μ L H ₂ O-MeOH (9:1). Λόγω των διαφορών στο βάρος και το μέγεθος των επιλεγμένων ειδών, τα μικρότερα δείγματα ψαριών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία και αναλύθηκαν ως ομάδα ατόμων, ενώ τα μεγαλύτερα δείγματα ψαριών υποβλήθηκαν σε επεξεργασία ως άτομα. Όπου ήταν δυνατό, μόνο οι ιστοί των μυών και του δέρματος αναλύθηκαν, αλλά όπου αυτό ήταν αδύνατο, ολόκληρο το σώμα των ψαριών εκχυλίστηκε και αναλύθηκε. Τα εκχυλίσματα καθαρίστηκαν με χρωματογραφικό σύστημα τυρβώδους ροής (turbulent flow chromatographic system, TFC.)	A: H ₂ O (pH 3.4, με HCOOH) B: ακετόνη: ισοπροπανόλη: ακετονιτρίλιο (10:45:45)	
Δείγματα ψαριών και οστρακόδερμων από τον ποταμό Περλ (Κίνα)	Φαρμακευτικές ενώσεις και προϊόντα προσωπικής υγιεινής	0,2 g αποξηραμένου δείγματος τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL και έγινε προσθήκη εσωτερικού προτύπου και ACN. Ακολούθησε vortex και το δείγμα αφέθηκε για μία ολόκληρη νύχτα στο σκοτάδι. Προστέθηκαν 8 mL διαλύματος ακετονιτρίλιου (ACN:H ₂ O 8:2 v/v) και έγινε ξανά vortex. Τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά στους 25°C και φυγοκεντρήθηκε (4500 rpm για 5 λεπτά). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα φυγοκέντρωσης. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμη μία φορά και τα υπερκείμενα αναμείχθηκαν. Ο καθαρισμός έγινε με εκχύλιση στερεάς φάσης, 10 mL του υπερκείμενου εκχυλίστηκαν με Oasis PRiME HLB φυσίγγιο (cartridge). Το διάλυμα συλλέχθηκε σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL και εξατμίστηκε έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου.	UHPLC-MS/MS Στήλη: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 column (Rapid Resolution HD 2.1 × 50 mm × 1.8 μ m) Κινητή φάση: ροή 0,25 mL/min Στον αρνητικό ιοντισμό (ESI-): A: MilliQ H ₂ O B: ACN Στον θετικό ιοντισμό (ESI+): A: H ₂ O-0.1% HCOOH B: ACN	[48]
Δείγματα ψαριών (μύες, ήπαρ, βράγχια) από τον ποταμό Παρανά (Αργεντινή)	Φαρμακευτικές ενώσεις και μεταβολίτες τους	1 g ομογενοποιημένου δείγματος τοποθετήθηκε σε vial και προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 mL MeOH και 4 mL υδατικού διαλύματος CH ₃ COOH 0.1 M (pH 4.0). Το φιαλίδιο ανακινήθηκε για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε rotating table (15 rpm για 25 λεπτά). Ακολούθησε φυγοκέντρωση (7500 rpm για 45 λεπτά) και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και εξατμίστηκε έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Τέλος, έγινε ανασύσταση σε 1 mL κινητής φάσης, 5:95 (v/v) MeOH: υδατικό διάλυμα 0,1% HCOOH.	LC-MS/MS Στήλη: m Poroshell 120 SB-AQ column (10 cm × 2.1 mm, 2.7 μ m) Κινητή φάση: ροή 0.5 mL/min A: H ₂ O- 0.1% HCOOH B: MeOH	[49]
Δείγματα ψαριών από τις εκβολές του	Αναδυσόμενοι ρύποι	0,5 g δείγματος αναμείχθηκαν με 1 g Al ₂ O ₃ και τοποθετήθηκαν σε σωλήνα πολυπροπυλενίου των 50 mL. Προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο, 10 mL MilliQ H ₂ O και 10 mL ACN. Το δείγμα ανακινήθηκε για 15 δευτερόλεπτα και ακολούθησε vortex για ακόμη 15	LC-MS/MS Στήλη : RP-C18 Gemini NX (50 mm × 2.0 mm, 3 μ m) Κινητή φάση :	[50]

ποταμού Klang (Μαλαισία)		δευτερόλεπτα έως να σχηματιστούν δύο φάσεις. Προστέθηκε όξινο διάλυμα (acetate buffer) (QuEChERS Extract Pouches, AOAC Method), vortex για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση (4000 rpm 5 λεπτά). Η οργανική φάση αναμείχθηκε με dispersive SPE , ανακινήθηκε, έγινε vortex για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση (4000 rpm 5 λεπτά). Ο καθαρισμός του δείγματος έγινε με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Ο όγκος των εκχυλισμάτων μειώθηκε στα 1-2 mL χρησιμοποιώντας περιστροφικό εξατμιστή (rotary evaporator) και ακλούθησε εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου. Η ανασύσταση έγινε με H₂O: ACN (70:30) σε 1 mL και φιλτράρισμα με PTFE 0,20 µm φίλτρα.	ροή 0,3 mL/min A: MilliQ H₂O B: ACN/ MeOH (60:40)	
------------------------------------	--	---	---	--

Πίνακας 2: Μέθοδοι προκατεργασίας δειγμάτων ψαριών από θάλασσες, λίμνες και άλλες πηγές.

Μήτρα	Αναλύτες	Προκατεργασία δείγματος	Αναλυτική τεχνική	Βιβλιογραφία
Δείγματα ψαριών από την Ερυθρά θάλασσα	Φαρμακευτικές ενώσεις, προϊόντα προσωπικής υγιεινής και φυτοφάρμακα	1 g δείγματος τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 mL, προστέθηκε σε αυτό εσωτερικό πρότυπο και 0,1 M υδατικού διαλύματος CH₃COOH:MeOH 1:1 v/v ως διαλύτης εκχύλισης. Τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων στους 25° C για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε (5000 rpm για 10 λεπτά στους 8 ° C). Ακολούθησε εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου στους 40°C. Το δείγμα εκχυλίστηκε περαιτέρω με 8 mL 0,1 M υδροξειδίου του αμμωνίου. Τα δύο υπερκείμενα ενώθηκαν και διηθήθηκαν μέσω ενός Millipore φίλτρου (μέγεθος πόρων 1,6 µm). Ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και τα εκλούσματα εξατμίστηκαν σε άζωτο στους 40°C. Τέλος, έγινε vortex και φιλτράρισμα μέσω φίλτρου Costar Spin-X 0,2µm .	LC-MS/MS Στήλη: Zorbax Eclipse plus C18 RRHD (2,1 × 100 mm, 1,8 µm) Κινητή φάση: A: H₂O- 0.1% HCOOH B: CH₃CN	[51]
Δείγματα ψαριών από την Ανταρκτική και την Γη του Πυρός (Αργεντινή)	υπερφθοριωμένες ενώσεις	2 g δείγματος εισήχθησαν σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml και προστέθηκε 10 ml μείγμα εσωτερικού προτύπου (500 pg / ml). Τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 20 λεπτά για εξισορρόπηση και στη συνέχεια ακολούθησε αλκαλική πέψη (alkaline digestion) με 10 ml NaOH 10 mM σε MeOH για 3 ώρες σε τροχιακό αναδευτήρα (orbital shaker) σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση (4000 rpm για 10 λεπτά). 3 ml του υπερκείμενου αραιώθηκαν σε 30 ml νερού και μετά εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας φασίγγια Oasis WAX 3cc. Η έκλυση πραγματοποιήθηκε με 2x2 ml MeOH (0,1% NH₄OH),	LC-MS/MS Στήλη: LiChroCART 125-2, PusopherSTAR, RP-18e (5 mm) Κινητή φάση: ροή 0,4 mL/min A: NH₄Ac 20 mM σε H₂O B: MeOH	[52]

		τα εκχυλίσματα ξηράθηκαν σε άζωτο και ανασυστάθηκαν με H ₂ O / MeOH (90:10). Τέλος, Τέλος, ένα μείγμα εσωτερικού προτύπου προστέθηκε για να ληφθεί τελική συγκέντρωση 5 mg/L στο φιαλίδιο.		
Δείγματα ψαριών από την Ακτή του Κονσεπσιόν (Χιλή)	Επιβραδυντικά φλόγας (Flame retardants)	Σε 1 g αποξηραμένου δείγματος προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο. Τα δείγματα αφέθηκαν ολόκληρη την νύχτα για εξισορρόπηση πριν γίνει η εκχύλιση υγρού υπό πίεση (PLE) με διαλύτης εκχύλισης εξάνιο:δихλωρομεθάνιο(1: 1). Μετά την εκχύλιση, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε λιπίδια και τα προκύπτοντα εκχυλίσματα διαλύθηκαν εκ νέου σε εξάνιο. Στη συνέχεια, το λίπος απομακρύνθηκε με επεξεργασία H ₂ SO ₄ . Ο καθαρισμός της οργανικής φάσης πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) με φυσίγγια (Al-N). Η έκλυση έγινε με 20 mL μίγματος εξανίου: DCM (1: 2). Τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν σε ρεύμα αζώτου και ανασυστάθηκαν στα 40 µL.	GC-MS σε κατάσταση αρνητικού χημικού ιονισμού (NCI) χρησιμοποιώντας NH ₄ + ως αέριο αντιδραστήριο Δεν αναφέρονται άλλες πληροφορίες.	[53]
Δείγματα ψαριών από την λίμνη Ματζόρε (σύνορα Ιταλίας-Ελβετίας)	υπερφθοριωμένες ενώσεις	2,5 g δείγματος ομογενοποιήθηκε με 2,5 mL NaOH, προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο και 10 mL MeOH. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε και καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας στήλες Oasis Wax SPE. Οι αναλυτές εκλούστηκαν με 1 mL υδροξειδίου του αμμωνίου 2% σε MeOH. Ακολούθησε εξάτμιση με άζωτο και ανασύσταση στην κινητή φάση.	LC-MS/MS Στήλη: RP-Phenomenex Synergi Fusion (150 x 2 mm, 4 µm) Κινητή φάση: ροή 350 µL/min A: NH ₄ Ac 20 mM σε H ₂ O B: NH ₄ Ac 2 mM σε MeOH.	[54]
Δείγματα ψαριών (σुकώπι και μύες) από ένα τοπικό Σούπερ Μαρκετ	Φαρμακευτικές ενώσεις-αντικαταθλιπτικά	Σε 0,5 g αποξηραμένου δείγματος προστέθηκαν 7 mL ACN / Milli-Q H ₂ O (95:5, v/v) και εσωτερικό πρότυπο και ακολούθησε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων (ultrasonic solid-liquid extraction). Οι εκχυλίσσεις έγιναν στους 0°C (σε λουτρό πάγου-νερού). Το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω φίλτρων 0.45-µm PA και στη συνέχεια ακολούθησε εξάτμιση έως 1 mL σε ρεύμα αζώτου (35°C) , ανασύσταση σε 200 µL of MeOH/Milli-Q H ₂ O(90:10, v/v) και φιλτράρισμα μέσω φίλτρου PP 0,22-µm.	LC-MS/MS Δύο στήλες: ACE UltraCore 2,5 SuperC18 (2,1×50 mm, 2,5 µm) και Kinetex biphenyl 100 Å core-shell (2,1×50 mm, 2,6 µm) Κινητή φάση: ροή 0.3 mL/ min A: Milli-Q H ₂ O/MeOH (95:5, v/v)- 0.1 % HCOOH B: MeOH/Milli-Q H ₂ O (95:5, v/v)- 0.1 % HCOOH	[55]

Δείγματα ψαριών(μύες) από το Hartbeespoort Dam (Αφρική)	Αναδυόμενοι ρύποι	Η προκατεργασία του δείγματος έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο QuEChERS. 28 g δειγμάτων χωρίστηκαν σε δύο ίσα τμήματα των 14 g σε δύο φυγοκεντρικούς σωλήνες των 50 mL φθοροαιθυλενοπροπυλενίου και σε κάθε σωλήνα προστέθηκε εσωτερικό πρότυπο, ακετονιτρίλιο 8 mL και 0,2 g NaCl, ανακινήθηκαν για 15 δευτερόλεπτα και έγινε vortex για άλλα 15. Τα δείγματα αφέθηκαν για 12 ώρες σε ισορροπία. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν (4000 rpm, 15 λεπτά) και η οργανική στιβάδα απομακρύνθηκε πριν από την προσθήκη άλλων 8 mL ακετονιτρίλιου, vortex και ξανά φυγοκέντρωση. Οι δύο οργανικές φάσεις ενώθηκαν σε έναν καθαρό σωλήνα φυγοκέντρωσης. Στα εκχυλίσματα προστέθηκε ένα QuEChERS kit ,έγινε vortex και φυγοκέντρωση Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα, συνδυάζοντας τα δύο εκχυλίσματα δείγματος και εξατμίστηκε σε υδατόλουτρο στους 38 ° C μέχρι ξηρού. Τα εκχυλίσματα ανασυστάθηκαν με 200 µL 10% μεθανόλης	LC-MS/MS Στήλη: 100 × 2.1 mm Kinetex 2.6 µm Biphenyl Κινητή φάση: ροή 0,3 mL/min A: Milli-Q H ₂ O -5 mM NH ₄ HCO ₂ (pH 4 HCOOH) B: 1.5% HCOOH-MeOH	[56]
Δείγματα ψαριών άγνωστης προέλευσης.	Αναδυόμενοι ρύποι	Η προκατεργασία του δείγματος έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο QuEChERS χρησιμοποιώντας το προζυγισμένο kit SampliQ® και σωλήνες εκχύλισης πολυπροπυλενίου των 50 mL. Σε 10 g ομογενοποιημένου δείγματος προστέθηκαν 10 mL ACN, ανακινήθηκε και στη συνέχεια προστέθηκαν 4 g of Na ₂ SO ₄ και 1 g NaCl. Ακολούθησε ανακίνηση και φυγοκέντρωση. Ο καθαρισμός του δείγματος έγινε με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και έγινε προσθήκη εσωτερικού προτύπου σε όλα τα δείγματα.	LC-QTOF-MS Στήλη: Zorbax Eclipse Plus C18 (50 × 2,1 mm, 1,8 µm particle size) Κινητή φάση: ροή 300 µL/min A: H ₂ O:MeOH 98:2 (v/v)- 0.1% (v/v) HCOOH - 5 mmol/L NH ₄ HCO ₂ B: MeOH-0.1% (v/v) HCOOH - 5 mmol/L NH ₄ HCO ₂	[57]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η λεκάνη απορροής του Δούναβη είναι ένα υδάτινο οικοσύστημα υψηλής οικονομικής, κοινωνικής και περιβαλλοντικής αξίας. Αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους ποταμούς στον κόσμο και διαρρέει μέσα από πολλές χώρες της Ευρώπης. Παρέχει πόσιμο νερό, γεωργία, βιομηχανία, ψάρεμα, τουρισμό, αναψυχή και παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Είναι ένας ποταμός με τον υψηλότερο αριθμό ειδών ψαριών στην Ευρώπη. Ωστόσο, αντικατοπτρίζει τις ολέθριες επιπτώσεις της ανθρώπινης δραστηριότητας που επιβαρύνει τα οικοσυστήματά του, συμπεριλαμβανομένης και της κοινότητας των ψαριών. Τα ψάρια θεωρούνται ιδανική μήτρα για την παρακολούθηση των περιβαλλοντικών ρύπων. Συμπερασματικά, ο προσδιορισμός και η αξιολόγηση των επιπέδων των αναδυσόμενων ρύπων στα ψάρια του ποταμού είναι ένας σημαντικός στόχος τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος όσο και για την ανθρώπινη υγεία.

Η ρύπανση του ποταμού από αναδυσόμενους ρύπους προκαλείται κυρίως από την είσοδο μερικώς επεξεργασμένων ή μη επεξεργασμένων λυμάτων από οικισμούς, βιομηχανικά απόβλητα, φυτοφάρμακα και άλλες χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη γεωργία. Η ανίχνευση, η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση ενός μεγάλου εύρους αναδυσόμενων ρύπων σε μήτρες όπως είναι τα ψάρια, αποτελούν πρόκληση, καθώς αφενός οι ενώσεις απαντώνται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων και αφετέρου τα περιβαλλοντικά δείγματα είναι σχετικά πολύπλοκες μήτρες για ανάλυση. Όπως παρουσιάστηκε και στο κεφάλαιο της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, με την πάροδο των χρόνων έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι ανάλυσης για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό αναδυσόμενων ρύπων σε μήτρες ψαριών. Λαμβάνοντας υπόψη τον αυξανόμενο αριθμό των ανθρωπογενών χημικών ενώσεων που ενδέχεται να εισέλθουν στο περιβάλλον και τον πιθανώς ακόμη μεγαλύτερο αριθμό παραγώγων τους (π.χ. μεταβολίτες

και προϊόντα αποικοδόμησης), κρίνεται αναγκαία η ανάλυση τέτοιων δειγμάτων ώστε μελλοντικά να θεσπιστούν κανονισμοί για τον περιορισμό των συγκεκριμένων ενώσεων στο περιβάλλον.

Εκτός από τη ρύπανση των υδάτινων οικοσυστημάτων, τα ψάρια μελετώνται και για την έκθεση των καταναλωτών σε χημικές ενώσεις. Μερικά είδη ψαριών είναι γνωστά για τη συσσώρευση σχετικά υψηλών συγκεντρώσεων διαφόρων χημικών ενώσεων (π.χ. οργανικοί αλογονωμένοι ρύποι) λόγω της θέσης τους στην τροφική αλυσίδα. Δεδομένου λοιπόν ότι αποτελούν σημαντικό μέρος της ανθρώπινης διατροφής, τα ψάρια έχουν αναγνωριστεί ως μια σημαντική διατροφική πηγή μολυσματικών ουσιών για τους καταναλωτές [58].

Παρουσιάζονται συνοπτικά οι στόχοι της συγκεκριμένης διπλωματικής διατριβής:

- ✓ Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των αναδυόμενων ρύπων σε δείγματα ψαριών του ποταμού Δούναβη με στοχευμένη και ύποπτη σάρωση, χρησιμοποιώντας προηγμένες αναλυτικές μεθόδους και εργαλεία επεξεργασίας δεδομένων. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, συλλέχθηκαν δείγματα ψαριών στο πλαίσιο της Κοινής Έρευνας για τον Δούναβη (JDS4, <http://www.danubesurvey.org/jds4/about>).
- ✓ Η εκτίμηση του κινδύνου των ενώσεων αυτών αξιολογώντας τις συγκεντρώσεις τους, συγκρίνοντας τις με βάση τις τιμές προβλεπόμενης συγκέντρωσης χωρίς επιπτώσεις (PNEC) που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων οικοτοξικολογίας NORMAN. Με αυτό τον τρόπο θα δοθεί προτεραιότητα στις ενώσεις με βάση τον κίνδυνο τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

5.1 Σύστημα υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας τεχνολογίας τετραπόλου-αναλυτή χρόνου πτήσης Q-TOF (LC-HRMS)

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη στοχευμένη και ύποπτη σάρωση είναι ένα σύστημα UHPLC/QTOF-MS (Εικόνα 12). Τα μέρη από τα οποία αποτελείται το συγκεκριμένο όργανο είναι:

- Μια συσκευή υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης UHPLC με αντλία HPG-3400 (Dionex UltiMate 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany)
- Αυτόματο δειγματολήπτη
- Ράφι για τους διαλύτες της κινητής φάσης
- Αντλία δυο εμβόλων και δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης δυο διαλυτών
- Φούρνος για τη στήλη που συνδέεται με τον αναλυτή μαζών Q-TOF-MS (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Germany)
- Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής και λογισμικό Bruker Data Analysis 4.3.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό είναι Acclaim RSLC C18 διαστάσεων 2.1×100 mm, $2.2 \mu\text{m}$ από τη Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany) και μια προστήλη με το ίδιο πληρωτικό υλικό, ACQUITY UPLC BEH C18 $1.7 \mu\text{m}$ (VanGuard Pre-Column, Waters Ireland), θερμοστατούμενη στους 30°C .



Εικόνα 12: Σύστημα υγροχρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας τετραπόλου-αναλυτή χρόνου πτήσης (Q-ToF) [59].

5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Για την υλοποίηση του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συσκευές:

- ✓ Συσκευή διήθησης διαλυτών κινητής φάσης και δειγμάτων (Millipore, XX, 15.4705)
- ✓ Συσκευή παραγωγής υπερκάθολου νερού ειδικής αντίστασης 18.2 MΩ/cm (Millipore Direct-Q, UV)
- ✓ Διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Sartorius Basic)
- ✓ Συσκευή Ανάδευσης (Vortex mixer-Stuart)
- ✓ Λουτρό υπερήχων (Ultrasons H-D, Selecta, Abrera, Barcelona, Spain)
- ✓ Φυγόκεντρος (Rotofix 32, Hettich, Tuttlingen, Germany)
- ✓ Θερμαινόμενη πλάκα με υποδοχείς δοκιμαστικών σωλήνων για εξάτμιση (Bloblock, Scientific, BAIN A, SEC 86207)
- ✓ Γεννήτρια αζώτου για εξάτμιση δειγμάτων (Alliance)

Επίσης:

- ✓ Φίλτρα για τη διήθηση κινητής φάσης, RC pore size 0.22 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- ✓ Πλαστικές πιπέτες Pasteur
- ✓ Φυγοκεντρικοί σωλήνες των 15 mL (SARSTEDT AG & Co, Germany)
- ✓ Ποτήρια ζέσης των 50 mL
- ✓ Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 mL
- ✓ Δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL
- ✓ Vials των 1.5 mL (GRACEALLTECH) με προτρυπημένα καπάκια
- ✓ Inserts των 250 μL (Macherey-Nagel, Germany)
- ✓ Πλαστικές σύριγγες με έμβολο
- ✓ Πλαστικά tips για τις πιπέτες

Τέλος χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL (Gilson) 10-100 μL , 100-1000 μL (Transferpette) για τον εμβολιασμό των δειγμάτων.

5.3 Αντιδραστήρια-Διαλύτες

- ✓ Το νερό (ultrapure H_2O) που χρησιμοποιήθηκε ήταν από συσκευή παραγωγής υπερκάθολου νερού ειδικής αντίστασης 18.2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$ και το φορμικό αμμώνιο (ammonium formate) αγοράστηκε από τη Sigma Aldrich (Fluka, Germany).
- ✓ Το φορμικό οξύ (formic acid, FA) HPLC 98% βαθμός καθαρότητας, αγοράστηκε από την Sigma Aldrich (Fluka, Germany)
- ✓ Το ακετονιτρίλιο (acetonitrile, ACN) και η μεθανόλη (methanol, MeOH) ήταν καθαρότητας HPLC και αγοράστηκαν από τη Merck

- ✓ Το εξάνιο ήταν καθαρότητας for analysis και αγοράστηκε από την CARLO ERBA Reagents S.A.S (France)
- ✓ Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση LC-QTOF-MS είναι υψηλού βαθμού καθαρότητας (LC-MS. Το αιθανικό αμμώνιο (ammonium acetate) αγοράστηκε από τη Fluka (Buchs, Switzerland).

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν λόγω της πιθανούς επιβλαβούς δράσης τους στην υγεία διαχειρίστηκαν με κατάλληλο τρόπο, ώστε η έκθεση σε αυτά τα χημικά να είναι περιορισμένη. Τα πτητικά αντιδραστήρια και οι διαλύτες διαχειρίστηκαν σε απαγωγούς και τηρήθηκαν όλοι οι κανόνες ασφαλείας που προβλέπονται για τα χημικά εργαστήρια.

5.4 Πρότυπες ουσίες-Πρότυπα Διαλύματα

Για τον προσδιορισμό κάθε χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες ουσίες και παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα και μείγματα αυτών με ζύγιση κατάλληλης ποσότητας στερεών προτύπων και αραίωσης με μεθανόλη. Τα διαλύματα προτύπων που χρησιμοποιήθηκαν είναι μεθανολικά. Όλα τα διαλύματα φυλάσσονταν στην κατάψυξη στους -20 ° C και διαχειρίζονταν με κατάλληλο τρόπο σύμφωνα με τις οδηγίες του προμηθευτή. Οι αναλύτες που προσδιορίστηκαν ανήκουν στις κατηγορίες φαρμακευτικών ενώσεων, φυτοφαρμάκων, βιομηχανικών χημικών και διαφόρων χημικών. Όλες οι πρότυπες ουσίες παραλήφθηκαν από από τη Sigma-Aldrich.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα δευτεριωμένοι αναλύτες για να ελεγχθεί η επίδοση του οργάνου (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Κατάλογος των ενώσεων που περιέχονται στο εσωτερικό πρότυπο μείγμα.

Χημική ουσία	Αριθμός CAS	Std. InChIKey
5-Methyl-1H-benzotriazole-d6	1246820-65-4	LRUDIIUSNGCQKF-RLTMCGQMSA-N
Amisulpride-d5	71675-85-9	NTJOBXMMWNYJFB-SGEUAGPISA-N
Atenolol-d7	1202864-50-3	METKIMKYRPQLGS-SVMCCORHSA-N
Atorvastatin-d5	222412-82-0	XUKUURHRXDUEBC-BDXWSXJNSA-N
Atrazine-d5	163165-75-1	MXWJVTOOROXGIU-SGEUAGPISA-N
Benzophenone-d10	22583-75-1	RWCCWEUUXYIKHB-LHNTUAQVSA-N
Benzoyllecgonine-d3	115732-68-8	GVGYEFKIHJTNQZ-GZBWLTEMSA-N
BPA-d16	96210-87-6	IISBACLAFLKSPIT-MAJJRYNQSA-N
Carbamazepine-d8	1538624-35-9	FFGPTBGBLSHEPO-PKSNNKEVSA-N
Cetirizine-d8	774596-22-4	ZKLPARSLTMPFCP-DTSBCCDKSA-N

Ciprofloxacin-d8	1130050-35-9	MYSWGUAQZAJ-SOK-SQUIKQQTSA-N
Citalopram-d6	1246819-94-2	WSEQXVZVJXJVFP-WFGJKAKNSA-N
Clozapine-d8	1185053-50-2	QZUDBNBUXVUHMW-JNJBWJDISA-N
Decoquinat-d5	1453100-61-2	JHAYEQICABJSTP-ZTIZGVCASA-N
Diazepam-d5	65854-76-4	AAOVKJBEBIDNHE-VIQUYUKPQSA-N
Diuron-d6	1007536-67-5	XMTQQYYKAHVGBJ-WFGJKAKNSA-N
Fenbendazole-d3	1228182-47-5	HDDSHPAODJUKPD-FIBGUPNXSA-N
flunixin-d3	1015856-60-6	NOOCSNJCXJYGPE-FIBGUPNXSA-N
Iohexol-d5	66108-95-0	NTHXOOBQLCIOLC-OPCJXEHASA-N
Ketamine-d4	1246815-97-3	HPQHIBKAPINDEN-KDWOUJHVSAN
Lamotrigine- ¹³ C ₃ ,d ₃	1246815-13-3	PYZRQGGJRPPTADH-MKOZQUTQSA-N
Meloxicam-d3	942047-63-4	ZRVUJXDFFKFLMG-BMSJAHLVSA-N
Metformin-d6	1185166-01-1	XZWYZXLIPXDOLR-WFGJKAKNSA-N
Metronidazole-d4	1261392-47-5	VAOCPAMSLUNLGC-RRVWJQJTSAN
Oxazepam-d5	65854-78-6	ADIMAYPTOBDMTL-RALIUCGRSA-N
Ranitidine-d6	1185238-09-8	VMXUWOKSQNHOCARUESZMOGSA-N
Ritonavir-d6	155213-67-5	NCDCNXCXCDXHOMX-GMBJSHJASAN
Saccharin- ¹³ C ₆	1286479-01-3	CVHZOJJKTDOEJC-IDEBNGHGSAN
Sucralose-d6	1459161-55-7	BAQAVOSOZGMPRM-UQRHTAPNSAN
Sulfadiazine-d4	1020719-78-1	SEEPANYCNGTZFQ-QFFDRWTDSAN
Sulfadimethoxine-d4	1020719-80-5	ZZORFUFYDOWNEF-LNFUJOGGGSAN
Sulfadimidine-d4	1020719-82-7	ASWVTGNCAZCNR-LNFUJOGGGSAN
Sulfamethazine-d4	1020719-82-7	ASWVTGNCAZCNR-LNFUJOGGGSAN
Tramadol-d6	1109217-84-6	TVYLLZQTGLZFBW-DTPCVOBTSAN
Valsartan- ¹³ C ₅ , ¹⁵ N	-	ACWBQPMHGXGDFX-UDHSYOPXSAN
Venlafaxin-d6	1020720-02-8	FETCANMPQJPEEP-WFGJKAKNSAN

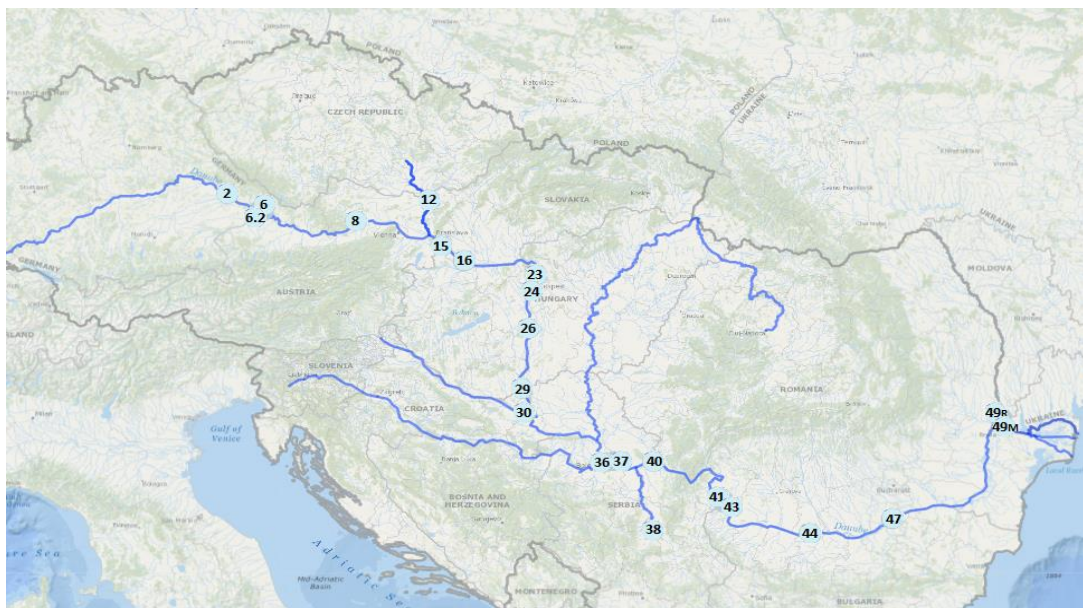
5.5 Δείγματα

Τα παρακάτω δείγματα συλλέχτηκαν από διάφορα σημεία που διατρέχει ο ποταμός Δούναβης ή κάποιος παραπόταμός του. Στον Πίνακα 4 αναφέρονται πληροφορίες για το κάθε δείγμα: ο κωδικός του, η χώρα και η περιοχή προέλευσης, ο ποταμός και η ημερομηνία συλλογής. Στην Εικόνα 13 απεικονίζονται τα δείγματα στον χάρτη. Οι αριθμοί απεικονίζουν τον κωδικό κάθε δείγματος.

Πίνακας 4: Πληροφορίες δειγμάτων: Όνομα, Χώρα/Περιοχή προέλευσης, Ημερομηνία συλλογής δείγματος.

Δείγμα	Χώρα	Περιοχή	Ποταμός	Ημερομηνία συλλογής ΗΗ.ΜΜ.ΥΥΥΥ
JDS4-2-Y-FC	Γερμανία	Oberhausen	Δούναβης	02.07.2019
JDS4-6-Y-FC	Γερμανία	Jochenstein	Δούναβης	09.07.2019
JDS4-6.2-Y-FC	Γερμανία	Jochenstein	Δούναβης	16.07.2019
JDS4-8-Y-FC	Αυστρία	Βιέννη	Δούναβης	23.07.2019
JDS4-12-Y-FC	Τσεχία	Breclav	Δούναβης	02.07.2019
JDS4-15-Y-FC	Σλοβακία	Μπρατισλάβα	Δούναβης	02.07.2019

JDS4-16-Y-FC	Σλοβακία	Vel'ky Meder	Δούναβης	04.07.2019
JDS4-23-Y-FC	Ουγγαρία	Βουδαπέστη	Δούναβης	15.07.2019
JDS4-24-Y-FC	Ουγγαρία	Βουδαπέστη	Δούναβης	17.07.2019
JDS4-26-Y-FC	Ουγγαρία	Dunafoldvar	Δούναβης	17.07.2019
JDS4-29-R-FC	Κροατία	Batina	Δούναβης	09.07.2019
JDS4-30-M-FC	Ουγγαρία	Mohacs	Ντράβα	10.07.2019
JDS4-36-R-FC	Σερβία	Belgrade	Σάβα	08.07.2019
JDS4-37-L-FC	Σερβία	Pancevo	Δούναβης	07.07.2019
JDS4-38-R-FC	Σερβία	Krusevac	Μεγάλος Μοράβας	11.07.2019
JDS4-40-L-FC	Σερβία	Pozarevac	Δούναβης	08.07.2019
JDS4-41-R-FC	Σερβία	Kladovo	Δούναβης	03.07.2019
JDS4-43-L-FC	Ρουμανία- Βουλγαρία	Vidin-Calafat bridge	Δούναβης	11.07.2019
JDS4-44-M-FC	Βουλγαρία	Pleven	Iskar	27.08.2019
JDS4-47-M-FC	Βουλγαρία	Ruse	Δούναβης	13.07.2019
JDS4-49-R-FC	Μολδαβία	Cahul	Prut	17.07.2019
JDS4-49-R-FC	Ρουμανία	Galati	Prut	17.07.2019



Εικόνα 13: Απεικόνιση των δειγμάτων στον χάρτη. Οι αριθμοί απεικονίζουν τον κωδικό του δείγματος.

5.5.1 Προετοιμασία δειγμάτων για ανάλυση LC-QTOF-MS

Ζυγίζονται 0,2 γραμμάρια αποξηραμένου δείγματος σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 mL και γίνεται προσθήκη εσωτερικού προτύπου τελικής συγκέντρωσης 50 ppb. Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας πλαστική πιπέτα Pasteur γίνεται προσθήκη 2 mL Milli-Q-water που περιέχει 0,1% φορμικό οξύ (formic acid) (v/v), 0,1% EDTA (w/v), 2 mL μεθανόλη, και 2 mL ακετονιτριλίου διαδοχικά. Γίνεται ανάδευση των δειγμάτων χειροκίνητα για μισό λεπτό και με συσκευή vortex για 1 λεπτό και έλεγχος αν έχει διαβραχεί όλη η ποσότητα του δείγματος. Στη συνέχεια, οι φυγοκεντρικοί σωλήνες τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων στους 60°C για 20 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά σε 4000 rpm και τοποθετούνται στην κατάψυξη για να καθιζάνουν τα λιπίδια και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες στους -20 ° C για 12 ώρες.

Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά σε 4000 rpm και τα υπερκείμενα μεταφέρονται σε νέους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης. Σε κάθε δείγμα με πιπέτα Pasteur προστίθενται 5 mL εξανίου καθαρότητας for analysis, γίνεται ανάδευση χειροκίνητα για μισό λεπτό και με συσκευή vortex για 1 λεπτό, φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 4000 rpm και υγρό-υγρό εκχύλιση για την απομάκρυνση του λίπους. Το εκχύλισμα κάθε δείγματος μεταγγίζεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και πραγματοποιείται εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και θερμοκρασία 45°C. Γίνεται ανασύσταση σε 0,2 mL μεθανόλης / Milli-Q water, 50:50 (v/v), διήθηση μέσω φίλτρου RC 0,22 μm και τοποθέτηση σε vial με insert για ανάλυση LC-HRMS.

Συνολικά:

- ✓ 22 δείγματα ψαριών
- ✓ Spike δείγμα ψαριών 200 ppb
- ✓ Λευκό δείγμα (Procedural blank, Milli-Q)
- ✓ Πρότυπο δείγμα 50 ppb

- ✓ Πρότυπο δείγμα 150 ppb
- ✓ Πρότυπο δείγμα 200 ppb

5.6 Τεχνικές σάρωσης

Υπάρχουν τρεις τρόποι ανίχνευσης των αναλυτών στα δείγματα, η σάρωση στοχευμένων ενώσεων (Target screening), η σάρωση «ύποπτων» ενώσεων (Suspect Screening) και η μη στοχευμένη ανάλυση (Non-target analysis). Για την ταυτοποίηση των ενώσεων που περιέχονται στα δείγματα ψαριών ακολουθήθηκαν δύο τεχνικές σάρωσης στη συγκεκριμένη εργασία, σάρωση στοχευμένων ενώσεων και σάρωση «ύποπτων» ενώσεων.

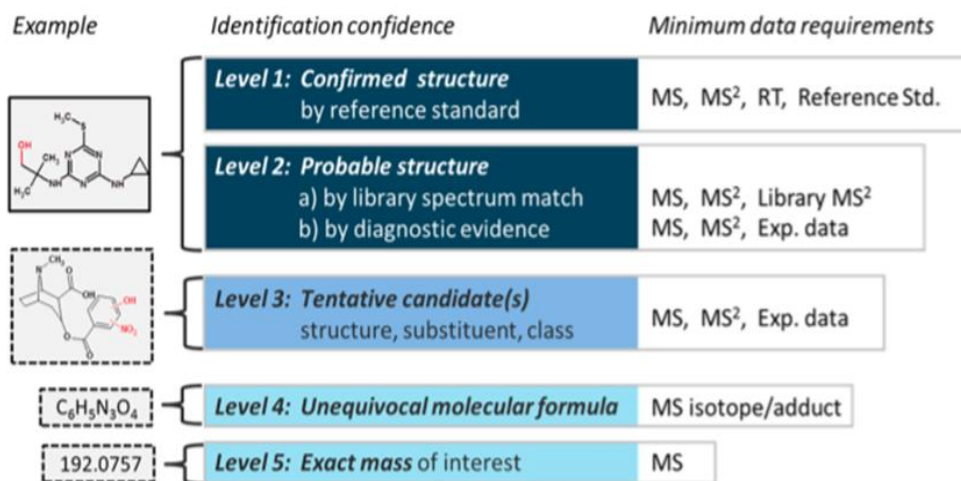
Κατά τη στοχευμένη σάρωση υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα αναφοράς για κάθε ένωση ώστε να καθοριστεί η συγκέντρωση της στο δείγμα, να γίνει ταύτιση του χρόνου ανάσχεσης και του φάσματος MS/MS. Για τους ποσοτικούς προσδιορισμούς γίνεται χρήση μιας πλήρους καμπύλης αναφοράς, αλλιώς τα αποτελέσματα είναι ημιποσοτικά (ένα σημείο βαθμονόμησης). Η σάρωση στοχευμένων ενώσεων έγινε με βάση μια λίστα στοχευμένων ενώσεων (target list) η οποία αποτελείται από 2316 ενώσεις αναδυόμενων ρύπων που έχουν εντοπιστεί σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η λίστα περιλαμβάνει αναδυόμενους ρύπους από πολλές βασικές κατηγορίες για τις οποίες υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα.

Για την εύρεση του θεωρητικού m/z της κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Isotope Pattern. Στην συνέχεια, αφού έγινε ανάλυση των δειγμάτων με λειτουργία AutoMS, βρέθηκε ο χρόνος ανάσχεσης της κάθε ένωσης με τη βοήθεια δύο λογισμικών: TASQ (Bruker Daltonik GmbH) και Data Analysis 4.4 (Bruker Daltonik GmbH). Έγινε σύγκριση του χρόνου ανάσχεσης των αντίστοιχων προτύπων και υπολογισμός του εμβαδού των κορυφών που αντιστοιχεί σε κάθε ένωση. Τέλος, τα φάσματα MS/MS των δειγμάτων συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα MS/MS φάσματα των πρότυπων ουσιών.

Κατά την ύποπτη σάρωση γίνεται αναζήτηση αναλυτών που πιθανότατα υπάρχουν στο δείγμα άρα οι δομές τους είναι γνωστές αλλά χωρίς υπάρχοντα πρότυπα. Με βάση το μοριακό τύπο μιας ύποπτης ένωσης γίνεται υπολογισμός της ακριβούς μάζας και το θεωρητικό ισοτοπικό προφίλ τα οποία αναζητούνται στα δεδομένα. Συστατικά που αναμένονται να υπάρχουν στα δείγματα μπορούν να βρεθούν με τη χρήση της ακριβούς μάζας του μοριακού ιόντος που προκύπτει από τον μοριακό τύπο. [34] [60]

Επίπεδα εμπιστοσύνης:

Στην Εικόνα 14 απεικονίζονται σχηματικά τα επίπεδα εμπιστοσύνης για την στοχευμένη και ύποπτη σάρωση.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση των επιπέδων εμπιστοσύνης όπως προτάθηκε από Schymanski et al. [61].

Επίπεδο 1 : Η επιβεβαίωση της δομής αντιπροσωπεύει την ιδανική περίπτωση όπου η προτεινόμενη δομή επιβεβαιώνεται μέσω κατάλληλων μετρήσεων ενός προτύπου αναφοράς μέσω MS, MS/MS και αντιστοίχισης των χρόνων κατακράτησης.

Επίπεδο 2: Η πιθανή δομή υποδηλώνει ότι είναι δυνατό να προταθεί μια ακριβής δομή χρησιμοποιώντας διαφορετικά στοιχεία. Διακρίνεται σε επίπεδο 2α και 2β. Για το επίπεδο 2α η επιβεβαίωση γίνεται μέσω των βιβλιοθηκών μαζών.

Χρειάζεται προσοχή όταν γίνεται η σύγκριση των φασμάτων που έχουν καταγραφεί με διαφορετικές παραμέτρους (ανάλυση, ενέργεια συγκρούσεως, ιοντισμός, επίπεδο MS) για να εξασφαλιστεί η εγκυρότητα της συσχέτισης, ενώ παράλληλα τα κριτήρια της απόφασης πρέπει να παρουσιάζονται πλήρως. Για το επίπεδο 2β παρουσιάζονται κάποια διαγνωστικά τα οποία αντιπροσωπεύουν την περίπτωση ότι δεν υπάρχει κάποια άλλη δομή που να ταιριάζει με την πειραματική πληροφορία αλλά δεν υπάρχει κάποιο πρότυπο ή κάποια πληροφορία από τη βιβλιογραφία που να μπορεί να το επιβεβαιώσει. Τα στοιχεία μπορεί να περιλαμβάνουν κάποια διαγνωστικά θραύσματα με MS-MS ή/και την συμπεριφορά ιοντισμού όπως και πληροφορίες για τη μητρική ένωση και το γενικότερο πειραματικό πλαίσιο.

Επίπεδο 3: Υπάρχουν κάποιες υποψήφιες δομές οι οποίες όμως περιγράφουν μια γκρι ζώνη όπου υπάρχουν στοιχεία για πιθανές δομές αλλά όχι σαφείς πληροφορίες για μια συγκεκριμένη δομή (π.χ ισομέρια θέσης). Ωστόσο υπάρχουν και βάσεις δεδομένων όπου προτείνονται τα πιθανά θραύσματα (insilico fragmentation) από τη δομή της ουσίας και άλλες πληροφορίες όπως είναι η συμπεριφορά στη συγκράτηση.

Επίπεδο 4: Σε αυτό το επίπεδο εμπιστοσύνης δεν υπάρχει κάποια προτεινόμενη ή πιθανή δομή παρά μόνο ο χημικός τύπος. Η πληροφορία αυτή είναι σημαντική και πρέπει να παρουσιάζεται γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές έρευνες.

Επίπεδο 5: Σε αυτό το επίπεδο εμπιστοσύνης η πληροφορία είναι η ακριβής μάζα (m/z). Μετράται η ακριβής μάζα σε ένα δείγμα και παρ'όλο που μπορεί να αποτελεί αντικείμενο για περαιτέρω μελέτη, οι πληροφορίες είναι ελλιπείς και δεν μπορεί να εξαχθεί ούτε ο χημικός τύπος του μορίου. Στο επίπεδο 5 δεν μπορούν να υπάρξουν ξεκάθαρες πληροφορίες ούτε για τη δομή ούτε για τον χημικό τύπο. Όμως μπορεί να αποθηκευτεί ένα φάσμα MS/MS για το επίπεδο 5 ως άγνωστο. Επίσης μπορεί να γίνουν μετρήσεις και σε λευκό δείγμα για να

επιβεβαιωθεί ότι το περιεχόμενο δεν προέρχεται από την προετοιμασία του δείγματος. [62]

Κατά την ανάλυση με ανιχνευτή Q-TOF-MS, ο τρόπος λειτουργίας του οργάνου για την απόκτηση των αναλυτικών πληροφοριών, καλείται broadband collision-induced dissociation (bbCID, data-independent) ενώ το εύρος m/z είναι 50-1000 Da με ρυθμό σάρωσης 2 Hz. Αυτός ο τρόπος λειτουργίας (Bruker bbCID), παρέχει ταυτόχρονα MS και MS/MS φάσματα καθώς το όργανο λειτουργεί σε δυο διαφορετικά επίπεδα ενέργειας που λαμβάνουν χώρα συγκρούσεις. Πιο συγκεκριμένα στο χαμηλό επίπεδο (4 eV), δημιουργούνται τα MS φάσματα και στο υψηλό επίπεδο (25 eV), πραγματοποιείται θραυσματοποίηση με αποτέλεσμα να παρέχεται MS/MS φάσμα με περισσότερες πληροφορίες.

Μετά την απόκτηση των δεδομένων από το όργανο, τα αποτελέσματα επεξεργάζονται με κατάλληλο τρόπο ώστε να εξαχθούν οι απαραίτητες πληροφορίες. Σε όλα τα αρχεία (bbCID και AutoMS) πραγματοποιείται βαθμονόμηση με τη χρήση του λογισμικού Bruker DataAnalysis 4.4. Έπειτα, γίνεται εξαγωγή ως αρχεία bbCID ή AutoMS ανάλογα με τα δεδομένα από το όργανο. Ο διαχωρισμός αυτός είναι απαραίτητος για να πραγματοποιηθεί η ύποπτη σάρωση με τη χρήση της πλατφόρμας της Norman που καλείται Digital Sample Freezing Platform (DSFP). Η πλατφόρμα αυτή χρησιμοποιείται για αρχειοθέτηση, επεξεργασία, ανάλυση δεδομένων και ανάκτηση πληροφοριών από ένα μεγάλο όγκο πληροφοριών φασμάτων μάζας που προέρχονται από την κοινότητα των επιστημόνων που ασχολούνται με το περιβάλλον.

Στα αρχεία που έχουν εξαχθεί ως bbCID, γίνεται διαχωρισμός στα δυο ενεργειακά επίπεδα 4 eV και 25 eV με τη χρήση του DSFP τόσο στα δεδομένα από τον θετικό ιοντισμό όσο και σε αυτά από τον αρνητικό. Στη συνέχεια τα δεδομένα αυτά, τα data-dependent αρχεία και η λίστα με τις ύποπτες ουσίες χρησιμοποιούνται στην πλατφόρμα DSFP, συμπληρώνοντας τα κατάλληλα πεδία ώστε να σαρωθούν όλα τα δείγματα ψαριών και να διαπιστωθεί ποιές από αυτές τις ουσίες απαντώνται στα δείγματα. Για την ταυτοποίηση των ενώσεων η

πλατφόρμα λαμβάνει υπόψη την ακρίβεια της μάζας, το χρόνο ανάλυσης στο χρωματογράφημα την ταύτιση του ισοτοπικού προφίλ (isotopic fit) και την παρουσία αντίστοιχων θραυσμάτων [63].

5.7 Εκτίμηση κινδύνου

Η εκτίμηση του κινδύνου των ανιχνευόμενων ενώσεων έγινε με βάση την μεθοδολογία που αναπτύχθηκε από το δίκτυο NORMAN. Το δίκτυο NORMAN (www.norman-network.com) είναι ένα δίκτυο εργαστηρίων αναφοράς, ερευνητικών κέντρων και συναφών οργανισμών για την παρακολούθηση των αναδυόμενων ρύπων στο περιβάλλον. Η μέθοδος βασίζεται στην σύγκριση των μετρούμενων συγκεντρώσεων των ανιχνευόμενων ουσιών με την Προβλεπόμενη Συγκέντρωση Χωρίς Επίδραση (Predicted No Effect Concentration, PNEC), που αντιπροσωπεύουν τις οικοτοξικολογικές οριακές τιμές τους. Σε περιπτώσεις που δεν υπήρχαν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα σχετικά με την τοξικότητα των ανιχνευόμενων ουσιών, τα προβλεπόμενα PNEC (P-PNECs) προήλθαν από μοντέλα QSTR. Όλες οι τιμές PNEC που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη (πειραματικά PNEC για 100 αναδυόμενους ρύπους και προβλεπόμενα P-PNEC για 180 αναδυόμενους ρύπους) εξήχθησαν από τη βάση δεδομένων NORMAN ECOTOX (<https://www.norman-network.com/nds/ecotox/>). Για την εκτίμηση του κινδύνου επιλέχτηκε η χαμηλότερη τιμή PNEC με την σειρά : α) τιμές EQS (Environmental quality standard) β) πειραματικές τιμές PNEC από εργαστήρια αναφοράς και γ) in silico προβλεπόμενα PNEC

Η αξιολόγηση έγινε με βάση τρεις δείκτες :

- Την συχνότητα εμφάνισης (Frequency of Appearance, FoA)
- Την συχνότητα υπέρβασης της τιμής PNEC (Frequency of PNEC Exceedance, FoE)
- Την έκταση της υπέρβασης της τιμής PNEC (Extent of PNEC Exceedance EoE)

Ο πρώτος δείκτης εκφράζει πόσες φορές η ένωση ανιχνεύθηκε πάνω από το όριο ανίχνευσης (LOD). Ο δεύτερος δείκτης εξετάζει τη συχνότητα των υπερβάσεων της ένωσης πάνω από ένα ορισμένο όριο και για τον υπολογισμό του συγκρίνεται σε κάθε δείγμα (MECsite) η μέγιστη παρατηρούμενη συγκέντρωση της ένωσης με την χαμηλότερη τιμή PNEC. Στη συνέχεια, ο αριθμός των δειγμάτων όπου ξεπεράστηκε το όριο διαιρέθηκε με τον συνολικό αριθμό δειγμάτων όπου ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη ένωση. Ο τρίτος δείκτης κατατάσσει τις ενώσεις ανάλογα με την έκταση των αναμενόμενων επιδράσεων και ορίζεται ως το 95ο εκατοστημόριο όλων των τιμών MECsite ανά ένωση (MEC95) διαιρεμένο με την τιμή PNEC.

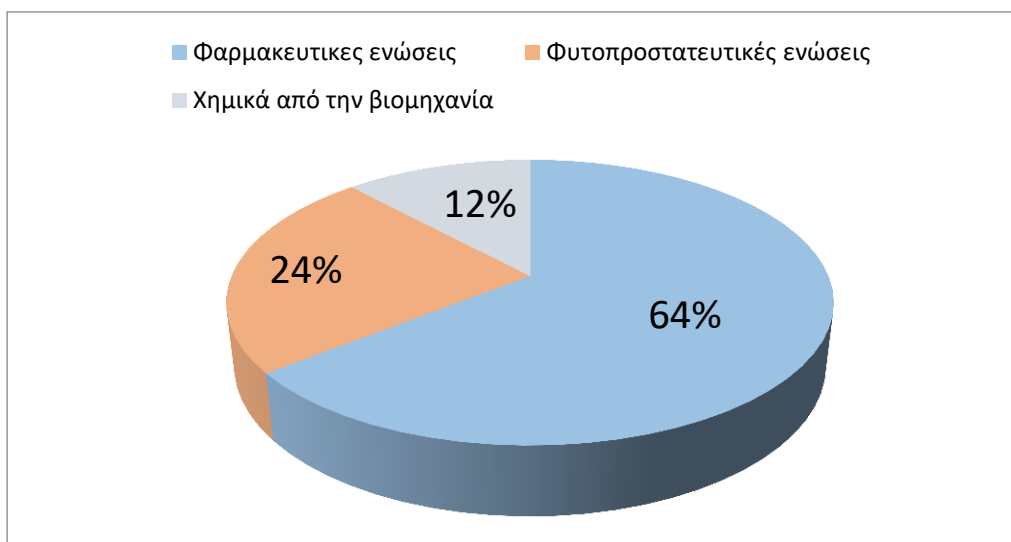
Το αποτέλεσμα κινδύνου που προέκυψε στη συνέχεια κλιμακώθηκε από 0 έως 1. Η βαθμολογία κινδύνου (Risk score) είναι ο γραμμικός συνδυασμός των δεικτών κλιμάκωσης από 0 έως 1. Στο τέλος, αναφέρονται μόνο οι ενώσεις με τιμή $> 1,01$ ενώ για τις υπόλοιπες ενώσεις, ο κίνδυνος θεωρείται αμελητέος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Στοχευμένη σάρωση

Στους πίνακες 5,6,7 παρουσιάζεται το σύνολο των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα 22 δείγματα ψαριών με στοχευμένη σάρωση αναλόγως με την κατηγορία που ανήκει η κάθε ένωση καθώς και τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της (LOQ, limit of quantification και LOD, limit of detection αντίστοιχα). Οι ενώσεις χωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες αναλόγως με την χρήση τους: Φαρμακευτικές ενώσεις, φυτοπροστατευτικές ενώσεις και χημικά που προέρχονται από την βιομηχανία. Στην κατηγορία των φαρμακευτικών ενώσεων ανιχνεύτηκαν ενώσεις από πολλές κατηγορίες όπως: των αντιυπερτασικών, των αντιεπιληπτικών, των αναισθητικών, των αναλγητικών, των αντιλιπιδαιμικών, των μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών, των αντιβιοτικών, των αντιψυχωσικών, των αντικαταθλιπτικών, των στεροειδών αλλά και κατηγορίες ενώσεων που ανήκουν στα προϊόντα προσωπικής φροντίδας. Από τις 84 ενώσεις συνολικά, οι 54 ανήκουν στις φαρμακευτικές, οι 20 στις φυτοπροστατευτικές και οι 10 στα βιομηχανικά χημικά (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Κατηγορίες ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα.

Πίνακας 5: Φαρμακευτικές ενώσεις: Κατηγορία ταξινόμησης, όνομα, όριο ποσοτικοποίησης και όριο ανίχνευσης για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με στοχευμένη σάρωση στα δείγματα.

Κατηγορία	Όνομα ένωσης	LOQ_Biota (µg/kg)	LOD_Biota (µg/kg)
Αντιυπερτασικά	Ajmaline	1,0	0,31
	Ethambutol	1,0	0,31
	Lisinopril	1,4	0,44
	Lovastatin	1,3	0,39
	Rilmenidine	1,5	0,45
	Sotalol	0,66	0,20
	Trapidil	4,5	1,4
Στεροειδή	Androsterone-19-nor	4,0	1,2
	Galaxolidone	1,0	0,31
	Methenolone	4,0	1,2
	Norethandrolone met.	8,5	2,6
	Norethisterone acetate	6,5	2,0
	Testosterone benzoate	7,5	2,3
Αντιψυχωσικά	Mazindol	1,2	0,36
	Normirtazapine	1,4	0,44
	Sulpiride	1,9	0,58
	Temazepam	1,2	0,35
	Midazolam	1,0	0,31
Αναλγητικά	Antipyrine-4-Acetamido	0,87	0,26
	Antipyrine-4-Formylamino	0,89	0,27
	Paracetamol	1,4	0,44
	Salicylic acid	1,0	0,29
	Tramadol-Nor (Tramadol-N-desmethyl)	0,81	0,24
Μη Στεροειδή Αντιφλεγμονώδη	Azapropazone	0,30	0,09
	Ibuprofen	0,90	0,27
	N-Acetyl mesalazine	1,0	0,31
	Niflumic acid	0,72	0,22
Αντιεπιληπτικά	Levetiracetam	2,0	0,61
	Pregabalin	1,1	0,33

	Vigabatrin	2,5	0,74
Αναισθητικά	Fentanyl	1,2	0,35
	Norfentanyl	0,58	0,17
	Tolycaine	1,4	0,44
Αντιβιοτικά	Lincomycin	1,0	0,30
	Sulfamethoxazole	1,1	0,34
Συμπαθομιμητικά	Ephedrine	1,0	0,29
	Methylephedrine	1,3	0,39
Αντιλιπιδαιμικά	Simvastatin	1,0	0,30
Φίλτρα UV	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	1,2	0,35
Μεταβολίτες	Norbuprenorphine	0,81	0,24
Διάφορα	Acamprosate	2,5	0,74
	Aceclidine	0,80	0,24
	Allopurinol	1,4	0,44
	Apophedrin (Phenylethanolamine)	1,3	0,38
	Benserazide	3,5	1,1
	Carbachol	5,5	1,7
	Chloropyramine	1,4	0,44
	Cytarabin	0,81	0,24
	Epinephrine	2,9	0,87
	Gabapentin-lactam	1,6	0,48
	Guaifenesin	1,5	0,45
	Reproterol	1,0	0,31
	Rivastigmine	1,0	0,30
	Tropisetron	0,89	0,27

Πίνακας 6: Φυτοπροστατευτικές ενώσεις: Κατηγορία ταξινόμησης, όνομα, όριο ποσοτικοποίησης και όριο ανίχνευσης για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με στοχευμένη σάρωση στα δείγματα.

Κατηγορία	Όνομα ένωσης	LOQ_Biota (μg/kg)	LOD_Biota (μg/kg)
Φυτοπροστατευτικά προϊόντα	Alachlor-OXA	6,5	2,0
	Barban	1,4	0,44
	Carbofuran-3-hydroxy	0,70	0,21
	Chlordimeform	1,4	0,44
	Clothiandin	1,2	0,35
	DEET (Diethyltoluamide)	1,5	0,45
	Dimethachlor-OXA	1,0	0,31
	Imazamox	1,4	0,44
	Imazapyr	1,0	0,31
	Jasmolin I	1,6	0,48
	Metalaxyl	0,87	0,26
	Methfuroxam	1,0	0,29
	Methoprene	3,4	1,0
	Metolachlor met (Metolachlor OA)	1,2	0,38
	N-2,4-Dimethylphenylformamide	1,0	0,31
	Picaridin (Icaridin)	1,2	0,36
	Propoxur	0,89	0,27
	Pyrethrin I	1,6	0,48
	Spiromesifen	1,4	0,44
	Trimethacarb (2.3.5-);Trimethacarb (3.4.5-)	1,4	0,44

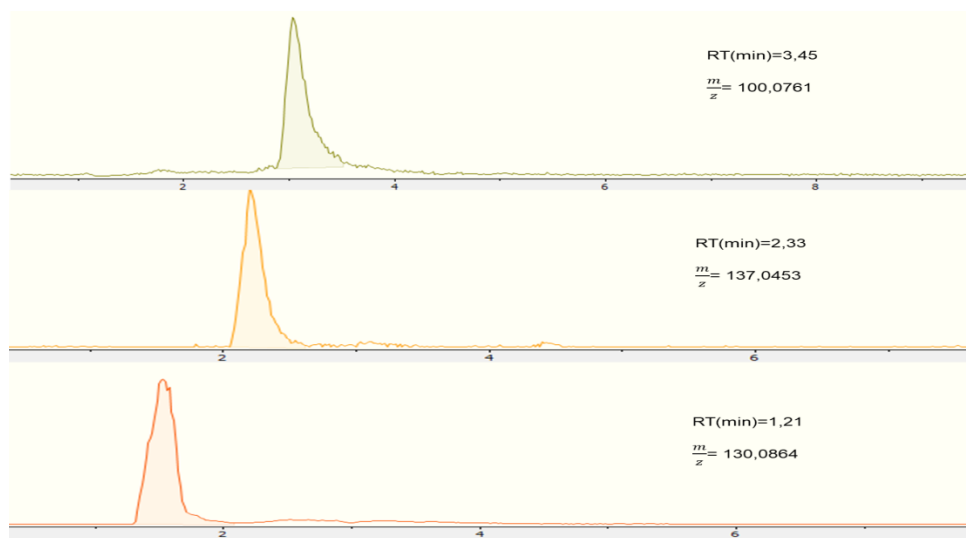
Πίνακας 7: Ενώσεις που προέρχονται από την βιομηχανία: Κατηγορία ταξινόμησης, όνομα, όριο ποσοτικοποίησης και όριο ανίχνευσης για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με στοχευμένη σάρωση στα δείγματα.

Κατηγορία	Όνομα ένωσης	LOQ_Biota (µg/kg)	LOD_Biota (µg/kg)
Υπερφθοριωμένες ενώσεις	PFDeA	0,72	0,22
	PFOS	0,72	0,22
	PFUnA	0,75	0,23
Επιφανειοδραστικά	Benzododecinium (Benzyl-dimethyl-dodecylammonium)	1,0	0,31
	Didecyldimethylammonium (DADMAC (C10:C10))	0,89	0,27
Φαινόλες	4-tert-Octylphenol (4-t-OP)	0,92	0,28
Φθαλικοί εστέρες	Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP)	1,0	0,31
Διάφορα	N-Methyl-2-pyrrolidone	1,4	0,42
	4-Piperidinecarboxamide	1,0	0,31
	3,3-pentamethylene-4-butyrolactam	1,5	0,45

Αφού πραγματοποιήθηκε η ολοκλήρωση των κορυφών για όλες τις προς μελέτη ουσίες, λαμβάνοντας υπόψη τους χρόνους έκλουσης των προτύπων, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των αποτελεσμάτων στο excel. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται φύλλα εργασίας για κάθε ουσία που περιλαμβάνουν το όνομα του δείγματος, το όνομα της ένωσης που προσδιορίζεται και το εμβαδό των κορυφών σε κάθε δείγμα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ποσοτικοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την χρήση προτύπων. Επίσης, σε όλα τα αποτελέσματα έγινε υπολογισμός λαμβάνοντας υπόψη το ποσοστό υγρασίας (%). Οπότε, τα αποτελέσματα προέκυψαν χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$\frac{(100 - \text{Υγρασία}) \times C}{100}$$

Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα για κάποιες από τις ενώσεις που προσδιορίστηκαν καθώς και οι χρόνοι έκλουσης τους.



Εικόνα 15: Χρωματογραφήματα των ουσιών N-methyl-2-pyrrolidone, allopurinol και vigabatrin, με τη χρήση του λογισμικού Data Analysis.

Αφού ανιχνεύθηκαν οι παραπάνω ουσίες από τη διαδικασία σάρωσης (παρουσιάζονται στους πίνακες 8 και 9), με τη βοήθεια του λογισμικού Target Analysis for Screening and Quantitation (TASQ), ποσοτικοποιήθηκαν και προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις για κάθε ένωση στα δείγματα 2 έως 29. Οι ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδα μεταξύ LOD και LOQ υπογραμμίζονται με πορτοκαλί χρώμα και αντικαταστάθηκαν με LOQ/2 σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία.

Name	Biota 2	Biota 6	Biota 6.2	Biota 8	Biota 12	Biota 15	Biota 16	Biota 23	Biota 24	Biota 26	Biota 29
3,3-pentamethylene-4-butyrolactam	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4-Piperidinecarboxamide	<LOD	7,7	6,2	<LOD	<LOD	8,8	<LOD	5,0	4,4	<LOD	5,9
4-tert-Octylphenol (4-t-OP)	<LOD	0,5	<LOD	<LOD	<LOD	20	<LOD	79	17	<LOD	35
Acamprosate	<LOD	10	46	<LOD	<LOD	15	<LOD	24	19	<LOD	29
Aceclidine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ajmaline	<LOD	<LOD	1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Alachlor-OXA	<LOD	<LOD	18	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	13	7,0	<LOD	8,1
Allopurinol	38	11	5,8	33	45	14	45	11	11	46	12
Androsterone-19-nor	53	118	252	18	37	18	38	56	20	43	51
Antipyrine-4-Acetamido	<LOD	<LOD	2,5	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	1,6	0,9	<LOD	3,3
Antipyrine-4-Formylamino	<LOD	7,3	19	<LOD	<LOD	5,4	<LOD	7,0	10	<LOD	10
Apophedrin (Phenylethanolamine)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	30	<LOD	22	38	39	24
Azapropazone	<LOD	<LOD	<LOD	0,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,6	<LOD

Barban	<LOD	20	81	<LOD	<LOD	23	<LOD	40	37	<LOD	5,6
Benserazide	184	<LOD	<LOD	90	145	<LOD	50	<LOD	<LOD	92	<LOD
Benzododecinium (Benzyl-dimethyl- dodecylammonium)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3,8	<LOD	<LOD
Bis-(2-ethylhexyl)- Phthalate (DEHP)	14	92	134	5,1	7,0	<LOD	6,6	<LOD	<LOD	15	<LOD
Carbachol	32	<LOD	<LOD	18	25	<LOD	19	<LOD	<LOD	18	<LOD
Carbofuran-3-hydroxy	<LOD	1,5	21	<LOD	<LOD	1,0	<LOD	0,8	1,0	<LOD	0,9
Chlordimeform	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,6	<LOD	<LOD	1,8
Chloropyramine	<LOD	<LOD	2,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Clothiandin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Cytarabin	75	27	<LOD	<LOD	<LOD	6,1	<LOD	20	16	<LOD	28
DEET (Diethyltoluamide)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	29	<LOD	42	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Didecylidimethylammoni- um (DADMAC (C10:C10))	1,0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,9	<LOD	<LOD
Dimethachlor-OXA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6,1	<LOD	<LOD	<LOD
Ephedrine	<LOD	22	21	<LOD	<LOD	16	<LOD	14	16	<LOD	17
Epinephrine	<LOD	4,9	9,5	<LOD	<LOD	11	<LOD	7,3	6,9	<LOD	8,2
Ethambutol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Fentanyl	<LOD	3,8	5,4	<LOD	<LOD	5,0	<LOD	1,2	<LOD	<LOD	3,5
Gabapentin-lactam	<LOD	38	4,9	<LOD	<LOD	10	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Galaxolide	<LOD	1,9	2,3	<LOD	<LOD	0,5	<LOD	1,8	0,5	<LOD	<LOD
Guaifenesin	2,2	<LOD	<LOD	1,7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,3	<LOD
Ibuprofen	<LOD	24	<LOD	<LOD	<LOD	20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	57
Imazamox	<LOD	1,8	1,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Imazapyr	<LOD	9,8	31	<LOD	<LOD	5,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Jasmolin I	<LOD	<LOD	4,8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Levetiracetam	<LOD	<LOD	14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Lincomycin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,1	1,4	<LOD	<LOD
Lisinopril	<LOD	<LOD	13	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Lovastatin	<LOD	10	<LOD	<LOD	<LOD	5,3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	18
Mazindol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Metalaxyl	<LOD	<LOD	1,1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Methenolone	<LOD	2673	3208	<LOD	<LOD	1256	<LOD	1876	565	<LOD	667
Methfuroxam	<LOD	0,5	0,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Methoprene	1,7	6,2	6,6	1,7	1,7	4,1	7,8	4,2	1,7	<LOD	6,9
Methylephedrine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,6	0,6	<LOD	0,6
Metolachlor met (Metolachlor OA)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Midazolam	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,5	<LOD	<LOD	<LOD
N-2,4- Dimethylphenylformami- de	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
N-Acetyl mesalazine	<LOD	<LOD	20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Niflumic acid	<LOD	2,0	1,7	<LOD	<LOD	0,9	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
N-Methyl-2-pyrrolidone	8,1	71	6,7	12	15	0,7	24	13	12	41	21
Norbuprenorphine	<LOD	2,5	2,1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Norethandrolone met.	<LOD	345	924	<LOD	<LOD	207	<LOD	1711	474	<LOD	270
Norethisterone acetate	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	115	<LOD	33	<LOD	<LOD	42	<LOD
Norfentanyl	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3,7	<LOD	<LOD
Normirtazapine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,7
Paracetamol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	3,0	<LOD	<LOD	<LOD
PFDeA	<LOD	1,0	1,3	<LOD	<LOD	1,0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PFOS	<LOD	22	41	<LOD	5,0	10	4,2	10	10	<LOD	16
PFOuA	<LOD	1,1	1,2	<LOD	<LOD	1,0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Phenylbenzimidazole sulfonic acid	<LOD	19	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Picardin (Icaridin)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Pregabalin	<LOD	8,6	35	<LOD	<LOD	6,0	<LOD	<LOD	3,1	<LOD	3,7
Propoxur	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Pyrethrin I	34	<LOD	<LOD	<LOD	34	<LOD	18	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Reproterol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,5	<LOD	<LOD	<LOD
Rilmenidine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Rivastigmine	<LOD	<LOD	0,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Salicylic acid	<LOD	4,2	<LOD	<LOD	<LOD	5,0	<LOD	13	11	<LOD	12
Simvastatin	<LOD	20	8	<LOD	<LOD	17	<LOD	8	8	<LOD	15
Sotalol	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,8
Spiromesifen	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Sulfamethoxazole	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6,4	<LOD	29	11	<LOD	11
Sulpiride	<LOD	21	27	<LOD	<LOD	37	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	52
Temazepam	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4	<LOD	<LOD	<LOD
Testosterone benzoate	2,7	119	145	5,6	<LOD	29	<LOD	10	14	5,0	69
Tolycaine	10	10	16	6,2	3,8	4,2	<LOD	1,6	0,7	4,9	1,5
Tramadol-Nor (Tramadol-N-desmethyl)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Trapidil	11	<LOD	<LOD	60	7,1	<LOD	12	<LOD	<LOD	85	<LOD
Trimethacarb (2.3.5-);Trimethacarb (3.4.5-)	<LOD	20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Tropisetron	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Vigabatrin	121	39	34	79	113	38	91	<LOD	<LOD	78	29

Πίνακας 9: Συγκεντρώσεις για κάθε ένωση στα δείγματα 30 έως 49. Οι ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδα μεταξύ LOD και LOQ υπογραμμίζονται με πορτοκαλί χρώμα και αντικαταστάθηκαν με LOQ/2 σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία.

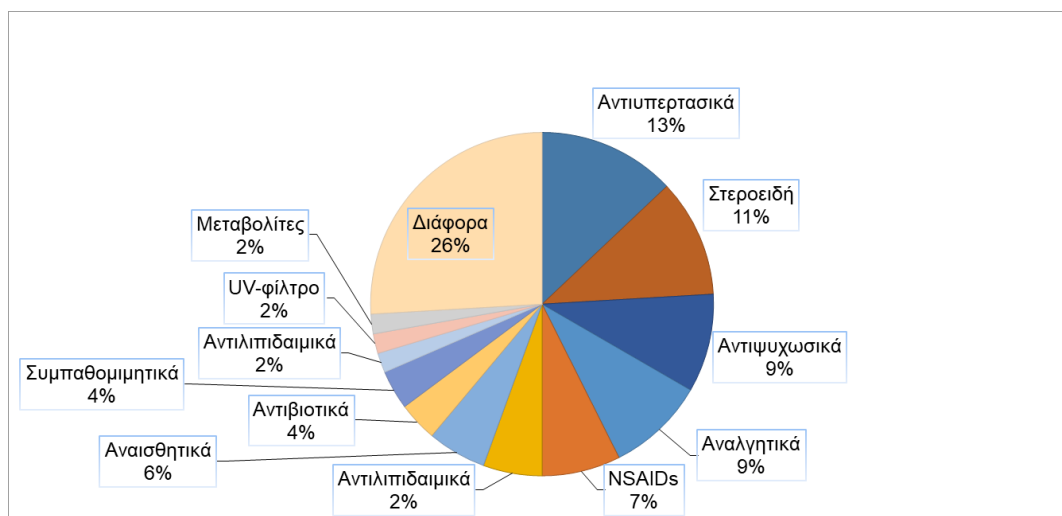
Name	Biota 30	Biota 36	Biota 37	Biota 38	Biota 40	Biota 41	Biota 43	Biota 44	Biota 47	Biota 49(Ro)	Biota 49(Mo)
3,3-pentamethylene-4-butyrolactam	<LOD	<LOD	<LOD	9,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	16
4-Piperidinecarboxamide	<LOD	<LOD	5,5	<LOD	<LOD	7,1	4,7	<LOD	5,0	5,6	<LOD
4-tert-Octylphenol (4-t-OP)	<LOD	<LOD	26	<LOD	99	35	36	55	50	24	<LOD
Acamprosate	<LOD	<LOD	29	<LOD	<LOD	10	16	<LOD	21	22	<LOD
Aceclidine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,97
Ajmaline	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Alachlor-OXA	<LOD	<LOD	10	<LOD	<LOD	<LOD	9,3	<LOD	3,3	3,3	<LOD
Allopurinol	36	33	10	48	48	11	10	27	13	12	43
Androsterone-19-nor	24	36	5,8	20	83	75	16	101	36	28	32
Antipyrine-4-Acetamido	<LOD	<LOD	2,1	<LOD	<LOD	1,1	1,2	<LOD	1,9	0,4	<LOD
Antipyrine-4-Formylamino	<LOD	<LOD	14	<LOD	<LOD	12	14	<LOD	11	16	<LOD
Apophedrin (Phenylethanolamine)	<LOD	<LOD	4,8	90	<LOD	33	17	<LOD	21	113	185
Azapropazone	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,96	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Barban	<LOD	<LOD	14	<LOD	<LOD	10	13	<LOD	20	7,7	<LOD
Benserazide	71	82	<LOD	142	131	<LOD	<LOD	42	<LOD	<LOD	73
Benzododecinium (Benzyl-dimethyl-dodecylammonium)	35	<LOD	5,8	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP)	16	1,6	<LOD	12	16	6,6	<LOD	18	<LOD	25	18
Carbachol	7,9	11	<LOD	25	27	<LOD	<LOD	14	<LOD	<LOD	18
Carbofuran-3-hydroxy	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	<LOD	1,4	0,4	<LOD	1,0	0,4	<LOD
Chlordimeform	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Chloropyramine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Clothianidin	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,6	<LOD
Cytarabin	<LOD	<LOD	12	<LOD	<LOD	25	18	<LOD	15	42	<LOD
DEET (Diethyltoluamide)	86	41	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Didecyltrimethylammonium (DADMAC (C10:C10))	6,4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Dimethachlor-OXA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5,8	<LOD	<LOD
Ephedrine	<LOD	<LOD	14	<LOD	<LOD	16	15	<LOD	11	11	<LOD
Epinephrine	<LOD	<LOD	5,0	<LOD	<LOD	6,3	6,8	<LOD	8,3	<LOD	<LOD
Ethambutol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,5	<LOD
Fentanyl	<LOD	<LOD	1,6	<LOD	<LOD	<LOD	1,4	<LOD	1,3	3,6	<LOD
Gabapentin-lactam	<LOD	<LOD	12	<LOD	<LOD	27	<LOD	<LOD	<LOD	18	<LOD
Galaxolide	<LOD	<LOD	15	<LOD	<LOD	1,3	0,50	<LOD	1,9	1,1	<LOD
Guaifenesin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	6,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ibuprofen	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	54	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Imazamox	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	<LOD	<LOD	1,6	<LOD

Imazapyr	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Jasmodin I	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Levetiracetam	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Lincomycin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,5	0,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Lisinopril	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Lovastatin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	15	6,7	<LOD	14	<LOD	<LOD
Mazindol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	24
Metalaxyl	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Methenolone	<LOD	<LOD	92	<LOD	<LOD	1160	341	<LOD	537	538	<LOD
Methfuroxam	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Methoprene	<LOD	<LOD	1,7	5,5	<LOD	4,4	4,7	1,7	1,7	1,7	<LOD
Methylephedrine	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	<LOD	<LOD	0,6	<LOD	0,6	<LOD	<LOD
Metolachlor met (Metolachlor OA)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5,4	<LOD	<LOD
Midazolam	<LOD	<LOD	1,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
N-2,4-Dimethylphenylformamide	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
N-Acetyl mesalazine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Niflumic acid	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
N-Methyl-2-pyrrolidone	65	20	44	20	29	5,9	15	19	17	17	24
Norbuprenorphine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Norethandrolone met.	<LOD	<LOD	49	<LOD	<LOD	520	261	<LOD	123	355	<LOD
Norethisterone acetate	<LOD	44	<LOD	66	55	<LOD	<LOD	26	<LOD	<LOD	<LOD
Norfentanyl	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Normirtazapine	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	<LOD	<LOD	0,7	<LOD	0,7	<LOD	<LOD
Paracetamol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PFDeA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
PFOS	<LOD	<LOD	12	<LOD	2,2	7,4	3,0	<LOD	5,3	1,6	<LOD
PFUnA	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Phenylbenzimidazole sulfonic acid	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Picaridin (Icaridin)	12	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5,3
Pregabalin	<LOD	<LOD	4,3	<LOD	<LOD	<LOD	6,2	<LOD	6,3	5,1	<LOD
Propoxur	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,0	<LOD
Pyrethrin I	9,1	24	<LOD	24	24	<LOD	<LOD	20	<LOD	<LOD	<LOD
Reproterol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Rilmenidine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2,4
Rivastigmine	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,5	<LOD
Salicylic acid	<LOD	<LOD	17	<LOD	<LOD	5,9	7,7	<LOD	10	3,2	<LOD
Simvastatin	<LOD	<LOD	2,7	<LOD	<LOD	20	6,1	<LOD	7,8	4,0	<LOD
Sotalol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Spiromesifen	<LOD	<LOD	3,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Sulfamethoxazole	<LOD	<LOD	13	<LOD	<LOD	2,0	13	<LOD	2,1	1,7	<LOD

Sulpiride	<LOD	<LOD	22	<LOD	<LOD	3,8	16	<LOD	12	19	<LOD
Temazepam	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Testosterone benzoate	5,9	9,5	29	6,1	5,1	51	36	23	30	51	11
Tolycaine	<LOD	5,6	2,9	9,0	7,8	6,1	<LOD	7,4	<LOD	6,6	7,8
Tramadol-Nor (Tramadol-N-desmethyl)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,4	<LOD	0,91	<LOD	<LOD
Trapidil	97	20	<LOD	33	74	<LOD	<LOD	93	<LOD	<LOD	47
Trimethacarb (2.3.5-);Trimethacarb (3.4.5-)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Tropisetron	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Vigabatrin	37	52	<LOD	113	121	35	<LOD	62	<LOD	<LOD	83

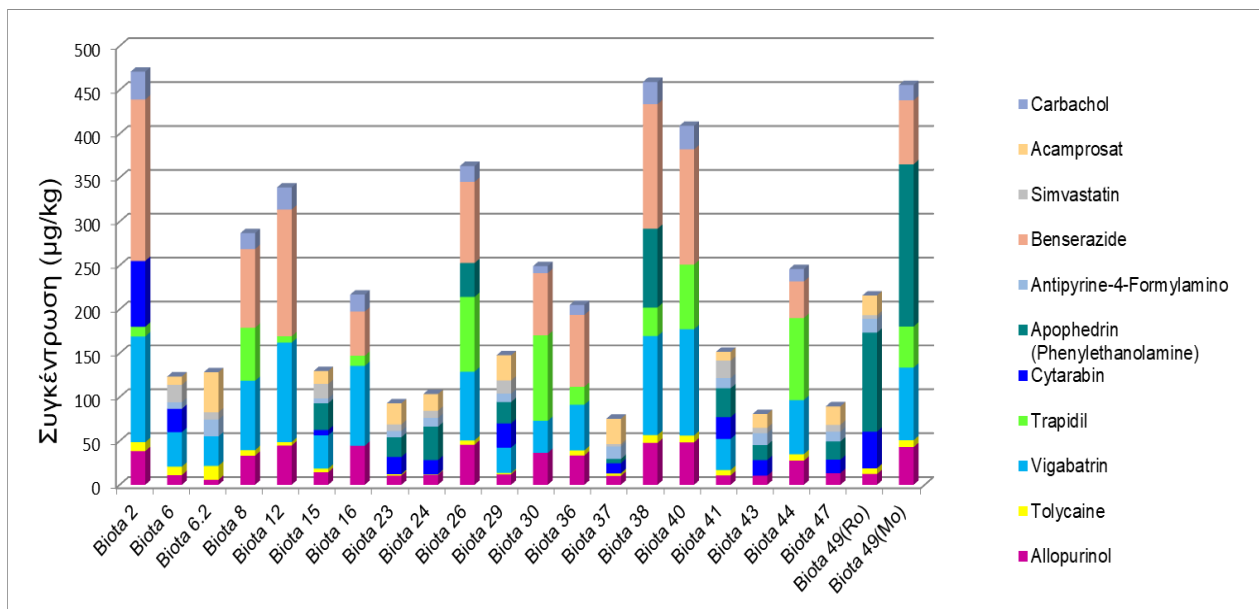
6.1.1 Φαρμακευτικές ενώσεις

Η ανάλυση των 22 δειγμάτων ψαριών έδειξε την παρουσία συνολικά 54 φαρμακευτικών προϊόντων και προϊόντων προσωπικής υγιεινής . Μεταξύ αυτών ήταν 7 αντιυπερτασικά, 5 αναλγητικά, 6 στεροειδή, 3 αντιεπιληπτικά, 3 αναισθητικά, 1 αντιλιπιδαιμικό, 4 μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Non-steroid anti-inflammatory drugs ,NSAIDs), 1 UV-φίλτρο, 5 αντιψυχωσικά, 2 αντιβιοτικά, 2 συμπαθομιμητικά 1 μεταβολίτη και 14 «διάφορα» φαρμακευτικά προϊόντα με ευρύ φάσμα κλινικών χρήσεων (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Κατηγορίες φαρμακευτικών ενώσεων.

Τα στεροειδή δεν θα σχολιαστούν περαιτέρω, διότι θεωρούνται φυσικές ενώσεις σε τέτοιες μήτρες και επομένως η ανίχνευσή τους δεν μπορεί να αποδοθεί με βεβαιότητα σε πιθανή μόλυνση.

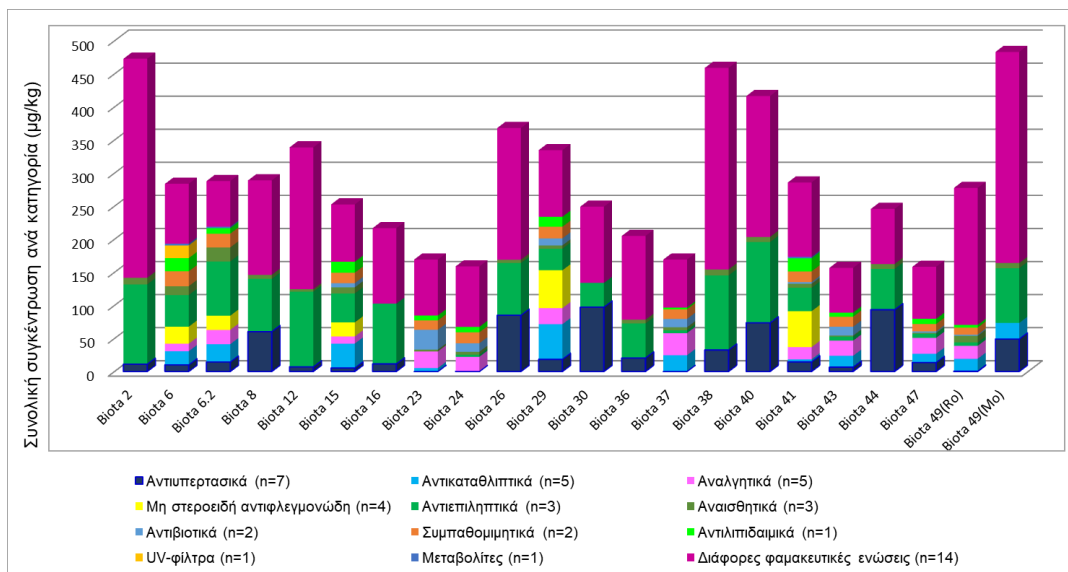


Σχήμα 3: Ραβδόγραμμα με τις συχνότερα εμφανιζόμενες φαρμακευτικές ενώσεις.

Η ένωση που εντοπίστηκε σε όλα τα δείγματα ήταν η αλλοπουρινόλη (Allopurinol) σε συγκεντρώσεις από 6 µg/kg έως 48 µg/kg. Η αλλοπουρινόλη ενδείκνυται για την αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς υπερουριχαιμίας και πρόληψη των εξ αυτής επιπλοκών (ουρική αρθρίτις, νεφρολιθίαση, νεφρική ανεπάρκεια). Αναστέλλει την ξανθινοξειδάση, το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αλλοπουρινόλη επιδρά στο μεταβολισμό των πουρινών, περιορίζοντας τη σύνθεση ουρικού οξέος, χωρίς να παρεμποδίζει τη σύνθεση των κανονικών ζωτικών πουρινών [65].

Οι πιο συχνά ανιχνευόμενες ενώσεις ήταν : Tolycaine (82%) και Vigabatrin (73%) ενώ στα μισά τουλάχιστον δείγματα ανιχνεύτηκαν οι : Trapidil (50%) , Cytarabin (50%), Apophedrin (54%), Antipyrine-4-Formylamino (50%), Benserazide (50%), Simvastatin (50%), Acamprosate (50%), Carbachol (50%). Από την άλλη πλευρά, 20 ενώσεις ανιχνεύθηκαν σε ένα μόνο δείγμα ψαριού.

Το 83% των ανιχνευόμενων ενώσεων βρέθηκαν σε επίπεδα συγκέντρωσης κάτω από 40 $\mu\text{g/kg}$, ενώ οι ενώσεις που βρέθηκαν στις πιο υψηλές συγκεντρώσεις ήταν οι: Arophenol (185 $\mu\text{g/kg}$ δείγμα: Biota 49 Μολδαβία), Benserazone (184 $\mu\text{g/kg}$ δείγμα: Biota 2 Γερμανία), Vigabatrin (121 $\mu\text{g/kg}$ δείγμα: Biota 2 Γερμανία), Trazodone (97 $\mu\text{g/kg}$ δείγμα: Biota 30 Ουγγαρία) και Cytarabine (75 $\mu\text{g/kg}$ Biota 2 Γερμανία).



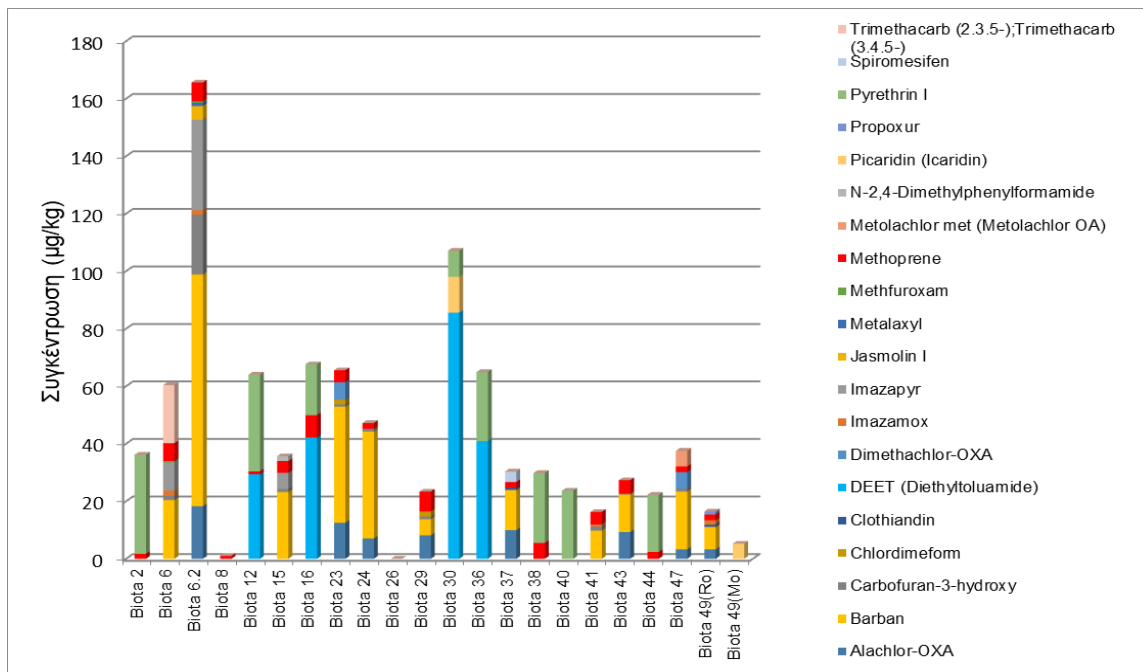
Σχήμα 4: Ραβδόγραμμα με τις συνολικές συγκεντρώσεις ανά κατηγορία φαρμακευτικών ενώσεων.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα και το ραβδόγραμμα (Σχήμα 4), το δείγμα Biota 43 (Ρουμανία-Βουλγαρία) είναι το λιγότερο επιβαρυνμένο (157 $\mu\text{g/kg}$) ενώ η υψηλότερη συνολική συγκέντρωση (483 $\mu\text{g/kg}$) ανιχνεύτηκε στο δείγμα Biota 49 (Μολδαβία).

Συγκρίνοντας τις αθροιστικές συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων Biota 6, Biota 6.2 (Γερμανία, Jochenstein), και Biota 23, Biota 24 (Ουγγαρία, Βουδαπέστη), παρατηρείται αρκετά παρόμοιο προφίλ μόλυνσης (κατανομή ανά κλάση και συνολική αθροιστική συγκέντρωση). Αυτό υποδεικνύει ότι δείγματα ψαριών που συλλέγονται στην ίδια χώρα και σε κοντινά σημεία δειγματοληψίας μπορεί να έχουν παρόμοια προφίλ μόλυνσης.

6.1.2 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Στα 22 δείγματα ψαριών που αναλύθηκαν, προσδιορίστηκαν 20 φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Η ένωση που ανιχνεύτηκε στο 77% των δειγμάτων ήταν το Methoprene με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 µg/kg έως 8 µg/kg, ενώ στο 50% των δειγμάτων ανιχνεύτηκαν το Barban από 6 µg/kg έως 81 µg/kg και το Carbofuran-3-hydroxy από 1 µg/kg έως 21 µg/kg. Η υψηλότερη συγκέντρωση που ανιχνεύτηκε ήταν 81 µg/kg για το DEET (Diethyltoluamide).



Σχήμα 5: Ραβδόγραμμα για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις στα δείγματα.

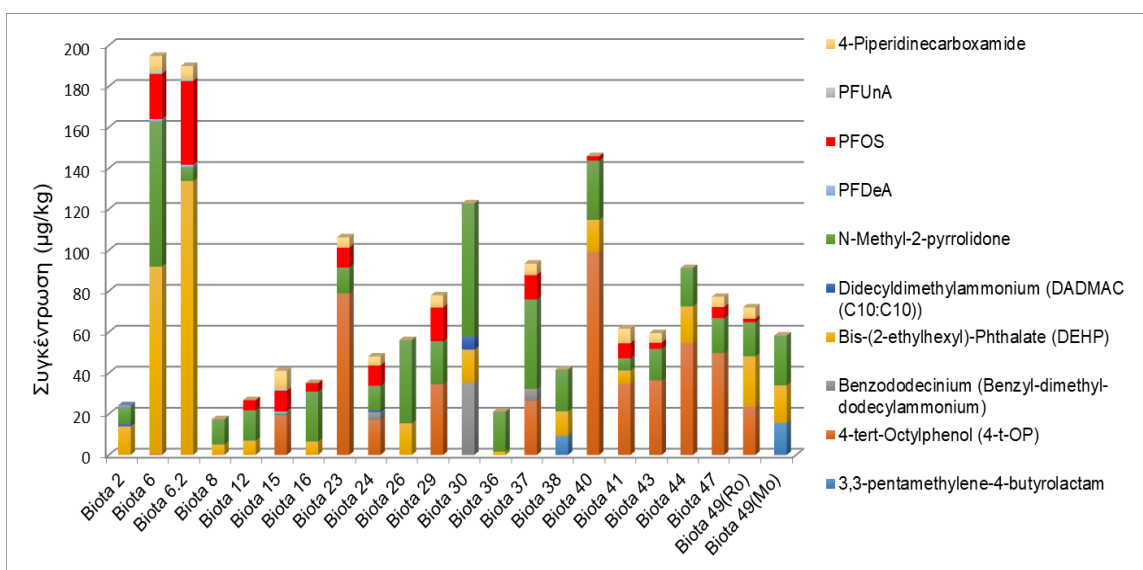
Όπως προκύπτει από τα παραπάνω δεδομένα ως πιο επιβαρυνμένο σε φυτοπροστατευτικές ενώσεις δείγμα φαίνεται να είναι το δείγμα Biota 6.2 που προέρχεται από την περιοχή Jochenstein της Γερμανίας. Αντίθετα, στο Biota 26 (Ουγγαρία) δεν βρέθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση ή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

6.1.3 Χημικά από την βιομηχανία

Στα 22 δείγματα ψαριών που αναλύθηκαν, προσδιορίστηκαν 10 ενώσεις που προέρχονται από τα βιομηχανικά απόβλητα. Η ένωση που ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα ήταν η N-μεθυλ-2-πυρρολιδόνη (N-Methyl-2-pyrrolidone) με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 1 µg/kg έως 71 µg/kg .

Η Ν-μεθυλ-2-πυρρολιδόνη (NMP) είναι μία οργανική ένωση που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία πετροχημικών και πλαστικών ως διαλύτης, αξιοποιώντας τη μη πτητικότητα και την ικανότητά του να διαλύει διάφορα υλικά. Χρησιμοποιείται στα σκευάσματα φαρμάκων στην φαρμακοβιομηχανία και στην κατασκευή μπαταριών ιόντων λιθίου , ως διαλύτης για την προετοιμασία ηλεκτροδίων [66].

Σε πάνω από τα μισά δείγματα ανιχνεύτηκαν οι : Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) (FoA : 68%), PFOS (FoA : 63%) και 4-tert-Octylphenol (4-t-OP) (FoA : 54%). Η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν 134 µg/kg για το Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP).



Σχήμα 6: Ραβδόγραμμα για τα χημικά από την βιομηχανία στα δείγματα.

Από το ραβδόγραμμα (Σχήμα 6) παρατηρείται ότι το πιο επιβαρυνμένο δείγμα είναι το Biota 6 (Γερμανία) με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις σε Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) και PFOS 134 µg/kg και 41 µg/kg αντίστοιχα. Το δείγμα που ανιχνεύτηκαν οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις είναι το δείγμα Biota 8 (Αυστρία).

6.1.4 Εκτίμηση κινδύνου

Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε παραπάνω υπολογίστηκε ο βαθμός κινδύνου (Risk Score) για όλες τις ενώσεις. Στον πίνακα 10 παρουσιάζεται για τους αναλύτες

που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα με στοχευμένη σάρωση το NORMAN ID, ο τύπος PNEC , η χαμηλότερη τιμή PNEC στα ψάρια για κάθε αναλύτη [64].

Στον Πίνακα 11 αναφέρονται μόνο οι ενώσεις με τιμή > 1,01 καθώς για τις υπόλοιπες ενώσεις, ο κίνδυνος θεωρείται αμελητέος. Συνολικά, εννιά ενώσεις υπερέβησαν τις τιμές PNEC τους. Ο Πίνακας 12 συνοψίζει το σύνολο των ενώσεων που υπερέβησαν τα PNECs τους, την έκταση υπέρβασης του PNEC και τα πιο επιβαρυνόμενα δείγματα.

Πίνακας 10: Αναλύτες που ανιχνεύτηκαν στα δείγμα με στοχευμένη σάρωση και οι τιμές PNEC τους.

NORMAN ID	Όνομα ένωσης	Τύπος PNEC	Χαμηλότερο όριο PNEC (µg/kg)
NS00000172	Norethandrolone met.	P-PNEC pred	113
NS00007198	Methenolone	P-PNEC pred	147
NS00010309	Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP)	P-PNEC pred	1,33
NS00010280	PFOS	EQS chronic water (=AA-EQS)	0,002
NS00003506	Methoprene	Indicatief MTR (opgelost)	0,10
NS00010272	Androsterone-19-nor	P-PNEC pred	74,6
NS00000678	Vigabatrin	P-PNEC pred	54,2
NS00004221	Testosterone benzoate	P-PNEC pred	41,6
NS00005195	Trapidil	P-PNEC pred	2,99
NS00008649	4-tert-Octylphenol (4-t-OP)	EQS chronic water (=AA-EQS)	19,9
NS00005949	Cytarabin	P-PNEC pred	16
NS00010476	Sulpiride	P-PNEC pred	5,87
NS00009290	Pyrethrin I	PNEC acute	1,67
NS00010074	Norethisterone acetate	P-PNEC pred	28,9
NS00009178	N-Methyl-2-pyrrolidone	P-PNEC pred	329
NS00000618	Allopurinol	P-PNEC pred	185582
NS00006338	Tolycaine	P-PNEC pred	259
NS00000544	Lovastatin	P-PNEC pred	4,52
NS00008824	Barban	P-PNEC pred	51,9
NS00014647	Apophedrin (Phenylethanolamine)	P-PNEC pred	181
NS00000268	Sulfamethoxazole	AA-EQS	15,9
NS00000329	Antipyrine-4-Formylamino	JD-UQN proposal	256254
NS00000382	Ephedrine	P-PNEC pred	665
NS00000553	4-Piperidinecarboxamide	P-PNEC pred	162
NS00009834	Benserazide	P-PNEC pred	5568
NS00010315	Carbofuran-3-hydroxy	Indicatief MTR (opgelost)	1002
NS00008782	Simvastatin	PNEC acute	38,1
NS00008367	Acamprosate	P-PNEC pred	373
NS00005986	Carbachol	P-PNEC pred	46,1
NS00002912	Imazapyr	PNEC acute	0,06
NS00000438	Imazamox	PNEC acute	0,06

NS00010274	Salicylic acid	PNEC chronic	21600
NS00000303	Galaxolidone	P-PNEC pred	62
NS00000226	Antipyrine-4-Acetamido	JD-UQN proposal	87384
NS00010349	Epinephrine	P-PNEC pred	119
NS00000044	Fentanyl	P-PNEC pred	21,4
NS00000537	Pregabalin	P-PNEC pred	116
NS00010518	Alachlor-OXA	P-PNEC pred	186
NS00002861	Methylephedrine	P-PNEC pred	1694
NS00105619	Gabapentin-lactam	NA	1000
NS00010059	Niflumic acid	P-PNEC pred	1,65
NS00000221	DEET (Diethyltoluamide)	AA-EQS	211
NS00004408	Normirtazapine	P-PNEC pred	8,56
NS00000025	Lincomycin	P-PNEC pred	4,89
NS00000214	Ibuprofen	P-PNEC pred	4191
NS00007812	Guaifenesin	P-PNEC pred	507
NS00001938	Benzododecinium (Benzyl-dimethyl-dodecylammonium)	P-PNEC pred	37,7
NS00010446	Norbuprenorphine	P-PNEC pred	15,8
NS00010630	Didecyldimethylammonium (DADMAC (C10:C10))	P-PNEC pred	71,9
NS00000369	PFDeA	P-PNEC pred	45,4
NS00000370	PFUnA	P-PNEC pred	223
NS00009426	Azapropazone	P-PNEC pred	7,58
NS00008107	Picaridin (Icaridin)	PNEC chronic	7047150
NS00011447	3,3-pentamethylene-4-butyrolactam	PNEC aqua (freshwater)	496
NS00009180	Clothiandin	P-PNEC pred	3002
NS00000476	Midazolam	P-PNEC pred	75,0
NS00010416	Temazepam	PNEC chronic	2,90
NS00000195	Sotalol	P-PNEC pred	15,4
NS00000332	Dimethachlor-OXA	P-PNEC pred	50,9
NS00010600	Propoxur	wettelijk JG-MKN (totaal)	0,05
NS00000463	Rivastigmine	P-PNEC pred	88,8
NS00000655	Tramadol-Nor (Tramadol-N-desmethyl)	P-PNEC pred	124
NS00006160	Chlordimeform	P-PNEC exp	670
NS00008420	Methfuroxam	P-PNEC pred	148
NS00007356	Reproterol	P-PNEC pred	0,20
NS00010257	Norfentanyl	PNEC aqua (freshwater)	768
NS00000231	Paracetamol	PNEC aqua (freshwater)	1415
NS00010385	Levetiracetam	P-PNEC pred	44,4
NS00010386	Phenylbenzimidazole sulfonic acid	PNEC aqua (freshwater)	901
NS00006968	Aceclidine	P-PNEC pred	199
NS00003738	Metalaxyl	AA-QSwater_eco	160
NS00003468	Mazindol	P-PNEC pred	409
NS00004014	Spiromesifen	PNEC chronic	41,6
NS00000245	Metolachlor met (Metolachlor OA, CGA 351916/CGA 51202)	P-PNEC pred	139
NS00008072	Jasmodin I	P-PNEC pred	18,9

NS00000458	N-2,4-Dimethylphenylformamide	P-PNEC pred	112
NS00009977	Lisinopril	P-PNEC pred	18,5
NS00000393	Ethambutol	P-PNEC pred	93,8
NS00034133	Chloropyramine	P-PNEC pred	954
NS00010532	Trimethacarb (2.3.5-);Trimethacarb (3.4.5-)	P-PNEC pred	80,5
NS00010343	Ajmaline	P-PNEC pred	120
NS00006001	Tropisetron	P-PNEC pred	355
NS00004335	N-Acetyl mesalazine	P-PNEC pred	29,0
NS00017270	Rilmenidine	P-PNEC pred	263

Πίνακας 11: Ενώσεις που εντοπίστηκαν με τιμή > 1,01 βαθμό κινδύνου.

Αναλύτης	Κατηγορία	FoA	FoE	EoE	Βαθμός Κινδύνου
Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP)	Industrial Chemicals - Phthalate esters	0,7	0,7	0,5	1,9
PFOS	Industrial chemicals - Perfluorinated substances	0,6	0,6	0,5	1,8
Methoprene	Agricultural chemicals	0,8	0,8	0,2	1,7
Vigabatrin	Pharmaceuticals - Antiepileptics	0,7	0,4	0,5	1,6
Trapidil	Pharmaceuticals - Antihypertensive drugs	0,5	0,5	0,5	1,5
4-tert-Octylphenol (4-t-OP)	Industrial chemicals - Phenols	0,5	0,4	0,5	1,5
Cytarabin	Pharmaceuticals - Other	0,5	0,4	0,5	1,4
Sulpiride	Antipsychotic drugs - Other	0,4	0,4	0,5	1,3
Pyrethrin I	Agricultural chemicals	0,4	0,4	0,5	1,2

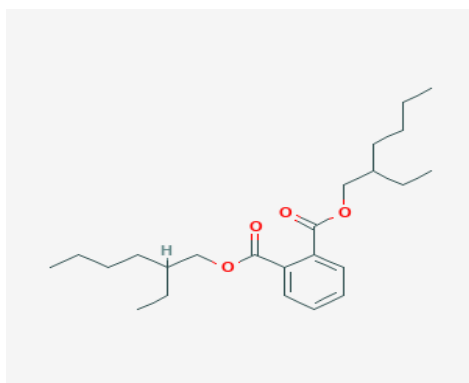
Πίνακας 12: Ενώσεις που υπερέβησαν τα PNEC τους.

Αναλύτης	PNEC(μg/kg)	Δείγματα>PNEC	Εύρος συγκεντρώσεων >PNEC (μg/kg)	Δείγμα με τη μεγαλύτερη υπέρβαση
Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP)	1,33	15	2-134	Biota 6.2
PFOS	0,0022	14	2-41	Biota 6.2
Methoprene	0,1	17	1-8	Biota 16
Vigabatrin	54,2	9	62-121	Biota 40
Trapidil	2,99	11	7-93	Biota 44
4-tert-Octylphenol	19,9	9	24-99	Biota 40

(4-t-OP)				
Cytarabin	16,0	7	18-75	Biota 2
Sulpiride	5,87	8	12-52	Biota 29
Pyrethrin I	1,67	8	9-34	Biota 2

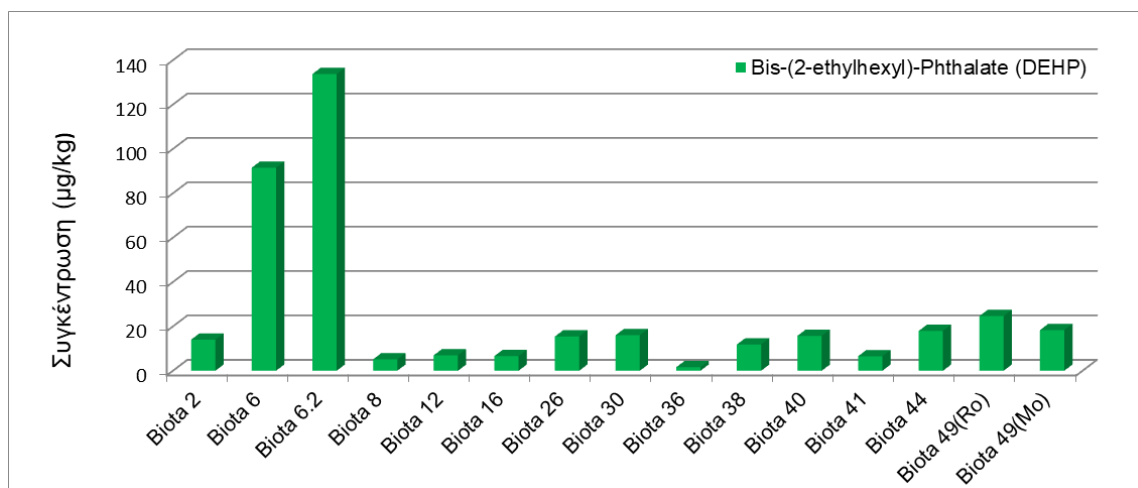
Δις (2-αιθυλεξυλ) φθαλικός εστέρας Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP)

Ο δις (2-αιθυλεξυλ) φθαλικός εστέρας (DEHP) είναι ένας εστέρας (Εικόνα 16) που προστίθεται συνήθως στα πλαστικά για να τα κάνει εύκαμπτα. Είναι ένα άχρωμο υγρό σχεδόν χωρίς οσμή. Υπάρχει συνήθως σε πλαστικά προϊόντα όπως καλύμματα τοίχων, τραπεζομάντηλα, πλακάκια δαπέδου, ταπετσαρίες επίπλων, κουρτίνες ντους, λάστιχα κήπου, ρούχα για βρέφη, βρεφικά παντελόνια, κούκλες, μερικά παιχνίδια, παπούτσια, ταπετσαρίες και οροφές αυτοκινήτων, μεμβράνες και σεντόνια, θήκες για σύρμα και καλώδια, ιατρικούς σωλήνες και σακούλες αποθήκευσης αίματος [66].



Εικόνα 16: Δομή Bis-(2-ethylhexyl)-Phthalate (DEHP) [66].

Λόγω της ευρείας χρήσης του, βρίσκεται παντού στο περιβάλλον, στα καταναλωτικά προϊόντα και στα τρόφιμα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η υψηλότερη συγκέντρωση στον συγκεκριμένο εστέρα βρέθηκε στα δείγματα Biota 6.2 (134 µg/kg) και Biota 6 (92 µg/kg) τα οποία προέρχονται από την Γερμανία. Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2012 στον Γερμανικό πληθυσμό για την πρόσληψη του εστέρα μέσω της κατανάλωσης τροφίμων υπολογίστηκε πως ο μέσος όρος πρόσληψης του ήταν τα 3,6 µg/kg ανά ημέρα [67].

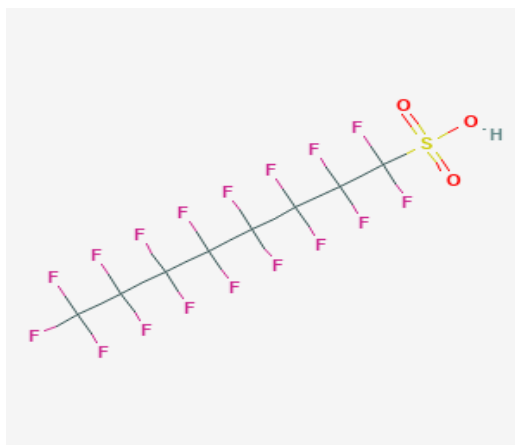


Σχήμα 7: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση DEHP.

Το DEHP μπορεί να εισέλθει στο σώμα μέσω εισπνοής, κατάποσης και δερματικής επαφής σε καθημερινή βάση, γεγονός που έχει προκαλέσει ανησυχίες σχετικά με την ασφάλειά του και τις πιθανές επιπτώσεις του στην ανθρώπινη υγεία. Είναι περισσότερο γνωστό ως ενδοκρινικός διαταράκτης, μια ένωση δηλαδή που μεταβάλλει τις λειτουργίες του ενδοκρινικού συστήματος και συνεπώς προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία ενός οργανισμού ή τους απογόνους του. Πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια, έχουν δείξει πως η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις στον εστέρα μπορεί να οδηγήσει σε τοξικές επιδράσεις στους όρχεις, λειτουργικές διαταραχές των ωοθηκών, αυξημένη πιθανότητα ενδομητρίωσης, μπορεί να προκαλέσει νεφροπάθεια κ.ά.. Η έκθεση στον DEHP έχει αποδειχθεί ότι έχει πολλές αρνητικές επιπτώσεις όχι μόνο στα ζώα αλλά και στους ανθρώπους αφού παρατηρείται στα δείγματα αίματος και στα ούρα ατόμων που νοσηλεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα λόγω της χρήσης ιατρικών συσκευών. Συνεπώς είναι μια πολύ τοξική και επικίνδυνη ένωση για την υγεία του οργανισμού, που χρησιμοποιείται ευρέως στην καθημερινή μας ζωή [68].

Σουλφονικό υπερφθοροκτάνιο (Perfluorooctanesulfonic acid PFOS)

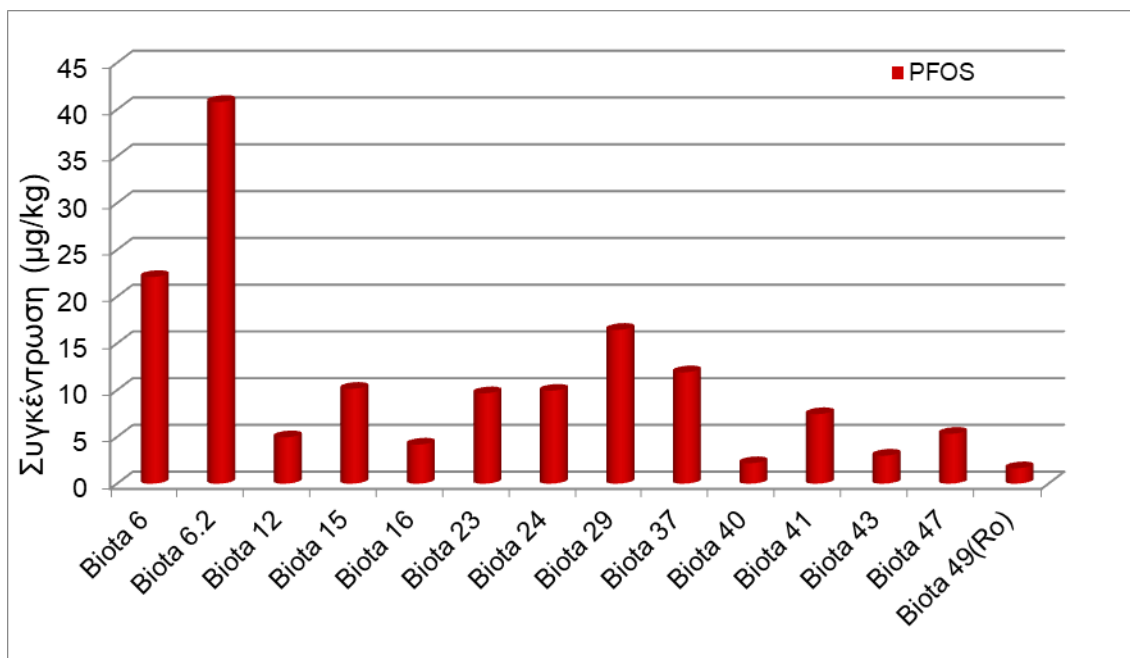
Το σουλφονικό υπερφθοροκτάνιο (PFOS) είναι ένας οργανικός ρύπος που βιοσυσσωρεύεται και ανιχνεύεται ευρέως σε περιβαλλοντικά δείγματα. Διατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή αλάτων, παραγώγων και πολυμερών. Χρησιμοποιείται ως συστατικό του υδατικού αφρού πυρόσβεσης (AFFF) και σε υλικά όπως είναι τα υφάσματα, τα χαλιά και το χαρτί για την αύξηση της αντοχής σε λίπη, λάδι και νερό.



Εικόνα 17: Δομή Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) [66].

Η έκθεση του ανθρώπου σε PFOS μπορεί να συμβεί μέσω της κατάποσης, της δερματικής επαφής ή της εισπνοής. Μελέτες δείχνουν ότι, για τον γενικό πληθυσμό, η κατάποση ψαριού και το πόσιμο νερό είναι οι κύριες οδοί έκθεσης [69]. Στο κεφάλαιο της βιβλιογραφικής ανασκόπησης έγινε αναφορά πολλών μελετών που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του συγκεκριμένου ρύπου. Το 2013 είχε γίνει ξανά ανίχνευση του ρύπου σε δείγματα ψαριών σε διάφορα σημεία του ποταμού Δούναβη [37]. Ο προσδιορισμός υψηλών συγκεντρώσεων PFOS στα ψάρια έχει γίνει και σε άλλους ποταμούς της Ευρώπης όπως είναι οι Júcar [44], Λιοβρεγάτ [46] και Έβρο [47] στην Ισπανία και ο ποταμός Saale στην Γερμανία με υψηλότερη συγκέντρωση τα 226 µg/kg. Παρόλο που καταργήθηκε σταδιακά πριν από σχεδόν 20 χρόνια στην Γερμανία, εξακολουθεί να είναι η κυρίαρχη ένωση σε πολλά δείγματα [38].

Η υψηλότερη συγκέντρωση που ανιχνεύτηκε στα δείγματα ήταν 41 $\mu\text{g/kg}$ στο δείγμα Biota 6.2 (Γερμανία) ενώ ακολουθεί το δείγμα Biota 6 (Γερμανία) με 22 $\mu\text{g/kg}$.



Σχήμα 8: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση PFOS.

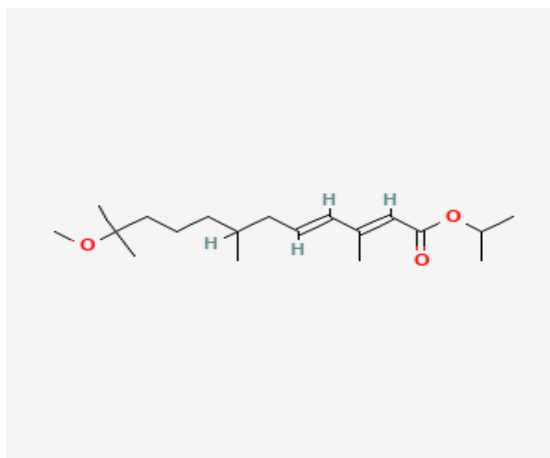
Η εκτιμώμενη μέση πρόσληψη PFOS των ενηλίκων σε τέσσερις ευρωπαϊκές χώρες: Ιταλία, Ολλανδία, Σουηδία και Ηνωμένο Βασίλειο κυμαίνεται από 45-58 μg ανά κιλό σωματικού βάρους ημερησίως με βάση τη μέση κατανάλωση ψαριών και προϊόντων αλιείας. Αυξημένα επίπεδα έχουν συσχετιστεί με μεταβαλλόμενα επίπεδα θυρεοειδικών ορμονών σε ενήλικες και αυξημένο κίνδυνο αυξημένης χοληστερόλης, αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου, αυξημένο κίνδυνο υπογονιμότητας κ.α. [69].

Τα τελευταία χρόνια θεσπίζονται κανονισμοί για τον περιορισμό της χρήσης PFOS και την εύρεση εναλλακτικών ουσιών. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, το PFOS δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε νέους αφρούς πυρόσβεσης, αλλά εκείνοι που ήταν ήδη στην αγορά πριν από τη θέσπιση της νομοθεσίας επιτρέπονταν για χρήση μέχρι τον Ιούνιο του 2011. Ωστόσο, παραμένουν ανησυχίες σχετικά με πιθανές χρόνιες εκθέσεις σε PFOS λόγω της περιβαλλοντικής ανθεκτικότητας και

τοξικότητάς του, ακόμη και μετά από κάθε διακοπή χρήσης ουσιών που περιέχουν PFOS [69].

Μεθοπρένιο (Methoprene)

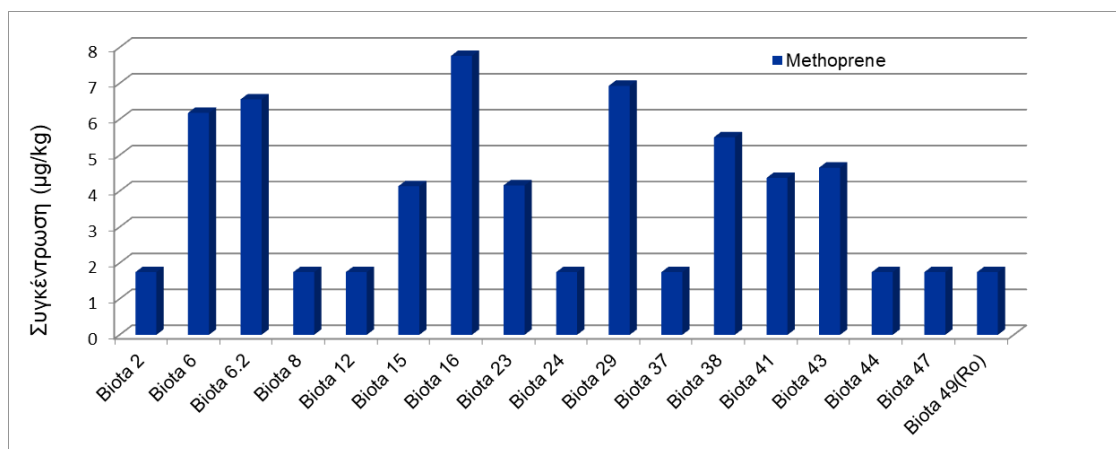
Το μεθοπρένιο (methoprene) ανήκει στις φυτοπροστατευτικές ενώσεις και συγκεκριμένα στα εντομοκτόνα. Ο σκοπός της χρήσης του δεν είναι να σκοτώσει τα έντομα αλλά να παρέμβει στον κύκλο ζωής τους και να τα εμποδίσει να ωριμάσουν ή να αναπαραχθούν. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται στην παραγωγή πολλών τροφίμων, όπως κρέας, γάλα, μανιτάρια, φιστίκια, ρύζι και δημητριακά όπως επίσης και για τον έλεγχο των ψύλλων στα κατοικίδια ζώα. Μία ακόμη χρήση του methoprene είναι η μείωση του αριθμού των προνυμφών των κουνουπιών (προνυμφοκτόνα) με αποτέλεσμα να μειωθεί η μετάδοση των παθογόνων που μεταφέρουν τα κουνούπια στον άνθρωπο και την άγρια ζωή [66].



Εικόνα 18: Δομή Methoprene [66].

Το μεθοπρένιο χαρακτηρίζεται ως χαμηλής τοξικότητας ένωση για τον άνθρωπο και άλλα σπονδυλωτά και μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε κατοικίδια ζώα και ζώα σε ζωολογικούς κήπους για τον έλεγχο ψύλλων, ακάρεων και άλλων παρασίτων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις δυσμενών επιπτώσεων στον άνθρωπο μετά από τυχαία έκθεση στο μεθοπρένιο.

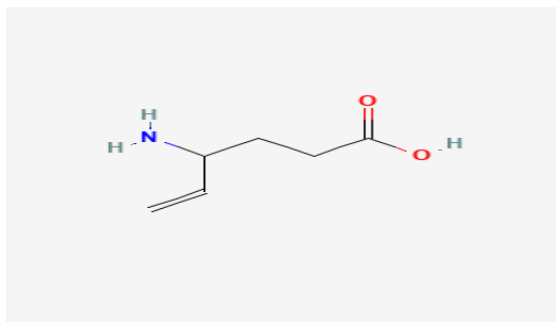
Επίσης, μελέτες που έχουν γίνει σε αμφίβια, ψάρια και πτηνά έδειξαν πως το μεθοπρένιο σε επίπεδα συγκεντώσεων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των κουνουπιών δεν είναι τοξική ένωση. Αντίθετα, έρευνες που έχουν γίνει σε θαλάσσια καρκινοειδή έχουν προκαλέσει ανησυχία. Αρνητικές επιδράσεις ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπήρχαν σε αστακούς και έμβρυα γαρίδας Mysid [70]. Η συγκέντρωση του μεθοπρενίου στα δείγματα κυμαίνεται από 1-8 $\mu\text{g/kg}$.



Σχήμα 9: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Methoprene.

Βιγαμπατρίνη (Vigabatrin)

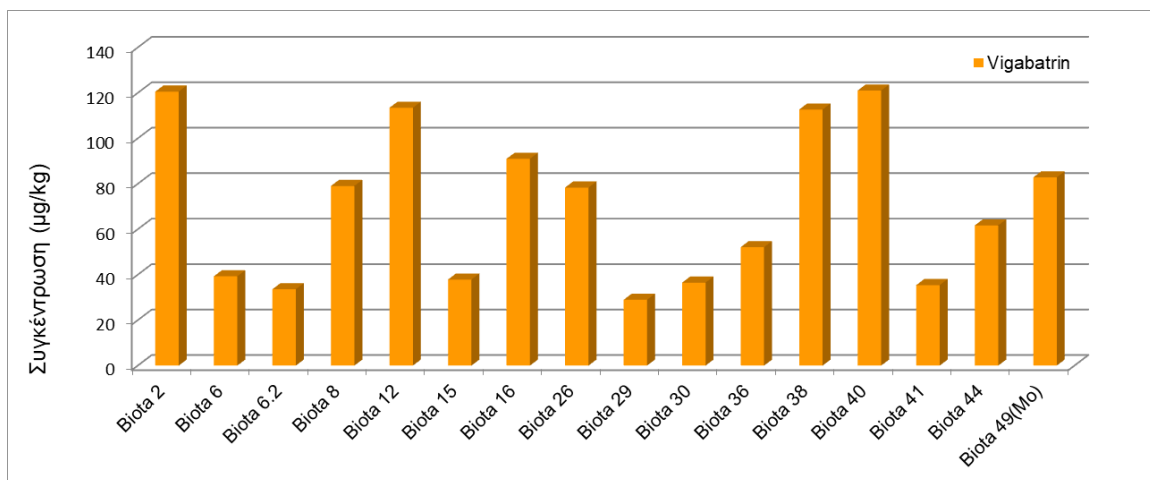
Η βιγαμπατρίνη (vigabatrin) είναι μια φαρμακευτική ένωση η οποία ανήκει στην κατηγορία των αντιεπιληπτικών. Είναι εκλεκτικός μη αναστρέψιμος αναστολέας της τρανσαμινάσης GABA, του ενζύμου που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση του GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ). Η βιγαμπατρίνη αυξάνει τη συγκέντρωση του GABA, του μείζονος ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή στον εγκέφαλο [65].



Εικόνα 19: Δομή Vigabatrin [66].

Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως αντιεπιληπτικό φάρμακο στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1989 και χρησιμοποιήθηκε εκτενώς μέχρι το 1997, ώσπου ανακαλύφθηκε ότι υπάρχει μια σχέση αυτού με την απώλεια όρασης. Ενδείκνυται πλέον ως εναλλακτική θεραπεία στη αντιμετώπιση επιληπτικών επεισοδίων σε ασθενείς ηλικίας από 2 ετών και άνω που είχαν ανεπαρκή ανταπόκριση σε προηγούμενες θεραπείες (δηλαδή δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για θεραπεία πρώτης γραμμής). Χρησιμοποιείται ένας στην θεραπεία παιδικών σπασμών σε ασθενείς ηλικίας 1 μηνός έως 2 ετών για ένας οποίος τα πιθανά οφέλη υπερτερούν του κινδύνου απώλειας όρασης [66] [71].

Η τιμή PNEC για την βιγαμπατρίνη είναι 54,2 $\mu\text{g/kg}$ ενώ το εύρος των συγκεντρώσεων που ξεπέρασαν αυτήν την τιμή είναι 62-121 $\mu\text{g/kg}$, με την υψηλότερη να ανιχνεύτηκε στο Biota 40 (Σερβία).



Σχήμα 10: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Vigabatrin.

Τραπιντίλ (Trapidil)

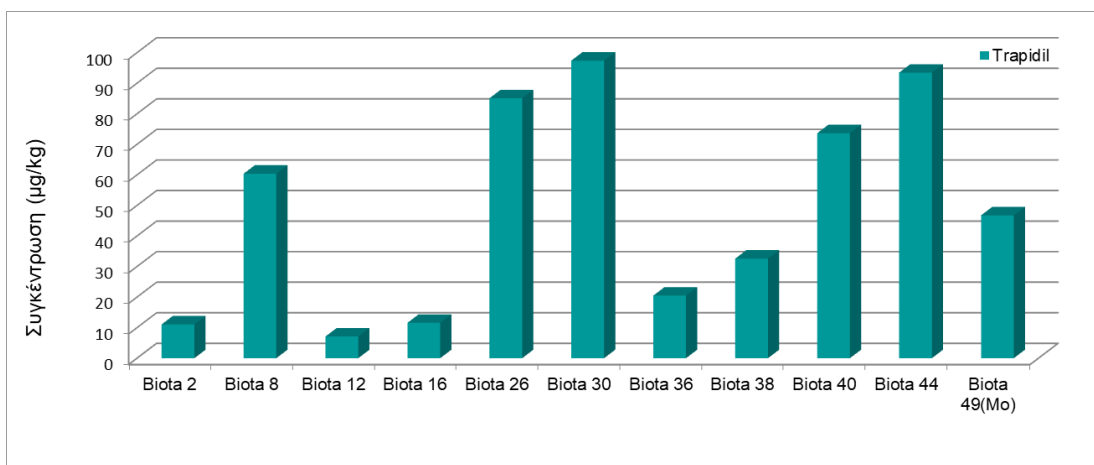
Το τραπιντίλ ανήκει στην κατηγορία των τριαζολοπυριμιδινών και είναι ένα αντιυπερτασικό φάρμακο το οποίο αναπτύχθηκε ως αγγειοδιασταλτικό και ως αντιαιμοπεταλιακός παράγοντας και χρησιμοποιείται για την θεραπεία ασθενών με ισχαιμική καρδιακή, ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια [66].



Εικόνα 20: Δομή trapidil.

Ως πιθανές παρενέργειες του φαρμάκου είναι η αύξηση των αιμορραγιών. Επίσης αλληλεπιδρά με πολλές διαφορετικές κατηγορίες φαρμάκων οι οποίες χρησιμοποιούνται πολύ συχνά από τον ευρύ πληθυσμό όπως είναι για παράδειγμα η ασπιρίνη (ακετυλοσαλικυλικό οξύ) προκαλώντας διάφορες παρενέργειες [72].

Η τιμή PNEC για το τραπιντίλ είναι 2,99 µg/kg ενώ το εύρος των συγκεντρώσεων που ξεπέρασαν αυτήν την τιμή είναι 7-93 µg/kg, με την υψηλότερη να ανιχνεύτηκε στο Biota 44 (Βουλγαρία).

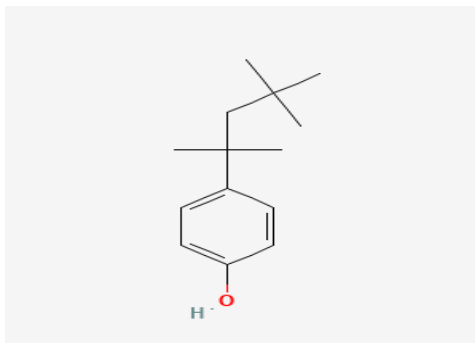


Σχήμα 11: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Trepidil.

4-tert-Octylphenol (4-t-OP)

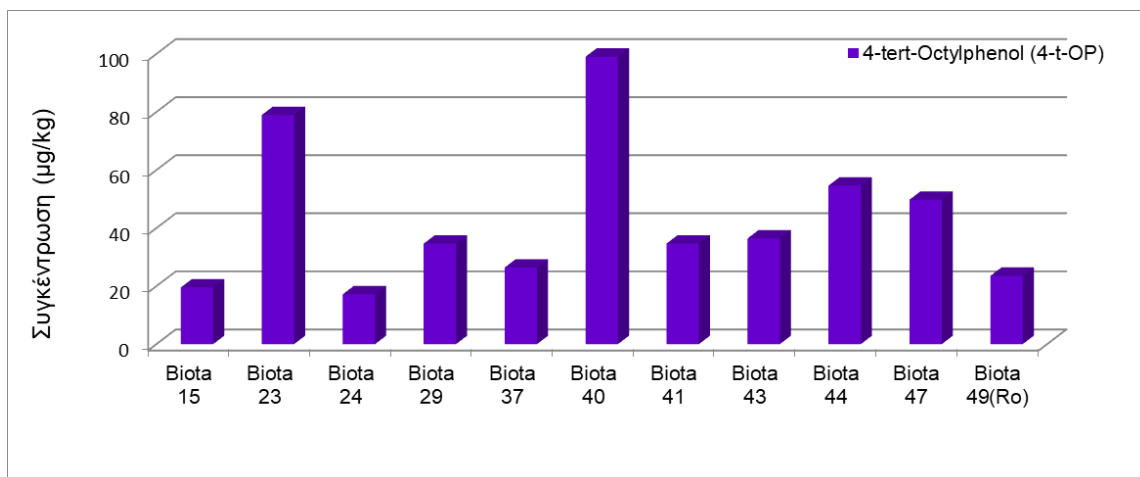
Η 4-tert-Octylphenol (4-t-OP) είναι μια αλκυλοφαινόλη που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία για την σύνθεση επιφανειοδραστικών ουσιών σε απορρυπαντικά,

βιομηχανικά καθαριστικά και γαλακτωματοποιητές. Η έκθεση του ανθρώπου σε αυτήν την ένωση μπορεί να συμβεί μέσω κατάποσης μολυσμένων τροφών (π.χ. ψαριών) και πόσιμου νερού ή μέσω της δερματικής επαφής με ορισμένα προϊόντα προσωπικής φροντίδας και απορρυπαντικά. Οι επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία από την συγκεκριμένη φαινόλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι άγνωστες μέχρι τώρα. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχει γίνει αναφορά εμφάνισης ενδοκρινικών διαταραχών που συνδέονται με έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτού του ρύπου [73].



Εικόνα 21: Δομή 4-tert-Octylphenol (4-t-OP) [66].

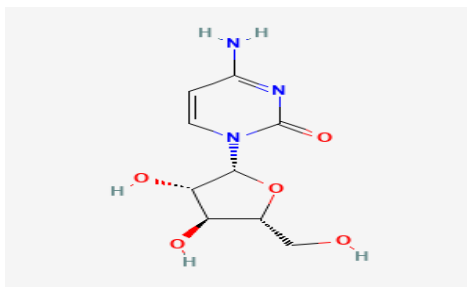
Η τιμή PNEC για την 4-tert-Octylphenol είναι 19,9 µg/kg ενώ το εύρος των συγκεντρώσεων που ξεπέρασαν αυτήν την τιμή είναι 24-99 µg/kg, με την υψηλότερη να ανιχνεύτηκε στο Biota 40 (Σερβία).



Σχήμα 12: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση 4-tert-Octylphenol.

Κυταραβίνη (Cytarabin)

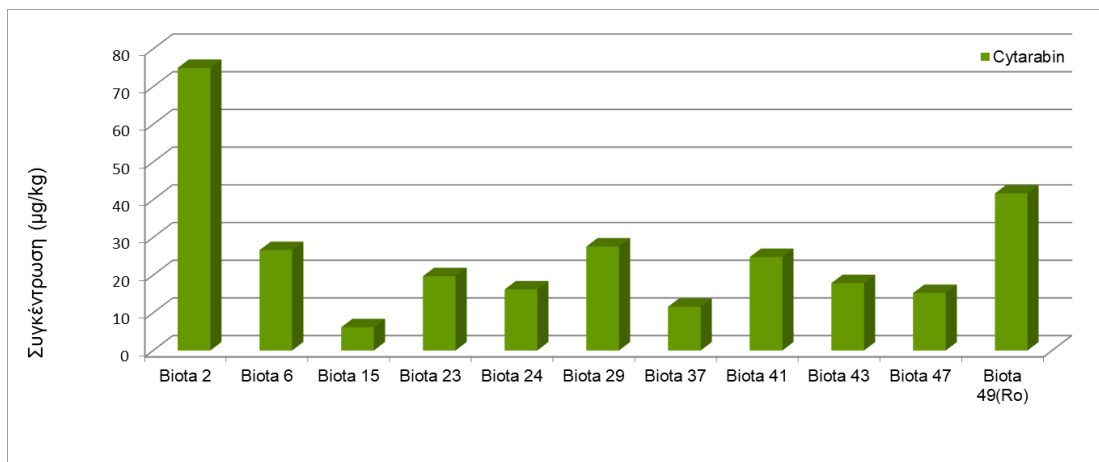
Η κυταραβίνη (cytarabin) είναι φάρμακο που χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία της λευχαιμίας. Διαθέτει επίσης αντιική δράση και έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία λοίμωξης από τον ιό έρπητα.



Εικόνα 22: Δομή Cytarabin [66].

Το συγκεκριμένο φάρμακο μπορεί να προκαλέσει μια σειρά παρενεργειών όπως είναι η καταστολή του μυελού των οστών, παγκρεατίτιδα, λευκοπενία, θρομβοπενία, αναιμία, γαστρεντερικές διαταραχές, στοματίτιδα, επιπεφυκίτιδα, πνευμονίτιδα, πυρετό και δερματίτιδα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, η κυταραβίνη μπορεί να προκαλέσει εγκεφαλική και παρεγκεφαλική δυσλειτουργία, οφθαλμική τοξικότητα, πνευμονική τοξικότητα και σοβαρό έλκος [74].

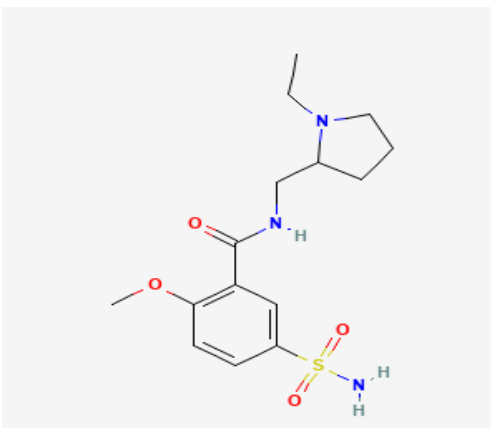
Η κυταραβίνη ανιχνεύτηκε στο 50% των δειγμάτων. Η τιμή PNEC της είναι 16 $\mu\text{g/kg}$ ενώ το εύρος των συγκεντρώσεων που ξεπέρασαν αυτήν την τιμή είναι 18-75 $\mu\text{g/kg}$, με την υψηλότερη να ανιχνεύτηκε στο Biota 2 (Γερμανία).



Σχήμα 13: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Cytarabin.

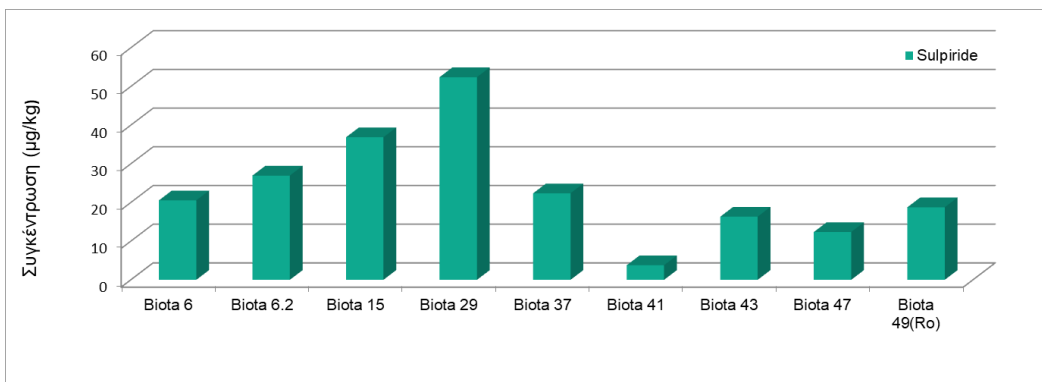
Σουλπιρίδη (sulpiride)

Η σουλπιρίδη (sulpiride) ανήκει στην κατηγορία των αντιψυχωσικών φαρμάκων και χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία της ψύχωσης που σχετίζεται με την σχιζοφρένεια, την καταθλιπτική διαταραχή και μερικές φορές χρησιμοποιείται σε χαμηλές δόσεις για τη θεραπεία του άγχους και της ήπιας κατάθλιψης.



Εικόνα 23: Δομή Sulpiride [66].

Σε περιπτώσεις υπερδοσολογίας, οι ασθενείς μπορεί να παρουσιάσουν υπόταση, φλεβοκομβική ταχυκαρδία, αρρυθμία, δυστονία, παραισθήσεις, εμετό, διέγερση, δυσαρθρία, σιελόρροια, καθώς και υπερρεπλεξία και έκταση πελματιαίου αντανάκλαστικού [72].

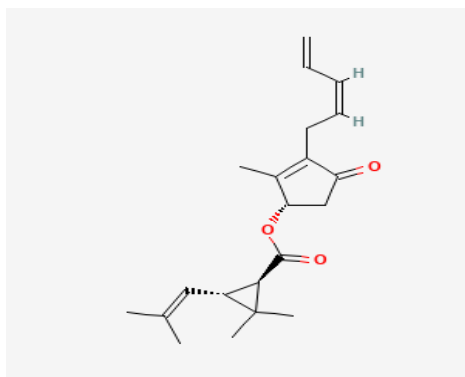


Σχήμα 14: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Sulpiride.

Η σουλπιρίδη ανιχνεύτηκε στο 40% των δειγμάτων με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 4-52 μg/kg ενώ 8 από αυτά τα δείγματα ξεπερνούσαν την τιμή PNEC (5,87 μg/kg).

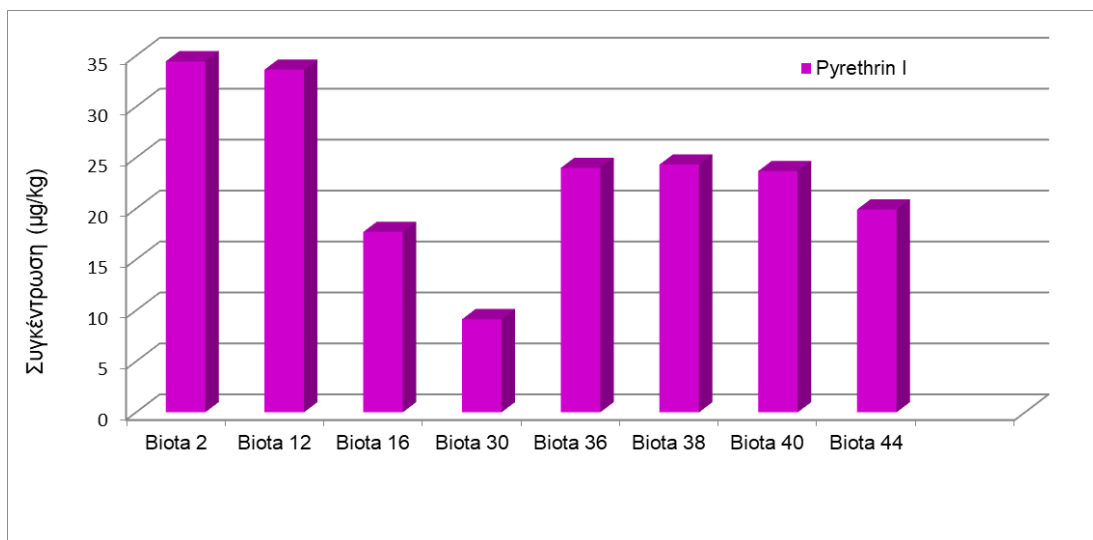
Πυρεθρίνη Ι (Pyrethrin I)

Η πυρεθρίνη Ι (Pyrethrin I) είναι μια οργανική ένωση με ισχυρή εντομοκτόνα δράση. Χρησιμοποιείται συνήθως σε σπρέι εσωτερικού χώρου, σαμπουάν για κατοικίδια και σε αεροζόλ για να σκοτώσουν τα έντομα. Αποτελεί αιτία δηλητηριάσεων από εντομοκτόνα καθώς αναφέρονται περισσότερα περιστατικά δηλητηρίασης με εντομοκτόνα από οποιαδήποτε άλλη κατηγορία εντομοκτόνων (εκτός από τα οργανοφωσφορικά). Τα συμπτώματα έκθεσης στην ένωση περιλαμβάνουν πονοκεφάλους, ζάλη και δυσκολία στην αναπνοή [75].



Εικόνα 24: Δομή Pyrethrin I [66].

Η πυρεθρίνη μπορεί να προκαλέσει επικίνδυνες αλλεργικές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της καρδιακής ανεπάρκειας και του σοβαρού άσθματος. Σε πειραματόζωα που εκτέθηκαν μέσω της τροφής ή μέσω της αναπνοής, οι πυρεθρίνες προκάλεσαν αναιμία. Πειράματα με αγελάδες δείχνουν ότι οι θηλάζουσες μητέρες που εκτίθενται σε πυρεθρίνες μπορούν να τις μεταδώσουν στα παιδιά τους. Επιπλέον, αγρότες που χρησιμοποιούν πυρεθρίνες έχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λευχαιμίας. Τέλος, είναι εξαιρετικά τοξικές για τις μέλισσες, τα ψάρια και άλλα υδρόβια ζώα [75].



Σχήμα 15: Ραβδόγραμμα με τα δείγματα όπου ανιχνεύτηκε η ένωση Pyrethrin I.

Εντοπίστηκε στο 36% των δειγμάτων με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 9 έως 34 µg/kg και όλες ξεπερνούσαν την τιμή PNEC της ένωσης (1,67 µg/kg)

6.2 Ύποπτη σάρωση

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζεται για τους αναλύτες που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα με ύποπτη σάρωση η κατηγορία που ανήκει ο κάθε αναλύτης, το NORMAN ID, το όνομα του, ο τύπος PNEC και η χαμηλότερη τιμή PNEC στα ψάρια για κάθε έναν από αυτούς.

Πίνακας 13: Αναλύτες που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα με ύποπτη σάρωση και οι τιμές PNEC τους.

Κατηγορία	Norman ID	Όνομα ένωσης	Τύπος PNEC	Χαμηλότερο όριο PNEC (µg/kg)
Industrial Chemicals	NS00020037	Ethyl 762	P-PNEC pred	240
	NS00038188	Cyclohexanone, 2-(hydroxymethylene)-	P-PNEC pred	99,7
	NS00038343	2,4,5-Tri-tert-butylphenol	P-PNEC pred	624
	NS00005309	Hexanedioic acid	P-PNEC pred	527
	NS00008025	cycloocta-1,5-diene	P-PNEC pred	599
	NS00002729	Tris(2-ethylhexyl) phosphate	P-PNEC pred	1,93
	NS00004569	methyl 9-decenoate	P-PNEC pred	92,6

NS00011501	Decanedioic acid	P-PNEC pred	132
NS00003402	diisopropylbenzene	P-PNEC pred	NA
NS00037066	3,5-Dimethoxybenzyl alcohol	P-PNEC pred	426
NS00002145	hexa-2,4-dienoic acid	P-PNEC pred	26,9
NS00039078	2-Oxononan-1-amide	P-PNEC pred	69,6
NS00039755	4-Allyl-2-methoxyphenyl heptanoate	P-PNEC pred	16,3
NS00004102	Methyl dihydrojasmonate	P-PNEC pred	117
NS00012842	Methyl abietate	P-PNEC pred	67,5
NS00012989	Acetylpyrazine	P-PNEC pred	75,8
NS00015672	2-Piperidone	P-PNEC pred	114
NS00021525	Nonanamide	P-PNEC pred	52,9
NS00032457	Isopropyl hydrogen adipate	P-PNEC pred	157
NS00011442	2-Methoxy-5-methylaniline	P-PNEC pred	81,6
NS00012275	Trivertal	P-PNEC pred	NA
NS00025201	1,4-Oxathiane	P-PNEC pred	15,3
NS00026591	2-Amino-6-methylpyridin-3-ol	P-PNEC pred	71,1
NS00032425	2-Methoxyphenylacetone	P-PNEC pred	56,3
NS00001343	Cyclohexanecarboxylic acid	P-PNEC pred	121
NS00010726	Erucamide	P-PNEC pred	1,11
NS00038281	3-Phenyl-3-propylpentane-1,5-diol	P-PNEC pred	63,6
NS00028682	4-Ethyl-4-formylhexanenitrile	P-PNEC pred	29,5
NS00012003	Benzenepropanol, .beta.-pentyl-	P-PNEC pred	406
NS00026985	Benzene, octyl-	P-PNEC pred	33,3
NS00019644	Propylene pentamer	P-PNEC pred	26,7
NS00022439	Cyclohexanol, 4-methyl-	P-PNEC pred	125
NS00008125	Caprolactam	P-PNEC pred	144
NS00021738	3-Octen-2-one	P-PNEC pred	47,4
NS00037276	11-Phenoxyundecanoic acid	P-PNEC pred	19,4
NS00002980	Amylmetacresol	P-PNEC pred	112

Pharmaceuticals	NS00023262	Benzeneacetamide	P-PNEC pred	147
	NS00013852	Methyl Deydroabie- tate	P-PNEC pred	71,1
	NS00005569	Tropicamide	P-PNEC pred	731
	NS00010336	Doxaprost	P-PNEC pred	NA
	NS00025045	Ibufenac	P-PNEC pred	129
	NS00022279	Gefarnate	P-PNEC pred	29,4
Agricultural Chemicals	NS00001051	Codlature	P-PNEC pred	73,4

Αφού ανιχνεύθηκαν οι παραπάνω ουσίες από τη διαδικασία ύποπτης σάρωσης μέσω της πλατφόρμας DSFP, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις τους στους Πίνακες 14 και 15.

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με ύποπτη σάρωση στα δείγματα 2 έως 29.

Όνομα ένωσης	Biota 2	Biota 6	Biota 6.2	Biota 8	Biota 12	Biota 15	Biota 16	Biota 23	Biota 24	Biota 26	Biota 29
Ethyl 762	1292	781	779	597	761	725	566	1045	829	516	2037
Cyclohexanone, 2-(hydroxymethylene)-	4,2	2,3	3,2	1,3	0,7	5,8	2,0	17	6,7	3,3	16
2,4,5-Tri-tert-butylphenol	347	238	115	578	349	560	298	1134	1057	539	996
Amylmetacresol	ND	14	9,4	28	16	12	10	47	49	27	50
Benzeneacetamide	ND	33	871	5,6	2,2	11	2,0	14	8,3	5,9	17
Hexanedioic acid	0,5	ND	2,0	0,78	0,32	ND	0,39	3,3	2,8	0,7	3,8
cycloocta-1,5-diene	NA	14	19	8,5	ND	11	9,0	17	17	12	21
Methyl dehydroabie-tate	ND	4,9	3,0	ND	0,2	1,6	NA	0,39	0,43	ND	ND
Tris(2-ethylhexyl) phosphate	0,7	ND	ND	1,4	2,0	ND	1,2	9,3	6,9	0,9	0,3
methyl 9-decenoate	ND	ND	ND	ND	ND	43	14	70	62	25	64
Decanedioic acid	1,0	ND	3,3	ND	1,0	ND	ND	19	8,5	2,1	7,5
diisopropylbenzene	ND	13	14	ND	9,5	14	9,3	19	19	ND	21
3,5-Dimethoxybenzyl alcohol	ND	14	ND	ND	ND	34	ND	39	45	10	115
hexa-2,4-dienoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	63	ND	378	245	ND	296
Tropicamide	222	ND	ND	187	222	ND	228	ND	ND	223	ND
2-Oxononan-1-amide	ND	1,0	0,69	ND	ND	2,3	ND	7,9	9,8	ND	2,9
4-Allyl-2-methoxyphenyl heptanoate	ND	2,5	3,9	ND	ND	1,4	ND	1,2	1,6	ND	1,9
Methyl dihydrojasmonate	ND	0,5	ND	ND	ND	0,23	ND	1,4	1,1	ND	1,5
Doxaprost	ND	124	17	ND	ND	57	ND	177	204	ND	321
Methyl abietate	ND	0,6	0,5	ND	ND	0,7	0,07	ND	0,3	ND	0,6

Acetylpyrazine	ND	125	191	ND	ND	169	ND	268	268	ND	282
2-Piperidone	ND	35	3,6	ND	ND	3,1	ND	7,3	6,8	ND	10,4
Nonanamide	ND	0,2	ND	ND	ND	0,5	ND	0,8	1,1	ND	0,3
Ibufenac	ND	16	6,6	ND	ND	24	ND	27	29	ND	39
Isopropyl hydrogen adipate	ND	0,2	0,3	ND	ND	0,5	ND	3,9	1,9	ND	1,5
Codlure	22	39	178	ND	9,0	ND	ND	24	18	ND	25
2-Methoxy-5-methylaniline	ND	ND	ND	ND	ND	15	ND	13	19	ND	15
Trivertal	ND	210	214	ND	ND	ND	ND	468	410	ND	424
1,4-Oxathiane	ND	0,3	ND	ND	ND	0,3	ND	0,2	0,3	ND	0,3
2-Amino-6-methylpyridin-3-ol	ND	0,4	0,3	ND	ND	0,4	ND	1,3	1,3	ND	1,1
2-Methoxyphenylacetone	ND	4,0	ND	ND	ND	6,9	ND	7,4	9,9	ND	15
Cyclohexanecarboxylic acid	ND	ND	ND	ND	ND	1,0	ND	1,5	1,5	ND	1,0
Erucamide	ND	0,04	0,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,01
Gefarnate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9,8	1174	393	ND	36
3-Phenyl-3-propylpentane-1,5-diol	ND	ND	ND	ND	ND	0,1	ND	0,1	0,08	ND	0,1
4-Ethyl-4-formylhexanenitrile	ND	17	ND	ND	ND	7,1	ND	ND	ND	ND	ND
Benzenepropanol, .beta.-pentyl-	ND	ND	ND	ND	ND	0,05	ND	0,09	0,08	ND	ND
Benzene, octyl-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	18	14	ND	ND
Propylene pentamer	ND	ND	ND	ND	0,8	ND	0,5	0,8	0,9	ND	ND
Cyclohexanol, 4-methyl-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,8	ND	ND	ND
Caprolactam	ND	21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,0
3-Octen-2-one	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15	ND	ND	ND
11-Phenoxyundecanoic acid	ND	ND	34	ND	ND	ND	ND	ND	22	ND	29

*ND : Not Detected

Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις για κάθε ένωση που ανιχνεύτηκε με ύποπτη σάρωση στα δείγματα 30 έως 49. Συνέχεια από προηγούμενο πίνακα.

Όνομα ένωσης	Biota 30	Biota 36	Biota 37	Biota 38	Biota 40	Biota 41	Biota 43	Biota 44	Biota 47	Biota 49 (Ro)	Biota 49 (Mo)
Ethyl 762	672	623	1183	682	979	1170	1135	1006	1322	884	650
Cyclohexanone, 2-(hydroxymethylene)-	5,5	1,1	17	1,9	4,3	8,0	7,1	3,2	7,4	5,7	2,0
2,4,5-Tri-tert-butylphenol	445	332	1363	375	623	510	1314	286	932	430	470
Amylmetacresol	27	34	47	18	26	41	49	41	49	18	25
Benzeneacetamide	1,7	1,1	16	4,7	5,4	19	3,9	3,3	11	39	11
Hexanedioic acid	1,5	0,6	4,8	0,4	0,7	ND	3,6	0,9	3,0	1,7	0,3
cycloocta-1,5-diene	ND	9,7	14	11	ND	18	13	10	19	11	8,8
Methyl dehydroabietate	0,09	0,2	0,1	0,1	0,1	4,6	0,3	0,3	0,8	0,3	0,07
Tris(2-ethylhexyl) phosphate	ND	1,9	ND	0,5	0,4	ND	4,1	0,5	4,0	ND	ND
methyl 9-decenoate	ND	14	90	ND	31	26	70	12	59	33	22
Decanedioic acid	ND	1,1	36	ND	1,8	3,4	9,1	ND	9,1	13	ND
diisopropylbenzene	ND	ND	12	ND	ND	20	19	ND	18	3,8	ND

3,5-Dimethoxybenzyl alcohol	ND	ND	48	ND	19	29	10	16	35	39	ND
hexa-2,4-dienoic acid	105	31	381	ND	31	100	214	ND	299	168	ND
Tropicamide	204	190	ND	249	266	ND	ND	150	ND	ND	250
2-Oxononan-1-amide	1,3	ND	14	ND	ND	1,9	11	ND	6,8	6,4	ND
4-Allyl-2-methoxyphenyl heptanoate	ND	ND	1,4	ND	ND	2,6	1,6	ND	2,1	0,6	ND
Methyl dihydrojasmonate	ND	ND	1,1	ND	ND	1,2	0,9	ND	1,2	0,9	ND
Doxaprost	ND	ND	133	ND	ND	211	230	ND	213	103	ND
Methyl abietate	ND	0,06	ND	ND	ND	1,5	ND	0,08	0,4	0,1	ND
Acetylpyrazine	ND	ND	137	ND	ND	229	215	ND	253	12	ND
2-Piperidone	ND	ND	16,6	ND	ND	3,6	7,2	ND	7,9	7,6	ND
Nonanamide	ND	ND	0,3	ND	ND	0,4	1,3	ND	0,4	1,8	ND
Ibufenac	ND	ND	27	ND	ND	31	24	ND	30	24	ND
Isopropyl hydrogen adipate	ND	ND	8,4	ND	ND	0,6	1,9	ND	1,5	2,0	ND
Codlure	4,3	ND	ND	ND	ND	15	13	ND	ND	ND	ND
2-Methoxy-5-methylaniline	ND	ND	3,6	ND	ND	16	7,9	ND	10	41	ND
Trivertal	ND	ND	712	ND	ND	344	453	ND	424	316	ND
1,4-Oxathiane	ND	ND	0,1	ND	ND	0,3	0,3	ND	0,3	0,4	ND
2-Amino-6-methylpyridin-3-ol	ND	ND	0,7	ND	0,07	ND	0,9	ND	ND	0,4	ND
2-Methoxyphenylacetone	ND	ND	5,7	ND	ND	8,9	6,0	ND	8,2	6,2	ND
Cyclohexanecarboxylic acid	ND	ND	2,3	ND	ND	0,6	1,8	ND	0,9	0,5	ND
Erucamide	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,3	0,01	ND
Gefarnate	ND	ND	45	ND	5,4	ND	119	ND	104	ND	ND
3-Phenyl-3-propylpentane-1,5-diol	ND	ND	0,1	ND	ND	0,05	0,08	ND	0,1	ND	ND
4-Ethyl-4-formylhexanenitrile	ND	1,0	8,9	ND	ND	14	ND	ND	ND	16	11
Benzenepropanol, .beta.-pentyl-	ND	ND	0,1	ND	ND	ND	0,1	ND	0,08	ND	ND
Benzene, octyl-	ND	ND	44	ND	ND	ND	31	ND	31	ND	ND
Propylene pentamer	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cyclohexanol, 4-methyl-	ND	ND	2,0	ND	ND	ND	0,9	ND	0,7	ND	ND
Caprolactam	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3-Octen-2-one	ND	ND	25	ND	ND	ND	9,8	ND	ND	ND	ND
11-Phenoxyundecanoic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*ND : Not Detected

Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του κινδύνου για το σύνολο των ενώσεων που εντοπίστηκαν με ύποπτη σάρωση. Στον Πίνακα 16 συνοψίζεται το σύνολο των ενώσεων, η συχνότητα εμφάνισης τους στα δείγματα (FoA), η συχνότητα υπέρβασης της τιμής PNEC (FoE), η έκταση της υπέρβασης της τιμής PNEC (EoE) καθώς και ο βαθμός κινδύνου από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο.

Αναφέρονται μόνο οι ενώσεις με τιμή > 1,01 καθώς για τις υπόλοιπες ενώσεις, ο κίνδυνος θεωρείται αμελητέος.

Πίνακας 16: Εκτίμηση κινδύνου για τις ενώσεις που εντοπίστηκαν με ύποπτη σάρωση στα δείγματα.

Norman ID	Όνομα ένωσης	FoA	FoE	EoE	Βαθμός κινδύνου
NS00020037	Ethyl 762	1,0	1,0	1,0	3,0
NS00013852	Methyl dehydroabie-tate	0,7	0,5	1,0	2,2
NS00012989	Acetylpyrazine	0,5	0,5	1,0	2,0
NS00025201	1,4-Oxathiane	0,5	0,5	1,0	1,9
NS00025045	Ibuprofen	0,5	0,4	1,0	1,9
NS00037066	3,5-Dimethoxybenzyl alcohol	0,6	0,5	0,5	1,5
NS00014365	Tropicamide	0,5	0,5	0,1	1,1

Συμπερασματικά, στην παρούσα διπλωματική ταυτοποιήθηκαν συνολικά 97 αναδυόμενοι ρύποι, με στοχευμένη και ύποπτη σάρωση. Μετά την αξιολόγηση των συγκεντρώσεων τους, συγκρίνοντας τες με βάση τις τιμές προβλεπόμενης συγκέντρωσης χωρίς επιπτώσεις (PNEC), 16 από αυτούς βρέθηκαν να υπερβαίνουν τα περιβαλλοντικά όρια. Όμως δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για τη συμπεριφορά των αναδυόμενων ρύπων στο περιβάλλον και τις απειλές για την οικολογία και την ανθρώπινη υγεία. Συνεπώς απαιτείται περισσότερη διερεύνηση σχετικά με την συμπεριφορά τους καθώς και διαμόρφωση κατάλληλου θεσμικού πλαισίου για τον περιορισμό των συγκεκριμένων ενώσεων στο περιβάλλον.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 17: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

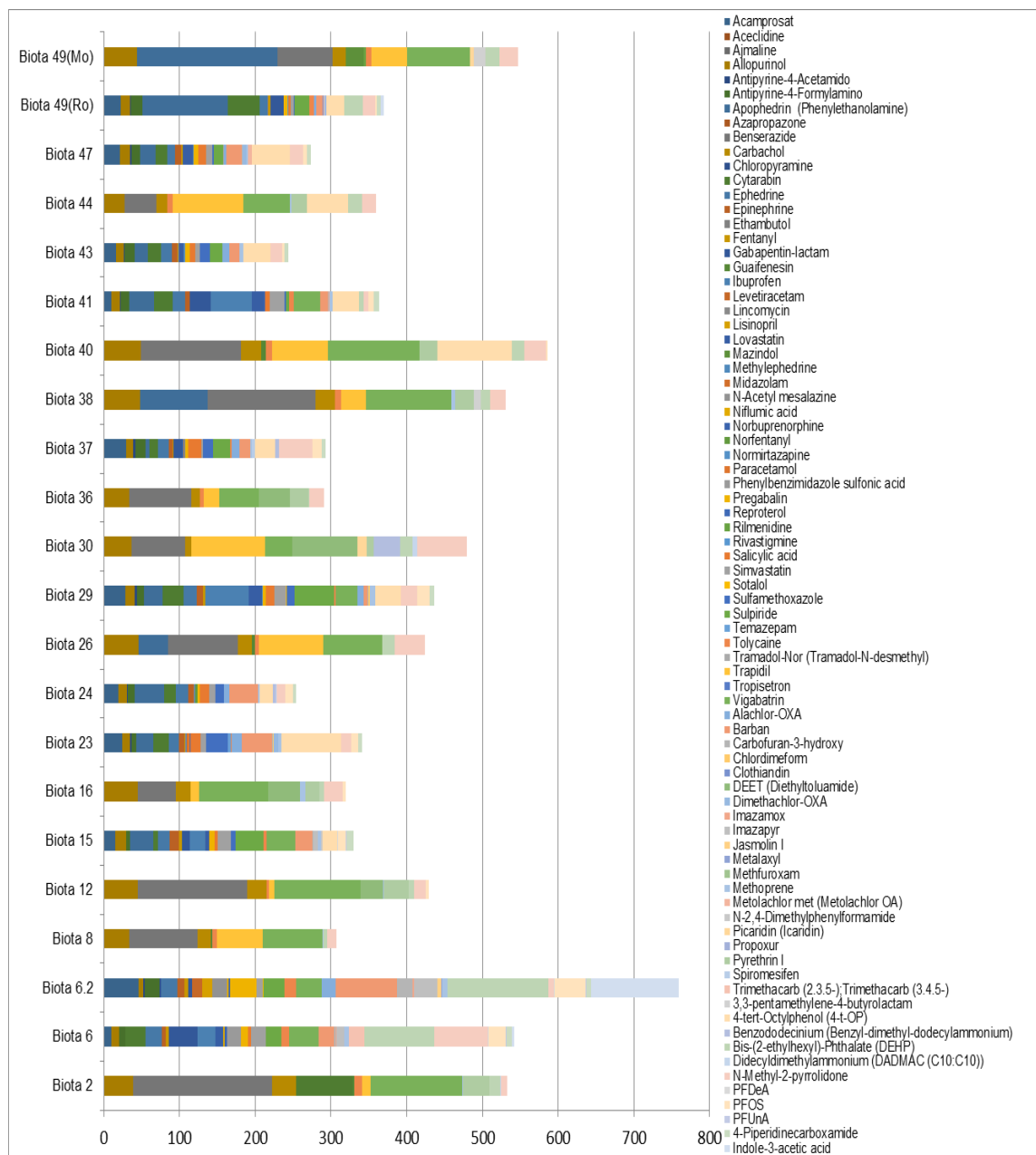
Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
emerging contaminants	αναδυόμενοι ρύποι
isotopic fit	ταύτιση του ισοτοπικού προφίλ
risk score	βαθμός κινδύνου

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

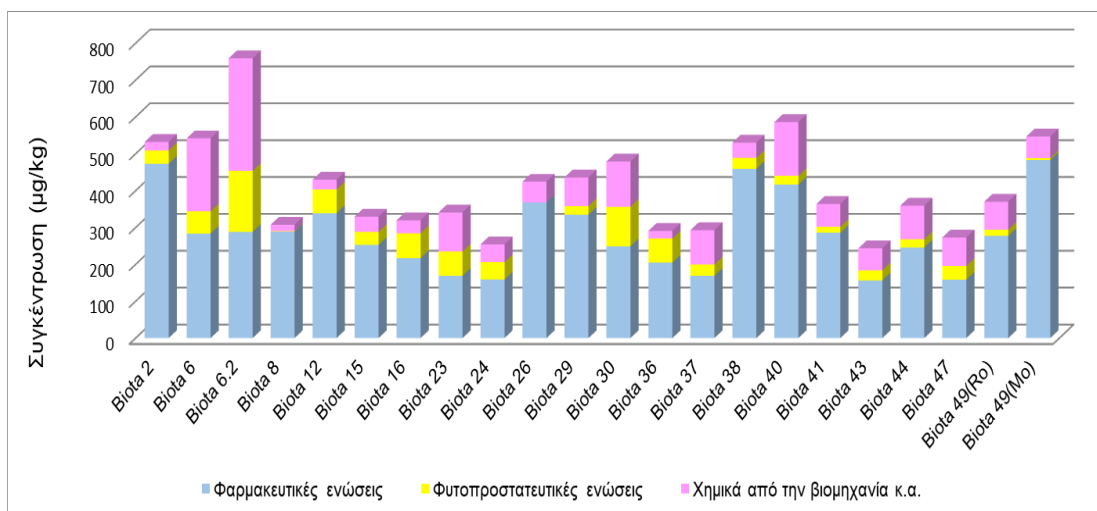
Πίνακας 18: Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους.

DSFP	Digital Sample Freezing Platform
PNEC	Provisional No Effect Concentration
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
JDS	Joint Danube Survey
EQS	Environmental quality standard
FoA	Frequency of Appearance
FoE	Frequency of PNEC Exceedance
EoE	Extent of PNEC Exceedance
LOQ	Limit Of Quantification
LOD	Limit Of Detection

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

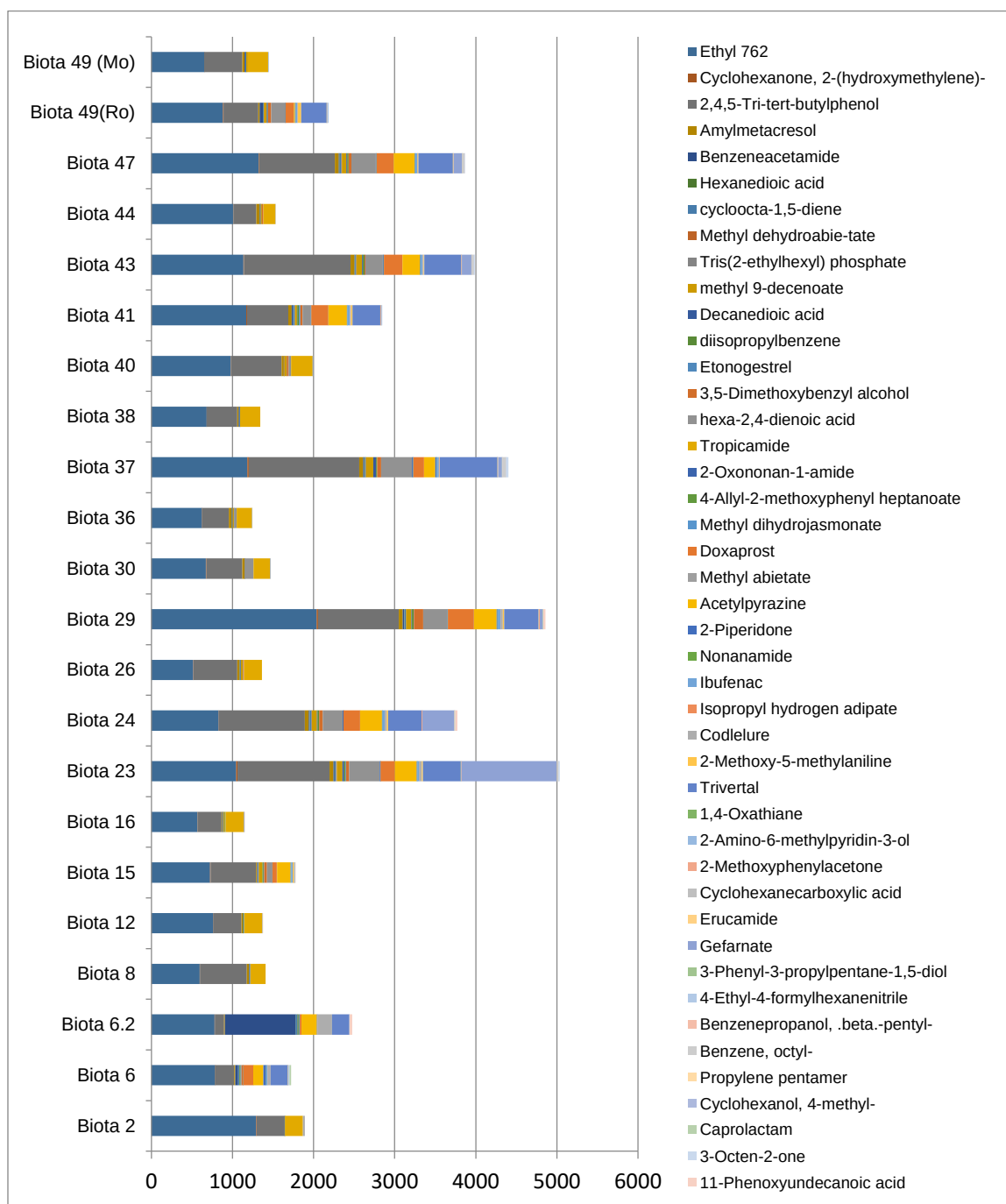


Σχήμα 16: Συγκέντρωση αναδυόμενων ρύπων που εντοπίστηκαν με στοχευμένη σάρωση στα δείγματα.



Σχήμα 17: Ραβδόγραμμα με τις συνολικές συγκεντρώσεις ανά κατηγορία αναδυόμενων ρύπων που εντοπίστηκαν με στοχευμένη σάρωση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II



Σχήμα 18: Συγκέντρωση αναδυόμενων ρύπων που εντοπίστηκαν με ύποπτη σάρωση στα δείγματα.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] V. Kováč, Current Status of Fish Communities in the Danube, in: I. Liska (Ed.), Danube River Basin, Springer, Berlin, Heidelberg, 2015: pp. 359–388. https://doi.org/10.1007/698_2015_377.
- [2] Main Page, Wikipedia Free Encycl. (2021). https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Main_Page&oldid=1004593520 (accessed August 23, 2021).
- [3] Χώρες που περνάει ο Δούναβης | Map, Map screenshot, Pinterest. (n.d.). <https://www.pinterest.com/pin/445363850621582077/> (accessed June 17, 2021).
- [4] A. Varduca, The 1985 Bucharest Declaration, in: I.L. Murphy (Ed.), Prot. Danube River Basin Resour. Ensuring Access Water Qual. Data Inf., Springer Netherlands, Dordrecht, 1997: pp. 31–41. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2805-8_4.
- [5] I. Liska, F. Wagner, K. Deutsch, J. Slobodník, M. Paunović, M. Sengl, JOINT DANUBE SURVEY 4 SCIENTIFIC REPORT: A SHARED ANALYSIS OF THE DANUBE RIVER, 2021.
- [6] L.B. Barber, 1.13 - Emerging Contaminants, in: S. Ahuja (Ed.), Compr. Water Qual. Purif., Elsevier, Waltham, 2014: pp. 245–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00015-3>.
- [7] S. Sauvé, M. Desrosiers, A review of what is an emerging contaminant, Chem. Cent. J. 8 (2014) 15. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-15>.
- [8] A. Asimakopoulos, A. Bletsou, N. Thomaidis, Emerging contaminants: A tutorial mini-review, Glob. Nest J. 14 (2012) 72–79.
- [9] L. Boulard, P. Parrhysius, B. Jacobs, G. Dierkes, A. Wick, G. Buchmeier, J. Koschorreck, T.A. Ternes, Development of an analytical method to quantify

pharmaceuticals in fish tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection and application to environmental samples, *J. Chromatogr. A.* 1633 (2020) 461612. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461612>.

[10] L. Dsikowitzky, J. Schwarzbauer, Industrial organic contaminants: identification, toxicity and fate in the environment, *Environ. Chem. Lett.* 12 (2014) 371–386. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0467-1>.

[11] C. Maggi, A. Ausili, R. Boscolo, F. Cacciatore, A. Bonometto, M. Cornello, D. Berto, Sediment and biota in trend monitoring of contaminants in transitional waters, *TrAC Trends Anal. Chem.* 36 (2012) 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.01.006>.

[12] W.N. Beyer, J.P. Meador, *Environmental Contaminants in Biota: Interpreting Tissue Concentrations*, Second Edition, CRC Press, 2011.

[13] Μιχαήλ Σκούλλος, Παναγιώτης Σίσκος, ΧΗΜΕΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΣΥΜΜΕΤΡΙΑ, 2010.

[14] C. Franke, G. Studinger, G. Berger, S. Böhling, U. Bruckmann, D. Cohors-Fresenborg, U. Jöhncke, The assessment of bioaccumulation, *Chemosphere.* 29 (1994) 1501–1514. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90281-X](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90281-X).

[15] J.M. Peña-Herrera, N. Montemurro, D. Barceló, S. Pérez, Combining quantitative and qualitative approaches using Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment-Ion methodology for the detection of pharmaceuticals and related compounds in river fish extracted using a sample miniaturized method, *J. Chromatogr. A.* 1620 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461009>.

[16] G. Daniele, M. Fieu, S. Joachim, A. Bado-Nilles, P. Baudoin, C. Turies, J.-M. Porcher, S. Andres, E. Vulliet, Rapid analysis of diclofenac and some of its transformation products in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*,

by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4435–4444. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9541-9>.

[17] A. Gogoi, P. Mazumder, V.K. Tyagi, G.G. Tushara Chaminda, A.K. An, M. Kumar, Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review, *Groundw. Sustain. Dev.* 6 (2018) 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2017.12.009>.

[18] M.V. Barbieri, C. Postigo, N. Guillem-Argiles, L.S. Monllor-Alcaraz, J.I. Simionato, E. Stella, D. Barceló, M. López de Alda, Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination, *Sci. Total Environ.* 653 (2019) 958–967. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.289>.

[19] I. Mahmood, S.R. Imadi, K. Shazadi, A. Gul, K.R. Hakeem, Effects of Pesticides on Environment, in: K.R. Hakeem, M.S. Akhtar, S.N.A. Abdullah (Eds.), *Plant Soil Microbes Vol. 1 Implic. Crop Sci.*, Springer International Publishing, Cham, 2016: pp. 253–269. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13.

[20] M. la Farré, S. Pérez, L. Kantiani, D. Barceló, Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, *TrAC Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>.

[21] T.T. Schug, A. Janesick, B. Blumberg, J.J. Heindel, Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127 (2011) 204–215. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.007>.

[22] M. Cargouët, D. Perdiz, A. Mouatassim-Souali, S. Tamisier-Karolak, Y. Levi, Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France), *Sci. Total Environ.* 324 (2004) 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.10.035>.

- [23] M. Lei, L. Zhang, J. Lei, L. Zong, J. Li, Z. Wu, Z. Wang, Overview of Emerging Contaminants and Associated Human Health Effects, *BioMed Res. Int.* 2015 (2015) e404796. <https://doi.org/10.1155/2015/404796>.
- [24] V. Geissen, H. Mol, E. Klumpp, G. Umlauf, M. Nadal, M. van der Ploeg, S.E.A.T.M. van de Zee, C.J. Ritsema, Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management, *Int. Soil Water Conserv. Res.* 3 (2015) 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>.
- [25] Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007.
- [26] Κουππάρης Μιχαήλ, Σημειώσεις στο μάθημα Προχωρημένη Αναλυτική Χημεία, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών- Αναλυτική Χημεία- Διασφάλιση Ποιότητας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών., in: 2019.
- [27] W.M.A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, CRC Press, 2006.
- [28] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd edition, Wiley, 2011.
- [29] P.K. Dasgupta, K.A. Schug, G.D. Christian, *Analytical Chemistry*, 7th edition, Wiley, Hoboken, NJ, 2013.
- [30] HPLC Help Center, (n.d.). <https://www.idex-hs.com/literature-tools/educational-materials/hplc-center/> (accessed May 25, 2021).
- [31] M.W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*, 1st edition, John Wiley & Sons, Hoboken, N.J, 2006.
- [32] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd edition, Wiley-Interscience, Chichester Weinheim, 2007.

- [33] Θωμαΐδης Νικόλαος, Σημειώσεις στο μάθημα Προχωρημένη Αναλυτική Χημεία, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών- Αναλυτική Χημεία- Διασφάλιση Ποιότητας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών., in: 2019.
- [34] Αλυγιζάκης Νικηφόρος, Αξιολόγηση χημειομετρικών τεχνικών για την ανάλυση τάσεων από μη στοχευμένη LC-Q-TOFMS ανάλυση λυμάτων, Διπλωματική εργασία, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών., in: 2015.
- [35] Christopher G. Herbert, Robert A. W. Johnstone, Mass spectrometry basics, CRC Press LLC, 2003.
<https://www.proquest.com/openview/76ee66dcc9951072743f08ebc4834c40/1?p-q-origsite=gscholar&cbl=2043687>.
- [36] 46.
<http://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/BIOL208/MASS%20SPECTROSCOPY.pdf>, n.d.
- [37] R. Loos, S. Tavazzi, G. Mariani, G. Suurkuusk, B. Paracchini, G. Umlauf, Analysis of emerging organic contaminants in water, fish and suspended particulate matter (SPM) in the Joint Danube Survey using solid-phase extraction followed by UHPLC-MS-MS and GC-MS analysis, Sci. Total Environ. 607–608 (2017) 1201–1212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.039>.
- [38] M. Kotthoff, A. Fliedner, H. Rüdell, B. Göckener, M. Bücking, A. Biegel-Engler, J. Koschorreck, Per- and polyfluoroalkyl substances in the German environment – Levels and patterns in different matrices, Sci. Total Environ. 740 (2020) 140116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140116>.
- [39] G. Santín, E. Eljarrat, D. Barceló, Simultaneous determination of 16 organophosphorus flame retardants and plasticizers in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1441 (2016) 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.058>.

- [40] A. Baesu, G. Ballash, D. Mollenkopf, T. Wittum, S.M.P. Sulliván, S. Bayen, Suspect screening of pharmaceuticals in fish livers based on QuEChERS extraction coupled with high resolution mass spectrometry, *Sci. Total Environ.* 783 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146902>.
- [41] A. Masiá, J. Campo, P. Vázquez-Roig, C. Blasco, Y. Picó, Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain), *J. Hazard. Mater.* 263 (2013) 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.035>.
- [42] V. Belenguer, F. Martinez-Capel, A. Masiá, Y. Picó, Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and waters of the Júcar River (Eastern Spain), *J. Hazard. Mater.* 265 (2014) 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.016>.
- [43] Y. Gu, X. Yu, J. Peng, S. Chen, Y. Zhong, D. Yin, X. Hu, Simultaneous solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry and gas chromatography tandem mass spectrometry for the highly sensitive determination of 15 endocrine disrupting chemicals in seafood, *J. Chromatogr. B.* 965 (2014) 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.06.024>.
- [44] J. Campo, M. Lorenzo, F. Pérez, Y. Picó, Marinel. la Farré, D. Barceló, Analysis of the presence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and biota of the Jucar River (E Spain). Sources, partitioning and relationships with water physical characteristics, *Environ. Res.* 147 (2016) 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.03.010>.
- [45] I. Abdel Malak, R. Cariou, A. Vénisseau, G. Dervilly-Pinel, F. Jaber, M. Babut, B. Le Bizec, Occurrence of Dechlorane Plus and related compounds in catfish (*Silurus spp.*) from rivers in France, *Chemosphere.* 207 (2018) 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.101>.

- [46] J. Campo, F. Pérez, A. Masiá, Y. Picó, Marinel. la Farré, D. Barceló, Perfluoroalkyl substance contamination of the Llobregat River ecosystem (Mediterranean area, NE Spain), *Sci. Total Environ.* 503–504 (2015) 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.094>.
- [47] E. Pignotti, G. Casas, M. Llorca, A. Tellbüscher, D. Almeida, E. Dinelli, M. Farré, D. Barceló, Seasonal variations in the occurrence of perfluoroalkyl substances in water, sediment and fish samples from Ebro Delta (Catalonia, Spain), *Sci. Total Environ.* 607–608 (2017) 933–943. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.025>.
- [48] H. Xie, H. Hao, N. Xu, X. Liang, D. Gao, Y. Xu, Y. Gao, H. Tao, M. Wong, Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment, *Sci. Total Environ.* 659 (2019) 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.222>.
- [49] P.M. Ondarza, S.P. Haddad, E. Avigliano, K.S.B. Miglioranza, B.W. Brooks, Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization, *Sci. Total Environ.* 649 (2019) 1029–1037. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.383>.
- [50] T.F.T. Omar, A.Z. Aris, F.Md. Yusoff, Multiclass analysis of emerging organic contaminants in tropical marine biota using improved QuEChERS extraction followed by LC MS/MS, *Microchem. J.* 164 (2021) 106063. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106063>.
- [51] A.M. Ali, H.T. Rønning, L.K. Sydnæs, W.M. Alarif, R. Kallenborn, S.S. Al-Lihaibi, Detection of PPCPs in marine organisms from contaminated coastal waters of the Saudi Red Sea, *Sci. Total Environ.* 621 (2018) 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.298>.
- [52] M. Llorca, M. Farré, M.S. Tavano, B. Alonso, G. Koremblit, D. Barceló, Fate of a broad spectrum of perfluorinated compounds in soils and biota from

Tierra del Fuego and Antarctica, Environ. Pollut. 163 (2012) 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.10.027>.

[53] E. Barón, I. Rudolph, G. Chiang, R. Barra, E. Eljarrat, D. Barceló, Occurrence and behavior of natural and anthropogenic (emerging and historical) halogenated compounds in marine biota from the Coast of Concepcion (Chile), Sci. Total Environ. 461–462 (2013) 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.006>.

[54] S. Squadrone, V. Ciccotelli, L. Favaro, T. Scanzio, M. Prearo, M.C. Abete, Fish consumption as a source of human exposure to perfluorinated alkyl substances in Italy: Analysis of two edible fish from Lake Maggiore, Chemosphere. 114 (2014) 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.085>.

[55] H. Ziarrusta, L. Mijangos, A. Prieto, N. Etxebarria, O. Zuloaga, M. Olivares, Determination of tricyclic antidepressants in biota tissue and environmental waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 408 (2016) 1205–1216. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9224-y>.

[56] C. Rimayi, D. Odusanya, J.M. Weiss, J. de Boer, L. Chimuka, Contaminants of emerging concern in the Hartbeespoort Dam catchment and the uMngeni River estuary 2016 pollution incident, South Africa, Sci. Total Environ. 627 (2018) 1008–1017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.263>.

[57] J.S. Munaretto, M.M. May, N. Saibt, R. Zanella, Liquid chromatography with high resolution mass spectrometry for identification of organic contaminants in fish fillet: screening and quantification assessment using two scan modes for data acquisition, J. Chromatogr. A. 1456 (2016) 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.018>.

[58] C. Simonnet-Laprade, S. Bayen, B. Le Bizec, G. Dervilly, Data analysis strategies for the characterization of chemical contaminant mixtures. Fish as a

case study, Environ. Int. 155 (2021) 106610.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106610>.

[59] ismart, Instrumentation, TrAMS. (n.d.).
<http://trams.chem.uoa.gr/research/instrumentation/> (accessed June 19, 2021).

[60] J. Aceña, N. Heuett, P. Gardinali, S. Pérez, Chapter 12 - Suspect Screening of Pharmaceuticals and Related Bioactive Compounds, Their Metabolites and Their Transformation Products in the Aquatic Environment, Biota and Humans Using LC-HR-MS Techniques, in: S. Pérez, P. Eichhorn, D. Barceló (Eds.), Compr. Anal. Chem., Elsevier, 2016: pp. 357–378.
<https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.02.011>.

[61] E.L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H.P. Singer, J. Hollender, Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence, Environ. Sci. Technol. 48 (2014) 2097–2098.
<https://doi.org/10.1021/es5002105>.

[62] Γαλάνη Αικατερίνη, Προσδιορισμός φαρμακευτικών και παρανόμως διακινούμενων ουσιών σε υγρά απόβλητα της Αθήνας με LC-MS/MS και LC-HRMS, Διπλωματική εργασία, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών., in: 2019.

[63] N.A. Alygizakis, P. Oswald, N.S. Thomaidis, E.L. Schymanski, R. Aalizadeh, T. Schulze, M. Oswaldova, J. Slobodnik, NORMAN digital sample freezing platform: A European virtual platform to exchange liquid chromatography high resolution-mass spectrometry data and screen suspects in “digitally frozen” environmental samples, TrAC Trends Anal. Chem. 115 (2019) 129–137.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.008>.

[64] N.A. Alygizakis, H. Besselink, G.K. Paulus, P. Oswald, L.M. Hornstra, M. Oswaldova, G. Medema, N.S. Thomaidis, P.A. Behnisch, J. Slobodnik, Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical

screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis, *Environ. Int.* 127 (2019) 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.060>.

[65] Γαληνός - Αρχική σελίδα, (n.d.). <https://www.galinos.gr/> (accessed August 6, 2021).

[66] PubChem, PubChem, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed August 6, 2021).

[67] G. Heinemeyer, C. Sommerfeld, A. Springer, A. Heiland, O. Lindtner, M. Greiner, T. Heuer, C. Krems, A. Conrad, Estimation of dietary intake of bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) by consumption of food in the German population, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 216 (2013) 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.01.001>.

[68] S.S.S. Rowdhwal, J. Chen, Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview, *BioMed Res. Int.* 2018 (2018) e1750368. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>.

[69] S. Saikat, I. Kreis, B. Davies, S. Bridgman, R. Kamanyire, The impact of PFOS on health in the general population: a review, *Environ. Sci. Process. Impacts.* 15 (2013) 329–335. <https://doi.org/10.1039/C2EM30698K>.

[70] S.P. Lawler, Environmental safety review of methoprene and bacterially-derived pesticides commonly used for sustained mosquito control, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139 (2017) 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.038>.

[71] C.A. Westall, T. Wright, F. Cortese, A. Kumarappah, O.C. Snead, J.R. Buncic, Vigabatrin retinal toxicity in children with infantile spasms: An observational cohort study, *Neurology.* 83 (2014) 2262–2268. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001069>.

[72] D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A.C. Guo, E.J. Lo, A. Marcu, J.R. Grant, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, Z. Sayeeda, N. Assempour, I. Iynkkaran, Y. Liu, A. Maciejewski, N. Gale, A. Wilson, L. Chin, R. Cummings, D. Le, A. Pon, C. Knox,

M. Wilson, DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>.

[73] L.W.B. Olaniyan, O.O. Okoh, N.T. Mkwetshana, A.I. Okoh, Environmental Water Pollution, Endocrine Interference and Ecotoxicity of 4-tert-Octylphenol: A Review, in: P. de Voogt (Ed.), *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 248, Springer International Publishing, Cham, 2020: pp. 81–109. https://doi.org/10.1007/398_2018_20.

[74] B.S. Chhikara, K. Parang, Development of cytarabine prodrugs and delivery systems for leukemia treatment, *Expert Opin. Drug Deliv.* 7 (2010) 1399–1414. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.527330>.

[75] Use of Pyrethrin/ Pyrethrum and its Effect on Environment and Human: A Review | PharmaTutor, (2018). <http://www.pharmatutorjournal.com/index.php/pt/article/view/116> (accessed August 6, 2021).

