

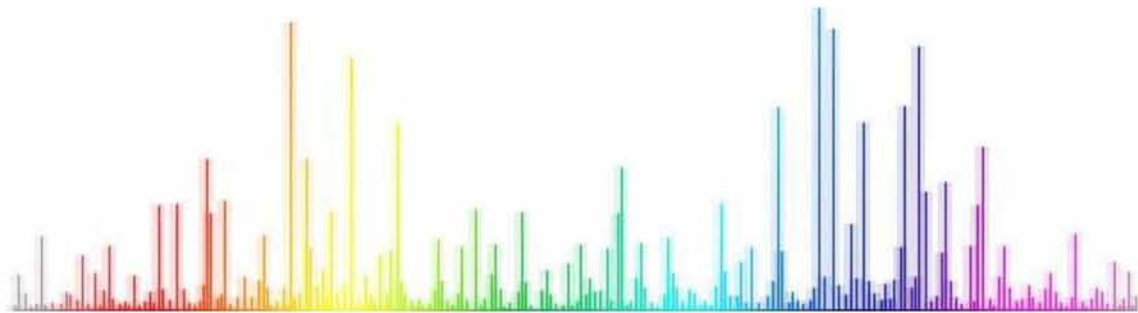


Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Ιατρικής

ΜΠΣ: “Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή - ποιότητα και ασφάλεια τροφίμων και υδάτων και δημόσια υγεία”

Τίτλος διπλωματικής εργασίας: «Ανάπτυξη μεθοδολογίας GC-MS για τη ποσοτικοποίηση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε βιολογικά δείγματα»



Συγγραφή: Καραγκούνη Φωτεινή, Περιβαλλοντολόγος

Τριμελής επιτροπή:

Τσακάλωφ Ανδρέας, επιβλέπων επικ. Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τσιρόπουλος Νικόλαος, Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κουρέας Μιχαήλ, Διδάκτωρ Τμήματος Ιατρικής, Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

-Λάρισα, 2015-

Ευχαριστίες

Για τη διεξαγωγή αυτής της εργασίας, να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Τσακάλωφ που πίστεψε σε μένα και στάθηκε άξιος καθοδηγητής από την αρχή ως το τέλος.

Εν συνέχεια, να ευχαριστήσω το Διδάκτωρ κ.Κουρέα, ο οποίος απεδείχθει άξιος αρωγός αυτής της προσπάθειας.

Τον κ.Γκατζή, ο οποίος ήταν πρόθυμος να βοηθήσει σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε, καθώς και όλα τα υπόλοιπα άτομα του εργαστηρίου που δημιουργούσαν ένα ευχάριστο εργασιακό κλίμα.

Τέλος, την οικογένειά μου και τους φίλους μου που έδειξαν αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση.

Περίληψη

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα (OCP's) είναι ανθεκτικοί οργανικοί ρύποι που πρωτοεισήχθησαν στο περιβάλλον με την εφαρμογή του DDT. Αρχικά έτυχαν ενθουσιώδους υποδοχής, καθώς συγκεκριμένα το DDT είχε καταφέρει να σώσει ένα τεράστιο πλήθος ανθρώπων από τα παρασιτικά νοσήματα, όπως ελονοσία και κίτρινο πυρετό. Με τη πάροδο του χρόνου, όμως, εμφανίστηκαν οι πρώτες αρνητικές επιδράσεις αυτών των ουσιών στο περιβάλλον και σε μη στοχευόμενους οργανισμούς. Αυτό συνέβη εξαιτίας της κινητικότητας και της συμπεριφοράς των OCP's στο περιβάλλον. Τα OCP's έχουν τη τάση να διέρχονται και να εμμένουν στο περιβάλλον ακόμη και για δεκαετίες, καθώς επίσης να βιοσυσσωρεύονται και να βιομεγενθύνονται μέσω της τροφικής αλυσίδας στους οργανισμούς και κατ'επέκταση στον άνθρωπο. Αρχικά προτάθηκαν για ένταξη στη λίστα "PAN DirtyDozen" και στη συνέχεια με τη σύμβαση της Στοκχόλμης (2004) απαγορεύτηκε η χρήση τους σε πολλές χώρες.

Μελέτες σε πειραματόζωα και επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναδείξει τους πιθανούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία από την έκθεση σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα. Σημαντική είναι η επίπτωση των OCP's στο νευρικό / ανοσοποιητικό / αναπαραγωγικό / ενδοκρινικό σύστημα αλλά και σε μεμονωμένα όργανα, όπως νεφροί και ήπαρ. Συγκεκριμένα, στις επιδημιολογικές μελέτες, όπου συσχετίζεται η έκθεση στις οργανοχλωριωμένες ενώσεις με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, είναι απαραίτητη η εκτίμηση της έκθεσης με βάση το ποσοτικό προσδιορισμό των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων και των μεταβολιτών τους (των βιολογικών δεικτών έκθεσης) στα βιολογικά δείγματα.

Στη συγκεκριμένη εργασία αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία ποσοτικού προσδιορισμού των δεικτών έκθεσης (OCP's) στον ορό του αίματος με βάση την αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS) και στη συνέχεια έγινε εφαρμογή της μεθόδου σε δείγμα του πληθυσμού της Θεσσαλίας για την εκτίμηση της έκθεσης σε OCP's.

Η μεθοδολογία περιλαμβάνει απομόνωση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων από τον ορό με τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME-Solid Phase Microextraction), μετέπειτα μεταφορά και ενόργανη ανάλυση με GC-MS. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών έγινε με τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου χρησιμοποιώντας εσωτερικό πρότυπο (PCB-101). Πραγματοποιήθηκε επικύρωση της μεθόδου και προσδιορίστηκε η αναλυτική απόδοσή της. Συγκεκριμένα, η μέθοδος που αναπτύχθηκε επιτρέπει το ποσοτικό προσδιορισμό 8 ουσιών (Hexachlorobenzene, Heptachlor, Heptachlor Epoxide, c-Chlordane, a-Chlordane, 4,4-DDE, 4,4-DDD, 4,4-DDT) με όρια ανίχνευσης (LOD) για τις ανιχνεύσιμες ουσίες από 0,01ng/ml (για το 4,4-DDE) έως 0,21 ng/ml (για το 4,4-DDT) και σε συγκεντρώσεις από 0,5 ng/mL έως 20 ng/mL. Η απόκριση του οργάνου για όλους τους αναλύτες σε αυτή τη περιοχή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκε ήταν

γραμμική με συντελεστή συσχέτισης $R^2 > 0,95$ και διακύμανση από 0,9744 (για το Hexachlorobenzene) έως 0,9998 (για το c-Chlordane).

Η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα για το προσδιορισμό του επίπεδου έκθεσης του πληθυσμού της Θεσσαλίας σε OCP's. Το δείγμα πληθυσμού περιλάμβανε 103 άτομα, εκ των οποίων το 78,64% ήταν άντρες (81 άτομα) και το 21,36% ήταν γυναίκες (22 άτομα). Έτσι, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του DDE, ο βασικός μεταβολιτής του DDT, ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 99% με ενδιάμεσο 1,25ng/ml και ενδοτεταρτημοριακό εύρος 0,7-2,58ng/ml και hexachlorobenzene (HCB) σε ποσοστό 68,9% με ενδιάμεσο 0,13ng/ml και ενδοτεταρτημοριακό εύρος 0-0,34ng/ml. Από την ανάλυση προέκυψε, επίσης, μια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των επιπέδων OCP's με την ηλικία, καθώς η τιμή p-value για το DDE είναι 0,033 και η τιμή p-value για το hexachlorobenzene είναι 0,006. Επομένως, τα δεδομένα αυτά αποδεικνύουν ότι παρόλο που τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα είναι απογορευμένα και δεν χρησιμοποιούνται πια εδώ και δεκαετίες, εξακολουθούν να αποτελούν κίνδυνο για τον άνθρωπο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ευρήματα για τη Θεσσαλία, όπου στη συντριπτική πλειοψηφία του πληθυσμού υπάρχει έκθεση σε DDE, καθώς και HCB. Η σχέση του βαθμού έκθεσης με την ηλικία, που παρατηρήθηκε, πιθανόν οφείλεται σε παλαιότερη έκθεση των ανθρώπων σε οργανοχλωριωμένες ενώσεις, τότε που τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνταν συχνά στις καλλιέργειες. Όμως, δεν αποκλείεται και τωρινή έκθεση του ανθρώπου σε OCP's, εξαιτίας της ύπαρξής τους ακόμα και σήμερα στο περιβάλλον. Το θέμα αυτό χρήζει περαιτέρω μελέτη.

Abstract

The organochlorine pesticides (OCP's) are persistent organic pollutants, which introduced in the environment with the application of DDT. Initially, they received an enthusiastic welcome, specifically DDT that had managed to save a huge crowd of parasitic diseases such as malaria and yellow fever. However, the first negative effects of these substances appeared to the environment and non-target organisms, due to the fact of the mobility and behavior of these compounds in the environment. The OCP's have a tendency to pass through the environment, persist for decades, bioaccumulate and biomagnify through the food chain in organisms and humans. Firstly, they are suggested to join the list "PAN Dirty Dozen" and then with the well-known Stockholm Convention (2004) they are banned in many countries.

Studies on laboratory animals and epidemiological studies have highlighted the potential risks to human health from the exposure to OCP's. The impact of these compounds is important for the nervous / immune / reproductive / endocrine system and also individual organs, such as kidneys and liver. Specifically, in epidemiological studies, where the exposure to OCP's associates with various pathological conditions, it is necessary the assesment of this exposure. This assesment is based on the quantification of organochlorine pesticides and their metabolites (biological exposure indicators) in biological samples.

In particular job, a method of quantification was developed for the exposure to indicators (OCP's) in serum samples by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The method was applied in a sample of population (Thessaly's population) in order to assess the exposure to OCP's.

The method involves the isolation of organochlorine compounds from the human serum by solid phase microextraction (SPME-Solid Phase Microextraction), after transformation and instrumental analysis with GC-MS. The quantification of analytes was carried out with the internal standard's method using internal standard (PCB-101). A method of validation was also carried out and determined the analytical performance. Specifically, the developed method allows the quantitation of eight compounds (Hexachlorobenzene, Heptachlor, Heptachlor Epoxide, c-Chlordane, a-Chlordane, 4,4-DDE, 4,4-DDD, 4,4-DDT) with detection limits (LOD) for detectable compounds and range from 0,01ng / ml (about 4,4-DDE) to 0,21 ng / ml (about the 4,4-DDT) at concentrations of 0,5 ng / mL up to 20 ng / mL. The instrument response for all analytes in this region of concentrations, which was studied, was linear with correlation coefficient $R^2 > 0,95$ and range from 0.9744 (about Hexachlorobenzene) to 0.9998 (about c-Chlordane).

The developed method was applied to real samples for the determination of the level of exposure to OCP's in the population of Thessaly. The population sample

included 103 people, of which 78.64% were men (81 persons) and 21.36% were women (22 people). Thus, according to the results, the DDE, the main metabolite of DDT, detected at the rate of 99% with intermediate 1,25 ng / ml and interquartile range 0,7-2,58 ng / ml and hexachlorobenzene (HCB) at a rate of 68, 9% with intermediate 0,13 ng / ml and interquartile range 0-0,34 ng / ml. From the analysis, it is also observed a statistically significant correlation between the levels of OCP's with the age, as the p-value rate for DDE is 0.033, and the p-value value for the hexachlorobenzene is 0,006. These data proved that while the organochlorine pesticides have not used for decades, they still remain a risk to the human's health. A typical example is the findings of Thessaly's population, where the majority of people are exposed to DDE, and HCB. The relationship of the degree of exposure with the age potentially shows that there was probably an earliest human exposure to OCP's, since the organochlorine pesticides were often used on crops. However, it is conceivable also a current human exposure to OCP's, because of their existence even today in the environment. This issue needs further study.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα

- 1.1 Ιστορική ανασκόπηση: Ανακάλυψη και χρήση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων.....(σελ.11-18)
- 1.2 Χημικές δομές και ιδιότητες των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων ... (σελ.19-23)
- 1.3 “Τύχη” και επίδραση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων στο περιβάλλον.....(σελ.23-24)
- 1.4 Έκθεση του ανθρώπου στις οργανοχλωριωμένες ενώσεις και επίπτωση στηνυγεία του.....(σελ.25-31)
- 1.5 Προστασία της δημόσιας υγείας μέσω της Βιοπαρακολούθησης της έκθεσης σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα.....(σελ.32-36)

Κεφάλαιο 2: Χρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών (GC/MS) ως βασική μέθοδος βιοπαρακολούθησης της έκθεσης.

- 2.1 Αρχές Χρωματογραφικού Διαχωρισμού.....(σελ.37-42)
- 2.2 Αέρια Χρωματογραφία / Αέριος χρωματογράφος Trace GCUltra.....(σελ.43-47)
- 2.3 Φασματομετρία μαζών/Φασματογράφος Polaris–Quadrupole Ion TrapMS(σελ.47-54)
- 2.4 Αρχές ποσοτικού προσδιορισμού στην Ενόργανη Ανάλυση / Μέθοδος εσωτερικού προτύπου.....(σελ.54-55)
- 2.5 Επεξεργασία δειγμάτων με Solid Phase Microextraction (SPME) (μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης).....(σελ.55-64)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3: Πειραματική διαδικασία

- 3.1 Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων και πρότυπων δειγμάτων.....(σελ.65-69)
- 3.2 Απομόνωση των αναλυτών με SPME.....(σελ.69-71)
- 3.3 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας SPME.....(σελ.71-80)
- 3.4 Ενόργανη Ανάλυση των δειγμάτων με GC/MS
 - 3.4.1 Συνθήκες Διεξαγωγής ανάλυσης του GC/MS.....(σελ. 81-89)
 - 3.4.2Ανάλυση πρότυπου υδατικού δείγματος για τον προσδιορισμό του χρόνου συγκράτησης των αναλυτών.....(σελ.89-90)
- 3.5 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων.....(σελ.91-92)
 - 3.5.1 Μέθοδος Ποσοτικοποίησης
- 3.6 Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας για τον ορό.....(σελ.93-95)

Κεφάλαιο 4: Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα

- 4.1 Στατιστική Ανάλυση.....(σελ.95)
- 4.2 Στατιστική Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.....(σελ.96-101)

Συμπεράσματα.....	(σελ.102)
Παραρτήματα	

Λίστα Πινάκων

Πίνακας 1: Οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα που περιλαμβάνονται σε διεθνείς συμβάσεις και στη PAN DirtyDozen.....	(σελ.17)
Πίνακας 2: Οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα που απαγορεύθηκαν στην Ευρωπαϊκή Ένωση.....	(σελ.18)
Πίνακας 3: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ουσιών.....	(σελ.20-21)
Πίνακας 4: Καρκινογόνος δράση οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων σύμφωνα με τις σχετικές Ενώσεις και Οργανισμούς.....	(σελ.27)
Πίνακας 5: Οι επιπτώσεις στην υγεία που προκαλούν κάποιες οργανοχλωριωμένες ουσίες μέσα από μελέτες σε πειραματόζωα και επιδημιολογικές μελέτες	(σελ.29-30)
Πίνακας 6: Τα συμπτώματα της οξείας και χρόνιας τοξικότητας και η εκτίμηση τοξικότητας.....	(σελ. 31)
Πίνακας 7: Αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων σε βιολογικά δείγματα με συγκεκριμένες προετοιμασίες δειγμάτων.....	(σελ.36)
Πίνακας 8: Σχετικές αποκρίσεις για οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα.....	(σελ.57)
Πίνακας 9: Σύγκριση της SPME με άλλες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων....	(σελ.60)
Πίνακας 10: Παρουσίαση των ουσιών που μελετήθηκαν εργαστηριακά.....	(σελ.65-66)
Πίνακας 11: Οι ουσίες του πρότυπου μίγματος οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων με το χρωματογράφημα ανάλυσης.....	(σελ.67)
Πίνακας 12: Διαδικασία προετοιμασίας πρότυπων δειγμάτων.....	(σελ.69)
Πίνακας 13: Οι χρόνοι εκχύλισης των ουσιών από τη χρωματογραφική στήλη...	(σελ.72)
Πίνακας 14: Αποτελέσματα για τρία πειράματα που διεξήχθησαν.....	(σελ.77)
Πίνακας 15: Αποτελέσματα πειραμάτων.....	(σελ.90)
Πίνακας 16: Παράμετροι λειτουργίας του συστήματος GC-MS.....	(σελ.91)
Πίνακας 17: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για κάθε ουσία	(σελ.92)

Πίνακας 18: Χαρακτηριστικά καμπύλης βαθμονόμησης.....	(σελ.95)
Πίνακας 19: Δημογραφικά στοιχεία και προσωπικές συνήθειες.....	(σελ.96)
Πίνακας 20: Ποσοστά ανιχνεύσιμων ουσιών.....	(σελ.98)
Πίνακας 21: Στατιστικά αποτελέσματα για DDE.....	(σελ.99)
Πίνακας 22: Στατιστικά αποτελέσματα για Hexachlorobenzene.....	(σελ.100)

Λίστα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) της κάθε ουσίας σε κάθε πείραμα.....(σελ.73)

Διάγραμμα 2: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων με προσθήκη NaCl σε διαφορετικά grm φυγοκέντρησης.....(σελ.75)

Διάγραμμα 3: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων με προσθήκη KH_2PO_4 σε διαφορετικά grm φυγοκέντρησης.....(σελ.75)

Διάγραμμα 4: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων με διαφορετικά άλατα αλλά στα ίδια 13000 grm φυγοκέντρησης.....(σελ.76)

Διάγραμμα 5: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων Π6 και Π7 με προσθήκη KH_2PO_4 (σελ.78)

Διάγραμμα 6: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων με προσθήκη buffer NaH_2PO_4 pH=2, NaCl(2M) pH=7, KH_2PO_4 (0,1M) pH=6, NaCl (1M) pH=7.....(σελ.79)

Συντομογραφίες

OCP's: Organochlorine Pesticides

DDT: Dichloro - diphenyl – trichloroethane

DDD: Dichloro - diphenyl - dichloroethane

DDE: Dichloro – diphenyl - dichloroethylene

PCB's: Polychlorinated biphenyls

POP's: Persistent Organic Pollutants

UNEP: United Nations Environment Programme

IFCS: International Forum on Chemical Safety

IPCS: International Programme on Chemical Safety

PAN: Pesticide Action Network

EPA: Environmental Protection Agency

ATSDR: Agency for Toxic Substances & Disease Registry

LOD: Limit of Detection

LOQ: Limit of Quantification

HS-SPME: Headspace Solid Phase Microextraction

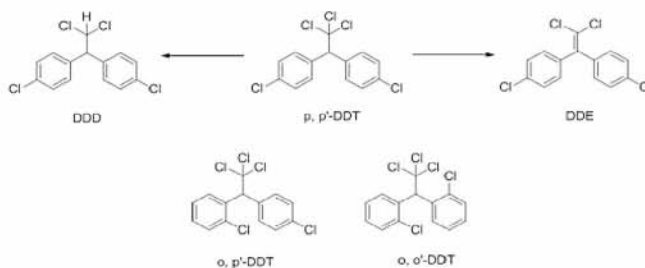
Κεφάλαιο 1: Οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα

1.1) Ιστορική ανασκόπηση: Ανακάλυψη και χρήση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων [4], [5]

Η απαρχή των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων, που ανήκουν στη κατηγορία των ανθεκτικών οργανικών ενώσεων, ξεκινά με τη σύνθεση του **DDT** το 1874 από τον αυστριακό επιστήμονα Othmar Zeidler. Μέχρι το 1939 οι ιδιότητες του DDT ήταν άγνωστες, ώσπου ο ελβετός χημικός Paul Hermann Müller ανακάλυψε τις εντομοκτόνες ιδιότητές του και τη χρήση του στον έλεγχο ασθενειών, όπως ελονοσία και κίτρινο πυρετό. Γι' αυτή του τη μεγάλη ανακάλυψη τιμήθηκε το 1948 με το βραβείο Νόμπελ.

Από τότε το DDT χρησιμοποιήθηκε ευρέως ως γεωργικό εντομοκτόνο (συγκεκριμένα στις Η.Π.Α το 1959 έφτασε την υψηλότερη ποσότητα χρήσης, η οποία ήταν 40.000 τόνοι). Αποδείχτηκε αποτελεσματικό για τη σωτηρία 12-15 εκατομμυρίων ανθρώπινων ζώων από την ελονοσία και άλλα παρασιτικά νοσήματα σε μικρό χρονικό διάστημα. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση του είχε ως αποτέλεσμα το θάνατο μεγάλου αριθμού πτηνών και μικρών ζώων. Πέρασαν αρκετά χρόνια ώστε να τεκμηριωθούν οι βλαβερές επιδράσεις του DDT (και των μεταβολιτών του **DDD** και **DDE**) καθώς και οι μηχανισμοί τοξικότητάς του. Να αναφερθεί χαρακτηριστικά ότι η επίδραση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων στα οικοσυστήματα μελετήθηκε συστηματικά και οι πρώτες εκτιμήσεις έγιναν από τη Rachel Carson στις Η.Π.Α όπου και δημοσιεύτηκαν το 1962 στο περίφημο βιβλίο της “Silent Spring”.

Οι μεταβολίτες του DDT (**DDD** και **DDE**) (εικόνα1) είναι πιο επίμονοι ρύποι απ'ότι η μητρική ένωση. Ο χρόνος ημιζωής του DDE στους ανθρώπους εκτιμήθηκε ότι είναι πάνω από 7 χρόνια. Τα υπολείμματα του DDE αποδείχθηκαν ότι συσσωρεύονται σε υψηλότερα τροφικά επίπεδα και είναι υπεύθυνα για τις βλαβερές επιδράσεις. Στις δεκαετίες του 1970 και 1980, οι περισσότερες χώρες απαγόρευσαν τη γεωργική χρήση του DDT, γιατί παρουσίασε ανθεκτικότητα μεταξύ των βλαβερών εντόμων. Ωστόσο, τα προβλήματα με το DDT συνεχίζουν να παρουσιάζονται σε πολλές χώρες εξαιτίας του αργού ρυθμού βιοδιασπασιμότητάς του.



Εικόνα 1: Χημικές δομές του DDT και των μεταβολιτών του DDD και DDE

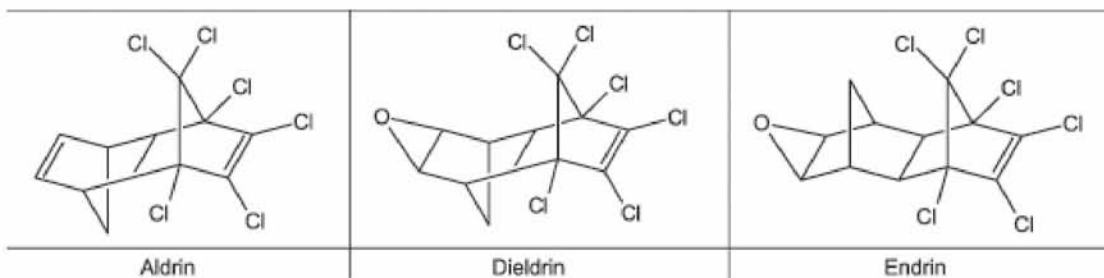
Κατόπιν του DDT, παρασκευάστηκαν κι άλλα εντομοκτόνα (όπως το Aldrin, Dieldrin, Endrin, Heptachlorκ.α).

Aldrin / Dieldrin/ Endrin

Τα Aldrin / Dieldrin / Endrin (**εικόνα 2**) χρησιμοποιήθηκαν ως εντομοκτόνα από το 1950 έως τα μέσα της δεκαετίας του 1970. Αυτές οι ενώσεις συνδέονται μεταξύ τους όχι μόνο ως προς τη δομή, αλλά και ως προς την ισχυρή τοξική δράση τους στα οικοσυστήματα. Συγκεκριμένα, το Aldrin συντέθηκε για πρώτη φορά το 1948 και στο εμπόριο κατασκευάστηκε το 1950. Το Aldrin όταν χρησιμοποιήθηκε στους αγρούς διασπάστηκε σε Dieldrin, έναν οξυγονωμένο μεταβολίτη του Aldrin. Επειδή το Aldrin εύκολα αποικοδομείται σε Dieldrin, σπάνια ανιχνεύεται στο περιβάλλον. Όμως, η υψηλή τοξικότητα αυτών των δύο και οι θάνατοι που προκλήθηκαν σε πολλά είδη πτηνών και ζώων κατά τη χρήση τους σε αγροτικές καλλιέργειες είχε ως αποτέλεσμα την απαγόρευσή τους στις Η.Π.Α το 1974 και σε άλλες χώρες στα μέσα της δεκαετίας του 1970. Εξαιτίας της τοξικότητάς τους, χαρακτηριστική ήταν η δραματική μείωση των μεταναστευτικών γερακιών που παρατηρήθηκε στην Ευρώπη και σε άλλες ηπείρους.

Το Endrin εισήχθη το 1951 και χρησιμοποιήθηκε κατά κύριο λόγο ως εντομοκτόνο στο βαμβάκι. Είναι ένα στερεοϊσομερές του Dieldrin και μεταβολίζεται ταχέως στο περιβάλλον. Το Endrin aldehyde και το Endrin ketone είναι προϊόντα αποικοδόμησης. Το εντομοκτόνο Endrin έχει σχετικά μικρή διάρκεια ημιζωής στους ιστούς των θηλαστικών και των πτηνών. Η χρήση του περιορίστηκε το 1979 στις Η.Π.Α, διότι απεδείχθη ότι προκάλεσε το θάνατο αρκετών πτηνών.

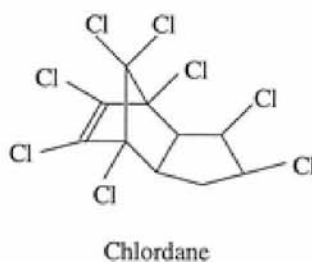
Στις περισσότερες χώρες, το Aldrin, το Dieldrin και το Endrin απαγορεύτηκαν για γεωργική χρήση και τέθηκαν αυστηροί περιορισμοί για τις μη αγροτικές εφαρμογές. Γενικά, η γεωργική χρήση των χημικών αυτών απαγορεύτηκε κατά τη δεκαετία του 1970 και το 1987 απαγορεύτηκαν όλες οι χρήσεις τους στις Η.Π.Α.



Εικόνα 2: Χημική δομή του Aldrin, Dieldrin και Endrin

Chlordane

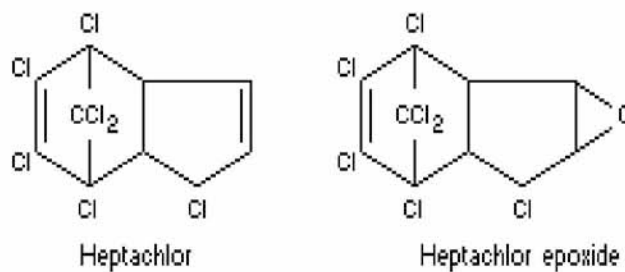
Το chlordane (**εικόνα 3**) χρησιμοποιήθηκε ως εντομοκτόνο για τις γεωργικές καλλιέργειες και το γκαζόν καθώς και για τον έλεγχο τερμιτών σε κτίρια. Παρήχθηκε εμπορικά το 1947. Το τεχνητό chlordane είναι ένα μίγμα από τουλάχιστον 23 ενώσεις. Αρχικά, δεν παρουσίασε τοξικές και υποτοξικές επιδράσεις, ενώ αργότερα διαπιστώθηκαν υπολείμματα chlordane στον εγκέφαλο πτηνών που πέθαναν κάτω από πειραματικές συνθήκες. Στις Η.Π.Α η χρήση του στις καλλιέργειες απαγορεύτηκε το 1978, ενώ όλες οι χρήσεις του έχουν απαγορευθεί μετά το 1988.



Εικόνα 3: Χημική δομή του Chlordane

Heptachlor /Heptachlor Epoxide

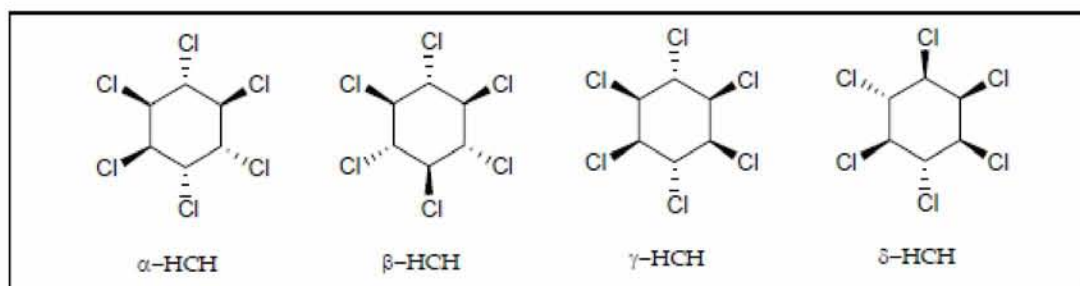
Η χημική δομή του Heptachlor είναι παρόμοια με εκείνη του Chlordane. Το Heptachlor έχει χρησιμοποιηθεί ως εντομοκτόνο για τον έλεγχο των μυρμηγκιών. Οξειδώνεται ταχέως φωτοχημικά και οι βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα το οξειδώνουν σε Heptachlor Epoxide. Έτσι, το Heptachlor Epoxide εμφανίστηκε μετά τη χρήση του Heptachlor (**εικόνα 4**). Αποσύρθηκε από τη κυκλοφορία το 1983, ενώ η υψηλή τοξικότητά του σε πτηνά εκδηλώθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε στις Η.Π.Α για τη καταπολέμηση των μυρμηγκιών.



Εικόνα 4: Χημική δομή του Heptachlor και του Heptachlor epoxide

Hexachlorocyclohexane

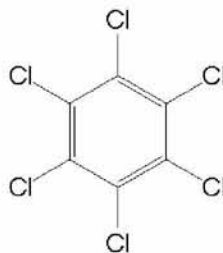
Το εντομοκτόνο hexachlorocyclohexane (HCH) είναι μίγμα πέντε ισομερών (**εικόνα 5**) όπου το γ -ισομερές είναι το Lindane που αποτελεί και το κύριο συστατικό με εντομοκτόνο δράση. Ο Michael Faraday ανακάλυψε τα HCH's το 1825 και ο Bender καθόρισε τις εντομοκτόνες ιδιότητές τους. Το τεχνητό HCH παρήχθη εμπορικά το 1947. Η Κίνα και η Ινδία ήταν οι δύο κύριοι χρήστες του τεχνητού HCH σε παγκόσμιο επίπεδο, αλλά η γεωργική του χρήση απαγορεύτηκε στη Κίνα το 1983 και στην Ινδία το 1990. Από τις Η.Π.Α αποσύρθηκε το 1978. Το Lindane μεταβολίζεται γρήγορα σε υδατοδιαλυτές χλωροφαινόλες και χλωροβενζόλια που απομακρύνονται εύκολα. Έχει μικρή διάρκεια ζωής μετά την εφαρμογή στους αγρούς, στους ιστούς των ζώων και στα αυγά τους.



Εικόνα 5: Χημική δομή των ισομερών των HCH's

Hexachlorobenzene

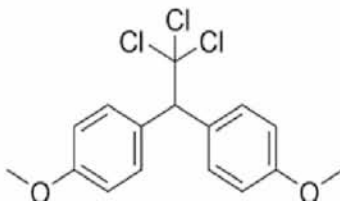
Το Hexachlorobenzene (HCB) (**εικόνα 6**) εισήχθη το 1945 ως μυκητοκτόνο για την επεξεργασία σπόρων. Έπειτα, σχηματίστηκε ως ένα παραπροϊόν κατά τη χημική κατασκευή των φυτοφαρμάκων και ακούσια παρήχθη από την ατελή καύση των στερεών αστικών αποβλήτων σε αποτεφρωτές και άλλες βιομηχανικές διεργασίες. Στις περισσότερες χώρες έχει απαγορευθεί ή υπαχθεί σε αυστηρούς περιορισμούς η χρήση του ως εντομοκτόνο. Το HCB απαγορεύτηκε στις Η.Π.Α το 1984.



Εικόνα 6: Χημική δομή HCB

Methoxychlor

Το methoxychlor (**εικόνα 7**) αντικατέστησε το DDT για τη καταπολέμηση της ασθένειας της πελέας (κν. Φτελιά) Dutchelm disease (*ulmus americana*). Παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα, διασπάται και δεν ανιχνεύεται.



Εικόνα 7: Χημική δομή Methoxychlor

Από τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μεγάλη και ανεξέλεγκτη απελευθέρωση των οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον οδήγησε σε μια ανησυχία, όσον αφορά τις μακροπρόθεσμες συνέπειες αυτών. Έτσι, οι περισσότερες από αυτές τις ουσίες οδηγήθηκαν σε περιορισμό ή/και σε απαγόρευση της χρήσης τους σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες. Για την απαγόρευση / κατάργηση των ουσιών αυτών συντάχθηκαν διάφορες Διεθνείς συμφωνίες, με τη πιο γνωστή τη συνθήκη της Στοκχόλμης.

Η πρωτοβουλία για τη δημιουργία λίστας “Dirty Dozen” και τη διακοπή των επικίνδυνων χημικών είχε γίνει και από τη PAN (Pesticide Action Network). Η PAN ήταν η πρώτη παγκόσμια εκστρατεία ευαισθητοποίησης που ξεκίνησε τη Παγκόσμια Ημέρα Περιβάλλοντος το 1985. [45]

Στη συνέχεια συντάχθηκαν κι άλλες διεθνείς συμφωνίες, όπως το πρωτόκολλο του Μόντρεαλ το 1987 και οι μεταγενέστερες τροποποιήσεις του, που είχαν ως αντικείμενο διαπραγμάτευσης τη σταδιακή κατάργηση των καταστροφικών χημικών ουσιών για το όζον. Η σύμβαση του Ρόττερνταμ που ετέθη σε νομική ισχύ το Φεβρουάριο του 2004. Η σύμβαση για τη Μακράς Ακτίνας Διασυννοριακή Ατμοσφαιρική Ρύπανση (LRTAP), ένα πρωτόκολλο του 1998 που αποτέλεσε τη βάση της συνθήκης της Στοκχόλμης. Η συνθήκη της Στοκχόλμης που ετέθη σε ισχύ το 2004 είναι μια παγκόσμια συνθήκη για τη προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος από έμμορους οργανικούς ρύπους (Persistent Organic Pollutants - **POP's**). Ως POP's ορίζονται τα χημικά που παραμένουν άθικτα στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα, κατανέμονται ευρέως γεωγραφικά, συσσωρεύονται στους λιπώδεις ιστούς των ζώντων οργανισμών και είναι τοξικοί ρύποι για τον άνθρωπο και την πανίδα. Οι δώδεκα ενώσεις που θεωρούνται ιδιαίτερα επικίνδυνες και καλύπτονται από τη παρούσα συνθήκη είναι όλες οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις, που παρήχθησαν για χρήση ως εντομοκτόνα ή

βιομηχανικά χημικά προϊόντα, τα παραπροϊόντα της καύσης και της βιομηχανικής παραγωγής. [2]

Συνθήκη της Στοκχόλμης [3]

Το Μάη 1995, το διοικητικό συμβούλιο της **UNEP** (United Nations Environment Programme) ξεκίνησε μια παγκόσμια δράση για να μειώσει και να εξαλείψει την απελευθέρωση των έμμονων οργανικών ρύπων. Σύμφωνα με τον ορισμό που δίνει η UNEP, τα **POP's** είναι «οι χημικές ουσίες που παραμένουν στο περιβάλλον, βιοσυσσωρεύονται μέσω της τροφικής αλυσίδας και ενέχουν κίνδυνο να προκαλέσουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον». Μετά από το Διακυβερνητικό Φόρουμ για τη Χημική Ασφάλεια (**IFCS**) και το Διεθνές Πρόγραμμα για τη Χημική Ασφάλεια (**IPCS**) παρήχθη η λίστα των 12 POP's για την αξιολόγηση με βάση τις ιδιότητές τους. Αυτές οι ενώσεις ονομάστηκαν στη καθομιλουμένη «The Dirty Dozen» και είναι οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα (DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Chlordane, HCB, Heptachlor), βιομηχανικά χημικά (**PCB's**) και απελευθερούμενα παραπροϊόντα (διοξίνες, φουράνια). Έτσι, οι παραπάνω ενώσεις εισήχθησαν στα παραρτήματα Α, Β και C αντίστοιχα των ενώσεων που δεσμεύονται για εξάλειψη ή για περιορισμό της παραγωγής τους.

Μετά από διαπραγματεύσεις η συνθήκη της Στοκχόλμης ολοκληρώθηκε στις 23 Μαΐου 2001 στη Στοκχόλμη και τέθηκε σε ισχύ στις 17 Μαΐου 2004 με επικύρωση αρχικά 128 μερών και 151 υπογραφόντων. Τα συνυπογράφοντα κράτη συμφώνησαν να τεθούν εκτός νόμου εννιά χημικές ουσίες της λίστας «The Dirty Dozen», περιορίζοντας τη χρήση του DDT για τον έλεγχο της ελονοσίας.

Τα συμβαλλόμενα μέρη της Συνθήκης της Στοκχόλμης συμφώνησαν για τη περιοδική επανεξέταση της λίστας για να προσθέσουν περισσότερες ενώσεις, αν αυτές πληρούν τα κριτήρια για την ανθεκτικότητα και τη διασυννοριακή απειλή. Η δεύτερη ομάδα των εννέα χημικών ουσιών που προστέθηκαν στη σύμβαση είχε συμφωνηθεί σε μια διάσκεψη στη Γενεύη στις 8 Μαΐου 2009. Σε αυτήν την ομάδα ανήκουν τρία ισομερή hexachlorocyclohexane (μεταξύ των οποίων είναι το Lindane). Από τον Απρίλιο του 2011 υπάρχουν 173 συμβαλλόμενα μέρη στη σύμβαση και από τον Οκτώβριο του 2011 προστέθηκαν άλλα τρία.

Στο **πίνακα 1** παρουσιάζονται οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα που περιλαμβάνονται σε διεθνείς συμβάσεις και στη **PAN DirtyDozen** και στο **πίνακα 2** οι κανονισμοί απαγόρευσης της Ε.Ε

Πίνακας 1: Οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα που περιλαμβάνονται σε διεθνείς συμβάσεις και στη PAN DirtyDozen [1]

Ενεργός ουσία	PIC*	POP's**	LRTAP***	PAN Dirty Dozen****
2,4,5 - Τ και άλατα-εστέρες του	√	√		√
Aldrin	√	√	√	√
Chlordane	√	√	√	√
Chlordecone			√	
Chlordimeform	√			√
Chlorobenzilate	√			√
DDT	√	√	√	√
Dieldrin	√	√	√	√
Endrin		√	√	√
Ethylene dichloride	√			
HCH, μίγμα ισομερών	√		√	√
Heptachlor	√	√	√	√
Hexachlorobenzene	√	√	√	√
Lindane	√		√	√
Mirex		√	√	
PCB's πλην μονοχλωριωμένων & διχλωριωμένων		√	√	
Pentachlorophenol και άλατα-εστέρες της	√			√
Toxaphene (Camphechlor)	√	√	√	√

***Σύμβαση του Ρόττερταμ** επί της εκ των προτέρων Ενημερωμένης συγκατάθεσης (PIC): Ετέθη σε ισχύ το Φεβρουάριο 2004 και είναι ένα σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για όλες τις απαγορεύσεις και τους περιορισμούς που αφορούν στα παρασιτοκτόνα. Όσα από αυτά έχουν απαγορευθεί σε δύο χώρες από δύο διαφορετικές περιοχές του κόσμου, μπαίνουν σε μια λίστα της PIC και οι χώρες εισαγωγής πρέπει να δηλώσουν αν επιτρέπουν ή όχι την εισαγωγή, ενώ οι χώρες εξαγωγής πρέπει να διασφαλίσουν τη συμμόρφωση. Περιλαμβάνονται 37 ουσίες (24 παρασιτοκτόνα).

****Σύμβαση της Στοκχόλμης** για τους Ανθεκτικούς Οργανικούς Ρυπαντές (POP's): Ετέθη σε ισχύ το Μάιο του 2004 και περιλαμβάνει 12 ουσίες (8 παρασιτοκτόνα), για τις οποίες οι Κυβερνήσεις θα λάβουν μέτρα περιορισμού ή εξάλειψης των προγραμματισμένων και μη εκπομπών τους στο περιβάλλον. Πολλοί POP's παραμένουν σε αποθήκες και απαιτείται η ασφαλής απόρριψή τους. Το WWF (Παγκόσμιο Ταμείο για τη Φύση) έχει αναγνωρίσει ακόμη 20 ουσίες που πρέπει να προστεθούν, από τις οποίες 7 παρασιτοκτόνα: Chlordecone, HCH/Lindane, Pentachlorophenol, Endosulfan, hexachlorobutadiene, dicofof, methoxychlor.

*****Σύμβαση για τη Μακράς Ακτίνας Διασπορευτική Ατμοσφαιρική Ρύπανση (LRTAP)**: Αυτή η σύμβαση της Οικονομικής Επιτροπής του ΟΗΕ για την Ευρώπη καλύπτει ουσίες μεταφερόμενες σε μεγάλες αποστάσεις (11 παρασιτοκτόνα) και σχετίζεται με το Πρωτόκολλο του 1998 που αποτέλεσε τη βάση της σύμβασης της Στοκχόλμης.

**** **«Η βρώμικη ντουζίνα» (The Dirty Dozen)**: περιλαμβάνει 18 ουσίες και είναι μια πρωτοβουλία του Pesticide Action Network (PAN, UK), με σκοπό την εστίαση στη διακοπή της χρήσης των επικίνδυνων αυτών χημικών.

Πίνακας 2: Οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα που απαγορεύθηκαν στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Πηγή: PAN-UK,2005-τροποποιημένο) [1]

ουσία	είδος περιορισμού χρήσης στην Ε.Ε	Κανονισμός / Οδηγία (Απόφαση*)
Aldrin	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	79/117/EEC(1991)+850/2004
Chlordane	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	79/117/EEC(1981)+850/2004
Chlorobenzilate	Απαγόρευση	2076/2002(00/626)
DDT	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	79/117/EEC(1986)+850/2004
Dieldrin	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	79/117/EEC(1981)+850/2004
Endrin	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	79/117/EEC(1991)+850/2004
Ethylene dichloride	Απαγόρευση	79/117/EEC(1989)
HCH περιέχον <99% γ-ισομερές	Απαγόρευση	79/117/EEC(1981)
Heptachlor	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	79/117/EEC(1984)+850/2004
Hexachlorobenzene	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	79/117/EEC(1981)+850/2004
Lindane (g-HCH)	Απαγόρευση	Αναφερόμενο στο 304/2003 (00/801)
Mirex	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	850/2004
Pentachlorophenol και συστατικά της	Απαγόρευση	91/173/EEC
Toxaphene	Απαγόρευση + απαγόρευση εξαγωγής	79/117/EEC(1984)+850/2004

*Οι παρενθέσεις αντιπροσωπεύουν σχετικό αριθμό απόφασης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής

1.2) Χημική δομή και ιδιότητες οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων

Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα αποτελούνται από διαφορετικές ομάδες ενώσεων. Κοινό χαρακτηριστικό αυτών των ενώσεων είναι ότι ενώνονται ομοιοπολικά τα άτομα άνθρακα με άτομα χλωρίου. Έτσι σύμφωνα με τη χημική τους δομή μπορούν να χωριστούν και να κατηγοριοποιηθούν σε 5 ομάδες [4]:

- Ομάδα του DDT
- Εξαχλωροκυκλοεξάνιο (HCH, και 8 ισομερή, εκ των οποίων το πιο γνωστό το γ-ισομερές είναι το Lindane),
- Ομάδα χλωριωμένων κυκλοδιενίων (περιλαμβάνονται τα Aldrin, Dieldrin, Endrin, Heptachlor, Chlordane, Endosulfan),
- Τοxaphene (μίγμα ενώσεων), και
- Φυτοφάρμακα με δομή κλωβού (caged structured), όπως πχ. το Mirex.

Ανήκουν συνεπώς σε μια ομάδα χλωριωμένων ενώσεων, οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί ως «σταθερές» και έμμονες στο περιβάλλον. Η σταθερότητα των ενώσεων αυτών οφείλεται στο γεγονός πως δεν βιοδιασπώνται ευκόλως από τους μηχανισμούς του περιβάλλοντος. Έτσι, τα OCP's διατηρούνται για δεκάδες χρόνια μετά την απόρριψή τους στο περιβάλλον, βιοσυσσωρεύονται και βιομεγεθύνονται στους ζωντανούς οργανισμούς. Οργανοχλωριωμένες ενώσεις έχουν βρεθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα ζώα που βρίσκονται στη κορυφή της τροφικής αλυσίδας (δελφίνια, φώκιες, ψάρια κ.α., καθώς και σε ανθρώπους που τρέφονται πολύ με ψάρια). [6]

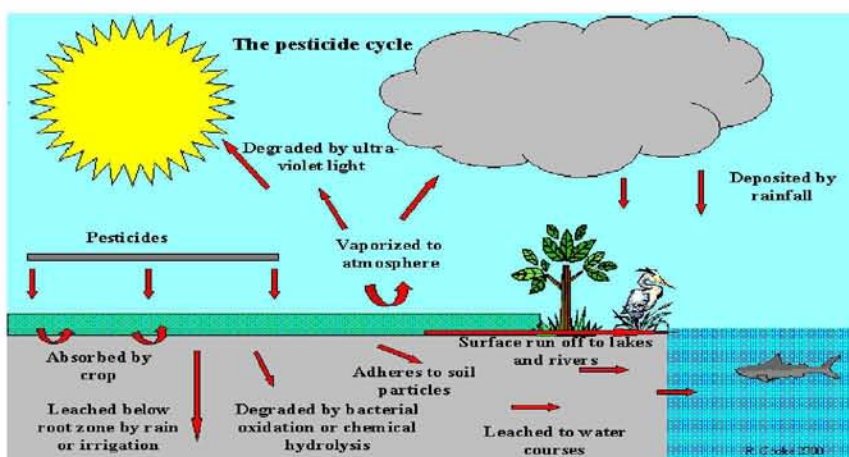
Οι φυσικοχημικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα OCP's είναι η λιποφιλικότητά, η πτητικότητα, η χαμηλή πίεση ατμών και η χαμηλή βιοδιασπασιμότητα. Συνεπώς, διαπιστώνεται ότι οι ιδιότητες αυτές τα καθιστούν από τη μια αποτελεσματικά ως εντομοκτόνα, αλλά από την άλλη είναι υπεύθυνες για την εμμονή τους στο περιβάλλον και τη μετέπειτα βιοσυσσώρευσή τους στη τροφική αλυσίδα. [13] Στο **πίνακα 3** παρουσιάζονται κάποια από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ορισμένων OCP's.

ουσία	Μοριακό βάρος	Διαλυτότητα σε νερό	Διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες	Σημείο βρασμού (°C)	LogK _{ow}	Τάση ατμών
m-Xylene	106,17	161mg/L	αναμείξιμο σε alcohol, ether και άλλους διαλύτες	139,1	3,2	8.29mm Hg at 25 °C
a-HCH	290,83	10ppm,69.5 mg/L at28 °C	Διαλυτό σε alcohol, 1,8g/100 g σε ethanol, 6,2g/100 g σε ether	288 °C at 760mmHg	3,8	4.5*10 ⁵ mm Hg at 25 °C
b-HCH	290,83	5ppm	1,1g/100g σε ethanol, 1,8g/100g σε ether, 1,9g/100g σε benzene	60 °C at 0,5 mmHg	3,78	3.6*10 ⁷ mm Hg at 20 °C
c-HCH	290,83	17ppm, insoluble	6,4g/100g ethanol, 20,8g/100g ether, 28,9g/100g benzene	323.4 °C at 760 mmHg	3,72	4.2*10 ⁵ mmHg at 20 °C
Heptachlor	373,72	0,05 mg/L	διαλυτό στους περισσότερους διαλύτες	145 °C	6,1	3*10 ⁴ mmHg ^g at 20 °C and 25 °C
Aldrin	364,91	0,011 mg/L	πολύ διαλυτό στους περισσότερους διαλύτες	Αποσυντίθεται	6,5	7,5*10 ⁵ mmHg στους20 °C,1,2*10 ⁻⁴ mm Hg στους 25 °C
Heptachlor Epoxide	389,4	0,275 mg/L	διαλυτό στους περισσότερους διαλύτες	No data	5,4	1,95*10 ⁵ mm Hg at 30 °C
cis-Chlordane	409,78	1,850 mg/L	Αναμείξιμο με υδρογονανθρακικούς διαλύτες	175 °C at 2mm Hg	5,54	2,2*10 ⁻⁵ mm Hg at 25 °C
Endosulfan I	406,93	0,53 mg/L	no data	No data	3,83	1*10 ⁻⁵ mm Hg at 25 °C
a-Chlordane	409, 78	0,056 mg/L	αναμείξιμο με υδρογονανθρακικούς διαλύτες	175 °C at 2mm Hg	5,54	2,2*10 ⁻⁵ mm Hg at 25 °C
Endrin	380,9	200 µg/L	acetone 17 g/100mL, benzene 13,8g/100mL, carbon tet. 3,3g/100mL, hexane 7,1g/100mL, xylene 18,3 g/100mL	Αποσυντίθεται στους 245 °C	5,34	2*10 ⁻⁷ mm Hg at 25 °C
Hexachloro-benzene	284,78	0,0062mg/L και 0,0047mg/L στους 25 °C και 0,006 στους 20°C	Αδιάλυτο στο νερό, μετρίως διαλυτό σε ethanol, διαλυτό σε diethylether και chloroform, πολύ διαλυτό σε benzene	323 – 326 °C	5,73	1.09 * 10 ⁻⁵ mm Hg
Endosulfan II	406,93	0,28 mg/L	διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες	No data	3,62	1*10 ⁻⁵ mm Hg at 25 °C
p'p DDD	320,05	0,090 mg/L	No data	350 °C	6,02	1,35x10 ⁻⁶ mm Hg at25 °C
Endrin Aldeyde	381,9	50mg/L,0,25-0,26 ppm	No data	No data	5,6	2*10 ⁻⁷ mmHg at 25 °C
Endosulfan Sulfate	422,95	0.22 σε 22 °C (pH7.2), 0.117 σε 25	No data	No data	3,66	1.0*10 ⁻¹¹ mm Hg at 25 °C

		°C				
p'p DDT	354,49	0,025 mg/L at 25 °C	Ελαφρώς διαλυτό σε ethanol, πολύ διαλυτό σε ethylether και acetone	Αποσυντίθεται	6,91	1,60*10 ⁻⁷ mmHg at 20 °C
Endrin Ketone	380,9	no data	No data	No data	4,99	No data
p'p DDE	318,03	0,12 mg/L at 25 °C	λιπίδια και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες	336 °C	6,51	6,0x10 ⁻⁶ mm Hg at 25 °C
Methoxychlor	345,65	0,04 mg/L at 24 °C	διαλυτό σε χλωριούχους αρωματικούς και κετονικούς διαλύτες, ethanol, xylene, methanol, benzene, petroleum ether	No data	4,68-5,08	1,4x10 ⁻⁶ mmHg at 25 °C

Πίνακας 3: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ουσιών [45]

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις είναι γνωστές για την εντομοκτόνο δράση τους, καθώς κατά κύριο λόγο στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν στη παρασκευή των εντομοκτόνων για τον έλεγχο των εντόμων στη γεωργία. Έχει αποδειχθεί ότι τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα μετά τη χρήση τους υφίστανται μια σειρά από φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες. Μπορούν να απορροφηθούν από τα φυτά, να εξατμιστούν, να προσροφηθούν σε αιωρούμενα σωματίδια και να μεταφερθούν, να δεσμευτούν στο έδαφος (στα κολλοειδή της αργίλου ή στην οργανική ουσία) ακόμη και να περάσουν στο υπέδαφος και στα υπόγεια νερά μέσω της έκπλυσης και της διήθησης (εικόνα 8). Στο έδαφος μπορεί να υποστούν χημική ή μικροβιακή διάσπαση σε λιγότερο τοξικές ουσίες (μεταβολίτες). Επίσης μπορεί να καταλήξουν μέσω της επιφανειακής απορροής σε λίμνες, ποτάμια και θάλασσα και τέλος στους υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες. Στο θαλάσσιο περιβάλλον εισέρχονται επίσης από τα αστικά λύματα και την ιλύ εγκαταστάσεων επεξεργασίας αποβλήτων.[7], [8]



Εικόνα 8: Ο κύκλος των παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον

Αναλυτικότερα, μετά την εφαρμογή τους (κυρίως με ψεκασμό), δημιουργείται αερόλυμα (αεροζόλ), το οποίο εναποθέτεται στα ζώα, τα φυτά ή τα υλικά – στόχους, με τελικούς αποδέκτες το έδαφος, τα γλυκά και τα αλμυρά ύδατα και, για μεγάλα χρονικά διαστήματα, στην ατμόσφαιρα.

Διασπώνται στη φύση με τη βοήθεια της υψηλής θερμοκρασίας, της υπερϊώδους ακτινοβολίας και ορισμένων μικροοργανισμών. Μειονέκτημα είναι το ότι η διάσπαση αυτή είναι χαρακτηριστικά βραδεία (εώς αρκετές δεκαετίες για ορισμένα). Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας σε συνδυασμό με τη κυκλική εναλλαγή των άψυχων αποδεκτών (γλυκό νερό, θάλασσα, έδαφος, αέρας) αλλά και με τη πρόσληψη μέσω της τροφής από τους οργανισμούς που βρίσκονται υψηλότερα στη τροφική αλυσίδα, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, δημιουργείται βιοσυσσώρευση και βιομεγέθυνση στο λιπώδη ιστό των ζώντων οργανισμών.

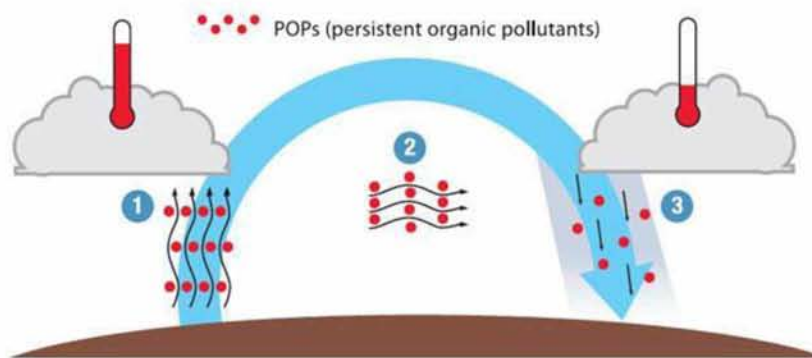
Από όλα τα παραπάνω, για τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα θα μπορούσε να αναφερθεί συνοπτικά μια σειρά από κοινά χαρακτηριστικά:

- Παρόμοια χημική δομή με τους χλωριο-υποκατεστημένους αλειφατικούς ή αρωματικούς κυκλικούς δακτυλίου.
- Υψηλή σταθερότητα / δε βιοδιασπώνται στο περιβάλλον: η ιδιότητα αυτή καθιστά τα υπολείμματά τους επικίνδυνα καθώς είναι ικανά να προκαλέσουν μελλοντικές βλάβες και να βιοσυσσωρευθούν σε οργανισμούς. Ο χρόνος ημιζωής που καθιστά αυτά τα εντομοκτόνα ανθεκτικά είναι μεγαλύτερος από δυο μήνες σε νερό ή έξι μήνες στο έδαφος και τα ιζήματα. Για κάποια από αυτά ο χρόνος ημιζωής είναι ακόμα και δεκαετίες.
- Λιπόφιλες ενώσεις που τείνουν να βιοσυσσωρεύονται και να βιομεγθενθύνονται στο λιπώδη ιστό.
- Αδιάλυτα στο νερό και ημιπτητικά, επιτρέποντας την είσοδό τους στην ατμόσφαιρα και τη μεταφορά σε μεγάλες αποστάσεις σε παγκόσμιο επίπεδο, κυρίως μέσα από τις κινήσεις των αέριων μαζών. Μπορούν να φτάσουν σε πολικές ή ορεινές περιοχές μέσω του φαινομένου της συμπύκνωσης, γνωστό ως «παγκόσμια απόσταξη».
- Η βιοσυσσώρευση είναι αποτέλεσμα της έκθεσης από το νερό, τη τροφή και μέσω του δέρματος σε επαφή με τα εντομοκτόνα. Η βιομεγέθυνση των υπολειμμάτων οργανοχλωριωμένων ενώσεων που έχει μετρηθεί είναι της τάξης των 10^6 από το νερό σε υδρόβιους οργανισμούς.
- Η θερμοκρασία, το pH, το ηλιακό φως και η υγρασία παίζουν το ρόλο τους.
- Ο μηχανισμός τοξικότητας των οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε ζωικούς οργανισμούς είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης με υποδοχείς μέσα στο

σώμα του οργανισμού, που ονομάζεται βιοχημική βλάβη ή αλλοίωση. Η τοξικότητα επηρεάζεται από το είδος, την ηλικία και το φύλο του οργανισμού, τον τύπο της έκθεσης, την επίδραση άλλων ρύπων κλπ. Επίσης, η διατροφή, το υπερβολικό κρύο, η αναπαραγωγική δραστηριότητα παίζουν σημαντικό ρόλο.

1.3) “Τύχη” και επίδραση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων στο περιβάλλον

Όπως προαναφέρθηκε ένα κοινό χαρακτηριστικό των OCP's είναι ότι μπορούν να ταξιδεύουν μέσω του αέρα ή των ρευμάτων του νερού για χιλιάδες χιλιόμετρα. Σύμφωνα, λοιπόν, με το φαινόμενο της παγκόσμιας απόσταξης «grasshopper effect» (εικόνα 9), σε υψηλές θερμοκρασίες οι ενώσεις αυτές εξατμίζονται, έπειτα κινούνται στην ατμόσφαιρα μέσω των ανέμων σε ψυχρότερες περιοχές, όπως στο βορρά, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες συμπυκνώνονται και πέφτουν στη γη. Έτσι, με το φαινόμενο αυτό τα OCP's μπορούν να απορροφηθούν από τα φυτά, τα ζώα και τους ανθρώπους, να αποθηκευτούν ως επί των πλείστων στο λίπος, να συσσωρευτούν και να βιομεγεθυνθούν μέσα από τη τροφική αλυσίδα. [10]



Εικόνα 9: Απεικόνιση του φαινομένου της παγκόσμιας απόσταξης «grasshopper effect»

Επίσης, η μεταφορά των OCP's μπορεί να γίνει με αυτό το φαινόμενο και μέσω των ωκεανών. Ωστόσο, επιστημονικά είναι σημαντικό να αξιολογηθεί ο αριθμός των «αλμάτων» στον οποίο η χημική ουσία υποβάλλεται σε παγκόσμια κλίμακα πάνω από τον ωκεανό, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν πειραματικές μετρήσεις αυτού του φαινομένου και μπορεί να προβλεφθεί μόνο θεωρητικά. Κάθε «άλμα» αξιολογείται ως εξάτμιση που τη διαδέχεται μια επόμενη εναπόθεση. Έτσι, ο αριθμός των «αλμάτων» είναι ένας δείκτης της ανακύκλωσης των POP's στην ατμόσφαιρα. [11]

Το φαινόμενο της παγκόσμιας απόσταξης «grasshopper effect» προκαλεί οικολογικές ανησυχίες για τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις, καθώς η συμπεριφορά τους και η κινητικότητα τους στο χερσαίο, υδάτινο και ατμοσφαιρικό περιβάλλον ορίζουν τη κατάληξη αυτών των ουσιών μέσα στα οικοσυστήματα.

Συγκεκριμένα, η εξάτμιση των OCP's, αυξάνει τα επίπεδά τους στην ατμόσφαιρα, με αποτέλεσμα να προκαλούνται δευτερογενείς επιπτώσεις, όπως η καταστροφή του στρώματος του όζοντος. [2] Επίσης, η πτητική και ημιπτητική φύση των περισσότερων οργανοχλωριωμένων ενώσεων τους επιτρέπει να επανεκπέμπονται από τα ρυπασμένα οικοσυστήματα κατά τη διάρκεια θερμού κλίματος και σε χαμηλές θερμοκρασίες να επανατοποθετούνται στο έδαφος. Στο έδαφος η εμμονή των OCP's μπορεί να κυμαίνεται από λίγες ώρες έως και πολλά χρόνια στη περίπτωση κάποιων. Παρά το γεγονός ότι πολλά από αυτά απαγορεύτηκαν ή περιορίστηκαν σε πολλές χώρες, εξακολουθούν να ανιχνεύονται στο έδαφος. [44]

Σε ορισμένες περιπτώσεις, εντομοκτόνα μπορούν να εφαρμοστούν απ'ευθείας πάνω στην επιφάνεια του νερού, π.χ. για τον έλεγχο των κουνουπιών. Η ρύπανση του νερού εξαρτάται από τη φύση των εντομοκτόνων (π.χ. τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα είναι υδρόφοβες ενώσεις), τις ιδιότητες του εδάφους, τις καιρικές συνθήκες και την απόσταση από τη σημείο εφαρμογής. Ταχεία μεταφορά στα υπόγεια ύδατα μπορεί να προκληθεί από ισχυρές βροχοπτώσεις αμέσως μετά την εφαρμογή του εντομοκτόνου σε υγρά εδάφη. Η ρύπανση των υπόγειων και των επιφανειακών υδάτων εξαιτίας της χρήσης αυτών των ουσιών έχει προκαλέσει σημαντική ανησυχία σε όλο το κόσμο.

Επειδή τα εντομοκτόνα εισήχθησαν σκόπιμα στο περιβάλλον, είναι σημαντικό να κατανοηθούν οι δυσμενείς επιπτώσεις που προκλήθηκαν σε αυτό. Οι πρώτες και σοβαρές επιπτώσεις των OCP's εμφανίστηκαν στην υγεία των ζώων και ειδικά αυτών των ευαίσθητων οικοσυστημάτων, οι οποίες άρχισαν να εμφανίζονται ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του '60. Παρά το γεγονός ότι πολλά από τα OCP's απαγορεύθηκαν κατά τη δεκαετία του '70, γίνεται αντιληπτό ότι η βιοσυσώρευση και η βιομεγέθυνση των υπολειμμάτων τους όλα αυτά τα χρόνια μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις όχι μόνο στην υγεία των ζώων, αλλά κατ'επέκταση και στου ανθρώπου. [4]

Συγκεκριμένα, οι πιθανές τοξικές επιδράσεις στην υγεία των ζώων (ιδιαίτερα σε αρπακτικά πτηνά, στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας) είναι [1]:

- Αναπαραγωγική ανεπάρκεια και μείωση των πληθυσμών
- Ανώμαλη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένου και άλλες ορμονικές δυσλειτουργίες
- Θηλεοποίηση αρσενικών και αρρενοποίηση θηλυκών ατόμων

- Ανεπάρκειες ανοσοποιητικού συστήματος
- Όγκοι – καρκίνοι
- Διαταραχές συμπεριφοράς
- Σοβαρές συγγενείς ανωμαλίες

1.4) Έκθεση του ανθρώπου στις οργανοχλωριωμένες ενώσεις και η επίπτωση στην υγεία του [14], [15]

Η έκθεση του ανθρώπου γίνεται κυρίως μέσω της τροφής (λιπαρές ζωικές τροφές, ιχθυρά αλλά και λαχανικά), του πόσιμου νερού (αναλόγου προελεύσεως), του δέρματος – βλεννογόνων (λιγότερο πιθανό), της εισπνοής μολυσμένου αεροζόλ ή σκόνης (κυρίως από επαγγελματική έκθεση – εργαζόμενοι στη βιομηχανία παραγωγής αυτών των ουσιών, θεριστές, αγρότες, ψεκαστές). Αξιοσημείωτη και δέουσα σημασίας είναι η έκθεση που ανευρέθηκε σε έμβρυα μέσω του πλακούντα και σε νεογνά μέσω του μητρικού θηλασμού (συγκεντρώνονται και απορρίπτονται μέσω του γάλατος). Εντός του σώματος τα OCP's συγκεντρώνονται μεν στο λίπος, αλλά κυκλοφορούν και ασκούν δράση και σε πολλά όργανα και συστήματα, με αποτέλεσμα οι πιθανές τοξικές δράσεις τους να επηρεάζουν τον άνθρωπο.[1]

Πάνω από 300 χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων μερικών γνωστών καρκινογόνων, έχουν ταυτοποιηθεί στο λιπώδη ιστό και σε άλλα όργανα, όπως τα κύτταρα του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος. Ο εγκέφαλος και οι ενδοκρινικοί αδένες είναι τα όργανα στα οποία οι λιποδιαλυτές τοξίνες συσσωρεύονται. Η συνεχής έκθεση σε αυτές τις χημικές ουσίες για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα της ήπιας γνωστικής δυσλειτουργίας (δηλαδή προβλήματα στον εντοπισμό λέξεων, χρωμάτων ή αριθμών και ανικανότητα στην άπταιστη ομιλία) και ορμονικές ανισορροπίες που οδηγούν σε υπογονιμότητα, πόνο στο στήθος, διαταραχές στην έμμηνο ρύση και πρόωρη εμμηνόπαυση. Οι τοξίνες έχουν την τάση να αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό, να απελευθερώνονται αργά και να ανακυκλώνονται στο αίμα, συμβάλλοντας έτσι και σε χρόνιες ασθένειες.

Ως «ενδοκρινικοί διαταράκτες» καλούνται οι εξωγενείς χημικές ουσίες που προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στο ενδοκρινικό σύστημα. Ορισμένα OCP's ενεργούν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες και μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα υγείας με αποτέλεσμα αναπαραγωγικές ανωμαλίες και δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού. Αυτές οι χημικές ουσίες μιμούνται ή παρεμποδίζουν τη δράση των ορμονών και μπορεί να βλάψουν ή να διαταράξουν την ομαλή λειτουργία ενός οργανισμού.

Η έκθεση σε πολλές οργανοχλωριωμένες ενώσεις μπορεί να επηρεάσει τη ποιότητα του σπέρματος και την αναπαραγωγική ανάπτυξη του εμβρύου. Υπάρχει μια

ανησυχία γι' αυτές τις χημικές ουσίες επειδή έχουν οιστρογονικές ιδιότητες και μπορεί να προκαλέσουν μια ποικιλία από διαταραχές στην αναπαραγωγή των ζώων και των ανθρώπων. Δεδομένα ερευνών έδειξαν ότι η έκθεση ορισμένων ασθενών σε οργανοχλωριωμένες ενώσεις με οιστρογονικές ιδιότητες, όπως το Dieldrin, το Endosulfan και το Chlordane, προκάλεσε μια αύξηση στην οιστρογονική δραστηριότητα του οργανισμού τους. Επίσης, η έκθεση σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα μπορεί να παίζει ρόλο σε μια πιθανή δυσμενή έκβαση της εγκυμοσύνης. Επιδημιολογικές έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ότι υπάρχει αυξημένος κίνδυνος για καθυστέρηση στη σύλληψη και αυτόματη αποβολή σε γυναίκες που οι συζύγοί τους ήταν εκτεθειμένοι σε αυτές τις ουσίες.

Επιδημιολογικά στοιχεία έχουν δείξει ότι οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε όλο το κόσμο είναι ανοσοκατασταλτικά. Αυτό δημιουργεί δυνητικά σοβαρούς κινδύνους για την υγεία πληθυσμών που είναι ιδιαίτερα εκτεθειμένοι σε λοιμώδη και παρασιτικά νοσήματα. Πολλές μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν μια ποικιλία των επιπτώσεων των εντομοκτόνων στο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως π.χ μείωση του σχηματισμού των αντισωμάτων κατά 70% και μειωμένη κυτταρική ανοσία. Σε μια σοβαρή έκθεση σε OCP's, το ανοσοποιητικό σύστημα θα βρεθεί σε μια υπερδιεγερμένη κατάσταση και θα παράγει αυτο-αντισώματα. Έτσι, το ανοσοποιητικό σύστημα οδηγείται σε δυσλειτουργία και προκαλούνται αλλεργίες, φλεγμονώδεις καταστάσεις, πρήξιμο αδένων, υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, σύνδρομο χρόνιας κόπωσης και αυτοάνοσα νοσήματα.

Η νόσος του Parkinson είναι η πιο κοινή νευροεκφυλιστική διαταραχή. Θεωρείται ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες σε συνδυασμό με κάποια γενετική προδιάθεση μπορούν να αποτελέσουν τη βασική μοριακή βάση για τον ιδιοπαθή. Επιδημιολογικά και πειραματικά δεδομένα δείχνουν τη πιθανή εμπλοκή των παρασιτοκτόνων (οργανοχλωριωμένων και οργανοφωσφορικών) στη παθογένεση του εκφυλισμού. Έτσι υποστηρίζεται ότι το περιβάλλον συσχετίζεται με τη νόσο του Parkinson.

Διάφορες μελέτες έχουν αποδείξει μια σύνδεση μεταξύ των καρκίνων του εγκεφάλου με τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις. Επίσης, στα τέλη της δεκαετίας του 1970 υπήρξαν αναφορές που συνδέουν τα OCP's με τη λευχαιμία στα παιδιά και γενικότερα με το καρκίνο στη παιδική ηλικία. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η επιδημία του καρκίνου του μαστού σχετίζεται με την έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους, συμπεριλαμβανομένου του DDT και άλλων καρκινογόνων φυτοφαρμάκων. Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, όπως το DDT και οι μεταβολίτες του DDD, DDE, το Dieldrin, Heptachlor, HCH και τα ισομερή του ανιχνεύονται στο αίμα ασθενών με καρκίνο του μαστού, ανεξάρτητα από την ηλικία, τη διατροφή και τις γεωγραφικές περιοχές σε σύγκριση με τις κανονικές

γυναίκες. Στο **πίνακα 4** γίνεται μια αναφορά στις ουσίες έχουν καρκινογόνο δράση σύμφωνα με τις σχετικές Ενώσεις και Οργανισμούς.

Να επισημανθεί επίσης ότι, τα αποτελέσματα της βιολογικής παρακολούθησης (κυτταρογενετικές μέθοδοι) έδειξαν ότι η έκθεση σε OCP's προκαλεί βλάβες στο DNA και στα περιφερειακά λεμφοκύτταρα.

Πίνακας 4: Καρκινογόνος δράση οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων σύμφωνα με τις σχετικές Ενώσεις και Οργανισμούς [1]

ενεργός ουσία	US EPA	EU	IARC
Acetochlor	2		
Alachlor	L2	3	
Aldrin	B2	3	3
Carbon tetrachloride	B2	3	2B
Chlordane	B2	3	2B
Chlordecone		3	2B
Chlordimeform	B2	3	
Chloroform	B2	3	2B
DDD	B2		
DDT	B2	3	2B
Lindane (HCH)	3		2B
Methoxychlor			3
Mirex		3	2B
Paradichlorobenzene	C		
Pentachlorophenol	B2	3	
DBCP	B2	2	2B
Dichloromethane	B2	3	2B
Dichlorvos	3		2B
Dieldrin	B2	3	3
Endrin	3		
Heptachlor	B2	3	2B
Hexachlorobenzene	B2	2	2B
Hexachlorocyclohexane	B2		2B
Toxaphene	B2		2B
Trichlorophenol, 2,4,6- προϊόντα διάσπασης	B2	3	
DDE	B2		
Heptachlor Epoxide	B2	3	

*Το Γραφείο Περιβαλλοντικής Προστασίας των Η.Π.Α (USEPA) έχει αλλάξει τα συστήματα ταξινόμησης τα τελευταία χρόνια και συγκεκριμένα:

Ταξινόμηση 1986: ομάδα A = βέβαιο ανθρώπινο καρκινογόνο, ομάδα B = πολύ πιθανό ανθρώπινο καρκινογόνο (B1=περιορισμένα δεδομένα, B2=επαρκή δεδομένα στα ζώα αλλά ανεπαρκή στον άνθρωπο),

Ομάδα C=πιθανό ανθρώπινο καρκινογόνο

Ταξινόμηση 1996: L1=επαρκώς πιθανό, L2=πιθανό ανθρώπινο καρκινογόνο σε υψηλές δόσεις

Ταξινόμηση 1999: 1=ανθρώπινο καρκινογόνο, 2=πιθανό ανθρώπινο καρκινογόνο, 3=ενδείξεις που συνηγορούν αλλά δεν επαρκούν, 4=απίθανο

**Σύμφωνα με την οδηγία EC 67/548, η Ευρωπαϊκή Ένωση (EU) ταξινομεί τις ουσίες σε: κατηγορία 1=πιθανή πρόκληση καρκίνου, κατηγορία 2=πιθανός κίνδυνος μη αντιστρεπτών βλαβών (και καρκίνου)

***Το Διεθνές Γραφείο Έρευνας του Καρκίνου (IARC) διακρίνει: κλάση 1=βέβαιο καρκινογόνο για τον άνθρωπο, κλάση 2A=πολύ πιθανό, κλάση 2B=πιθανό, κλάση 3=μη ταξινομούμενο

Αποδεικτικά στοιχεία εμπλέκουν, επίσης, το ρόλο των OCP's στην ανάπτυξη της νόσου του Alzheimer, αν και είναι λιγότερα από εκείνα του Parkinson. Σύμφωνα με μια έρευνα που έγινε επί δέκα χρόνια σε ηλικιωμένους ανθρώπους που ζουν σε μια αγροτική περιοχή, τα στοιχεία παρουσίασαν το κίνδυνο της νόσου του Alzheimer. Μια πρόσφατη οικολογική μελέτη του Pagnonnet. al. (2011) [16] απέδειξε ότι οι άνθρωποι που ζούν σε περιοχές με υψηλά επίπεδα οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων είχαν αυξημένο κίνδυνο της νόσου.

Ο διαβήτης έχει μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα, όπου οι ερευνητές διερεύνησαν τις επιπτώσεις της έκθεσης σε OCP's στην ομοιόσταση της γλυκόζης και στη μη ισορροπημένη έκκριση ινσουλίνης σε πειραματόζωα. Πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες έδειξαν ότι η έκθεση σε OCP's μπορεί να είναι ένας πιθανός παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του σακχαρώδους διαβήτη. [17],[18],[19]

Η υψηλότερη συχνότητα της όψιμης έναρξης νευροπαθειών, όπως η χρόνια νεφρική νόσος και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, έχει αναφερθεί σε άτομα μέσης ηλικίας (40-60 ετών) που ζουν σε αγροτικές περιοχές με περισσότερη εμφάνιση στους άνδρες. Υψηλότερο επίπεδο οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων ανιχνεύθηκε σε ασθενείς με χρόνια νευρική νόσο.

Το άσθμα θεωρείται ως η πιο συχνή διαταραχή μεταξύ των χρόνιων αναπνευστικών δυσλειτουργιών που επηρεάζουν τόσο τα παιδιά όσο και τους ενήλικες. Ωστόσο, υπάρχει και το επαγγελματικό άσθμα. Υπήρξαν αναφορές σχετικά με το επαγγελματικό άσθμα, όπου παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού άσθματος σε ανθρώπους που ήταν επαγγελματικά εκτεθειμένοι σε OCP's.[20] Αποτελέσματα μελέτης έδειξαν ότι η έκθεση σε ορισμένες οργανοχλωριωμένες ενώσεις μπορεί να αυξήσει το κίνδυνο της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (ΧΑΠ) σε γεωργούς. [21]

Συνεπώς, ο κίνδυνος στην υγεία από την έκθεση σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα γίνεται αντιληπτός μέσα από μελέτες σε πειραματόζωα και σε επιδημιολογικές μελέτες. Οι επιπτώσεις στην υγεία που προκαλούν κάποιες οργανοχλωριωμένες ουσίες αναφέρονται συνοπτικά στο **πίνακα 5**.

Πίνακας 5: Οι επιπτώσεις στην υγεία που προκαλούν κάποιες οργανοχλωριωμένες ουσίες μέσα από μελέτες σε πειραματόζωα και επιδημιολογικές μελέτες [22], [23]

Ουσίες	Επιπτώσεις στην υγεία
<p>Heptachlor/ Heptachlor Epoxide</p> <p>EPA: B2 πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Νευρικό σύστημα • Γαστρεντερικό σύστημα • Ανοσοποιητικό σύστημα • Αναπαραγωγικό σύστημα • Αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη του εμβρύου και στη μεταγεννητική επιβίωση • Ηπατικοί όγκοι • Αρνητικές επιδράσεις στα νεφρά • Ευερεθιστικότητα/σιελόρροια/ζάλη • Επιπτώσεις στο αίμα
<p>Hexachlorobenzene</p> <p>EPA: B2 πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ασθένεια ήπατος που σχετίζεται με δερματικές αλλοιώσεις • Καρκίνος του ήπατος • Καρκίνος του θυροειδούς • Καρκίνος των νεφρών • Επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα • Επιπτώσεις στο αίμα • Νευρολογικές επιπτώσεις • Τερατογόνες επιπτώσεις • Επιπτώσεις στο συκώτι
<p>Hexachlorohexane</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Δερματικά εξανθήματα • Νευρικό σύστημα (πχ. επιληπτικές κρίσεις, υπερδιέγερση, σπασμούς) • Εμετός και ναυτία • Αιματολογικές επιπτώσεις • Νευροχημικές μεταβολές στον εγκέφαλο • Μεταβολές συμπεριφοράς σε ενήλικα ζώα και απογόνους • Μειωμένος αριθμός ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων και αιμοσφαιρίνης • Αύξηση δραστηριοτήτων των ενζύμων • Νέκρωση του ήπατος και εκφυλισμός • Εμβρυοτοξικότητα • Αναπαραγωγικό σύστημα (πχ. αλλαγές στους όρχεις και στο σπέρμα των αρρένων) • Συσχέτιση με την ασθένεια non Hodgkin's lymphoma
<p>DDT/DDD/DDE</p> <p>EPA: DDE - B2 πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Νευρικό σύστημα (επιδράσεις ήπιας μορφής μέχρι δονήσεις και σπασμούς και στα ζώα μπορεί να προκληθεί μέχρι και θάνατος) • Μεταβολές στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη • Προβλήματα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (πχ. κίνδυνος να γεννηθούν πρόωρα βρέφη και να υπάρξουν

	<ul style="list-style-type: none"> • ανωμαλίες στο ύψος των παιδιών) • Καρκίνος, κυρίως στο ήπαρ • Δυσμενείς επιδράσεις στο ήπαρ και την ανοσοϊκανότητα • Αναπαραγωγικό σύστημα (πχ. υπογονιμότητα, αρνητικές επιπτώσεις στη σπερματογένεση, μειωμένο βάρος ορχέων και ωοθηκών) • Εμβρυοτοξικότητα • Οιστρογονική δραστηριότητα • Ηπατικοί όγκοι και όγκοι θυροειδούς
Endrin/ Aldehyde/ ketone	Endrin Endrin <ul style="list-style-type: none"> • Σοβαρός τραυματισμός του κεντρικού νευρικού συστήματος (εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός) • Πονοκέφαλος/Ζάλη/Νευρική/Νευρικότητα /Σύγχυση/Ναυτία/Εμετό/Σπασμούς • Γενετικές ανωμαλίες και ανώμαλος σχηματισμός των οστών • Ανάπτυξη εμβρύων • Ηπατική νόσο
Aldrin/Dieldrin EPA: B2 πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο	<ul style="list-style-type: none"> • Διέγερση του κεντρικού νευρικού συστήματος με αποκορύφωμα τους σπασμούς • Ηπατική και νεφρική τοξικότητα • Αιμολυτική αναιμία • Πονοκέφαλος/ζάλη/εμετός/ευερεθιστότητα/ανεξέλεγκτες μυϊκές κινήσεις • Ανοσοκαταστολή • Εμβρυϊκή τοξικότητα • Ηπατικοί όγκοι • Αυξημένη θνησιμότητα μετά τη γέννηση • Νευροαναπτυξιακές επιπτώσεις • Μειωμένη αναπαραγωγική λειτουργία
Chlordane EPA: B2 πιθανό καρκινογόνο για τον άνθρωπο	<ul style="list-style-type: none"> • Νευρικό/ πεπτικό / αναπνευστικό σύστημα • Πονοκέφαλος/ερεθισμός/σύγχυση • Αδυναμία • Προβλήματα όρασης • Στομαχικές διαταραχές / εμετό / κράμπες στο στομάχι / διάρροια • Ήπαρ • Αναιμία/αλλαγές στα κύτταρα του αίματος • Αρνητικές επιπτώσεις σε νεφρά, ήπαρ, αίμα, θυροειδή

Ωστόσο, η επίδραση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων στην υγεία του ανθρώπου εξαρτάται από τη ποσότητα της οργανοχλωριωμένης ένωσης που έχει συσσωρευτεί, τη διάρκεια και τη συχνότητα της έκθεσης και από τη τοξικότητα του οργανοχλωριωμένου εντομοκτόνου. Οι επιδράσεις εξαρτώνται επίσης από την υγεία του ατόμου κατά το χρόνο της έκθεσης. Χρόνιες επιπτώσεις των OCP's μπορούν να αναπτυχθούν σε ηλικιωμένα άτομα λόγω της μακράς λανθάνουσας περιόδου μεταξύ της έκθεσης και της ασθένειας.

Η τοξικότητα των εντομοκτόνων εκφράζεται γενικά με τη δόση που εκτιμάται ως ασφαλής (acceptable intake level) (**πίνακας 6**) και συσχετίζεται με την ευαισθησία και το στάδιο ανάπτυξης του ανθρώπινου οργανισμού [12].

- Acceptable daily intake (ADI): Μέγιστη αποδεκτή ημερήσια δόση, εκφρασμένη σε mg της ουσίας ανά kg ανθρώπινου σωματικού βάρους, η οποία δεν επιφέρει κίνδυνο στον άνθρωπο.

Τοξικότητα	Συμπτώματα
Οξεία: από έκθεση εντός 24 ωρών	<ul style="list-style-type: none"> • Ερεθισμός δέρματος • Ερεθισμός αναπνευστικού • Αλλεργικές αντιδράσεις/άσθμα • Γαστρεντερολογικά συμπτώματα • Ειδικά σύνδρομα
Χρόνια: Από επαναλαμβανόμενη έκθεση	<ul style="list-style-type: none"> • Ανωμαλίες κατά την ανάπτυξη και την εξέλιξη του οργανισμού • Διαταραχές ενδοκρινικού, αναπαραγωγικού και ανοσοποιητικού συστήματος • Καρκίνος • Αυξημένη ευαισθησία σε μολύνσεις

Πίνακας 6: Τα συμπτώματα της οξείας και χρόνιας τοξικότητας και η εκτίμηση τοξικότητας

1.5) Προστασία της δημόσιας υγείας μέσω της βιοπαρακολούθησης της έκθεσης σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα

«Η βιοπαρακολούθηση (biomonitoring) ορίζεται ως μια μέθοδος αποτίμησης της ανθρώπινης έκθεσης σε χημικές ουσίες μετρώντας τις καθαυτές ουσίες ή τους μεταβολίτες τους σε αντιπροσωπευτικά δείγματα, όπως το αίμα ή τα ούρα.» [24]

Ο προσδιορισμός χημικών ουσιών στα ανθρώπινα υγρά ή ιστούς χρησιμοποιήθηκε αρχικά στο πεδίο της επαγγελματικής ιατρικής για την προστασία της υγείας των εκτιθέμενων εργαζομένων. Πρώιμα παραδείγματα της βιοπαρακολούθησης αποτελεί ο προσδιορισμός μολύβδου ή μεταβολιτών του βενζολίου στο αίμα ή στην ουρία. Τη δεκαετία του '60 αναπτύχθηκαν αναλυτικές τεχνικές οι οποίες επέτρεπαν τη μέτρηση πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων χημικών ουσιών στο αίμα και την ουρία, προκαλούμενες από περιβαλλοντική έκθεση σε αυτές.

Επειδή, τα OCP's αποτελούνται από οργανοχλωριωμένες ενώσεις οι οποίες αργούν να βιοδιασπαστούν στο περιβάλλον, αυξάνεται η πιθανότητα έκθεσης του ανθρώπου σε αυτές ακόμα και σήμερα μετά την απαγόρευσή τους. Η βιοπαρακολούθηση αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της ανθρώπινης έκθεσης σε αυτές τις ουσίες. Ο ρόλος της βιοπαρακολούθησης περιλαμβάνει τη μέτρηση της μητρικής ουσίας και των μεταβολιτών της σε βιολογικά δείγματα, όπως το αίμα ή τα ούρα, για να καθορίσει μια έκθεση ή για να προσδιορίσει την έκταση της εν λόγω έκθεσης. Ωστόσο, εκτός από το αίμα και τα ούρα, αναλύονται επίσης το μητρικό γάλα, τα μαλλιά, τα νύχια, το λίπος, τα οστά και άλλοι ιστοί που μπορούν να συμπεριληφθούν στο δείγμα. Αν και η βιοπαρακολούθηση έχει τους περιορισμούς της, είναι μια πολύ χρήσιμη μέθοδος που ενσωματώνει όλες τις οδούς έκθεσης που επιτρέπονται για τη μέτρηση μιας έκθεσης. Για να είναι επιτυχής η χρήση της βιοπαρακολούθησης, συχνά απαιτούνται βοηθητικές πληροφορίες για την ουσία-στόχο, όπως για παράδειγμα ο χρόνος έκθεσης και οι φαρμακοκινητικές πληροφορίες που μας δείχνουν ποια είναι η κύρια ουσία και ποιος ο μεταβολίτης που πρέπει να μετρηθούν. [9]

Όταν τα δεδομένα της βιοπαρακολούθησης συνδυάζονται με επιδημιολογικά, τοξικολογικά ή δεδομένα φαρμακοκινητικής, μπορούν να εκτιμήσουν τη μετρήσιμη ποσότητα που έχει απορροφηθεί από τον οργανισμό καθώς και τη πιθανότητα κινδύνου για την υγεία. Όταν τα δεδομένα αυτά αφορούν ολόκληρο το πληθυσμό μπορούν να βοηθήσουν στη ταυτοποίηση ουσιών που βρίσκονται σε περιβαλλοντικά και/ή ανθρώπινα δείγματα και στο να καθοριστεί η κατανομή της έκθεσης ανάμεσα στον γενικό πληθυσμό. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη ταυτοποίηση ουσιών που αφορούν πληθυσμούς, όπως τα βρέφη και τα παιδιά, οι οποίοι ίσως έχουν υψηλότερη έκθεση απ'ότι ο γενικός πληθυσμός. Οι αρμόδιοι φορείς μπορούν να αποτιμήσουν του

περιβαλλοντικούς κινδύνους για συγκεκριμένα μέρη ή ομάδες του πληθυσμού . Στην επαγγελματική και κλινική ιατρική, η βιοπαρακολούθηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο επίβλεψης για την ερμηνεία ενός κλινικού προβλήματος ή για την παρακολούθηση μιας έκθεσης.[25]

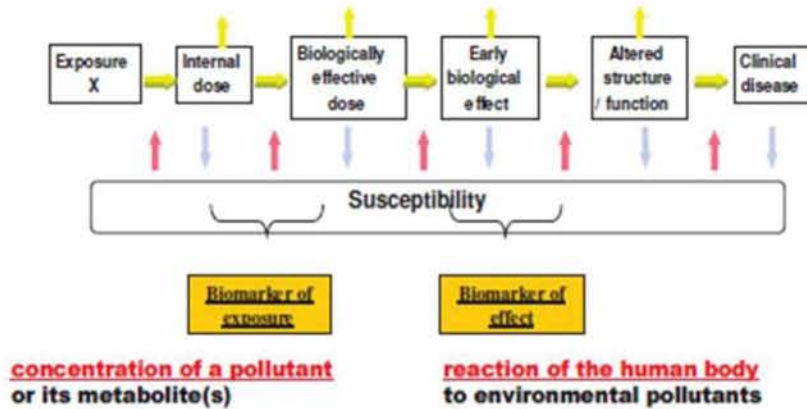
Η μέθοδος της βιοπαρακολούθησης υποστηρίζει ότι οι περιβαλλοντικοί ρύποι εισέρχονται στο ανθρώπινο σώμα και αφήνουν δείκτες που αντανακλούν την έκθεση σε αυτούς τους ρύπους. Ο δείκτης μπορεί να είναι ο ίδιος ο ρύπος ή ένα προϊόν διάσπασης, αλλά μπορεί επίσης να είναι κάποια αλλαγή στο σώμα που προκύπτει από την αλληλεπίδραση του ρύπου ή του προϊόντος διάσπασης με το άτομο, όπως αλλαγές στα επίπεδα ορισμένων ενζύμων ή άλλες πρωτεΐνες που μπορεί να οδηγήσουν σε τροποποιήσεις της κανονικής διεργασίας του σώματος.

Έτσι, ως βιολογικός δείκτης ή βιοδείκτης (biomarker) καλείται ένας δείκτης που μετράει τη κατάσταση σε ένα βιολογικό σύστημα ή δείγμα. Ο βιολογικός δείκτης μετράει την έκθεση ενός οργανισμού σε συγκεκριμένες ουσίες ή τις αλλαγές στη βιολογική δομή αυτού και τις βιολογικές διεργασίες που δύναται να προκύψουν από την έκθεση. Υπάρχουν δύο ειδών βιοδείκτες, οι οποίοι μας απασχολούν, οι βιοδείκτες έκθεσης και οι βιοδείκτες επίδρασης, που έχουν σχέση με την ευαισθησία ενός οργανισμού απέναντι σε ένα ρύπο. **(εικόνα 10)** Συνήθως, δίνεται πιο πολύ έμφαση στους βιοδείκτες έκθεσης που είναι συχνά η πραγματική χημική ουσία ή τα προϊόντα διάσπασής τους (μεταβολίτες) σε ανθρώπινους ιστούς ή υγρά.[47]

Οι βιοδείκτες έκθεσης χρησιμοποιούνται πιο συχνά για να καθορίσουν αν ένα άτομο έχει εκτεθεί σε χημικές ουσίες, εάν η έκθεση έχει αλλάξει με τη πάροδο του χρόνου ή εάν η έκθεση είναι διαφορετική μεταξύ των ομάδων των ανθρώπων (ανδρών – γυναικών, παιδιών – ενηλίκων). Επίσης, οι βιοδείκτες έκθεσης βοηθούν στον εντοπισμό των πρωτογενών πηγών έκθεσης (τροφή, αέρας, καταναλωτικά προϊόντα, κλπ).[26] Οι βιοδείκτες έκθεσης σε χημικές ουσίες αποτιμούνται με την μέτρηση της συγκέντρωσης τους σε κατάλληλα δείγματα, όπως αίμα, ορός αίματος ή ουρία. Η συγκέντρωση μιας πτητικής ουσίας μπορεί να μετρηθεί στον εκπνεόμενο αέρα. Αν η χημική ουσία μεταβολίζεται μέσα στον οργανισμό, ένας ή περισσότεροι μεταβολίτες μπορούν να προσδιοριστούν σε ένα δείγμα. Η μέτρηση ενός βιοδείκτη σε ένα βιολογικό υπόστρωμα αποδεικνύει μόνο ότι η χημική αυτή ουσία βρίσκεται στον οργανισμό. Αν είναι γνωστό ότι η παρουσία της ουσίας δεν είναι ενδογενής, τότε μπορεί να συμπεράνει κάποιος ότι μεταφέρθηκε στον οργανισμό από το εξωτερικό του περιβάλλον. [27]

Οι βιοδείκτες επίδρασης χρησιμοποιούνται για να εκτιμήσουν αλλαγές που έχουν συμβεί σε βιοχημικό ή φυσιολογικό επίπεδο του οργανισμού ενός ατόμου. Μια ασυνήθιστη τιμή ενός βιοδείκτη επίδρασης ίσως να μην δείχνει κάποια επιζήμια

επίδραση την υγεία του ατόμου ή του συνόλου του πληθυσμού, αν, για παράδειγμα, η διατάραξη είναι αναστρέψιμη και ληφθούν μέτρα που να βεβαιώνουν ότι η έκθεση που την προκάλεσε θα σταματήσει. Ωστόσο, η ασυνήθιστη αυτή τιμή μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για κάποια διορθωτική ενέργεια.



blood (whole or serum), lymphocytes (white blood cells), urine, saliva, adipose tissue, breast milk, toe nails, hair, and exhaled breath

Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων από την έκθεση ενός οργανισμού σε μια χημική ουσία μέχρι την εκδήλωση μιας κλινικής νόσου. Οι βιοδείκτες (έκθεσης και επίδρασης) ως μέτρο της εκτίμησης κινδύνου ενός οργανισμού απέναντι σε μια νόσο. Τα διάφορα βιολογικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στη βιοπαρακολούθηση για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού σε χημικές ουσίες.

Διάφορες μελέτες έχουν διεξαχθεί στις Η.Π.Α αλλά και σε όλο το κόσμο, που μας δίνουν όλο και ξεκάθαρη εικόνα των OCP's σε αναλογία με το σωματικό βάρος και τις επιπτώσεις που οι χημικές αυτές ουσίες έχουν στην υγεία του ανθρώπου. Ακόμη και σε πολύ μικρές δόσεις, πολλές χημικές ουσίες μπορεί να επιφέρουν αρνητικές επιπτώσεις σε ευαίσθητα συστήματα του σώματος που ελέγχουν την ανάπτυξη, την υγεία και την αναπαραγωγή του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα, το DDE, το εξαχλωροβενζόλιο (HCB) και το DDT συχνά ανιχνεύονται στον ανθρώπινο ορό που είναι συγκριτικά ένα εύκολο βιολογικό δείγμα και λαμβάνεται από όλα τα άτομα. Μια επιδημιολογική έρευνα έχει αποκαλύψει ότι οι χημικές αυτές ουσίες σχετίζονται με διάφορες διαταραχές της υγείας. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι ο γενικός πληθυσμός (συμπεριλαμβανομένων των νεογνών), ο οποίος στερείται επαγγελματικής έκθεσης σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα εκτέθησαν στις χημικές αυτές ουσίες.

Η έκθεση σε χημικές ουσίες ξεκινά από τη προγεννητική φάση (στη μήτρα), καθώς οι μητέρες συσσωρεύουν χημικές ουσίες, οι οποίες μέσω του πλακούντα διοχετεύονται στο έμβρυο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Όταν η μητέρα εκτίθεται σε ορισμένες επικίνδυνες χημικές ουσίες, η κανονική διαδικασία της ανάπτυξης του

εμβρύου μπορεί να διαταραχθεί. Οι επιστήμονες κατονοούν ότι αυτές οι εκθέσεις κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης μπορεί να οδηγήσουν σε γενετικές ανωμαλίες, μαθησιακές δυσκολίες ή υπογονιμότητα στη ζωή αργότερα. Όταν το παιδί γεννιέται μερικές από τις χημικές ουσίες που βρίσκονται στο σώμα της μητέρας μετακινούνται από τα αποθέματα λίπους του σώματός της στο μητρικό γάλα που παράγει για το παιδί και μέσω της διαδικασίας του θηλασμού περνάνε στο βρέφος. Στη συνέχεια το παιδί κατά την ανάπτυξή του εξακολουθεί να έρχεται σε επαφή με χημικές ουσίες. Έτσι, τα επίπεδα των OCP's στους ενήλικες αποτελούν μια μοναδική συσσώρευση για το κάθε άτομο, καθώς είναι ένας συνδυασμός της έκθεσης στη παιδική ηλικία, μιας τυχόν επαγγελματικής έκθεσης, των υπολειμμάτων στα τρόφιμα που καταναλώνει, τα προϊόντα που χρησιμοποιεί καθώς και η ποιότητα του νερού και του αέρα στο περιβάλλον στο οποίο ζει. Το σωματικό βάρος του κάθε ατόμου αντανάκλα την ισχύ και την ικανότητα του σώματος να απαλλάσσεται από τις τοξίνες.

Δυστυχώς, πολλές ασθένειες που έχουν αυξηθεί δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες συνδέονται με την έκθεση σε χημικές ουσίες. Συγκεκριμένα τα OCP's, λόγω του ότι είναι λιπόφιλες ενώσεις που βιοσυσσωρεύονται και βιομεγενθύνονται στο λιπώδη ιστό και εμμένουν, δύσκολα απαλλάσσουν τον ανθρώπινο οργανισμό από τις αρνητικές επιδράσεις τους. Οι επιπτώσεις στην υγεία από έκθεση σε χαμηλά επίπεδα συχνά χρειάζονται δεκαετίες για να εμφανιστούν, κι έτσι ασθένειες αρχίζουν να αναδύονται καθώς περνούν τα χρόνια. Επιστημονικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι πολλές ασθένειες και σύνδρομα που συνδέονται με τη γήρανση οφείλονται στα OCP's. Αυτές οι ασθένειες είναι: ο προστάτης, ο καρκίνος των νεφρών κι άλλοι καρκίνοι, οι διαταραχές του θυροειδούς αδένου, η απώλεια της ακοής, το Alzheimer και η νόσος του Parkinson.

Συνεπώς, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι για την αξιολόγηση του κινδύνου έκθεσης του ανθρώπου σε OCP's καθώς και των μεταβολιτών τους, η σταθερή βιοπαρακολούθηση είναι απαραίτητη και πολύ σημαντική. Λόγω της ανθεκτικότητάς τους στο περιβάλλον (χρόνο ημιζωής που κυμαίνεται από μήνες έως και δεκαετίες) και των πιθανών δυσμενών μακροπρόθεσμων επιπτώσεών στην ανθρώπινη υγεία, διεξάγονται έρευνες σχετικά με την έκθεση του ανθρώπου σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα βιοπαρακολούθησης αποτελεί το DDT που ανήκει στα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και είναι μιας μακράς διάρκειας χημική ουσία, η οποία εξετάζεται κυρίως στο αίμα και στο μητρικό γάλα. Η βιοπαρακολούθηση καθίσταται δυνατή με τη βοήθεια της αναλυτικής τεχνικής GC-MS, καθώς με αυτή είναι δυνατόν να ανιχνευθούν τα υπολείμματα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων και να ποσοτικοποιηθούν. [28]

Για το προσδιορισμό και τη ποσοτικοποίηση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων και των μεταβολιτών τους σε βιολογικά υποστρώματα απαιτείται η εφαρμογή μιας

αποτελεσματικής εκχύλισης, συγκεκριμένη προετοιμασία του δείγματος, ανάλυση με GC, και ανίχνευση κυρίως μέσω της σύλληψης ηλεκτρονίων ανιχνεύσεως (ECD), του MS αλλά και της φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS).

Χρονολογικά, η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS), σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, ήταν μεταξύ των πρώτων ενόργανων τεχνικών που εισήχθησαν για τη βιοπαρακολούθηση των φυτοφαρμάκων. Στη συνέχεια ακολούθησε η GC-MS/MS, η οποία επιτρέπει πολύ συγκεκριμένες αναλύσεις και με αυτόν τον τρόπο μπορεί να βελτιώσει τα όρια ανίχνευσης, αποφεύγοντας τις περισσότερες από τις παρεμβολές, ειδικά κατά την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων, όπως πχ. τα βιολογικά δείγματα. [29]

Στο **πίνακα 7** παρουσιάζονται κάποιες αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων και/ή των μεταβολιτών τους σε βιολογικά δείγματα.

Method	Analytes*	Sample Matrix	Sample Treatment	Analytical Method	Recovery %	Sample LOD
Bar, 2003 ⁷³	1-11 and others	Serum	SPE, elution with methanol/dichloromethane, silica clean-up, gel permeation chromatography	GC-EI-HRMS	†	0.57-3.3 pg/g
Bar, 2003 ⁷⁶	1-11 and others	Serum	lyophilization, accelerated solvent extraction, gel permeation chromatography clean-up	GC-EI-HRMS	†	†
Conka, 2005 ⁷⁸	1, 3, 9-12 and others	Serum	SPE, elution with dichloromethane/n-hexane, florisil-silica gel column clean-up	GC-μECD	88-120	1.5-5.0 pg/mL
Lacassie, 2001 ⁷⁷	1-3, 5, 9, 10, 13-15, and others	Serum	SPE, elution with ethyl acetate	GC-EI-MS	40-99	5 ng/mL
Sundberg, 2006 ⁷⁹	1, 9, 15-17, 19, and others	Serum	SPE, elution with methylene chloride	GC-ECD	74-107	†
Hong, 2002 ⁸³	1	Meconium	LLE, filtration, concentration	GC-EI-MS	†	†
Campoy, 2001 ⁸¹	1-5, 9, 10, 13-18	Milk	LLE, silica Sep-Pak clean-up	GC-ECD GC-EI-MS (confirmation)	†	†
Burke, 2003 ⁸²	1, 3, 5, 9-11, 13, 14	Milk	Solvent extraction, florisil SPE clean-up	GC-ECD	53-109	0.01 mg/kg

LOD, limit of detection; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; GC-HRMS, gas chromatography-high resolution mass spectrometry; GC-ECD, gas chromatography-electron capture detection; GC-μECD, gas chromatography-micro-electron capture detection; LLE, liquid-liquid extraction; SPE, solid-phase extraction; EI, electron impact ionization.

*1, dichlorodiphenyldichloroethylene (*p,p'*-DDE); 2, *o,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane (*o,p'*-DDT); 3, dichlorodiphenyltrichloroethane (*p,p'*-DDT); 4, mirex; 5, dieldrin; 6, heptachlor epoxide; 7, oxychlor; 8, trans-nonachlor; 9, hexachlorobenzene (HCB); 10, gamma-hexachlorocyclohexane (lindane, γ-HCH); 11, beta-hexachlorocyclohexane (β-HCH); 12, alpha-hexachlorocyclohexane (α-HCH); 13, α-endosulfan; 14, β-endosulfan; 15, aldrin; 16, chlordane; 17, dichlorodiphenyldichloroethane (*p,p'*-DDD); 18, methoxychlor; 19, endrin.

†Not specified.

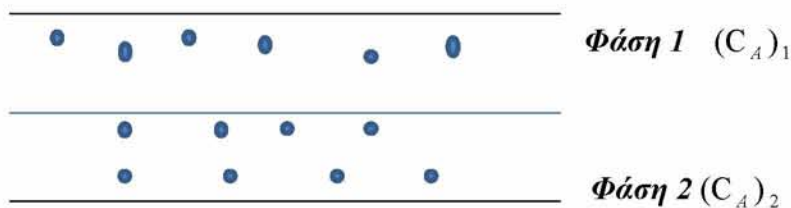
Πίνακας 7: Αναλυτικές μέθοδοι για την ανίχνευση οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων σε βιολογικά δείγματα με συγκεκριμένες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων.

Κεφάλαιο 2: Χρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών ως βασική μέθοδος βιοπαρακολούθησης της έκθεσης

2.1) Αρχές Χρωματογραφικού Διαχωρισμού

Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από το Ρώσο βοτανολόγο Tswett (1903). Στην προσπάθειά του να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων, εκχύλισε τα πράσινα μέρη των φύλλων σε πετρελαϊκό αιθέρα και διαβίβασε το εκχύλισμα μέσα από στήλη από κονιοποιημένο CaCO_3 . Έτσι, τα συστατικά (χλωροφύλλες) διαχωρίστηκαν σε διάκριτες έγχρωμες ζώνες. Εξαιτίας, αυτού του γεγονότος, η τεχνική ονομάστηκε διεθνώς «χρωματογραφία». Με το πέρασμα του χρόνου η τεχνική βελτιώθηκε και διαμορφώθηκαν και άλλες τεχνικές, έτσι ώστε σήμερα η χρωματογραφία να αποτελεί τη καλύτερη τεχνική διαχωρισμού και αναλύσεως πολύπλοκων μιγμάτων και απομονώσεως ουσιών.

Με τον όρο, λοιπόν, «χρωματογραφία» εννοούμε μία ομάδα μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων στα επιμέρους συστατικά τους. Είναι, δηλαδή, μια διαχωριστική τεχνική που η φυσικοχημική της βάση βασίζεται στην άνιση κατανομή των συστατικών του μίγματος μεταξύ των δύο μη αναμειγνυόμενων φάσεων (**εικόνα 11**). [35]



Εικόνα 11: Σύστημα δύο φάσεων στο οποίο προστέθηκε ουσία A

Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στις διαφορές, που υπάρχουν σε ορισμένες ιδιότητες των συστατικών ενός μείγματος, όπως είναι το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (για ιονικές ενώσεις), το μέγεθος των μορίων κ.α. Παρατηρείται, δηλαδή, διαφορετική φυσικοχημική συγγένεια κάθε συστατικού προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής στήλης. Έτσι, η κινητή φάση διερχόμενη μέσα από τη στατική, προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος, τα οποία συστατικά διαχωρίζονται μεταξύ τους και συνήθως εξέρχονται από τη στήλη, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Εάν στην έξοδο υπάρχει σύστημα ανιχνεύσεως και καταμετρήσεως της ποσότητας κάθε συστατικού, εκτός από το διαχωρισμό και παράλληλα με αυτό, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών. [31]

Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρή ή αέρια) ή της στατικής (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα), ως προς το μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός (προσρόφηση, ιοντοανταλλαγή, κατανομή, μέγεθος μορίων) και ως προς το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση (στήλη, λεπτή στοιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα, χαρτί).

Θεωρία της χρωματογραφίας – Θεωρία Πλακών

Η πρώτη θεωρία της χρωματογραφίας διατυπώθηκε το 1940 από τους Martin και Synge (βραβείο Nobel Χημείας 1952) και συνδύαζε τη διεύρυνση κορυφής με τη μετακίνηση των συστατικών στη στήλη. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή (θεωρία πλακών), η κίνηση μίας ουσίας A μέσα από τη χρωματογραφική στήλη μπορεί να θεωρηθεί ως μετακίνηση μέσω διαδοχικών θαλάμων (ζωνών) εξισορροπήσεως, που ονομάζονται θεωρητικές πλάκες. Μια θεωρητική πλάκα είναι ο απαιτούμενος όγκος της στήλης, ώστε μέσα σε αυτόν να αποκαθίσταται ισορροπία μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσεως. Η ισορροπία αυτή περιγράφεται με το λόγο ή συντελεστή κατανομής. [31]

Η κατανομή των μορίων ενός δείγματος μεταξύ δύο φάσεων ελέγχεται από μια σταθερά ισορροπίας, που ονομάζεται συντελεστής κατανομής (distribution coefficient) και συμβολίζεται με K. Πρόκειται για μια δυναμική ισορροπία όπου τα μόρια της ουσίας κινούνται γρήγορα από τη μια φάση στην άλλη και αντίστροφα. Ο συντελεστής κατανομής δίνεται από τη σχέση: $K = C_S / C_M$, όπου C_S και C_M είναι οι συγκεντρώσεις της ουσίας στην στατική (static) και την κινητή (mobile) φάση αντίστοιχα.

Ωστόσο, η ισορροπία στο σύστημα είναι δυναμική. Αυτό σημαίνει ότι οι συγκεντρώσεις C_M (C_1) και C_S (C_2) παραμένουν σταθερές μολονότι τα μόρια της ουσίας μετακινούνται γρήγορα από τη μια φάση στην άλλη και αντίστροφα. Υπάρχει επομένως μια δυνατότητα ανταλλαγής ύλης μεταξύ των δύο φάσεων.

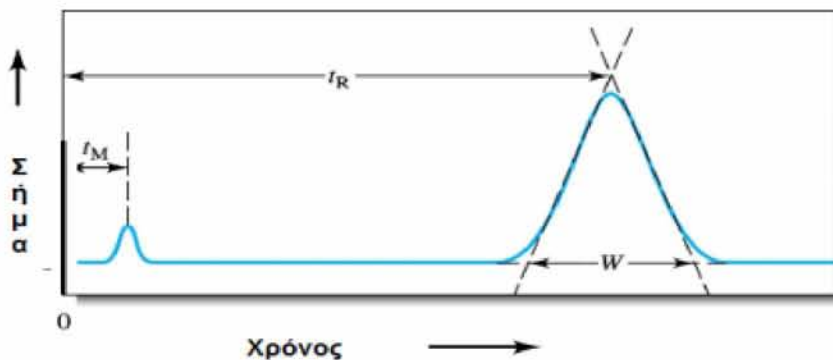
$$\frac{\text{Αριθμός των μορίων στη φάση 1}}{\text{Ολικός αριθμός των μορίων}} = \frac{C_1 V_1}{C_1 V_1 + C_2 V_2}$$

Γενικά, η χρωματογραφική διαδικασία αρχίζει από τη στιγμή που, με τον έναν ή τον άλλον τρόπο, τίθεται σε κίνηση μια εκ των δύο φάσεων, πχ. η φάση 1 - κινητή φάση. Η κινητή και η ακίνητη φάση περιέχεται στη χρωματογραφική στήλη όπου συντελείται ο

χρωματογραφικός διαχωρισμός. Συνήθως, η ακίνητη φάση παραμένει ακίνητη στη χρωματογραφική στήλη και κατά διαστήματα δεσμεύει τις προς διαχωρισμό ουσίες παρεμποδίζοντας τη διέλευσή τους από τη στήλη. Η κινητή φάση είναι η φάση που κινείται στη χρωματογραφική στήλη, διαλύει τις προς διαχωρισμό ουσίες και εξασφαλίζει τη διέλευσή τους από τη στήλη.

Σε κάθε χρωματογραφικό πείραμα, εισάγεται στην είσοδο της στήλης ένα δείγμα που περιέχει διάφορα συστατικά. Όλα τα συστατικά του δείγματος ξεκινούν την ίδια χρονική στιγμή από την ίδια θέση της στήλης, αλλά καθένα από αυτά κινείται με διαφορετική ταχύτητα λόγω του διαφορετικού συντελεστή κατανομής μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Στην έξοδο της στήλης τα διάφορα συστατικά του δείγματος εμφανίζονται σε διαφορετικούς χρόνους και μπορούν να ανιχνευθούν από έναν ανιχνευτή. Η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή σε σχέση με το χρόνο έκλουσης καλείται χρωματογράφημα (εικόνα 12).

Στο χρωματογράφημα οι εκλουόμενες ουσίες εμφανίζονται ως χρωματογραφικές κορυφές – κωδωνοειδείς καμπύλες Gauss. Σε ιδανικό διαχωρισμό δεν έχουμε διαπλάτυνση των κορυφών κατά μήκος του διαχωρισμού, ενώ σε πραγματικό διαχωρισμό έχουμε διαπλάτυνση. Ωστόσο, στόχος είναι η ελάχιστη διαπλάτυνση.



Εικόνα 12: Χρωματογράφημα μιας ουσίας. Αριστερά φαίνεται η κορυφή μιας ουσίας που δεν κατακρατείται από τη στήλη (π.χ. αέρας) ως προς την οποία διορθώνεται ο χρόνος κατακράτησης της κυρίας ουσίας: $t_R = t_R - t_M$. Η θέση της κορυφής (t_R ή $t_R - t_M$) αποτελεί το ποιοτικό χαρακτηριστικό της προσδιοριζόμενης ένωσης, ενώ το ύψος (ή το εμβαδόν) της κορυφής αποτελεί το ποσοτικό χαρακτηριστικό.[46]

Υπάρχουν τρεις κύριες αιτίες διαπλάτυνσης των κορυφών:

- A) Διασπορά στις διαδρομές που ακολουθεί τα μόρια της ουσίας διαμέσου του υλικού πλήρωσης της στήλης.
- B) Αξονική διάχυση της ουσίας κατά το μήκος της στήλης.
- Γ) Διαταραχές στην αποκατάσταση της ισορροπημένης κατανομής της ουσίας μεταξύ κινητής και ακίνητης φάσης.

Σύμφωνα με τη «Θεωρία Πλακών», μια χρωματογραφική στήλη αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό παρόμοιων τμημάτων ή θεωρητικών πλακών, σε καθένα από τα οποία αποκαθίσταται ισορροπία στη κατανομή μιας ουσίας μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης. Η κίνηση δηλαδή της ουσίας στη στήλη μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σύνολο διαδοχικών κινήσεων δια μέσου ζωνών ισορροπίας συνδεδεμένων σε σειρά. Όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής κατανομής μιας ουσίας τόσο περισσότερο κατανέμεται στη στατική φάση και επομένως τόσο βραδύτερα κινείται αυτή μέσα στη στήλη και τόσο πιο αργά εξέρχεται από αυτή. Έτσι, όταν εισάγουμε ένα μίγμα συστατικών στη στήλη και όταν αυτά τα συστατικά έχουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, έχουμε ένα διαχωρισμό αυτών γιατί κινούνται μέσα στη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες και συνεπώς εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους.

Η αποτελεσματικότητα της στήλης χαρακτηρίζεται από τη «λεπτότητα» μιας θεωρητικής πλάκας ή το ύψος ισοδύναμο με μία θεωρητική πλάκα (ΥΙΘΠ), δηλαδή το μήκος της στήλης που αντιστοιχεί σε μια θεωρητική πλάκα και ισούται με:

$$\text{ΥΙΘΠ} = H = L/n$$

όπου n είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών της στήλης και L το μήκος της στήλης και όσο πιο μικρή είναι η τιμή του H τόσο πιο καλός είναι ο διαχωρισμός.

Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός n τόσο στενότερες είναι οι κορυφές και τόσο αποτελεσματικότερη είναι η στήλη για το διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών με παραπλήσιους όγκους συγκράτησης. Σε μια δεδομένη στήλη, το εύρος της κορυφής είναι ανάλογο του χρόνου (όγκου) συγκράτησης, και γι' αυτό οι κορυφές διευρύνονται από την αρχή μέχρι το τέλος του χρωματογραφήματος.[30]

Γενικά, ο αριθμός των θεωρητικών πλακών (n) είναι ένδειξη απόδοσης του χρωματογραφικού διαχωρισμού:

$$n = \frac{L}{H} = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2, \text{ όπου:}$$

L - το μήκος της αναλυτικής στήλης,

H - το ύψος της θεωρητικής πλάκας,

t_r - χρόνος συγκράτησης,

W - εύρος της κορυφής.

Όσο μεγαλύτερος είναι αυτός ο αριθμός (n), τόσο πιο μεγάλη είναι η απόδοση (μεγάλο σήμα απόκρισης – μικρότερα όρια ανίχνευσης). Ωστόσο, ο αριθμός των θεωρητικών πλακών μιας στήλης, δεν είναι μόνο συνάρτηση του τρόπου πλήρωσης, αλλά επίσης και της φύσης της ουσίας, της ταχύτητας ροής, της θερμοκρασίας, της μεθόδου εισαγωγής του δείγματος και άλλων παραγόντων.

Συμπερασματικά, για την αποδοτικότητα διαχωρισμού – θεωρία πλακών:

- Η αύξηση του μήκους της στήλης, δηλαδή του αριθμού n , οδηγεί σε αύξηση του χρόνου και του όγκου ανάσχεσης.
- Για ένα καθορισμένο μήκος στήλης, ο διαχωρισμός είναι τόσο αποτελεσματικός όσο μικρότερο είναι το ΥΙΘΠ (H).
- Από δύο στήλες, εκείνη που έχει μεγαλύτερο αριθμό θεωρητικών πλακών, n , θα δίνει οξύτερες κορυφές και συνεπώς καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ ουσιών που έχουν παραπλήσιους όγκους (χρόνους) ανάσχεσης.
- Επειδή, για δεδομένη στήλη, το εύρος W μιας κορυφής είναι ανάλογο με τον όγκο ανάσχεσης, V_R , οι κορυφές συνεχώς θα διευρύνονται από την αρχή ως το τέλος του χρωματογραφήματος. Η παρατεταμένη έκλυση εκφυλίζει τη κανονική κατανομή της κορυφής.
- Το πλάτος της κορυφής είναι ανεξάρτητο από το μέγεθος του δείγματος, αρκεί η στήλη να μην φτάσει σε κατάσταση κορεσμού.

Εξίσωση Van Deemter

Το ισοδύναμο ύψος προς θεωρητική πλάκα H και η ταχύτητα ροής του φέροντος συστατικού (κινητή φάση) σχετίζονται σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση που είναι γνωστή σαν εξίσωση Van Deemter.

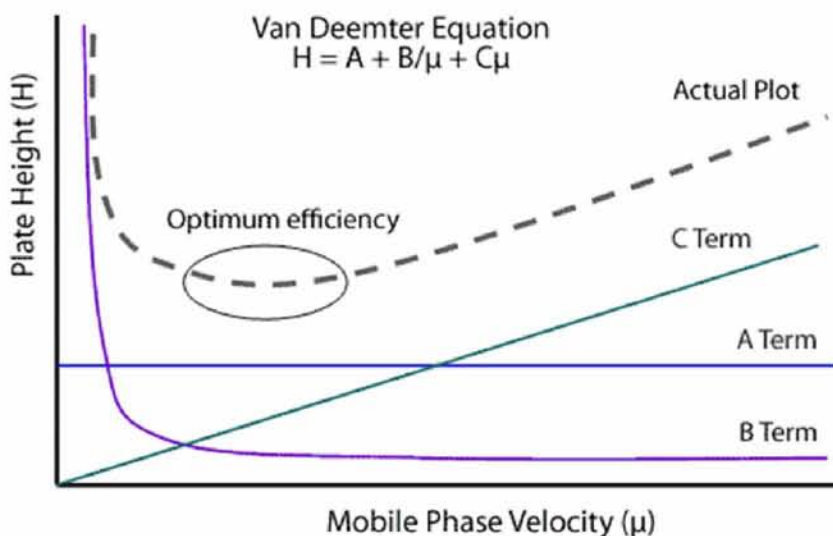
$$H=A+B/u+C*u, \text{ όπου}$$

Ο όρος A είναι συνάρτηση του μεγέθους και της ομοιομορφίας των σωματιδίων πλήρωσης της στήλης.

Ο όρος B σχετίζεται με τη διάχυση κατά μήκος της στήλης.

Ο όρος C σχετίζεται πρώτον με την αντίσταση μεταφοράς μάζας εντός της στήλης που εμποδίζει την ακαριαία αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων και δεύτερον με την εγκάρσια διάχυση μέσα στην κινητή φάση. [30]

Η γραφική παράσταση της εξίσωσης Van Deemter φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 13) σε συνάρτηση της ταχύτητας σ' ένα χρωματογράφημα αερίου-υγρού.



Εικόνα 13: Γραφική παράσταση της εξίσωσης Van Deemter στην οποία απεικονίζεται η σχετική συνεισφορά του κάθε όρου σε συνάρτηση της ταχύτητας της κινητής φάσης.

Τέλος, να επισημάνουμε, ότι το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό σε μια χρωματογραφική στήλη είναι η ικανότητά της να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος με παρόμοια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Η διαχωριστική ικανότητα (R) αποτελεί μέτρο του διαχωρισμού δύο κορυφών A και B και δίνεται από τη σχέση:

$$R = \Delta t_R / 4\sigma, \text{ όπου } \sigma \text{ είναι η τυπική απόκλιση των κορυφών.}$$

Αν $R > 1.5$, έχουμε τη διαχωριστικότητα γραμμής βάσης (baseline resolution), που αντιστοιχεί στο τέλει διαχωρισμό δύο κορυφών ίδιου μεγέθους. Αν $R = 1.0$ οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται σε ποσοστό 2% και ο διαχωρισμός θεωρείται επαρκής για αναλυτικούς σκοπούς. Ωστόσο, για να βελτιώσουμε τη διαχωριστική ικανότητα μπορούμε [30]:

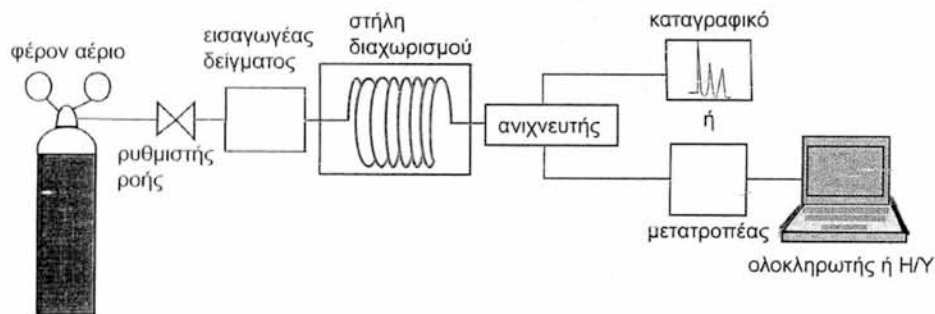
- να μεταβάλλουμε τη θερμοκρασία ή τη φύση των φάσεων ώστε να έχουμε μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ των δύο κορυφών.
- να ελαττώσουμε το πλάτος των κορυφών βελτιώνοντας την απόδοση της στήλης (αύξηση του n , ελάττωση του H , π.χ με ρύθμιση της ταχύτητας ροής του φέροντος συστατικού, με ελάττωση του μεγέθους του δείγματος, της διαμέτρου της στήλης κλπ.),
- καθώς και να συνδυάσουμε τις δύο παραπάνω περιπτώσεις για να γίνει ο διαχωρισμός περισσότερο ικανοποιητικός.

2.2) Αέρια Χρωματογραφία/Αέριος Χρωματογράφος Trace GC Ultra

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανάλυση όλων σχεδόν των οργανικών ρύπων. Σε αυτή τη τεχνική χρησιμοποιείται ως κινητή φάση ένα αέριο, το οποίο καλείται φέρον αέριο.

Η εκλογή του φέροντος αερίου (κινητή φάση) γίνεται ανάλογα με τις απαιτήσεις του ανιχνευτή, γιατί ο ανιχνευτής πρέπει να έχει την ικανότητα να ανιχνεύει τα συστατικά που μεταφέρονται με το φέρον αέριο σε πολύ μεγάλη αραιώση. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι χημικώς αδρανές σε κανονικές πιέσεις και θερμοκρασίες, έτσι ώστε να μην αλληλεπιδρά με τη στήλη. Γνωστά ως φέροντα αέρια είναι το ήλιο, το άζωτο, το υδρογόνο και το αργό. Επίσης, η καθαρότητα του αερίου είναι πολύ σημαντική γιατί αν υπάρχουν προσμίξεις προκαλείται θόρυβος στον ανιχνευτή με αποτέλεσμα να μην γίνει καλή ανίχνευση των ουσιών. Συγκεκριμένα, στην εργασία χρησιμοποιήθηκε το ήλιο, παρά το υψηλό του κόστος, γιατί έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα και μικρή πυκνότητα επιτρέποντας τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής αερίου, με αντίστοιχη μείωση του χρόνου αναλύσεως. [30]

Η διάταξη της αέριας χρωματογραφίας με όλα τα μέρη από τα οποία αποτελείται φαίνεται στην **(εικόνα 14)**.



Εικόνα 14: Γενική διάταξη συστημάτων αέριας χρωματογραφίας

Τα κύρια μέρη ενός αέριου χρωματογράφου περιλαμβάνουν [32]:

- **Πηγή φέροντος αερίου:** μια χαλύβδινη φιάλη με συμπιεσμένο (100bar) αέριο. Η ροή οφείλεται στη διαφορά πίεσης μεταξύ της φιάλης και του υπόλοιπου συστήματος και η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται από τους ρυθμιστές πίεσεως.
- **Σύστημα εισαγωγής δείγματος:** Το δείγμα, αφού πρώτα έχει προεπεξεργαστεί (SPME), εισάγεται σ' ένα θερμαινόμενο θάλαμο (εισαγωγέας δείγματος) με μια τροποποιημένης μορφής σύριγγα που τρυπάει ένα ελαστικό διάφραγμα. Εκεί γίνεται η εξαέρωση του δείγματος.
- **Χρωματογραφική στήλη:** Το φέρον αέριο μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος μέσα στη στήλη όπου και εκεί γίνεται ο διαχωρισμός στα επιμέρους συστατικά.
- **Ανιχνευτής:** Η έξοδος της τριχοειδούς στήλης συνδέεται απευθείας με τον ανιχνευτή (σύστημα MS), ο οποίος αφού πρώτα ιονίζει στο θάλαμο ιονισμού τα συστατικά, στη συνέχεια αναγνωρίζει τη ροή των μορίων των συστατικών και τη μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
- **Καταγραφικό σύστημα:** Το ένα μετά το άλλο συστατικό στη συνέχεια διέρχεται σε διαφορετικούς χρόνους από τον ανιχνευτή, ο οποίος στέλνει το σήμα στον καταγραφέα για κάθε ένωση που ανιχνεύει μαζί με τα χαρακτηριστικά ιόντα της (φάσμα ιόντων). Η καταγραφή και η αποτίμηση του ηλεκτρικού σήματος γίνεται από H/Y και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των συστατικών που διέρχονται μέσα από τον ανιχνευτή.

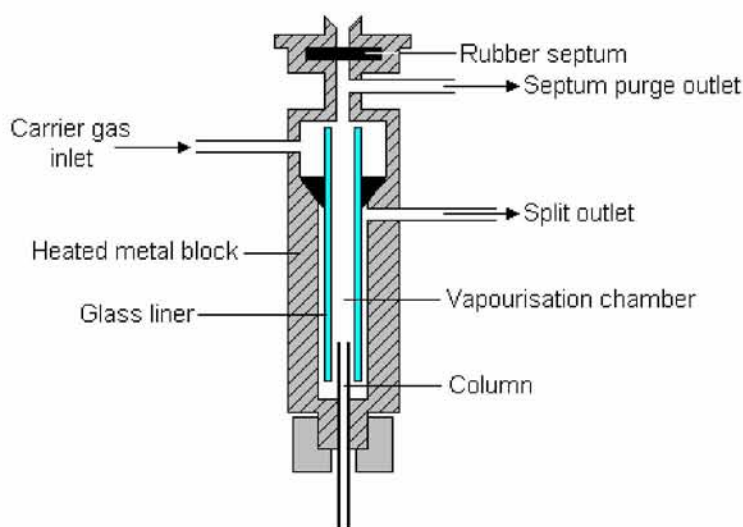
Η στήλη, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος (θύρα έγχυσης) και ο ανιχνευτής μαζών βρίσκονται μέσα σε ένα θερμοστατούμενο φούρνο, αλλά μπορούν να θερμανθούν και ξεχωριστά.

Για την εισαγωγή δειγμάτων υψηλών συγκεντρώσεων, χρησιμοποιείται μια τεχνική για την ελάττωση του εισερχόμενου όγκου δείγματος στη στήλη (split injection). Ωστόσο, υπάρχουν διάφορες κατηγορίες συστημάτων εισαγωγής δείγματος, στα οποία λαμβάνονται υπόψη το είδος του δείγματος, οι ενώσεις προς ανάλυση και ο τύπος της στήλης [30]:

- Σύστημα εισαγωγής για γεμισμένες στήλες (packed column injector)
- Σύστημα εισαγωγής με δυνατότητα ελάττωσης του όγκου δείγματος (split/splitless injector) **(εικόνα 15)**
- Θερμοστατούμενο σύστημα εισαγωγής (temperature – programmed vaporization injector, PTV) **(εικόνα 16)**
- Σύστημα απευθείας εισαγωγής στη στήλη (cold on column injection)
- Βαλβίδα εισαγωγής (για αέρια δείγματα)

- Εισαγωγέας πυρόλυσης (pyrolyser)
- Εισαγωγέας θερμικής εκρόφησης
- Σύστημα εισαγωγής purge and trap (για πτητικά συστατικά)

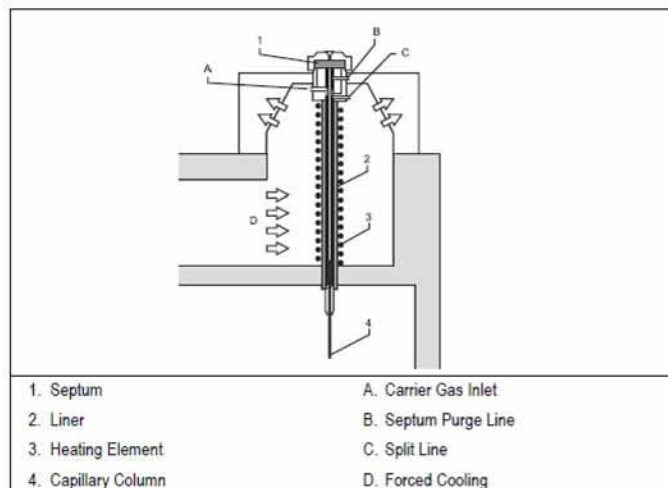
The split / splitless injector



Εικόνα 15: Σύστημα εισαγωγής με δυνατότητα ελάττωσης του όγκου δείγματος (split/splitless injector)

Στο σύστημα εισαγωγής δείγματος (split/splitless injector):

- Το δείγμα εισάγεται ως διάλυμα, εξατμίζεται και μεταφέρεται με το φέρον αέριο στη στήλη
- Η επιλογή θερμοκρασίας και ταχύτητας παροχής του φέροντος αερίου είναι βασικοί παράμετροι προς ρύθμιση για τη πληρότητα εξάτμισης και αποσύνθεσης του δείγματος
- Οι λειτουργίες:
Split (κλασματική) – διαλύματα μεγάλων συγκεντρώσεων
Splitless (ολική) – διαλύματα μικρών συγκεντρώσεων

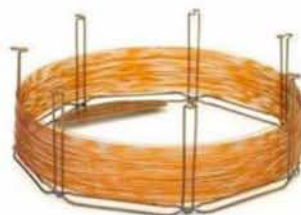


εικόνα 16: PTV

Επίσης, υπάρχουν αυτόματα προγραμματιζόμενα συστήματα, όπως για παράδειγμα οι αυτόματοι δειγματολήπτες (autosamplers), με τα οποία γίνεται αυτόματα η ένεση του δείγματος στο σύστημα εισαγωγής. Το πλεονέκτημά τους έναντι των άλλων συστημάτων είναι η άριστη επαναληψιμότητάς τους.

Η συσκευή GC που χρησιμοποιούμε είναι εξοπλισμένη με τριχοειδή στήλη (capillary column) (**εικόνα 17**). Ωστόσο, ανάλογα με το τρόπο που τοποθετείται η στατική φάση στη στήλη διακρίνονται σε [43]:

- αυτές τις οποίες η υγρή στατική προσδένεται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης. Ανοιχτής διατομής επικαλυμένες (Wall-Coated open tubular, WCOT).
- αυτές στις οποίες η υγρή στατική φάση προσδένεται σε στερεό υπόστρωμα το οποίο καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα της στήλης. Ανοιχτής διατομής με πορώδες υπόστρωμα (Support-coated open tubular, SCOT).
- αυτές τις οποίες τα σωματίδια της στερεάς στατικής φάσης προσδένονται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης. Ανοιχτής διατομής με πορώδες στρώμα (Porus layer open tubular, PLOT).



Εικόνα 17: Τριχοειδή στήλη

Ωστόσο, στην αγορά υπάρχουν και οι γεμισμένες (packed columns) (**εικόνα 18**) με μήκος από 1 έως 20m και διάμετρο από 3 έως 10mm. Αυτές περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα (πχ. κονιοποιημένο πυρίμαχο υλικό ή οργανικό πορώδες πολυμερές) το οποίο είναι διαποτισμένο με κατάλληλο υγρό. Το στερεό υπόστρωμα πρέπει να είναι χημικά αδρανές. Σε σύγκριση με τις τριχοειδείς στήλες, οι γεμισμένες κατασκευάζονται ευκολότερα, είναι φθηνότερες, έχουν μεγάλη χωρητικότητα, μεγάλο χρόνο ζωής και είναι κατάλληλες για τους πιο δύσκολους διαχωρισμούς. [30]



Εικόνα 18: packed GC columns

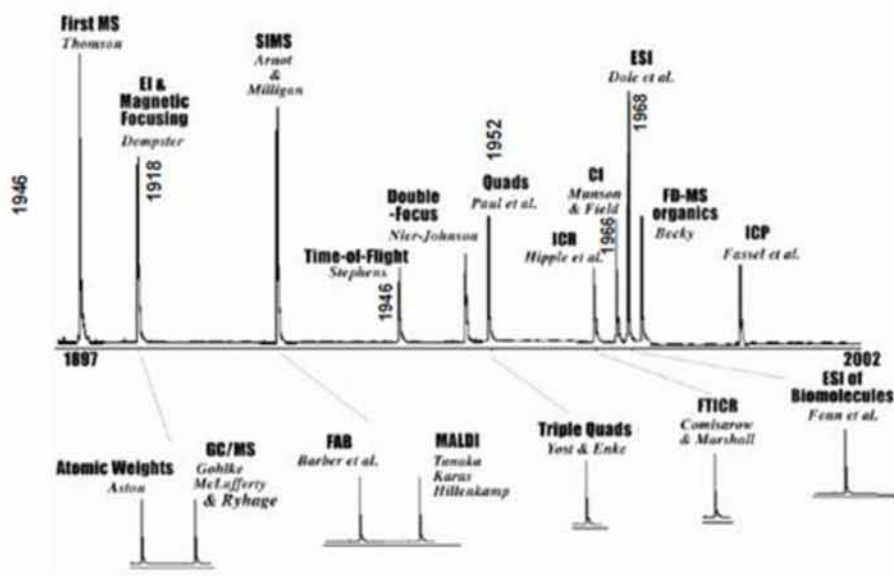
Η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας παρέχει υψηλή διαχωριστική ικανότητα, χαμηλά όρια ανίχνευσης, απόκριση για όλες τις ουσίες, εκλεκτικότητα καθώς και δυνατότητα προσδιορισμού της δομής ενώσεων με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση μιας ένωσης χωρίς να χρειάζεται κάποια άλλη επιβεβαιωτική τεχνική.

2.3) Φασματομετρία μαζών/Φασματογράφος Polaris Quadrupole Ion Trap MS

Φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) καλείται η τεχνική, όπου τα συστατικά ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Πρώτος ο Wien (1898) παρατήρησε ότι τα θετικά ιόντα αποκλίνουν της φοράς τους κατά τη κίνησή τους σε ηλεκτρικά ή μαγνητικά πεδία. Έπειτα η πρώτη ανακάλυψη του φασματογράφου μαζών ήρθε από το Thomson (1897), ο οποίος χρησιμοποίησε στα πειράματά του ένα καθοδικό σωλήνα ακτίνων και μέτρησε τη μάζα προς το φορτίο των ηλεκτρονίων. Από τότε η τεχνική εξελίχθηκε (**εικόνα 19**), έτσι ώστε να είναι σήμερα η φασματομετρία μαζών μια από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης προσφέροντας πληροφορίες για [34]:

- Τη στοιχειακή σύσταση του δείγματος
- Τη δομή ανόργανων, οργανικών, οργανομεταλλικών και βιολογικών μορίων
- Τη ποιοτική και ποσοτική σύσταση μιγμάτων

- Τη δομή και σύσταση επιφανειών
- Την αναλογία ισοτόπων στοιχείων

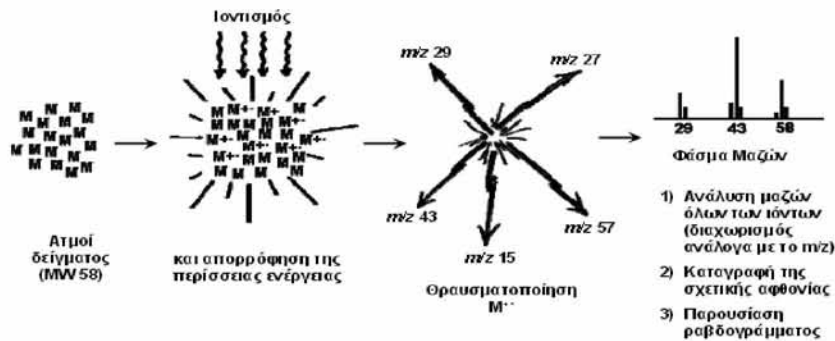
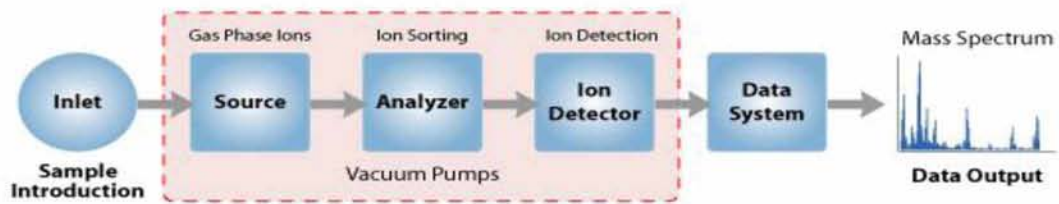


Εικόνα 19: Η ιστορική εξέλιξη της MS

Σήμερα, η φασματομετρία μαζών αποτελεί μία μέθοδο ανίχνευσης και ταυτοποίησης των χημικών ενώσεων, ή αλλιώς μια τεχνική προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της αλληλεπίδρασης του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου με τα κινούμενα φορτισμένα σωματίδια – ιόντα. Η τροχιά που ακολουθούν αυτά τα φορτισμένα σωματίδια μέσα στον ηλεκτρομαγνητικό πεδίο εξαρτάται από το λόγο m/z , όπου m είναι η μάζα ενός σωματιδίου και z είναι το φορτίο του. Το αποτέλεσμα αυτής της εξάρτησης είναι η παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων βάση του λόγου m/z (που αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος) και η καταγραφή του φάσματος μαζών της κάθε ουσίας.

Αναλυτικότερα, όταν ηλεκτρόνια, σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, προσκρούσουν σε μόρια μιας ενώσεως, που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια της ενώσεως μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό, συνήθως, φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . [31]

Το φάσμα μαζών είναι μία γραφική παράσταση που παρουσιάζει όλα τα ιόντα που προκύπτουν από τον ιονισμό μιας χημικής ένωσης με ένδειξη σχετικής (%) απόλυτης αφθονίας τους (εικόνα 20).



Εικόνα 20. Διαδικασία καταγραφής φάσματος μαζών: Εισέρχονται οι ατμοί στο εισαγωγέα δείγματος, η ένωση ιονίζεται καθώς προσκρούουν πάνω της ηλεκτρόνια, θραυσματοποιείται σε ιόντα και ο αναλυτής μετράει το ηλεκτρικό ρεύμα που παράγουν τα διαφορετικά ιόντα σε m/z . Καταγραφή της σχετικής αφθονίας των ιόντων σε ραβδογράμματα.

Γενικά, η τεχνική MS εφαρμόζεται:

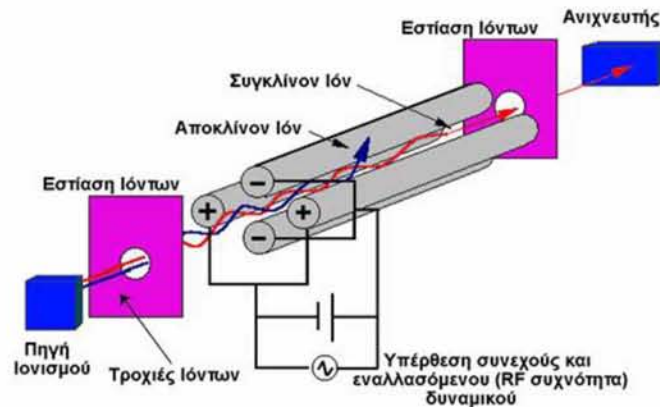
- στο προσδιορισμό του μοριακού τύπου
- στη ταυτοποίηση δομής και
- σε συνδυασμένες τεχνικές, πχ. GC-MS (εικόνα 21), ως ολικός ανιχνευτής με μεγάλη εκλεκτικότητα και πολύ υψηλή ευαισθησία.



Εικόνα 21: GC-MS: Σύστημα αέριου χρωματογράφου Trace GC με φασματογράφο μαζών Polaris Q και αυτόματη δειγματοληψία πολλών δειγμάτων.

Τα κύρια πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών είναι η αυξημένη ευαισθησία της (χαμηλά όρια ανίχνευσης) σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, και η υψηλή εξειδίκευσή της κατά την ταυτοποίηση ουσιών ή την επιβεβαίωση της παρουσίας ύποπτων ουσιών. Ως μειονεκτήματά της μπορεί να θεωρηθούν το συγκριτικά μεγάλο κόστος των απαιτούμενων οργάνων, το μεγάλο κόστος λειτουργίας και συντηρήσεώς τους και ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσεως του χρήστη για το χειρισμό των σχετικών συσκευών και την ορθή ερμηνεία των φασμάτων μαζών. [31]

Στη περίπτωση του τετραπολικού φασματομέτρου μαζών (QMS, Quadrupole Mass Spectrometer), τα ιόντα κινούνται μεταξύ τεσσάρων κυλινδρικών ηλεκτροδίων που τροφοδοτούνται διαγωνίως με εναλλασσόμενη τάση (υψηλής συχνότητας) και συνεχή τάση. Στην **εικόνα 22** παρουσιάζεται η διάταξη ενός τετραπολικού φασματομέτρου μαζών, όπου για το διαχωρισμό των ιόντων χρησιμοποιούνται τέσσερις παράλληλες ράβδοι τοποθετημένες έτσι ώστε οι άξονές τους να βρίσκονται στις κορυφές ενός τετραγώνου. Οι ράβδοι τροφοδοτούνται με συνεχή και εναλλασσόμενη τάση με αποτέλεσμα τη διαμόρφωση ενός παλλόμενου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. [32]



Εικόνα 22: Διάταξη ενός τετραπολικού φασματομέτρου μαζών

Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από τα ακόλουθα κοινά και διακριτά τμήματα [31]:

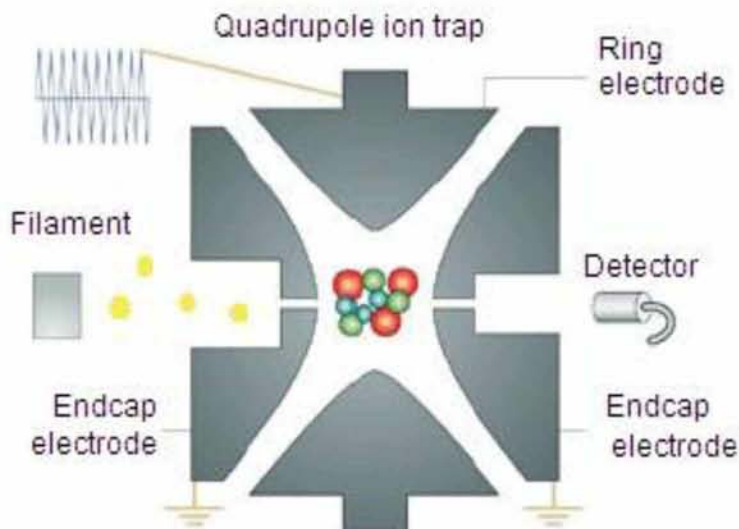
- **Σύστημα εισαγωγής δείγματος:** σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για εισαγωγή του στο χώρο ιονισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση,
- **Θάλαμος ιονισμού:** γίνεται ο ιονισμός των μορίων μιας ουσίας καθώς αυτά συγκρούονται με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact Ionization, EI). Τα ηλεκτρόνια παράγονται με θέρμανση ενός νήματος βολφραμίου, το οποίο βρίσκεται σε αρνητικό δυναμικό, και αφού απωθηθούν από αυτό στη συνέχεια

έλκονται από μια άνοδο με ρυθμιζόμενο θετικό δυναμικό. Η ενέργεια των ηλεκτρονίων είναι αρκετή ώστε να αποσπαστεί κατά τη σύγκρουση ένα καινούργιο ηλεκτρόνιο από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα ενός μορίου ($M+e^- \rightarrow M^++2e^-$). Έτσι, δημιουργούνται τα μοριακά ιόντα M^+ που είναι κατιονικές ρίζες με μοριακό βάρος ίσο με το μοριακό βάρος της αρχικής ένωσης. Το μοριακό ιόν έχει αυξημένη εσωτερική ενέργεια η οποία πολλές φορές διασπά το ιόν σε επιμέρους ιοντικά θραύσματα.

- **Τετράπολος αναλυτής:** τα παραγόμενα ιόντα (μοριακά ιόντα και τα ιοντικά θραύσματα) προωθούνται εδώ, όπου διαχωρίζονται στο χώρο βάση του λόγου m/z . Εξαιτίας της επίδρασης του παλλόμενου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου προκαλείται ταλάντωση των ιόντων με αυξανόμενο πλάτος με αποτέλεσμα τα περισσότερα ιόντα να προσκρούουν σε ένα από τα ηλεκτρόδια και μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένο m/z να φτάνουν στον ανιχνευτή.
- **Ανιχνευτής ιόντων:** αποτελείται από πολλαπλασιαστές ηλεκτροδίων για την ανίχνευση των ιόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους αποτελούνται από διόδους υψηλού δυναμικού.

Συγκεκριμένα, ο φασματογράφος Q Polaris διαθέτει παγίδα ιόντων (Ion Trap MS) (εικόνα 23). Αυτή λειτουργεί με τη δημιουργία τρισδιάστατου πεδίου στο οποίο παγιδεύονται τα αναλυόμενα ιόντα και εστιάζονται σε ένα επίπεδο. Τα ιόντα ουσιαστικά περιορίζονται από ένα ηλεκτρομαγνητικό πεδίο τεσσάρων πόλων, δύο ημικυλινδρικά ηλεκτρόδια (ring electrode) και δύο ελάσματα (end cap). Τα εισερχόμενα ιόντα κυκλοφορούν στο τρισδιάστατο χώρο που ορίζεται από τα τέσσερα ηλεκτρόδια και εστιάζονται στο επίπεδο που ορίζεται από τον ανιχνευτή και το πλέγμα ιονισμού (filament). Στη συνέχεια εφαρμόζεται δυναμικό ραδιοσυχνότητας που αυξάνει γραμμικά προσφέροντας αυξανόμενη κινητική ενέργεια στα ιόντα. Έτσι, τα μικρότερα ιόντα αρχίζουν να ξεφεύγουν από τη παγίδα και να οδηγούνται στον ανιχνευτή και τα μεγαλύτερα ιόντα ακολουθούν ανάλογα με τη μάζα τους. Οι παγίδες ιόντων είναι μικρά συμπαγή όργανα που μπορούν να εφαρμοσθούν άμεσα και να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα για αναλύσεις μαζών έως 1000 dalton. Είναι οικονομικά και αξιόπιστα όργανα που λειτουργούν πολύ ικανοποιητικά ως ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία και προσφέρουν πολύ μεγάλες δυνατότητες MS-MS. [34]

Τα πλεονεκτήματα της τετράπολης παγίδας ιόντων είναι ότι είναι ένας φθηνός αναλυτής με μικρό μέγεθος, μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($>(1000m/z)s^{-1}$), χαμηλή απαίτηση κενού (10^{-3} Torr), δυνατότητα MS/MS, υψηλή ευαισθησία (χαμηλά όρια ανίχνευσης), δυνατότητα ανίχνευσης μεταβολιτών. Ενώ στα μειονεκτήματά της είναι το περιορισμένο εύρος m/z , η περίπλοκη λειτουργία, και η ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση. [37]



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση Quadrupole IonTrap

Καταγραφή και παρουσίαση του φάσματος μαζών

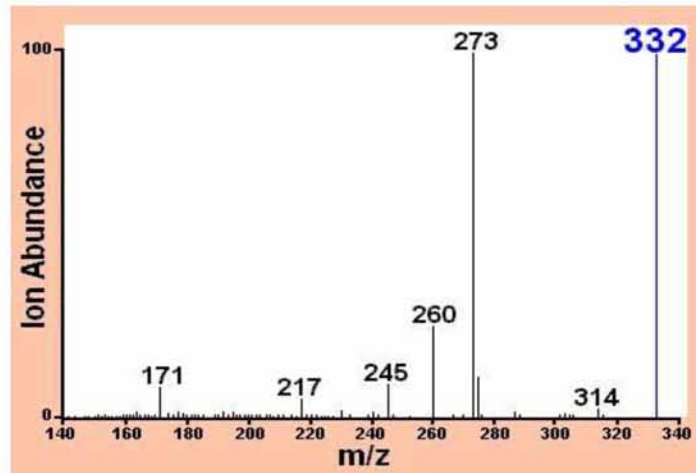
Η καταγραφή και η παρουσίαση του φάσματος μαζών είναι το τελικό στάδιο της τεχνικής MS. Τα τελευταία χρόνια η εισαγωγή ηλεκτρονικού υπολογιστή στην παρουσίαση των αποτελεσμάτων έχει κάνει τη τεχνική του φασματομέτρου μαζών μια από τις σημαντικότερες για τη πιστοποίηση δομής των οργανικών ενώσεων. Σαρώνοντας τη συχνότητα των παλμών του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου μπορούμε να συντονίσουμε κατά σειρά όλα τα ιόντα και να παραλάβουμε τελικά το φάσμα μαζών της κάθε ένωσης που υπάρχει στο δείγμα μας.

Ωστόσο, κατά τη καταγραφή του φάσματος:

- α) ο καταγραφέας πρέπει να αντιδρά ταχύτατα στην εμφάνιση των διαφόρων ιόντων του δείγματος,
- β) η ποικιλία των εντάσεων των φασματικών γραμμών που πρέπει να καταγραφούν είναι αρκετά μεγάλη (μεταξύ 1 και 1000), αν και οι ασθενείς γραμμές δεν παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στην ερμηνεία του φάσματος.[36]

Το φάσμα μαζών (**εικόνα 24**) είναι μια γραφική παράσταση κάθετων ευθειών γραμμών διαφορετικού ύψους (το ύψος είναι ανάλογο με τη σχετική αφθονία-relative abundance του ιόντος που αντιπροσωπεύει) και σε αποστάσεις σύμφωνα με το μοριακό βάρος/φορτίο του ιόντος. Η καταγραφή αυτή καλείται και bargraph (ραβδογράφημα). Στη κορυφή κάθε γραμμής (τυπώνεται από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή) η ακριβής θέση

της στη κλίμακα m/z εκτός από τις πολύ μικρές. Η μεγαλύτερη κορυφή αντιστοιχεί στο πιο άφθονο ιόν και χαρακτηρίζεται ως βασική γραμμή του φάσματος η οποία έχει αυτομάτως σχετική αφθονία 100%. Οι άλλες γραμμές λαμβάνουν τιμές ανάλογα με το ύψος τους και εκφράζονται ως εκατοστιαίο ποσοστό της σχετικής αφθονίας. [42]



Εικόνα 24: Παράδειγμα φάσματος μαζών

Με βάση το φάσμα μαζών είναι δυνατή:

- **αυτόματη ταυτοποίηση μιας ένωσης:** στα σύγχρονα ηλεκτρονικά λογισμικά υπάρχει μια βιβλιοθήκη φασμάτων, όπου το κάθε φάσμα είναι ταυτόσημο κάποιας γνωστής ένωσης. Σήμερα όλα τα όργανα GC/MS διαθέτουν στο λογισμικό τους τέτοιες βιβλιοθήκες αυτόματης αναζήτησης φασμάτων, διευκολύνοντας και το χρήστη στη ταυτοποίηση κάποιας ένωσης.
- **εύρεση της χημικής δομής μιας ένωσης:** σε περίπτωση που δεν υπάρχει ταυτόσημο φάσμα στη βιβλιοθήκη, έχουμε τη δυνατότητα να μελετήσουμε το τρόπο διάσπασής της και να ταυτοποιήσουμε την ένωση μέσα από τα διάφορα θραύσματά της.

Συνδυασμός αέριου χρωματογράφου και φασματογράφου μαζών

Ο αέριος χρωματογράφος είναι άμεσα συνδεδεμένος με το φασματογράφο μάζας και το φάσμα μαζών κάθε μιας ουσίας στο μίγμα καταγράφεται καθώς εγκαταλείπει τη στήλη διαχωρισμού. Με αυτόν το τρόπο υποβοηθείται σημαντικά η ηλεκτρονική καταγραφή του φάσματος, γίνεται με ευχέρεια ο ακριβής διαχωρισμός και η ανίχνευση μικρών ποσοτήτων προσμίξεων καθώς και η πιστοποίησή τους.

Ως αναλυτική μέθοδος η GC/MS εφαρμόζεται με μεγάλη επιτυχία σε αναλύσεις φαρμάκων, φυτοφαρμάκων, στεροειδών και μεταβολιτών στο αίμα και τα ούρα, τοξικών ουσιών στα τρόφιμα και το πόσιμο νερό κλπ. Ωστόσο, παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς και μειονεκτήματα, όπως:

- Η ταχύτατη σάρωσης του φάσματος μάζας πρέπει να είναι πολύ γρηγορότερη από το χρόνο έκλουσης της χρωματογραφικής κορυφής.
- Ορισμένες αντιδράσεις ισομερισμού μέσα στη στήλη διαχωρισμού του αέριου χρωματογράφου περνούν απαρατήρητες και μικρές ποσότητες του φέροντος αερίου διαφεύγουν στο θάλαμο ιονισμού, κλπ.

Με τη τεχνική της αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μάζας συνδυάζεται η υψηλή διαχωριστική ικανότητα των χρωματογραφικών τεχνικών με την υψηλή ευαισθησία, τη καθολικότητα στην απόκριση, την εκλεκτικότητα και τη δυνατότητα προσδιορισμού της δομής ενώσεων με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση μιας ένωσης χωρίς να χρειάζεται κάποια άλλη επιβεβαιωτική τεχνική. [30]

2.4) Αρχές ποσοτικού προσδιορισμού στην Ενόργανη Ανάλυση

Οι ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης είναι σχετικές μέθοδοι και σχεδόν στο σύνολό τους παρέχουν την αριθμητική τιμή μιας φυσικής ή φυσικοχημικής ιδιότητας, η οποία λαμβάνεται υπόψη ως S (signal) δηλαδή ως σήμα. Στο ποσοτικό προσδιορισμό η τιμή S ενός άγνωστου δείγματος μπορεί με διάφορες μεθόδους να συσχετιστεί με τη συγκέντρωση. Συνήθως, αυτή η μέθοδος συσχέτισης επιλέγεται όταν θέλουμε παράλληλα να εξασφαλίσουμε την αποφυγή τόσο των τυχαίων όσο και των συστηματικών σφαλμάτων κατά την ανάλυση στη προσπάθειά μας να παρέχουμε επαναληψιμότητα.

Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Η τεχνική του εσωτερικού προτύπου (internal standard) επιλέγεται ως μια μέθοδος ποσοτικοποίησης σε περιπτώσεις χρωματογραφικών τεχνικών, που αναμένεται να υπάρχει έντονη οργανολογική αστάθεια, γεγονός το οποίο θα οδηγήσει στο να λαμβάνονται αναλυτικά σήματα διαφορετικών τιμών κάθε φορά που επαναλαμβάνεται η μέτρηση του ίδιου δείγματος.

Σύμφωνα με τη μέθοδο εσωτερικού προτύπου προστίθεται αυστηρά στα πρότυπα και τα άγνωστα δείγματα ίδια συγκέντρωση μιας ουσίας A (εσωτερικό πρότυπο, internal standard-IS), που δεν υπάρχει στο δείγμα, με την ίδια αναλυτική συμπεριφορά με την αναλυόμενη ουσία. Η συγκέντρωσή του επιλέγεται, έτσι ώστε το σήμα του να είναι παρόμοιου μεγέθους με τα αναμενόμενα άγνωστα. Χρησιμοποιείται ως «διορθωμένο σήμα» του αγνώστου για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς ή/και τον υπολογισμό του αγνώστου. Επιτρέπει, δηλαδή, την εξουδετέρωση των τυχαίων σφαλμάτων τα οποία οφείλονται στις διακυμάνσεις των παραμέτρων λειτουργίας του οργάνου κατά τις μετρήσεις και/ή στις διακυμάνσεις της ποσότητας του δείγματος που τελικά φτάνει στον ανιχνευτή λόγω τυχαίων αποκλίσεων κατά την προετοιμασία και το χειρισμό του δείγματος. Να επισημάνουμε, ότι ως τυχαία σφάλματα (random errors) ονομάζονται τα σφάλματα που προέρχονται από μη μόνιμες πηγές και επηρεάζουν ακανόνιστα τις μετρήσεις. Για παράδειγμα, η έγχυση του δείγματος με σύριγγα μικρών όγκων (1-10μL) στην αέρια χρωματογραφία έχει σχετικά μικρή επαναληψιμότητα και οι διακυμάνσεις της τάξης των 10-20% στους εμβαλλόμενους όγκους είναι αναπόφευκτες.

Στην περίπτωση, της εφαρμογής της μεθόδου του εσωτερικού προτύπου ο λόγος $S_{\text{δείγμα}}/S_A$ θα είναι ανεξάρτητος των τυχαίων σφαλμάτων των μετρήσεων και επομένως οι διακυμάνσεις αυτές θα εξουδετερώνονται. Η καμπύλη αναφοράς σχηματίζεται με συσχέτιση των τιμών $S_{\text{δείγμα}}/S_A$ προς τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας στα πρότυπα διαλύματα. Στη συνέχεια υπολογίζονται οι τιμές $S_{\text{δείγμα}}/S_A$ για τα άγνωστα δείγματα και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς βρίσκονται οι άγνωστες συγκεντρώσεις.[32]

2.5) Επεξεργασία δειγμάτων με Solid Phase Microextraction (SPME) [33], [38], [39]

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) (**εικόνα 25**) είναι μια τεχνική απομόνωσης/εκρόφησης που αναπτύχθηκε στο Πανεπιστήμιο του Waterloo (Ontario, Canada) από τον Jawnuz. Η SPME είναι μια απλή και αποτελεσματική τεχνική απομόνωσης / εκρόφησης που εξαλείφει την ανάγκη για οργανικούς διαλύτες και απλοποιεί τις διαδικασίες για την απομόνωση των πτητικών ή μη πτητικών ενώσεων σε υγρά και στερεά δείγματα. Επίσης, επιτρέπει άμεσα, μετά την απομόνωση, εισαγωγή των ενώσεων στα συστήματα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας για επακόλουθο διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό τους. Είναι μια μεθοδολογία που μπορεί να εξασφαλίσει υψηλή σταθερότητα και ποσοτικά αποτελέσματα σε χαμηλές συγκεντρώσεις των ουσιών στόχων.



Εικόνα 25: Γενική εικόνα της συσκευής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης και εξαρτημάτων της

Οι αναλύσεις των πτητικών ή ημιπτητικών οργανικών περιβαλλοντικών ρύπων, συστατικών που ευθύνονται για τη γεύση και την οσμή καθώς και πολλών άλλων δειγμάτων συνήθως ξεκινούν με την απομόνωση των ουσιών στόχων με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών όπως η εκχύλιση υγρού-υγρού, εκδίωξη και παγίδευση (purge and trap), μεταφορά στον υπερκείμενο χώρο (headspace) ή με την μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME).

Χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα της SPME

Η SPME πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνικών διότι δεν απαιτεί χρήση οργανικών διαλυτών, είναι απλή διαδικασία και αποδοτική. Παρέχει γραμμικά αποτελέσματα για ένα εύρος συγκεντρώσεων των ουσιών στόχων, είναι συμβατή με οποιαδήποτε πεπληρωμένη στήλη ή τριχοειδή στήλη αέριας χρωματογραφίας ή οποιοδήποτε συστήματος αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με split/splitless έγχυση ή απευθείας έγχυση.

Στις αναλύσεις των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων, για παράδειγμα, τα εντομοκτόνα στα τρόφιμα, στα περιβαλλοντικά ή άλλα δείγματα συνήθως εξάγονται με την εκχύλιση υγρού-υγρού, η οποία παίρνει 4 έως 18 ώρες, ή με τα φυσίγγια ή τους δίσκους της εκχύλισης στερεάς φάσης που παίρνει συνολικά 1 έως 2 ώρες και 20 έως 45

λεπτά του διεκπεραιωμένου χρόνου για κάθε δείγμα. Επιπλέον, οι διαδικασίες της εκχύλισης υγρού-υγρού και της εκχύλισης στερεάς φάσης μπορούν να μεταφέρουν ρυπαντές στο τελικό δείγμα μαζί με τις ουσίες στόχους, παράγοντας ένα υψηλό υπόβαθρο (background) στην ανάλυση. Σε αντίθεση, η SPME είναι γρηγορότερη (30 λεπτά) και χρειάζεται πολύ λιγότερη εντατική εργασία (περίπου 3 λεπτά για κάθε δείγμα) απ' ό,τι η εκχύλιση υγρού-υγρού ή η εκχύλιση στερεάς φάσης. Απαιτεί μόνο μικρές ποσότητες του δείγματος και καθόλου οργανικούς διαλύτες. Η SPME μειώνει τη ποσότητα του δείγματος παρεμβαίνοντας στο υπόβαθρο των εντομοκτόνων ή άλλων ουσιών, καθιστώντας τη ταυτοποίηση της ουσίας στόχου και τη ποσοτικοποίησή της περισσότερο αξιόπιστες. Οι σχετικές αποκρίσεις για μια σειρά των 10 εκχυλίσεων των χλωριωμένων παρασιτοκτόνων στο νερό δείχνουν ότι η SPME είναι πολύ σταθερή στη καθημερινή χρήση. (πίνακας 8)

Analyte	Relative Responses (n=10)		
	Mean	Std. Dev.	%RSD
a-BHC	0,72	0,07	9,2
b-BHC	0,06	0,01	19,1
c-BHC	0,53	0,06	10,5
d-BHC	0,28	0,03	11,9
Heptachlor	1,01	0,1	10,2
Aldrin	1,25	0,06	4,8
Heptachlor Epoxide	0,92	0,12	13,2
a-Chlordane	0,97	0,12	9,9
Endosulfan I	0,87	0,1	11,1
c-Chlordane	0,92	0,11	10,1
4,4'-DDE	0,92	0,07	8,1
Dieldrin	0,83	0,08	9,5
Endrin	0,68	0,06	9,1
Endosulfan II	0,72	0,09	13
4,4'-DDD	0,69	0,06	8,9
Endrin Aldehyde	0,13	0,04	28,6
Endosulfan Sulfate	0,54	0,06	11,9
4,4'-DDT	0,51	0,08	15,2
Endrin Ketone	0,57	0,06	10,7
Methoxychlor	0,26	0,04	16,2

Sample: Chlorinated pesticides in 4ml water, 50ppt each

SPME: 100µm polydimethylsiloxane-coated fiber immersion sampling, 15min

Column: poly[5% diphenyl / 95% dimethylsiloxane] phase, 15m *0.20mm ID, 0.20 µm film

Oven: 120°C(1 min) to 180°C at 30 °C / min, then to 290°C at 10°C / min,

Carrier: helium, 37 cm/sec, set at 120°C,

Det: ECD, 300°C,

Inj.: splitless (closed 3 min), 260°C

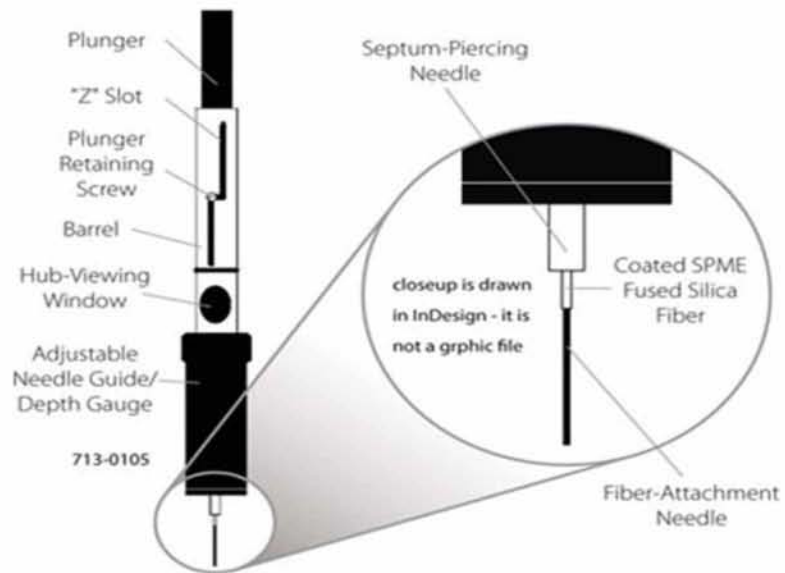
Πίνακας 8: Σχετικές αποκρίσεις για οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα

Λειτουργία SPME

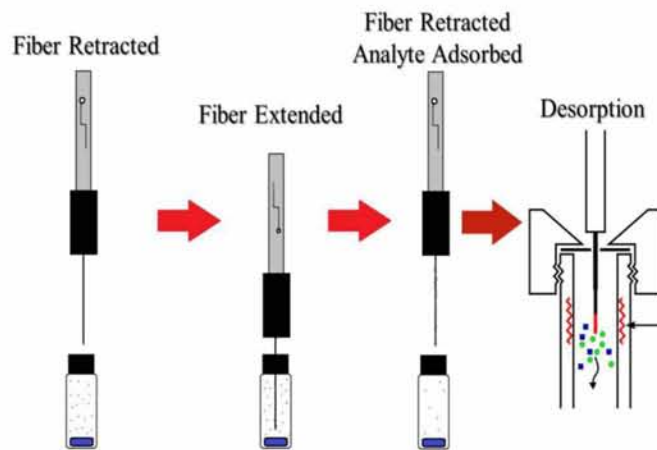
Μια ίνα μήκους 1cm τετηγμένου πυριτίου επικαλυμμένη με ένα πολυμερές συνδέεται σε ένα ατσάλινο έμβολο που μοιάζει με τροποποιημένη σύριγγα μικρολίτρων (**εικόνα 26,27**) και τοποθετείται σε έναν υποδοχέα. Το έμβολο (**εικόνα 28**) μετακινεί την ίνα μέσα από τη τρύπα της βελόνας. Η βελόνα περνάει διαμέσω του διαγράμματος που σφραγίζει το δοκιμαστικό σωλήνα, πιέζει το έμβολο και σύρει την ίνα μέσα στη βελόνα εκθέτοντάς τη μέσα στο δείγμα ή με headspace τεχνική πάνω από το δείγμα. Οι οργανικές ουσίες απορροφώνται στην επικάλυψη της ίνας. Μετά την απορρόφηση επιτυγχάνεται η ισορροπία, συνήθως σε 2 με 30 λεπτά, η ίνα σύρεται στη βελόνα, και η βελόνα αποσύρεται από το δοκιμαστικό σωλήνα. Τέλος, η βελόνα εισάγεται στη θύρα έγχυσης του αέριου χρωματογράφου, όπου οι προσροφημένες ουσίες θερμικά εκροφώνονται και μεταφέρονται στη στήλη GC ή στη διεπαφή SPME/HPLC. Τα αποτελέσματα της τεχνικής συγκρίνονται με τα αποτελέσματα άλλων μεθοδολογιών προετοιμασίας δείγματος και φαίνονται να είναι πολύ ευνοϊκά. (**πίνακας 9**)



Εικόνα 26: Εξοπλισμός του ατσάλινου εμβόλου (holder) με την ίνα τετηγμένου πυριτίου που έχει επικάλυψη πολυμερούς.



Εικόνα 27: Εικονική επεξήγηση ατσάλινου εμβόλου



Εικόνα 28: Διαδικασία εκχύλισης του δείγματος.

Detection Limit (MS)	Precision % (RSD)	Expense	Time	Solvent Use	Simplicity
Purge and trap (ppb)	1-30%	high	30min	none	no
Stripping (ppt)	3-20%	high	2min	none	no
Headspace (ppm)		low	30min	none	yes
Liquid-Liquid Extraction (ppt)	5-50%	high	1hr	1000mL	yes
Solid Phase Extraction (ppt)	7-15%	medium	30min	to 100mL	yes
SPME (ppt)	<1-12%	low	(30min)	none	yes

Πίνακας 9: Σύγκριση της SPME με άλλες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων (Table provided by J.Pawliszyn, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada).

Στην SPME, οι ισορροπίες αποκαθίστανται μεταξύ των συγκεντρώσεων της ουσίας στόχου στην αέρια φάση πάνω από το δείγμα και στην πολυμερή επικάλυψη της ίνας τετηγμένου πυριτίου. Η ποσότητα της ουσίας στόχου που απομονώνεται από την ίνα εξαρτάται από το πάχος της πολυμερούς επικάλυψης και από το ρυθμό που διανέμεται η ουσία στόχος. Ο χρόνος εκχύλισης καθορίζεται από το χρόνο που απαιτείται για την απόκτηση ακριβών εκχυλίσεων για τις ουσίες στόχους με τις υψηλότερες σταθερές κατανομής. Η σταθερά κατανομής γενικά αυξάνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους και του σημείου ζέσεως της ουσίας. Η εκλεκτικότητα μπορεί να τροποποιηθεί αλλάζοντας το τύπο της πολυμερούς επικάλυψης στην ίνα, ή το πάχος της επικάλυψης έτσι ώστε να ταιριάζουν με τα χαρακτηριστικά των ουσιών στόχων. Γενικά, οι πτητικές ενώσεις απαιτούν μια χοντρή επικάλυψη, αν και μια λεπτή επικάλυψη είναι περισσότερο αποτελεσματική για την απομόνωση/ εκρόφηση ημιπτητικών ενώσεων. Για τις υγρές πολυμερικές επιστρώσεις SPME, η ποσότητα της ουσίας στόχου που απομονώνεται από την επικάλυψη, στην ισορροπία είναι άμεσα συσχετιζόμενη με τη συγκέντρωση της ουσίας στο δείγμα:

$$n = \frac{K_{fs} * V_f * C_o * V_s}{K_{fs} * V_f + V_s}, \text{ όπου}$$

n = η μάζα του αναλύτη που απομονώνεται από την επικάλυψη

C_o = η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα

K_{fs} = ο συντελεστής κατανομής για τον αναλύτη μεταξύ της επικάλυψης και της μήτρας του δείγματος

V_f = ο όγκος της επικάλυψης

V_s = ο όγκος του δείγματος

Η εξίσωση δείχνει τη σχέση μεταξύ της αρχικής συγκέντρωσης της ουσίας στο δείγμα και της ποσότητας της ουσίας που απορροφήθηκε από την επικάλυψη, η οποία είναι γραμμική.

Επειδή οι επικαλύψεις που χρησιμοποιούνται στην SPME επιλέγονται ώστε να έχουν ισχυρή σχέση με τις οργανικές ενώσεις που προορίζονται για εκχύλιση, οι τιμές του συντελεστή κατανομής για αυτές τις ουσίες είναι μεγάλες. Συνεπώς, η SPME έχει την ικανότητα να δίνει συγκεντρωτικό αποτέλεσμα και να οδηγεί σε καλή ευαισθησία. Οι τιμές των συντελεστών κατανομής συνήθως δεν είναι αρκετά μεγάλες ώστε να εκχυλιστεί πλήρως η ουσία από τη μήτρα του δείγματος. Ωστόσο, επικρατεί η άποψη ότι η SPME είναι μια μέθοδος δειγματοληψίας ισορροπίας. Μέσω της κατάλληλης βαθμονόμησης, η SPME μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ακριβή καθορισμό των συγκεντρώσεων των ουσιών στόχων στο δείγμα.

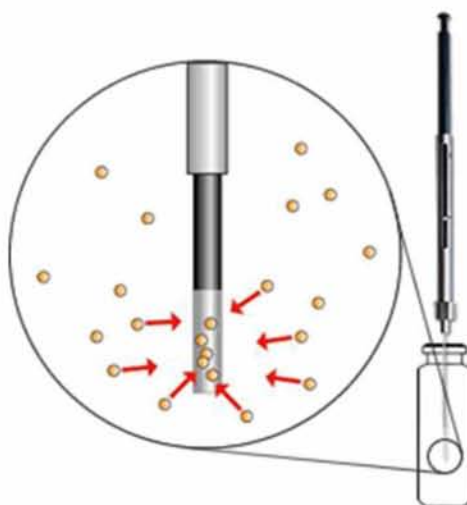
Η εξίσωση, επίσης, δείχνει ότι αν ο όγκος του δείγματος (V_s) είναι πολύ μεγάλος, η ποσότητα της ουσίας που εκχυλίζεται από την επικάλυψη της ίνας δεν σχετίζεται με τον όγκο του δείγματος. Αυτό κάνει την SPME ιδανικά κατάλληλη για δειγματοληψία πεδίου και ανάλυση. Επειδή η ίνα μπορεί να παρέχει ακριβή πληροφορία για τις ουσίες στόχους απλά με την έκθεσή της στον αέρα ή τη βύθισή της σε μια λίμνη ή ένα ποτάμι, η SPME μπορεί σημαντικά να μειώσει το πεδίο του χρόνου ανάλυσης συνδυάζοντας τη δειγματοληψία, την εκχύλιση, τη συγκέντρωση και την έγχυση σε μία ενιαία διαδικασία.

Επίσης, αλλάζοντας το τύπο της επικάλυψης της ίνας ή το πάχος της, μπορεί να βελτιωθεί η ανάκτηση μιας ουσίας ή η παλαιότερη εκλεκτικότητά της χάρη στις περισσότερες πτητικές ή λιγότερο πτητικές ενώσεις. Επίσης, η ανάκτηση μπορεί να βελτιωθεί αν αλλάξουμε τις παραμετρικές συνθήκες, όπως: προσθέτοντας έναν ηλεκτρολύτη στο δείγμα, αλλάζοντας το pH, ή με δειγματοληψία του υπερκείμενου (headspace) και όχι του δείγματος αντίστροφα.

Δειγματοληψία με SPME

Για την υψηλή ακρίβεια της SPME, συνεπώς ο χρόνος δειγματοληψίας και άλλοι παράμετροι της δειγματοληψίας είναι περισσότερο σημαντικοί απ' ό,τι η πλήρης εξισορρόπηση. Είναι, επίσης, σημαντικό να διατηρείται σταθερό το μέγεθος του φιαλιδίου και ο όγκος του δείγματος, και όταν έχουμε δειγματοληψία με εμβάπτιση, το

βάθος με το οποίο η ίνα εμβάπτιζεται στο δείγμα. Εξαιτίας του ότι οι μέθοδοι, αυτή της εμβάπτισης και αυτή της δειγματοληψίας headspace, διαφέρουν στη κινητική, οι δύο προσεγγίσεις έχουν θεωρηθεί συμπληρωματικές. Για ένα δεδομένο χρόνο δειγματοληψίας, ο Yang και ο Peppard βρήκαν ότι η εμβάπτιση SPME ήταν πιο ευαίσθητη από τη Headspace SPME (HS-SPME) για ουσίες κυρίως παρούσες σε υγρό. Το αντίθετο ήταν για ουσίες που ήταν κατά κύριο λόγο σε υπερκείμενη φάση-Headspace. Αυξάνοντας τον όγκο του δείγματος από 200μL σε 3ml, ενώ διατηρείται η αναλογία του υγρού προς τη σταθερά Headspace (1:1), αυξάνεται ο ρυθμός απομόνωσης της ουσίας είτε με εμβάπτιση είτε με HS-SPME. Για υψηλότερη ευαισθησία από τη Headspace SPME, το δείγμα πρέπει να είναι τόσο μικρό όσο και πρακτικό. Η ισορροπία επιτυγχάνεται ταχύτερα σε HS-SPME (εικόνα 29) απ' ό,τι σε εμβάπτιση SPME, επειδή οι ουσίες μπορούν να διαχυθούν πιο γρήγορα στην επικάλυψη επί της ίνας. Αυτά τα χαρακτηριστικά μπορούν να διαχειριστούν θετικά ώστε να απομονώνουν επιλεκτικά συστατικά του δείγματος, όπως ενδείκνυται. Η τεχνική HS-SPME είναι ιδανική για να ελαχιστοποιεί τις παρεμβολές σε μια ανάλυση, και μπορεί να επεκτείνει το χρόνο ζωής της SPME ίνας.



Εικόνα 29: Απεικόνιση των μορίων των πτητικών ουσιών που επικάθονται στην ίνα SPME με τη τεχνική Headspace

Η εκρόφιση μιας ουσίας από την SPME ίνα εξαρτάται από το σημείο βρασμού της ουσίας, το πάχος της επικάλυψης της ίνας, και τη θερμοκρασία της θύρας έγχυσης. Η κρυογονική ψύξη μερικές φορές απαιτείται για να συγκεντρώνει αργά τις εκροφούμενες ενώσεις στην είσοδο της τριχοειδούς στήλης. Εναλλακτικά, μια επένδυση εισόδου με μια στενή εσωτερική διάμετρο οξύνει τις κορυφές και συχνά μπορεί να εξαλείψει την ανάγκη για ψύξη. Η SPME μπορεί να σαρώσει ταχέως δείγματα και όταν χρησιμοποιηθεί υπό

σταθερές συνθήκες εκχύλισης και με internal standards μπορεί να αποτελέσει ένα αξιόπιστο μέρος μιας επίσημης ποσοτικής ανάλυσης.

Βελτιστοποίηση της SPME

Σχετικά με την ανάκτηση ακριβών αποτελεσμάτων και την αξιόπιστη ανίχνευση των ουσιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σπουδαίο ρόλο παίζουν οι εξής παράγοντες, καθώς επηρεάζουν τη διαδικασία της SPME:

- η πολικότητα και το πάχος της επικάλυψης της ίνας,
- η μέθοδος της δειγματοληψίας (τεχνική headspace ή εμβάπτιση της ίνας),
- το pH,
- η περιεκτικότητα σε άλατα του δείγματος,
- ο ρυθμός ανάδευσης του δείγματος και άλλα.

Πολικότητα της ίνας: Οι μη πολικές ενώσεις εκχυλίζονται πιο αποτελεσματικά με μια μη πολική ίνα και οι πολικές ενώσεις εκχυλίζονται πιο αποτελεσματικά με μια πολική ίνα. Τόσο οι πολικές όσο και οι μη πολικές ενώσεις αναλύονται πιο αποτελεσματικά στην αέρια χρωματογραφική στήλη της ίδιας πολικότητας. Στην SPME, ωστόσο, επειδή μόνο 1cm της ίνας εκτίθεται στη μήτρα του δείγματος, η επικάλυψη της ίνας πρέπει να είναι είτε μη πολική ή ισχυρά πολική εκ φύσεως. Το πολυμερές αυξάνει τη διαθέσιμη επιφάνεια και έτσι βελτιώνει τις εκχύλισεις μικρών πολικών μορίων.

Πάχος επικάλυψης της ίνας: Μία χοντρή επικάλυψη της ίνας θα εκχυλίσει περισσότερο από την υπάρχουσα ουσία, απ' ό,τι μια λεπτή επικάλυψη. Συνεπώς, μια ίνα με λεπτότερη επικάλυψη χρησιμοποιείται για να κατακρατήσει πτητικές ενώσεις και να τις μεταφέρει στη θύρα έγχυσης GC χωρίς να χαθούν, αλλά μια λεπτή επικάλυψη χρησιμοποιείται επίσης για να εξασφαλίσει γρήγορη διάχυση και απελευθέρωση των ενώσεων υψηλότερου σημείου ζέσεως κατά τη διάρκεια της θερμικής εκρόφησης. Μια λεπτή επικάλυψη θα απομακρύνει αποτελεσματικά τις ενώσεις υψηλού σημείου ζέσεως από τη μήτρα του δείγματος, αλλά ο ρυθμός εκρόφησης θα παραταθεί και κάποιες ενώσεις θα μπορούσαν να μεταφερθούν στην επόμενη εκχύλιση.

Ανάδευση του δείγματος: Ο ρυθμός ανάδευσης του δείγματος βοηθάει την εκχύλιση και μειώνει τον χρόνο εκχύλισης, ειδικά για τις ενώσεις υψηλότερου μοριακού βάρους με υψηλούς συντελεστές κατανομής. Η μη σταθερή ανάδευση προκαλεί χαμηλή ακρίβεια και είναι χειρότερη από τη μη ανάδευση. Η κατεργασία με υπερήχους προωθεί την απορρόφηση της ουσίας, αλλά μπορεί να θερμάνει το δείγμα. Αυτό ίσως να είναι θετικό για την εξάτμιση των πτητικών ενώσεων στην headspace εκχύλιση.

Εμβάπτιση έναντι Headspace δειγματοληψίας: Η επίδραση των αλάτων και το pH των ουσιών που έχουν μια πίεση ατμών, μπορούν να εκχυλιστούν με την εμβάπτιση της ίνας εντός του δείγματος, ή με τη δειγματοληψία headspace πάνω από το δείγμα. Οι ουσίες που δεν έχουν καμία πίεση ατμών πρέπει να εκχυλιστούν με την εμβάπτιση. Προσθέτοντας 25-30% sodium chloride στο δείγμα ή αλλάζοντας το pH του δείγματος πριν την εκχύλιση μπορεί να αυξηθεί η ιονική δύναμη του διαλύματος και αντιστρόφως να μειωθεί η διαλυτότητα μερικών ενώσεων.

Προσθήκη αλάτων: Η προσθήκη αλάτων στο δείγμα αυξάνει ιδιαίτερα την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης για πολλές ουσίες, συγκεκριμένα πολικές ενώσεις και πτητικές ενώσεις. Τα άλατα πρέπει να προστίθενται στις αναλύσεις ιχνηλασιμότητας. Τα άλατα δεν χρειάζεται να ενισχύουν την εκχύλιση των ουσιών με υψηλούς συντελεστές κατανομής, ωστόσο ίσως εισάγουν παρεμβαλλόμενες κορυφές. Αλλάζοντας το pH μπορεί να μειωθεί η διαλυτότητα μερικών ενώσεων. Αλκαλικές και βασικές ενώσεις εκχυλίζονται πιο αποτελεσματικά σε αντίστοιχα αλκαλικό και βασικό pH. Ένας συνδυασμός τροποποίησης των αλάτων και του pH συχνά βοηθάει την εκχύλιση των ενώσεων στη τεχνική headspace. Η ισορροπία είναι γρηγορότερη στη δειγματοληψία Headspace απ' ό,τι στη δειγματοληψία εμβάπτισης, γιατί τα μόρια μετακινούνται πιο γρήγορα στον αέρα από το νερό.

Άλλοι παράγοντες: Αυτό που ελέγχεται λιγότερο, αλλά επηρεάζει την εκχύλιση, είναι η συγκέντρωση των ενώσεων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τέτοιες των 50ppb ή χαμηλότερες για τις πτητικές ενώσεις, οι αλλαγές στον όγκο του δείγματος δεν επηρεάζουν την απόκριση, γιατί η ισορροπία είναι ανεξάρτητη συγκεντρώσεων. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι αλλαγές στον όγκο του δείγματος γίνονται σημαντικές. Σε ένα μεγάλο δείγμα (>5mL) συμπεριλαμβανομένου μιας ένωσης υψηλής συγκέντρωσης, η ποσότητα της ένωσης που μετακινείται από το δείγμα δεν είναι επαρκής να αλλάξει τη συγκέντρωση. Γι' αυτό, η απόκριση μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης είναι εκθετική και όχι γραμμική, ιδιαίτερα για ενώσεις με υψηλούς συντελεστές κατανομής. Οι αποκρίσεις ίσως να μην είναι γραμμικές για χαμηλές συγκεντρώσεις. Επειδή η συγκέντρωση της ένωσης δεν είναι συχνά γνωστή, είναι καλύτερα να διατηρούνται οι όγκοι του δείγματος 1mL και 5mL, και πάντα να χρησιμοποιείται ο όγκος των δειγμάτων και για τη βαθμονόμηση των πρότυπων δειγμάτων.

Τέλος, οι παράμετροι εκρόφησης, όπως η θερμοκρασία της θύρας έγχυσης, το βάθος της εισόδου της ίνας στη θύρα έγχυσης, και ο χρόνος εκρόφησης, επίσης πρέπει να βελτιώνονται για τις συμπεριλαμβάνοντες ενώσεις. Μόλις εγκατασταθούν, αυτές οι παραμετρικές τιμές πρέπει να ελέγχονται συνεχώς. Συνεπώς, η υψηλή σταθερότητα και τα ποσοτικά αποτελέσματα της SPME μπορούν να επιβεβαιωθούν, με τον έλεγχο της πολικότητας και του πάχους της επικάλυψης της ίνας, της συνεχούς ανάδευσης του δείγματος, και όταν είναι απαραίτητο με τη προσαρμογή του pH και τη περιεκτικότητα των αλάτων στο δείγμα.

Κεφάλαιο 3: Πειραματική διαδικασία

Στο πειραματικό μέρος, στόχος ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας αναλυτικής μεθοδολογίας για το ποσοτικό προσδιορισμό των οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε βιολογικά δείγματα. Τα τρία βασικά στάδια της μεθόδου περιλαμβάνουν: 1. απομόνωση των αναλυτών, 2. ενόργανη ανάλυση του δείγματος με GC-MS, 3. επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις απομονώθηκαν με την μικροεκχύλιση στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο. Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της εκχύλισης με επιλογή βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης όπως προσθήκη ACN, pH, εξαλάτωση με KH_2PO_4 , ταχύτητα φυγοκέντρησης (3.3)

Η ενόργανη ανάλυση του εκχυλίσματος έγινε με την αέρια χρωματογραφία φασματομετρία μαζών με αναλυτή μαζών παγίδας ιόντων (GC IT MS). Η αρχική ανάπτυξη της μεθόδου έγινε με την χρήση των προτύπων διαλυμάτων και Splitless έγχυση PTV (3.4)

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Xcalibur® (Thermo Finnigan, USA). (3.5)

Έπειτα, η αναλυτική μεθοδολογία που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα για την εκτίμηση της έκθεσης στο γενικό πληθυσμό. Στο εργαστήριο εστιαστήκαμε σε συγκεκριμένα OCP's που παρουσιάζονται παρακάτω (πίνακας 10).

A/A	Ουσία	Μοριακά Βάρη	Χαρακτηριστικά Ιόντα, m/z
1	m – Xylene	106.17	207
2	a – BHC	290.82	181,219
3	β – BHC	290.82	181,219
4	γ – BHC	296.87	183,219
5	δ – BHC	290.83	181,219
6	Heptachlor	373.32	272,337
7	Aldrin	364.93	263,293
8	Heptachlor epoxide	389.3	151,263
9	γ – Chlordane	409.78	373
10	Endosulfan I	406.95	241,373
11	α – Chlordane	409.78	373
12	4,4' – DDE	318.03	246,318

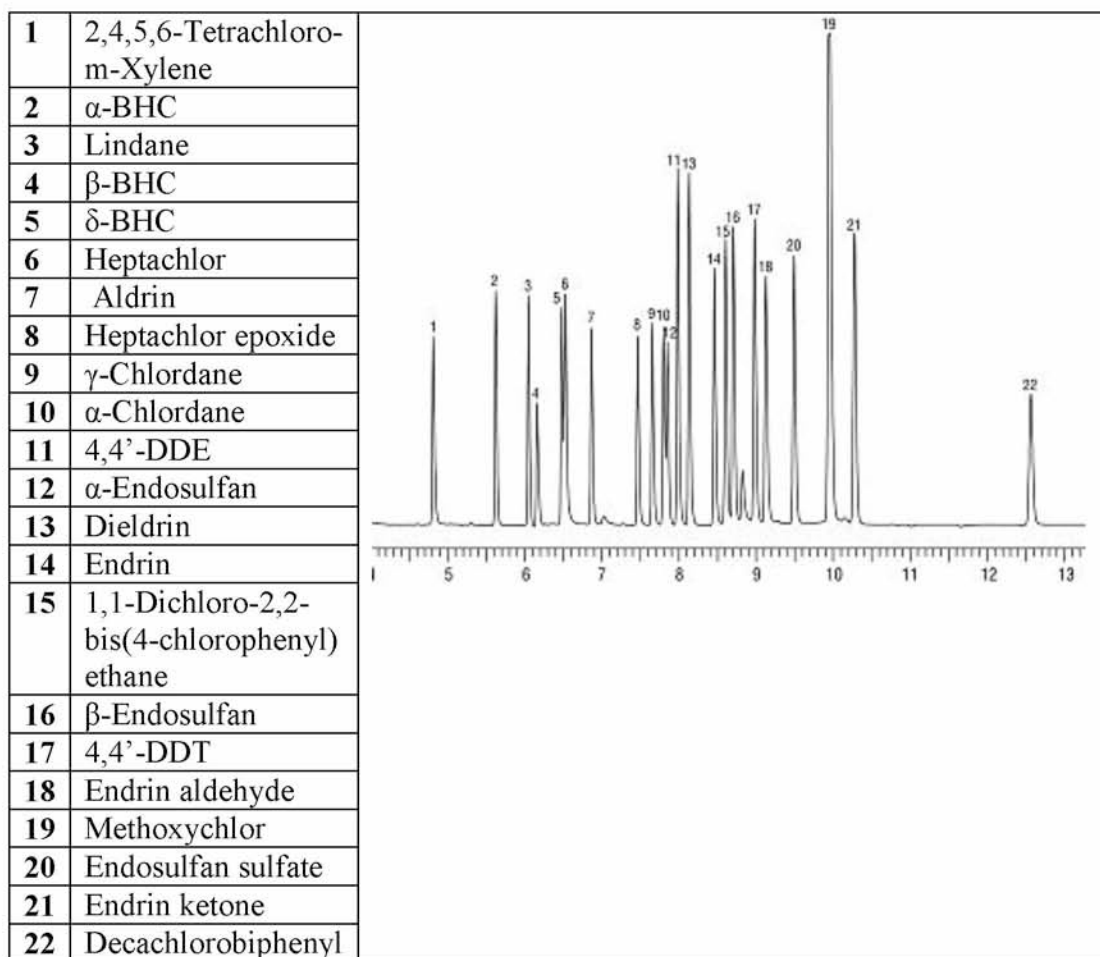
13	Dieldrin	380.91	263,277
14	Endrin	380.9	263,280
15	Endosulfan II	406.95	195,241
16	4,4' – DDD	320.05	165,235
17	Endrin aldehyde	380.91	281,345
18	Endosulfan Sulfate	422.92	272,387
19	4,4' – DDT	354.49	165,235
20	Endrin ketone	346.46	281,317
21	Methoxychlor	345.66	227
22	Decachlorobiphenyl	498	498
23	Hexachlorobenzene	284.76	284

Πίνακας 10: Παρουσίαση των ουσιών που μελετήθηκαν εργαστηριακά

3.1) Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων και πρότυπων δειγμάτων

Ένα από τα σημαντικά στάδια της πειραματικής διαδικασίας είναι η προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων παρακαταθήκης (stock solutions). Για τη παρασκευή τους χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά και όργανα:

- Φιαλίδια χωρητικότητας 15ml (15ml Clear Vial, Screw Top, Hole Cap PTFE/Silicone Septa)
- Μικροσύριγγες 10μL, 100 μL και 500 μL (Thermoscientific, Syringe SGE 10uL AGO 50mm needle)
- Πρότυπα Διαλύματα:
 - 1) Πρότυπο μίγμα οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων Supelco: EPA 8081 Pesticide Standard Mix 200μg/mL each component in hexane: toluene (1:1), analytical standard , το οποίο περιέχει τις παρακάτω 22 ουσίες (**πίνακας 11**).



Πίνακας 11: Οι ουσίες του πρότυπου μίγματος οργανοχλωριωμένων παρασιτοκτόνων με το χρωματογράφημα ανάλυσής του

- 2) Πρότυπο διάλυμα HCB (Supelco) 1000 μ g/ml in acetone
- 3) Πρότυπο διάλυμα εσωτερικού προτύπου οργανοχλωριωμένων διφαινυλίων (PCB's) Supelco: 36902 Fluka - PCB No101 solution 10ng/ μ L in isooctane, analytical standard
- 4) Πρότυπο διάλυμα εσωτερικού προτύπου οργανοχλωριωμένων διφαινυλίων (PCB's) Supelco: 36904 Fluka - PCB No153 solution 10ng/ μ L in isooctane analytical standard

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων παρακαταθήκης

Τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) παρασκευάστηκαν με τη προσθήκη διαλύτη MeOH (μεθανόλη) σε φιαλίδια χωρητικότητας 15 ml και με τη χρήση μικροσύριγγας λήφθηκε η επιθυμητή ποσότητα πρότυπου διαλύματος και του διαλύτη προκειμένου να γίνεται η προσθήκη με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια. Για να αποφεύγονται τυχόν επιμολύνσεις στα δείγματα, οι μικροσύριγγες ξεπλένονταν με ακετόνη και μεθανόλη κάθε φορά πριν τη χρήση τους. Έτσι, παρήχθησαν τα εξής πρότυπα διαλύματα εργασίας:

- Διάλυμα παρακαταθήκης 1 (Pesticide Standard Mix+HCB : 1μg/ml)

Για τη παρασκευή διαλύματος 1μg/ml Pesticide Standard Mix + HCB ελήφθησαν 50μL από το πρότυπο 1 (Pesticide Standard Mix 200μg/ml) και 10 μL από το πρότυπο 2 (HCB 1mg/ml) ενώ προστέθηκαν και 9,94 ml MeOH.

- Διάλυμα παρακαταθήκης 2 (Pesticide Standard Mix +HCB: 0,1μg/ml)

Η παρασκευή αυτού του αραιωμένου διαλύματος έγινε με αραιώση 1:10. Ελήφθηκε 1ml από το διάλυμα παρακαταθήκης 1 (1μg/ml Pesticide Standard Mix+HCB) και αραιώθηκε σε 9ml MeOH.

- Διάλυμα παρακαταθήκης 3 (PCB's:1000 ng/ml)

Για τη παρασκευή αυτού του διαλύματος ελήφθησαν 100μL από το πρότυπο 3 (10ng/μL PCB-101) και 100μL από το πρότυπο 4 (10ng/μL PCB-153) και έγινε αραιώση 1/10 σε 9,8 ml MeOH.

Παρασκευή των πρότυπων δειγμάτων

Για τη βαθμονόμηση του οργάνου καθημερινά προετοιμάζονταν πρότυπα δείγματα με συγκεκριμένες ποσότητες των διαλυμάτων παρακαταθήκης για το καθένα και με εμβολιασμό 0,5 ml από συνενωμένους ορούς (pooled serum). Έτσι, η ποσότητα των συνενωμένων ορών αναλύονταν για τη παρουσία OCP's στα πρότυπα δείγματα. Η διαδικασία προετοιμασίας περιγράφεται παρακάτω πίνακα (**πίνακα 12**)

πρότυπο δείγμα	ποσότητα συνενωμένων ορών	Διάλυμα παρακαταθήκης 1	Διάλυμα παρακαταθήκης 2	Διάλυμα παρακαταθήκης 3	Τελική συγκέντρωση αναλυτών	Τελική συγκέντρωση Internal Standard
1	0,5 ml	-	-	10 μ L	-	20 ng/ml
2	0,5 ml	-	2,5 μ L	10 μ L	0,5ng/ml	20 ng/ml
3	0,5 ml	-	5 μ L	10 μ L	1ng/ml	20 ng/ml
4	0,5 ml	1 μ L	-	10 μ L	2 ng/ml	20 ng/ml
5	0,5 ml	5 μ L	-	10 μ L	10 ng/ml	20 ng/ml
6	0,5 ml	10 μ L	-	10 μ L	20 ng/ml	20 ng/ml

Πίνακας 12: Διαδικασία προετοιμασίας πρότυπων δειγμάτων

Αναλυτικότερα για το πρότυπο δείγμα προστίθονταν σε 0,5ml ορού ανάλογη ποσότητα διαλύματος παρακαταθήκης 1 και παρακαταθήκης 3 (βλ.πινακ 12), καθώς και 0,5ml ACN. Έπειτα γινότανε καλή ανάδευση στο vortex και μετέπειτα φυγοκέντρωση στους 25°C και στα 13000 rpm για 5min. Στη συνέχεια απομονώνονταν το υπερκείμενο (0,5ml) και προστίθονταν σε αυτό 0,5 ml νερό και 1ml KH_2PO_4 (0.1M).

Για τα άγνωστα δείγματα προστίθονταν σε 0,5ml ορού 10 μ L PCB's, και 0,5 ml ACN. Έπειτα γινότανε καλή ανάδευση στο vortex και μετέπειτα φυγοκέντρωση στους 25°C και στα 13000 rpm για 5min. Στη συνέχεια απομονώνονταν το υπερκείμενο (0,5ml) και προστίθονταν σε αυτό 0,5 ml νερό και 1ml KH_2PO_4 (0.1M).

3.2) Απομόνωση των αναλυτών με μικροεκχύλιση στερεάς φάσεως

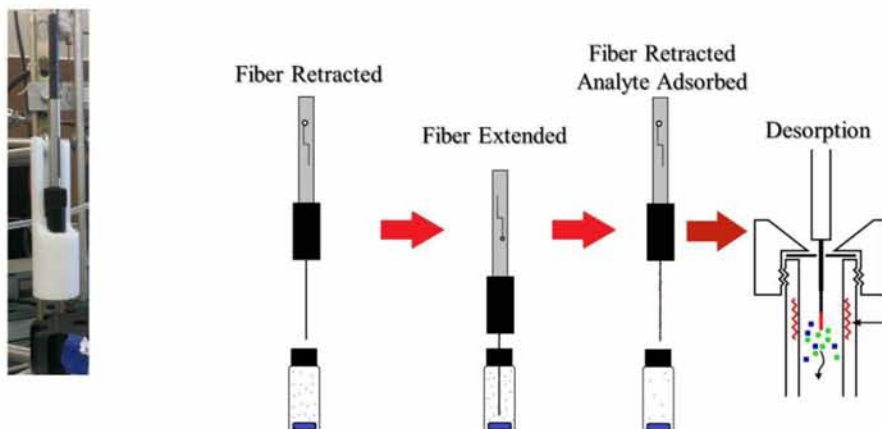
Ένα δεύτερο εξίσου σημαντικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η διαδικασία απομόνωσης των αναλυτών με τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσεως (SPME).

Υλικά και όργανα:

- Κωνικά πλαστικά σωληνάρια 2ml τύπου Eppendorf
- Συσκευή μικροεκχύλισης στερεάς φάσεως (Supelco Solid Phase Micro-Extraction Manual Holder – Mod. 57330-U)
- Ίνα σιλοζανίου 100 μ M (Supelco SPME Fiber Assembly Used With SPME Holders 57331 and 57347-U)
- Θερμαντική πλάκα – μαγνητικός αναδευτήρας (VELP SCIENTIFICA ARE Heating Magnetic Stirrer, S/N:82102)
- Αυτόματη πιπέτα (BIOHIT Proline 100-1000 μ L)

- Μικροσύριγγα (Thermoscientific, Syringe SGE 10ul AGO 50mm needle)
- Συσκευή υπερκάθαρου νερού (Thermo Electron LED GmbH, Smart2Pure3-UV/UF, Thermo Scientific)
- Φυγόκεντρος Eppendorf
- Αναλυτικός ζυγός (SHIMADZU UniBlock AUW120D, S/N: D449911638).
- Οργανικός διαλύτης ακετονιτρίλιο

Ακολουθούν τα βήματα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσεως (SPME) (εικόνα 30):



Εικόνα 30 : Απεικόνιση της διαδικασίας SPME

Βήμα 1^ο

Αφού σε 4ml φιαλιδίου έχουν προστεθεί 2ml από το επεξεργασμένο δείγμα (βλ. 3.1), το φιαλίδιο κλείνεται αεροστεγώς και τοποθετείται πάνω σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα. Ρυθμίζεται η θερμοκρασία (στους 80-85 °C) και η ταχύτητα ανάδευσης του δείγματος.

Βήμα 2^ο

Τοποθετώντας τη συσκευή του υποδοχέα της ίνας (holder) στη σωστή θέση, η βελόνα τρυπά το διάφραγμα (septum) του φιαλιδίου και στη συνέχεια η ίνα που βρίσκεται εντός της βελόνας εξάγεται και εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο (headspace) του φιαλιδίου για 30min. Η θέση της βελόνας εντός του φιαλιδίου μπορεί να ελεγχθεί καλύτερα και με τη βοήθεια ενός μεγεθυντικού φακού.

Βήμα 3^ο

Μετά το πέρας των 30 min, επαναφέρεται η ίνα στην αρχική της θέση εντός της βελόνας και η βελόνα εξάγεται από το φιαλίδιο. Με μεγάλη προσοχή απομακρύνεται η συσκευή του υποδοχέα της ίνας από τη βάση στήριξης και η εξωτερική βελόνα σκουπίζεται ελαφρώς προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν κατάλοιπα νερού από την επιφάνειά της. Οι ουσίες που προσροφήθηκαν στην ίνα από το δείγμα είναι πλέον έτοιμες προς ανάλυση στο χρωματογράφο.

3.3) Βελτιστοποίηση της διαδικασίας SPME

Η μεθοδολογία SPME προτάθηκε αρχικώς από τους Lopez et al. (2007) [41]. Όμως παρουσίασε μη αναμενόμενα προβλήματα (δεν λαμβάνονταν οι αναλύτες), με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί έτσι ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη εκχύλιση των αναλυτών. Οι τροποποιήσεις προέκυψαν μετά από πειραματική διαδικασία.

Σύμφωνα με το άρθρο, αναπτύχθηκε η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης με headspace (HS-SPME). Η ανάλυση διεξήχθη από την αέρια χρωματογραφία (GC), η οποία ήταν εξοπλισμένη με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Για τη καλύτερη απομόνωση των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε ίνα 100 μ mPDMS, αναλογία headspace 3/5 (3 ml σε 5ml φιαλιδίου), θερμοκρασία εκχύλισης 85°C, χρόνος εκχύλισης 50 min και προστέθηκε 1ml όξινου διαλύματος (pH 3) σε 1ml αραιωμένου ορού (1:1).[41] Οι τροποποιήσεις που έγιναν πάνω σε αυτή τη διαδικασία ενδεικτικά είναι οι παρακάτω.

Επίδραση ακετονιτριλίου (ACN) για τη κατακρήμνιση πρωτεϊνών και εκχύλιση των ουσιών

Η αναπαραγωγή της μεθόδου των Lopez et al. (2007) στο εργαστήριο παρουσίασε δυσκολίες καθώς παρατηρήθηκε πήξη του δείγματος κατά τη θέρμανσή του, με αποτέλεσμα η απόδοση της μεθόδου να μην είναι ικανοποιητική. Για το λόγο αυτό προστέθηκε στη διαδικασία ένα βήμα που περιελάμβανε τη προσθήκη ACN και φυγοκέντρηση για τη κατακρήμνιση πρωτεϊνών και εκχύλιση των ουσιών.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα με σκοπό την εύρεση της καταλληλότερης αναλογίας ακετονιτριλίου (ACN). Αναλυτικότερα:

- Πείραμα (Π1): Σε 0,5 ml ορού προστέθηκαν 1,5 ml H₂O, 20 μ L Pesticide Standard Mix+HCB (1 μ g/ml) και 20 μ L PCB's (100ng/ml). Αρχικά, αναδεύτηκαν μόνο στο vortex, έγινε HS-SPME στους 85 °C για 30 min και έπειτα έγχυση δείγματος στον εισαγωγέα δείγματος.

- Πείραμα (Π2): Σε 0,5 ml ορού προστέθηκε 0,5ml H₂O, 1ml ACN, 20 μL Pesticide Standard Mix+HCB (1μg/ml) και 20μL PCB's (100ng/ml). Αρχικά, αφού αναδεύτηκαν στο vortex φυγοκεντρήθηκαν στους 25°C με 3000 rpm για 3 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αραιώθηκε 1/10 σε νερό, έπειτα έγινε HS-SPME στους 85 °C για 30 min και μετά έγχυση δείγματος στον εισαγωγέα δείγματος.
- Πείραμα (Π3): Σε 0,5ml ορού προστέθηκε 0,5ml ACN, 20 μL Pesticide Standard Mix+HCB (1μg/ml) και 20 μL PCB's (100ng/ml). Αρχικά, αφού αναδεύτηκαν στο vortex φυγοκεντρήθηκαν στους 25°C με 3000 rpm για 3 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αραιώθηκε 1/4 (0,5ml υπερκείμενο και 1,5 ml νερό), έπειτα έγινε HS-SPME στους 85 °C για 30 min και μετά δείγματος στον εισαγωγέα δείγματος.

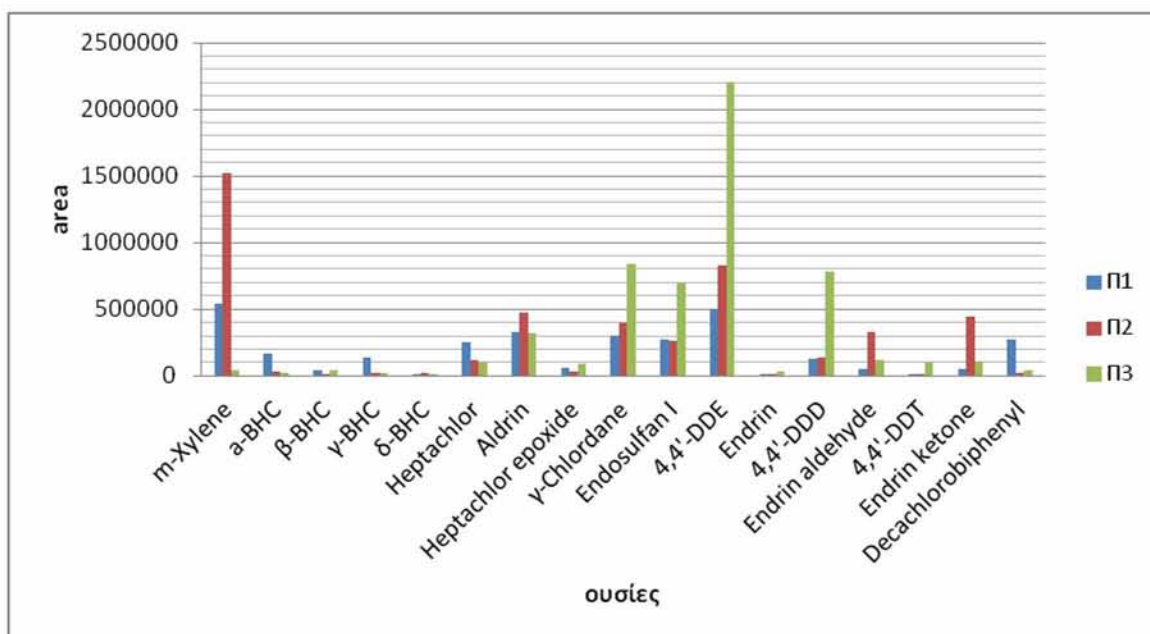
Τα αποτελέσματα των τριών πειραμάτων παρουσιάζονται στον **πίνακα 13**.

A/A	ουσία	Χαρακτηριστικό ιόν	χρόνος	Π1 area	Π2 area	Π3 area
1	m-Xylene	207	12.93	543103	1524962	36849
2	a-BHC	181, 219	14.13	164016	34053	24832
3	β-BHC	181, 219	14.98	41353	16238	42085
4	γ-BHC	183, 219	15.16	140095	22678	26040
5	δ-BHC	181, 219	15.93	15656	20408	5583
6	Heptachlor	272, 337	17.53	247616	120269	98428
7	Aldrin	263, 293	18.69	331851	473826	323239
8	Heptachlor epoxide	151, 263	20.07	62195	26471	85250
9	γ-Chlordane	373	20.9	304011	395511	836536
10	Endosulfan I	241, 373	21.26	270656	259163	691309
11	α-Chlordane	373	21.38	Not detected	Not detected	Not detected
12	4,4'-DDE	246, 318	22.22	501378	826550	2199277
13	Dieldrin	263, 277	20.32	Not detected	Not detected	Not detected
14	Endrin	263, 280	22.97	13100	4482	32137
15	Endosulfan II	195, 241	23.25	6120	Not detected	Not detected
16	4,4'-DDD	165, 235	23.68	126977	133431	781962
17	Endrin aldehyde	281, 345	21.95	47035	331251	119511
18	Endosulfan Sulfate	272, 387	24.8	Not detected	Not detected	Not detected
19	4,4'-DDT	165, 235	24.99	8664	11377	99847
20	Endrin ketone	281, 317	24.4	49369	445943	111710

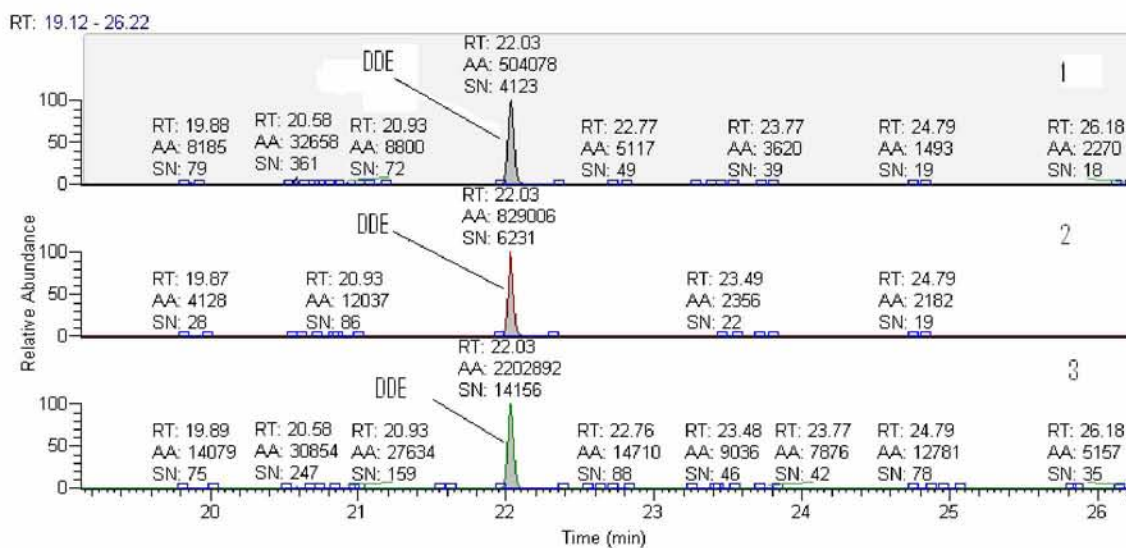
21	Methoxychlor	227	26.99	4362	Not detected	17675
22	Decachlorobiphenyl	498	32.84	268928	17914	43884

Πίνακας 13: Αποτελέσματα για τα τρία πειράματα που διεξήχθησαν

Από τη σύγκριση των πειραμάτων (όπως φαίνεται και στο διάγραμμα) διαπιστώνεται ότι το Π3 δίνει καλύτερα αποτελέσματα για τις περισσότερες ουσίες (**διάγραμμα 1**). Χαρακτηριστικό παράδειγμα, αποτελεί το DDE, όπου φαίνεται ότι στο Π3 υπάρχει πολύ μεγαλύτερο area και S/N. (**εικόνα 31**)



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) της κάθε ουσίας σε κάθε πείραμα



Εικόνα 31: Σύγκριση χρωματογραφημάτων για την ουσία DDE των τριών πειραμάτων

Επίδραση διαφορετικής ταχύτητας φυγοκέντρωσης

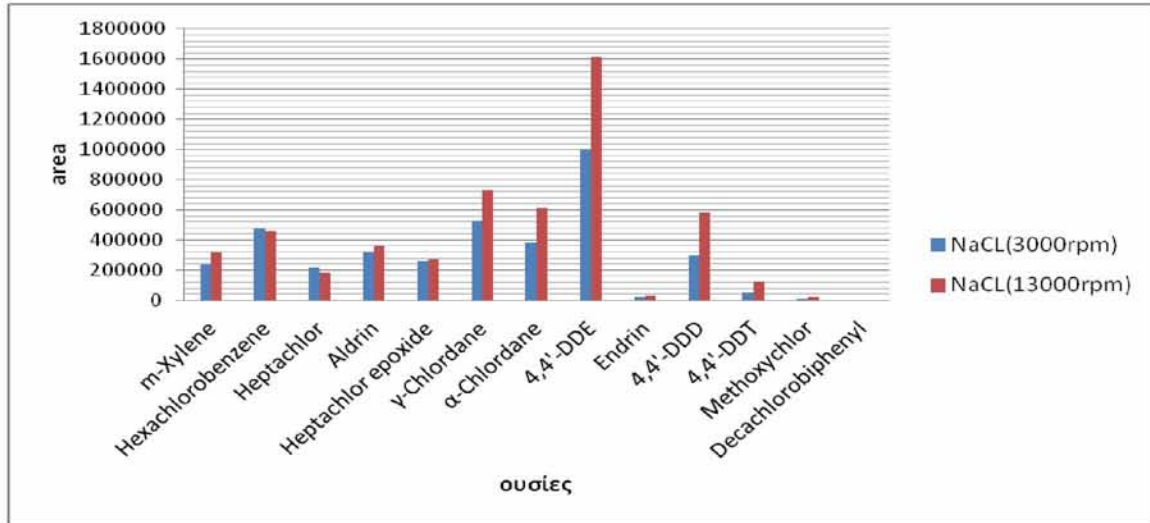
Δέουσας σημασίας ήταν η ταχύτητα της φυγοκέντρωσης, όπου τα αποτελέσματα αποδείχθηκαν να είναι σαφώς καλύτερα σε μεγαλύτερη ταχύτητα. Εκτελέστηκαν δύο πειράματα με τη διαφορά ότι το ένα περιείχε διάλυμα άλας KH_2PO_4 (0.1M) και το άλλο διάλυμα NaCl (1M). Έτσι,

- (Π4): τοποθετήθηκαν σε 0,5ml ορό, 0,5ml ACN, 20μL Pesticide Standard Mix+HCB (1μg/ml), 20μL PCB's (100ng/ml), τα οποία αφού αναδεύτηκαν στο vortex φυγοκεντρήθηκαν στους 25°C με 3000 rpm για 3 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αραιώθηκε 1/4 (0,5ml υπερκείμενο και 0,5 ml νερό και 1 ml KH_2PO_4) και έτσι παρασκευάστηκε διάλυμα 10ng/ml. Έπειτα έγινε HS-SPME στους 85 °C για 30 min και τέλος έγχυση του δείγματος στον εισαγωγέα δείγματος.
- (Π5): τοποθετήθηκαν σε 0,5ml ορό, 0,5ml ACN, 20μL Pesticide Standard Mix+HCB (1μg/ml), 20μL PCB's (100ng/ml), τα οποία αφού αναδεύτηκαν στο vortex φυγοκεντρήθηκαν στους 25°C με 3000 rpm για 3 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αραιώθηκε 1/4 (0,5ml υπερκείμενο και 0,5 ml νερό και 1 ml NaCl) και έτσι παρασκευάστηκε διάλυμα 10ng/ml. Έπειτα έγινε HS-SPME στους 85 °C για 30 min και τέλος έγχυση του δείγματος στον εισαγωγέα δείγματος.

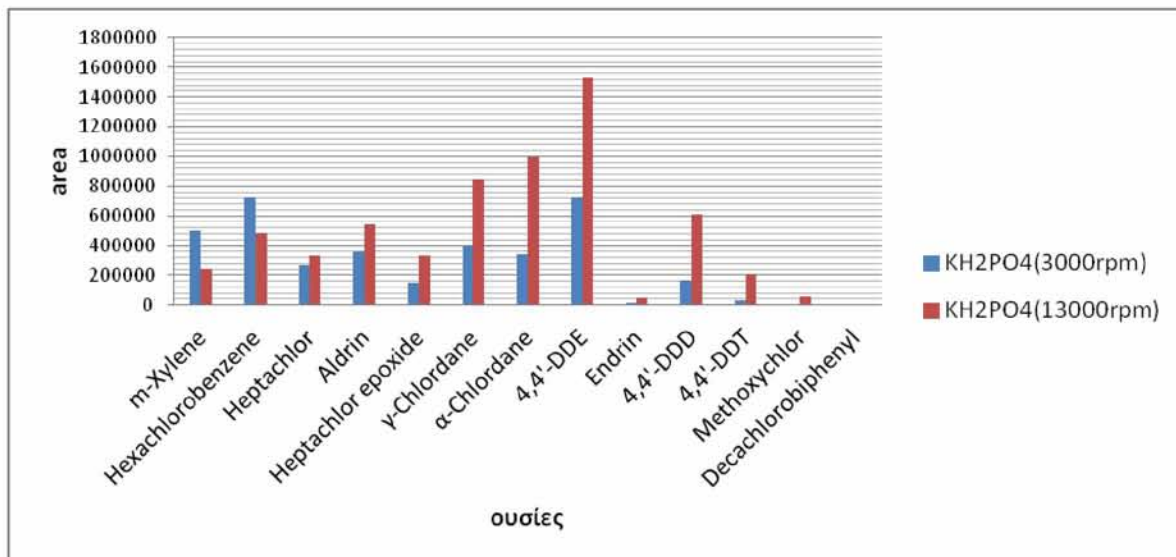
Τα δύο πειράματα φυγοκεντρήθηκαν σε δύο διαφορετικές ταχύτητες για να βρεθεί η ταχύτητα που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Αρχικά, και για τα δυο πειράματα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 3000rpm, έπειτα και για τα δυο πειράματα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στα 13000 rpm. Το κάθε πείραμα

συγκρίθηκε και στις δύο ταχύτητες φυγοκέντρησης και παρατηρήθηκε πως τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα στα 13000 rpm της φυγοκέντρησης.(διάγραμμα 2, 3)

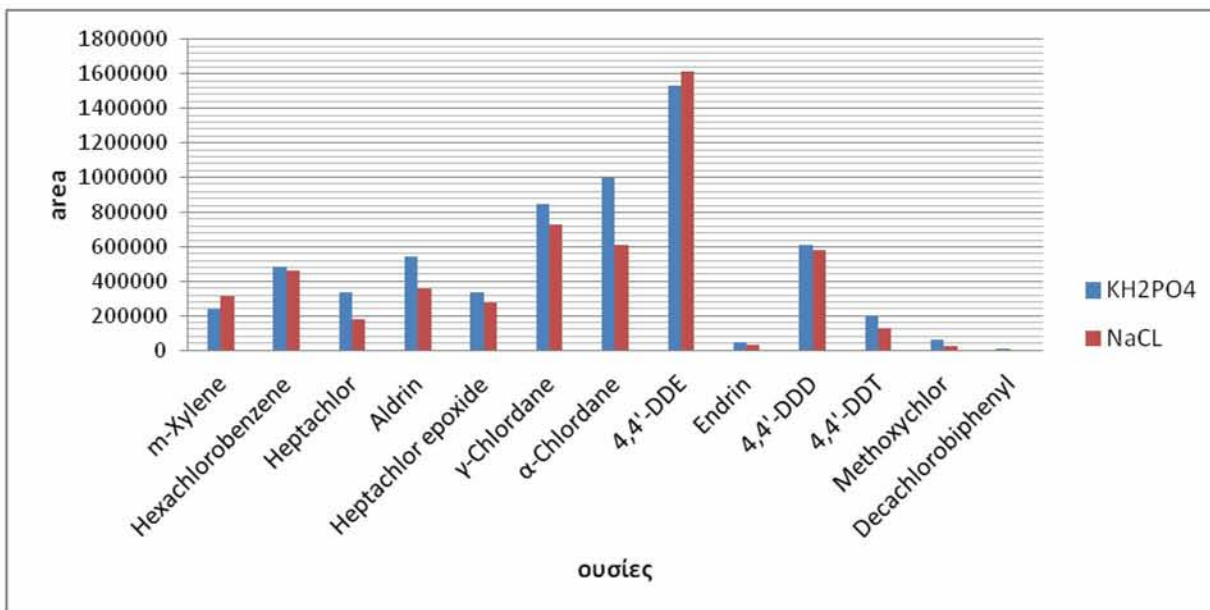
Τέλος, έγινε και μια σύγκριση ανάμεσα στα δύο διαλύματα αλάτων με τις ίδιες στροφές στη φυγοκέντρηση και τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα για τις περισσότερες ουσίες με τη προσθήκη KH_2PO_4 στα 13000 rpm.(διάγραμμα 4)



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων με προσθήκη NaCl σε διαφορετικά rpm φυγοκέντρησης



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων με προσθήκη KH_2PO_4 σε διαφορετικά rpm φυγοκέντρησης



Διάγραμμα 4: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων με διαφορετικά άλατα αλλά στα ίδια 13000 rpm φυγοκέντρησης

Επίδραση προσθήκης διαλύματος άλατος ΚΗ₂ΡΟ₄(0,1Μ)

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις, επειδή είναι αδιάλυτες στο νερό ίθισται να εκχυλίζονται καλύτερα μέσω του φαινομένου της εξαλάτωσης. Για να δούμε κατά πόσο επιδρά θετικά στα αποτελέσματα η προσθήκη διαλύματος άλατος, εκτελέστηκαν δύο πειράματα, ένα χωρίς προσθήκη διαλύματος άλατος ΚΗ₂ΡΟ₄ και ένα με προσθήκη άλατος. Αναλυτικότερα:

- (Π6): τοποθετήθηκαν σε 0,5ml ορό, 0,5ml ACN, 20μL Pesticide Standard Mix+HCB (1μg/ml), 20μL PCB's (100ng/ml), τα οποία αφού αναδεύτηκαν στο vortex έπειτα φυγοκεντρήθηκαν στους 25°C με 3000 rpm για 3 min. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο αραιώθηκε 1/4 (0,5ml υπερκείμενο και 1,5 ml νερό) και έτσι παρασκευάστηκε διάλυμα 10 ng/ml. Έπειτα, έγινε HS-SPME στους 85 °C για 30 min και έπειτα έγινε έγχυση δείγματος στον εισαγωγέα δείγματος.
- (Π7): τοποθετήθηκαν σε 0,5ml ορό, 0,5ml ACN, 20μL Pesticide Standard Mix+HCB (1μg/ml), 20μL PCB's (100ng/ml), τα οποία αφού αναδεύτηκαν στο vortex φυγοκεντρήθηκαν στους 25°C με 3000 rpm για 3 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο αραιώθηκε 1/4 (0,5ml υπερκείμενο και 0,5 ml νερό και 1 ml ΚΗ₂ΡΟ₄) και έτσι παρασκευάστηκε διάλυμα 10ng/ml. Έπειτα έγινε HS-SPME

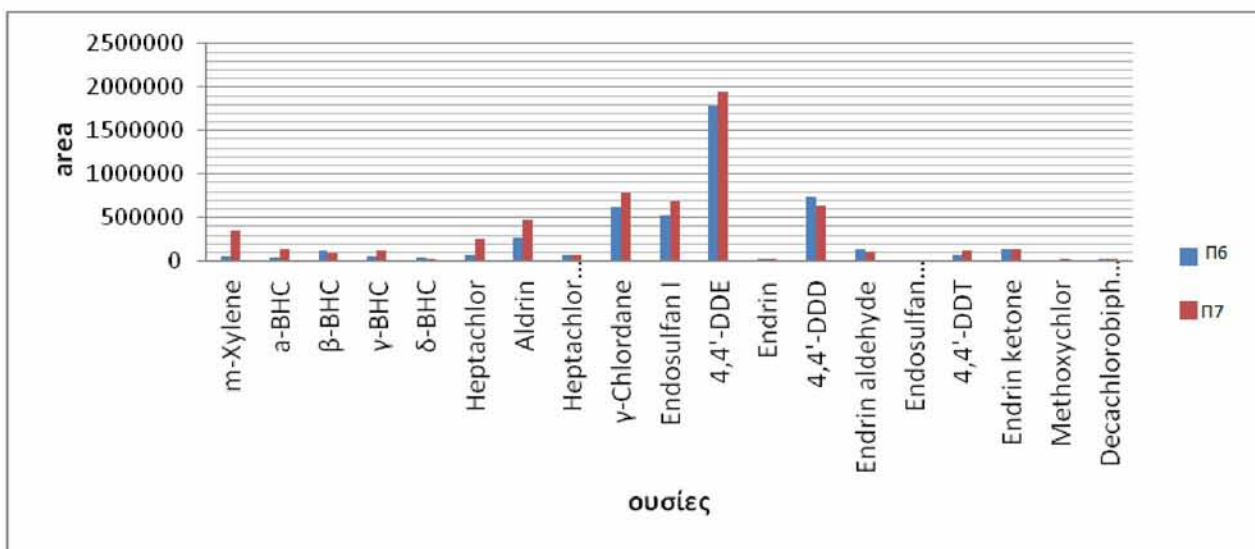
στους 85 °C για 30 min και τέλος έγχυση του δείγματος στον εισαγωγέα δείγματος.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων φαίνονται στον ακόλουθο **πίνακα 14**.

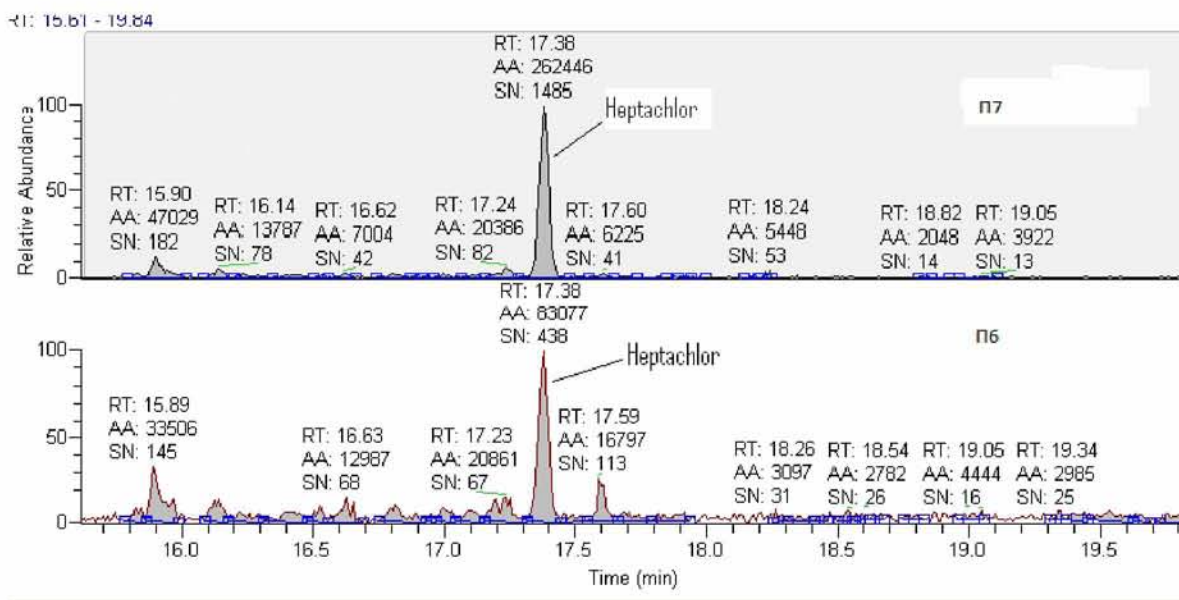
A/A	ουσία	Χαρακτηριστικό ιόν	χρόνος	Π6 area	Π7 area	Π7/Π6
1	m-Xylene	207	12.93	64964	344020	5.30
2	a-BHC	181, 219	14.13	40776	137303	3.37
3	β-BHC	181, 219	14.98	120029	87352	0.73
4	γ-BHC	183, 219	15.16	55347	120137	2.17
5	δ-BHC	181, 219	15.93	41051	21019	0.51
6	Heptachlor	272, 337	17.53	81500	259600	3.19
7	Aldrin	263, 293	18.69	267900	477800	1.78
8	Heptachlor epoxide	151, 263	20.07	69350	80700	1.16
9	γ-Chlordane	373	20.9	631700	782300	1.24
10	Endosulfan I	241, 373	21.26	526900	690400	1.31
11	α-Chlordane	373	21.38	Not detected	Not detected	-
12	4,4'-DDE	246.318	22.22	1785900	1949000	1.09
13	Dieldrin	263, 277	20.32	Not detected	Not detected	-
14	Endrin	263, 280	22.97	24300	33000	1.36
15	Endosulfan II	195, 241	23.25	Not detected	7763	-
16	4,4'-DDD	165, 235	23.68	738000	635700	0.86
17	Endrin aldehyde	281, 345	21.95	139000	110000	0.79
18	Endosulfan Sulfate	272, 387	24.8	1336	2572	1.93
19	4,4'-DDT	165, 235	24.99	70000	131000	1.87
20	Endrin ketone	281, 317	24.4	134800	136103	1.01
21	Methoxychlor	227	26.99	11000	24000	2.18
22	Decachlorobiphenyl	498	32.84	30000	21000	0.70

Πίνακας 14: Αποτελέσματα πειραμάτων

Στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 5) φαίνεται ότι το Π7 με τη προσθήκη KH_2PO_4 είναι ελαφρώς καλύτερο από το Π6 και βγάζει καλύτερα αποτελέσματα. Αυτό φαίνεται χαρακτηριστικά και από το παρακάτω χρωματογράφημα, όπου για το Heptachlor υπάρχει πολύ καλύτερο area και S/N (εικόνα 32).



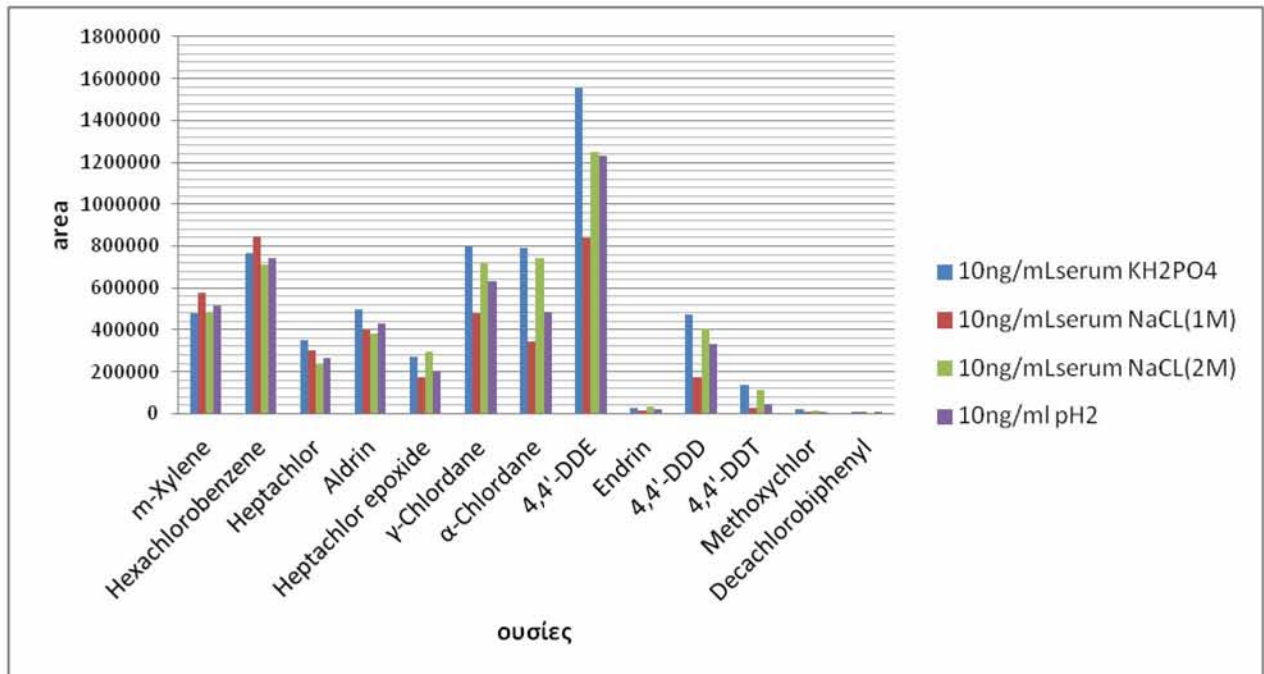
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων Π6 & Π7 με προσθήκη KH_2PO_4



Εικόνα 32: Σύγκριση χρωματογραφημάτων στα δύο πειράματα για το Heptachlor

Επίδραση pH

Για να ελεγχθεί η επίδραση του pH εκτελέστηκαν πειράματα (σύμφωνα με το πείραμα Π7). Παρασκευάστηκαν διαλύματα ορού 10 ng/ml με αντικατάσταση μόνο του ρυθμιστικού διαλύματος άλατος κάθε φορά, έτσι ώστε να βρεθεί το διάλυμα άλατος που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Παράλληλα, η ταχύτητα φυγοκέντρωσης διατηρήθηκε σταθερή στα 13000 rpm μιας και παραπάνω διαπιστώθηκε ότι στα 13000 rpm τα αποτελέσματα είναι συγκριτικά καλύτερα. Έτσι, έγιναν δοκιμές: α) με προσθήκη buffer NaH_2PO_4 pH=2, β) με προσθήκη NaCl (1M) pH=7, γ) με προσθήκη NaCl (2M) pH=7 και δ) με προσθήκη KH_2PO_4 (1M) pH=6. Για το KH_2PO_4 (1M) δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αξιοσημείωτη διαφορά με το KH_2PO_4 (0,1M). Έτσι συγκρίθηκαν τα πειράματα μεταξύ του buffer NaH_2PO_4 , NaCl (2M), KH_2PO_4 (0,1M) και NaCl (1M) και το συμπέρασμα είναι ότι με τη προσθήκη του KH_2PO_4 (0,1M) τα αποτελέσματα για τις περισσότερες ουσίες είναι καλύτερα. **(διάγραμμα 6)**

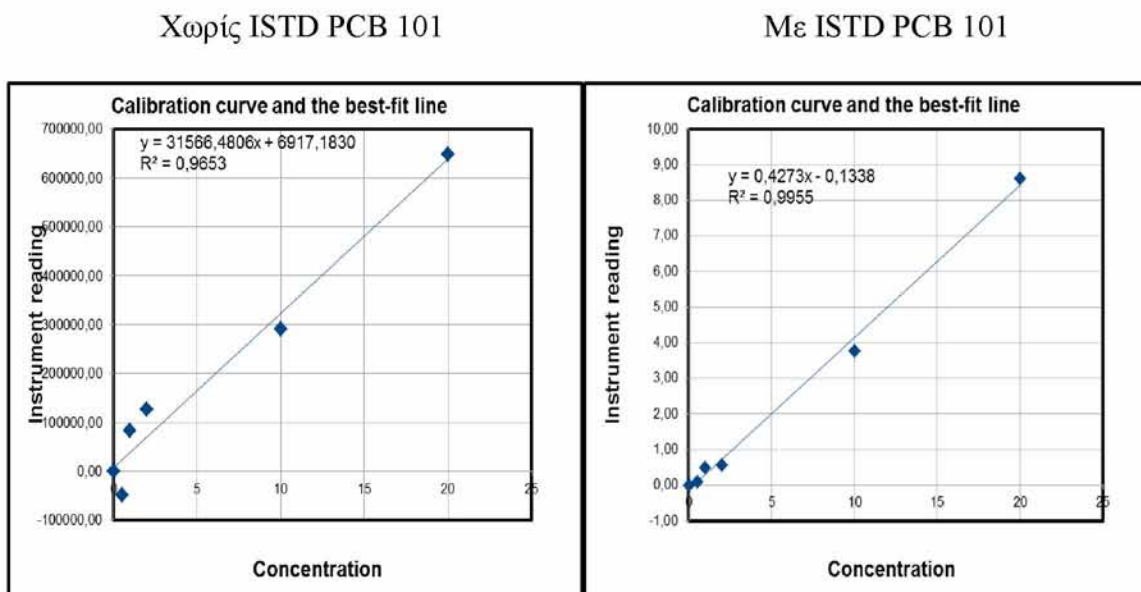


Διάγραμμα 6: Διάγραμμα σύγκρισης των αποτελεσμάτων (area) των πειραμάτων με προσθήκη buffer NaH_2PO_4 pH=2, NaCl (2M) pH=7, KH_2PO_4 (0,1M) pH=6 και NaCl (1M) pH=7

Επίδραση ISTD (Internal Standard)

Προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο το ISTD βελτιώνει τα αποτελέσματα εκτελέστηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης (blank, 0.5 ng/ml, 1ng/ml, 2.5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml), στην οποία παρατηρήθηκε ότι ρυθμίζοντας στο πρόγραμμα το ISTD (Internal Standard) – PCB 101 η καμπύλη βαθμονόμησης βελτιώθηκε εξαιρετικά για τις περισσότερες ουσίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στην **εικόνα 33** είναι η καμπύλη για το DDE. Παρατηρούμε ότι με το ISTD η καμπύλη βαθμονόμησης βελτιώθηκε αρκετά, αλλά δε περνάει από το σημείο 0. Αυτό συμβαίνει γιατί στους συνεννωμένους ορούς αίματος (pooled serum) υπάρχει ήδη ποσότητα DDE.

Σε αυτό το σημείο μπορούμε να αναφέρουμε τη σημαντικότητα της προσθήκης των IST (Internal Standards), η οποία αποδεικνύεται ότι βελτιώνει σημαντικά τα όποια σφάλματα προκύπτουν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, τόσο κατά την προεπεξεργασία των δειγμάτων όσο και κατά την χρωματογραφική ανάλυση αυτών.



Εικόνα 33: Διόρθωση καμπύλης με Internal Standard

3.4) Ενόργανη Ανάλυση των δειγμάτων με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών

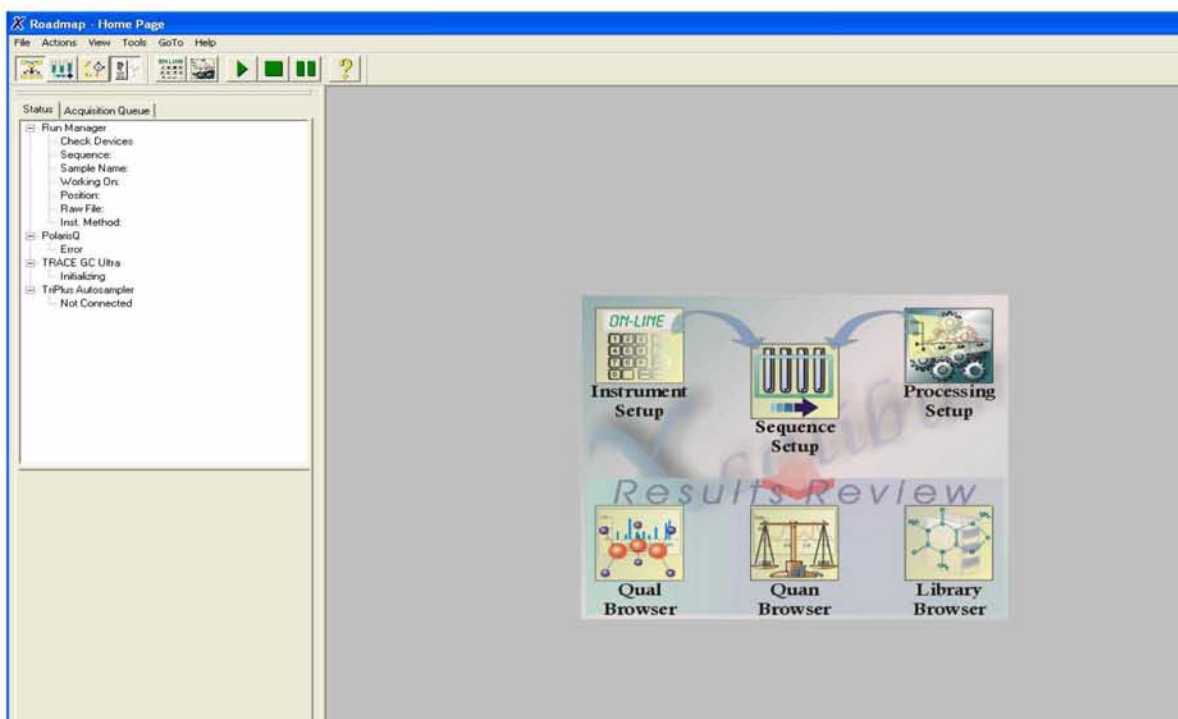
Στην Ενόργανη Ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών με την εξής χαρακτηριστική οργανολογία:

- Σύστημα αέριου χρωματογράφου – φασματογράφου μάζας (GC/MS/MS Finnigan Trace GC Ultra/Polaris – Quadrupole Ion Trap GC/MS system με split/splitless και PTV εισαγωγέα δείγματος και χημικό ιονισμό)
- Τριχοειδή στήλη αέριας χρωματογραφίας (Alltech, AT-5ms, 30 x 0,25mmx 0,25 um, HELIFLEXCAP)
- Fiber Assembly Used With SPME Holders 57331 and 57347-U

Αρχικά, εισάγεται το δείγμα στο χρωματογράφο. Η συσκευή του υποδοχέα της ίνας, εισέρχεται στη κατάλληλη θύρα του χρωματογράφου και κατόπιν η ίνα εκτίθεται. Η θερμοκρασία της θύρας (270°C) καθώς και τα βήματα της ανάλυσης έχουν προηγουμένως προγραμματιστεί. Ο ρυθμιστής βάθους περιστρέφεται κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού, έτσι ώστε η εξωτερική βελόνα να εισέλθει εντός της θύρας του χρωματογράφου στο επιθυμητό βάθος των 25mm. Στη συνέχεια, ο μοχλός καταβύθισης πιέζεται και περιστρέφεται κατά τη φορά των δεικτών του ρολογιού έτσι ώστε η βίδα συγκράτησης να έρθει στο αριστερό άκρο της οριζόντιας εσοχής. Κατ' αυτόν τον τόπο και πολύ προσεκτικά, η ίνα εκτίθεται και αρχίζει η εκρόφιση των ουσιών που είχαν προηγουμένως προσροφηθεί στην ίνα. Μετά το πέρας του χρόνου εκρόφισης των ουσιών από την ίνα (αναμονή 10 λεπτά εντός της θύρας) κατά τον ίδιο τρόπο εξέρχεται προσεκτικά η βελόνα από την θύρα έγχυσης αφού πρώτα έχει ανακληθεί η ίνα εντός της βελόνας.

3.4.1) Συνθήκες διεξαγωγής ανάλυσης του GC/MS.

Πριν τη χρωματογραφική ανάλυση απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών του GC-MS, έτσι ώστε να λαμβάνονται τα βέλτιστα αποτελέσματα κατά την ανάλυση. Από το λογισμικό του XCalibur [48] και από την επιλογή (Ρύθμιση του οργάνου – Instrument Setup) προσαρμόζονται καταλλήλως οι συνθήκες του GC (Trace GC Ultra) καθώς και οι συνθήκες για το MS (PolarisQ) (Home Page) (εικόνα 34).

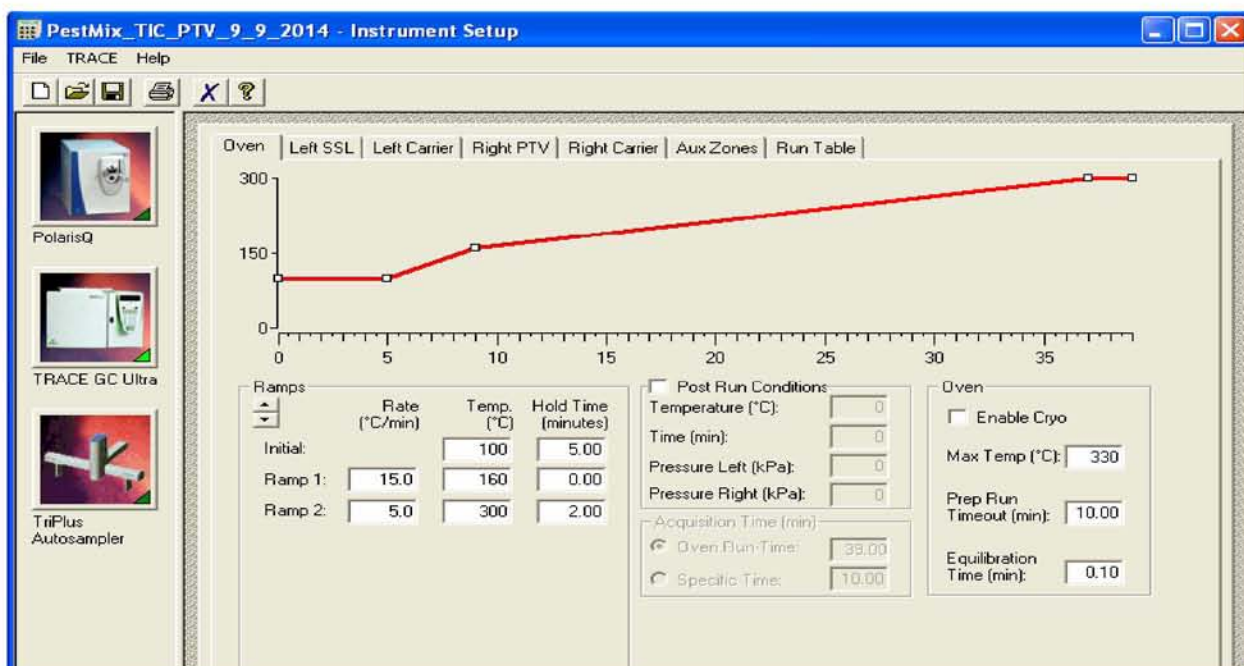


Εικόνα 34: Roadmap - Home Page

Για το βέλτιστο διαχωρισμό των αναλυτών επιλέχτηκαν πειραματικά προγράμματα, όπως πρόγραμμα θέρμανσης για το φούρνο στήλης, πρόγραμμα για τον εισαγωγέα του δείγματος, πρόγραμμα για τη ροή αερίων, καθώς και πρόγραμμα για τις συνθήκες του ανιχνευτή μαζών για τη βέλτιστη ανίχνευση και ταυτοποίησή τους. Ρυθμιζόταν δηλαδή η μεθοδολογία που ακολουθούσε το GC-MS.

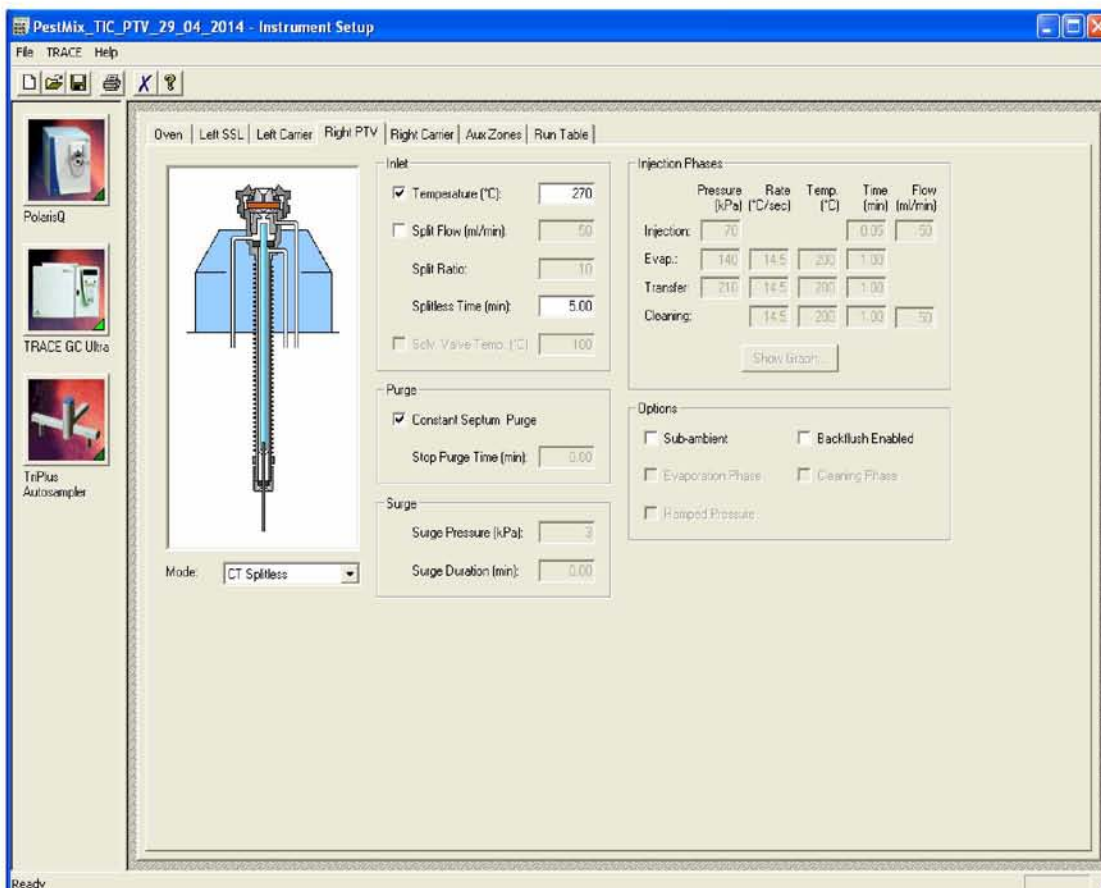
Το πρόγραμμα θέρμανσης του φούρνου της στήλης αποτελείται από 4 στάδια: (εικόνα 35)

- Ισόθερμη κατάσταση στους 100 °C για 5 λεπτά.
- Θέρμανση της στήλης από 100 -160 °C με ρυθμό 15 °C/min και έπειτα
- Θέρμανση της στήλης με ρυθμό 5 °C/min έως τους 300 °C,
- Συντήρηση στους 300 βαθμούς για 2 λεπτά και επιστροφή στις αρχικές συνθήκες.



Εικόνα 35. Πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου στηλης του GC σε φύλο εργασίας XCalibur.

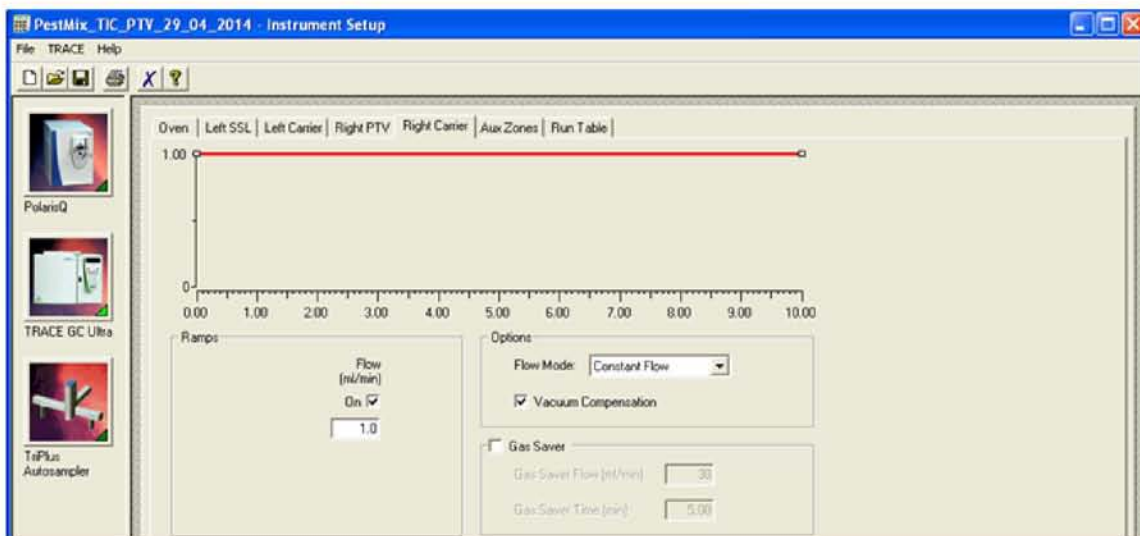
Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το πρόγραμμα για τον εισαγωγέα δείγματος PTV (εικόνα 36). Ως θερμοκρασία εισόδου ορίστηκε 270°C, mode:CTSplitless (Σταθερή θερμοκρασία – ισοθερμική – splitless βαλβίδα. Η split διέξοδος είναι κλειστή κατά τη διάρκεια της έγχυσης για να οδηγήσει το μεγαλύτερο μέρος του δείγματος μέσα στη στήλη. Έτσι, επικεντρωθήκαμε στη διάλυση των πιο πτητικών ενώσεων).



Εικόνα 36: Πρόγραμμα για τον εισαγωγή δείγματος PTV.

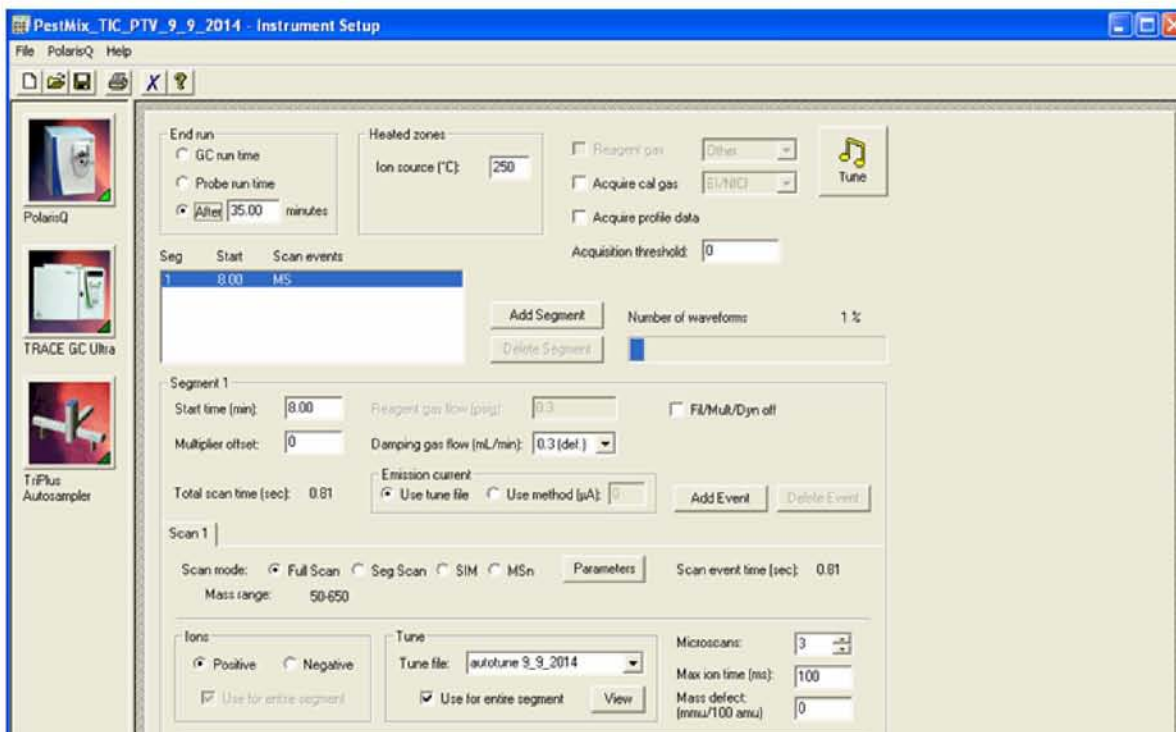
Το αέριο που χρησιμοποιείται ως κινητή φάση στην αέρια χρωματογραφία καλείται «φέρων αέριο». Είναι αυτό που μεταφέρει το μίγμα της αναλυόμενης ουσίας και ρέει διαμέσου της στήλης GC με συγκεκριμένο ρυθμό. Συνήθως, μετράται είτε ως μια γραμμική ταχύτητα (cm/s), είτε ως ένα ποσοστό ροής (ml/min).

Στο πρόγραμμα του φέροντος αερίου (εικόνα 37) διατηρήθηκε σταθερή ροή (flow 1.0ml/min). Η σταθερή ροή του φέροντος αερίου αντισταθμίζει την μεταβολή του ιξώδους του αερίου λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας. Με αυτή τη ρύθμιση, η πίεση εισόδου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια μιας αναλυτικής μεθόδου έτσι ώστε να διατηρηθεί η ροή του αερίου σε μια καθορισμένη ταχύτητα .



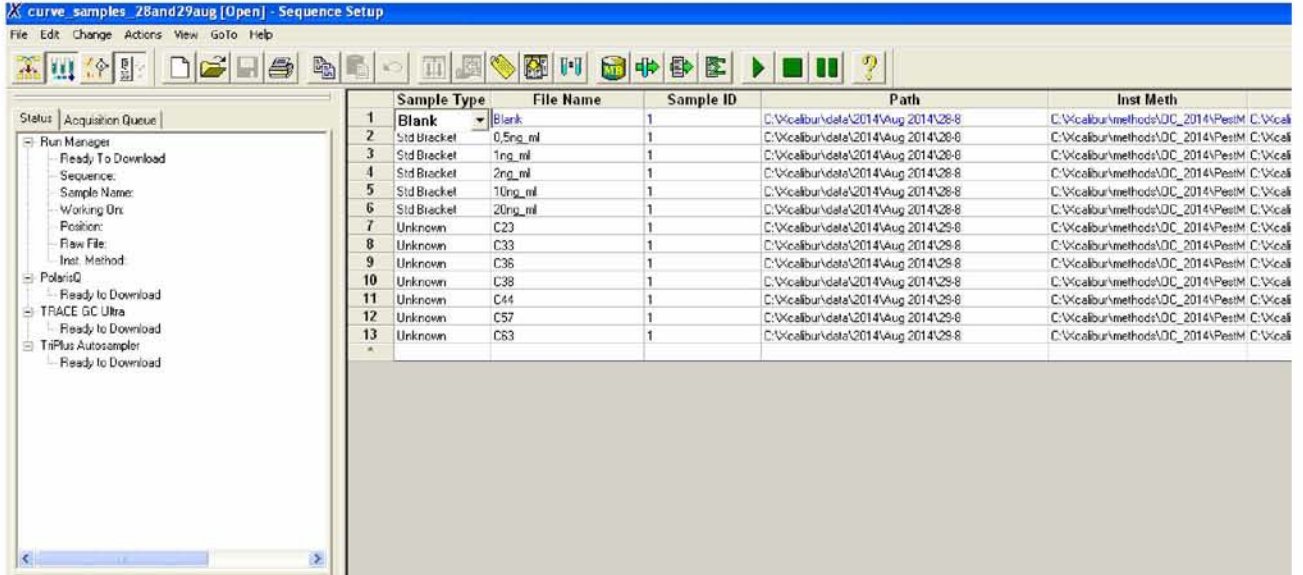
Εικόνα 37: Πρόγραμμα φέροντος αερίου

Τέλος, ρυθμίστηκαν από το πρόγραμμα για το MS οι συνθήκες και οι παράμετροι παραλαβής των φασμάτων μαζών για τις αναλυόμενες ουσίες. (εικόνα 38) Η παραλαβή των δεδομένων έγινε με συνθήκες πλήρης σάρωσης (full scan) θετικών ιόντων (positive ion) σε περιοχή μαζών 50-650Da ξεκινώντας μετά από 8 λεπτά της έναρξης της ανάλυσης και ολοκληρώνοντας σε 35 λεπτά.



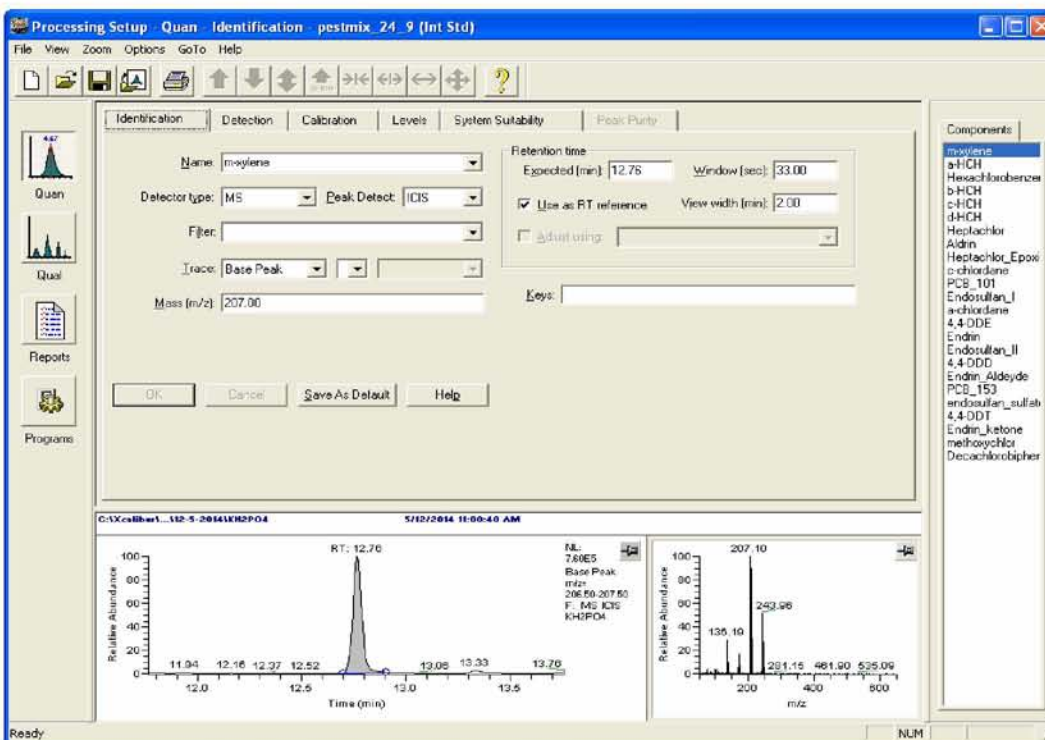
Εικόνα 38: Συνθήκες και παράμετροι παραλαβής φασμάτων μαζών για τις αναλυόμενες ουσίες

Στη συνέχεια, από το “Sequence Setup” του λογισμικού δημιουργήθηκε ένα αρχείο “sequence”, όπου αρχικά επιλεγόταν ο τύπος του δείγματος (SampleType) ανάλογα με τη χρωματογραφική ανάλυση κάθε φορά. Έτσι, επιλεγόταν Std. Bracket για τα πρότυπα δείγματα της καμπύλης βαθμονόμησης, Blank για το τυφλό, και Unknown για τα άγνωστα δείγματα. Στη συνέχεια οριζόταν ο φάκελος όπου και αποθηκευόταν το αρχείο στη βάση δεδομένων μέσα από την επιλογή (Path) και τέλος επιλεγόταν η μέθοδος που ακολουθούσε το πρόγραμμα (Instr. Method). (εικόνα 39)

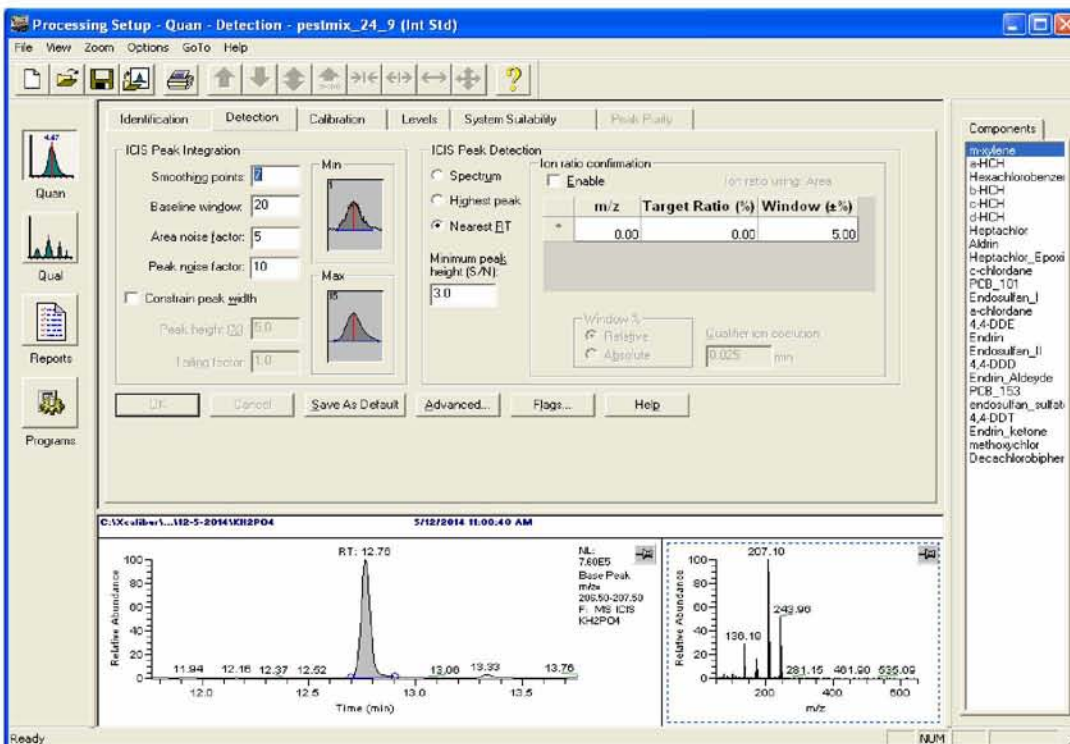


Εικόνα 39: Δημιουργία Sequence αρχείου

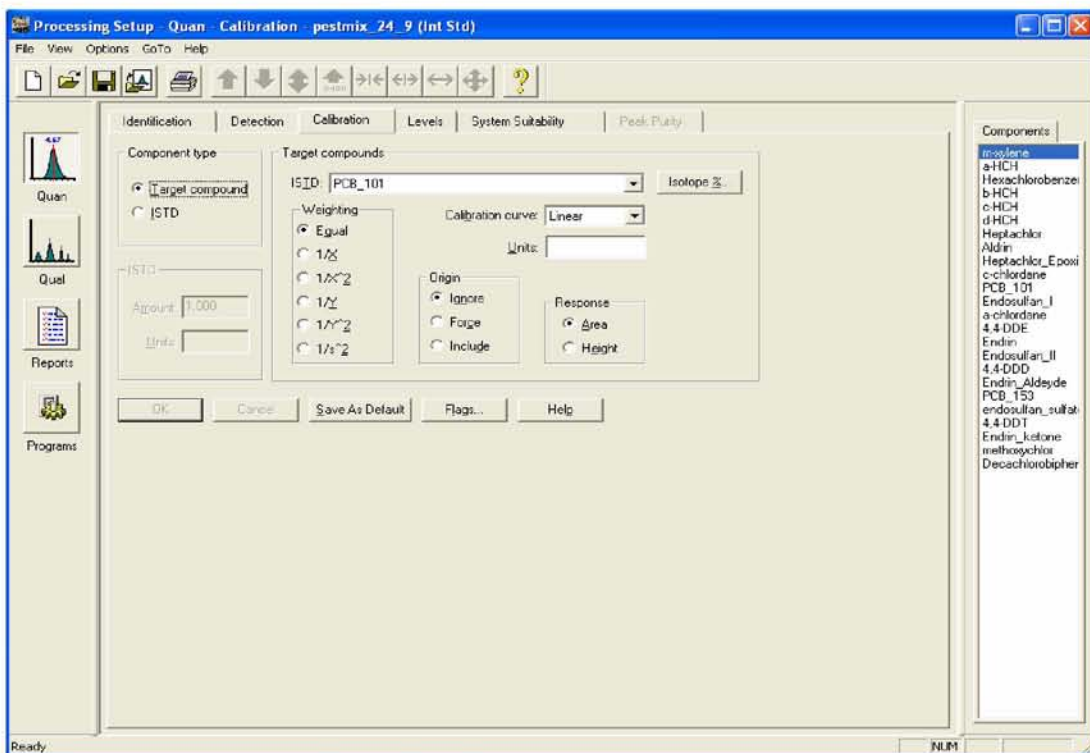
Με το “Processing Setup” ρυθμίζονταν οι συνθήκες του Quan Browser για την αυτοματοποιημένη παραλαβή των δεδομένων σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιαζόταν στο Qual Browser (π.χ επιλέγοντας τη ταυτοποίηση «Identification» δίνεται όνομα στη προσδιοριζόμενη ουσία, ρυθμίζεται ο αναμενόμενος χρόνος παραλαβής αυτής, ο τύπος του ανιχνευτή, το m/z κ.α.).(εικόνα 40, 41, 42, 43, 44) Με το τρόπο αυτό, στο τέλος παραλαμβάνονταν ένα αρχείο Quan.



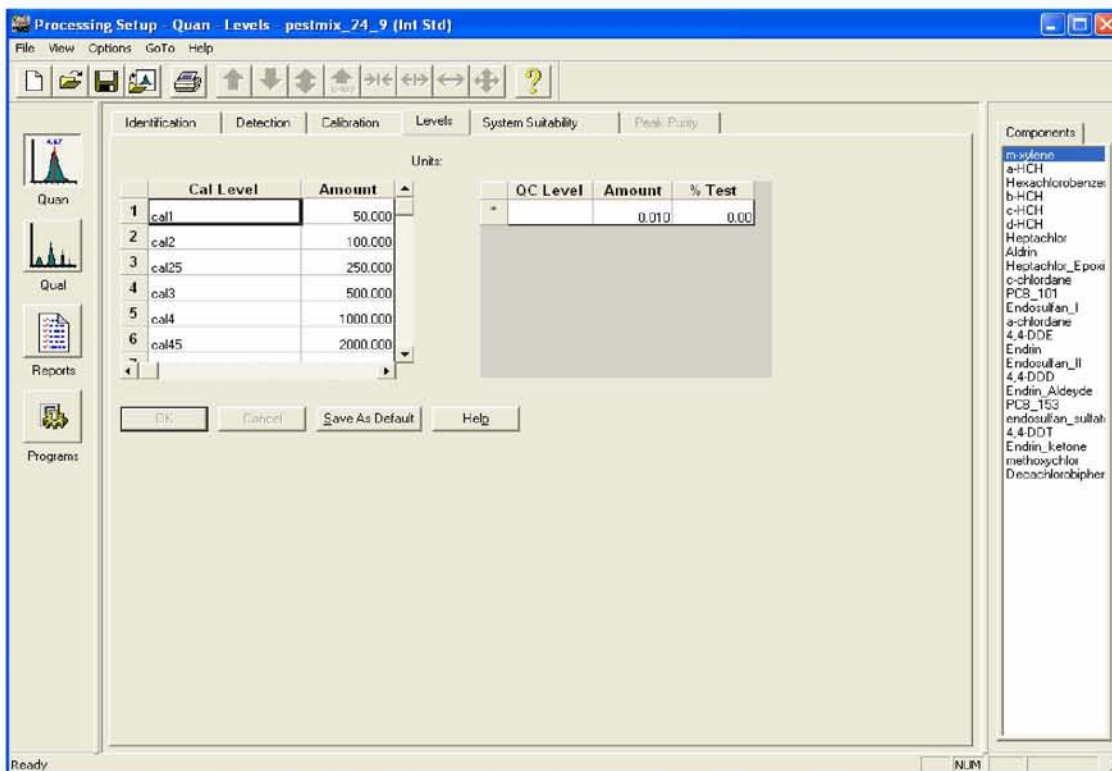
Εικόνα 40: Για τη ταυτοποίηση ορίζεται το όνομα της προσδιοριζόμενης ουσίας, ο τύπος του ανιχνευτή, η κορυφή ανίχνευσης, τα χαρακτηριστικά ιόντα και ο αναμενόμενος χρόνος παραλαβής της ουσίας.



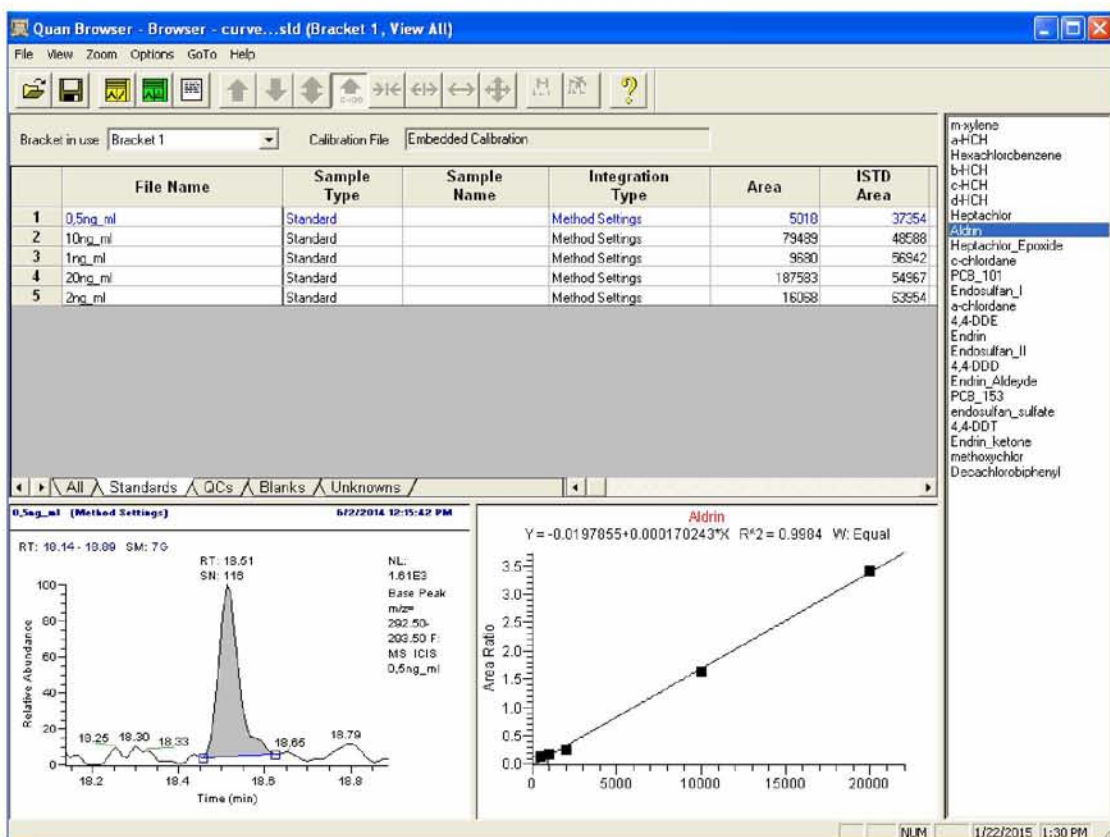
Εικόνα 41: Για τον προσδιορισμό ορίζονται κυρίως τα σημεία εξομάλυνσης (smoothing points), το μικρότερο ύψος της κορυφής (S/N), ανίχνευση της κορυφής με βάση το κοντινότερο χρόνο.



Εικόνα 42: Για τη βαθμονόμηση επιλέγεται η ουσία στόχος, το Internal Standard (ISTD) και η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης



Εικόνα 43: Επιλέγονται τα επίπεδα για τη καμπύλη βαθμονόμησης με τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις

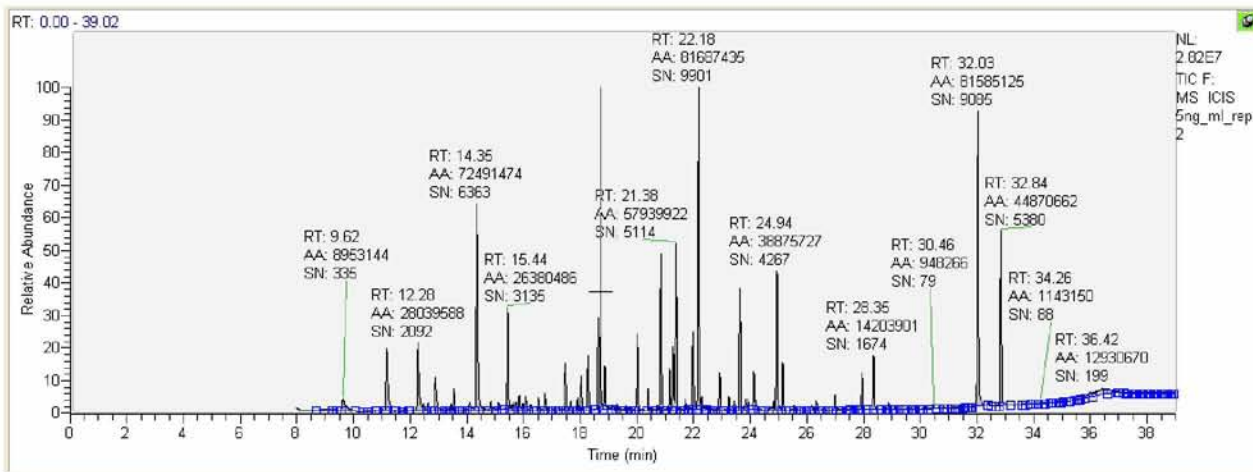


Εικόνα 44: Παραδειγματική απεικόνιση ενός Quan αρχείου

3.4.2) Ανάλυση πρότυπου υδατικού δείγματος για τον προσδιορισμό του χρόνου συγκράτησης των αναλυτών.

Για το προσδιορισμό του χρόνου συγκράτησης των αναλυτών από τη χρωματογραφική στήλη πραγματοποιήθηκε μια ανάλυση πρότυπου υδατικού δείγματος τελικής συγκέντρωσης 5ng/ml. Το χρωματογράφημα ανάλυσης (full scan) για όλες τις ουσίες παρουσιάζεται στην **εικόνα 45**, ενώ στα παραρτήματα αναρτώνται τα χρωματογραφήματα βάση χαρακτηριστικών ιόντων (m/z) της κάθε ουσίας ξεχωριστά καθώς και τα φάσματα μαζών τους. Ο χρόνος έκλυσης της κάθε ουσίας από τη χρωματογραφική στήλη παρουσιάζεται στο **πίνακα 15**.

Εικόνα 45: Χρωματογράφημα ανάλυσης



ουσία	RT (min)
m-Xylene	12,89
a-HCH	14,09
HCB	14,35
c-HCH (Lindane)	15,12
d-HCH	15,90
Heptachlor	17,48
Aldrin	18,05
Heptachlor Epoxide	20,02
Cis-Chlordane	20,85
PCB-101	21,16
Endosulfan I	21,27
DDE	22,18
Endrin	22,91
Endosulfan II	23,26
DDD	23,64
Endrin aldehyde	23,92
PCB-153	24,13
Endosulfan sulfate	24,75
DDT	24,94
Endrin ketone	26,34
Methoxychlor	26,99
Decachlorobiphenyl	32,84

Πίνακας 15: Οι χρόνοι έκλουσης των ουσιών από τη χρωματογραφική στήλη

3.5) Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου, ενώ η επικύρωση της μεθόδου έγινε με το προσδιορισμό της απόδοσής της μέσα από τη γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης.

3.5.1) Μέθοδος Ποσοτικοποίησης

Η ποσοτικοποίηση των ουσιών έγινε με την μέθοδο του εσωτερικού προτύπου (PCB 101). Οι καμπύλες βαθμονόμησης (με συγκεντρώσεις 0.5ng/ml, 1ng/ml, 2ng/ml, 10ng/ml και 20 ng/ml) δημιουργήθηκαν για κάθε ουσία. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκαν με βάση το λόγο σήμα / θόρυβος (signal to noise, S/N) ως εξής:

- $LOD = 3 * S/N$
- $LOQ = 10 * S/N$

Να επισημάνουμε, ότι ως **LOD** (limit of detection) θεωρείται το κατώτερο όριο ανίχνευσης, δηλαδή η μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα ουσίας) που μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα δείγμα. Ως **LOQ** (limit of quantification) θεωρείται το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης, δηλαδή τη μικρότερη συγκέντρωση (ή ποσότητα ουσίας) που μπορεί να αναφερθεί ποσοτικά με ικανοποιητικό βαθμό εμπιστοσύνης. Ενώ, ως S/N (signal to noise) θεωρείται η απόκριση του σήματος σε σχέση με το θόρυβο. [40]

Στο **πίνακα 16** παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης για κάθε ουσία που ανιχνεύθηκε καθώς και οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) της καμπύλης βαθμονόμησης του οργάνου για κάθε ουσία. Να αναφερθεί, ότι βαθμονομήθηκε η περιοχή 0.5-20 ng/ml σειρά πρότυπων διαλυμάτων.

ουσία	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	R^2
Hexachlorobenzene	0,03	0,1	0,9744
Heptachlor	0,04	0,14	0,9977
Heptachlor Epoxide	0,04	0,15	0,9974
c-Chlordane	0,02	0,08	0,9998
a-Chlordane	0,04	0,13	0,9973
4,4-DDE	0,01	0,03	0,9954
4,4-DDD	0,15	0,49	0,9849
4,4-DDT	0,21	0,7	0,9749

Πίνακας 16: Όρια ανίχνευσης για τις ουσίες

Η απόκριση του οργάνου για όλους τους αναλύτες σε αυτή τη περιοχή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκε ήταν γραμμική με συντελεστή συσχέτισης $R^2 > 0,95$ και διακύμανση από 0,9744 (για το hexachlorobenzene) έως 0,9998 (για το c-Chlordane). Στο **πίνακα 17** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά μιας καμπύλης βαθμονόμησης για τις ανιχνεύσιμες ουσίες και οι τυπικές αποκλίσεις αυτών εν συγκρίση με άλλες καμπύλες βαθμονόμησης.

ουσία	(α)	R²	Τυπική απόκλιση για το (α)	Τυπική απόκλιση για το R²
Hexachlorobenzene	0,2386	0,9744	0,071	0,009
a-Chlordane	0,2335	0,9973	0,029	0,004
c-Chlordane	0,2541	0,9998	0,024	0,001
4,4-DDE	0,3875	0,9954	0,040	0,001
Heptachlor	0,0489	0,9977	0,008	0,004
Heptachlor Epoxide	0,0807	0,9974	0,021	0,005
4,4-DDD	0,0943	0,9849	0,047	0,006
4,4-DDT	0,0458	0,9749	0,023	0,021

Πίνακας 17: Χαρακτηριστικά της καμπύλης βαθμονόμησης

3.6) Πρωτόκολλο πειραματικής διαδικασίας για ορό

Από όλες τις παραπάνω δοκιμές καταλήξαμε στο πιο βέλτιστο πείραμα με συγκεκριμένες παραμέτρους για τη προεπεξεργασία των δειγμάτων. Έτσι, στη συνέχεια παρατίθεται ένα πρωτόκολλο της προεπεξεργασίας των δειγμάτων.

A) Πρότυπα διαλύματα

Προετοιμάζονται τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις με προσθήκη μεθανόλης (MeOH) σε φιαλίδια χωρητικότητας 15 ml και με τη χρήση μικροσύριγγας λαμβάνεται η επιθυμητή ποσότητα πρότυπου διαλύματος και διαλύτη προκειμένου να γίνει η προσθήκη με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια. Έτσι, παράγονται τα εξής πρότυπα διαλύματα εργασίας:

- Διάλυμα παρακαταθήκης 1 (1μg/ml Pesticide Standard Mix+HCB)
- Διάλυμα παρακαταθήκης 2 (0,1μg/ml Pesticide Standard Mix +HCB)
- Διάλυμα παρακαταθήκης 3 (1000 ng/mlPCB's με PCB-101 και PCB-153)

Όλα τα διαλύματα παρακαταθήκης διατηρούνται σε θερμοκρασία ψυγείου.

B) Επεξεργασία δειγμάτων για την απομόνωση των αναλυτών με μικροεκχύλιση στερεάς φάσεως

Έπειτα, σε πλαστικά κωνικά σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 2ml προστίθενται 0,5ml ορού, 10 μLPCB's (1000ng/ml) και 500μL οργανικού διαλύτη (acetonitrile). Αναδεύουμε το δείγμα καλά στο vortex και στη συνέχεια το βάζουμε στη φυγόκεντρο στους 25 °C στα 13000 rpm για 5min. Στη συνέχεια, με ένα πλαστικό παστεράκι απομονώνουμε προσεκτικά το υπερκείμενο του φυγοκεντρημένου δείγματος και το τοποθετούμε σε ένα γυάλινο φιαλίδιο χωρητικότητας 4ml. Εκεί προσθέτουμε μετά 0,5 ml υπερκάθαρο νερό και 1ml διάλυμα άλατος KH_2PO_4 (0,1M). Το διάλυμα που παρασκευάζεται είναι έτοιμο να περάσει τώρα στη φάση HS-SPME, αφού πρώτα ρίξουμε μέσα σ' αυτό ένα μικρό αναδευτηράκι και το σφραγίσουμε αεροστεγώς με αλουμινόχαρτο και ένα καπάκι με πλαστικό septum. Το τοποθετούμε στη συσκευή μικροεκχύλισης στερεάς φάσεως για 30 min σε θερμοκρασία περίπου 80 °C. Η ίνα καθ'όλη τη διάρκεια της εκχύλισης εκτείνεται headspace πάνω από το δείγμα. Προσέχουμε κατά τη διάρκεια της εκχύλισης να μην υπερβαίνει η θερμοκρασία τους

85°C γιατί υπάρχει κίνδυνος να βράσει το δείγμα και μαζί με τις πτητικές ουσίες να προσκολληθούν και μη πτητικές ουσίες, οι οποίες θα μας δημιουργήσουν ίσως πρόβλημα κατά τη χρωματογραφική ανάλυση του δείγματος. Επίσης, προσέχουμε ώστε να αναδεύεται συνεχώς το δείγμα με το αναδευτηράκι καθ' όλη τη διάρκεια.

Γ) Ανάλυση GC-MS

Γ1) Συνθήκες αέριου χρωματογράφου Trace GC Ultra

Η θερμοκρασία εισαγωγής του δείγματος ρυθμίζεται στους 270°C και χρησιμοποιείται η μέθοδος PTVsplitless. Η ποσότητα του δείγματος που εισάγεται στο GC κάθε φορά είναι 2 µL. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το ήλιο, καθαρότητας 99,999%. Η ταχύτητα ροής ρυθμίζεται στο 1ml/min. Οι αναλυόμενες ουσίες διαχωρίζονται με μια τριχοειδή στήλη αέριας χρωματογραφίας τύπου (Alltech, AT-5ms, 30 x 0,25mm x 0,25 µm, HELIFLEX CAP) από την Supelco Company. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου ρυθμίζεται ως εξής:

- Ισόθερμη κατάσταση στους 100 °C για 5 λεπτά.
- Θέρμανση της στήλης από 100 -160 °C με ρυθμό 15 °C/min και έπειτα
- Θέρμανση της στήλης με ρυθμό 5 °C/min έως τους 300 °C,
- Συντήρηση στους 300 °C για 2 λεπτά και επιστροφή στις αρχικές συνθήκες.

Ο χρόνος ανάλυσης για κάθε δείγμα ολοκληρώνεται στα 35 min.

Γ2) Συνθήκες αναλυτή μαζών Quadrupole Polaris Ion Trap (MS)

Ο ιονισμός του δείγματος πραγματοποιήθηκε με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (electron impact, EI) με electron energy 70eV emission current 60µA. Οι θερμοκρασίες στη πηγή ιόντων και στη γραμμή μεταφοράς είναι αντίστοιχα 250°C. Η λειτουργία του ανιχνευτή MS σταματάει στα 35min. Τα χρωματογραφήματα GC-MS με τη μέθοδο SIM (selected ion monitoring), λαμβάνονται με 2 fragmentions (1 για ποσοτικό προσδιορισμό και 1 για ποιοτικό προσδιορισμό) για κάθε μελετούμενο μεταβολίτη, με χρόνο σάρωσης 100ms. Οι παράμετροι λειτουργίας του οργάνου Trace GC Ultra/MS-QP2010 αναφέρονται συνοπτικά στον **πίνακα 18**.

Injector	PTV (mode:CTSplitless), 270°C, purge flow 1mL/min, liner with silica wool
Column	Alltech, AT-5ms, 30 x 0,25mm x 0,25 um, HELIFLEX CAP
Oven	100°C, hold 5min 15°C/min to 160°C, hold 0 min 5°C/min to 300°C, hold 2 min Total run time 35min
Detector	Quadrupole Ion Trap MS, ion source temperature 250°C

Πίνακας 18: Παράμετροι λειτουργίας του συστήματος GC-MS.

Κεφάλαιο 4: Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα

4.1) Στατιστική ανάλυση

Η επεξεργασία των δεδομένων και η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού SPSS (v.15). Δημιουργήθηκε βάση δεδομένων όπου καταγράφηκαν τα αποτελέσματα των μετρήσεων των OCP's στον ορό. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν παλαιότερες βάσεις δεδομένων όπου ήταν καταχωρημένες οι τιμές των παραμέτρων που σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως διάμεσοι με το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Interquartile Range - IQR) καθώς οι συγκεντρώσεις των ουσιών δεν παρουσιάζουν κανονική κατανομή. Ο έλεγχος της κανονικότητας πραγματοποιήθηκε με οπτική αξιολόγηση των ιστογραμμάτων συχνοτήτων με βάση το εύρος των συγκεντρώσεων. Για τον έλεγχο διαφορών στις ποσοτικές μεταβλητές μεταξύ υποομάδων, χρησιμοποιήθηκε το Mann-Whitney test για τον έλεγχο μεταξύ δυο ομάδων και η δοκιμασία Kruskal-Wallis για τον έλεγχο μεταξύ περισσότερων υποομάδων. Ως στατιστικώς σημαντικά θεωρήθηκαν τα αποτελέσματα όπου η τιμή του p-value ήταν μικρότερη ή ίση του 0,05. Η συσχέτιση μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών ελέγχθηκε με τη χρήση των συντελεστών συσχέτισης Spearman.

4.2) Στατιστική ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Για την εκτίμηση της έκθεσης σε OCP's πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων (αποθηκευμένα δείγματα ορού αίματος από προηγούμενη εργασία). Συγκεκριμένα, η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από 103 άτομα του αστικού πληθυσμού του Νομού Λαρίσης. Τα δείγματα προέρχονταν από εθελοντές αιμοδότες του τμήματος αιμοδοσίας του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, αλλά και από το δημοτικό γηροκομείο Λάρισας. Ως βασική προϋπόθεση είχε τεθεί η μη εμπλοκή των συμμετεχόντων σε γεωργικές δραστηριότητες, είτε ως κύριο επάγγελμα, είτε ως δευτερεύουσα απασχόληση. Ωστόσο, τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της ψεκαστικής περιόδου (Ιούνιος 2010 – Σεπτέμβριος 2010).

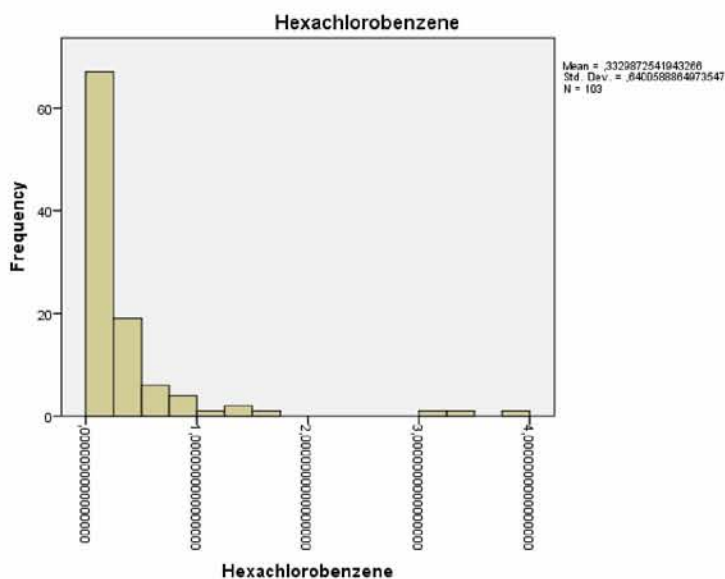
Στο **πίνακα 19** παρουσιάζεται η κατανομή του δείγματος σύμφωνα τα δημογραφικά χαρακτηριστικά (φύλο, ηλικία, επίπεδο εκπαίδευσης) καθώς και τις προσωπικές συνήθειες (καπνιστική συνήθεια και κατανάλωση αλκοόλ).

Δημογραφικά χαρακτηριστικά και συνήθειες			
		N	%
ΦΥΛΛΟ	Άνδρας	81	78,64%
	Γυναίκα	22	21,36%
ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΟΜΑΔΑ	60+	11	10,68%
	45-59	44	42,72%
	30-44	44	42,72%
	έως 30	4	3,88%
ΚΑΠΝΙΣΤΙΚΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ	Ποτέ	33	32,04%
	Περιστασιακά	2	1,94%
	Καθημερινά	49	47,57%
	Πρώην καπνιστής	19	18,45%
ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΛΚΟΟΛ (ΙΣΟΔΥΝΑΜΑ ΑΛΚΟΟΛ)	Ποτέ	13	12,62%
	<1 ποτό /μήνα	12	11,65%
	2-3 ποτό /μήνα	18	17,48%
	1-2 ποτά/εβδομάδα	21	20,39%
	3-4 ποτά/εβδομάδα	20	19,42%
	5-6 ποτά/εβδομάδα	7	6,80%

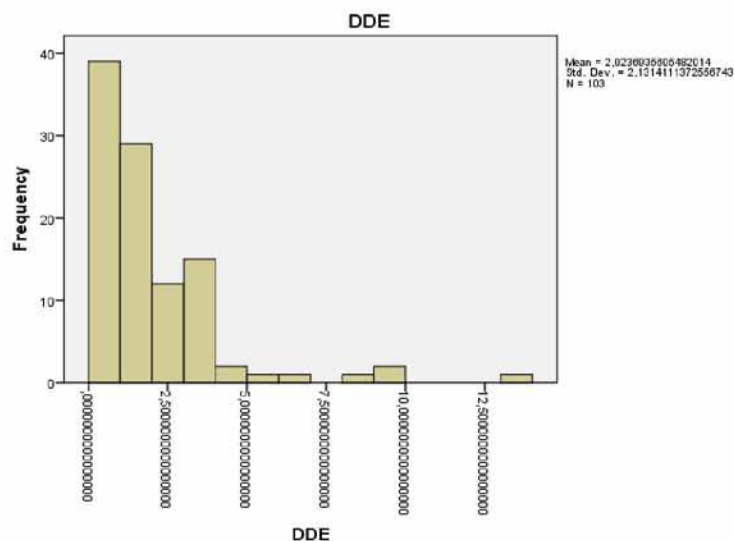
	1 ποτά/ ημέρα	10	9,71%
	2-3 ποτά/ ημέρα	2	1,94%
	4-5 ποτά/ ημέρα	4	3,88%
	> 6 ποτά/ ημέρα	6	5,83%
ΕΠΠΕΔΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ	Καμία	4	3,9%
	Δημοτικό	6	5,8%
	Γυμνάσιο	17	16,5%
	Λύκειο	22	21,4%
	ΤΕΙ	14	13,6%
	ΑΕΙ	40	38,8%

Πίνακας 19: Δημογραφικά στοιχεία και συνήθειες

Οι συγκεντρώσεις των OCP's δεν ήταν κανονικά κατανομημένες. Ενδεικτικά παρουσιάζονται οι κατανομές για το DDE και για το HCB (**εικόνα 46,47**), όπου είναι φανερό ότι δεν υπάρχει κανονική κατανομή. Η κατανομή για το HCB και το DDE φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 46: Κατανομή δειγμάτων για το HCB (Hexachlorobenzene)



Εικόνα 47: Κατανομή δειγμάτων για το DDE

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα ποσοστά ανίχνευσης των ουσιών καθώς και οι ενδιάμεσες συγκεντρώσεις (IQR) σε ng/ml. **(πίνακας 20)** Στο συνολικό δείγμα, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης για το DDE (99%) με ενδιάμεσο 1,25ng/ml και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (0,7-2,58) και για το HCB (68,9%) με ενδιάμεσο 0,13ng/ml και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (0-0,34).

ng/ml	% ανίχνευσης	Ενδιάμεσος	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος
a-chlordane	16,50%	<LOD	<LOD
c-chlordane	4,80%	<LOD	<LOD
DDD	9,70%	<LOD	<LOD
DDE	99,00%	1,25	0,70-2,58
DDT	4,90%	<LOD	<LOD
Heptachlor Epoxide	1,00%	<LOD	<LOD
Heptachlor	2,90%	<LOD	<LOD
Hexachlorobenzene	68,90%	0,13	0,00-0,34

Πίνακας 20: Ποσοστά ανιχνεύσιμων ουσιών

Στο **πίνακα 21, 22** παρουσιάζεται η κατανομή των δειγμάτων ανά ενδοτεταρτημοριακά εύρη για το DDE και το HCB, για όλα τα χαρακτηριστικά που παρουσιάζει το δείγμα (δημογραφικά χαρακτηριστικά και προσωπικές συνήθειες). Επίσης παρουσιάζονται και οι τιμές της στατιστικής σημαντικότητας (p-value) για τη κάθε κατηγορία. Η ηλικία παρουσιάζει στατιστικά σημαντική σχέση με τα επίπεδα DDE και HCB, καθώς το p-value για το DDE είναι 0,033, ενώ το p-value για το HCB είναι 0,006.

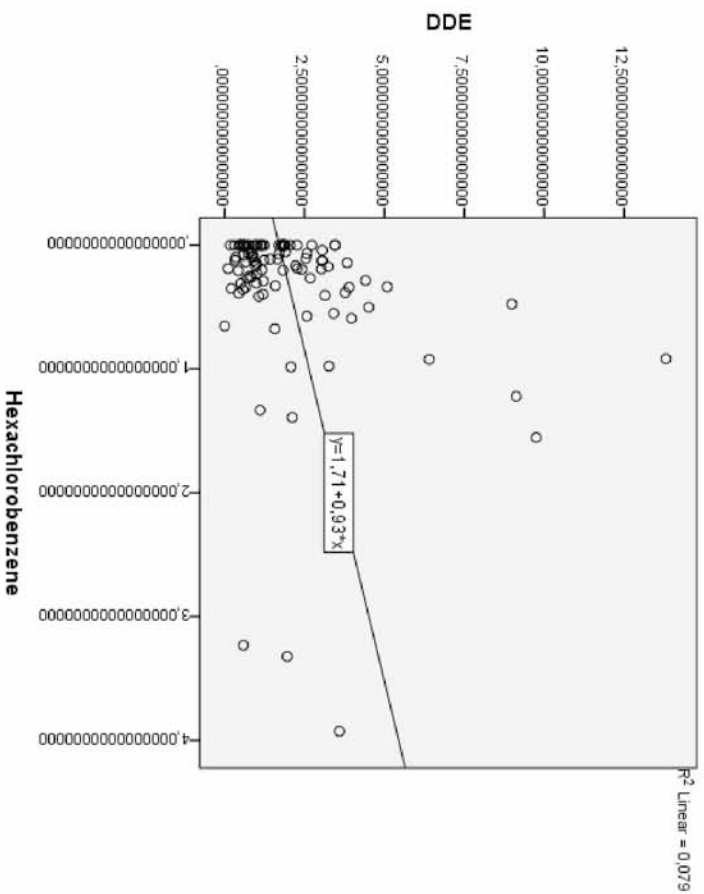
DDE				
		Ενδιάμεσος	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	P-value
ΦΥΛΛΟ	Άνδρας	1,21	0,74-2,69	0,917*
	Γυναίκα	1,42	0,65-1,91	
ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΟΜΑΔΑ	60+	1,12	0,33-3,59	0,033**
	45-59	1,80	1,04-3,05	
	30-44	1,02	0,68-1,98	
	έως 30	0,58	0,34-0,91	
ΚΑΠΝΙΣΤΙΚΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ	Ναι	1,16	0,70-2,12	0,210*
	Όχι	1,62	0,80-3,05	
ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΛΚΟΟΛ	Υψηλή	1,37	0,83-1,99	0,658*
	Χαμηλή	1,25	0,70-2,73	
ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ	Καμία	3,50	0,46-8,08	0,179**
	Δημοτικό	1,99	0,31-3,59	
	Γυμνάσιο	0,98	0,70-2,58	
	Λύκειο	0,93	0,62-1,78	
	ΤΕΙ	1,72	0,59-2,42	
	ΑΕΙ	1,85	1,09-2,71	
*Mann -Whitney test				
**Kruskal Wallis test				

Πίνακας 21: Στατιστικά αποτελέσματα για DDE

Hexachlorobenzene				
		Ενδιάμεσος	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	P-value
ΦΥΛΛΟ	Άνδρας	0,12	0,00-0,31	0,288*
	Γυναίκα	0,23	0,00-0,39	
ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΟΜΑΔΑ	60+	0,35	0,12-1,55	0,006**
	45-59	0,18	0,06-0,41	
	30-44	0,06	0,00-0,22	
	έως 30	0,17	0,07-0,25	
ΚΑΠΝΙΣΤΙΚΗ ΣΥΝΗΘΕΙΑ	Ναι	0,12	0,00-0,31	0,479*
	Όχι	0,14	0,00-0,39	
ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΑΛΚΟΟΛ	Υψηλή	0,13	0,00-0,29	0,642*
	Χαμηλή	0,13	0,00-0,35	
ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ	Καμία	1,24	0,52-2,39	0,086**
	Δημοτικό	0,33	0,07-0,65	
	Γυμνάσιο	0,13	0,05-0,26	
	Λύκειο	0,03	0,00-0,19	
	TEI	0,15	0,00-0,36	
	ΑΕΙ	0,15	0,00-0,32	
*Mann -Whitney test				
**Kruskal Wallis test				

Πίνακας 22: Στατιστικά αποτελέσματα για Hexachlorobenzene

Η σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων των OCP's ελέγχθηκε με τον υπολογισμό των συντελεστών Spearman. Εξεταστηκε η πιθανή σχέση των συγκεντρώσεων της κάθε ουσίας με τις υπόλοιπες. Παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του DDE και του HCB (με συντελεστή συσχέτισης 0,309 και p-value 0,001), η οποία ευρέθει μέσω της συσχέτισης spearman (correlation spearman) και φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα διασποράς (εικόνα 48). Η ύπαρξη και των δύο ουσιών σε πολλά δείγματα ήταν χαρακτηριστική. Επίσης, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του α -Chlordane και του DDD (με συντελεστή συσχέτισης 0,193 και p-value 0,050). (παραρτήματα, πίνακας 23).



Εικόνα 48: Διάγραμμα διασποράς

Συμπεράσματα

Αναπτύχθηκε μεθοδολογία ποσοτικού προσδιορισμού για OCP's στα δείγματα ορού. Η μεθοδολογία βασίζεται στην επεξεργασία του δείγματος ορού με HS-SPME για την απομόνωση των αναλυτών από το δείγμα και επακόλουθη ανάλυση με GC-MS.

Είναι μια αξιόπιστη και σχετικά εύκολη μεθοδολογία για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων με χαμηλά όρια ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, η μεθοδολογία επιτρέπει το ποσοτικό προσδιορισμό 8 ουσιών (Hexachlorobenzene, Heptachlor, Heptachlor Epoxide, c-Chlordane, a-Chlordane, 4,4-DDE, 4,4-DDD, 4,4-DDT) με όρια ανίχνευσης (LOD) από 0,01ng/ml (για το 4,4-DDE) έως 0,21 ng/ml (για το 4,4-DDT) και σε συγκεντρώσεις από 0,5ng/mL έως 20ng/mL.

Η μεθοδολογία εφαρμόστηκε με επιτυχία σε δείγματα από το πληθυσμό της Θεσσαλίας (103 άτομα: 81 άντρες και 22 γυναίκες) για την εκτίμηση της έκθεσης σε OCP's. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης, παρατηρήθηκε έκθεση σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα στο πληθυσμό της Θεσσαλίας, καθώς ανιχνεύθηκε συνολικά **DDE** σε ποσοστό **99%** και Hexachlorobenzene (**HCB**) σε ποσοστό **68,9%**. Παρατηρήθηκε, επίσης, μια στατιστικά σημαντική σχέση της έκθεσης με την ηλικία, για το DDE (**p-value 0,033**) και για το Hexachlorobenzene (**p-value 0,006**). Παράλληλα παρατηρήθηκε και μια συσχέτιση του Hexachlorobenzene με το DDE.

Τέλος, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ότι άτομα μεγαλύτερης ηλικίας παρουσίασαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα. Τα ανιχνεύσιμα επίπεδα DDE και HCB σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού της Θεσσαλίας ενδέχονται να οφείλονται σε παλαιότερες περιβαλλοντικές εκθέσεις ή επαγγελματικές εκθέσεις από τη γεωργική χρήση των οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων. Το ενδεχόμενο αυτό ενισχύεται από την συσχέτιση των συγκεντρώσεων με την ηλικία. Επίσης δεν αναιρείται και μια σημερινή έκθεση μέσω της διατροφικής έκθεσης, καθώς οι ουσίες αυτές εξακολουθούν να υπάρχουν, να βιοσυσσωρεύονται και να βιομεγενθύνονται ακόμα στο περιβάλλον.

Παράρτημα

Correlations Spearman

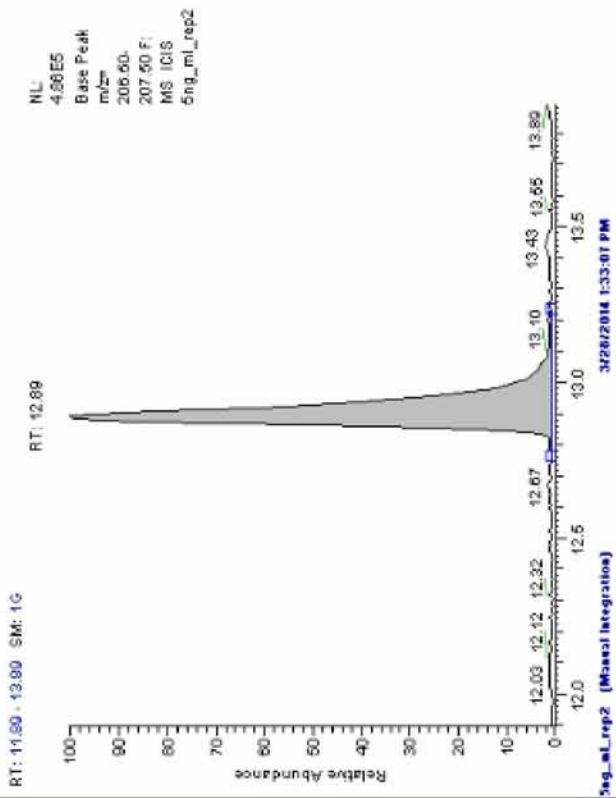
		a-chlordane	Aldrin	c-chlordane	DDD	DDE	DDT	Endrin	Heptachlor Epoxide	heptachlor	Hexachlorobenzene	
Spearman's rho	a-Chlordane	Correlation Coefficient	1,000	-,030	-,015	,193	,015	,021	-,067	-,044	,084	,057
		p-value		,761	,878	,050	,879	,834	,503	,661	,398	,568
	c-Chlordane	Correlation Coefficient	-,015	,065	1,000	,192	,097	,138	-,194*	-,025	-,043	,193
		p-value	,878	,518		,051	,331	,163	,050	,805	,666	,051
	DDD	Correlation Coefficient	,193	,048	,192	1,000	-,029	,083	-,031	-,032	-,057	-,109
		p-value	,050	,634	,051		,769	,406	,758	,745	,569	,272
	DDE	Correlation Coefficient	,015	,128	,097	-,029	1,000	0,013	-,098	-,063	-,038	,309**
		p-value	,879	,200	,331	,769		,900	,325	,525	,706	,001
	DDT	Correlation Coefficient	,021	,036	,138	,083	,013	1,000	,186	-,022	-,039	,135
		p-value	,834	,719	,163	,406	,900		,061	,823	,695	,174
	Heptachlor Epoxide	Correlation Coefficient	-,044	-,108	-,025	-,032	-,063	-,022	,128	1,000	-,017	-,047
		p-value	,661	,280	,805	,745	,525	,823	,197		,864	,635
	Heptachlor	Correlation Coefficient	,084	,044	-,043	-,057	-,038	-,039	-,031	-,017	1,000	,063
		p-value	,398	,663	,666	,569	,706	,695	,759	,864		,528
	Hexachlorobenzene	Correlation Coefficient	,057	-,116	,193	-,109	,309**	,135	-,149	-,047	,063	1,000
		p-value	,568	,247	,051	,272	,001	,174	,133	,635	,528	

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Πίνακας 23: Στατιστική συσχέτιση της κάθε ουσίας με την άλλη μέσω της συσχέτισης Spearman.

5ng_ml_rep2 (Micro settings)

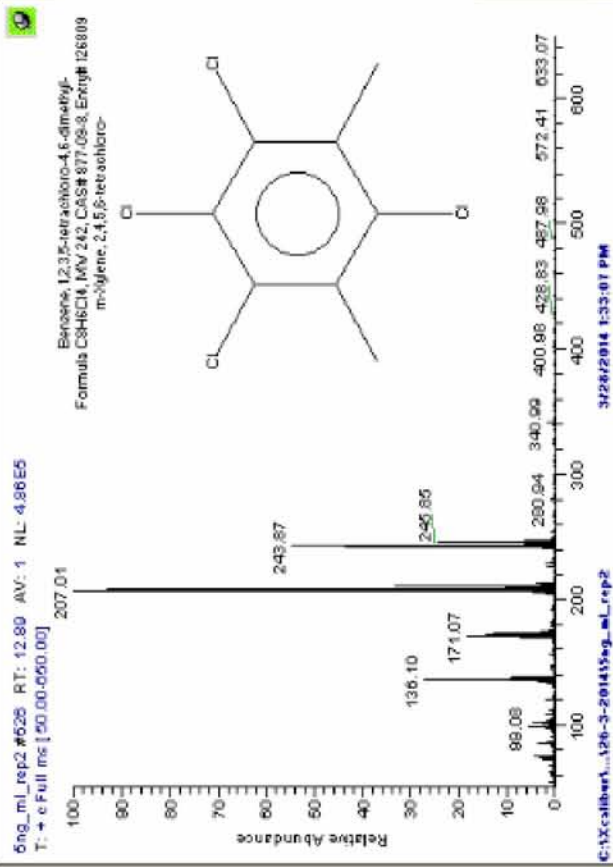
3/28/2014 1:33:01 PM

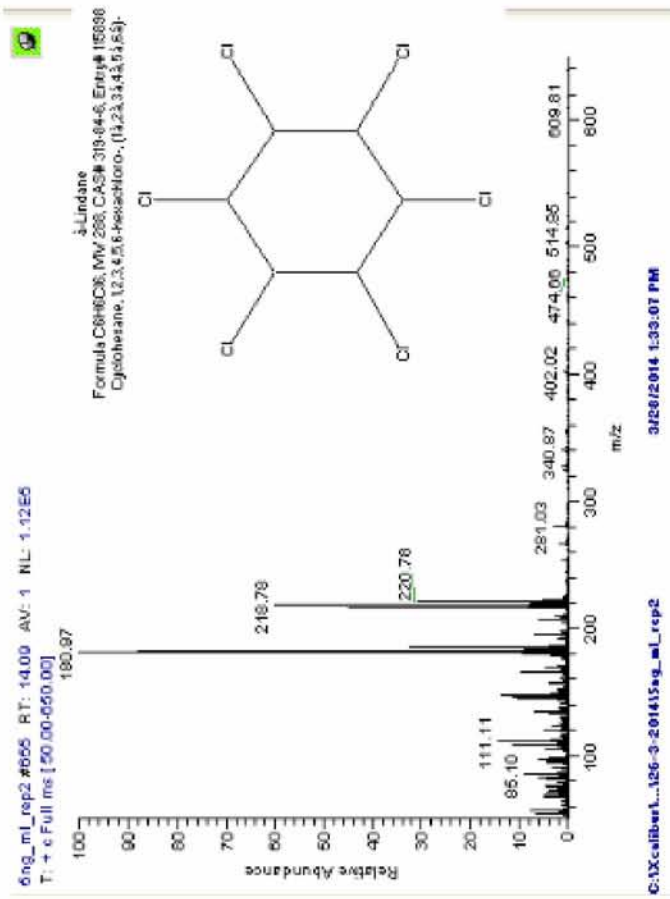
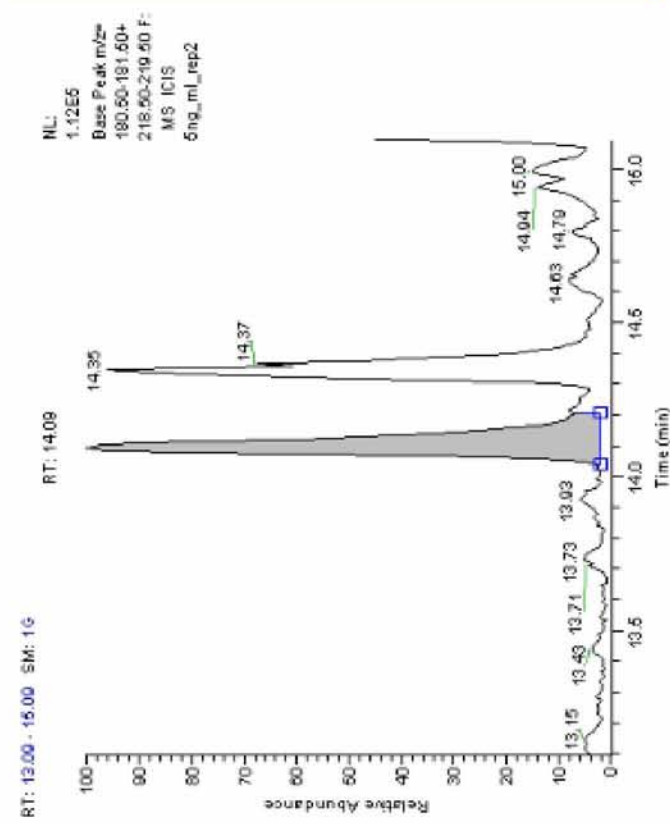


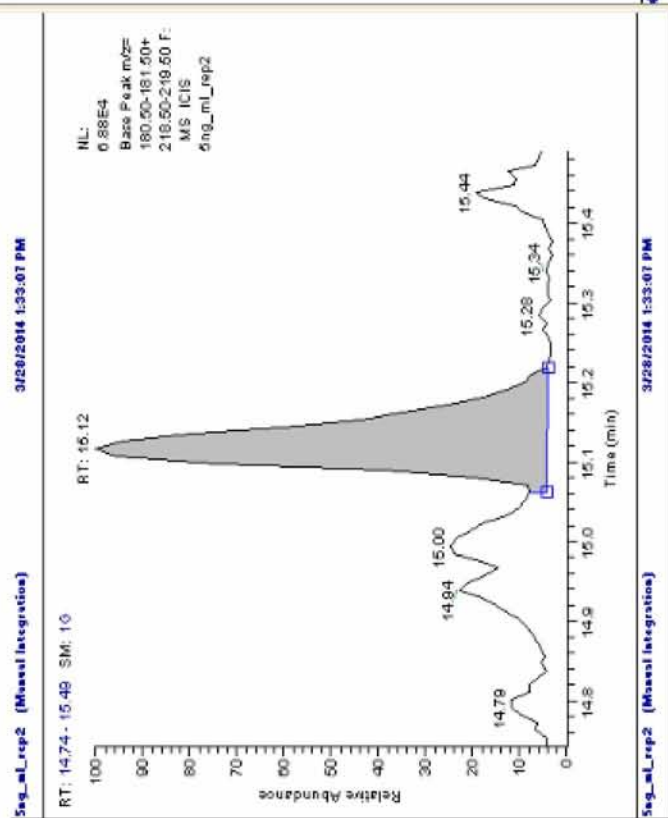
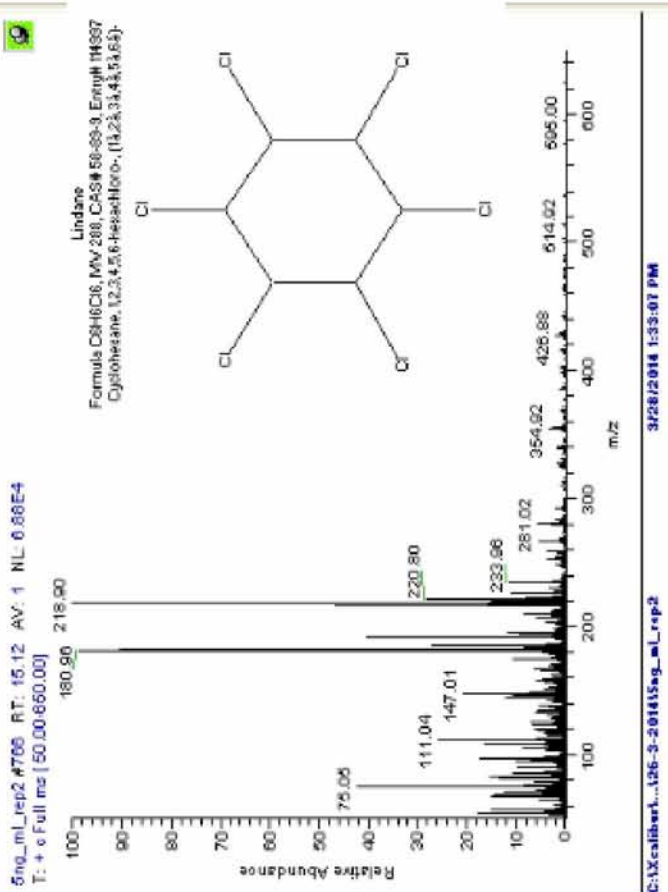
NL: 4.86E5
Base Peak
m/z: 207.00
207.00 F:
MS ICIS
5ng_ml_rep2

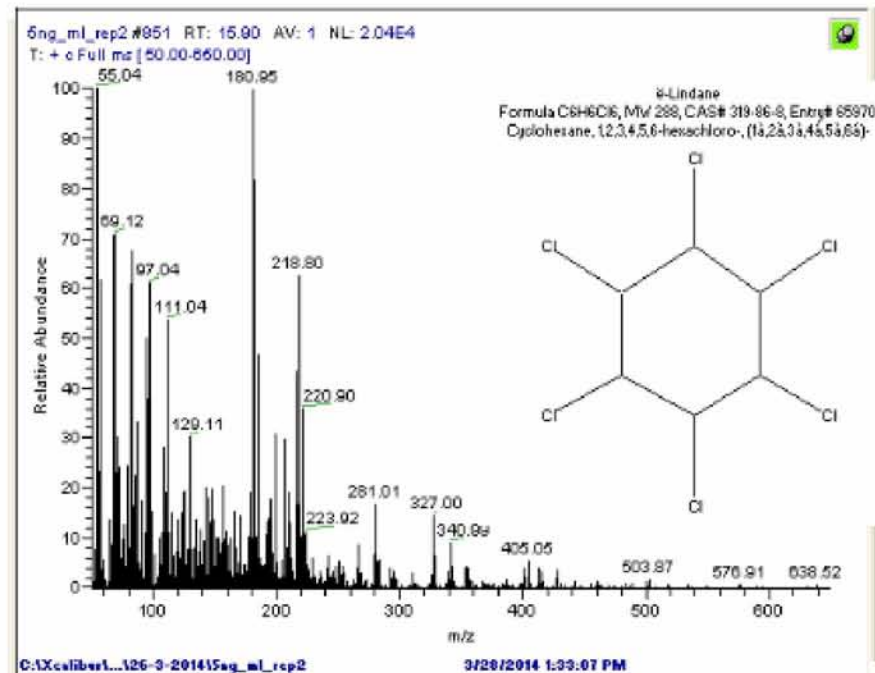
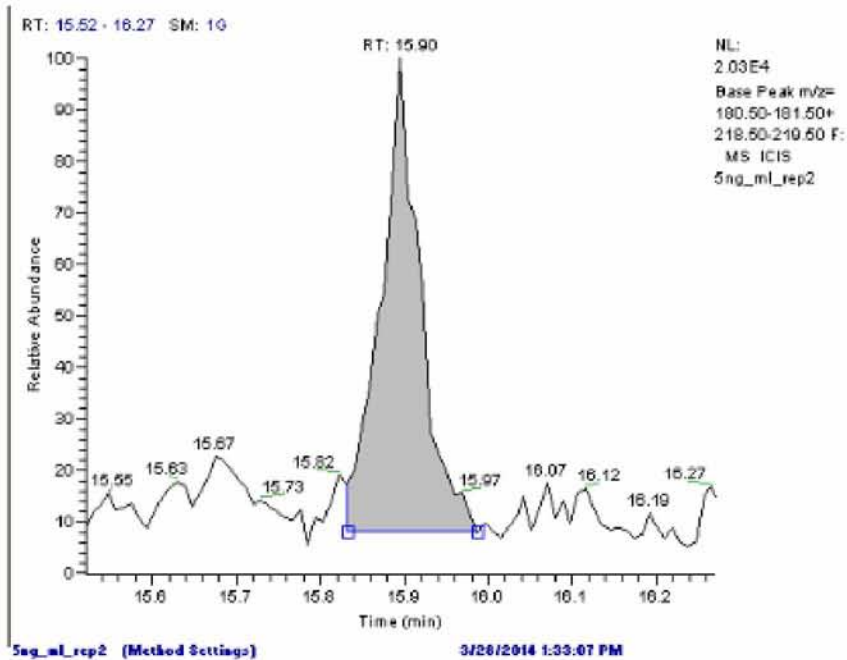
C:\Xcalibert...126-3-201455ng_ml_rep2

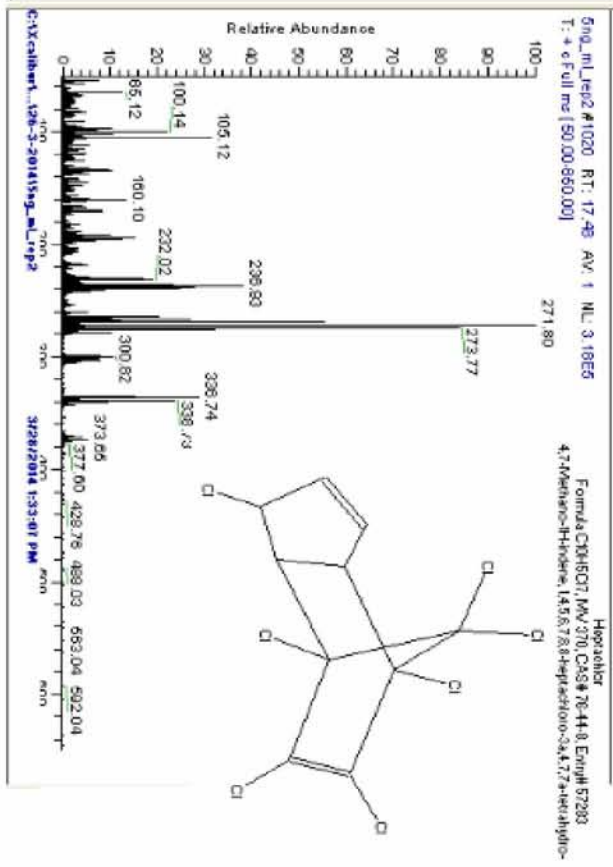
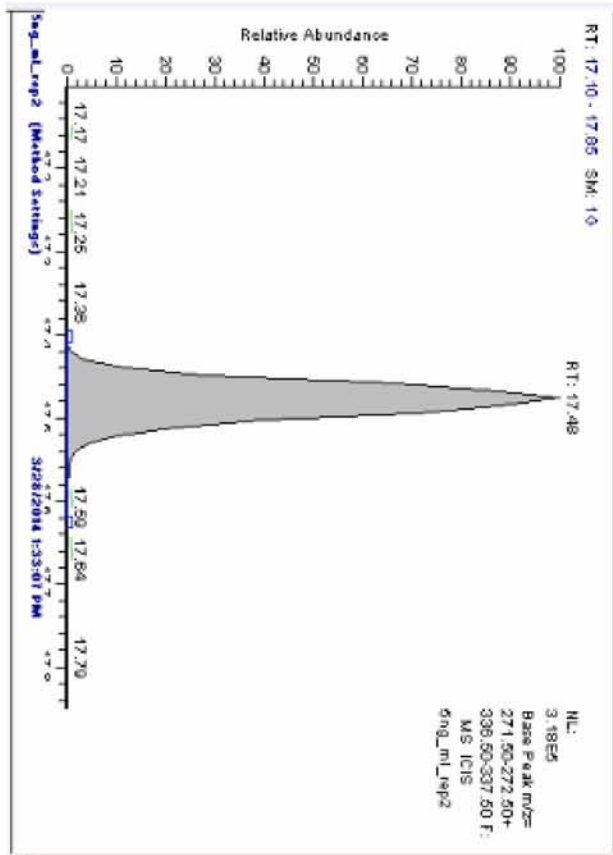
3/28/2014 1:33:01 PM

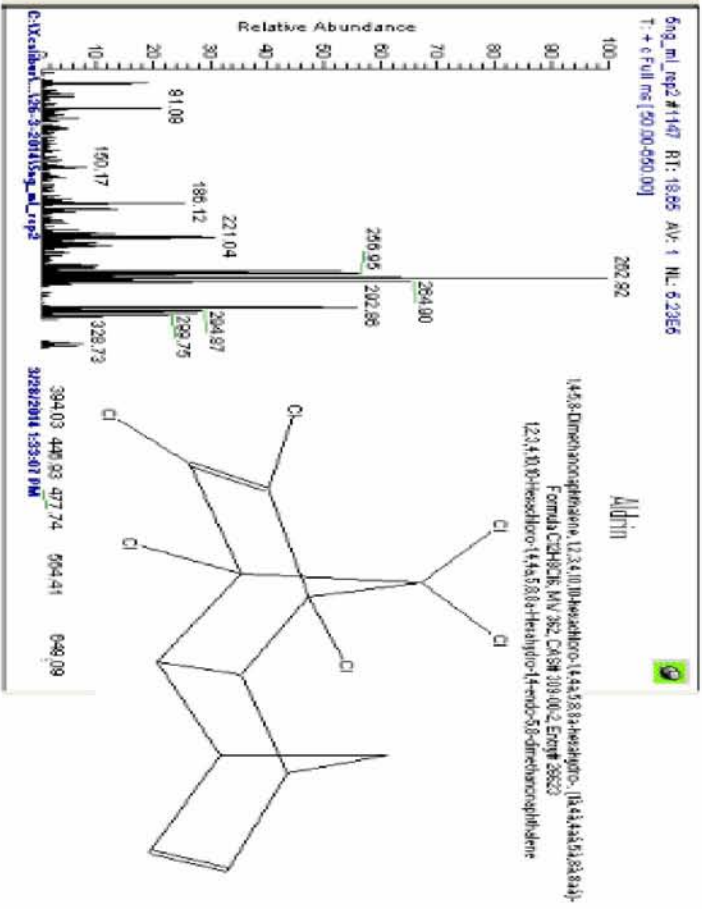
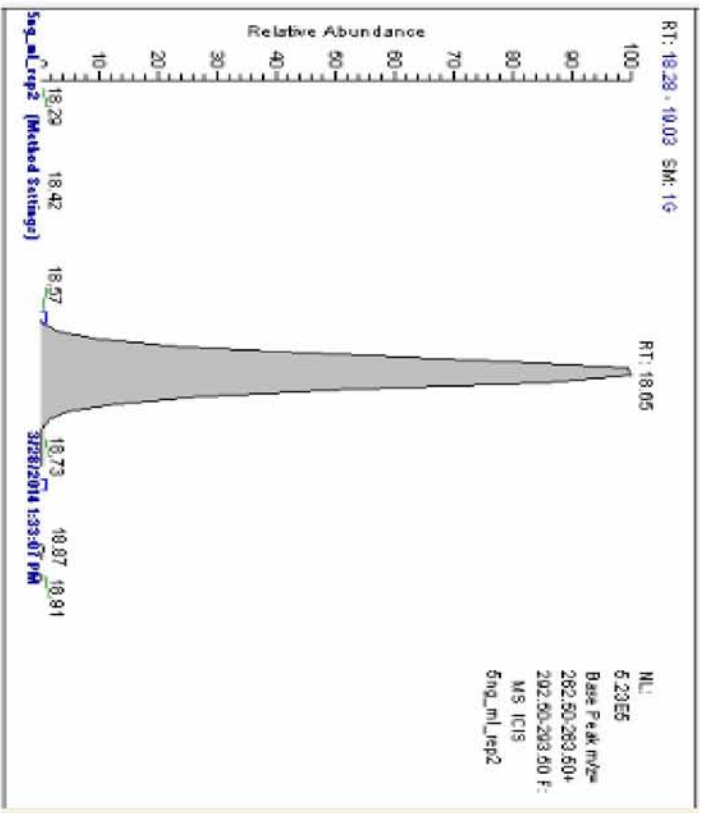


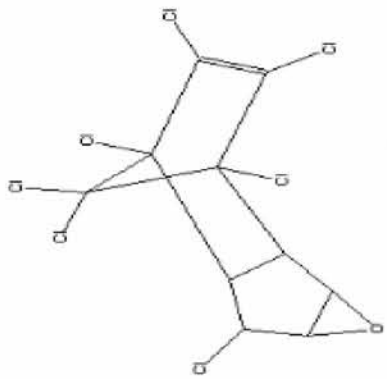
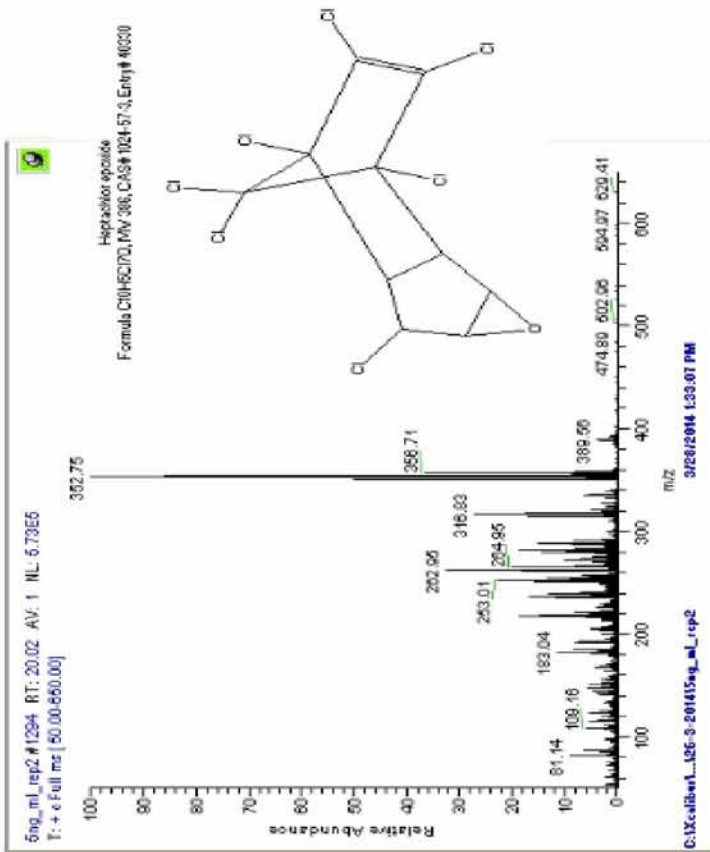
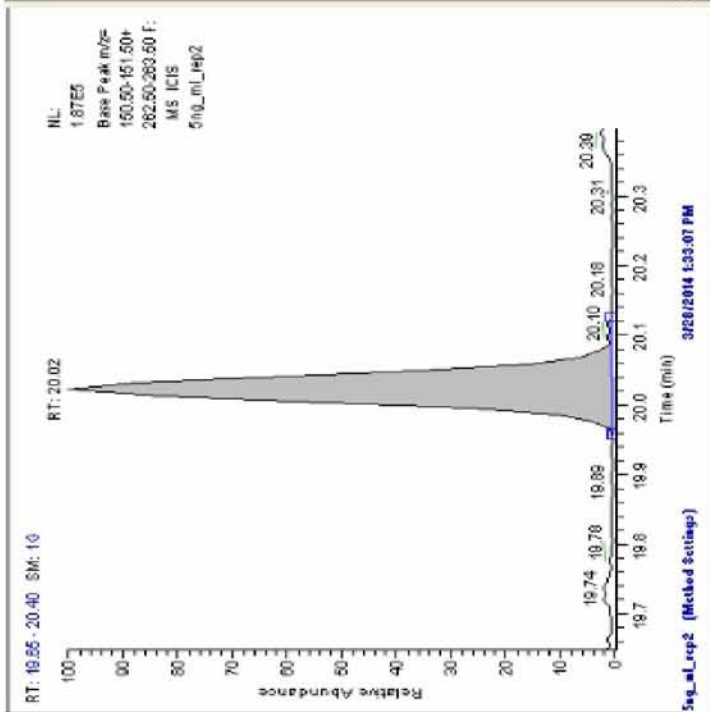


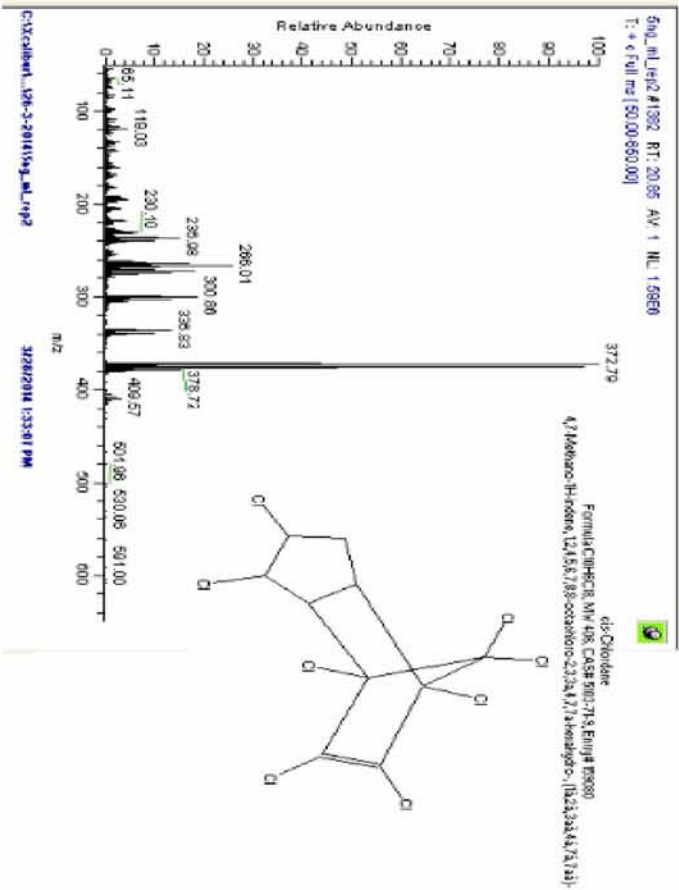
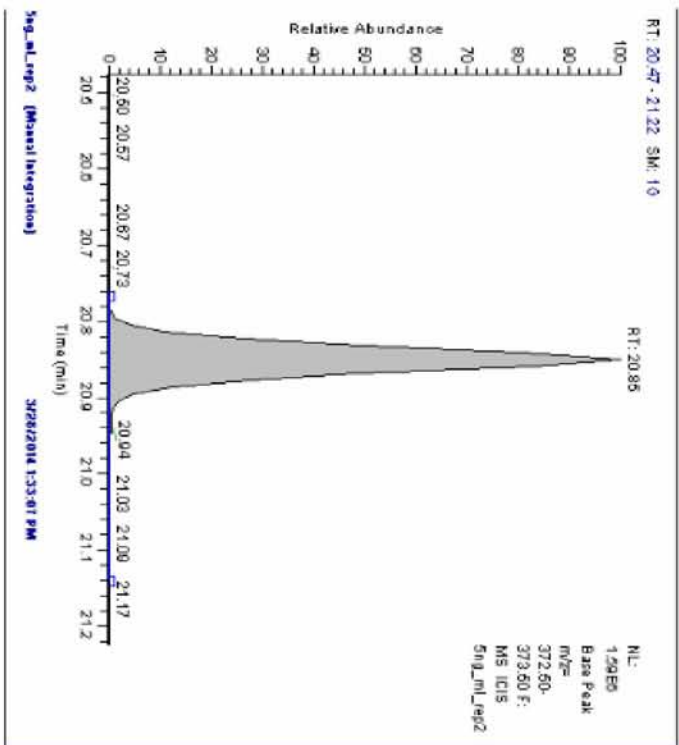




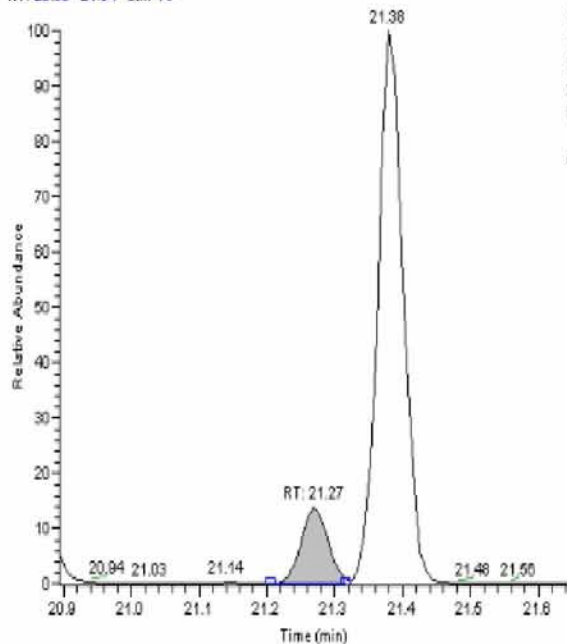








RT: 20.80 - 21.84 SM: 16

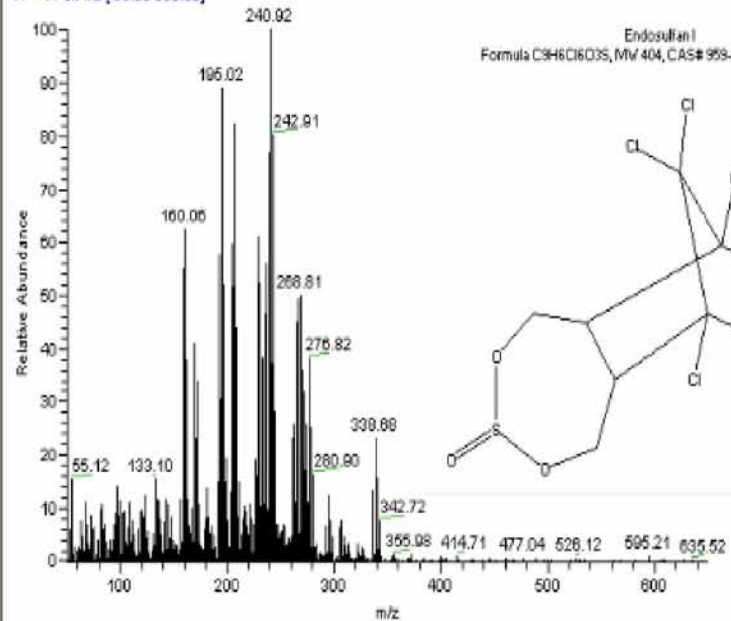


5ag_ml_rep2 (Method Settings)

3/28/2014 1:33:07 PM

NL:
1.32E8
Base Peak m/z:
240.50-241.50+
372.50-373.50 F:
MS ICIS
5ng_ml_rep2

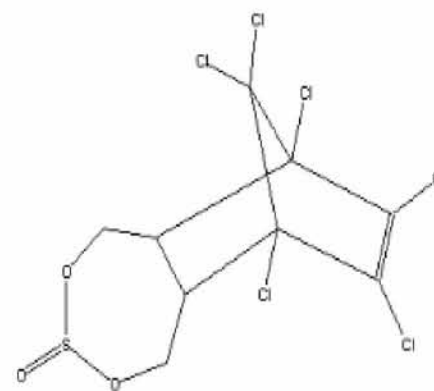
5ng_ml_rep2 #1427 RT: 21.27 AV: 1 NL: 1.83E6
T: + e Full ms [50.00-650.00]

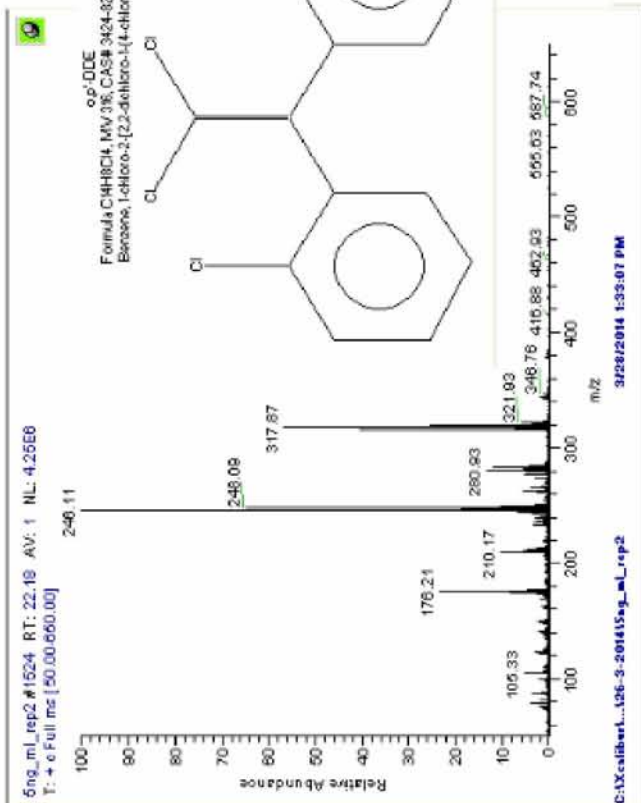
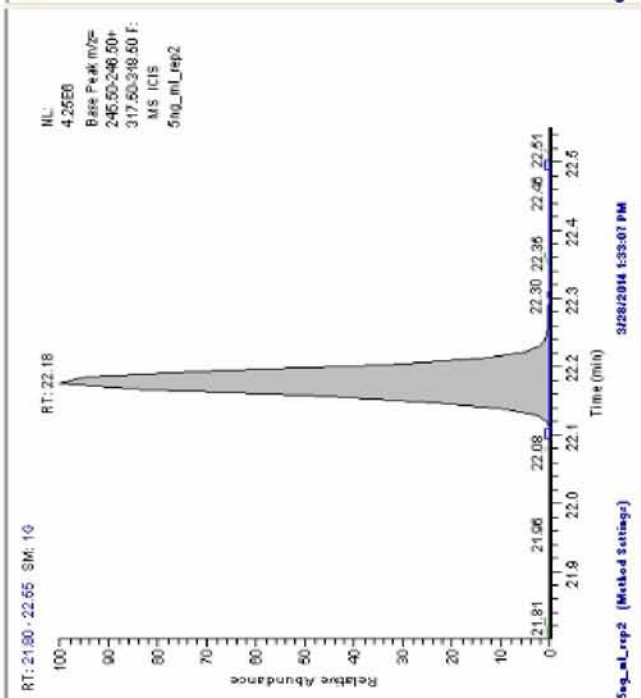


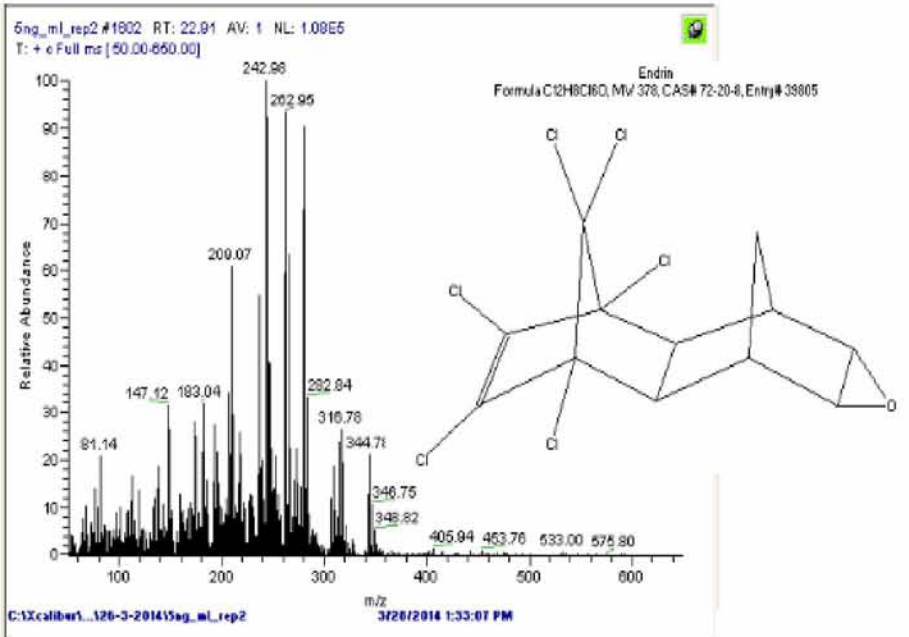
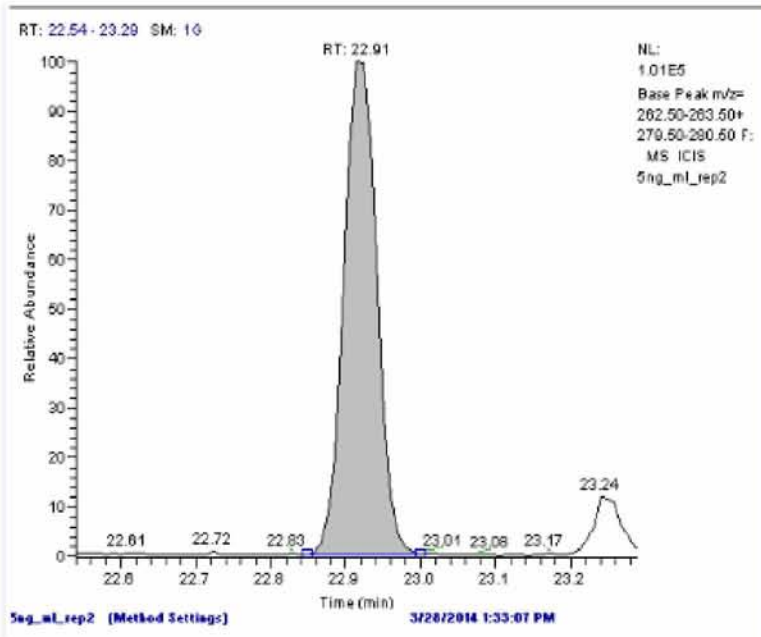
C:\Xcaliber\...126-3-2014\5ag_ml_rep2

3/28/2014 1:33:07 PM

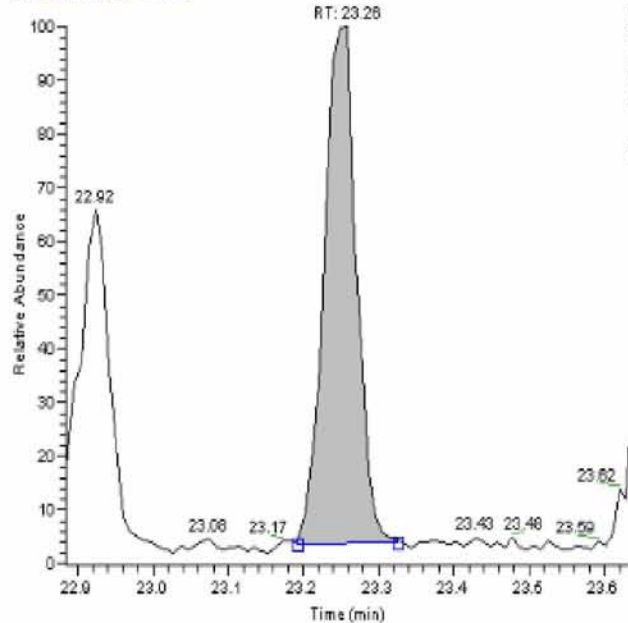
Endosulfan I
Formula C₉H₆Cl₆O₃S, MW 404, CAS# 959-98-8, Entry# 138017







RT: 22.88 - 23.63 SM: 1G

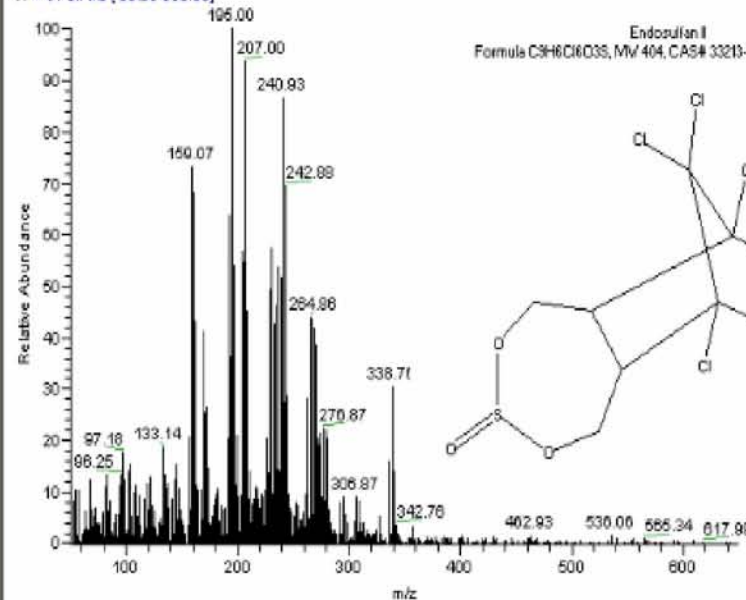


NL:
3.90E4
Base Peak m/z=
194.50-196.50+
240.50-241.50 F:
MS ICIS
6ng_ml_rep2

5ng_ml_rep2 (Method Settings)

3/28/2014 1:33:07 PM

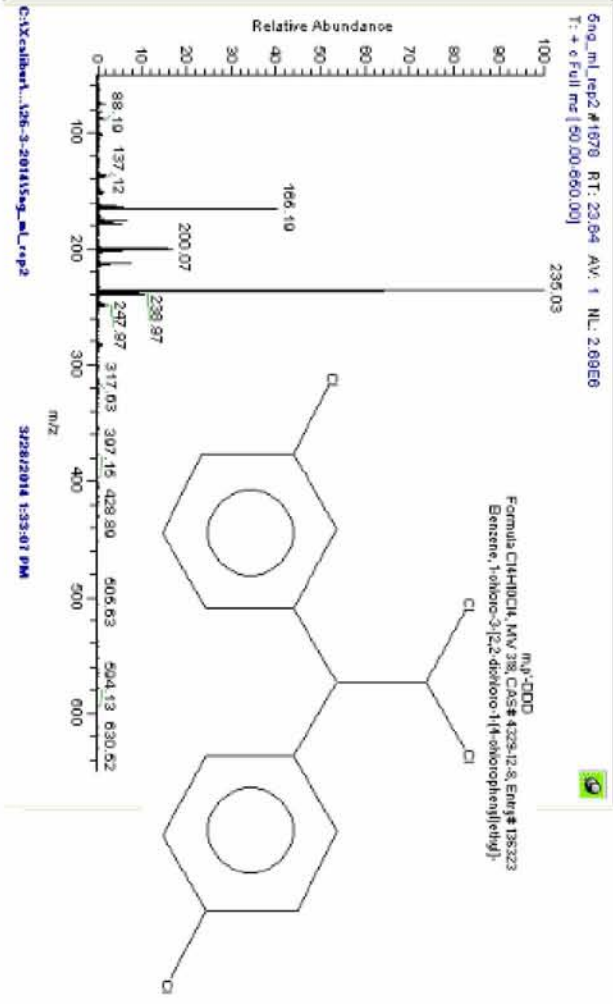
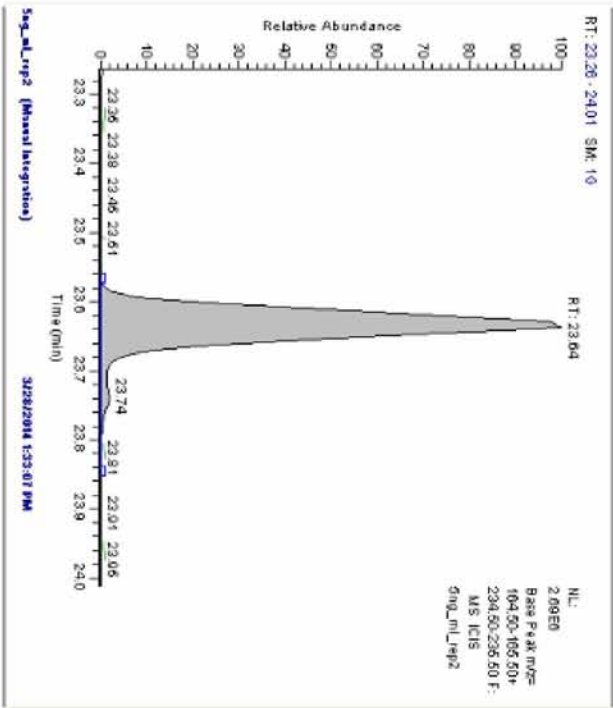
6ng_ml_rep2 #1638 RT: 23.26 AV: 1 NL: 3.90E4
T: + e Full ms [50.00-650.00]

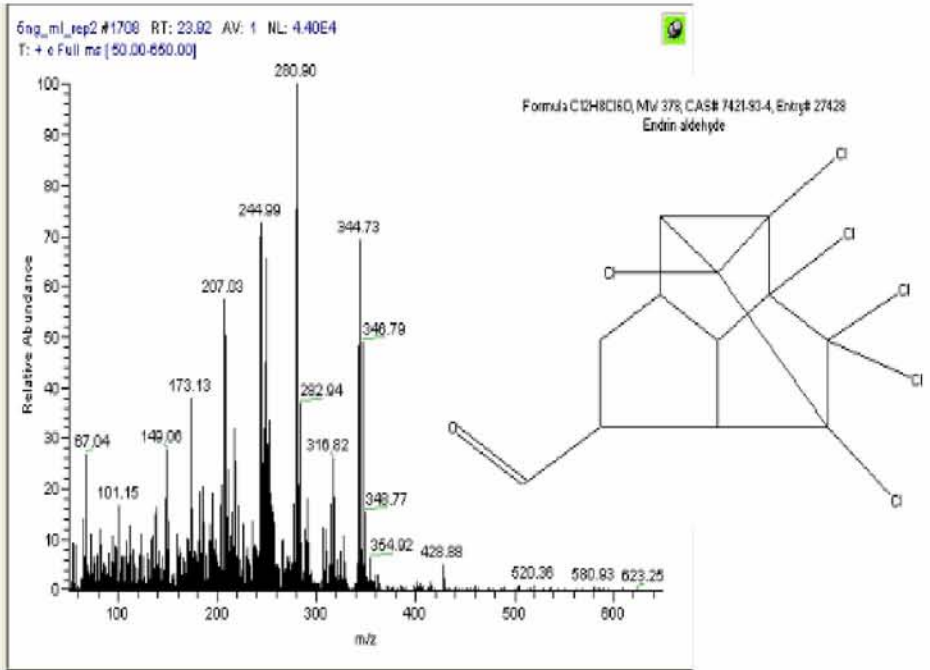
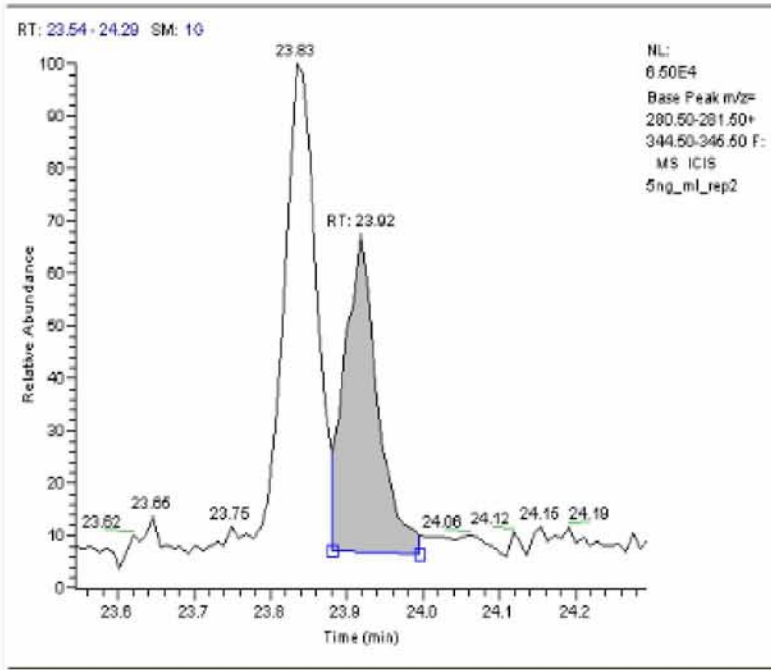


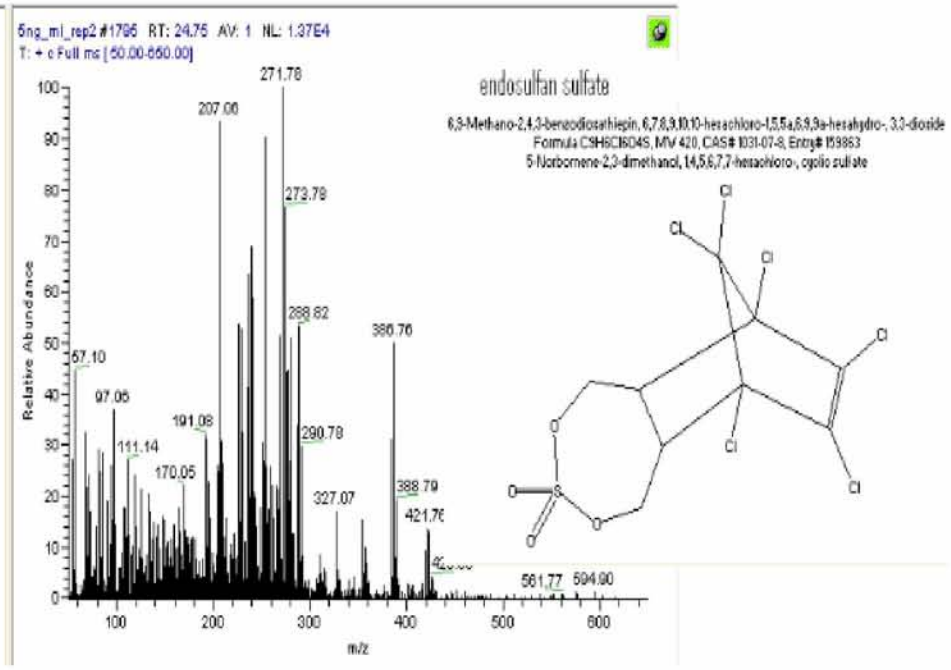
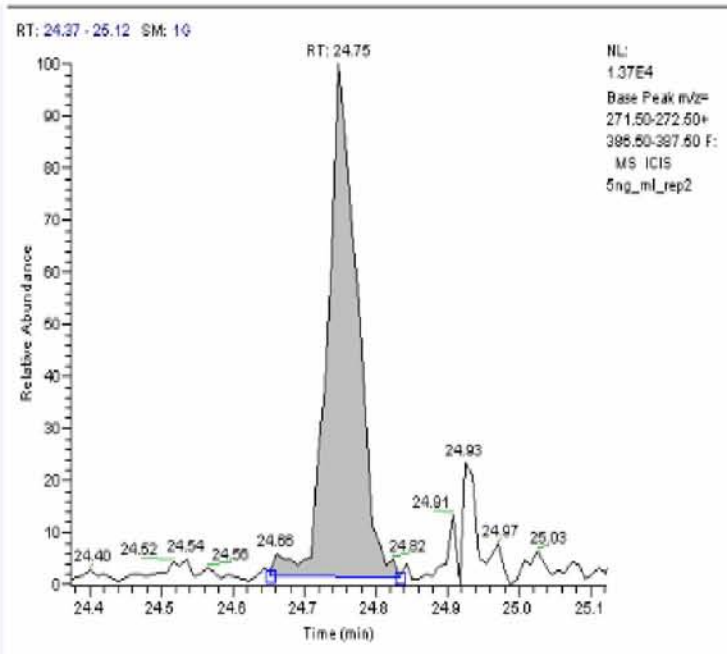
Endosulfan I
Formula C₉H₆Cl₆O₃S, MW 404, CAS# 33213-65-9, Entry# 122063

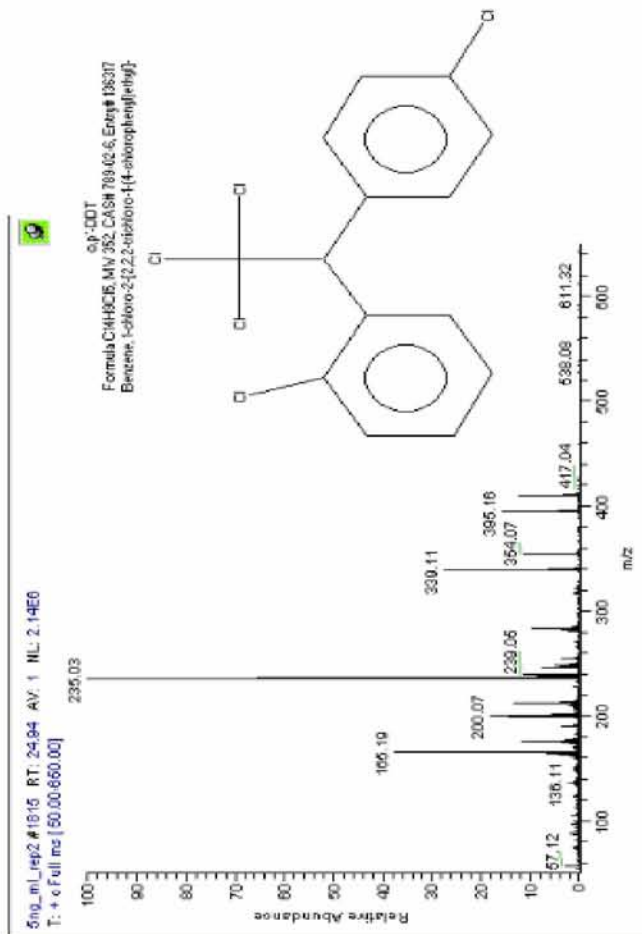
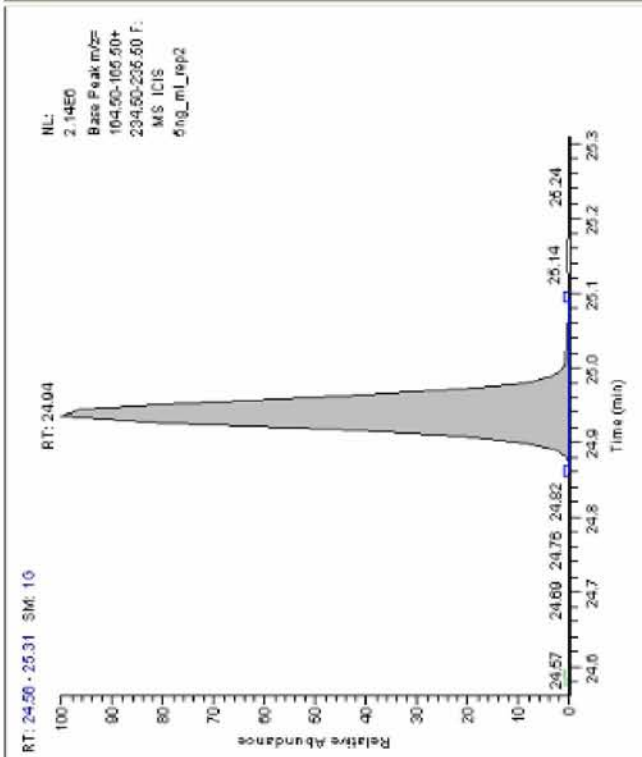
C:\Xcaliber\...126-3-2014\5ng_ml_rep2

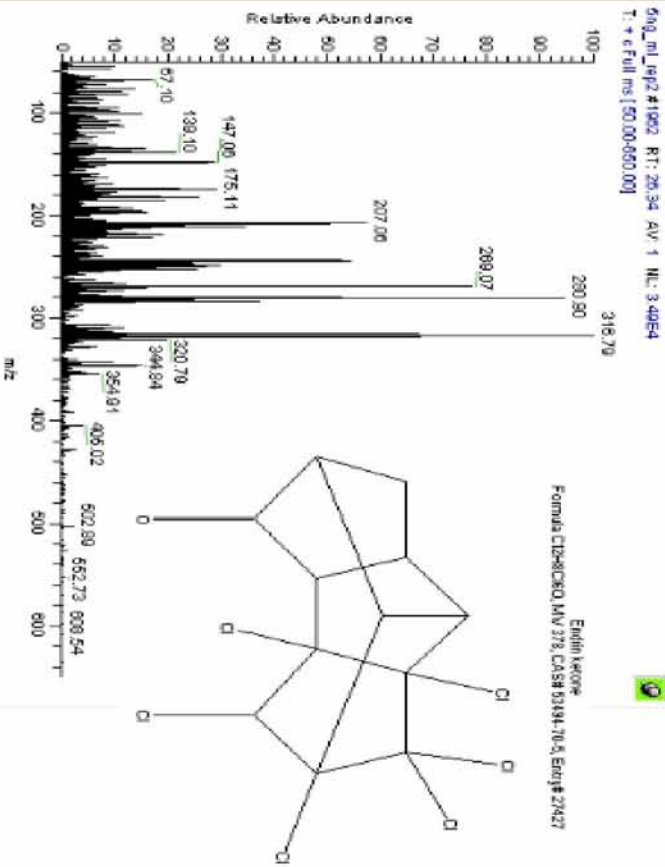
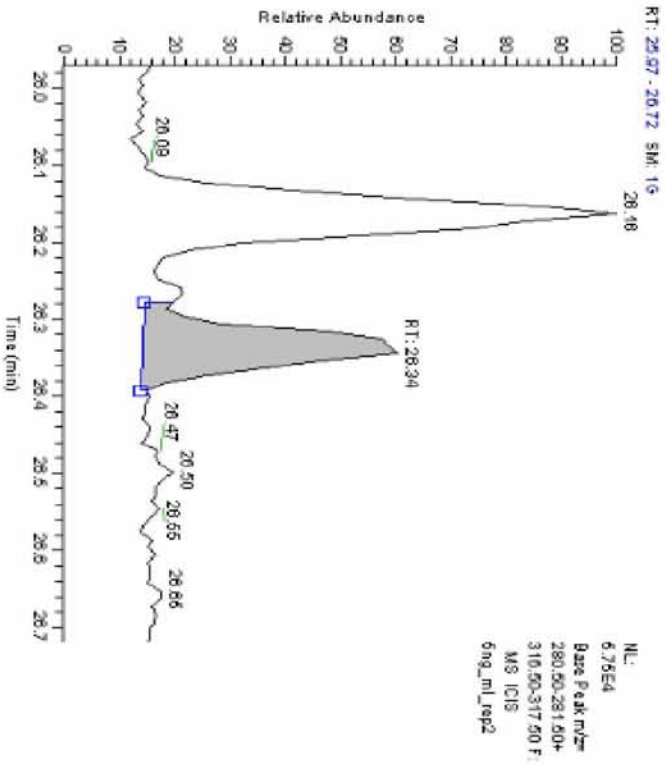
3/28/2014 1:33:07 PM

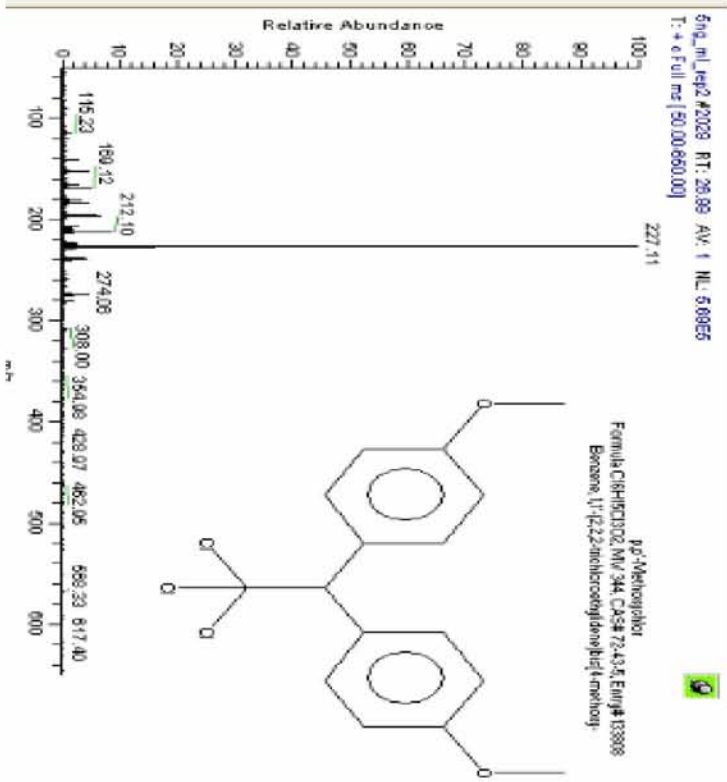
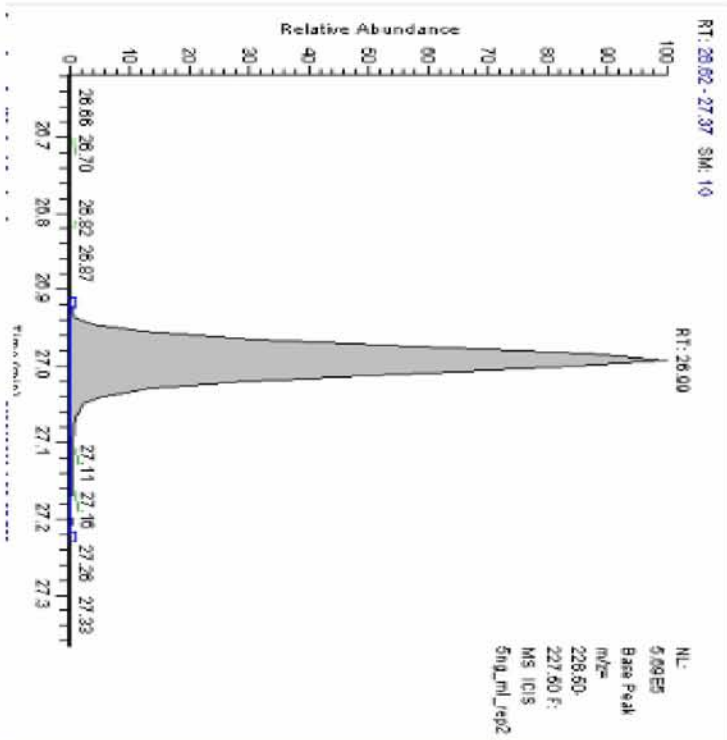




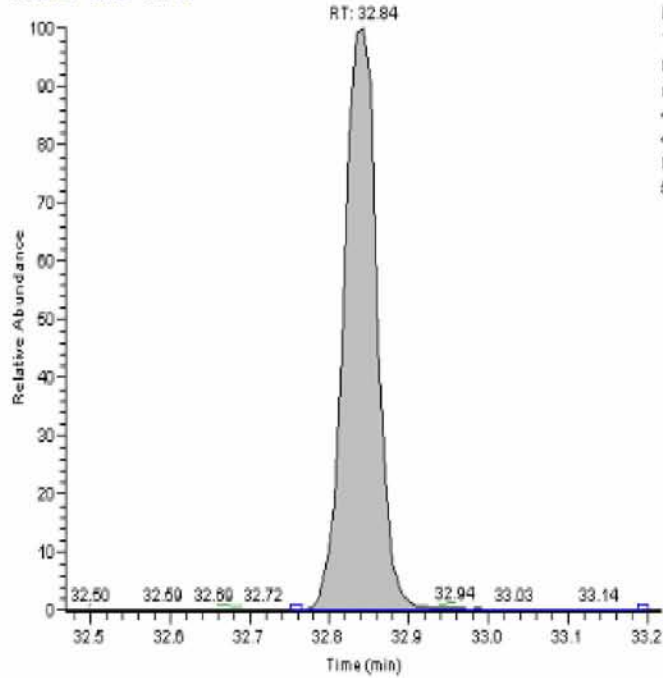






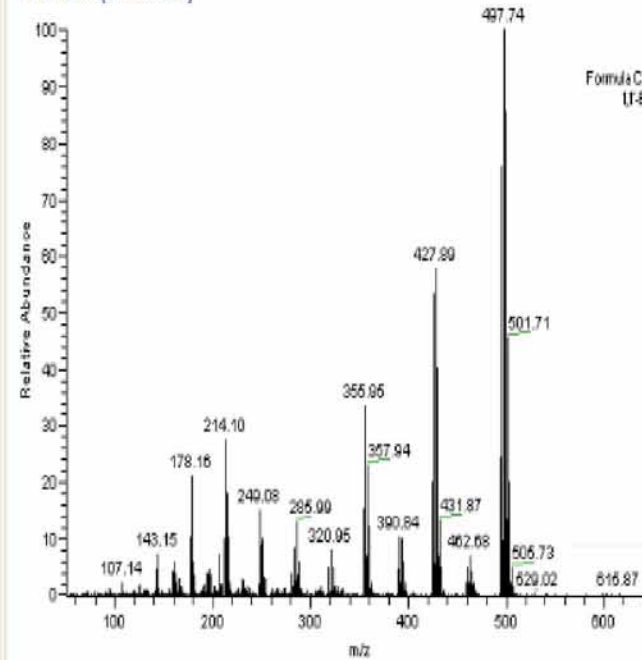


RT: 32.47 - 33.22 SM: 10

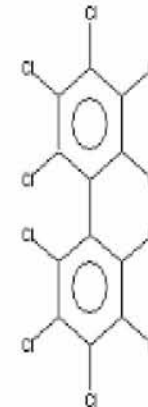


NL:
1.30E0
Base Peak
m/z=
497.50
498.50 F:
MS IC1S
5ng_ml_rep2

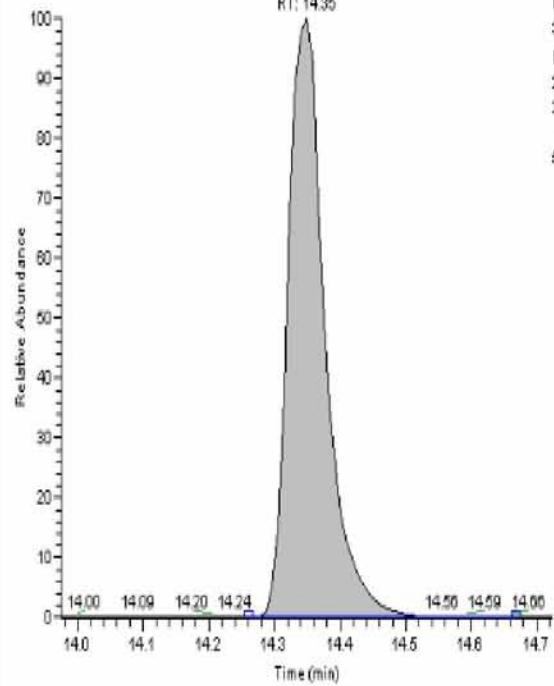
5ng_ml_rep2 #2630 RT: 32.84 AV: 1 NL: 1.30E0
T: + e Full ms [50.00-650.00]



Decachlorobiphenyl
Formula C12Cl10, MW 494, CAS# 2051-24-3, EINEK# 82364
LT-Biphenyl 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decachloro-

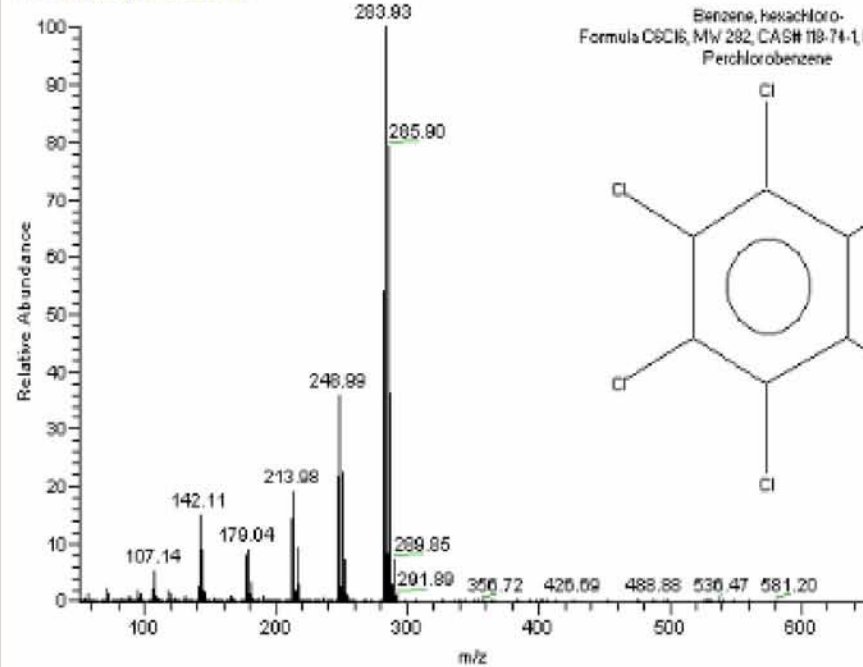


RT: 13.97 - 14.72 SM: 16

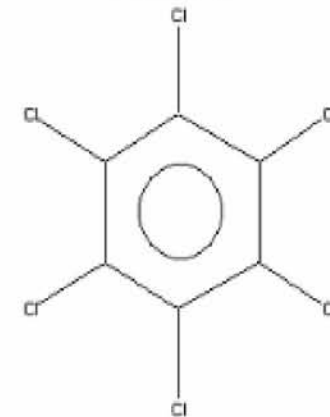


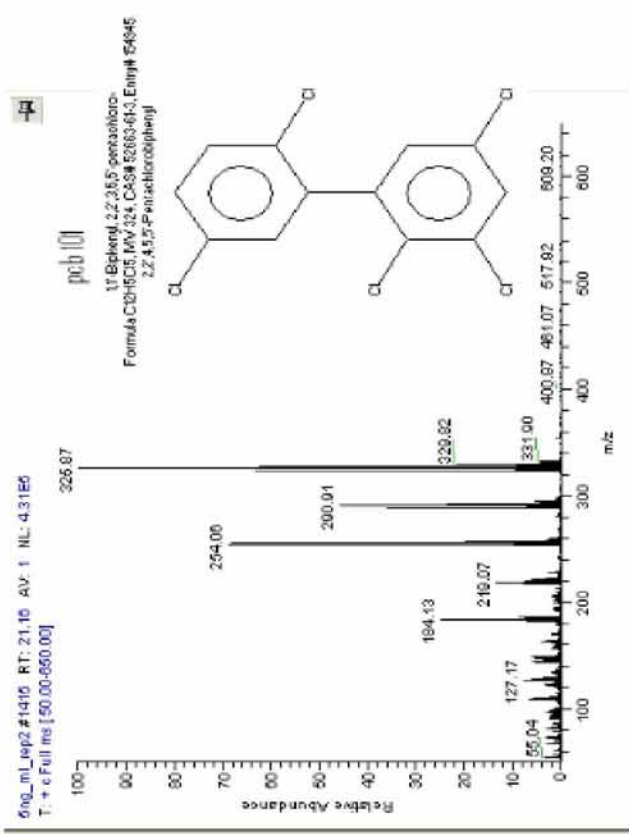
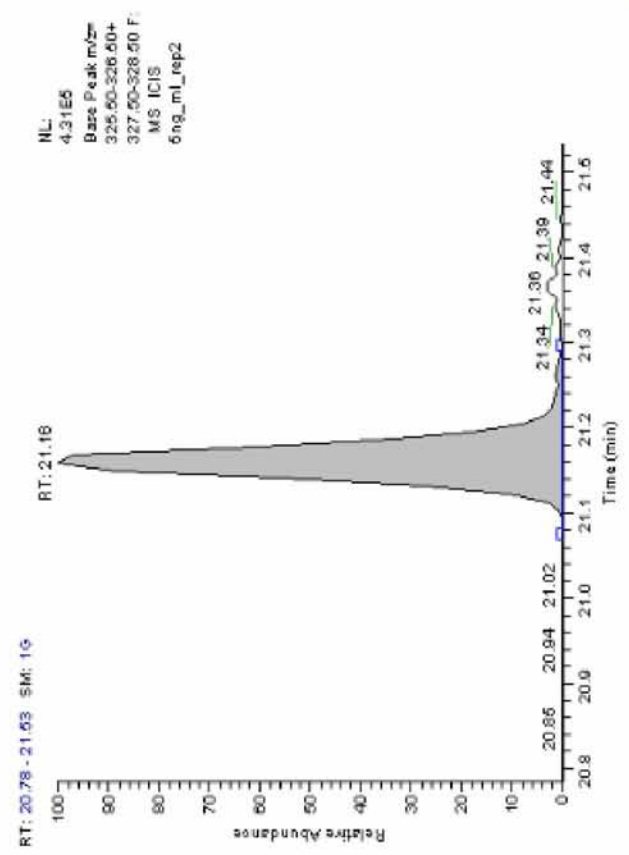
NL:
3.32E8
Base Peak m/z:
293.50-294.50+
285.50-286.50 F:
MS IC15
5ng_ml_rep2

5ng_ml_rep2 #683 RT: 14.35 AV: 1 NL: 3.32E8
T: + e Full ms [50.00-650.00]

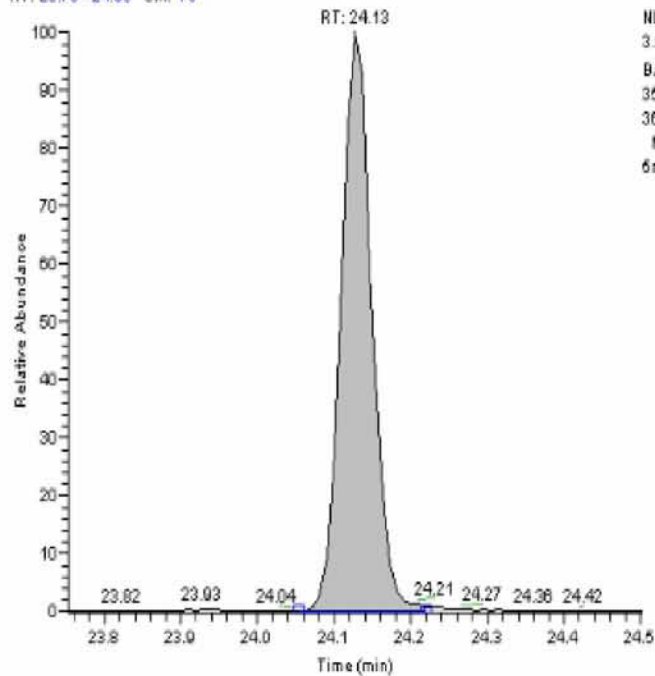


Benzene, hexachloro-
Formula C6Cl6, MW 282, CAS# 118-74-1, Entry# 148461
Perchlorobenzene



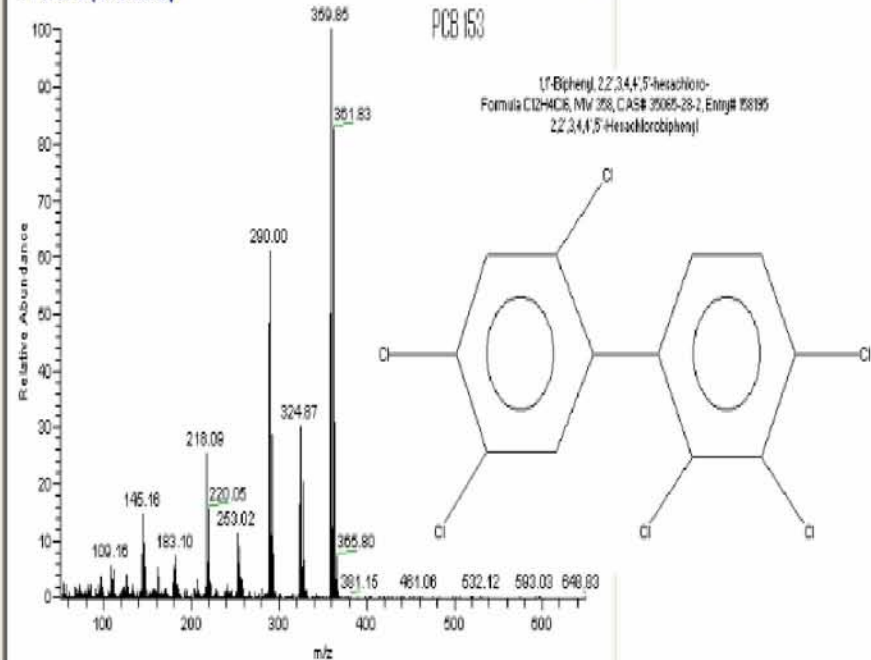


RT: 23.75 - 24.50 SM: 16



NL:
3.93E5
Base Peak m/z:
359.50-360.50+
361.50-362.50 F:
MS ICIS
6ng_ml_rep2

6ng_ml_rep2 #1730 RT: 24.13 AV: 1 NL: 3.93E5
T: + s Full ms [50.00-650.00]



Βιβλιογραφία

[1] **Γ.Βρυώνη, Ι.Ντεβές**, Οργανοχλωριωμένοι υδρογονάνθρακες: Επιπτώσεις στη δημόσια υγεία, Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, 2007

[2] **Max M. Haggblom and Ingeborg D. Bossert**, Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications, pages 3-29, Kluwer Academic Publishers, 2003

[3] **Lubomir I. Simeonov, Fliur Z. Macaev, Biana G. Simeonova**, Environmental , Springer 2012, Published in Cooperation with NATO Emerging Security Challenges Division

[4] **Θωμαΐς Βλαχογιαννάκη και ΑΘ Βαλανίδης**, Δοκιμασίες Τοξικότητας και Οικοτοξικότητας σε Υδρόβιους Οργανισμούς, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2010

[5] **Jung-Ho Kang and Yoon-Seok Chang (2011)**. Organochlorine Pesticides in Human Serum, Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis, Prof. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-460-3, InTech,

Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-strategies-for-pesticides-analysis/organochlorinepesticides-in-human-serum>

[6] <http://www.bio.auth.gr/river/river/theory/unit4/chapte5.htm>

[7] **Galanopoulou, S., Vgenopoulos, A., Conispoliatis, N., 2005**. DDTs and other chlorinated organic pesticides and polychlorinated biphenyls pollution in the surface sediments of Keratsini harbour, Saronikos gulf, Greece. Marine Pollution Bulletin, 50, 520-525.

[8] **Γαλανοπούλου, Σ.**, Ορυκτολογική και Γεωχημική μελέτη θαλάσσιων επιφανειακών θαλασσιών ιζημάτων περιοχής λιμένος Κερατσινίου, Διδακτορική διατριβή. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών, Αθήνα 2005.

[9] **Dana B. Barr**, Biomonitoring of exposure to pesticides, Journal of Chemical Health & Safety 231 1-10, July/August 2008.

[10] <https://www.aadnc-aandc.gc.ca/eng/1100100023458/1100100023475>

[11] **Elena Jurado and Jordi Dachs**, Seasonality in the “grasshopping” and atmospheric residence times of persistent organic pollutants over the

oceans, *GEOPHYSICAL RESEARCH LETTERS*, VOL. 35, L17805, doi:10.1029/2008GL034698, 2008

[12] **Μαρία Ρεκλείτη, Παναγιώτης Κυλούδης**, Φυτοφάρμακα: Οι επιπτώσεις τους στην Υγεία και η Αντιμετώπιση Δηλητηρίασης στη Πρωτοβάθμια Φροντίδα, *Νοσηλευτική* 2012, 51 (4): 364-374, *HellenicJournalofNursing*.

[13] **Stephen M. Roberts, Robert C. James, Phillip L. Williams**, *Principles of Toxicology, Environmental and Industrial Applications*, 3rd edition, Wiley

[14] **Rathinam Xavier, K. Rekha & K.L. Bairy**, Health Perspective of Pesticide Exposure and Dietary Management, *Malaysian Journal of Nutrition* 10(1): 39-51, 2004

[15] **Sara Mostafalou, Mohammad Abdollahi**, Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 15 April 2013, Pages 157–177

[16] **Parron, T., Requena, M., Hernandez, A.F., Alarcon, R., 2011**. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256 (3), 379–385.

[17] **Everett, C.J., Matheson, E.M., 2010**. Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999–2004 national health and nutrition examination survey. *Environ. Int.* 36 (4), 398–401.

[18] **Montgomery, M.P., Kamel, F., Saldana, T.M., Alavanja, M.C., Sandler, D.P., 2008**. Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993–2003. *Am. J. Epidemiol.* 167 (10), 1235–1246.

[19] **Saldana, T.M., Basso, O., Hoppin, J.A., Baird, D.D., Knott, C., Blair, A., Alavanja, M.C., Sandler, D.P., 2007**. Pesticide exposure and self-reported gestational diabetes mellitus in the Agricultural Health Study. *Diabetes Care* 30 (3), 529–534.

[20] **Hernandez, A.F., Parron, T., Alarcon, R., 2011**. Pesticides and asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 11 (2), 90–96.

[21] **Hoppin, J.A., Valcin, M., Henneberger, P.K., Kullman, G.J., Umbach, D.M., London, S.J., Alavanja, M.C., Sandler, D.P., 2007**. Pesticide use and chronic bronchitis among farmers in the Agricultural Health Study. *Am. J. Ind. Med.* 50 (12), 969–979.

[22] Agency for Toxic Substances & Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>

[23] United States Environmental Protection Agency (EPA) www.epa.gov

[24] <http://www.cdc.gov/nceh/tracking/trackbiomon.htm>

[25] **Παπαγεωργίου Αλεξ.**, Πτυχιακή εργασία με θέμα «Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας προσδιορισμού οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και μεταβολιτών τους με αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μαζών», ΜΠΣ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας: Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή, Λάρισα 2010

[26] <http://www.epa.gov/heasd/research/biomonitoring.html>

[27] **Wagida A. Anwar**, «*Biomarkers of Human Exposure to Pesticides*», Environmental Health Perspectives, Vol 105, Supplement 4, June 1997.

[28] Pesticide Action Network: www.panna.org/science/biomonitoring

[29] **Maria G. Margariti, Andreas K. Tsakalof, and Aristidis M. Tsatsakis**, Analytical Methods of Biological Monitoring for Exposure to Pesticides: Recent Update, Ther Drug Monit 2007;29:150–163

[30] **Δεληγιαννάκης Ι., Δήμητρα Χελά, Κωνσταντίνου Ι.**, Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση, Εκδόσεις Τζιόλα 2010

[31] **Θ.Π. Χατζηγιάννου, Μ.Α. Κουμπάρη**, Ενόργανη Ανάλυση, Πανεπιστήμιο Αθηνών 2003

[32] **Γκατζής Δημήτριος**, Πτυχιακή εργασία με θέμα «Ανάπτυξη και εφαρμογή της μεθοδολογίας αέριας χρωματογραφίας – φασματοσκοπίας μαζών στην ανίχνευση υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα», ΜΠΣ Πανεπιστημίου Θεσσαλίας: Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή, Λάρισα 2009

[33] **Supelco Bulletin 928**, Solid Phase Microextraction Troubleshooting Guide

[34] **Ιωάννης Στράτης, Ζαχαριάδης Γεώργιος, Σαμανίδου Βικτωρία, Θεοδωρίδης Γεώργιος**, Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης, Εκδόσεις Ζήτη 2004

[35] **Τσακάλωφ Α.**, Σημειώσεις εγχειριδίου Ενόργανης Περιβαλλοντικής Ανάλυσης του ΜΠΣ: Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή

[36] http://www.chem.uoa.gr/courses/organiki_1/fasm_org/Chapter_12.pdf

[37] http://www.chem.uoa.gr/courses/analtechn/SAT_02_Mass_Spectrometry_pt1.pdf

[38] **Janusz Pawliszyn**, Theory of Solid-Phase Microextraction, Department of Chemistry, University of Waterloo, Waterloo, ON, N2L 3G1, Canada, Journal of Chromatographic Science, Vol.38, July 2000

[39] **Supelco Bulletin 923**, Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions

[40] <http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/additional/LOQ-LOD.pdf>

[41] **Raul Lopez, Fernando Goni, Arsenio Etxandia, Esmeralda Millan,** “*Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection*”, *Journal of Chromatography* 2007.

[42] http://www.chem.uoa.gr/courses/organiki_1/fasm_org/Chapter_12.pdf

[43] http://www.chem.uoa.gr/courses/analtechn/SAT_Aerioxrwmatoграфия2%20_2.pdf

[44] **Penka Shegunova, Jana Klánová, Ivan Holoubek,** «Residues of organochlorinated pesticides in soils from the Czech Republic», *Environmental Pollution*, Volume 146, Issue 1, March 2007, Pages 257–261

[45] **ATSDR** <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>

[46] http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/Intro_GC_2013_03.pdf

[47] **Richard Mayeux,** Biomarkers: Potential Uses and Limitations, *The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, April 2004

[48] **Finnigan XCalibur,** Getting Productive: Qualitative Analysis, Revision A XCALI-97061, Thermo Electron Corporation

