



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΙΘ  
ΣΤΕΤ – Δ  
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΚΑΙ  
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ  
ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΑ  
ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ  
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ-  
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΣΕ ΣΕΙΡΑ**

**ΤΣΑΧΠΙΝΗ ΣΥΜΕΛΛΑ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ  
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΛΟΓΙΑΝΝΗΣ ΣΤΑΥΡΟΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2019**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Διατροφής και Διαιτολογίας του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2018. Αντικείμενο της εργασίας αυτής είναι η ανάπτυξη και η επικύρωση μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης, σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (UPLC-MS/MS), με σκοπό το στοχευμένο προσδιορισμό 12 φθαλικών εστέρων σε δείγματα αποσταγμάτων μικρών αποσταγματοποιών (ή αλλιώς "διημέρων"), τα οποία συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας.

Το σύνολο του πειραματικού μέρους της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Διατροφής καθώς και στο Εργαστήριο του Τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σταύρου Καλογιάννη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Σταύρο Καλογιάννη για την υπόδειξη του θέματος της πτυχιακής εργασίας, την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές του. Επίσης τον ευχαριστώ για τη συμμετοχή του στη συγγραφή της εργασίας, μέσω της κριτικής διόρθωσης, των χρήσιμων επιστημονικών συμβουλών και των πολύτιμων παρατηρήσεών του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Δήμητρα Διαμαντίδου για την άριστη συνεργασία, τις χρήσιμες υποδείξεις και τις σημαντικές επιστημονικές και εργαστηριακές συμβουλές, καθώς και στους Καθηγητές της, κ. Αναστασία-Στέλλα Ζώτου και κ. Γεώργιο Θεοδωρίδη για τη συνεχή βοήθεια και συμβολή τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Όλγα Μπέγου για τη μεγάλη βοήθειά της.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σοφία Μπαλαλά για την άπογη συνεργασία και στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της ερευνητικής εργασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το δώσω στους φίλους και την οικογένειά μου, για τη συνεχή στήριξη και συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια, για το αμείωτο ενδιαφέρον τους και τη συνεχή ηθική και υλική υποστήριξη.

Θεσσαλονίκη, 2019

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φθαλικοί εστέρες αποτελούν χημικά παράγωγα ανθρωπογενούς προέλευσης και απαντώνται σε πλήθος προϊόντων καθημερινής χρήσης, με κυριότερη την εφαρμογή τους ως πλαστικοποιητές σε πολυμερή όπως το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC). Λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους (υδροφοβικότητα κ.α.), μεταναστεύουν εύκολα σε τροφές πλούσιες σε λίπος, καθώς και σε οιοπνευματώδη ποτά με υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη.

Το γεγονός αυτό, παράλληλα με την ισχυρή ενδοκρινική τους δράση, έχει οδηγήσει παγκόσμιους και ευρωπαϊκούς φορείς να κινητοποιηθούν για τη θεσμοθέτηση αρχών προφύλαξης και πρόληψης έτσι, ώστε να πραγματοποιηθεί ο κατά το δυνατόν περιορισμός της έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού στις χημικές αυτές ουσίες.

Στην παρούσα μελέτη, η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν η Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης συζευγμένη με την Φασματομετρία Μαζών, με σκοπό την ανίχνευση 12 φθαλικών εστέρων σε 56 ελληνικά αποστάγματα στεμφύλων (αρωματισμένα ή μη). Οι φθαλικοί εστέρες που προσδιορίστηκαν ήταν οι DMP, DEP, DiPP, DPP, DPhP, BBP, DBP, DPeP, DEHP, DnOP, DiNP, DiDP. Η τεχνική σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή της παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων (MRM), ενώ ο τύπος της Υγρής Χρωματογραφίας ήταν αυτός της Αντίστροφης Φάσης (Reversed Phase Liquid Chromatography). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το H<sub>2</sub>O και μείγμα ACN – MeOH σε αναλογία 50:50% v/v. Το πρόγραμμα της βαθμωτής έκλουσης των διαλυτών ξεκινά με 40% οργανικό διαλύτη και φθάνει στο 100% σε 14 λεπτά, με ροή διαλυτών καθορισμένη στα 250μL/min, αύξηση στα 300μL/min στα 10-14 λεπτά και ξανά μείωση στην αρχική τιμή. Στη συνέχεια, ακολούθησε η επικύρωση της μεθόδου, με έλεγχο της γραμμικότητας, με συντελεστή συσχέτισης  $r \geq 0,9975$ . Τέλος, έλεγχος των ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ), με τιμές να κυμαίνονται από 1,7-33,3μg L<sup>-1</sup> και 5,0-100,0μg L<sup>-1</sup> αντίστοιχα.

Η προτεινόμενη αυτή μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των φθαλικών εστέρων στα αποστάγματα. Μόνο σε τρία δείγματα (27,30,31) ανιχνεύτηκε συγκέντρωση του DEHP μεγαλύτερη από το όριο ειδικής μετανάστευσης που ορίζει η νομοθεσία (Οδηγία 2007/19/EK) (2,39-296mg/L για τον DEHP). Συγκεκριμένα, οι τιμές ανίχνευσης ήταν 93339,53μg L<sup>-1</sup> (27), 68828,67μg L<sup>-1</sup> (30) και 113219,80μg L<sup>-1</sup> (31). Στα δείγματα 36,37,38 έγινε έλεγχος για τον χρόνο παραμονής των αποσταγμάτων σε πλαστικές φιάλες. Οι εστέρες που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ήταν ο DBP και ο DEHP. Ωστόσο, δεν παρατηρείται κάποια σημαντική συσχέτιση της συγκέντρωσης με τον χρόνο παραμονής. Κλείνοντας, σε όλα τα δείγματα, εκτός των 5, 15, 28, 29, 36, 36(1), και 40, ανιχνεύτηκαν συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών. Τέλος, η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος κρίνεται αξιόπιστη για τον έλεγχο ποιότητας ποτών υψηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλες πιθανότητες περιεκτικότητας φθαλικών εστέρων, λόγω της φύσης τους.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΦΘΑΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ.....	8
1.1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ .....	8
1.1.2 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΒΑΣΗ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ.....	9
1.1.3 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ .....	11
1.1.4 ΠΗΓΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΦΘΑΛΙΚΟΥΣ ΕΣΤΕΡΕΣ.....	14
1.1.5 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ .....	16
1.1.6 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ .....	18
1.1.7 ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ .....	20
1.1.8 ΦΘΑΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΑ ΔΙΗΜΕΡΩΝ.....	21
1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ/ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) .....	24
1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	24
1.2.2 ΤΜΗΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HPLC.....	26
1.2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ .....	27
1.2.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (UPLC).....	28
1.2.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ HPLC.....	28
1.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	30
1.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	30
1.3.2 ΤΜΗΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΩΝ .....	30
1.3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	33
1.3.3.1 Φασματομετρία Μαζών σε Σειρά.....	33
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....	37
2.1 ΟΡΓΑΝΑ.....	37
2.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ .....	37
2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	37
2.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ .....	38
2.5 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΩΝ.....	39
2.6 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ESI-MS/MS.....	39
2.7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ .....	42
2.7.1 Επιλογή της Στατικής Φάσης.....	42
2.7.2 Επιλογή της Κινητής Φάσης .....	42
2.7.3 Δοκιμές συστήματος βαθμωτής έκλουσης .....	43

2.8 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ .....	47
2.9 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ.....	47
2.10 ΌΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (LOQ) .....	48
2.11 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ .....	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	52
3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	52
3.2 ΧΑΡΑΞΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΕ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ.....	52
3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ .....	59
3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ .....	60
3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΩΝ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ .....	62
3.6 ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΩΝ .....	71
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	78
Βιβλιογραφία.....	80
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	83

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ

Σύντμηση	Επεξήγηση
ACC	Αμερικανικό Συμβούλιο Χημείας (American Chemistry Council)
BBP	Φθαλικός βενζυλο-βουτυλεστέρας (Benzyl Butyl Phthalate)
CE	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (Collision Energy)
CE-DAD	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση-Ανιχνευτής Παράταξης Φωτοδιόδων (Capillary Electrophoresis-Diode Array Detector)
CI	Χημικός Ιοντισμός (Chemical Ionization)
CNL	Σάρωση για την Ανίχνευση Απώλειας Ουδέτερου Μορίου (Constant Neutral Loss Scan)
CSTEE	Επιστημονική Επιτροπή Τοξικολογίας, Οικοτοξικολογίας και Περιβάλλοντος (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment)
CV	Δυναμικό Κώνου (Cone Voltage)
DBP	Φθαλικός διβουτυλεστέρας (Dibutyl Phthalate)
DEHP	Φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο)εστέρας (Bis-(2-ethylhexyl) Phthalate)
DEP	Φθαλικός διαιθυλεστέρας (Diethyl Phthalate)
DiDP	Φθαλικός δι-ισοδεκυλεστέρας (Diisodecyl Phthalate)
DiNP	Φθαλικός δι-ισοεννεϋλεστέρας (Diisononyl Phthalate)
DiPP	Φθαλικός δι-ισοπροπυλεστέρας (Diisopropyl Phthalate)
DMP	Φθαλικός διμεθυλεστέρας (Dimethyl Phthalate)
DnOP	Φθαλικός δι-n-οκτυλεστέρας (Di-n-octyl Phthalate)
DPeP	Φθαλικός διπεντυλεστέρας (Dipentyl Phthalate)
DPhP	Φθαλικός διφαινυλεστέρας (Diphenyl Phthalate)
DPP	Φθαλικός διπροπυλεστέρας (Dipropyl Phthalate)
ECB	Ευρωπαϊκό Γραφείο Χημικών (European Chemicals Bureau)
EFSA	Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety)
ESI	Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization)

EU	Ευρωπαϊκή Ένωση (European Union)
FAB	Βομβαρδισμός με Ταχεία Άτομα (Fast Atom Bombardment)
FCMs	Υλικά σε Επαφή με τα Τρόφιμα (Food Contact Materials)
FD	Εκρόφησης Πεδίου (Field Desorption)
FI	Ιοντισμού Πεδίου (Field Ionization)
FT	Μετασχηματισμός Fourier (Fourier Transformation)
GC	Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography)
GMP	Σωστές Παρασκευαστικές Πρακτικές (Good Manufacturing Practice)
HILIC	Υγρή Χρωματογραφία Υδροφιλης Αλληλεπίδρασης (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
LOD	Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection)
LOQ	Όριο Ποσοτικού Προσδιορισμού (Limit of Quantification)
MALDI	Ιοντισμός Εκρόφησης με τη βοήθεια Υλικού Μήτρας (Matrix Assisted Desorption Ionization)
MRM	Παρακολούθηση Πολλαπλών Αντιδράσεων Θραυσματοποίησης Ιόντων (Multiple Reaction Monitoring)
MS	Μέση Τιμή Τετραγώνων (Mean Squares)
MS	Φασματομετρία Μαζών (Mass Spectrometry)
MS/MS	Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry)
ODS	Δεκοκτασυλάνιο (Octadecylsilyl)
PAEs	Φθαλικοί Εστέρες (Phthalate Esters)
PD	Εκρόφηση Πλάσματος (Plasma Desorption)
PVC	Πολυβινυλοχλωρίδιο (Polyvinyl Chloride)
RP	Αντίστροφη Φάση (Reversed Phase)
RSD	Σχετική Τυπική Απόκλιση (Relative Standard Deviation)
SCCNFP	Επιστημονική Επιτροπή Καλλυντικών Προϊόντων και Μη Εδώδιμων Προϊόντων Προοριζόμενων για τους Καταναλωτές (Scientific Committee on

	Cosmetics and Non-Food Products)
SD	Τυπική Απόκλιση (Standard Deviation)
SIM	Επιλεκτική Παρακολούθηση Ιόντων (Single Ion Monitoring)
SIMS	Φασματομετρία Μαζών Δευτερογενούς Ιόντος (Secondary Ion Mass Spectroscopy)
SRM	Επιλεκτική Παρακολούθηση Αντίδρασης Θραυσματοποίησης Ιόντων (Single Reaction Monitoring)
SS	Άθροισμα Τετραγώνων (Sum of Squares)
TS	Ιοντισμός με Θερμοψεκασμό (Thermospray Ionization)
U.S. EPA	Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Εθνών (United States Environmental Protection Agency)
UPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography)
Γ.Χ.Κ.	Γενικό Χημείο του Κράτους
EI	Πρόσκρουση Ηλεκτρονίων (Electron Impact)
OEIM/SML	Ειδικά Όρια Μετανάστευσης (Specific Migration Limits)



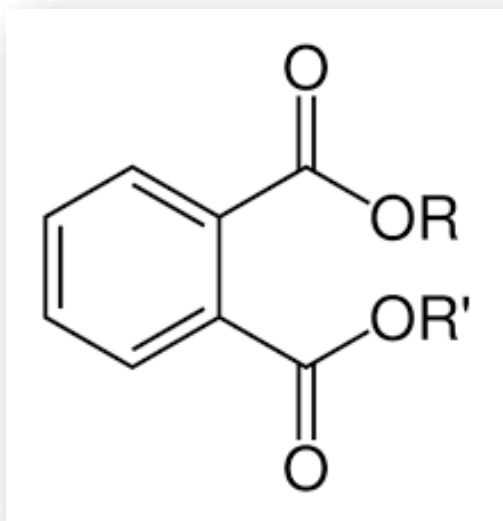
# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΦΘΑΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ

### 1.1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ

Οι φθαλικοί εστέρες είναι εστέρες του 1,2-βενζολυδικαρβοξυλικού οξέος, με πλευρικές ομάδες (OR και OR') που φέρουν από 1-13 άτομα άνθρακα (Εικόνα 1.1). Η δομή του κάθε φθαλικού εστέρα εξαρτάται από τη σύνθεση των αλκοολών από τις οποίες προέρχονται. Οι αλκυλομάδες μπορεί να είναι γραμμικά αλκυλο-ισομερή (linear alkyl isomers), διακλαδισμένα αλκυλο-ισομερή (branched alkyl isomers) ή/και συνδυασμός βενζολικών και γραμμικών ή διακλαδισμένων ισομερών (benzyl and linear or branched isomers). Κάποιοι από αυτούς αναφέρεται ότι έχουν αμυδρά γλυκιά γεύση και άλλοι αμυδρά κίτρινο χρώμα. Είναι χημικά αδρανείς ενώσεις, με μεγάλη πυκνότητα, μικρή έως μέτρια πτητικότητα και μεγάλη διαλυτότητα στους οργανικούς διαλύτες (1). Σε συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος, συναντώνται σε υγρή φυσική κατάσταση.

Στην πράξη, πρόκειται για λιπόφιλες χημικές ενώσεις με πληθώρα χρήσεων, αλλά με κύρια εφαρμογή την χρήση τους ως πλαστικοποιητές στη βιομηχανία, που έχουν την ικανότητα να καθιστούν τα διάφορα πολυμερή εύκαμπτα και μαλακά (2) (3) (4).



Εικόνα 1.1 Δομή Φθαλικού Εστέρα.

### 1.1.2 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΒΑΣΗ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ

Η παραγωγή των φθαλικών εστέρων πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός μονοεστέρα από την αλκοόλυση ενός φθαλικού ανυδρίτη και το δεύτερο τη μετατροπή του μονοεστέρα σε διεστέρα. Η αντίδραση αυτή είναι αντιστρεπτή και το πρώτο στάδιο επιτυγχάνεται γρήγορα και εύκολα, σε αντίθεση με το δεύτερο που απαιτεί περισσότερο χρόνο και την παρουσία καταλύτη (5).

Το Αμερικανικό Συμβούλιο Χημείας κατέταξε τους φθαλικούς εστέρες σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και τα διάφορα φυσικοχημικά και τοξικολογικά ευρήματά τους. Ύστερα από έγκριση της U.S. EPA (2010), τα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν σε επίσημο έγγραφο, που εξετάζει τα επίπεδα επικινδυνότητας των ενώσεων αυτών. Παρ' όλα αυτά, η ίδια ζήτησε την επανεξέταση ορισμένων εστέρων πάνω στον υποβληθέντα αυτό ορισμό. Συνοπτικά, οι PAEs βάση του ορισμού αυτού διακρίνονται (6):

#### 1. Σε αυτούς που έχουν Χαμηλό Μοριακό Βάρος (Κατηγορία 1):

- i. Παράγονται από αλκοόλες με γραμμική αλυσίδα ατόμων  $C_{1-3}$ .
- ii. Έχουν μέτρια πίεση ατμών και υψηλή διαλυτότητα στο νερό.
- iii. Ο ρυθμός φωτοξείδωσής τους είναι αμελητέος έως και αργός.

#### 2. Στους Μεταβατικούς Φθαλικούς Εστέρες (Κατηγορία 2):

- i. Παράγονται από αλκοόλες με γραμμική αλυσίδα ατόμων  $C_{4-6}$ .
- ii. Έχουν χαμηλή πίεση ατμών και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό.
- iii. Ο ρυθμός φωτοξείδωσής τους είναι μέτριος.

#### 3. Σε αυτούς που έχουν Μεγάλο Μοριακό Βάρος (Κατηγορία 3):

- i. Παράγονται από αλκοόλες που έχουν γραμμική αλυσίδα ατόμων  $C_{>7}$  ή μία δομή δακτυλίου.
- ii. Σε πολλές περιπτώσεις αυτής της κατηγορίας οι φθαλικοί εστέρες συνδέονται μεταξύ τους.
- iii. Έχουν αμελητέα έως χαμηλή πίεση ατμών και έχουν την τάση προς χαμηλή διαλυτότητα στο νερό.
- iv. Ο ρυθμός φωτοξείδωσής τους είναι υψηλός.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φθαλικών εστέρων καθορίζουν και την κατανομή τους στο περιβάλλον. Οι βασικότερες είναι **ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού, η διαλυτότητα τους στο νερό και η τάση ατμών τους**. Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ο προσδιορισμός της διαλυτότητας στο νερό για τους περισσότερους υδρόφοβους φθαλικούς εστέρες είναι δύσκολος, καθώς σχηματίζουν με σχετική ευκολία κolloειδή γαλακτώματα και λεπτές μεμβράνες στη διεπιφάνεια αέρα-νερού, μιας που είναι λιγότερο πυκνά σε σχέση με το νερό (2).

Πειραματικά δεδομένα, που υιοθέτησε η German Federal Environmental Agency (2004), φανέρωσαν πως οι φθαλικοί εστέρες με μικρή ανθρακική αλυσίδα έχουν υψηλή διαλυτότητα στο νερό, ενώ οι φθαλικοί εστέρες που φέρουν μεγάλη αλυσίδα ατόμων άνθρακα παρουσιάζουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα και μπορούν να θεωρηθούν έως και αδιάλυτοι. Η μεγάλη διαλυτότητα των φθαλικών εστέρων με μικρή ανθρακική αλυσίδα οδηγεί σε υψηλά επίπεδα τοξικότητας. Αντίθετα, οι φθαλικοί εστέρες με μεγαλύτερη αλυσίδα ατόμων άνθρακα μπορούν να δεσμευτούν ισχυρά στο έδαφος και στα αιωρούμενα σωματίδια του νερού (5). Επιπλέον, δεν καθίστανται διαθέσιμοι για συμμετοχή στις διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις οδηγώντας έτσι σε υποβάθμιση του νερού και του εδάφους (2).

Η μετατροπή και η δέσμευση των ΡΑΕς από το περιβάλλον πραγματοποιούνται με δύο σημαντικές διαδικασίες: την **αβιοτική υποβάθμιση** (abiotic degradation) και τη **βιοαποικοδόμηση** (biodegradation). Στην πρώτη περιλαμβάνονται 1) η υδρόλυση (hydrolysis), 2) η φωτοοξειδωση (photocatalytic oxidation) και 3) η φωτόλυση (photolysis). Σημαντικοί παράγοντες για τις διάφορες αυτές αντιδράσεις είναι η θερμοκρασία, η πίεση, η παρουσία καταλυτών, κ.ά. Η φωτόλυση είναι και ο σημαντικότερος τρόπος αποικοδόμησής τους (7) (8).

Όσον αναφορά τη βιοαποικοδόμηση των ΡΑΕς, αυτή είναι μία πολύ σημαντική διαδικασία. Η έρευνα έχει δείξει ότι ο μεταβολισμός των φθαλικών εστέρων, τόσο κάτω από αερόβιες συνθήκες, όσο και κάτω από αναερόβιες συνθήκες, ξεκινάει με τη βιοαποικοδόμηση του διεστέρα (PDEs) στο σχηματισμό μονοεστέρα (PMEs) και έπειτα σε φθαλικό οξύ (PA). Καταλήγει με την τελική βιοαποικοδόμηση του φθαλικού οξέος σε CO<sub>2</sub> ή/και CH<sub>4</sub> (5). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Jianlong et al. (1996), για τον προσδιορισμό της βιοαποικοδόμησης των φθαλικών εστέρων από την ενεργό ύλη διαπιστώθηκε η γρήγορη βιοαποικοδόμηση του φθαλικού δι-μεθυλεστέρα (DMP) και του φθαλικού δι-βουτυλεστέρα (DBP) και η σχετικά αργή βιοαποικοδόμηση του φθαλικού δι-n- οκτυλεστέρα (DnOP) (9). Αυτό είναι λογικό, καθώς οι φθαλικοί εστέρες με μικρή ανθρακική αλυσίδα μπορούν να βιοδιασπαστούν με ευκολία, ενώ αντίθετα, φθαλικοί εστέρες με μεγάλο μήκος ανθρακικής αλυσίδας είναι λιγότερο επιρρεπείς στη διάσπαση.

Οι ιδιότητες των ΡΑΕς συμπληρώνονται από την European Commission-JRC-Institute for Reference Materials and Measurements (2009) με τη σταθερότητα που παρουσιάζουν στα διάφορα διαλύματα και την αντοχή τους στις υψηλές

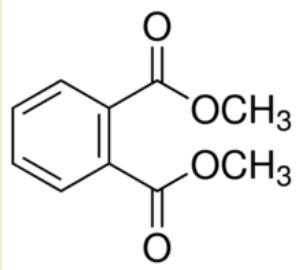
θερμοκρασίες. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από σημείο ζέσεως που κυμαίνεται από 5,5 - 58°C και σημείο βρασμού από 230 - 486°C (5). Τέλος, δεν πρέπει να παραληφθεί και η υψηλή διαλυτότητα που παρουσιάζουν στους οργανικούς διαλύτες.

### 1.1.3 ΕΙΔΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ

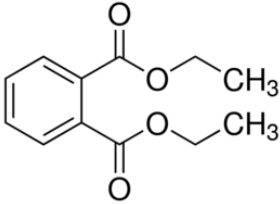
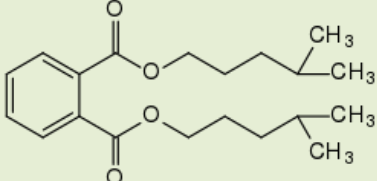
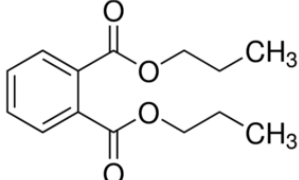
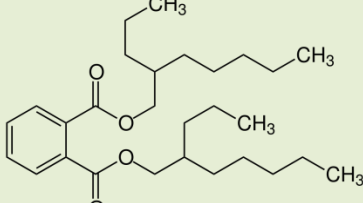
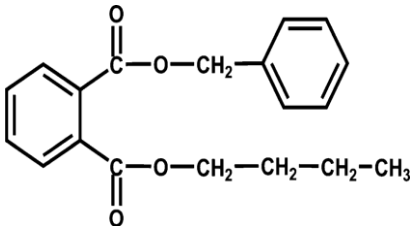
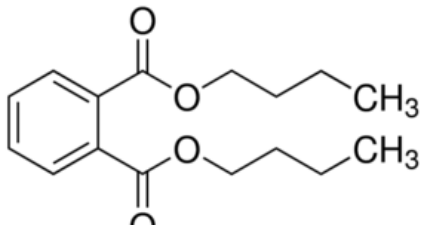
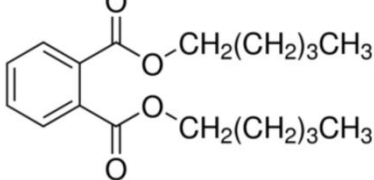
Τα είδη των φθαλικών εστέρων εκτιμάται να είναι πάνω από 60 διαφορετικούς τύπους, γι' αυτό και είναι δύσκολο να απαριθμηθούν (8). Στην συγκεκριμένη μελέτη θα γίνει αναφορά μόνο για τους 12 φθαλικούς εστέρες που μελετήθηκαν στην έρευνα αυτή. Στον Πίνακα 1.2 φαίνονται οι χημικές δομές, οι φυσικοχημικές ιδιότητες και οι συνήθεις εφαρμογές αυτών των ΡΑΕς. Οι φθαλικοί εστέρες που μελετήθηκαν είναι οι εξής:

1. Φθαλικός διμεθυλεστέρας (Dimethyl phthalate, DMP)
2. Φθαλικός διαιθυλεστέρας (diethyl phthalate, DEP)
3. Φθαλικός δι-ισοπροπυλεστέρας (Diisopropyl phthalate, DiPP)
4. Φθαλικός διπροπυλεστέρας (Dipropyl phthalate, DPP)
5. Φθαλικός διφαινυλεστέρας (Diphenyl phthalate, DPhP)
6. Φθαλικός βενζυλοβουτυλεστέρας (Benzyl butyl phthalate, BBP)
7. Φθαλικός διβουτυλεστέρας (Dibutyl phthalate, DBP)
8. Φθαλικός διπεντυλεστέρας (Dipentyl phthalate, DPeP)
9. Φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (Bis-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)
10. Φθαλικός δι-n-οκτυλεστέρας (Di-n-octyl phthalate, DnOP)
11. Φθαλικός δι-ισοεννυλεστέρας (Diisononyl phthalate, DiNP)
12. Φθαλικός δι-ισοδεκυλεστέρας (Diisodecyl phthalate, DiDP)

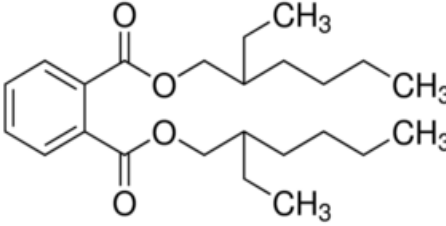
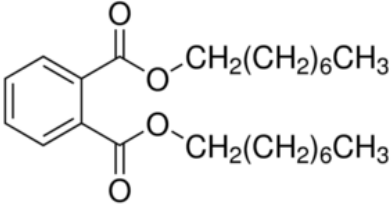
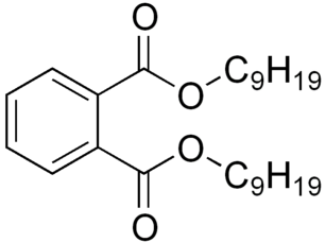
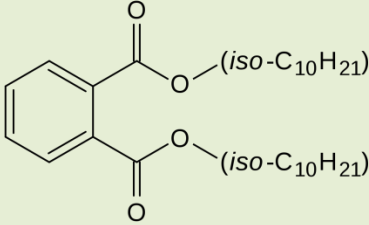
Πίνακας 1.2 Ονομασίες και χημικές δομές των φθαλικών εστέρων που μελετήθηκαν.

Ονομασία	Χημική Δομή	Ιδιότητες/Εφαρμογές
Φθαλικός διμεθυλεστέρας (Dimethyl phthalate, DMP)		Σ.ζ.: 283-284°C, d: 1,19 g/mL. Χρησιμοποιείται ως διαλυτικό (π.χ. βερνίκια νυχιών) και ως πλαστικοποιητής παραγώγων κυτταρίνης. Παλαιότερα χρησιμοποιήθηκε και ως εντομοαπωθητικό.

**Πίνακας 1.2 (συνέχεια)** Ονομασίες και χημικές δομές των φθαλικών εστέρων που μελετήθηκαν.

<p><b>Φθαλικός δαιθυλεστέρας (diethyl phthalate, DEP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 295-302oC, d: 1,12 g/mL. Χρησιμοποιείται κυρίως ως διαλύτης, ως πλαστικοποιητής παραγώγων κυτταρίνης και σε διάφορα καλλυντικά.</p>
<p><b>Φθαλικός δι- ισοπροπυλεστέρας (Diisopropyl phthalate, DiPP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 296°C , d: 1,063 g/mL.</p>
<p><b>Φθαλικός διπροπυλεστέρας (Dipropyl phthalate, DPP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 317-318°C, d: 1,078 g/mL.</p>
<p><b>Φθαλικός διφαινυλεστέρας (Diphenyl phthalate, DPhP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 416°C, d: 1,23 g/mL</p>
<p><b>Φθαλικός βενζυλοβουτυλεστέρας (Benzyl butyl phthalate, BBP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 370oC, d: 1,10 g/mL. Χρησιμοποιείται ως πλαστικοποιητής για είδη PVC, όπως σε "πλίνθους" βινυλίου, πλαστικά δάπεδα, τεχνητό δέρμα, ηλεκτρικά καλώδια και είδη αυτοκινήτου.</p>
<p><b>Φθαλικός διβουτυλεστέρας (Dibutyl phthalate, DBP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 340oC, d: 1,05 g/mL. Χρησιμοποιείται ως διαλύτης, στερεωτικό αρωμάτων, και ως πλαστικοποιητής νιτροκυτταρίνης και πολυ(οξικού βινυλεστέρα).</p>
<p><b>Φθαλικός διπεντυλεστέρας (Dipentyl phthalate, DPeP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 342°C, d: 1,022 g/mL.</p>

**Πίνακας 1.2 (συνέχεια)** Ονομασίες και χημικές δομές των φθαλικών εστέρων που μελετήθηκαν.

<p><b>Φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο) εστέρας (Bis-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 385οC, d: 0,986 g/mL. Είναι ο κυριότερος πλαστικοποιητής εύκαμπτων ειδών από πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) σε περιεκτικότητες από 1% έως 40%. Απαντάται σε ιατρικά είδη (σωλήνες και σάκοι μετάγγισης αίματος) και σε μικρότερες ποσότητες ως διηλεκτρικό υλικό σε αντικατάσταση των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων, αλλά και ως ανενεργό συστατικό σε διάφορα εντομοκτόνα.</p>
<p><b>Φθαλικός δι-n-οκτυλεστέρας (Di-n-octyl phthalate, DnOP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: 390οC, d: 0,978 g/mL. Έχει ουσιαστικά ίδιες εφαρμογές με εκείνες του DEHP, το οποίο παράγεται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες.</p>
<p><b>Φθαλικός δι-ισοεννυλεστέρας (Diisononyl phthalate, DiNP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: &gt; 400οC, d: 0,975 g/mL. Χρησιμοποιείται ως πλαστικοποιητής για είδη από πολυβινυλοχλωρίδιο που θα εκτεθούν σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ηλεκτρικά καλώδια, θερμομονωτικά υλικά και υλικά οροφών, παιδικά παιχνίδια, εσωτερικά πλαστικά αυτοκινήτων και σόλες υποδημάτων.</p>
<p><b>Φθαλικός δι-ισοδεκυλεστέρας (Diisodecyl phthalate, DiDP)</b></p>		<p>Σ.ζ.: &gt; 400οC, d: 0,966 g/mL. Έχει εφαρμογές ανάλογες του DiNP. Χρησιμοποιείται σε σωλήνες ποτίσματος, πλαστικά δάπεδα, καλύμματα τοίχων και κουρτίνες μπάνιου.</p>

#### 1.1.4 ΠΗΓΕΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΦΘΑΛΙΚΟΥΣ ΕΣΤΕΡΕΣ

Η χρήση των ΡΑΕς από τη βιομηχανία είναι ευρέως διαδεδομένη, καθώς προσφέρουν μεγάλη ελαστικότητα και ανθεκτικότητα στα υλικά που εφαρμόζονται (8). Όταν οι φθαλικοί εστέρες ενσωματώνονται στα διάφορα πολυμερή επιτρέπουν στα μακρομόριά τους να ολισθαίνουν το ένα παράλληλα με το άλλο δημιουργώντας έτσι, την απαραίτητη ευκαμψία και πλαστικότητα. Το PVC περιέχει στο 50% του φθαλικούς εστέρες. Επειδή, όμως, οι πλαστικοποιητές δεν δεσμεύονται στα πολυμερή του PVC (ασθενής πρόσδεση, δεσμοί Van der Waals), έχουν την τάση να διαχέονται στην ατμόσφαιρα, το νερό, την τροφή, τη σκόνη, το έδαφος και τους μικροοργανισμούς προκαλώντας, με αυτόν τον τρόπο, τοξικότητες. Αξίζει να αναφερθεί, επίσης, ότι το **95%** του παραγόμενου φθαλικού εστέρα **DEHP** χρησιμοποιείται για την πλαστικοποίηση διαφόρων ειδών PVC. Τα υλικά αυτά μπορεί να είναι παιδικά παιχνίδια, οικιακά σκεύη, συσκευασίες τροφίμων, δοχεία τροφίμων, προστατευτικά σωληνώσεων και ιατρικά είδη. Ειδικότερα για τη συσκευασία των τροφίμων, η εφαρμογή των φθαλικών εστέρων για την πλαστικοποίηση του PVC έχει το μειονέκτημα ότι, οι ενώσεις αυτές μπορούν να μεταναστεύσουν στο τρόφιμο και επίσης μπορούν να εξατμιστούν κατά τη διάρκεια παρατεταμένης συντήρησής του, με αποτέλεσμα το πολυμερές να γίνεται εύθρυπτο.

Η U.S.EPA, το 2007, διεξήγαγε έρευνα στην οποία παρουσιάζει την επικινδυνότητα των ΡΑΕς με βάση την πηγή έκθεσης τους στα μικρά παιδιά. Έτσι, ο υψηλότερος κίνδυνος επαφής των παιδιών με τους φθαλικούς εστέρες είναι η διατροφή, ακολουθεί ένας μέσος κίνδυνος από την επαφή με το δέρμα, ενώ το εξωτερικό και εσωτερικό περιβάλλον αποτελούν τον χαμηλότερο κίνδυνο.

Όσον αφορά τη **διατροφή**, πληθώρα εργαστηριακών πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν σε τρόφιμα που καταναλώνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, αναδεικνύει τη σημαντική προσπάθεια που κάνουν οι ερευνητές, ώστε να αφυπνιστούν οι καταναλωτές πάνω στις πιθανές επιμολύνσεις που υφίστανται τα τρόφιμα από σοβαρούς ρυπαντές όπως οι φθαλικοί εστέρες. Όπως αναφέρθηκε από την Jarosova (2006), επειδή πρόκειται για λιπόφιλες χημικές ενώσεις, η διείσδυσή τους σε τροφές πλούσιες σε λίπος καθίσταται πολύ εύκολη (4). Έτσι, από την έρευνα των Fierens et al. (2012), που πραγματοποιήθηκε σε ένα σύνολο δειγμάτων (400 σε αριθμό), το 81% περιείχε το φθαλικό εστέρα DEHP, αμέσως μετά ακολουθούσαν οι DBP και BBP, ενώ σπάνια εμφανίζονταν οι DMP, DEP και DnOP. Ο Πίνακας 1.3 καταγράφει τον αριθμό των τροφίμων και των υλικών συσκευασίας που βρέθηκαν θετικά στην ύπαρξη φθαλικών εστέρων (10).

**Πίνακας 1.3:** Τρόφιμα και υλικά συσκευασίας που βρέθηκαν θετικά στην παρουσία φθαλικών εστέρων (10).

ΟΜΑΔΑ	DMP	DEP	DiBP	DnBP	BBP	DEHP	DCHP	DnOP
<b>Φρούτα και Λαχανικά (27)</b>	11	4	18	21	11	13	2	6
<b>Γαλακτοκομικά προϊόντα (56)</b>	2	11	43	43	15	52	30	3
<b>Δημητριακά (47)</b>	13	26	44	35	38	45	6	20
<b>Κρεατικά (22)</b>	13	4	19	14	3	22	22	6
<b>Ψαρικά (18)</b>	9	10	8	8	4	17	1	4
<b>Λίπη και λάδια (26)</b>	4	6	8	4	22	18	1	0
<b>Snacks (28)</b>	3	9	25	24	17	26	4	4
<b>Καρυκεύματα και σάλτσες (40)</b>	13	7	23	29	34	39	5	7
<b>Διάφορα (22)</b>	8	4	19	14	19	15	4	7
<b>Παιδικές τροφές (17)</b>	4	9	17	17	15	16	6	10
<b>Ποτά (85)</b>	45	30	65	56	45	48	10	19
<b>Υλικά συσκευασίας (12)</b>	3	7	10	10	10	12	6	2
<b>Σύνολο (400)</b>	128	127	299	275	233	323	97	88
<b>Σύνολο (%)</b>	32	32	75	69	58	81	24	22

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, τα **αλκοολούχα ποτά** είχαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε φθαλικούς εστέρες. Σε πειράματα που διεξήχθησαν σε εργαστήρια στην Κίνα αποδείχθηκε πως, όσο υψηλότερη αλκοόλη φέρει το αλκοολούχο ποτό, τόσο μεγαλύτερη είναι και η μόλυνσή του από τους συγκεκριμένους πλαστικοποιητές. Ενδιαφέρουσα ήταν η έρευνα που πραγματοποίησαν οι Fan et al. (2014), οι οποίοι προσπάθησαν να ανιχνεύσουν φθαλικούς εστέρες, όχι μόνο σε αλκοολούχα ποτά, αλλά και σε ερυθρούς οίνους. Έτσι, διαπιστώθηκε η παρουσία PAEs, κυρίως στα αλκοολούχα ποτά, με τον DBP να ξεπερνάει σε ορισμένες περιπτώσεις το όριο ειδικής μετανάστευσης. Η διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των φθαλικών εστέρων, μεταξύ των αλκοολούχων ποτών και των οίνων εξηγείται για τους μεν οίνους, κυρίως λόγω της χρήσης δρύινων βαρελιών, καθώς και ανοξειδωτών δεξαμενών κατά την οινοποίηση, ενώ για τα αποστάγματα η χρήση πλαστικών σωληνώσεων και δεξαμενών, καθώς και πλαστικών πωμάτων είναι πιο διαδεδομένη (11).

Οι φθαλικοί εστέρες μπορούν να μεταφερθούν στον ανθρώπινο οργανισμό και μέσω του **δέρματος**. Η χρήση καλλυντικών, lotions, αρωμάτων, εντομοαπωθητικών κ.α προκαλούν την άμεση επαφή των PAEs με το δέρμα, με αποτέλεσμα να εισέρχονται στο σώμα (8). Οι φθαλικοί εστέρες χαμηλού μοριακού βάρους (π.χ. οι DEP, DBP και



BBP) φαίνεται πως είναι, κατά κύριο λόγο, υπεύθυνοι για τον κίνδυνο πρόκλησης τοξικοτήτων μιας τέτοιου είδους έκθεσης, εξαιτίας της εφαρμογής τους ως διαλύτες για την συγκράτηση του χρώματος αλλά και του αρώματος διαφόρων προϊόντων προσωπικής φροντίδας.

Πηγές φθαλικών εστέρων, όπως αναφέρθηκε, μπορούν να αποτελέσουν το εσωτερικό και το εξωτερικό περιβάλλον. Οι PAEs εισέρχονται στο περιβάλλον λιγότερο μέσω της παραγωγής και δημιουργίας τους και περισσότερο μέσω της απελευθέρωσης, της μετανάστευσης και πτητικότητας κατά τη χρήση και απόθεση των διαφόρων προϊόντων που τους περιέχουν (2).

Με την έννοια του **εσωτερικού περιβάλλοντος** γίνεται αναφορά στα οικοδομικά υλικά, στα ηλεκτρικά καλώδια, στα παρκέ, στα βερνίκια που χρησιμοποιούνται κατά το βάψιμο των σπιτιών, αλλά και σε διάφορες άλλες ύλες που φέρουν φθαλικούς εστέρες (8). Έτσι, ο χώρος συγκεντρώνει ποσότητες PAEs εκφρασμένων σε οικιακή σκόνη, που διαχέονται στην εσωτερική ατμόσφαιρα του σπιτιού με αποτέλεσμα να εισπνέονται από τον άνθρωπο.

Με την έννοια του **εξωτερικού περιβάλλοντος** γίνεται αναφορά στην περιβάλλουσα ατμόσφαιρα και κυρίως αυτήν που βρίσκεται γύρω από βιομηχανικές περιοχές. Τα εργοστάσια απελευθερώνουν φθαλικούς εστέρες μέσω των αποβλήτων τους, τα οποία διαχέονται στην ατμόσφαιρα και έρχονται σε επαφή με το έδαφος και το νερό. Το έδαφος και το υπέδαφος προσροφούν τους φθαλικούς εστέρες, οι οποίοι σπάνια εκλύονται και εξατμίζονται από τα υπόγεια ύδατα, ενώ όταν έρχονται σε επαφή με το νερό, το υποβαθμίζουν. Τέλος, κάποιοι PAEs, όπως ο DEHP, έχουν την ικανότητα να βιοσυγκεντρώνονται στο υδάτινο οικοσύστημα με αποτέλεσμα την πρόκληση δευτερογενών δηλητηριάσεων (ως μέσο πρόσληψης από την τροφική αλυσίδα).

### **1.1.5 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ**

Κατά καιρούς έχουν διεξαχθεί ποικίλες έρευνες, μακροπρόθεσμες και βραχυπρόθεσμες, από διάφορες υπηρεσίες, οι οποίες καταδεικνύουν τις δυσμενείς επιδράσεις των PAEs και έχουν ως κύριο σκοπό την αξιολόγηση του κινδύνου αυτών των ουσιών. Οι υπηρεσίες αυτές είναι είτε ευρωπαϊκές είτε αμερικάνικες όπως οι: ECB (2004), EFSA (2004), CSTE (1998, 2004), ATSDR (1995, 1997, 2001, 2002), NTP-CERHR (2000, 2003, 2005), IARC (2000) και η U.S EPA. Το κύριο μειονέκτημα των ερευνών αυτών είναι ότι πραγματοποιήθηκαν σε πειραματόζωα, με αποτέλεσμα να υπάρχουν ελλιπή στοιχεία για την επικινδυνότητα των PAEs στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι, η πειραματική προσπάθεια εστιάζεται στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη σύγκρισή τους με μία πιθανή έκθεση του ανθρώπου σ' αυτές.

Έρευνες σε τρωκτικά έχουν δείξει αρνητικές επιδράσεις των PAEs στο συκώτι, τα νεφρά και για κάποιες ενώσεις στο θυρεοειδή αδένος, ανάλογα με το βαθμό έκθεσης.

Επιπλέον, διαφορετικά αποτελέσματα υπήρξαν μεταξύ διαφορετικών ειδών και μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων (12). Σε πειράματα που διεξήχθησαν στο παρελθόν παρατηρήθηκε πως, οι φθαλικοί εστέρες επιδρούν στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών, μέσω της μείωσης της τεστοστερόνης, που είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη των αναπαραγωγικών τους οργάνων (8) (12). Η επίδραση αυτή είναι γνωστή και ως **φθαλικό σύνδρομο**. Ακόμα, γίνεται αναφορά στην πρόκληση αναπαραγωγικών δυσπλασιών στα αρσενικά όργανα, μειωμένη γονιμότητα και καταστροφή του σπέρματος (4) (12). Στα θηλυκά, μπορούν να αναπτυχθούν ασθένειες στο αναπαραγωγικό τους σύστημα. Άλλες δυσμενείς επιδράσεις που έχουν καταγραφεί είναι: η πρόκληση πρόωρης εφηβείας, άσθματος, θυρεοειδούς, καρκινογενέσεις, ηπατοτοξικότητα, εμβρυοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα και τερατογενέσεις (4). Επίσης, η δράση των φθαλικών εστέρων ως **ενδοκρινικών διαταρακτών** έχει τονιστεί ιδιαίτερα, καθώς έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο ενδοκρινικό σύστημα του ανθρώπου και να επηρεάζουν το σύστημα της ανάπτυξης, της αναπαραγωγικής ανάπτυξης και τις φυσιολογικές λειτουργίες των ατόμων, αρσενικών και θηλυκών (4) (12).

Παρόλο που η συνάφεια της έκθεσης των πειραματόζων σε ΡΑΕς είναι δύσκολο να συγκριθεί και να αξιολογηθεί με την αντίστοιχη στον άνθρωπο, διότι η πληθώρα των αποτελεσμάτων που προέκυψε ήταν με δόσεις σχετικά υψηλές στον επιβλαβή παράγοντα και σε ένα τρόπο μεταβολισμού πολύ διαφορετικό, αξίζει να σημειωθεί ότι το ηλικιακό στάδιο παίζει σημαντικό ρόλο στην επίδραση των φθαλικών εστέρων στα άτομα. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε με βάση την ημερήσια πρόσληψη DEHP σε διάφορα ηλικιακά στάδια στον Καναδά οδήγησε στα εξής αποτελέσματα: 9μg/kg/ημέρα για τα βρέφη, 19μg/kg/ημέρα για τα νήπια, 14μg/kg/ημέρα για τα παιδιά και 6μg/kg/ημέρα για τους ενήλικες (12). Έτσι, αναφέρεται πως στο εμβρυακό στάδιο η μακρόχρονη έκθεση στον επιβλαβή παράγοντα έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη αναπαραγωγική του ανάπτυξη, διότι στο στάδιο αυτό αναπτύσσεται το αναπαραγωγικό σύστημα του ατόμου.

Ο πιο αξιόπιστος βιοδείκτης έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού σε φθαλικούς εστέρες αποτελεί η χημική ανάλυση ούρων για την ανίχνευση του μονοεστέρα και των οξειδωτικών μεταβολιτών. Χρησιμοποιείται, κυρίως, από επιδημιολογικές μελέτες που αφορούν τις επιπτώσεις των ενώσεων αυτών στην ανθρώπινη υγεία. Καθώς αυτός ο τρόπος ανάλυσης περικλείει όλους τους τρόπους με τους οποίους ο ανθρώπινος οργανισμός έρχεται σε επαφή με τους ΡΑΕς κρίνεται σημαντικό να τονιστεί πως, η κάθε φθαλική ένωση μπορεί να προέρχεται είτε από την επαφή του ανθρώπου με είδη καλλυντικών, είτε μέσω της διατροφής κ.α. Αξιοσημείωτες είναι μελέτες, οι οποίες αφορούσαν την ανίχνευση 30 φθαλικών εστέρων κατά την περίοδο της νηστείας στον ανθρώπινο οργανισμό, συμπεραίνουν ότι οι συγκεντρώσεις του φθαλικού εστέρα DEHP που μετρήθηκαν σε ούρα ατόμων, ήταν πολύ χαμηλότερες από αυτές πριν από τη νηστεία. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις του BBP παρέμειναν στα ίδια επίπεδα, πράγμα που σημαίνει πως η πηγή τους δεν αφορούσε τη διατροφή.

Τέλος, η τοξικότητα των ουσιών αυτών διακρίνεται σε οξεία ή χρόνια και εξαρτάται από τη μορφή ή τον χρόνο εμφάνισης της επιβλαβούς δράσης. Οι επιδράσεις της οξείας τοξικότητας εμφανίζονται αμέσως, σε λίγες ώρες ή μέρες, και μετρώνται ποσοτικά με την ED<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>, TD<sub>50</sub> και την LT<sub>50</sub>. Από την άλλη, οι επιδράσεις της χρόνιας τοξικότητας εμφανίζονται μετά από πολλές μέρες ή χρόνια και μετρώνται ποσοτικά με τις ADI ή TDI. Επιπλέον, η τιμή NOAEL, η ARFD ή RfD και η MRLs αποτελούν πρόσθετες παραμέτρους που εκφράζουν ποσοτικά την τοξικότητα.

### 1.1.6 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ

Οι σχετικές οδηγίες και κανονισμοί, που θεσπίζονται τόσο από την Ε.Ε. όσο και από διεθνείς επιτροπές για την χρήση και την εφαρμογή των φθαλικών εστέρων, καθορίζονται από τις υπηρεσίες αξιολόγησης κινδύνου και έτσι οι τιμές της κάθε ουσίας μπορεί να διαφέρουν από χώρα σε χώρα. Οι απαγορεύσεις για τους ΡΑΕς σε πλαστικά παιχνίδια και άλλα υλικά είναι αρκετές. Ωστόσο, στην παρούσα εργασία ενδιαφέρει κυρίως η νομοθεσία που καλύπτει την καταλληλότητα των πλαστικοποιητών, όταν εφαρμόζονται σε πλαστικές συσκευασίες οι οποίες έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, καθώς και οποιαδήποτε οδηγία αφορά την επαφή των τροφίμων, και συγκεκριμένα των αλκοολούχων ποτών, με πλαστικά είδη.

Η Οδηγία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Νο 1935/2004 της 27ης Οκτωβρίου του 2004 αναφέρει ότι «τα αντικείμενα και τα υλικά θα πρέπει να παρασκευάζονται σε συμμόρφωση των σωστών παρασκευαστικών πρακτικών (Good Manufacturing Practice ή αλλιώς GMP) έτσι ώστε, κάτω από φυσικές ή εφικτές συνθήκες χρήσης να μην μεταφέρουν συστατικά στα τρόφιμα σε ποσότητες οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν:

1. Κίνδυνο στην ανθρώπινη υγεία ή
2. Να επιφέρουν μη-αποδεκτή μεταβολή της σύνθεσης του τροφίμου ή
3. Να επιφέρουν αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου.

Σύμφωνα, τώρα, με την οδηγία της Ε.Ε. Νο 10/2011 της 14ης Ιανουαρίου του 2014 ορίστηκαν περιορισμοί για τα πλαστικά τα οποία έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, γνωστά ως FCMs (Food Contact Materials). Για να καθοριστεί και να διασφαλιστεί η καταλληλότητα των FCMs χρησιμοποιούνται τα όρια μετανάστευσης (Migration Limits), τα οποία ορίζουν την μέγιστη ποσότητα ουσιών που επιτρέπεται να μεταναστεύσει από τη πλαστική συσκευασία στο τρόφιμο. Η EFSA καθιέρωσε τα Ειδικά Όρια Μετανάστευσης (Specific Migration Limits, SML) βασισμένα στα τοξικολογικά δεδομένα της κάθε ουσίας. Επιπλέον, γίνεται λόγος και για τα Ολικά Όρια Μετανάστευσης (Overall Migration Limits, OML), τα οποία ορίζονται ως, το σύνολο των ουσιών που μπορούν να μεταναστεύσουν από μία πλαστική συσκευασία στα τρόφιμα. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2007) συνέστησε στα κράτη-μέλη της την απαγόρευση της παραγωγής και εισαγωγής των φθαλικών εστέρων DBP, BBP και

DEHP στην Κοινότητα των πλαστικών ειδών που πρόκειται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα, όταν δεν συμμορφώνονται με τους περιορισμούς και τις προδιαγραφές που οφείλουν να πληρούν. Σύμφωνα με την Οδηγία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Νο 19/2007 της 30ης Μαρτίου 2007, δίνονται στον Πίνακα 1.4 οι περιορισμοί ή/και οι προδιαγραφές για τους φθαλικούς εστέρες.

**Πίνακας 1.4** Περιορισμοί και προδιαγραφές για τους φθαλικούς εστέρες σύμφωνα με την Οδηγία 2007/19/EK.

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ Ή/ΚΑΙ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ
<b>BBP</b>	<p>Να χρησιμοποιείται μόνον ως:</p> <p>α) Πλαστικοποιητής για υλικά και αντικείμενα επανειλημμένης χρήσης.</p> <p>β) Πλαστικοποιητής και υλικά αντικείμενα μιας χρήσης που έρχονται σε επαφή με μη λιπαρά τρόφιμα εκτός από τα παρασκευάσματα για βρέφη και τα παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας όπως ορίζονται από την οδηγία 91/321/ΕΟΚ και για προϊόντα σύμφωνα με την οδηγία 96/5/ΕΚ.</p> <p>γ) Παράγων τεχνικής υποστήριξης σε συγκεντρώσεις μέχρι 0,1 % στο τελικό προϊόν.</p> <p>10ΕΙΜ = 30 mg/kg προσομοιωτή τροφίμων.</p>
<b>DEHP</b>	<p>Να χρησιμοποιείται μόνον ως:</p> <p>α) Πλαστικοποιητής για υλικά και αντικείμενα επανειλημμένης χρήσης που έρχονται σε επαφή με μη λιπαρά τρόφιμα.</p> <p>β) Παράγων τεχνικής υποστήριξης σε συγκεντρώσεις μέχρι 0,1 % στο τελικό προϊόν.</p> <p>0ΕΙΜ = 1,5 mg/kg προσομοιωτή τροφίμων.</p>
<b>DBP</b>	<p>Να χρησιμοποιείται μόνον ως:</p> <p>α) Πλαστικοποιητής για υλικά και αντικείμενα επανειλημμένης χρήσης που έρχονται σε επαφή με μη λιπαρά τρόφιμα.</p> <p>β) Παράγων τεχνικής υποστήριξης σε πολυολεφίνες σε συγκεντρώσεις μέχρι 0,05 % στο τελικό προϊόν.</p> <p>0ΕΙΜ = 0,3 mg/kg προσομοιωτή τροφίμων.</p>
<p><b>Διεστέρες που προέρχονται από πρωτοταγείς, κεκορεσμένες διακλαδισμένες αλκοόλες C8-C10, άνω του 60 % C9</b></p> <p><b>Διεστέρες που προέρχονται από πρωτοταγείς, κεκορεσμένες</b></p>	<p>Να χρησιμοποιούνται μόνον ως:</p> <p>α) Πλαστικοποιητές για υλικά και αντικείμενα επανειλημμένης χρήσης.</p> <p>β) Πλαστικοποιητές για υλικά και αντικείμενα μιας χρήσης που έρχονται σε επαφή με μη λιπαρά τρόφιμα εκτός από τα παρασκευάσματα για βρέφη και τα</p>

<p><b>διακλαδισμένες αλκοόλες C9-C11, άνω του 60 % C10</b></p>	<p>παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, όπως ορίζονται από την οδηγία 91/321/ΕΟΚ και για προϊόντα σύμφωνα με την οδηγία 96/5/ΕΚ·</p> <p>γ) ) Παράγοντες τεχνικής υποστήριξης σε συγκεντρώσεις μέχρι 0,1 % στο τελικό προϊόν.</p> <p>OEIM = 9 mg/kg προσομοιωτή τροφίμων.</p>
--	---

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία και ανατρέχοντας στο ΦΕΚ (2007): «τα αλκοολούχα ποτά είτε προορίζονται για την εγχώρια κατανάλωση ή για αποστολή σε άλλο κράτος-μέλος, είτε προορίζονται για εξαγωγή σε τρίτη χώρα, τοποθετούνται αποκλειστικά και μόνον σε φιάλες ή δοχεία γυάλινα, πήλινα με εφυαλωμένη την εσωτερική τους επιφάνεια, από πορσελάνη, φαβεντιανά, ως και από κατάλληλο ξύλο (τσότρες). Το υλικό κατασκευής των κατά τα ανωτέρω μέσων προσυσκευασίας των αλκοολούχων ποτών πρέπει να πληροί τους όρους και προδιαγραφές που προβλέπονται από τις σχετικές διατάξεις του Κώδικα Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής χρήσης. Απαγορεύεται η καθιοιονδήποτε τρόπο διάθεση των αλκοολούχων ποτών εντός προσυσκευασίας από οποιαδήποτε πλαστική ύλη, έστω και επιτρεπόμενη από τις σχετικές διατάξεις του Κώδικα Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης. Κατ' εξαίρεση και μόνον ύστερα από την προηγούμενη ειδική προς τούτο άδεια της αρμόδιας Διεύθυνσης της Γενικής Διεύθυνσης του Γενικό Χημείο του Κράτους, μπορεί να επιτρέπεται η τοποθέτηση των κατά τα ανωτέρω αλκοολούχων ποτών σε φιάλες ή δοχεία: από καθαρό αργίλιο επικαλυμμένο με κατάλληλο επίχρισμα ή πλαστική ύλη και από πολυτερεφθαλικόαιθυλεστέρα (PET). Κατ' εξαίρεση επίσης, τα πώματα των φιαλών μπορεί να είναι κατασκευασμένα από ειδική πλαστική ύλη υπό την αποκλειστική προϋπόθεση της λήψεως, κατά περίπτωση, προ της χρησιμοποίησής τους, ειδικής προς τούτο αδείας από την αρμόδια Διεύθυνση της Γενικής Διεύθυνσης του Γενικό Χημείο του Κράτους τηρουμένης αναλόγως της αυτής ως άνω διαδικασίας ή της σχετικής προς τούτο εγκρίσεως του Ανωτάτου Χημικού Συμβουλίου. Κατ' εξαίρεση επίσης, η αποθήκευση των αλκοολούχων ποτών ή η μεταφορά τους για επεξεργασία ή εμφιάλωση μπορεί να ενεργείται εντός δοχείων ή βαρελιών ή δεξαμενών από κατάλληλο ανοξείδωτο μέταλλο ή ξύλο κατάλληλο για τους σκοπούς αυτούς» (ΦΕΚ1634, 2007).

### 1.1.7 ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ

Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού πλαστικοποιητή είναι τα εξής: άοσμος, άχρωμος, ανθεκτικός στο νερό, στο φώς, στη θερμότητα και το κρύο, ουδέτερος, μη τοξικός, με χαμηλή αναφλεξιμότητα και πτητικότητα (2). Με βάση αυτά, η αντικατάσταση των φθαλικών εστέρων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. Παρ' όλα αυτά, για κάποιους από αυτούς δεν έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες, οπότε θα ακολουθήσει μία απλή αναφορά:

1. Χημικοί αντικαταστάτες των ΡΑΕς.
2. Πλαστικά χωρίς απαιτούμενο πλαστικοποιητή.
3. Πλαστικά που προέρχονται από φυτικά μέρη ή από μείγμα με βάση φυτικά μέρη και παραγώγων πετρελαίου.

Όσον αναφορά τους πρώτους, πρόκειται για πλαστικοποιητές με ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των ΡΑΕς, δηλαδή μπορούν και λειτουργούν ως στερεωτικά, ως διαλύτες και δεν δεσμεύονται από τα πολυμερή και σε αυτούς ανήκουν τα: κιτρικά, σεβακικά, αδιπικά και φωσφορικά. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα πλαστικά που παράγονται από παράγωγα πετρελαίου. Ειδικότερα για τη συσκευασία των τροφίμων ανήκει κυρίως το τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (ΡΕΤ), ιδανικός και στην περίπτωση των φιαλών. Τέλος, σχετικά με τους τελευταίους, τέτοια φυτικά μέρη μπορεί να προέρχονται από το καλαμπόκι, τη σόγια, το σιτάρι, το ρύζι και το λιναρόσπορο. Στην κατηγορία αυτών των πλαστικών δεν έχει αναφερθεί οποιαδήποτε εφαρμογή στη συσκευασία των τροφίμων, οπότε δεν υπάρχουν και τα ανάλογα παραδείγματα.

#### 1.1.8 ΦΘΑΛΙΚΟΙ ΕΣΤΕΡΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΑ ΔΙΗΜΕΡΩΝ

Διήμεροι ή μικροί αποσταγματοποιοί καλούνται οι αμπελοκαλλιεργητές που εργάζονται με απλούς άμβυκες χωρητικότητας μέχρι 130 λίτρων. Οι άμβυκες αυτοί μπορεί να είναι χάλκινοι (χωρητικότητας < 130 λίτρα) ή πήλινοι (χωρητικότητας < 40 λίτρα) και οι πρώτες ύλες που επιτρέπονται είναι τα στέμφυλα, τα κούμαρα, τα ζίζιφα, τα κράνα, τα μούρα, υπολείμματα μέλιτος κ.α. Ο ελάχιστος κατ' όγκο **αλκοολικός τίτλος** του αποστάγματος πρέπει να είναι τουλάχιστον **35%**. Η περίοδος της απόσταξης πρέπει να διαρκεί μέχρι δύο μήνες και ξεκινάει από την 1η Αυγούστου μέχρι την 31η Ιουλίου. Με τον όρο στέμφυλα εννοούμε τα στέμφυλα που προέρχονται από κανονική και επιμελημένη έκθλιψη των σταφυλιών, η απόδοση των οποίων σε άνυδρη αλκοόλη είναι < 7,5 λίτρα/100kg καθαρών στεμφύλων κατ' ανώτατο όριο (ΦΕΚ 281/Α/2001). Το απόσταγμα των διημέρων δεν μπορεί να αρωματίζεται, αλλά αυτό δεν αποκλείει τις παραδοσιακές μεθόδους παραγωγής. Επιπλέον, το απόσταγμα αυτό μπορεί να περιέχει μόνο πρόσθετο καραμελόχρωμα ως μέσο προσαρμογής του χρώματος (13).

Το κύριο απόσταγμα των διημέρων είναι ένα υδροαλκοολικό διάλυμα που περιέχει ουσίες που αποκαλούνται μη-αλκοόλες. Αυτές οι μη-αλκοόλες ονομάζονται αλλιώς συναπόστακτες ουσίες, καθώς συναποστάζουν μαζί με την αλκοόλη, διαμορφώνοντας με αυτό το τρόπο τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αποστάγματος. Πιο συγκεκριμένα, οι ουσίες που μπορεί να περιέχει ένα απόσταγμα διημέρων είναι:

1. **Το νερό**, που καταλαμβάνει περίπου το 44-58% κατ' όγκο και προέρχεται από τα στέμφυλα, αλλά και ως προσθήκη πριν ή/και μετά την απόσταξη, για την αραίωση του αποστάγματος.

2. **Η αιθυλική αλκοόλη**, που παράγεται από την αλκοολική ζύμωση. Αποτελεί το κύριο προϊόν του μεταβολισμού των σακχάρων από τις ζύμες.
3. **Στις συναπόστακτες ουσίες** ανήκουν η μεθανόλη, διάφορα οξέα (μάλλον πτητικά), οι ανώτερες αλκοόλες, η φουρφουράλη, οι αλδεΐδες, οι εστέρες, κάποια αρωματικά συστατικά, οι τερπενικές ενώσεις, η γλυκερόλη και οι σάπωνες (13).

Τα αλκοολούχα ποτά διαφέρουν ως προς την ποσότητα της αλκοόλης που περιέχουν και έτσι τα διάφορα αποστάγματα (> 30% vol), για παράδειγμα, μπορεί να περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φθαλικών εστέρων σε σχέση με τους οίνους (< 15% vol). Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Chatonnet et al. (2014) σε δείγματα οίνων και αποσταγμάτων ανιχνεύτηκαν οι φθαλικοί εστέρες BBP, DBP και DEHP, με τον DBP να βρίσκεται αφθονότερος συγκριτικά με τους άλλους δύο φθαλικούς εστέρες και μάλιστα να υπερβαίνει το όριο ειδικής μετανάστευσης (SML) σε κάποια από αυτά. Πιθανές αιτίες μόλυνσης των δειγμάτων αυτών με τους συγκεκριμένους φθαλικούς εστέρες μπορεί να ήταν τα πολυμερή υλικά των αντλιών, της αποθήκευσης και γενικότερα της μεταχείρισης των οίνων και των αποσταγμάτων (δεξαμενές, αντλίες, εύκαμπτοι σωλήνες, φλάντζες, επιστρώσεις εποξικής ρητίνης κ.α). Ειδικότερα, οι εύκαμπτοι σωλήνες που συνδέονται με τις διάφορες αντλίες φαίνεται να φέρουν υψηλές συγκεντρώσεις DEHP, ενώ ο φθαλικός εστέρας DBP βρίσκεται άφθονος σε κάποια είδη επιστρώσεων εποξικής ρητίνης, οι οποίες καλύπτουν τις δεξαμενές ζύμωσης και αποθήκευσης. Η τελευταία αυτή πηγή πλαστικοποιητών αποτελεί και τον κυριότερο τρόπο μόλυνσης των υπό ανάλυση οίνων και αποσταγμάτων (14).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ανάλογα με το είδος της ζυμούμενης ύλης τα αποστάγματα μπορούν να διακριθούν σε:

1. **Αποστάγματα αμύλου:** προέρχονται από την απόσταξη ζυμωμένης αμυλούχου ύλης και είναι αποστάγματα σιτηρών (βότκα, ουίσκι, τζιν κ.α), γεωμήλων (κάποια είδη βότκας κ.α) και άλλων αμυλούχων υλών.
2. **Αποστάγματα ζαχάρων:** προέρχονται από την απόσταξη ζυμωμένης ζαχαρούχου ύλης και είναι αμπελοϊνικά αποστάγματα, αποστάγματα φρούτων, ζαχαροκάλαμου και άλλων ζαχαρούχων υλών. Τα αμπελοϊνικά αποστάγματα παράγονται από την απόσταξη οίνου (απόσταγμα οίνου, κονιάκ, μπράντι κ.α), από την απόσταξη στεμφύλων (τσίπουρο, τσικουδιά, γράππα κ.α.) από την απόσταξη σταφυλής (απόσταγμα σταφυλής) και από την απόσταξη σταφίδας (απόσταγμα σταφίδας ή αλλιώς raisin brandy).
3. **Αποστάγματα ουδέτερης αλκοόλης:** προέρχονται από την απόσταξη ουδέτερης αλκοόλης (γεωργικής προέλευσης αλκοόλη χωρίς συναπόστακτες ουσίες) μετά από την αραίωσή της με νερό και την προσθήκη αρωματικών

υλών. Ουσιαστικά η ουδέτερη αλκοόλη προέρχεται από την απόσταξη ζυμωμένου πολτού σταφίδας, σταφυλιών, γεωμήλων, τεύτλων και άλλων ζαχαρούχων υλών και χρησιμοποιείται όταν πλέον είναι απαλλαγμένη από όλα τα συστατικά εκτός της αιθανόλης και του νερού. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα: ούζο, κάποια είδη βότκας και τζιν, πολλά λικέρ κ.ά.



## 1.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ/ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

### 1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στον τομέα της χημικής ανάλυσης, οι χρωματογραφικές τεχνικές χρησιμοποιούνται πάνω από έναν αιώνα. **Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης/Απόδοσης (High Pressure/Performance Liquid Chromatography, HPLC)** καλείται η μέθοδος διαχωρισμού ενός μίγματος στα συστατικά του και αποτελεί το κυριότερο αναλυτικό εργαλείο στα χέρια του βιοαναλυτικού χημικού, καθώς βρίσκει πολυάριθμες εφαρμογές, όπως στον προσδιορισμό ορμονών, αντιβιοτικών, βιταμινών, αντιψυχωσικών, αντικαταθλιπτικών, αντικαρκινικών, τοξινών, κατεχολαμίνων, ναρκωτικών ουσιών, φαρμάκων, βιοφαρμάκων κλπ. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με διαδοχικές προσροφήσεις/εκροφήσεις ή κατανομές μεταξύ μίας στερεής ή υγρής στατικής φάσης (stationary phase) και μίας υγρής κινητής φάσης (mobile phase) με τη βοήθεια πίεσης, η οποία είναι μεγαλύτερη από την ατμοσφαιρική. Ουσιαστικά, η κινητή φάση μετακινεί τα συστατικά ενός μίγματος, διερχόμενη από την στατική φάση, με διαφορετική ταχύτητα. Έτσι, μία ουσία η οποία συγκρατείται ισχυρότερα από την στατική φάση μετακινείται με μικρότερη ταχύτητα από κάποια άλλη, η οποία συγκρατείται λιγότερο ισχυρά.

Συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με:

- **Χρωματογραφία Προσρόφησης (Adsorption Chromatography).** Ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης των συστατικών στη στατική φάση. Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης: Η **Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης (Normal Phase NP-HPLC)**, όπου η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή και η **Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reversed Phase (RP-HPLC))**, όπου συμβαίνει το αντίθετο. Στην RP-LC η στατική φάση είναι λιγότερο πολική της κινητής και αποτελείται από SiO<sub>2</sub>, συζευγμένο με διάφορες ομάδες (bonded phase), όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α. Για τη σύσταση της κινητής φάσης χρησιμοποιούνται μίγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο κ.α.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό.
- **Χρωματογραφία Κατανομής (Partition ή Liquid-Liquid Chromatography).** Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών του μίγματος μεταξύ κινητής και υγρής στατικής φάσης. Εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων, μη ιοντικών ενώσεων.
- **Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography).** Ο διαχωρισμός στηρίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης.

- **Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography).** Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες (ligands), οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια της στατικής φάσης.
- **Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους ή Διάχυσης Πηκτής (Size Exclusion ή Gel Permeation Chromatography).** Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων. Βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών.

Άλλα χαρακτηριστικά της HPLC που την καθιστούν κατάλληλη για μια πληθώρα εφαρμογών σε ποικίλα επιστημονικά πεδία, είναι η υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς και η καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ενώσεων.

Οι βασικές αρχές της HPLC διέπονται από την εξίσωση Van Deemter, η οποία δίνει τη μαθηματική προσέγγιση της συμπεριφοράς των χρωματογραφικών στηλών, συσχετίζοντας το ρυθμό ροής της κινητής φάσης με τον αριθμό των θεωρητικών πλακών ή αλλιώς την αποδοτικότητα της στήλης. Η εξίσωση Van Deemter δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$H = 2\lambda d_p + 2 \frac{\gamma D_M}{u} + f(k) \left( \frac{d_p^2}{D_M} \right) u = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1)$$

Όπου:

$\lambda$  και  $\gamma$ : σταθερές που εξαρτώνται από την ποιότητα και την πλήρωση της στήλης

$D_M$ : ο συντελεστής διάχυσης στην κινητή φάση

$d_p$ : η διάμετρος του υλικού πλήρωσης

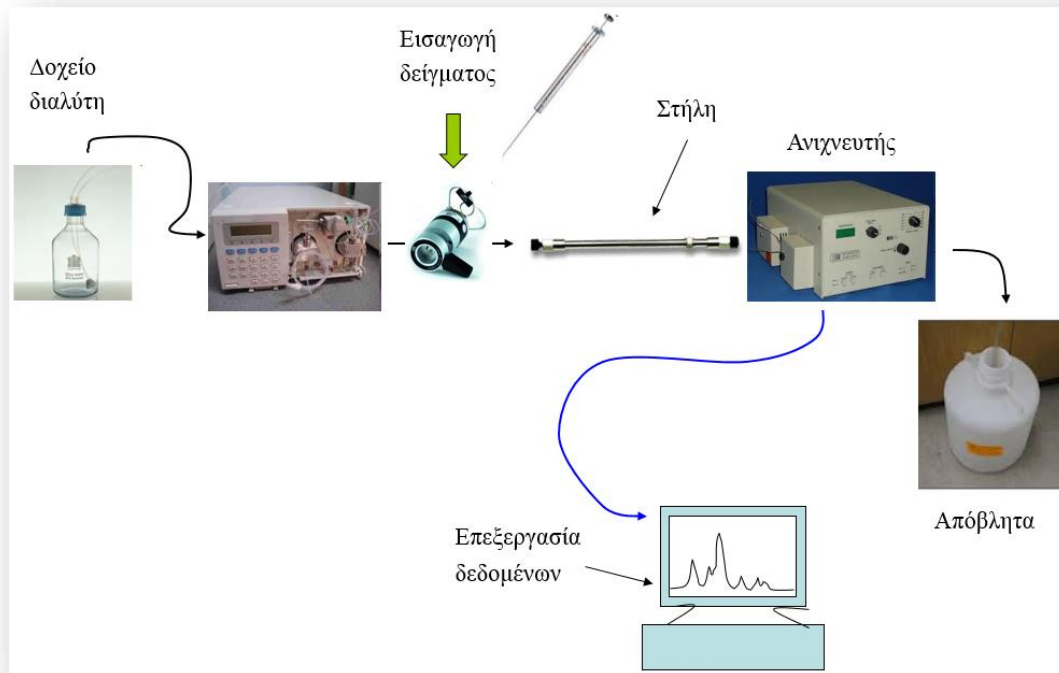
$u$ : η γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης

$f(k)$ : μια συνάρτηση του παράγοντα συγκράτησης  $k$

Ο όρος  $A$  αποτελεί τον όρο πολλαπλότητας διαδρομών ροής, ο οποίος είναι ανάλογος της διαμέτρου των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Ο όρος  $B$  αποτελεί τον όρο διαμήκους διάχυσης και σχετίζεται με τη διάχυση της αναλυόμενης ένωσης στην κινητή και στατική φάση. Όσο αυξάνεται η γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης, ο όρος  $B$  μειώνεται. Ο όρος  $C$  αποτελεί τον όρο μεταφοράς μάζας και σχετίζεται με τη ροή της κινητής φάσης και με τη διάμετρο των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Σύμφωνα με την εξίσωση Van Deemter, όταν η διάμετρος των σωματιδίων πλήρωσης της στήλης είναι μικρότερη από 2,5  $\mu\text{m}$ , παρατηρείται μείωση των θεωρητικών πλακών, άρα και αύξηση της αποδοτικότητας της στήλης, επομένως η καμπύλη Van Deemter παίρνει ένα πιο επίπεδο προφίλ (15).

### 1.2.2 ΤΜΗΜΑΤΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ HPLC

Η **οργανολογία** της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης περιλαμβάνει: **α)** φιάλη(ες) αποθήκευσης διαλυτών, **β)** μονάδα εισαγωγής δείγματος, **γ)** αντλία υψηλής πίεσης, **δ)** χρωματογραφική στήλη, **ε)** ανιχνευτή, **στ)** σύστημα συλλογής, καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων. Ένα τυπικό σύστημα HPLC φαίνεται στο Σχήμα 1.2.2.



**Σχήμα 1.2.2** Τυπική διάταξη Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης (16).

#### I. Δοχεία Διαλυτών

Τα δοχεία που φυλάσσονται οι διαλύτες της κινητής φάσης είναι συνήθως από γυαλί και συνοδεύονται από ειδικό καπάκι που διαθέτει μεταλλικό φίλτρο για την αναρρόφηση διαλυτών, φίλτρο παροχής αερίου απαέρωσης των διαλυτών και σωλήνα από Teflon για την έξοδο του αέρα.

#### II. Μονάδα Εισαγωγής Δείγματος

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος αποτελείται από μία βαλβίδα έξι εισόδων και δύο θέσεων. Από τις δύο θέσεις η μία αποτελεί τη θέση φόρτωσης «load» και η δεύτερη τη θέση έγχυσης του δείγματος «injector».

#### III. Αντλίες

Ο ρόλος των αντλιών είναι η άντληση της κινητής φάσης από τα δοχεία και η διαβίβασή της στη στήλη κάτω από μεγάλη πίεση.

#### IV. Χρωματογραφική Στήλη

Η αναλυτική στήλη είναι η καρδιά του χρωματογραφικού συστήματος για αυτό και πρέπει να είναι υψηλής ποιότητας, ώστε να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Αποτελείται από τον εξωτερικό κύλινδρο, κατασκευασμένο από μέταλλο, ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί ή πολυμερές, και το υλικό πλήρωσης. Το υλικό πλήρωσης μπορεί να είναι σφαιρικά, μη πορώδη σωματίδια από ύαλο ή πολυμερές, ή πορώδη σωματίδια αδρανούς υλικού μικρής διαμέτρου ( $< 2\mu\text{m}$ ).

#### V. Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής στηρίζεται στην καταγραφή των διάφορων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των εκλούμενων συστατικών του δείγματος.

#### VI. Καταγραφέας

Το σήμα του ανιχνευτή καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου ανάλυσης και με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα διάγραμμα με συνεχόμενες κορυφές έκλουσης, γνωστό ως **χρωματογράφημα**.

### 1.2.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ

Ένα χρωματογράφημα αποτελείται από σχήματα κορυφών έκλουσης. Η συγκέντρωση των μορίων ενός συστατικού μέσα στη ζώνη έκλουσης ακολουθεί συνήθως κανονική κατανομή (κατανομή Gauss). Αν υπάρξει απόκλιση από την κανονική κατανομή αυτό σημαίνει πως σε κάποιο σημείο κατά τη διεξαγωγή ενός χρωματογραφήματος υπάρχει πρόβλημα (κακή ποιότητα πλήρωσης της στήλης, φαινόμενα κατακράτησης που μπορεί να οφείλονται σε μικρότερης ισχύος μηχανισμούς κατανομής των συστατικών κ.α). Τα χαρακτηριστικά ενός χρωματογραφήματος είναι (17):

- Ο χρόνος έκλουσης (elution time) ή χρόνος συγκράτησης (retention time)  $t_{r,i}$ .
- Ικανότητα συγκράτησης  $k$ .
- Ταχύτητα κίνησης συστατικού  $u_i$ .
- Παράγοντας εκλεκτικότητας  $\alpha$ .
- Νεκρός όγκος  $t_0$  ή «μέτωπο του διαλύτη».
- Σχετικός χρόνος έκλουσης  $t_r$ .
- Πλάτος κορυφής  $W_b$  και ύψος κορυφής  $h$ .
- Συνολικός χρόνος ανάλυσης  $t_T$ .
- Αριθμός θεωρητικών πλακών  $N$ .

- Απόδοση στήλης N.
- Ισοδύναμο ύψος θεωρητικών πλακών H.
- Διαχωριστική ικανότητα R.

#### 1.2.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (UHPLC)

Οι απαιτήσεις ενός σύγχρονου αναλυτικού εργαστηρίου για γρήγορες αναλύσεις μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε συνδυασμό με την εξέλιξη, από τεχνολογικής άποψης, των υλικών πλήρωσης των χρωματογραφικών στηλών οδήγησαν στην εμφάνιση μιας νέας μορφής της HPLC, της Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC). Η UHPLC ή UPLC πλεονεκτεί στις περισσότερο ακριβείς αντλίες υψηλής πίεσης, στα πιο αποτελεσματικά υλικά πλήρωσης, στον έλεγχο και στην επεξεργασία των δεδομένων, και στη συνολική βελτιστοποίηση του συστήματος. Ως αποτέλεσμα, εμφανίζει βελτιωμένα χαρακτηριστικά στην ταχύτητα, την ευαισθησία και τη διακριτική ικανότητα. Η βασική αρχή της UHPLC στηρίζεται στο ότι η χρήση μικρότερων σωματιδίων αδρανούς υλικού στη στατική φάση βελτιώνει τα όρια της ανάλυσης. Τα μη πορώδη σωματίδια με μέγεθος κόκκων από 1,5 έως 2 μm διατίθενται στο εμπόριο, χαρακτηρίζονται όμως από μικρή επιφάνεια που συνεπάγεται με μειωμένη ικανότητα συγκράτησης. Γι αυτό και προτιμάται η χρήση πορωδών σωματιδίων πυριτίου με μέγεθος μικρότερο από 2 μm, καλή ομοιομορφία κατανομής στο εσωτερικό της στήλης και αντοχή σε υψηλές πιέσεις (16).

#### 1.2.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ HPLC

Η HPLC, σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη υγρής χρωματογραφίας (χρωματογραφία στήλης, χάρτου και λεπτής στοιβάδας) εμφανίζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- ✓ Έχει καλύτερη επαναληψιμότητα και ακρίβεια.
- ✓ Παρέχει δυνατότητες πλήρους αυτοματοποίησης.
- ✓ Ο διαχωρισμός διαρκεί για ελάχιστο χρονικό διάστημα.
- ✓ Εμφανίζει μεγαλύτερες δυνατότητες παρασκευαστικής εργασίας.
- ✓ Επιτρέπει τη δυνατότητα επιλογής των οργάνων που απαρτίζουν ένα σύστημα HPLC, καθώς και τη μορφή που αυτό τελικά θα πάρει, ανάλογα από το είδος της εφαρμογής που επιχειρείται κάθε φορά, προσδίδοντας έτσι κάποια ευελιξία για το εργαστήριο (17).

- ✓ Η εφαρμογή υψηλής πίεσης στο σύστημα δίνει τη δυνατότητα αύξησης της ικανότητας διαχωρισμού των συστατικών, μειώνοντας το χρόνο έκλουσης και περιορίζοντας την εξάπλωση των ζωνών τους.

Αν και τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι αρκετά σε αριθμό το γεγονός ότι ένα σύστημα HPLC έχει υψηλό κόστος συγκριτικά με άλλες μεθόδους ανάλυσης αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα για την εφαρμογή της μεθόδου σε κάποιες περιπτώσεις (18).

## 1.3 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

### 1.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες σε οικονομικά μεγέθη και τις πλέον αναπτυσσόμενες αναλυτικές τεχνικές, με κύρια πεδία εφαρμογής τις επιστήμες ζωής, των τροφίμων, τις περιβαλλοντικές επιστήμες και τις τεχνολογίες οπικής. **Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS)** ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Στην ουσία, η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για:

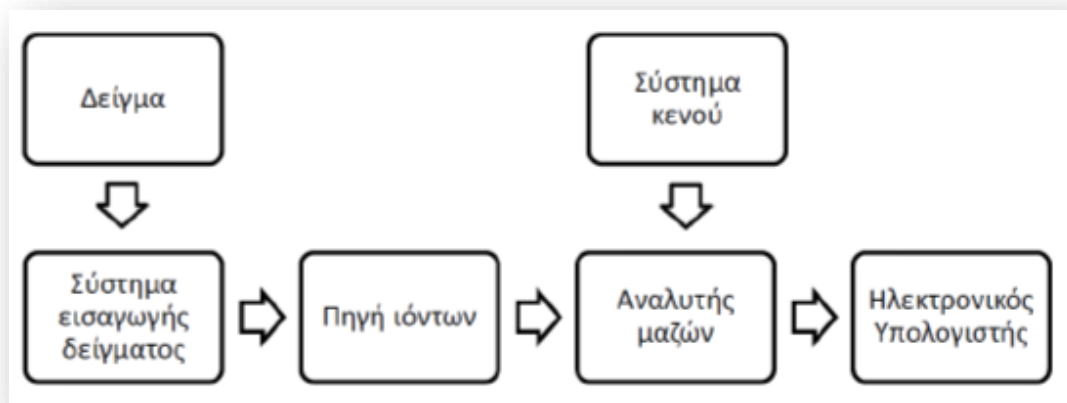
- α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων,
- β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων,
- γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων,
- δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η φασματομετρία μαζών συνοψίζονται α) στη μεγάλη εκλεκτικότητα που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, β) την πολύ υψηλή ευαισθησία, γ) το γεγονός ότι η φασματομετρία μαζών μπορεί θεωρητικά να δράσει σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector) και, επομένως, να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ενώσεως, και δ) τη δυνατότητα εύρεσης δομής αγνώστων ενώσεων.

### 1.3.2 ΤΜΗΜΑΤΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΩΝ

Παρακολουθώντας το σχηματικό διάγραμμα του Σχήματος 1.3.1, τα κυριότερα τμήματα ενός φασματογράφου μαζών είναι:

1. **Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος**, το οποίο εισάγεται συνήθως στην υγρή ή αέρια μορφή.
2. **Την πηγή ιόντων**, όπου τα συστατικά του δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα.
3. **Τον αναλυτή μαζών**, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το  $m/z$  τους.
4. **Τον ανιχνευτή**, που συγκεντρώνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
5. **Το σύστημα κενού**, στο οποίο βρίσκεται ο φασματογράφος και δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες.
6. **Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή**, με κατάλληλο λογισμικό, μέσω του οποίου γίνεται ο έλεγχος του οργάνου και η επεξεργασία των δεδομένων (16).



**Σχήμα 1.3.1** Διάγραμμα απεικόνισης κυριότερων τμημάτων ενός φασματογράφου μαζών.

Όσον αφορά το **Σύστημα Εισαγωγής του Δείγματος**, σκοπός της διάταξης είναι η εισαγωγή του δείγματος χωρίς τη διατάραξη του κενού. Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος (στερεό, υγρό ή αέριο) υπάρχουν διαφορετικά συστήματα εισαγωγής. Όταν η φασματομετρία μαζών είναι σε σύζευξη με χρωματογραφικό σύστημα, η εισαγωγή δείγματος γίνεται μέσω κάποιων ειδικών διατάξεων σύζευξης (16).

Όσον αφορά την **Πηγή Ιόντων** και την τεχνική ιονισμού, το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιονισμού, για την ίδια ένωση. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι η επιλογή της τεχνικής ιονισμού είναι καθοριστικής σημασίας για τον προσδιορισμό των ενώσεων. Ένας γενικός όρος διαχωρισμού των τεχνικών αυτών, τις χωρίζει στις **σκληρές** και **μαλακές** τεχνικές. Στις πρώτες χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια που προκαλεί διάσπαση της ένωσης σε θυγατρικά ιόντα (**θραύση**). Στις μαλακές τεχνικές λαμβάνει χώρα ιονισμός σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραυσματοποίηση. Ο βασικός τύπος των πηγών ιονισμού χωρίζεται, επίσης, σε δύο κατηγορίες: της **αέριας φάσης** και της **εκρόφησης**. Στην πρώτη περίπτωση, το δείγμα εξαερώνεται και έπειτα ιονίζεται, ενώ στη δεύτερη, το στερεό ή υγρό δείγμα μετατρέπεται απευθείας σε ιόντα στην αέρια φάση (15). Παρακάτω παρατίθενται οι πηγές ιονισμού που χρησιμοποιούνται στην φασματομετρία μαζών:



**Εικόνα 1.3.1** Πηγές ιοντισμού που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών (15).

Βασικός Τύπος	Ονομασία	Παράγοντας Ιοντισμού
Αέριας Φάσης	Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI)	Ηλεκτρόνια μεγάλης ενέργειας
	Χημικού Ιοντισμού (Chemical Ionization, CI)	Αντιδραστήρια-ιόντα σε αέρια κατάσταση
	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)	Ισχυρό ηλεκτρικό δυναμικό
Εκρόφησης	Ιοντισμού πεδίου (Field Ionization, FI)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
	Εκρόφησης πεδίου (Field Desorption, FD)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
	Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Desorption Ionization, MALDI)	Ακτίνα λέιζερ
	Εκρόφηση πλάσματος (Plasma desorption, PD)	Θραύσματα σχάσης $^{252}\text{Cf}$
	Βομβαρδισμού με ταχεία άτομα (Fast Atom Bombardment, FAB)	Δέσμη ατόμων μεγάλης ενέργειας
	Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (Secondary Ion Mass Spectroscopy, SIMS)	Δέσμη ιόντων μεγάλης ενέργειας
	Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (Thermospray Ionization, TS)	Υψηλή θερμοκρασία

Η πιο συνηθισμένη πρακτική είναι ο ιοντισμός σε αέρια φάση, ο οποίος διαχωρίζεται σε τεχνικές που εφαρμόζονται σε **συνθήκες κενού** και στις **τεχνικές ατμοσφαιρικής πίεσης**. Οι τελευταίες έχουν επικρατήσει στη φασματομετρία μάζας σε σύζευξη με τεχνικές διαχωρισμού στην υγρή φάση (LC-MS, CE-MS). Οι τεχνικές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης περιλαμβάνουν τον Ηλεκτροψεκασμό (electrospray, **ESI**), το Χημικό Ιονισμό σε ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, **APCI**) και το Φωτοϊονισμό σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Photo Ionisation, **APPI**). Η τεχνική του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό αποτελεί την κυριότερη μέθοδο σύζευξης Υγρής Χρωματογραφίας με Φασματομετρία Μαζών. Το έκλουσμα από τη στήλη εισέρχεται σε πεδίο δυναμικού 3-5 kV μέσω τριχοειδούς σωλήνα, παράλληλα με τον οποίο διαβιβάζεται αέριο για τη δημιουργία εκνεφώματος. Το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος αποτελούμενο από μικρές φορτισμένες σταγόνες, ακολουθεί η εξάτμιση του διαλύτη και ο ιοντισμός των ενώσεων. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό ανήκει στις μαλακές τεχνικές ιοντισμού, αφού το φάσμα των ενώσεων μπορεί να διαφέρει πολύ, ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και το εφαρμοζόμενο δυναμικό (16). Η τεχνική αυτή προσφέρει το

πλεονέκτημα ιοντισμού μιας μεγάλης ποικιλίας μορίων (μετρίως πολικών και πολικών) σε ένα μεγάλο εύρος μοριακών μαζών και επηρεάζεται από παράγοντες όπως το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων, τις πτητικότητες των διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά την επεξεργασία του δείγματος και τη σύσταση της κινητής φάσης.

Σχετικά με τον **Αναλυτή Μαζών** μπορεί να είναι διαφόρων ειδών. Τα κύρια χαρακτηριστικά του ιδανικού αναλυτή είναι η ικανότητα να διαχωρίζει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές του λόγου  $m/z$ , η ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, γεγονός που του αποδίδει μεγάλη ευαισθησία, και η δυνατότητα σύζευξης με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος και ιοντισμού.

Η διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R) του αναλυτή μάζας δίνεται από τη σχέση:

$$R = m/\Delta m \quad (1.1)$$

Όπου:

$m$  η μάζα της πρώτης κορυφής και

$\Delta m$  η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών.

Ανάλογα με την τιμή του  $r$  τα όργανα κατηγοριοποιούνται σε χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Ωστόσο, η υψηλή διαχωριστική ικανότητα δεν μπορεί να επιτευχθεί ταυτόχρονα με την υψηλή ευαισθησία, γι αυτό και όταν απαιτείται ευαισθησία, συχνά επιλέγεται η λειτουργία του οργάνου σε μικρότερη διαχωριστική ικανότητα (16).

### 1.3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Οι τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών είναι:

- 1) Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan).
- 2) Τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM).
- 3) Φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS).

Η τελευταία είναι και αυτή που ενδιαφέρει για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας.

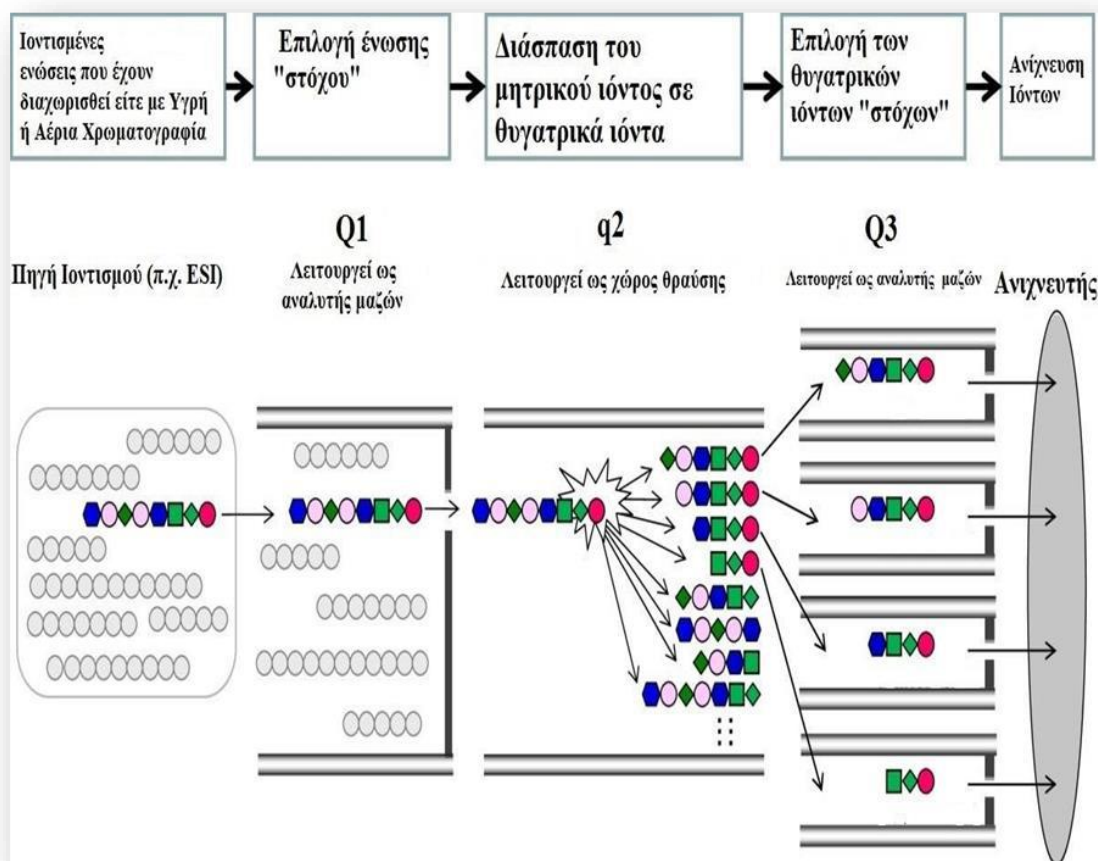
#### 1.3.3.1 Φασματομετρία Μαζών σε Σειρά

Η Φασματομετρία Μαζών σε σειρά είναι η πιο συχνά εφαρμοζόμενη τεχνική Φασματομετρίας Μαζών. Η τεχνική αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί στο χώρο (Tandem Mass Spectrometry in Space), όπου περιλαμβάνει δύο τουλάχιστον αναλυτές μαζών, με πιο κοινή διαμόρφωση το τριπλό τετράπολο, και στο χρόνο (Tandem Mass Spectrometry in Time) με τη χρήση παγίδων ιόντων και αναλυτές μαζών κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων ή Orbitrap με μετασχηματισμό Fourier (FT-MS). Η διαφορά τους είναι ότι στη δεύτερη περίπτωση, τα ιόντα που επιλέγονται και αποθηκεύονται στον αναλυτή μαζών, μπορούν να διασπαστούν, και η ανάλυση

των παραγόμενων ιόντων να γίνει κατά τη διάρκεια ενός δεύτερου πειράματος MS στον ίδιο αναλυτή, οπότε τα δύο πειράματα χωρίζονται στο χρόνο και όχι στο χώρο, όπως στην πρώτη περίπτωση (16).

### 1.3.3.1.1 Αναλυτής Μάζας Τριπλού Τετράπολου

Το τριπλό τετράπολο χρησιμοποιεί δύο τετράπολα (Q1, Q3) ως αναλυτές μαζών, και το ενδιάμεσο τετράπολο (Q2) χρησιμοποιείται ως χώρος θραύσης των ιοντιζόμενων μορίων. Συγκεκριμένα, σε πρώτη φάση επιλέγεται από το πρώτο τετράπολο Q1 ένα ιόν. Από το δεύτερο τετράπολο Q2 διέρχεται το μητρικό ιόν, όπου διασπάται σε θυγατρικά ιόντα με τη χρήση ενός αδρανούς αερίου σύγκρουσης (collision gas), το οποίο πληρώνει το χώρο. Λόγω της μεταβολής της πολικότητας του εφαρμοζόμενου δυναμικού, τα ιόντα επανέρχονται στο κέντρο της διάταξης και έτσι αποφεύγεται ο διασκορπισμός τους. Τα εξερχόμενα ιόντα εισέρχονται στο τρίτο τετράπολο Q3, το οποίο επιτρέπει τη δίοδο μόνο των επιθυμητών ιόντων με κατάλληλη επιλογή του λόγου  $m/z$  (15). Στο Σχήμα 1.3.2 περιγράφεται η αρχή λειτουργίας του τριπλού τετράπολου.



Σχήμα 1.3.2 Αρχή λειτουργίας τριπλού τετράπολου.

#### **1.3.3.1.2 Τεχνικές Σάρωσης στη Φασματομετρία Μαζών σε Σειρά**

Στη Φασματομετρία Μαζών σε σειρά υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής διαφόρων πειραμάτων σάρωσης, όπως η σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product Ion Scan), η σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor Ion Scan), η σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (Constant Neutral Loss Scan, CNL) και η επιλεκτική παρακολούθηση θραυσματοποίησης ιόντων. Στην τελευταία περίπτωση, παρακολουθείται μια αντίδραση ή μια ομάδα αντιδράσεων θραυσματοποίησης. Όταν επιλέγεται μια μόνο αντίδραση, η μέθοδος ονομάζεται «επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων» (Single Reaction Monitoring, SRM), ενώ με την επιλογή δύο ή περισσότερων θραυσμάτων η μέθοδος ονομάζεται «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Οι τύποι SRM και MRM προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα, αφού οποιαδήποτε παρεμποδίζουσα ουσία θα πρέπει να σχηματίσει μητρικό ιόν και θυγατρικά ιόντα ίδιου λόγου  $m/z$ , καθώς και χαμηλό σήμα υποβάθρου.

## ΣΚΟΠΟΣ

Οι φθαλικοί εστέρες, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς τους στο νερό, μεταναστεύουν εύκολα σε περιβάλλον με υψηλή περιεκτικότητα σε αιθανόλη, χαρακτηριστικό παράδειγμα του οποίου αποτελούν τα αλκοολούχα ποτά. Η ιδιότητα αυτή, σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να επηρεάζουν τις λειτουργίες του ενδοκρινικού συστήματος, λειτουργώντας έτσι ως ενδοκρινικοί διαταράκτες, οδήγησε πολλούς διεθνείς και ευρωπαϊκούς οργανισμούς να ορίσουν επιτρεπτά επίπεδα συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών στα τρόφιμα, καθώς και να απαγορεύσουν την χρήση τους όπου κρίνεται απαραίτητο, με σκοπό τη μείωση της επικινδυνότητάς τους. Έτσι, προκύπτει η ανάγκη ανάπτυξης αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων, ικανών για τον έλεγχο ποιότητας τροφίμων και ποτών δυνητικών στην παρουσία φθαλικών εστέρων. Ο περιορισμένος αριθμός εργασιών στη διαθέσιμη βιβλιογραφία, που ασχολούνται με τον προσδιορισμό των PAEs σε αλκοολούχα ποτά, αποτέλεσε την κινητήρια δύναμη για την υλοποίηση της παρούσας μελέτης.

Ο σκοπός αυτής της εργασίας, λοιπόν, ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υπερυψηλής Απόδοσης (UHPLC), σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μαζών σε σειρά (MS/MS) για τον προσδιορισμό 12 φθαλικών εστέρων σε δείγματα ελληνικών αποσταγμάτων, καθώς αυτά αποτελούν προϊόντα με αυξημένο δείκτη επικινδυνότητας.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 2.1 ΟΡΓΑΝΑ

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα **Υγρής Χρωματογραφίας Υπέρ Υψηλής Απόδοσης συζευγμένης με διαδοχική Φασματομετρία Μαζών (Accela TSQ Quantum™ Access MAX Triple Quadrupole Mass Spectrometer, Thermo Scientific, USA)** αποτελούμενο από τα εξής μέρη:

- Αντλία με μονάδα απαέρωσης τεσσάρων διαλυτών (Thermo Scientific, USA)
- Αυτόματο δειγματολήπτη (Thermo Scientific, USA)
- Αναλυτική στήλη U-VDSpher PUR 100 C18-E (100 mm x 2.0 mm, 1.8 μm), (VDS optilab, Chromatographie Technik GmbH, Germany)
- Προστήλη U-VDSpher PUR C18-E (5.0 mm x 2.0 mm, 1.8 μm), (VDS optilab, Chromatographie Technik GmbH, Germany)
- Φασματόμετρο μαζών, Accela TSQ Quantum™ Access MAX Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Scientific, USA)
- Ηλεκτρονικό Υπολογιστή Dell με λογισμικό ελέγχου λειτουργίας του οργάνου και επεξεργασίας των δεδομένων Xcalibur και TSQ Tune (Thermo Scientific, USA)

### 2.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Ο επιπλέον εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της εργασίας περιλάμβανε:

- Αυτόματο σιφόνιο 200 μL
- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού Mili-Q Direct-Q®3 UV System (Milipore Corporation, USA)
- Ηλεκτρονικό αναλυτικό ζυγό ακριβείας  $\pm 0,0001$  g του οίκου Sartorius, μοντέλο 1801
- Πυριατήριο ξήρανσης Heraus (Thermo Scientific, USA)

### 2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν:

- Υπερκάθαρο νερό (Συσκευή παραγωγής νερού, Mili-Q Direct-Q®3 UV System, Milipore Corporation, USA)

- Ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN), καθαρότητας LC-MS Grade (Chem-Lab, Belgium)
- Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH), καθαρότητας LC-MS Grade (Chem-Lab, Belgium)
- Εξάνιο (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) καθαρότητας HPLC Grade (Chem-Lab, Belgium)
- Ακετόνη (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) καθαρότητας HPLC Grade (Chem-Lab, Belgium)
- Μυρμηκικό οξύ (HCOOH), 99% (Chem-Lab, Belgium)
- Φθαλικός διμεθυλεστέρας (DMP), ≥99% (Sigma Aldrich, Germany)
- Φθαλικός διαιθυλεστέρας (DEP), 99,5% (Sigma Aldrich, Germany)
- Φθαλικός δι-ισοπροπυλεστέρας (DiPP), >98% (Fluka, Switzerland)
- Φθαλικός διπροπυλεστέρας (DPP), 99% (Sigma Aldrich, Germany)
- Φθαλικός διαφαινυλεστέρας (DPhP), 99% (Sigma Aldrich, Germany)
- Φθαλικός βενζυλο-βουτυλεστέρας (BBP), 98% (Sigma Aldrich, Germany)
- Φθαλικός διβουτυλεστέρας (DBP), 99% (Sigma Aldrich, Germany)
- Φθαλικός διπεντυλεστέρας (DPeP), >99% (Fluka, Switzerland)
- Φθαλικός δι-(2-αιθυλοεξυλο)εστέρας (DEHP), ≥99% (Sigma Aldrich, Germany)
- Φθαλικός δι-η-οκτυλεστέρας (DnOP), ≥98% (Fluka, Switzerland)
- Φθαλικός δι-ισοεννεύλεστέρας (DiNP), ≥99% (Fluka, Switzerland)
- Φθαλικός δι-ισοδεκυλεστέρας (DiDP), >99% (Fluka, Switzerland)

## 2.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Απαραίτητη κρίθηκε η χρήση μόνο γυάλινων και μεταλλικών σκευών, καθώς οι ΡΑΕς είναι ουσίες που μπορεί να βρεθούν σε οποιοδήποτε πλαστικό υλικό. Η διαδικασία του καθαρισμού των γυάλινων σκευών αφορούσε το επιμελές ξέπλυμα με ακετόνη, εξάνιο και τέλος την παραμονή τους σε πυριατήριο ξήρανσης για 4 ώρες σε θερμοκρασία 120°C. Στη συνέχεια, περιτυλίγονταν με αλουμινόχαρτο, ώστε να μην επιμολυνθούν από κάποιο αιωρούμενο πλαστικοποιητή. Τα πυκνά πρότυπα διαλύματα όλων των προσδιοριζόμενων εστέρων παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 1000 mg L<sup>-1</sup>. Για τη διάλυσή τους χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη, και φυλάχτησαν στους -20°C σε σκουρόχρωμα γυάλινα φιαλίδια.

## 2.5 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΩΝ

Για τις αναλύσεις του φάσματος μαζών των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε ένα φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου Accela TSQ Quantum™ Access MAX Triple Quadrupole (Thermo Scientific, USA), με πηγή ηλεκτροψεκασμού (ESI ion source). Το δυναμικό του τριχοειδούς σωλήνα ρυθμίστηκε στα 3000 kV. Η θερμοκρασία εξάτμισης και η θερμοκρασία πηγής ήταν 300 °C και στις δύο περιπτώσεις. Η πίεση του αερίου εξάτμισης ήταν 40 Arb, ενώ του αερίου του κώνου ήταν 10 Arb. Το δυναμικό του κώνου (cone voltage) και η ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy) ρυθμίστηκαν ανάλογα με την εκάστοτε αναλυόμενη ουσία.

## 2.6 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ESI-MS/MS

Το δυναμικό του κώνου (Cone Voltage, CV) και η ενέργεια θραυσματοποίησης (Collision Energy, CE) είναι δύο παράμετροι που εξαρτώνται από την εκάστοτε προσδιοριζόμενη ένωση. Με βελτιστοποίηση των δύο αυτών παραμέτρων, επιτυγχάνεται το μέγιστο σήμα του επιλεγόμενου θραύσματος του αναλύτη αλλά και η εκλεκτικότητα της ανάλυσης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επιλογή των κατάλληλων τιμών ήταν η εξής: Αρχικά, γινόταν απευθείας έγχυση πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  σε μεθανόλη της κάθε ένωσης, σε χαμηλή ροή (2-5 mL) στο φασματόμετρο μαζών. Ακολουθούσε η σάρωση μιας συγκεκριμένης περιοχής  $m/z$ , η οποία ρυθμιζόταν έτσι ώστε να περιέχει τη μοριακή μάζα της προσδιοριζόμενης ένωσης. Με τον τρόπο αυτό ανιχνευόταν το μητρικό ιόν και στη συνέχεια οριζόταν μια τιμή σάρωσης  $m/z$  στον ανιχνευτή, η οποία αντιστοιχούσε στη μοριακή μάζα της ένωσης αυξημένη κατά μία μονάδα Dalton, αφού σε όλες τις περιπτώσεις συναντήσαμε θετικό ιοντισμό. Στη συνέχεια, ρυθμίστηκε ο ανιχνευτής MS για λειτουργία σε MS/MS. Με την δυνατότητα αυτόματης επιλογής αριθμού θυγατρικών ιόντων για ένα μητρικό ιόν, το σύστημα μεταβάλλει την ενέργεια θραύσης και εξάγει τις ιδανικές μάζες θυγατρικών ιόντων. Επιλέγεται, έτσι, το εκλεκτικότερο θραύσμα, που συνήθως θα είναι αυτό με τη μεγαλύτερη τιμή  $m/z$  ή αυτό με τη μεγαλύτερη ένταση στη μικρότερη δυνατή ενέργεια θραυσματοποίησης (15). Στην περίπτωση των φθαλικών εστέρων, επειδή οι περισσότεροι δίνουν κοινό θυγατρικό ιόν (149.0), για τον εκλεκτικότερο προσδιορισμό τους επιλέχθηκαν δύο θραύσματα για τον καθένα. Στον Πίνακα 2.1 δίνονται οι χαρακτηριστικές παράμετροι του φασματόμετρου μάζας των 12 φθαλικών εστέρων που προσδιορίστηκαν.



**Πίνακας 2.1** Παράμετροι ανίχνευσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων και του εσωτερικού προτύπου στο φασματομέτρο μάζας και χρονικό παράθυρο ανίχνευσης.

Όνομασία	Μονοϊσοτοπική Μάζα (g mol <sup>-1</sup> )	Μητρικό Ιόν	Θυγατρικά Ιόντα	Δυναμικό Κώνου (kV)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (kV)	ESI	SRM χρονικό παράθυρο (min)
<b>DMP</b>	194,186	195	164	48	5	+	2-5
			78		32		
<b>DEP</b>	222,24	223	149	26	20	+	4-7
			65		39		
<b>DiPP</b>	250,294	251	149	31	17	+	6-9
			65		46		
<b>DPP</b>	250,294	251	149	29	16	+	6-9
			65		45		
<b>DPhP</b>	318,328	319	77	72	36	+	7-10
			226		13		

**Πίνακας 2.1 (συνέχεια)** Παράμετροι ανίχνευσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων και του εσωτερικού προτύπου στο φασματοόμετρο μάζας και χρονικό παράθυρο ανίχνευσης.

<b>BBP</b>	312,365	313	149 91	25	14 31	+	8-11
<b>DBP</b>	278,348	279	149 65	28	15 50	+	8-11
<b>DPeP</b>	306,402	307	149 121	49	15 36	+	9-12
<b>DEHP</b>	390,654	391	149 121	35	30 48	+	11-14
<b>DnOP</b>	390,654	391	149 121	37	15 43	+	12-14
<b>DiNP</b>	418,609	419	149 71	78	29 20	+	11-15
<b>DiDP</b>	446,670	447	149 85	86	17 30	+	12-16

## 2.7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Οι παράμετροι που συνήθως ερευνούνται κατά την ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής μεθόδου είναι ο τύπος της στατικής φάσης της αναλυτικής στήλης, η σύσταση, το pH και η ροή της κινητής φάσης. Η συγκράτηση και ο διαχωρισμός των αναλυτών επηρεάζεται άμεσα από τις προαναφερθείσες παραμέτρους, γι αυτό και κατά την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου εξετάστηκαν προσεκτικά.

### 2.7.1 Επιλογή της Στατικής Φάσης

Στο προηγούμενο κεφάλαιο έγινε λόγος για το υλικό πλήρωσης της στήλης, η επιλογή του οποίου γίνεται με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων και παίζει καθοριστικό ρόλο στο μηχανισμό συγκράτησής τους. Ο συντελεστής κατανομής P, ή ο συντελεστής κατανομής D, όταν πρόκειται για μη ουδέτερες πολικές ενώσεις, είναι οι παράμετροι που πρέπει να εξετασθούν πριν την επιλογή της στατικής φάσης. Ο συντελεστής κατανομής P, συχνά εκφράζεται ως logP και δίνεται από τη σχέση:

$$\log P_{\text{οκτανόλη/ύδατος}} = \log \left[ \frac{\text{Αναλύτης}_{\text{οκτανόλη}}}{\text{Αναλύτης}_{\text{ύδατο}}} \right] \quad (2.1)$$

Όταν  $\log P > 0$  η ένωση είναι σχετικά υδρόφοβη, ενώ όταν  $\log P < 0$  η ένωση είναι περισσότερο υδρόφιλη. Στην περίπτωση πολικών ενώσεων οι οποίες φέρουν κέντρα ιοντισμού, προτιμάται ο συντελεστής κατανομής D, ο οποίος εκφράζεται ως logD, και αναφέρεται στο λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων ουδέτερης μορφής και ιοντισμένων μορφών στην οργανική και υδατική φάση, σε αντίθεση με το logP. Η έκφραση του logD γίνεται μέσω της σχέσης:

$$\log D_{\text{οκτανόλη/ύδατος}} = \log \left[ \frac{\text{ιοντικού αναλύτη}_{\text{οκτανόλη}} + [\text{μη ιοντικού αναλύτη}]_{\text{οκτανόλη}}}{\text{ιοντικού αναλύτη}_{\text{ύδατο}} + [\text{μη ιοντικού αναλύτη}]_{\text{ύδατο}}} \right] \quad (2.2)$$

Έτσι, ο logD παρέχει μια καλή ένδειξη της κατάστασης ιοντισμού μιας ένωσης, σε ένα διάλυμα με συγκεκριμένο pH και είναι πιο αντιπροσωπευτικός του υδροφοβικού χαρακτήρα σε συνθήκες ρυθμιστικού διαλύματος από το logP. Οι φθαλικοί εστέρες όπως αναφέρθηκε είναι υδρόφοβες ενώσεις με τις τιμές του logP να κυμαίνονται από 1,61 (DMP) έως 10,6 (DiDP). Η RP-LC γενικά δεν προτείνεται για ενώσεις με έντονα υδρόφιλο ή υδρόφοβο χαρακτήρα.

Με βάση τα παραπάνω και έπειτα από ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, οι στατικές φάσεις που ενδείκνυνται για τον προσδιορισμό των φθαλικών εστέρων είναι οι C8 και C18. Έτσι, η στήλη που επιλέχθηκε είναι η U-VD Spher PUR 100 C18-E (100 mm x 2.0 mm, 1.8 μm).

### 2.7.2 Επιλογή της Κινητής Φάσης

Οι διαλύτες των κινητών φάσεων στις μελέτες της διαθέσιμης βιβλιογραφίας (19) (20) (21) είναι η μεθανόλη (MeOH), το ακετονιτρίλιο (ACN) και το H<sub>2</sub>O. Με γνώμονα το γεγονός αυτό, αποφασίστηκε η κινητή φάση στην παρούσα εργασία να αποτελείται από τον διαλύτη (A) ο οποίος εμπεριείχε H<sub>2</sub>O και από το διαλύτη (B) με σύσταση ACN-MeOH σε αναλογία 50:50% v/v. Στους δύο αυτούς διαλύτες υπήρχε επίσης ποσότητα μυρμηκικού οξέος σε ποσοστό 0,1% v/v.

### 2.7.3 Δοκιμές συστήματος βαθμωτής έκλουσης

Προκειμένου να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός των ενώσεων-στόχων και η καλύτερη δυνατή μορφή κορυφών, έγιναν διάφορες δοκιμές βαθμωτής έκλουσης, σε ποικίλες αναλογίες όγκων των δύο διαλυτών. Το σύστημα που έδινε τον καλύτερο δυνατό διαχωρισμό, με τη μεγαλύτερη ευαισθησία για το MS και την καλύτερη χρωματογραφική μορφή κορυφών, στα πρότυπα διαλύματα αλλά και στα δείγματα των αποσταγμάτων, ξεκινούσε με ποσοστό 60% υδατικού και 40% οργανικού διαλύτη, με βαθμιαία αύξηση του οργανικού διαλύτη μέχρι τα 100% σε 14 λεπτά, και μείωση ξανά στο 40% ισοκρατικά για 4 λεπτά. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ , με αύξηση στα 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  στα 10-14 λεπτά και έπειτα μείωση πάλι στην αρχική τιμή. Στους Πίνακες 2.2 και 2.3 δίνονται τα προγράμματα βαθμωτής έκλουσης που δοκιμάστηκαν για το βέλτιστο διαχωρισμό των φθαλικών εστέρων και οι λόγοι για τους οποίους απορρίφθηκαν. Το τελικό σύστημα βαθμωτής έκλουσης που επιλέχθηκε έπειτα από αυτές τις δοκιμές δίνεται στον Πίνακα 2.4. Στο Σχήμα 2.1 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα όλων των εστέρων με την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών και σε συγκέντρωση προτύπου διαλύματος 1000  $\mu\text{g}/\text{L}$ .

**Πίνακας 2.2** Σύστημα βαθμωτής έκλουσης 1<sup>ης</sup> δοκιμής.

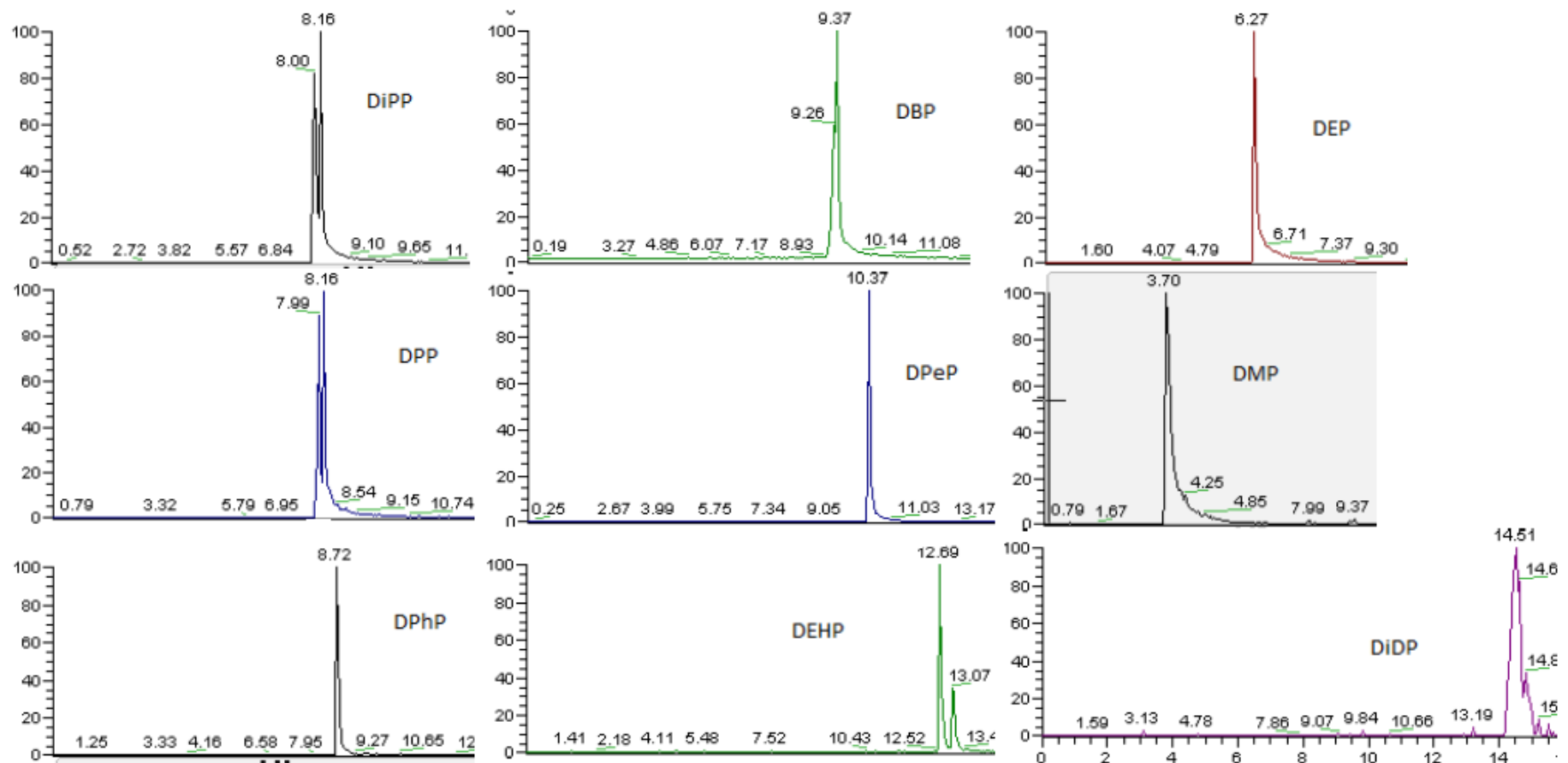
Χρόνος (min)	Διαλύτης A ( $\text{H}_2\text{O}$ + 0,1% v/v μυρμηκικό οξύ)	Διαλύτης B (ACN + 0,1% v/v μυρμηκικό οξύ)	Παρατηρήσεις
0	60	40	Μη ικανοποιητικός διαχωρισμός των ισομερών ενώσεων, ευρείες κορυφές
3,5	45	55	
6	25	75	
9	10	90	
12	0	100	
13	0	40	
13,01	60	40	
16	60	40	

**Πίνακας 2.3** Σύστημα βαθμωτής έκλουσης 2<sup>ης</sup> δοκιμής.

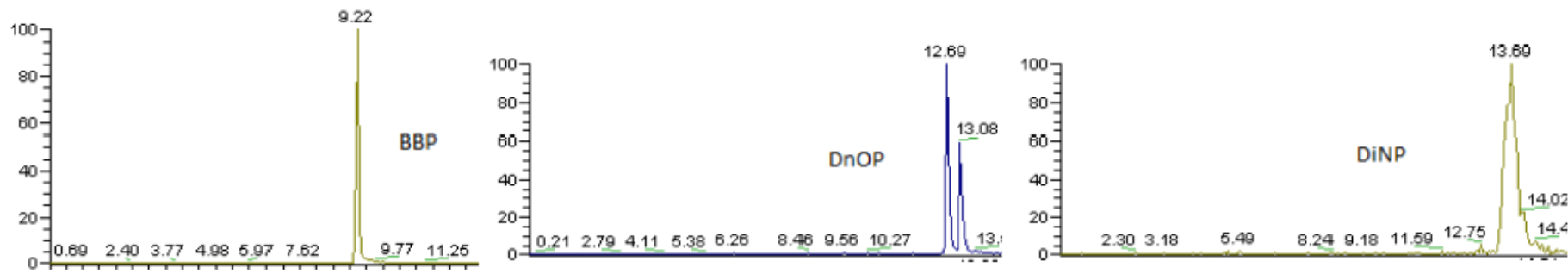
<b>Χρόνος (min)</b>	<b>Διαλύτης Α (H<sub>2</sub>O + 0,1% v/v μυρμηκικό οξύ)</b>	<b>Διαλύτης Β (ACN + 0,1% v/v μυρμηκικό οξύ)</b>	<b>Παρατηρήσεις</b>
0	60	40	Ικανοποιητικότερος διαχωρισμός των ισομερών ενώσεων, ευρείες κορυφές στους εστέρες DiNP και DiDP
6	40	60	
8	40	60	
11	0	100	
13	0	100	
13,01	60	40	
16	60	40	

**Πίνακας 2.4** Σύστημα βαθμωτής έκλουσης της αναπτυχθείσας μεθόδου.

<b>Χρόνος (min)</b>	<b>Διαλύτης Α (H<sub>2</sub>O + 0,1% v/v μυρμηκικό οξύ)</b>	<b>Διαλύτης Β (ACN-MeOH 50:50 v/v + 0,1% v/v μυρμηκικό οξύ)</b>
0	60	40
3,5	45	55
7,5	10	90
8,2	8	92
9	5	95
10	0	100
14	0	100
14,01	60	40
18	60	40



Σχήμα 2.1 Χρωματογραφήματα των φθαλικών εστέρων που μελετήθηκαν.



Σχήμα 2.1 (συνέχεια) Χρωματογραφήματα των φθαλικών εστέρων που μελετήθηκαν.

## 2.8 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η επιλογή του επιπέδου και του εύρους των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων της εργασίας, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου, έγινε με βάση τη διεξαγωγή προκαταρκτικών μετρήσεων για την ποσοτική εκτίμηση των εστέρων στα δείγματα και λαμβάνοντας υπόψη τα ελάχιστα επιτρεπτά όρια (SML) των ενώσεων στα αποστάγματα με βάση το Γενικό Χημείο του Κράτους. Έτσι, από τα πυκνά πρότυπα διαλύματα των 1000 mg L<sup>-1</sup> με κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα, στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Ο διαλύτης αραιώσεως ήταν η MeOH, όπως και στα αρχικά πυκνά διαλύματα. Συνολικά τα πρότυπα διαλύματα εργασίας ήταν οκτώ μίγματα ίσων συγκεντρώσεων όλων των ενώσεων, των οποίων οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 1 έως 2500 μg L<sup>-1</sup>.

## 2.9 ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς της μεθόδου πραγματοποιήθηκε ανάλυση κάθε πρότυπου διαλύματος, ξεκινώντας από το αραιότερο και καταλήγοντας στο πυκνότερο. Όλες οι αναλύσεις έγιναν εντός της ίδιας ημέρας, και για κάθε συγκέντρωση προτύπου λαμβάνονταν τρεις μετρήσεις. Στη συνέχεια, για κάθε φθαλικό εστέρα κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς της μέσης τιμής των εμβαδών έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης των προτύπων. Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων υπολογίστηκαν οι εξισώσεις της μορφής  $y=(a\pm s_a)+(b\pm s_b)x$ , όπου  $a$  τεταγμένη επί την αρχή,  $b$  η κλίση,  $s_a$ ,  $s_b$  το τυπικό σφάλμα της τεταγμένης επί την αρχή και της κλίσης αντίστοιχα, και ο συντελεστής συσχέτισης  $r$ . Εκτός από το συντελεστή συσχέτισης ο οποίος πρέπει να προσεγγίζει τη μονάδα, η τυχαία κατανομή των υπολοίπων (σφαλμάτων) εκατέρωθεν του άξονα των ανεξάρτητων μεταβλητών  $x$  στο διάγραμμα υπολοίπων διασφαλίζει την καλή γραμμικότητα της μεθόδου. Η αναλυτική μέθοδος τελικά, παρουσίασε πολύ καλή γραμμικότητα, με συντελεστή συσχέτισης  $r \geq 0,9975$ . Στον Πίνακα 2.1 δίνονται οι ευθείες ελαχίστων τετραγώνων και οι συντελεστές συσχέτισης για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.

Η ανάλυση διακύμανσης ANOVA έδωσε στοιχεία για την περαιτέρω ερμηνεία της συνολικής μεταβλητότητας του μοντέλου και για τον έλεγχο της υπόθεσης της γραμμικής παλινδρόμησης. Το άθροισμα των τετραγώνων παλινδρόμησης και των υπολοίπων (Regression Sum of Squares και Residual Sum of Squares, SS), η τιμή  $F$  που αποτελεί το λόγο της μέσης τιμής των τετραγώνων (Mean Squares, MS) της παλινδρόμησης με την αντίστοιχη των υπολοίπων, και η σημαντικότητα  $F$  ήταν οι παράμετροι που εξετάστηκαν. Ιδανικά θα πρέπει να ισχύει  $SS_{\text{παλινδρόμησης}} \gg SS_{\text{υπολοίπων}}$  για μικρές τιμές σφαλμάτων,  $MS_{\text{παλινδρόμησης}} \gg MS_{\text{υπολοίπων}}$  για καλή γραμμική σχέση και μικρή τιμή σημαντικότητας  $F$  για ισχυρή σχέση μεταξύ των τιμών  $y$  και  $x$ .



## 2.10 ΌΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ (LOQ)

Ως όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) ορίζεται η μικρότερη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευθεί με μια μέθοδο (22). Το LOD λήφθηκε με βάση το τριπλάσιο ύψος κορυφής του θορύβου της βασικής γραμμής, σύμφωνα με τον τύπο:

$$S/N=3 \quad (2.3)$$

όπου: S το σήμα της κορυφής και N ο θόρυβος της βασικής γραμμής.

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantification, LOQ) είναι η μικρότερη ποσότητα της ουσίας που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το LOQ έχει τιμή τριπλάσια του LOD και λήφθηκε ως το δεκαπλάσιο ύψος του θορύβου της βασικής γραμμής, σύμφωνα με τον τύπο:

$$S/N=10 \quad (2.4)$$

Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού αποτελούν το πρώτο σημείο στις καμπύλες αναφοράς κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης. Στον Πίνακα 2.5 δίνονται τα LOD και LOQ για κάθε φθαλικό εστέρα.

**Πίνακας 2.5** Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.

Πρότυπο	Γραμμική περιοχή (μg L <sup>-1</sup> )	$b \pm s_b$	$a$	$r$	LOD (μg L <sup>-1</sup> )	LOQ (μg L <sup>-1</sup> )
<b>DMP</b>	10-2500	2753,77 ± 47,02	-1007,7	0,9996	3,3	10,0
<b>DEP</b>	5-2500	26418,92 ± 297,30	35324,1	0,9997	1,7	5,0
<b>DiPP</b>	5-2500	18695,36 ± 178,32	34368,8	0,9998	1,7	5,0
<b>DPP</b>	5-2500	19344,62 ± 219,48	-83743,2	0,9997	1,7	5,0
<b>DPhP</b>	5-2500	1936,86 ± 29,88	6221,8	0,9995	1,7	5,0
<b>BBP</b>	5-2500	1527,01 ± 33,55	-8738,5	0,9995	1,7	5,0
<b>DBP</b>	10-2500	22772,84 ± 811,90	89234,6	0,9981	3,3	10,0
<b>DPeP</b>	5-2500	12768,15 ± 322,01	-187797	0,9987	1,7	5,0
<b>DEHP</b>	5-2500	10918,18 ± 127,75	369868,4	0,9998	1,7	5,0
<b>DnOP</b>	10-2500	3990,68 ± 65,93	235507,8	0,9996	3,3	10,0

**Πίνακας 2.5 (συνέχεια)** Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου.

<b>DiNP</b>	50-2500	1145,34 ± 56,60	266380,5	0,9976	16,7	50,0
<b>DiDP</b>	100-2500	536,42 ± 18,57	-62470,6	0,9988	33,3	100,0

$b$ : κλίση της ευθείας,  $s_b$ : τυπικό σφάλμα της κλίσης,  $a$ : τεταγμένη επί την αρχή,  $r$ : συντελεστής συσχέτισης

## 2.11 ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η **ακρίβεια** μιας αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται με το απόλυτο σφάλμα (absolute error,  $E$ ), δηλαδή τη διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής της μετρούμενης συγκέντρωσης και της πραγματικής τιμής:

$$E = \bar{x} - \mu \quad (2.5)$$

όπου:  $\bar{x}$  η μέση τιμή των μετρούμενων συγκεντρώσεων μια ένωσης και  $\mu$  η πραγματική τιμή της συγκέντρωσης. Μια μέθοδος είναι τόσο περισσότερο ακριβής, όσο μικρότερο είναι το υπολογιζόμενο απόλυτο σφάλμα. Συχνά, ένας όρος πιο χρήσιμος από το απόλυτο σφάλμα είναι το σχετικό σφάλμα  $E_r$  που εκφράζεται ως εκατοστιαία ποσότητα της πραγματικής τιμής σύμφωνα με τον τύπο (23):

$$E_r = 100 \times E / \mu \quad (2.6)$$

Ο βαθμός συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του ίδιου δείγματος με την ίδια τη μέθοδο, ορίζει την **πιστότητα** της αναλυτικής μεθόδου. Η επαναληψιμότητα είναι η προσέγγιση της πιστότητας που αφορά σε μετρήσεις του ίδιου δείγματος, από τον ίδιο αναλυτή μέσα στην ίδια ημέρα (intra- day precision), ενώ η ενδιάμεση πιστότητα αφορά σε μετρήσεις του ίδιου δείγματος σε διαφορετικές ημέρες (inter- day precision). Η πιστότητα εκφράζεται μέσω της τυπικής απόκλισης (Standard Deviation,  $s$ ) και της σχετικής τυπικής απόκλισης (Relative Standard Deviation,  $s_r$ ).

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας, πραγματοποιήθηκαν οκτώ επαναλαμβανόμενες μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων μείγματος των φθαλικών εστέρων, σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων. Η σχετική τυπική απόκλιση των μετρήσεων αυτών κυμάνθηκε από 0,45 έως 14,92%, γεγονός που διασφαλίζει την καλή επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Για τον έλεγχο της ενδιάμεσης πιστότητας, λήφθηκαν τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις πρότυπων διαλυμάτων μείγματος των ενώσεων σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, σε πέντε διαδοχικές ημέρες. Οι χαμηλές τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων και σε αυτή την περίπτωση, επιβεβαιώνουν την ικανοποιητική ενδιάμεση πιστότητα, καθώς αυτή κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 1,57 και 14,00%.

Ο Πίνακας 2.6 συνοψίζει τις τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης και του σχετικού σφάλματος των μετρήσεων για κάθε φθαλικό εστέρα στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, κατά τη διάρκεια της ίδιας μέρας και 5 διαδοχικών ημερών.

**Πίνακας 2.6** Πιστότητα και ακρίβεια της μεθόδου.

Επαναληψιμότητα					Ενδιάμεση πιστότητα			
Πρότυπο	Προστέθηκε (μg L <sup>-1</sup> )	Βρέθηκε (μg L <sup>-1</sup> ) ± s <sup>a</sup>	s <sub>r</sub> (%)	Er (%)	Προστέθηκε (μg L <sup>-1</sup> )	Βρέθηκε (μg L <sup>-1</sup> ) ± s <sup>b</sup>	s <sub>r</sub> (%)	Er (%)
<b>DMP</b>	10	10,16±0,08	0,79	+1,58	10	10,42±0,19	1,82	+4,20
	100	91,94±3,26	3,55	-8,05	100	102,43±9,76	9,53	+2,43
	1000	1006,25±4,51	0,45	+0,62	1000	991,00±37,97	3,83	-0,90
<b>DEP</b>	10	8,80±0,48	5,45	-6,37	10	9,51±0,93	9,78	-4,83
	100	109,67±3,13	2,85	+9,67	100	108,22±5,70	5,27	+8,22
	1000	986,27±42,29	4,29	-1,37	1000	978,64±50,02	5,11	-2,14
<b>DiPP</b>	10	9,04±0,49	5,42	-9,63	10	9,09±0,19	2,09	-9,07
	100	97,40±1,72	1,78	-2,60	100	102,1±3,80	3,72	+0,02
	1000	1011,20±44,86	4,44	+1,12	1000	900,39±93,95	10,43	-9,96
<b>DPP</b>	10	9,99±0,81	8,11	-0,13	10	9,22±0,38	4,12	-7,79
	100	86,43±2,05	2,37	-	100	92,59±2,25	2,43	-7,41
	1000	972,00±30,22	3,11	13,57 -2,8	1000	1007,00±43,10	4,28	+0,07
<b>DPhP</b>	10	9,93±1,48	14,90	-0,68	10	10,60±0,40	3,77	+6,00
	100	101,36±6,33	6,25	+1,36	100	100,79±5,70	5,66	+0,79
	1000	1029,68±29,94	2,91	+2,97	1000	1031,16±42,56	4,13	+8,14
<b>BBP</b>	10	10,95±1,88	17,17	+9,50	10	11,79±3,02	25,61	+17,90
	100	105,32±6,88	6,53	+5,32	100	105,56±6,37	6,03	+5,56
	1000	951,48±37,98	3,99	-4,85	1000	1005,79±53,98	5,37	+0,58
<b>DBP</b>	10	11,14±0,66	5,92	+11,40	10	10,21±0,83	8,13	+2,10
	100	96,24±3,58	3,72	0	100	96,47±6,21	0,06	-3,53
	1000	1028,03±40,14	3,90	-3,76 +2,80	1000	1033,18±24,65	2,39	+3,32

**Πίνακας 2.6 (συνέχεια) Πιστότητα και ακρίβεια της μεθόδου.**

<b>DPeP</b>	10	10,06±2,3	23,1	+0,60	10	9,82±1,50	15,2	-1,80
	100	108,95±4,01	6	+8,95	100	97,38±3,71	6	-2,62
	1000	1018,38±30,12	3,68	+1,84	1000	1049,44±35,90	3,81	+4,94
			2,96				3,42	
<b>DEHP</b>	10	10,03±0,4	4,49	+0,3	10	9,45±0,80	8,47	-5,50
	100	104,98±1	16,1	+4,98	100	109,35±1	9,32	+9,35
	1000	1169,07±12,98	6	+16,9	1000	1232,54±39,68	3,22	+23,25
			1,11	1				
<b>DnOP</b>	100	83,7±3,96	4,73	-16,3	100	123,15±3,58	2,91	+23,15
	1000	1131,13±23,05	2,04	+13,1	1000	1006,99±119,02	11,8	+0,699
	2500	2634,90±125,52	4,76	+5,40	2500	2623,39±240,91	2	+4,94
							9,18	
<b>DiNP</b>	100	116,10±1	11,7	+16,1	100	103,95±1,95	1,88	+3,95
	1000	903,73±3	6	0	1000	1095,83±99,47	9,07	+9,58
	2500	2550,56±368,87	3,59	-9,63	2500	2677,54±341,25	12,7	+7,10
			14,4	+2,02			4	
<b>DiDP</b>	100	122,84±9,68	7,88	+22,8	100	121,69±1	9,50	+21,69
	1000	1004,63±81,34	8,10	+0,46	1000	944,76±5	6,27	-5,52
	2500	2395,98±199,77	8,34	3	2500	2387,21±177,17	7,42	-4,51
				-4,16				

“Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών για οκτώ επαναλαμβανόμενες μετρήσεις εντός της ίδιας ημέρας, <sup>b</sup>μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών για τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις σε πέντε διαδοχικές ημέρες, *s*: τυπική απόκλιση, *s*<sub>r</sub>: σχετική τυπική απόκλιση, E<sub>r</sub>: σχετικό τυπικό σφάλμα

### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Η φύση του συγκεκριμένου δείγματος επιτρέπει την παράλειψη του σταδίου της προκατεργασίας, γεγονός που απλοποιεί σημαντικά τη διαδικασία της ανάλυσης. Η ποσοτική αποτίμηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χάραξη καμπυλών αναφοράς με τη μέθοδο σταθερής προσθήκης προτύπου και τη χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων.

#### **3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Τα δείγματα των ελληνικών αποσταγμάτων ήταν στο σύνολο 56 και συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Σε 38 από τους παραγωγούς αυτών των δειγμάτων δόθηκε ερωτηματολόγιο 12 ερωτήσεων, προκειμένου να συλλεχθούν πληροφορίες για την αμπελοκαλλιέργεια, τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, τη διαδικασία της απόσταξης και το στάδιο της αποθήκευσης. Στον Πίνακα Π1 του Παραρτήματος δίνονται αναλυτικά οι απαντήσεις των ερωτηματολογίων. Τα 15 από τα 56 δείγματα που αναλύθηκαν, συλλέχθηκαν με βάση τους διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσής τους σε πλαστικές φιάλες, προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο χρόνος επαφής με πλαστικό υλικό σχετίζεται με τη συγκέντρωση των εστέρων στο απόσταγμα. Στον Πίνακα Π2 του Παραρτήματος δίνονται οι σχετικές πληροφορίες για τα συγκεκριμένα δείγματα. Καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας τα δείγματα των αποσταγμάτων διατηρήθηκαν σε γυάλινες φιάλες και σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **3.2 ΧΑΡΑΞΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΣΕ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ**

Η επίδραση του υποστρώματος είναι ένας παράγοντας που πρέπει να συνυπολογιστεί για τον σωστό ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων στα αποστάγματα. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα (pooled sample), αποτελούμενο από μίγμα ίσων ποσοτήτων (5 mL) των 56 δειγμάτων. Κλάσματα του αντιπροσωπευτικού δείγματος εμβολιάστηκαν με γνωστές ποσότητες των 12 φθαλικών εστέρων, ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις να κυμαίνονται από 1 έως 2500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Για την παρασκευή του λευκού δείγματος (blank sample) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χωρίς όμως την προσθήκη προτύπου. Για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης προτύπου στα δείγματα, αλλά και για το λευκό δείγμα, λήφθηκαν τρεις μετρήσεις.

Στον Πίνακα 3.1 δίνονται οι ευθείες ελαχίστων τετραγώνων, οι συντελεστές συσχέτισης και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού για το αντιπροσωπευτικό δείγμα, όπως προέκυψαν από την ανάλυση παλινδρόμησης.

**Πίνακας 3.1** Ευθείες ελαχίστων τετραγώνων, συντελεστές συσχέτισης και όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού σε εμβολιασμένο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

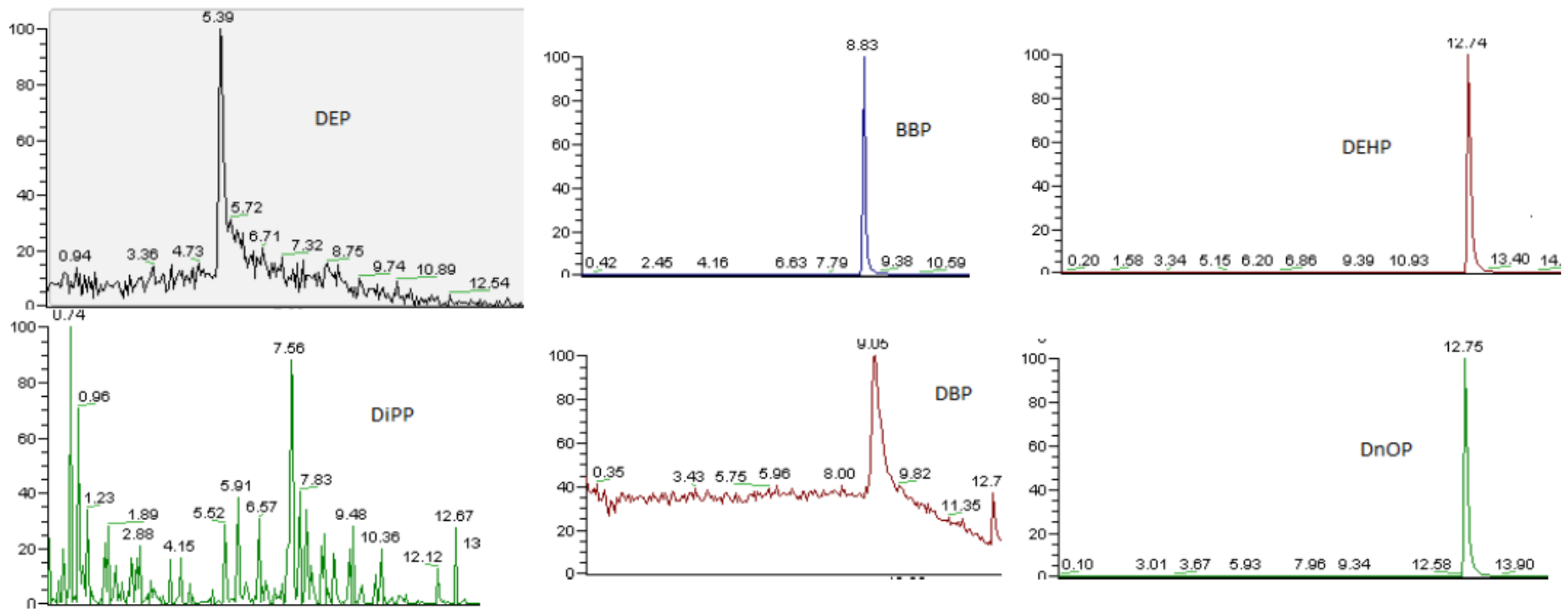
<b>Πρότυπο</b>	<b>Γραμμική περιοχή (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b><i>b</i> ± <i>s</i></b>	<b><i>α</i></b>	<b><i>r</i></b>	<b>LOD (μg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LOQ (μg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>DMP</b>	50-2500	2493,84 ± 23,43	0	0,9998	16,7	50,0
<b>DEP</b>	1-2500	21284,85 ± 92,04	342160,9	0,9999	0,3	1,0
<b>DiPP</b>	1-2500	6897,26 ± 57,26	-9902,24	0,9997	0,3	1,0
<b>DPP</b>	1-2500	10660,13 ± 42,91	21369,8	0,9999	0,3	1,0
<b>DPhP</b>	5-2500	1745,32 ± 5,90	9329,66	0,9999	1,7	5,0
<b>BBP</b>	1-2500	4504,30 ± 29,09	0	0,9998	0,3	1,0
<b>DBP</b>	1-2500	12990,73 ± 113,26	-1,9·10 <sup>-9</sup>	0,9997	0,3	1,0
<b>DPeP</b>	1-2500	6058,38 ± 27,08	-4,7·10 <sup>-10</sup>	0,9999	0,3	1,0
<b>DEHP</b>	5-2500	18467,27 ± 125,53	3,7·10 <sup>-9</sup>	0,9999	1,7	5,0
<b>DnOP</b>	50-2500	591,98 ± 8,42	1,2·10 <sup>-10</sup>	0,9995	16,7	50,0

**Πίνακας 3.1 (συνέχεια)** Ευθείες ελαχίστων τετραγώνων, συντελεστές συσχέτισης και όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού σε εμβολιασμένο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

<b>DiNP</b>	100-2500	403,26 ± 4,11	0	0,9998	33,3	100,0
<b>DiDP</b>	100-2500	142,57 ± 2,36	-2,9·10 <sup>-11</sup>	0,9997	33,3	100,0

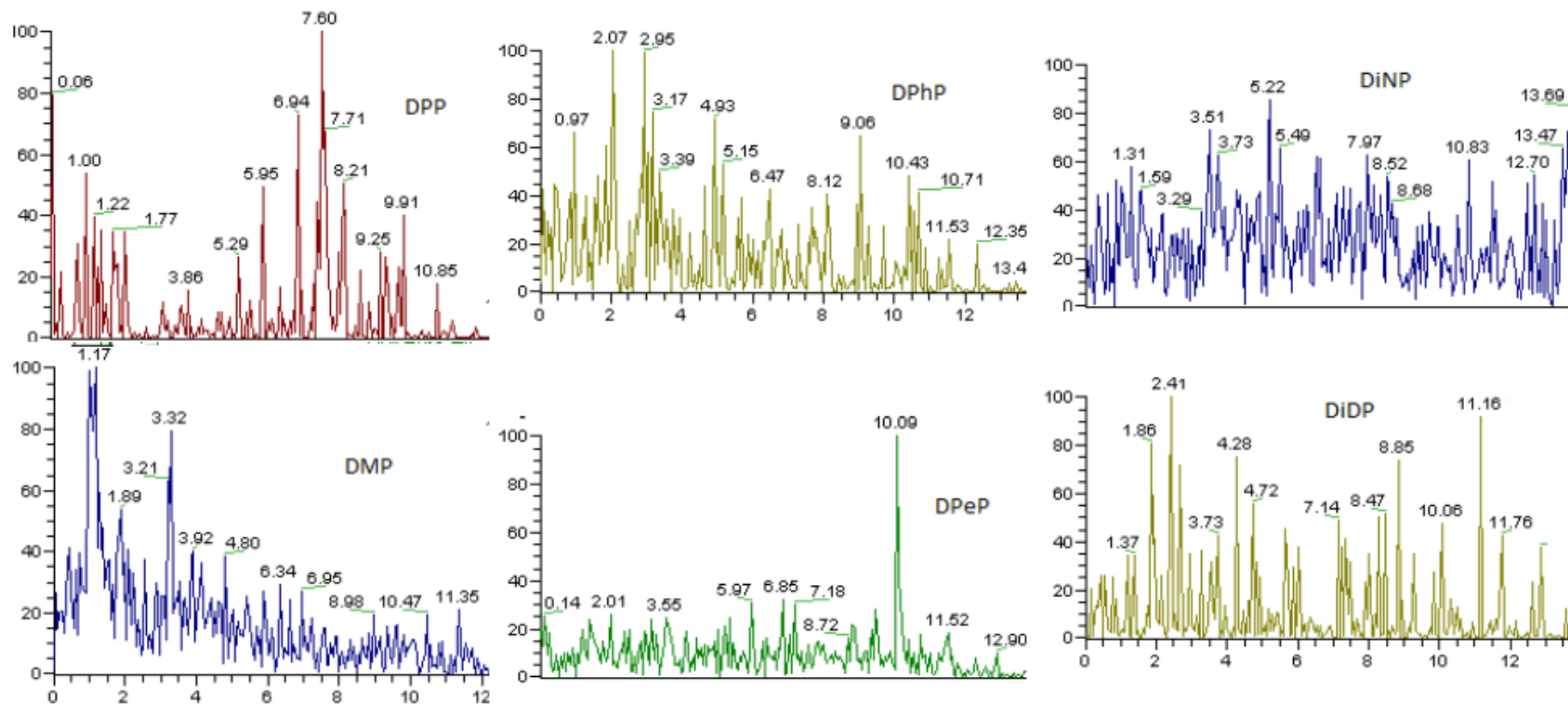
*b*: κλίση της ευθείας, *s<sub>b</sub>*: τυπικό σφάλμα της κλίσης, *a*: τεταγμένη επί την αρχή, *r*: συντελεστής συσχέτισης

Στα Σχήματα 3.1 και 3.2 παρουσιάζονται αντίστοιχα χρωματογραφήματα του λευκού αντιπροσωπευτικού δείγματος και του εμβολιασμένου ίδιου δείγματος, με μίγμα των 12 ενώσεων-στόχων συγκέντρωσης 1000 μg L<sup>-1</sup> (β). Ο ικανοποιητικός διαχωρισμός ακόμα και των ισομερών ενώσεων επιβεβαιώνει την εκλεκτικότητα και την αξιοπιστία της μεθόδου.

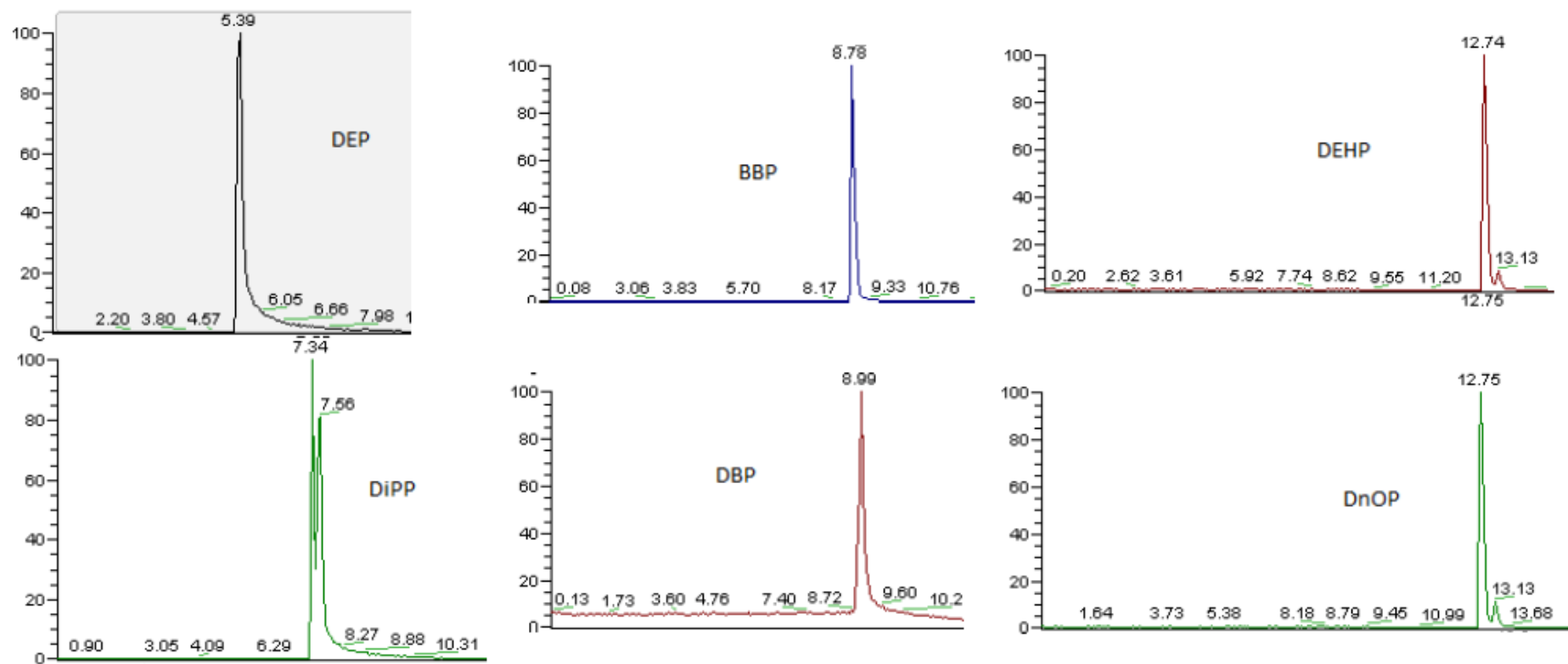


Σχήμα 3.1 Χρωματογραφήματα των ενώσεων στο λευκό αντιπροσωπευτικό δείγμα.

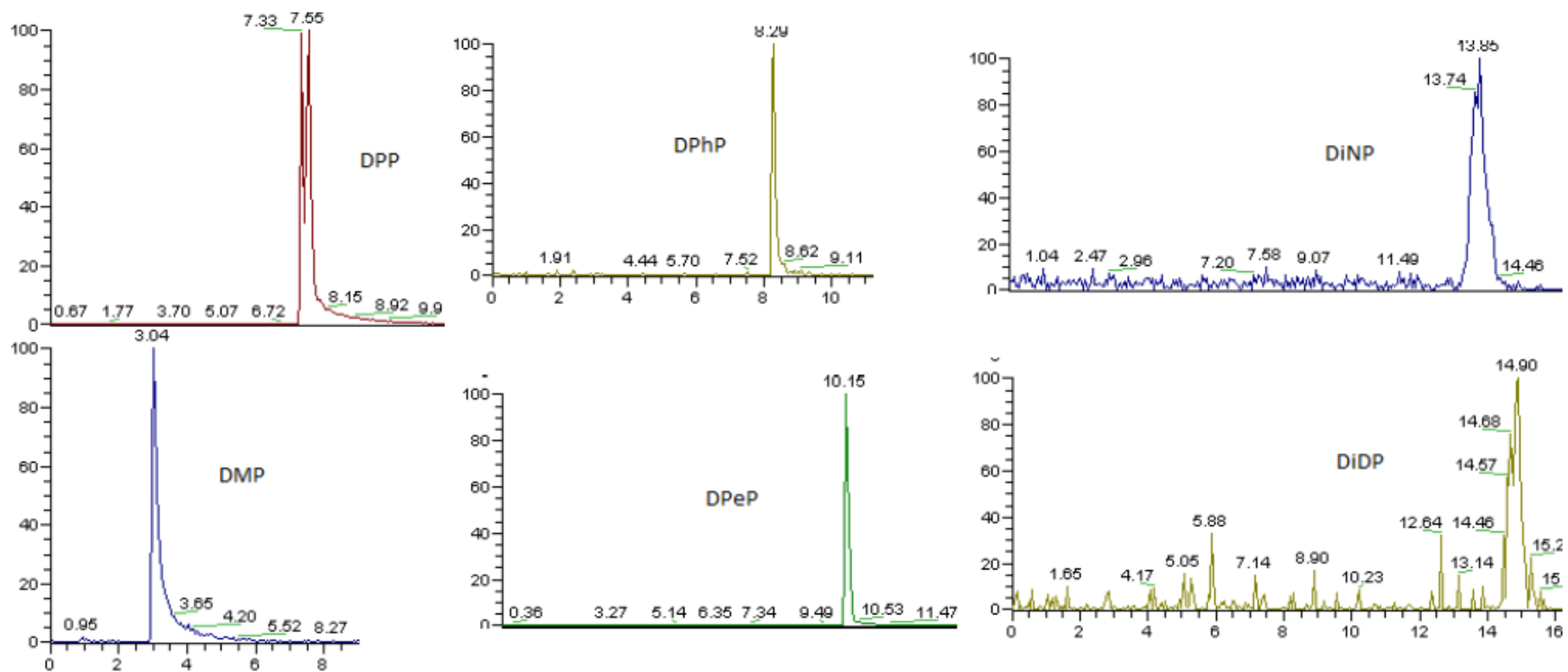




Σχήμα 3.1 (συνέχεια) Χρωματογραφήματα των ενώσεων στο λευκό αντιπροσωπευτικό δείγμα.



Σχήμα 3.2 Χρωματογραφήματα των ενώσεων στο εμβολιασμένο αντιπροσωπευτικό δείγμα.



Σχήμα 3.2 (συνέχεια) Χρωματογραφήματα των ενώσεων στο εμβολιασμένο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

### 3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Η σύγκριση των καμπυλών αναφοράς στο διαλύτη και στο αντιπροσωπευτικό δείγμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της δοκιμασίας Student's test, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση του υποστρώματος για την εφαρμογή της αναπτυχθείσας μεθόδου στα δείγματα των αποσταγμάτων. Έτσι, οι κλίσεις των δύο ευθειών συγκρίθηκαν με τη διατύπωση της υπόθεσης ότι δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ τους (μηδενική υπόθεση,  $H_0$ ), σε στάθμη σημαντικότητας 5%, για στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των δύο κλίσεων είχε τη μορφή:

$$t = (b_1 - b_2) / S_{b_1 - b_2} \quad (3.1)$$

όπου  $b_1$  και  $b_2$  είναι οι κλίσεις των ευθειών παλινδρόμησης (καμπύλες αναφοράς στο αντιπροσωπευτικό δείγμα και στο διαλύτη, αντίστοιχα) και  $S_{b_1 - b_2}$  το τυπικό σφάλμα μεταξύ της διαφοράς των δύο κλίσεων, που υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$S_{b_1 - b_2} = \sqrt{[(S_{y,x}^2)_p / (\Sigma x^2)_1] + [(S_{y,x}^2)_p / (\Sigma x^2)_2]} \quad (3.2)$$

όπου  $(S_{y,x}^2)$  είναι το τετράγωνο της αντιπροσωπευτικής υπολειμματικής μέσης τιμής (pooled residual mean squared) και οι δείκτες 1 και 2 αναφέρονται στις συγκρινόμενες ευθείες παλινδρόμησης. Ο υπολογισμός των κρίσιμων (θεωρητικών) τιμών του  $t$ -test έγινε, λαμβάνοντας υπόψη  $(n_{1-2}) + (n_{2-2})$  βαθμούς ελευθερίας.

Στον Πίνακα 3.2 δίνονται τα αποτελέσματα του  $t$ -test μέσα από τη σύγκριση της πειραματικής τιμής  $t_{\text{πειραματικό}}$  με τη θεωρητική τιμή  $t_{\text{θεωρητικό}}$  όπως προκύπτει, από τους πίνακες για στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι, σε όλους τους φθαλικούς εστέρες, εκτός του DiPP, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές, αφού ισχύει  $t_{\text{πειραματικό}} > t_{\text{θεωρητικό}}$ . Στις ενώσεις αυτές δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι καμπύλες αναφοράς σε διαλύτη (μεθανόλη) για την ποσοτική αποτίμησή τους στα δείγματα, αλλά είναι απαραίτητη η χρήση των καμπυλών βαθμονόμησης στο αντιπροσωπευτικό εμβολιασμένο δείγμα. Αντίθετα, για τον φθαλικό εστέρα DiPP είναι δυνατή η χρήση της μεθανολικής εξίσωσης παλινδρόμησης, αφού τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση του υποστρώματος ( $t_{\text{πειραματικό}} < t_{\text{θεωρητικό}}$ ).

**Πίνακας 3.2** Αποτελέσματα του Student's test.

Ένωση	$t_{\text{πειραματικό}}$	$t_{\text{θεωρητικό}}$
<b>DMP</b>	4,637	2,447
<b>DEP</b>	7,356	2,262
<b>DiPP</b>	1,547	2,228

**Πίνακας 3.2 (συνέχεια)** Αποτελέσματα του Student's test.

<b>DPP</b>	17,267	2,228
<b>DPhP</b>	2,890	2,306
<b>DBP</b>	6,238	2,262
<b>DPeP</b>	9,631	2,228
<b>DEHP</b>	18,261	2,447
<b>DnOP</b>	21,624	2,365
<b>DiNP</b>	6,868	2,571
<b>DiDP</b>	10,562	2,776
<b>BBP</b>	19,027	2,306

### 3.4 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η μελέτη ανάκτησης της μεθόδου έγινε με τη χρήση του αντιπροσωπευτικού δείγματος, το οποίο εμβολιάστηκε με πρότυπα διαλύματα των φθαλικών εστέρων σε 3 επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλή, μεσαία, υψηλή συγκέντρωση). Ακολούθησε η ανάλυση του αρχικού δείγματος χωρίς επιμόλυνση και των τριών εμβολιασμένων κλασμάτων, σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο, και λήφθηκε ο μέσος όρος των τιμών από τις καμπύλες αναφοράς, για τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Η ανάκτηση της μεθόδου υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Ανάκτηση (\%)} = [(C_{\text{ευρεθείσα}} - C_{\text{αρχική}}) / C_{\text{προσθεθείσα}}] \times 100 \quad (3.3)$$

Ο Πίνακας 3.3 συνοψίζει τα αποτελέσματα της μελέτης, όπου είναι εμφανείς οι υψηλές τιμές της ανάκτησης, αφού η τελευταία κυμαίνεται από 81,6% έως 132,1%.

**Πίνακας 3.3** Μελέτη ανάκτησης των ενώσεων στο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

Ένωση	Αρχική συγκέντρωση (μg L <sup>-1</sup> )	Προσθεθείσα συγκέντρωση (μg L <sup>-1</sup> )	Βρέθηκε ± s <sup>a</sup> (μg/L)	s <sub>r</sub> <sup>b</sup> (%)	Ανάκτηση <sup>γ</sup> (%)
<b>DMP</b>	13,69	50	64,55±5,15	8,0	101,7
	13,69	500	497,2±18,26	3,7	92,7
	13,69	2500	2508±291,9	11,6	99,8

**Πίνακας 3.3 (συνέχεια)** Μελέτη ανάκτησης των ενώσεων στο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

<b>DiPP</b>	1,44	10	12,28±1,76	14,3	108,4
	1,44	100	103,0±10,03	9,7	101,6
	1,44	1000	957,5±75,36	7,9	95,6
<b>DPP</b>	2,00	10	11,27±1,03	9,1	92,7
	2,00	100	94,13±11,16	11,9	92,1
	2,00	1000	1002±171,3	17,1	100,0
<b>DPhP</b>	5,35	10	13,80±1,30	9,4	85,5
	5,35	100	101,6±7,210	7,1	96,3
	5,35	1000	991,2±89,73	8,7	98,6
<b>BBP</b>	167,35	500	578,0±66,05	11,4	82,1
	167,35	1000	983,3±6,640	6,7	81,6
	167,35	2500	2504±335,9	13,4	93,5
<b>DBP</b>	18,08	100	108,0±12,35	11,4	89,9
	18,08	500	584,7±40,89	8,4	100,6
	18,08	2500	2483±340,5	13,7	98,6
<b>DPeP</b>	11,27	50	55,30±5,020	9,1	88,1
	11,27	500	541,3±25,33	4,7	110,5
	11,27	2500	2491±111,7	4,5	99,2
<b>DEHP</b>	974,51	50	1033±114,5	11,1	118,2
	974,51	500	1502±162,6	10,8	105,5
	974,51	2500	3715±454,4	12,2	109,6
<b>DnOP</b>	403,62	500	1063±42,36	4,0	132,1
	403,62	1000	1260±147,1	11,7	85,7
	403,62	2500	2499±312,2	12,5	83,8

**Πίνακας 3.3 (συνέχεια)** Μελέτη ανάκτησης των ενώσεων στο αντιπροσωπευτικό δείγμα.

<b>DiNP</b>	102,99	500	527,7±19,57	3,7	84,9
	102,99	1000	1052±60,62	5,8	95,0
	102,99	2500	2490±99,57	4,0	95,5
<b>DiDP</b>	4,78	100	101,0±24,12	23,9	96,2
	4,78	1000	966,0±15,88	1,7	96,1
	4,78	2500	2509±212,0	8,5	100,2
<b>DEP</b>	16,08	50	60,48±7,180	13,6	88,8
	16,08	100	99,85±3,53	3,5	83,8
	16,08	1000	1007±58,41	5,8	99,6

<sup>a</sup>Μέσος όρος και τυπική απόκλιση των τιμών που βρέθηκαν από τις καμπύλες αναφοράς των εμβολιασμένων δειγμάτων, για τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις.

$${}^b S_r (\%) = 100 \times SD / \bar{x}, \text{ Ανάκτηση } (\%) = 100 \times C_{\text{ευρεσθείσα}} - C_{\text{αρχική}} / C_{\text{προστεθείσα}}$$

### 3.5 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΘΑΛΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΠΟΣΤΑΓΜΑΤΩΝ ΣΤΕΜΦΥΛΩΝ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε και περιγράφηκε προηγουμένως, εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό 12 φθαλικών εστέρων σε 56 δείγματα ελληνικών αποσταγμάτων στεμφύλων, που συλλέχθηκαν από διάφορες περιοχές της χώρας. Τα αποστάγματα εισήχθησαν απευθείας στο δειγματολήπτη, χωρίς να προηγηθεί κάποια προκατεργασία λόγω της απλής φύσης του δείγματος και της υψηλής εκλεκτικότητας της μεθόδου. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων που αναλύθηκαν, στις προσδιοριζόμενες ενώσεις δίνονται στον Πίνακα 3.4.

**Πίνακας 3.4** Συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) φθαλικών εστέρων σε πραγματικά δείγματα αποσταγμάτων στεμφύλων.

Δειγμάτων	DMP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DEP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DiPP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DPP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DPhP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	BBP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DBP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DPeP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DEHP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DnOP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DiNP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )	DiDP ( $\mu\text{g L}^{-1} \pm s$ )
1	-	-	-	-	-	8,33 $\pm$ 1,30	12,07 $\pm$ 1,26	-	18,42 $\pm$ 2,63	31,07 $\pm$ 2,4	-	-
2	-	2,06 $\pm$ 0,14	-	-	-	9,62 $\pm$ 1,94	24,47 $\pm$ 3,84	1,25 $\pm$ 0,02	144,33 $\pm$ 19,50	-	-	-
3	-	-	-	-	-	11,16 $\pm$ 0,84	-	-	6,92 $\pm$ 1,85	-	-	-
4	-	456,25 $\pm$ 66,22	-	-	-	56,26 $\pm$ 10,22	-	1,85 $\pm$ 0,42	607,51 $\pm$ 90,02	-	79,03 $\pm$ 11,13	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	5,13 $\pm$ 1,07	24,35 $\pm$ 0,50	-	14,41 $\pm$ 1,11	-	-	-
7	-	-	-	-	-	172,75 $\pm$ 5,65	-	-	11,34 $\pm$ 0,45	-	-	-
8	-	-	-	-	-	28,45 $\pm$ 0,30	39,15 $\pm$ 3,57	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	10,43 $\pm$ 1,28	3,16 $\pm$ 0,94	-	70,13 $\pm$ 2,02	-	-	-
10	-	1,11 $\pm$ 0,30	-	-	-	-	5,31 $\pm$ 0,30	-	-	-	-	-
11	3,19 $\pm$ 0,34	-	-	-	-	5,76 $\pm$ 1,47	18,23 $\pm$ 1,50	-	9,13 $\pm$ 0,52	26,08 $\pm$ 1,44	-	-
12	-	2,24 $\pm$ 0,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	19,14 $\pm$ 0,23	2,55 $\pm$ 0,17	10,37 $\pm$ 1,43	-	-	500,94 $\pm$ 91,39	60,45 $\pm$ 7,53	-	15,40 $\pm$ 1,07	-	-	-
14	-	-	-	2,62 $\pm$ 0,01	-	491,95 $\pm$ 7,28	-	-	18,92 $\pm$ 0,23	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Πίνακας 3.4 (συνέχεια)** Συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) φθαικών εστέρων σε πραγματικά δείγματα αποσταγμάτων στεμφύλων.

16	6,45±0,42	-	-	-	-	-	30,65±3.2 1	-	31,68±2,3 2	12,96±1,0 3	57,89±3,8 7	-
17	-	2,10±0,14	-	-	-	-	21,53±0.5 5	-	19,43±3,0 8	-	-	-
18	-	0,99±0,06	-	-	-	29,03±2,8 6	64,46±5.0 2	-	19,32±2,0 5	-	-	-
19	8,45±1,21	-	-	-	-	6,21±0,42	12,60±3.0 6	-	20,58±1,2 1	26,94±1,6 7	-	-
20	-	-	-	-	-	8,45±1,08	26,44±3.6 4	-	77,13±2,2 8	-	-	-
21	-	-	-	-	-	708,20±68 ,69	17,60±1.1 9	1,23±0,28	75,28±4,9 3	-	-	-
22	-	-	-	-	-	4,35±0,12	7,77±1.25	-	10,52±0,9 8	-	-	-
23	-	-	-	-	-	190,34±2, 39	-	-	7,45±0,11	-	-	-
24	3,98±0,50	-	-	-	-	579,60±10 2,79	12,63±1,9 7	1,19±0,22	53,41±8,4 2	29,26±1,2 3	-	-
25	-	-	-	-	-	270,37±69 ,38	-	-	66,71±15, 28	-	-	-
26	31,36±1,8 0	5,13±0,51	-	5.26±0.39	-	1526,28±1 94,17	31,90±0,5 7	-	194,24±21 ,55	-	882,96±12 ,02	-
27	-	-	-	1,48±0,12	-	-	135,77±1, 12	103,76±3, 06	93339,53± 345,54	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	46,08±5,7 3	2,03±0.22	-	3,18±0,40	-	-	9,37±1,31	16,01±2,4 5	68828,67± 2170,39	-	-	-
31	56,17±2,0 7	-	-	2,34±0,26	-	-	14,27±2,4 6	16,23±0,4 3	113219,80 ±896,53	-	-	-

**Πίνακας 3.4 (συνέχεια)** Συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) φθαικών εστέρων σε πραγματικά δείγματα αποσταγμάτων στεμφύλων.

32	66,61±4,2 5	-	-	-	-	134,26±30 ,83	29,41±5,4 4	1,11±0,13	783,20±98 ,26	-	172,90±2, 77	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	446,44±10 ,22	-	174,08±2, 26	-
34	-	1,25±0,23	-	-	-	2,49±0,42	10,32±2,5 4	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	6,93±1,56	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36(1) <sup>α</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36(2) <sup>β</sup>	-	-	-	-	-	3,04±0,27	1,23±0,11	-	-	-	-	-
36(3) <sup>γ</sup>	-	-	-	-	-	2,37±0,21	21,79±4,7 5	-	-	-	-	-
36(4) <sup>δ</sup>	-	2,47±0,18	-	-	-	-	12,26±1,3 8	-	17,87±0,1 0	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	26,60±2,0 2	-	36,85±3,4 5	27,40±3,8 9	-	-
37(1) <sup>α</sup>	-	2,91±0,24	-	-	-	-	29,91±3,1 2	-	-	-	-	-
37(2) <sup>β</sup>	-	-	-	-	-	-	25,41±4,8 9	-	27,14±1,6 4	-	-	-
37(3) <sup>γ</sup>	-	9,90±1,70	-	-	-	-	30,16±1,4 0	-	30,53±5,5 8	-	-	-
37(4) <sup>δ</sup>	-	1,60±0,26	-	-	-	-	30,98±0,7 2	-	25,01±1,9 8	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	9,93±0,70	-	68,13±3,2 1	-	-	-
38(1) <sup>α</sup>	-	-	-	-	-	-	26,78±3,8 9	-	-	-	-	-

**Πίνακας 3.4 (συνέχεια)** Συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) φθαικών εστέρων σε πραγματικά δείγματα αποσταγμάτων στεμφύλων.

38(2) <sup>β</sup>	-	1,11±0,02	-	-	-	-	8,49±0,46	-	15,39±2,20	-	-	-
38(3) <sup>γ</sup>	-	-	-	-	-	-	26,27±4,56	-	6,65±0,87	-	-	-
38(4) <sup>δ</sup>	-	-	-	-	-	-	17,05±2,19	-	12,32±1,45	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	30,43±0,79	-	20,33±2,68	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	1,02±0,27	-	-	-	79,85±11,54	23,67±2,83	3,33±0,52	228,68±27,38	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	26,98±0,96	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	1,37±0,10	-	-	-	-	-	-
44	17,87±1,27	1,56±0,47	-	-	-	-	35,05±1,99	-	-	30,65±2,21	-	-
45	24,34±3,11	-	-	-	-	2,40±0,67	-	-	-	-	-	-

Συμπερασματικά, σε όλα τα δείγματα, εκτός των 5, 15, 28, 29, 36, 36(1) και 40, ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις από τις προσδιοριζόμενες ουσίες.

Στα δείγματα 27, 30 και 31 εμφανίστηκαν συγκεντρώσεις του εστέρα DEHP αρκετά υψηλές, οι οποίες υπερέβαιναν τα όρια της γραμμικής περιοχής, και γι' αυτό έλαβε χώρα κατάλληλη αραίωση ώστε να υπολογιστεί σωστά η ποσότητα της ένωσης.

Η ανίχνευση φθαλικών εστέρων σε αλκοολούχα αποστάγματα αποτελεί ένα σύνηθες φαινόμενο καθώς, οποιοδήποτε διάλυμα φέρει υψηλή συγκέντρωση αιθυλικής αλκοόλης ( $> 30\% \text{vol}$ ) μπορεί να αποτελέσει εύκολο μέσο για τη μετανάστευση ενός τέτοιου είδους πλαστικοποιητή σε αυτό. Όπως ανέφεραν και οι Kamouris et al., τα υψηλού αλκοολικού βαθμού προϊόντα μπορούν να διαλυτοποιήσουν τους πλαστικοποιητές αυτούς καθώς, ανήκουν στις μη-πολικές ενώσεις. Επομένως, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της αλκοόλης στο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερα επίπεδα μετανάστευσης θα παρατηρηθούν. Τα αποστάγματα στεμφύλων έχουν αλκοολικό τίτλο μεγαλύτερο από  $40\% \text{vol}$  (24).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνάς μας, ο φθαλικός εστέρας DEHP αποτελεί τον βασικότερο πλαστικοποιητή που εμφανίζεται στα αλκοολούχα αποστάγματα που αναλύθηκαν. Ο DEHP, ως κύρια μεταναστεύουσα ουσία στην παρούσα έρευνα, ανήκει στην κατηγορία των φθαλικών εστέρων που έχουν μεγάλο μοριακό βάρος ( $> 300$ ). Ωστόσο, δεν έχει εξακριβωθεί αν υπάρχει σταθερή σχέση μεταξύ του μοριακού βάρους ενός πλαστικοποιητή και του επιπέδου της μετανάστευσης, όταν αυτός έρχεται σε επαφή με κάποιο αλκοολούχο διάλυμα (24). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τη Σαλαπασίδου (2009) και τους Luo et al. (2012), οι φθαλικοί εστέρες που έχουν μεγάλο μοριακό βάρος (π.χ ο DEHP) χρησιμοποιούνται, κατά κύριο λόγο, για την ικανότητα που έχουν να καθιστούν εύκαμπτα και ανθεκτικά τα διάφορα πολυμερή, όπως το PVC, ενώ οι φθαλικοί εστέρες που έχουν μικρότερο μοριακό βάρος (DMP, DEP και BBP) εφαρμόζονται ευρέως ως διαλύτες που συγκρατούν το χρώμα και την οσμή σε ποικίλα καταναλωτικά προϊόντα προσωπικής φροντίδας (π.χ αρώματα, σαπούνια, lotions κ.α) (25). Ίσως και γι' αυτό το λόγο να μπορεί να δικαιολογηθεί η έντονη παρουσία του συγκεκριμένου φθαλικού εστέρα σε σχέση με τους υπόλοιπους πλαστικοποιητές.

Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζει και η ποσότητα του πλαστικοποιητή που φέρεται σε ένα πλαστικό υλικό, καθώς σύμφωνα με τους Kamouris et al. (1975), όσο πιο μεγάλη είναι η συγκέντρωση του πλαστικοποιητή στο πλαστικό αυτό υλικό, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα θα μεταναστεύσει από αυτό σε κάποιο διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης, εξαιτίας της υψηλότερης διάχυσης. Επομένως, θα μπορούσαμε να πούμε ότι τα πλαστικά υλικά, με τα οποία ήρθαν σε επαφή τα συγκεκριμένα επιμολυσμένα αποστάγματα (οποιοσδήποτε πλαστικός εξοπλισμός και πλαστικοί περιέκτες αποθήκευσης), μπορεί να έφεραν υψηλότερες συγκεντρώσεις DEHP, σε σχέση με άλλους φθαλικούς εστέρες, χωρίς ωστόσο να μπορούμε να το αποδείξουμε. Ωστόσο, με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, ο συγκεκριμένος πλαστικοποιητής φαίνεται να χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία, επομένως η παρουσία του δεν δημιουργεί

μεγάλη έκπληξη. Συγκεκριμένα, η Σαλαπασίδου (2009) αναφέρει ότι, το 95% του παραγόμενου φθαλικού εστέρα DEHP χρησιμοποιείται για την πλαστικοποίηση διαφόρων ειδών PVC, όπου τυπικά η περιεκτικότητά τους σε αυτόν μπορεί να φθάσει το 30% (w/w). Στα είδη αυτά συμπεριλαμβάνονται οι συσκευασίες τροφίμων, τα δοχεία τροφίμων και τα προστατευτικά σωληνώσεων, δηλαδή είδη με τα οποία τα αποστάγματα μπορεί να ήρθαν σε επαφή καθ' όλη τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας. Το χαμηλό κόστος του συγκεκριμένου φθαλικού εστέρα δικαιολογεί την εφαρμογή του στη βιομηχανία σε πληθώρα προϊόντων (8).

Παράλληλα, σημαντικό παράγοντα στη μετανάστευση ενός φθαλικού εστέρα αποτελεί και το pH του διαλύματος. Βάσει των Σουφλερός και Ροδοβίτης (2014), τα αποστάγματα στεμφύλων έχουν τιμές pH μεγαλύτερες από 3,5. Σε έρευνα των Bosnić et al. (2007), που πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ανίχνευση φθαλικών εστέρων σε δείγματα εμφιαλωμένου μεταλλικού νερού και σε δείγματα soft drinks και δίνοντας έμφαση στο διαφορετικό pH που παρουσιάζουν, φάνηκε πως τα επίπεδα μετανάστευσης των εστέρων ήταν πολύ υψηλότερα σε τιμές pH < 3 (soft drinks) και χαμηλότερα σε τιμές pH > 5 (μεταλλικό νερό) (26). Με τα ευρήματα αυτά γίνεται εμφανής η σημαντική επίδραση ενός όξινου μέσου στη μετανάστευση των φθαλικών εστέρων. Στη περίπτωση των soft drinks, ο κυρίαρχος φθαλικός εστέρας ήταν ο DMP, ο οποίος φαίνεται να διαλύεται σε περισσότερο όξινα μέσα, ενώ στα δείγματα του εμφιαλωμένου μεταλλικού νερού ήταν οι DBP και DEHP, που διαλύονται σε περισσότερο αλκαλικά μέσα. Όσον αφορά τα αποστάγματα, η οξύτητα δεν είναι τόσο μεγάλη όσο στα αναψυκτικά, ωστόσο υπάρχουν οξέα (ηλεκτρικό, γαλακτικό, κιτρικό, τρυγικό, οξικό, μυρμηγκικό, προπιονικό, βουτυρικό, ισοβουτυρικό, καπροϊκό κ.α) που ενδεχομένως να υποβοηθούν τη μετανάστευση των φθαλικών εστέρων. Στην παρούσα πειραματική έρευνα, το pH των περισσότερων αποσταγμάτων κυμαινόταν στα 3,5, ενώ των επιμολυσμένων ξεπερνούσε τα 4 (και σε κάποιες περιπτώσεις ακόμη και τα 5). Επομένως, οι υψηλές συγκεντρώσεις του DEHP που ανιχνεύτηκαν στα αποστάγματα στεμφύλων που αναλύθηκαν, μπορεί να προέκυψαν εξαιτίας του περισσότερο αλκαλικού περιβάλλοντος που παρουσίασαν τα αλκοολούχα αυτά δείγματα.

Ειδικότερα όσον αφορά τον τομέα της συσκευασίας και αποθήκευσης, μελετώντας την έρευνα των Balafas et al. (1999), οι φθαλικοί εστέρες DMP, DEP και DnOP δεν φαίνεται να χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα στη βιομηχανία συσκευασίας των τροφίμων. Επομένως, αναμένεται περισσότερο η εμφάνιση των υπόλοιπων φθαλικών εστέρων (DBP και DEHP), για τους οποίους γίνεται λόγος και από πολλούς άλλους ερευνητές (14) (11) (25) (10) (27). Ιδιαίτερα, οι DMP και DnOP ανήκουν σε εκείνους τους φθαλικούς εστέρες που εφαρμόζονται, συνήθως, σε προϊόντα που δεν σχετίζονται με τη παραγωγή τροφίμων και ποτών, αλλά σε άλλα καταναλωτικά προϊόντα, όπως ήδη αναφέρθηκε. Επομένως, η απουσία εμφάνισης των DMP και DnOP στα συγκεκριμένα αποστάγματα μπορεί να δικαιολογηθεί και από τις εν λόγω έρευνες.

Όσον αφορά το είδος των πλαστικών περιεκτών που χρησιμοποιούνται από τους παραγωγούς για την αποθήκευση των αποσταγμάτων τους, δεν μπορούν να δοθούν απαντήσεις, λόγω έλλειψης σχετικών πληροφοριών. Αναφορικά, ωστόσο, σύμφωνα με τα είδη των πλαστικών περιεκτών που διακινούνται στην αγορά, οι πλαστικές φιάλες από τερεφθαλικό πολυαιθυλένιο (PET) και πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE) είναι οι περισσότερο συχνές. Στην τελευταία περίπτωση συμπεριλαμβάνονται και τα πλαστικά πόματα. Η χρήση του πολυβινυλοχλωριδίου (PVC), από την άλλη πλευρά, φαίνεται να έχει περιοριστεί πλέον στον τομέα των τροφίμων, εξαιτίας των πολλών άλλων μειονεκτημάτων του. Σε άλλες χώρες, μάλιστα, όπως η Ελβετία, έχει απαγορευτεί ρητά η χρήση του (28). Οι Marsh and Bugusu (2007) αναφέρουν συγκεκριμένα ότι το PET χρησιμοποιείται ευρέως ως υλικό συσκευασίας τροφίμων, με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τις πλαστικές φιάλες μεταλλικού νερού ή αναψυκτικών. Υπό κανονικές συνθήκες, οι φιάλες αυτές δεν προορίζονται για επαναχρησιμοποίηση, ωστόσο, επαναχρησιμοποιούνται από πολλούς για αποθήκευση οίνου και αποσταγμάτων. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο έχουν κατηγορηθεί για μετανάστευση φθαλικών εστέρων στο προϊόν κατά τη μακρά διατήρησή τους σε αυτά (29). Επιπλέον, σύμφωνα με την έρευνα των Balafas et al. (1999), κατά την οποία συλλέχτηκαν τρόφιμα και ποτά συσκευασμένα σε διάφορους τύπους πλαστικού, παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φθαλικών εστέρων ανιχνεύτηκαν σε προϊόντα συσκευασμένα σε πολυαιθυλένιο που έχει τυπωθεί (PPE/printed polyethylene). Ειδικότερα, στην περίπτωση των ποτών, το είδος των συσκευασιών που ερευνήθηκε ήταν από PET και PPE. Τα αποτελέσματα, όσον αφορά τους δύο αυτούς τύπους συσκευασίας, δεν παρουσίαζαν μεγάλες διαφορές, με το φθαλικό εστέρα DEHP να εμφανίζεται σε όλα και τον DBP σε ορισμένα από αυτά (27). Ωστόσο, και οι Chatonnet et al. (2014) στη δική τους έρευνα κάνουν μια αναφορά στη χρήση πλαστικών περιεκτών, που ενώ θα αναμενόταν υψηλή συγκέντρωση φθαλικών εστέρων στα δείγματά τους, φαίνεται να παρουσιάζουν μόλις ίχνη πλαστικοποιητών (14).

Πέρα όμως από τους πλαστικούς περιέκτες, φθαλικοί εστέρες μπορούν να μεταναστεύουν στα αποστάγματα και από πλαστικά εξαρτήματα κατά τη παραγωγική διαδικασία. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Chatonnet et al. (2014) σε δείγματα οίνων και αποσταγμάτων ανιχνεύτηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις οι φθαλικοί εστέρες DBP και DEHP, ο πρώτος από τους οποίους υπερέβαινε και το όριο ειδικής μετανάστευσης (SML) σε κάποια από αυτά. Με βάση την έρευνα αυτή διαπιστώθηκε ότι οι εύκαμπτοι σωλήνες μετάγγισης που συνδέονται με τις διάφορες αντλίες φαίνεται να φέρουν υψηλές συγκεντρώσεις DEHP, ενώ ο φθαλικός εστέρας DBP βρίσκεται άφθονος σε κάποια είδη επιστρώσεων εποξικής ρητίνης, οι οποίες καλύπτουν τις δεξαμενές ζύμωσης και αποθήκευσης. Μάλιστα, η τελευταία αυτή πηγή πλαστικοποιητών αποτελεί και τον κυριότερο τρόπο μόλυνσης των υπό ανάλυση οίνων και αποσταγμάτων (14). Επομένως, η υψηλή συγκέντρωση του DEHP στα δείγματα αποσταγμάτων της δικής μας έρευνας μπορεί να δικαιολογηθεί και από τη χρήση τέτοιου είδους εξαρτημάτων. Βέβαια, παρατηρείται διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των φθαλικών εστέρων,

μεταξύ των αλκοολούχων ποτών και των οίνων και αυτό εξηγείται από τους Fan et al. (2014), για τους μεν οίνους, κυρίως λόγω της χρήσης δρύινων βαρελιών, καθώς και ανοξειδωτων δεξαμενών κατά την οινοποίηση, ενώ για τα αποστάγματα η χρήση πλαστικών σωληνώσεων και δεξαμενών είναι πιο διαδεδομένη (11). Αναφορικά, σε έρευνα των Carlo et al. (2008) αποδείχθηκε ότι σε δείγματα οίνου που παρήχθησαν σε ανοξειδωτες δεξαμενές, χωρίς τη χρήση μέσων υψηλής επικινδυνότητας (πilotική μονάδα παραγωγής) δεν υπήρξε καμία μόλυνση των δειγμάτων από τους φθαλικούς εστέρες BBP και DBP. Αντίθετα, δείγματα του εμπορίου, όπου αναμένεται η πιθανή χρήση μέσων υψηλής επικινδυνότητας, η συχνότητα εμφάνισης των εστέρων αυτών ήταν 55% και 88% αντίστοιχα Η έντονη παρουσία του φθαλικού εστέρα DEHP στη συγκεκριμένη έρευνα αποδόθηκε σε παράγοντες του περιβάλλοντος (30).

Όπως αναφέρθηκε, κάποια από τα δείγματα που αναλύθηκαν, συλλέχθηκαν με βάση τους διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσής τους σε πλαστικές φιάλες. Η συλλογή αυτών των δειγμάτων (με A/A 36, 37, 38) έγινε από τρεις παραγωγούς σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία: κάθε παραγωγός συγκέντρωσε ένα δείγμα αποστάγματος, το οποίο παρέμεινε σε πλαστική φιάλη σε 5 διαφορετικούς χρόνους: 0 ώρες, 1 ώρα, 24 ώρες, 168 ώρες (7 ημέρες) και 720 ώρες (1 μήνα). Στον Πίνακα Π2 του Παραρτήματος δίνονται οι σχετικές πληροφορίες για τα συγκεκριμένα αποστάγματα. Οι εστέρες που ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, σε αυτά τα δείγματα, ήταν ο DBP και ο DEHP. Ωστόσο, δε φαίνεται να παρατηρείται κάποια συσχέτιση της συγκέντρωσης του DBP με το χρόνο παραμονής σε πλαστική φιάλη, για τον DEHP όμως παρατηρούμε μια μικρή, αλλά όχι ιδιαίτερα σημαντική, αύξηση. Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφική ανασκόπηση, οι Mehdi et al. (2008) και οι Keresztes et al. (2013) παρατήρησαν μία αύξηση των συγκεντρώσεων των φθαλικών εστέρων σε μία χρονική περίοδο πολύ μεγαλύτερη του ενός μήνα, μελετώντας όμως δείγματα εμφιαλωμένου νερού και λιπαρών τροφίμων, αντίστοιχα (31) (32). Επομένως, ίσως και στην περίπτωση των υψηλού αλκοολικού βαθμού προϊόντων (όπως των αποσταγμάτων στη συγκεκριμένη περίπτωση) θα ήταν προτιμότερο να είχε γίνει κάποια επέκταση του χρόνου αποθήκευσης των αποσταγμάτων αυτών για ένα τέτοιο χρονικό διάστημα, ώστε να εξαχθούν πιο αντιπροσωπευτικά συμπεράσματα, που θα σχετίζονται με τη διάρκεια επαφής ενός αποστάγματος με έναν πλαστικό περιέκτη. Έτσι, μπορεί να κριθεί ενδιαφέρουσα η διαπίστωση ότι σε ένα χρονικό διάστημα ενός μήνα, τα αποστάγματα να μπορούν να αποθηκευτούν σε μία πλαστική φιάλη, χωρίς να συντρέχει λόγος επικινδυνότητας κατά την μετέπειτα κατανάλωσή του. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό θα πρέπει να εξαχθεί με απόλυτη βεβαιότητα, όταν ο αριθμός των αποσταγμάτων που θα αναλυθούν θα είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα. Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να λαμβάνεται παράλληλα υπόψη και η θερμοκρασία αποθήκευσης των αποσταγμάτων, ως ένας παράγοντας που συνδέεται άμεσα με τη διάρκεια αποθήκευσης ενός τροφίμου σε έναν πλαστικό περιέκτη, σύμφωνα με τους Kampouris et al. (1975) (24).

### 3.6 ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΩΝ

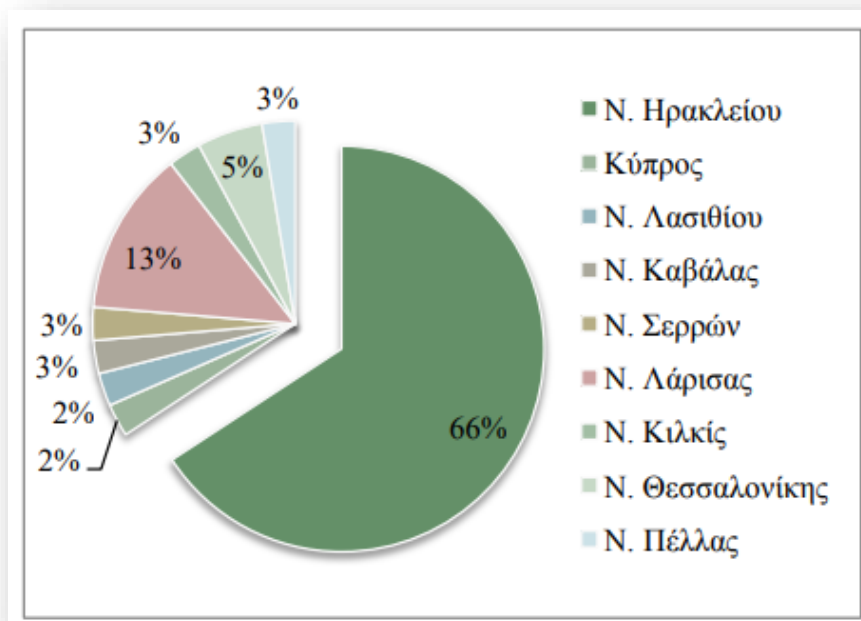
Το ερωτηματολόγιο που δόθηκε σε κάθε παραγωγό, αποτελούνταν από 12 ερωτήσεις, η απάντηση των οποίων εξασφάλιζε σημαντικές πληροφορίες για τη διαδικασία και τις συνθήκες παραγωγής των αποσταγμάτων. Τα αποτελέσματα, λοιπόν, αναλύθηκαν με βάση τις πληροφορίες που συλλέχθηκαν για την αμπελοκαλλιέργεια, τη διαδικασία της αλκοολικής ζύμωσης, τη διαδικασία της απόσταξης και το στάδιο της αποθήκευσης.

Σε πρώτη φάση, έγινε μια ταξινόμηση των αποσταγμάτων με βάση το νομό της χώρας, όπου πραγματοποιήθηκε η καλλιέργεια της αμπέλου. Ο μεγαλύτερος αριθμός ήταν από το νομό Ηρακλείου (66%), με το νομό Λάρισας (13%) και Θεσσαλονίκης (5%) να καταλαμβάνουν τη δεύτερη και τρίτη θέση αντίστοιχα. Το Σχήμα 3.3 αναπαριστά το εκατοστιαίο ποσοστό προέλευσης των αποσταγμάτων. Δεδομένου ότι τα δείγματα που εμφάνισαν υψηλή συγκέντρωση του εστέρα DEHP, ήταν από το νομό Λάρισας, θα μπορούσε να αναζητηθεί μια πηγή ρύπανσης, η οποία να σχετίζεται με το εξωτερικό περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η αμπελοκαλλιέργεια. Ο ατμοσφαιρικός αέρας μιας βιομηχανικής περιοχής είναι πλούσιος σε PAEs, τα συγκεκριμένα αποστάγματα, όμως, δεν προήλθαν από αμπελώνες κοντά σε μια τέτοια παραγωγική μονάδα, άρα ίσως θα πρέπει να εστιάσουμε στις κοινές αγροτικές πρακτικές των κατοίκων της περιοχής. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος για επιμόλυνση από τους φθαλικούς εστέρες φαίνεται να προέρχεται από τα πλαστικά υλικά που έρχονται σε επαφή με τα λιπάσματα, τα γεωργικά φάρμακα και το νερό άρδευσης, με αποτέλεσμα οι πλαστικοποιητές να μεταναστεύουν στο εκάστοτε υγρό διάλυμα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος και τη χρόνια αποθήκευση σε τέτοιου είδους δοχεία, αυξάνει τα επίπεδα μετανάστευσης των PAEs στα διαλύματα, και κατ' επέκταση στα προς αλκοολική ζύμωση και απόσταξη σταφύλια. Παρ' όλα αυτά, η τόσο υψηλή συγκέντρωση του DEHP στα αποστάγματα δεν δικαιολογείται ακόμη και στην περίπτωση ενός ρυπασμένου εξωτερικού περιβάλλοντος (33).

Τα παραγόμενα αποστάγματα προέρχονταν από ένα συνδυασμό διάφορων ποικιλιών αμπέλου. Τα περισσότερα από αυτά προέρχονταν από την ποικιλία «Σουλτανίνα» και αμέσως μετά ακολουθούσαν οι ποικιλίες «Μοσχάτο» και «Λιάτικο» (γνωστή ποικιλία της Κρήτης). Σε πολλές περιπτώσεις οι αποσταγματοποιοί επέλεξαν και την παραγωγή αποστάγματος από την ποικιλία «Κοτσιφάλι» (γνωστή επίσης σε κρητικούς αμπελώνες) και από την ξένη «Cabernet Sauvignon». Σε ελάχιστο βαθμό χρησιμοποιούνταν οι ποικιλίες: Ξυνιστέρι (Κυπριακή ποικιλία), Μανδηλάρι, Ροδίτης και οι ξένες Syrah, Merlot, Cinsaut και Grand Noir. Τονίζεται ότι, τα επιμολυσμένα με τον φθαλικό εστέρα DEHP δείγματα προέρχονται από την ποικιλία «Μοσχάτο» σε συνδυασμό ή όχι με την ξένη ποικιλία «Cabernet Sauvignon». Ωστόσο, δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα που να συσχετίζουν το είδος της χρησιμοποιούμενης ποικιλίας με την εμφάνιση των φθαλικών εστέρων στα αποστάγματα. Η μοναδική παρατήρηση που μπορεί να γίνει είναι ότι, οι δύο αυτές ποικιλίες χρησιμοποιούνται,

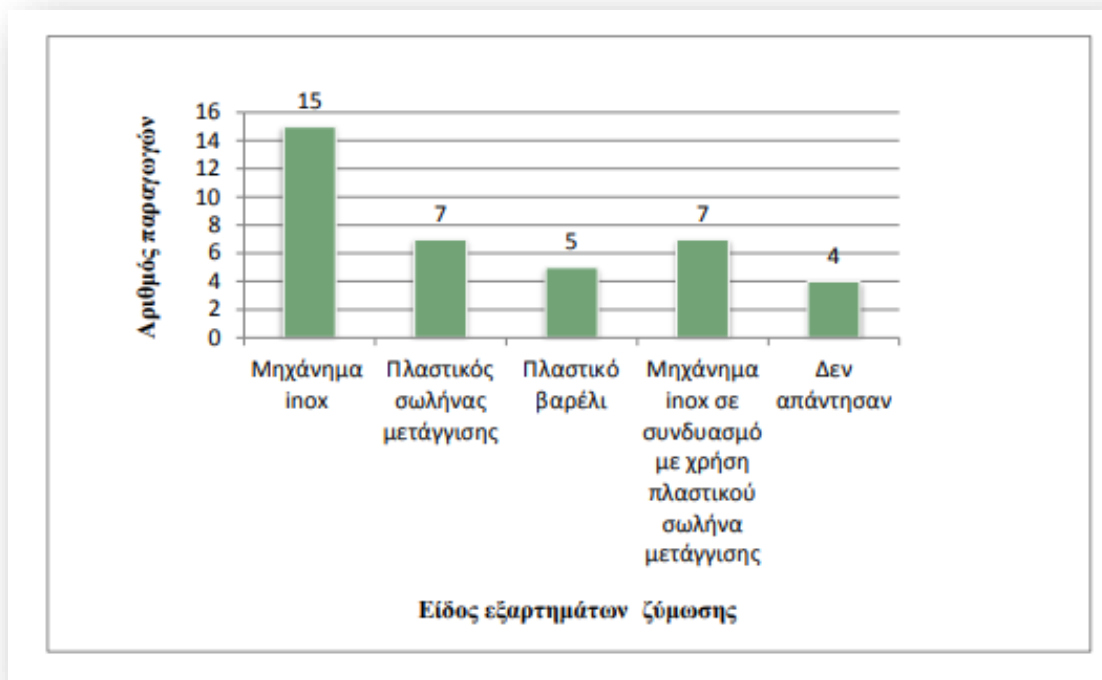


κατά κύριο λόγο, στις αποστάξεις που πραγματοποιούνται στην ευρύτερη περιοχή της Βορείου Ελλάδας.



**Σχήμα 3.3** Περιοχές (Νομοί) αμπελοκαλλιέργειας στις οποίες παρήχθησαν τα σταφύλια, που προορίστηκαν για απόσταξη.

Μετά τη συλλογή τους από τους αμπελώνες, τα σταφύλια μετατρέπονται σε σταφυλόμαζα μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Στο στάδιο αυτό, έρχονται σε επαφή με διάφορα είδη εξαρτημάτων (πλαστικά βαρέλια, πλαστικοί σωλήνες, ανοξείδωτα μηχανήματα ή ακόμη και συνδυασμός αυτών). Η χρήση ανοξείδωτων μηχανημάτων (Ιποχ) φαίνεται να αποτελεί το κύριο είδος εξαρτημάτων κατά την αλκοολική ζύμωση, με τη χρήση πλαστικών σωλήνων να καλύπτει, επίσης, ένα σημαντικό ποσοστό. Συμπεράσματα για το χρόνο παραμονής των στεμφύλων σε πλαστικά δοχεία ζύμωσης, σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία της διαδικασίας δεν μπορούν εξαχθούν, διότι δεν απάντησαν όλοι οι παραγωγοί στις σχετικές ερωτήσεις (33).

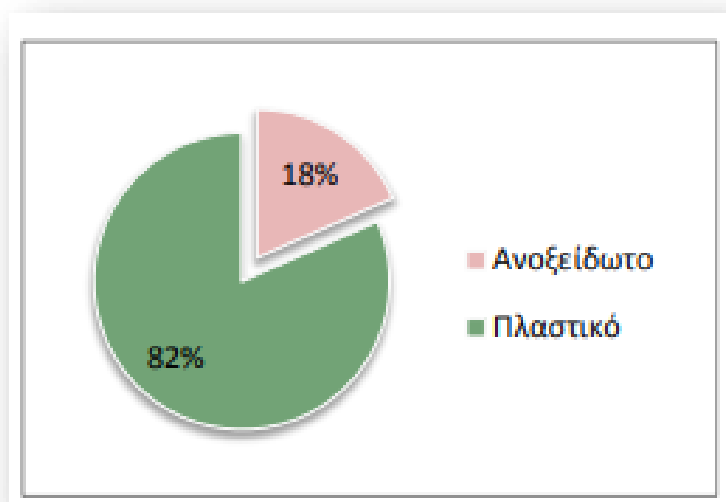


**Σχήμα 3.4:** Είδη εξαρτημάτων (ανοξείδωτα, πλαστικά κ.α) που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλκοολική ζύμωση

Επιπλέον, σημαντικό ρόλο παίζει και ο αλκοολικός τίτλος που έχει το αλκοολούχο διάλυμα κατά τη διάρκεια της επαφής με τέτοιου είδους πλαστικούς σωλήνες. Με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, όσο υψηλότερη είναι η αλκοόλη σε ένα δείγμα τόσο πιο εύκολα επιτυγχάνεται η μετανάστευση του πλαστικοποιητή στο απόσταγμα (11). Πιθανότατα, να μην πραγματοποιείται κάποιου είδους μετανάστευση στον οίνο, που προκύπτει μετά από την αλκοολική ζύμωση, όταν αυτός έρχεται σε επαφή με κάποιο πλαστικό σωλήνα, μιας που ο αλκοολικός τίτλος σε εκείνο το στάδιο είναι πολύ χαμηλός (< 15% vol). Αντίθετα, μετά από την απόσταξη, η επαφή με ένα τέτοιο εξάρτημα μπορεί να αυξήσει την επικινδυνότητα μετανάστευσης στο παραγόμενο απόσταγμα. Οπότε, σε περίπτωση που υπήρξε κάποια επιμόλυνση από πλαστικό σωλήνα, αυτή ενδεχομένως να πραγματοποιήθηκε σε στάδιο όπου το προϊόν είχε υψηλότερη συγκέντρωση αλκοόλης.

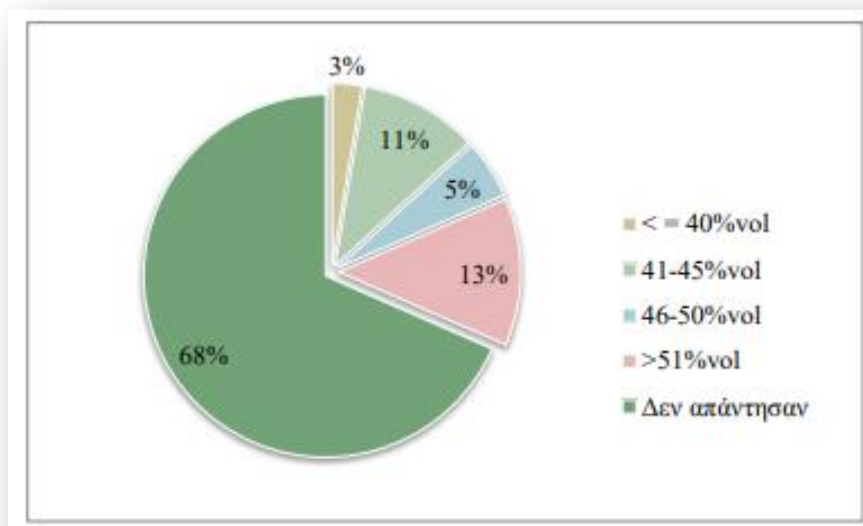
Επιπλέον, το γλεύκος για να ζυμωθεί τοποθετείται σε δοχεία διαφόρων τύπων. Τα δοχεία αυτά μπορεί να είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο χάλυβα (Inox) ή από κάποιο είδος πλαστικού υλικού. Στην συγκεκριμένη έρευνα το 82% των παραγωγών δήλωσαν ότι τα δοχεία που χρησιμοποιούν κατά τη ζύμωση είναι πλαστικά, ενώ μόνο το 18% αυτών χρησιμοποιεί ανοξείδωτες δεξαμενές (Σχήμα 3.4). Η χρήση πλαστικών δοχείων κατά την αλκοολική ζύμωση ήταν κυρίαρχη για τα περισσότερα από τα υπό εξέταση δείγματα, αλλά δεν φαίνεται να αποτελεί παράγοντα επιμόλυνσης, μιας που στα περισσότερα από αυτά δεν φάνηκε ίχνος πλαστικοποιητή. Επιπλέον, όπως ήδη αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά την αλκοολική ζύμωση, ο αλκοολικός τίτλος βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και επομένως, ίσως, να μην ευνοείται η μετανάστευση

των πλαστικοποιητών σε αυτό το στάδιο. Το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το πάχος και η ποσότητα του πλαστικοποιητή και η διάρκεια πλαστικοποίησης και σταθεροποίησης του πλαστικού υλικού που χρησιμοποιείται ως δοχείο ζύμωσης, επίσης, μπορούν να καθορίσουν τα επίπεδα μετανάστευσης ενός φθαλικού εστέρα στο παραγόμενο απόσταγμα. Ωστόσο, δεν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες για τους προαναφερόμενους παράγοντες.



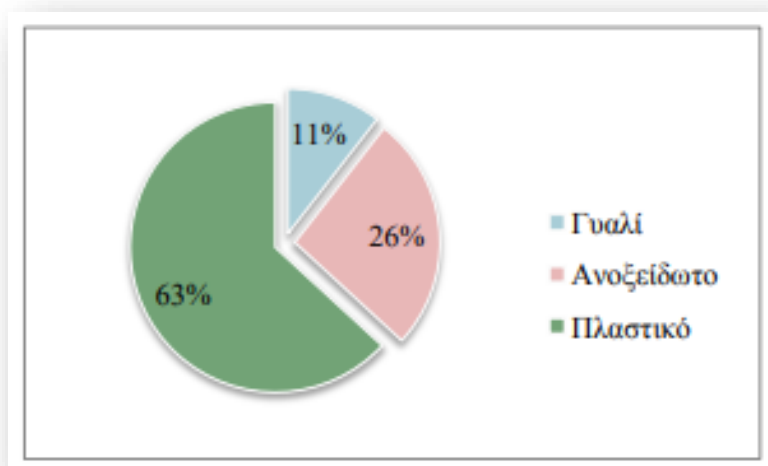
**Σχήμα 3.5:** Είδος δοχείου ζύμωσης (ανοξείδωτο ή πλαστικό) το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά την αλκοολική ζύμωση.

Το απόσταγμα που παράχθηκε κατά τη διαδικασία της απόσταξης φυλάσσεται έχοντας αποκτήσει κάποιο αλκοολικό βαθμό. Το 68% των παραγωγών δεν απάντησε στην ερώτηση για το βαθμό της αλκοόλης που περιέχεται στο απόσταγμά του. Μόνο το 3% αυτών δήλωσε πως το απόσταγμά του έχει λιγότερο από 40%vol και μόλις ένα 11% από 41-45%vol. Κάποιοι παραγωγοί (13%) δήλωσαν απόσταγμα με περισσότερο από 51%vol (Σχήμα 3.6). Τα επιμολυσμένα δείγματα έφεραν αλκοολικό τίτλο πάνω από 50%vol και αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί βάσει της έρευνας των Kampouris et al. (1975), οι οποίοι παρατήρησαν ότι, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση της αλκοόλης στο αλκοολούχο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερα επίπεδα μετανάστευσης θα παρατηρηθούν σε αυτό (24).



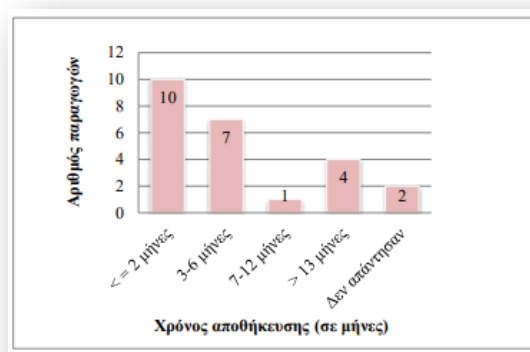
**Σχήμα 3.6:** Αλκοολικός βαθμός του παραγόμενου αποστάγματος (σε % vol).

Το παραγόμενο απόσταγμα μπορεί να αποθηκευτεί σε ποικίλα είδη περιεκτών κατασκευασμένα από γυαλί, από ανοξείδωτο χάλυβα και από πλαστικό. Πολύ σημαντική πηγή επιμόλυνσης αποτελεί η συσκευασία των τροφίμων που μπορεί να αυξήσει το ποσοστό εμφάνισης φθαλικών εστέρων, όταν τα τρόφιμα έρχονται σε επαφή με πλαστικούς περιέκτες, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα επικινδυνότητας. Με βάση τους Fan et al. (2014), η επαφή των αλκοολούχων ποτών με διάφορα είδη πλαστικών φιαλών αυξάνει την πιθανότητα μετανάστευσης φθαλικών εστέρων, εξαιτίας της υψηλής διαλυτότητας που παρουσιάζουν οι ενώσεις αυτές στην αιθυλική αλκοόλη (11). Το 63% των παραγωγών δήλωσε πως για το στάδιο της αποθήκευσης του αποστάγματος χρησιμοποιεί πλαστικό περιέκτη, το 26% ανοξείδωτο περιέκτη, ενώ μόλις το 11% γυάλινο (Σχήμα 3.7). Οφείλεται να επισημανθεί ότι, στο γράφημα αυτό δεν υπολογίζονται τα αποστάγματα που, πειραματικά, αποθηκεύτηκαν σε πλαστικές φιάλες για συγκεκριμένους χρόνους φύλαξης. Στην παρούσα μελέτη, φαίνεται πως η αποθήκευση σε τέτοιου είδους περιέκτες δεν σημαίνει απόλυτα ότι οδηγεί στην επιμόλυνση των αποσταγμάτων, κάτι το οποίο παρατήρησαν και οι Chatonnet et al. (2014) στην δική τους έρευνα πάλι σε δείγματα αποσταγμάτων (14). Επιπλέον, μερικά από τα δείγματα που έφεραν τον φθαλικό εστέρα DEHP είχαν αποθηκευτεί και σε γυάλινους και σε ανοξείδωτους περιέκτες και, επομένως, η πηγή επιμόλυνσής τους μπορεί να αναζητηθεί σε κάποιο άλλο παράγοντα, όπως είναι τα πλαστικά εξαρτήματα που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγική διαδικασία.



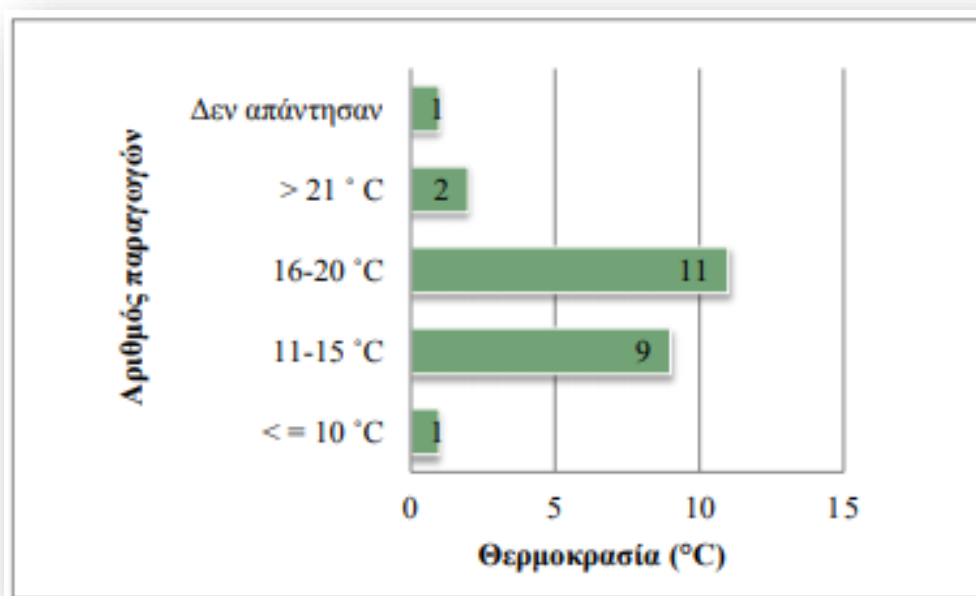
**Σχήμα 3.7:** Υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως περιέκτες για την αποθήκευση των αποσταγμάτων (γυάλινα, πλαστικά, ανοξειδωτά).

Σημαντικό ρόλο, ωστόσο, έχει και ο χρόνος παραμονής του αποστάγματος στην πλαστική φιάλη σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία. Οι 24 παραγωγοί που χρησιμοποιούν πλαστικό περιέκτη ρωτήθηκαν για τη διάρκεια παραμονής του αποστάγματος μέσα στον περιέκτη, όπως επίσης και τη θερμοκρασία αποθήκευσής του. Οι περισσότεροι παραγωγοί (10 σε αριθμό) αποθηκεύουν το απόσταγμα για διάστημα μικρότερο των δύο μηνών, 7 παραγωγοί για διάστημα μεταξύ 3-6 μηνών, ενώ οι υπόλοιποι παραγωγοί μπορούν να κρατήσουν το απόσταγμα μέσα στον πλαστικό περιέκτη για διάστημα μεγαλύτερο από ένα εξάμηνο (Σχήμα 3.8). Στο γράφημα αυτό, επίσης δεν υπολογίζονται τα αποστάγματα που, πειραματικά, αποθηκεύτηκαν σε πλαστικές φιάλες για συγκεκριμένους χρόνους φύλαξης. Από το γράφημα παρατηρούμε ότι οι περισσότεροι παραγωγοί αποθήκευσαν το απόσταγμά τους για ένα χρονικό διάστημα μεταξύ 2-6 μηνών χωρίς, ωστόσο, να ανιχνεύεται κάποιος φθαλικός εστέρας.



**Σχήμα 3.8:** Χρόνος παραμονής του παραγόμενου αποστάγματος στον πλαστικό περιέκτη φύλαξης (σε μήνες).

Ωστόσο, σύμφωνα με τους Kampouris et al. (1975), η διάρκεια αποθήκευσης ενός αλκοολούχου διαλύματος πρέπει να μελετάται παράλληλα και με τη θερμοκρασία διότι, όπως παρατήρησαν, 30 ημέρες επαφής στους 10°C έδωσε την ίδια ποσότητα μετανάστευσης με την επαφή για 2 μέρες στους 30°C, όπως επίσης και 30 μέρες επαφής στους 30°C έδωσε τα ίδια επίπεδα μετανάστευσης με την επαφή για 2 μέρες στους 60°C. Έτσι, όσον αφορά τη θερμοκρασία φύλαξης των αποσταγμάτων στα πλαστικά δοχεία, αυτή κυμαινόταν για τα περισσότερα αποστάγματα μεταξύ των 11-20°C, ενώ τα υπόλοιπα διατηρούνταν σε θερμοκρασία μεγαλύτερη ή/και μικρότερη του αναφερόμενου εύρους τιμών.



**Σχήμα 3.9:** Θερμοκρασιακές συνθήκες φύλαξης του αποστάγματος, το οποίο αποθηκεύτηκε μέσα σε πλαστικό περιέκτη (°C).

Τέλος, τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι το περίπου 5% των υπό ανάλυση δειγμάτων μπορούν να θεωρηθούν μη ασφαλή για κατανάλωση, ποσοστό που αντιπροσωπεύει πλήρως τις αντίστοιχες αναλύσεις στο Γενικό Χημείο του Κράτους. Σύμφωνα με τις εκθέσεις πεπραγμένων, των ετών 2012, 2013 και 2014, το 5-7% των δειγμάτων των αποσταγμάτων που αναλύεται κάθε χρόνο ορίζονται ως μη-κανονικά/μη-ασφαλή (33) (34) (35) (36).

#### 4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση και βάση της παρούσας πειραματικής έρευνας που πραγματοποιήθηκε, η ανίχνευση των φθαλικών εστέρων σε αλκοολούχα αποστάγματα αποτελεί κοινή παραδοχή. Ο φθαλικός εστέρας DEHP αποτελεί τον πιο συχνό σε εμφάνιση φθαλικό εστέρα και, μάλιστα, σε 3 από τα 56 αποστάγματα στεμφύλων ανιχνεύτηκε πάνω από τα επιτρεπόμενα όρια της ειδικής μετανάστευσης. Φαίνεται ότι η εμφάνιση του φθαλικού αυτού εστέρα μπορεί να οφείλεται στην επαφή των αλκοολούχων αποσταγμάτων με διάφορα είδη πλαστικών υλικών που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγική διαδικασία και αποθήκευση. Μάλιστα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του εστέρα παρατηρούνται σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε πλαστικούς περιέκτες και που ήρθαν παράλληλα σε επαφή με πλαστικά δοχεία ζύμωσης ή πλαστικούς σωλήνες μετάγγισης στα προηγούμενα στάδια της παραγωγής. Τα υπόλοιπα δείγματα ήρθαν σε επαφή μόνο με πλαστικά δοχεία ζύμωσης ή πλαστικούς σωλήνες μετάγγισης και έφεραν χαμηλότερες συγκεντρώσεις DEHP (μέσα στα όρια ειδικής μετανάστευσης). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το απόσταγμα έχει υψηλό αλκοολικό τίτλο σ' αυτά τα στάδια και βάση της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, όσο υψηλότερη αλκοόλη έχει ένα διάλυμα, τόσο υψηλότερα θα είναι και τα επίπεδα μετανάστευσης των φθαλικών εστέρων σε αυτά. Μάλιστα, τα επιμολυσμένα αυτά δείγματα έφεραν αλκοολικό τίτλο μεγαλύτερο από 50%vol. Βέβαια, αυτό δε σημαίνει ότι η επαφή με κάποιο από αυτά τα πλαστικά είδη οδηγεί απόλυτα στη μετανάστευση των φθαλικών εστέρων, καθώς και δείγματα στα οποία δεν ανιχνεύτηκε κανένας εστέρας (και με αλκοόλη μικρότερη από 40%vol), ήρθαν σε επαφή με τέτοιου είδους πλαστικά εξαρτήματα. Σε αυτή τη περίπτωση σημαντικό ρόλο παίζουν το μοριακό βάρος του πολυμερούς, το πάχος και η ποσότητα του πλαστικοποιητή, η διάρκεια πλαστικοποίησης και σταθεροποίησης, η αναλογία της επιφάνειας/όγκου του πλαστικού περιέκτη αποθήκευσης, η διάρκεια και η θερμοκρασία αποθήκευσης του αποσταγματος. Ωστόσο, σε όλες αυτές τις περιπτώσεις δεν μπορούν να δικαιολογηθούν οι τόσο υψηλές συγκεντρώσεις του DEHP στα αποστάγματα.

Κάποια από τα δείγματα που αναλύθηκαν, συλλέχθηκαν με βάση τους διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσής τους σε πλαστικές φιάλες. Οι εστέρες που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, σε αυτά τα δείγματα, ήταν ο DBP και ο DEHP. Ωστόσο, δε φαίνεται να παρατηρείται κάποια συσχέτιση της συγκέντρωσης του DBP με το χρόνο παραμονής σε πλαστική φιάλη, για τον DEHP όμως παρατηρούμε μια μικρή, αλλά όχι ιδιαίτερα σημαντική, αύξηση.

Στο μέλλον απαιτείται μία εκτενέστερη έρευνα για τα παραγόμενα ελληνικά αποστάγματα που διακινούνται στην αγορά, ώστε να επιβεβαιωθούν και να εμπλουτιστούν τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Μάλιστα, επειδή οι φθαλικοί εστέρες είναι ενώσεις που βρίσκονται παντού στο περιβάλλον, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μία έρευνα που να ανιχνεύει αυτούς τους πλαστικοποιητές σε συγκεκριμένα στάδια της παραγωγής των αποσταγμάτων (στη σταφυλόμαζα πριν από την αλκοολική ζύμωση, στον οίνο που προκύπτει από τη ζύμωση των σταφυλιών, στο

απόσταγμα που προκύπτει μετά από την απόσταξη και τέλος κατά την αποθήκευση των αποσταγμάτων). Με αυτόν τον τρόπο θα μπορεί να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε όλα τα στάδια της παραγωγής και να βρεθούν πιο εύκολα οι πηγές επιμόλυνσης των αποσταγμάτων.

Παρ' όλη την ανίχνευση του DEHP, στη παρούσα έρευνα, ο μεγαλύτερος αριθμός των ελληνικών αποσταγμάτων χαρακτηρίζονται ως «ασφαλή» για την ανθρώπινη κατανάλωση, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από τις εκθέσεις πεπραγμένων του Γενικού Χημείου του Κράτους. Εκτός, όμως, από τους ελέγχους σημαντικό ρόλο παίζει και η ενημέρωση των παραγωγών για την επικινδυνότητα που παρουσιάζει η χρήση πλαστικών υλικών, καθ' όλη τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας των αποσταγμάτων. Η σωστή ενημέρωση των παραγωγών μπορεί να οδηγήσει στην εξάλειψη των φαινομένων διακίνησης αποσταγμάτων ακατάλληλων προς κατανάλωση και κατ' επέκταση στη διασφάλιση της καλής υγείας του καταναλωτή.

Τέλος, από τα ευρήματα αυτής της μελέτης συμπεραίνουμε ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε και παρουσιάστηκε αναλυτικά στην παρούσα εργασία χαρακτηρίζεται από:

- Ικανοποιητικό και εκλεκτικό διαχωρισμό των ενώσεων, ακόμη και των ισομερών.
- Σύντομο κύκλο ανάλυσης, συνολικής διάρκειας 18 λεπτών.
- Μεγάλη ευαισθησία, με χαμηλά όρια LOD και LOQ, της τάξης των  $\mu\text{g L}^{-1}$ .
- Πολύ ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα.
- Απουσία προκατεργασίας των δειγμάτων.

Η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος, λοιπόν, κρίνεται αξιόπιστη και ικανή για τον έλεγχο ποιότητας ποτών υψηλής περιεκτικότητας σε αιθανόλη, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλες πιθανότητες περιεκτικότητας φθαλικών εστέρων, λόγω της φύσης τους.



## Βιβλιογραφία

1. **Liang, L and Huebschmann, H.** *Thermo Fish. Sci. Appl. note.* 2012, pp. 1–11.
2. **Heise, S and Litz, N.** In Phthalates. *German Federal Environmental Agency.* 2004, p. 10.
3. **Hubinger, J.** A survey of phthalate esters in consumer cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science.* 2010, pp. 457–465.
4. **Jarosova, A.** Phthalic acid esters (PAEs) in the food chain. *Czech Journal of Food Science.* 2006, pp. 223–231.
5. **Huang, J, Nkrumah, P and Appiah-Sefah, G.** Chemical behavior of phthalates under abiotic conditions in landfills. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 2013, pp. 39-52.
6. **U.S.EPA.** *Screening-level hazard characterization phthalate esters category.* s.l. : Hazard Characterization Document, 2010.
7. **Γκοργκόλιας, Χ.** Μελέτη της οξειδωτικής αποδόμησης δύο ενώσεων της κατηγορίας των ενδοκρινικών διαταρακτών μέσω της αντίδρασης *PhotoFenton*. 2010.
8. **Σαλαπασίδου, Μ.** Μελέτη της παρουσίας ενώσεων με ενδοκρινική δράση στην ατμόσφαιρα της Θεσσαλονίκης. 2009.
9. **Jianlong, W, Ping, L and Yi-Q.** Biodegradation of phthalic acid esters by acclimated activated sludge. *Environmental International.* 1996, pp. 737–741.
10. **Fierens, T, Servaes, K and Holderbeke, M.** Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. *Food and Chemical Toxicology.* 2012, pp. 2575–2583.
11. **Fan, Y, Liu, S and Xie, Q.** Rapid determination of phthalate esters in alcoholic beverages by conventional ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta.* 2014, pp. 291–298.
12. **Heudorf, U, Mersch-Sundermann, V and Angerer, J.** Phthalates: toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2007, pp. 623–634.
13. **Σουφλέρος, Ε and Ροδοβίτης, Β.** *Το τσίπουρο και η τσικουδιά.* Θεσσαλονίκη : ΙΔΙΩΤΙΚΗ, 2004. p. 295.
14. **Chatonnet, P, Bouton, S and Plana, A.** Contamination of wines and spirits by phthalate residues. Types of contaminants present, contamination sources and means of prevention. *Revue des Oenologues.* 2014, pp. 1605–1615.
15. **Πίνα, Α.** Προσδιορισμός ενδογενών μεταβολιτών στο βασιλικό πολτό με την τεχνική UPLC (HILIC) MS/MS. *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.* 2016.

16. **Θεοδωρίδης, Γ, Γηρούση, Σ και Ζαχαριάδης, Γ.** *Βιοαναλυτική χημεία*. Αθήνα : Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράματα και Βοηθήματα, 2015.
17. **Παπαδοπούλου-Μουρκίδου, Ε and Πατσιάς, Ι.** *Χρωματογραφία και εργαστηριακές τεχνικές*. s.l. : Μέθεξις, 2009. p. 160.
18. **Βουδούρης, Ε and Κοντομηνάς, Μ.** *Ανάλυση τροφίμων: Θεωρία και εφαρμογές*. s.l. : Οργανισμός εκδόσεως διδακτικών βιβλίων, 2010. p. 434.
19. **Barciela-Alonso, M, Otero-Lavandeira, N and Bermejo-Barrera, P.** Determination of phthalate esters in wine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2017, pp. 233–237.
20. **Kuang, H, Ding, T and Sheng, C.** Simultaneous determination of nine types of phthalate residues in commercial milk products using HPLC-ESI-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*. 2011, pp. 49–56.
21. **Holadová, K, Prokupková, G and Hajšlová, J.** Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification. *Analytica Chimica Acta*. 2007, pp. 120–127.
22. **Παπαδογιάννης, Ι and Σαμανίδου, Β.** *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*. Θεσσαλονίκη : Πήγασος, 2001.
23. **Ζαχαριάδης, Γ, Γηρούση, Σ and Βουλγαρόπουλος, Α.** *Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας με στοιχεία Μετρολογίας και Χημειομετρίας*. Θεσσαλονίκη : ΖΗΤΗ, 2013.
24. **Kampouris, E, Regas, F and Rokotas, S.** Migration of PVC plasticizers into alcohols. *Polymer*. 1975, pp. 840-844.
25. **Luo, Y, Yu, Q and Yuan, B.** Fast microextraction of phthalate acid esters from beverage, environmental water and perfume samples by magnetic multi-walled carbon nanotubes. *Talanta*. 2012, pp. 123-131.
26. **Bosnir, J, Puntaric, D and Galic, A.** Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water. *Food Technology and Biotechnology*. 2007, pp. 91–95.
27. **Balafas, D, Shaw, K and Whithfield, F.** Phthalate and adipate esters in Australian packaging material. *Food Chemistry*. 1999, pp. 279-287.
28. **Μπλούκας, Ι.** *Συσκευασία Τροφίμων*. s.l. : Σταμούλης, 2004, p. 328.
29. **Marsh, K and Bugusu, B.** Food packaging - Roles Materials and Environmental issues. *Journal of Food Science*. 2007, p. 72.
30. **Carlo, M, Pepe, A and Sacchetti, P.** Determination of phthalate esters in wine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2008, pp. 771-777.

31. **Mehdi, F, Zahra, E and Mohammad, R.** Effect of environmental conditions on the migration of di (2-ethylhexyl) phthalate from PET bottles into yogurt drinks: influence of time, temperature, and food simulant. *The Arabian journal for science and engineering*. 2008, p. 33.
32. **Keresztes, S, Tatar, E and Czegeny, Z.** Study on the leaching of phthalates from polyethylene terephthalate bottles into mineral water. *Science of the Total Environment*. 2013, pp. 451-458.
33. **Καταϊφτσή, Ν.** Προσδιορισμός φθαλικών εστέρων σε ελληνικά αποστάγματα μικρών αποσταγματοποιών ή αλλιώς «διημέρων». *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*. 2017.
34. **Γενικό Χημείο του Κράτους.** Έκθεση Πεπραγμένων έτους 2012. 2012.
35. **Γενικό Χημείο του Κράτους.** Έκθεση Πεπραγμένων έτους 2013. 2013.
36. **Γενικό Χημείο του Κράτους.** Έκθεση Πεπραγμένων έτους 2014. 2014.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### Ερωτηματολόγιο:

1. Ποιά είναι η τοποθεσία της αμπέλου (Νομός);  
.....
2. Ποιά είναι η ποσότητα του αποστάγματος που παράγεται;  
.....
3. Ποιά είναι η ποικιλία της αμπέλου από την οποία προέρχεται το απόσταγμα;  
.....
4. Το χωράφι είναι φυτεμένο σε βιομηχανική περιοχή, κοντά σε αυτή ή σε εργοστάσιο επεξεργασίας πλαστικών ειδών;  
.....
5. Με ποιό τρόπο μετατράπηκαν τα σταφύλια σε στέμφυλα (έχουμε επαφή πλαστικού PVC με τον πολτό, π.χ. πλαστική βαρέλα, εξάρτημα του πιεστηρίου, άλλου μηχανήματος ή σωληνώσεις)  
.....
6. Από τι υλικό είναι φτιαγμένο το δοχείο στο οποίο τοποθετήθηκαν τα στέμφυλα για να γίνει η ζύμωση;  
.....
7. Αν το υλικό της προηγούμενης ερώτησης είναι πλαστικό, πόσο καιρό παρέμειναν εκεί και σε ποιά θερμοκρασία;  
.....
8. Ποιά η ποσότητα των σακχάρων των σταφυλιών πριν από τη ζύμωση (βαθμοί Baumé);  
.....
9. Προστέθηκε γλυκάνισος κατά την απόσταξη;  
.....
10. Μετά την απόσταξη, ποιά είναι το υλικό του δοχείου στο οποίο αποθηκεύτηκε το απόσταγμα;  
.....
11. Αν το υλικό της προηγούμενης ερώτησης είναι πλαστικό, για πόσο χρονικό διάστημα αποθηκεύεται στο δοχείο αυτό και σε ποιά θερμοκρασία;  
.....
12. Σε τί αλκοολικό βαθμό φυλάσσεται το απόσταγμά σας μετά την απόσταξη στα διάφορα δοχεία φύλαξης;  
.....

**Εικόνα Π1.** Ερωτηματολόγιο 12 ερωτήσεων που δόθηκε στους αποσταγματοποιούς.

Πίνακας Π1. Απαντήσεις ερωτηματολογίων.

Δείγμα	Τοποθεσία αμπελώνα (Νομός)	Παραγόμενη ποσότητα αποστά/τος (λίτρα)	Ποικιλία αμπέλου	Γειτνίαση αμπελώνα με βιομ/κή περιοχή	Είδη εξαρτ/των κατά τη ζύμωση	Υλικό δοχείου ζύμωσης	Διάρκεια παραμονής στο υλικό ζύμωσης (ημέρες)	Θερμ/σία κατά την παραμονή στο υλικό ζύμωσης (°C)	Ποσότητα σακχάρων πριν από τη ζύμωση (°Bé)	Προσθήκη αρωμ/κής ύλης	Υλικό δοχείου φύλαξης	Διάρκεια φύλαξης (μήνες)	Θερμ/σία φύλαξης (°C)	Αλκοολικός βαθμός αποστά/τος (% vol)
2	Ηρακλείου	5000	Σουλτανίνα	Όχι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	15	30	14	Όχι	Πλαστικό	3	15	45
3	Ηρακλείου	300	Σουλτανίνα Λιάτικο Κοτσιφάλι Μανδηλάρι	Όχι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	30	30	15	Όχι	Πλαστικό	17	15	-
4	Κύπρος	>10000	Σουλτανίνα Ξυνιστέρι	Όχι	Μηχάνημα Inox	Inox	-1	-	15	Όχι	Γυαλί	-	-	-
5	Λασιθίου	5000	Σουλτανίνα	Όχι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	10	30	14	Όχι	Inox	-	-	-
6	Ηρακλείου	200	Σουλτανίνα Λιάτικο Κοτσιφάλι CabernetSa uignon	Όχι	Μηχάνημα Inox σε συνδυασμό με χρήση πλαστικού σωλήνα μετάγγισης	Πλαστικό	30	30	16	Όχι	Πλαστικό	2	15	-
7	Ηρακλείου	1000	Σουλτανίνα	Όχι	Μηχάνημα Inox σε συνδυασμό με χρήση πλαστικού σωλήνα μετάγγισης	Πλαστικό	15	25	15	Όχι	Πλαστικό	14	20	-

<i>Δείγμα</i>	<i>Τοποθεσία αμπελώνα (Νομός)</i>	<i>Παραγόμενη ποσότητα αποστά/τος (λίτρα)</i>	<i>Ποικιλία αμπέλου</i>	<i>Γειτνίαση αμπελώνα με βιομ/κή περιοχή</i>	<i>Είδη εξαρτ/των κατά τη ζύμωση</i>	<i>Υλικό δοχείου ζύμωσης</i>	<i>Διάρκεια παραμονής στο υλικό ζύμωσης (ημέρες)</i>	<i>Θερμ/σία κατά την παραμονή στο υλικό ζύμωσης (°C)</i>	<i>Ποσότητα σακχάρων πριν από τη ζύμωση (°Bé)</i>	<i>Προσθήκη αρωμ/κής ύλης</i>	<i>Υλικό δοχείου φύλαξης</i>	<i>Διάρκεια φύλαξης (μήνες)</i>	<i>Θερμ/σία φύλαξης (°C)</i>	<i>Αλκοολικός βαθμός αποστά/τος (% vol)</i>
9	Ηρακλείου	1000	Σουλτανίνα Λιάτικο Κοτσιφάλι Cabernet Sauvignon	Όχι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	30	30	15	Όχι	Πλαστικό	2	20	-
10	Ηρακλείου	200	Σουλτανίνα	Όχι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	20	30	15	Όχι	Πλαστικό	5	20	-
11	Ηρακλείου	150	Σουλτανίνα Κοτσιφάλι Μανδηλάρι	Όχι	Πλαστικό βαρέλι	Πλαστικό	10	25	14	Όχι	Πλαστικό	15	15	-
12	Ηρακλείου	30	Σουλτανίνα	Όχι	Πλαστικό βαρέλι	Πλαστικό	120	13	11	Όχι	Πλαστικό	2	12	-
13	Ηρακλείου	100	Syrah	Όχι	Μηχάνημα Inox	Inox	-	-	12	Όχι	Inox	-	-	42
14	Ηρακλείου	70	Σουλτανίνα	Όχι	Μηχάνημα Inox	Inox	-	-	14	Όχι	Inox	-	-	49
15	Ηρακλείου	70	Λιάτικο	Όχι	-	Πλαστικό	50	12	13	Όχι	Πλαστικό	3,5	12	45
16	Ηρακλείου	60	Λιάτικο Κοτσιφάλι	Όχι	-	Πλαστικό	65	13	13	Όχι	Πλαστικό	2	12	45
17	Ηρακλείου	200	Λιάτικο	Όχι	-	Πλαστικό	60	25	16	Όχι	Πλαστικό	3	12	53
18	Ηρακλείου	300	Σουλτανίνα	Όχι	-	Πλαστικό	60	25	13	Όχι	Πλαστικό	12	20	53

<i>Δείγμα</i>	<i>Τοποθεσία αμπελώνα (Νομός)</i>	<i>Παραγόμενη ποσότητα αποστά/τος (λίτρα)</i>	<i>Ποικιλία αμπέλου</i>	<i>Γειτνίαση αμπελώνα με βιομ/κή περιοχή</i>	<i>Είδη εξαρ/των κατά τη ζύμωση</i>	<i>Υλικό δοχείου ζύμωσης</i>	<i>Διάρκεια παραμονής στο υλικό ζύμωσης (ημέρες)</i>	<i>Θερμ/σία κατά την παραμονή στο υλικό ζύμωσης (°C)</i>	<i>Ποσότητα σακχάρων πριν από τη ζύμωση (°Bé)</i>	<i>Προσθήκη αρωμ/κής ύλης</i>	<i>Υλικό δοχείου φύλαξης</i>	<i>Διάρκεια φύλαξης (μήνες)</i>	<i>Θερμ/σία φύλαξης (°C)</i>	<i>Αλκοολικός βαθμός αποστά/τος (% vol)</i>
20	Ηρακλείου	1000	Σουλτανίνα	Όχι	Πλαστικός σωλήνας μετάγγισης	Πλαστικό	8	30	14,5	Όχι	Πλαστικό	2	20	-
21	Ηρακλείου	400	Σουλτανίνα Λιάτικο	Όχι	Μηχάνημα Inox σε συνδυασμό με χρήση πλαστικού σωλήνα μετάγγισης	Πλαστικό	15	30	14	Όχι	Πλαστικό	1	20	-
22	Ηρακλείου	20	Λιάτικο Μοσχάτο	Όχι	Πλαστικός σωλήνας μετάγγισης	Πλαστικό	8	20	14,5	Όχι	Πλαστικό	2	18	-
23	Ηρακλείου	1000	Σουλτανίνα Λιάτικο	Όχι	Μηχάνημα Inox σε συνδυασμό με χρήση πλαστικού σωλήνα μετάγγισης	Πλαστικό	15		14	Όχι	Πλαστικό	2	22	-
24	Ηρακλείου	600	Σουλτανίνα Μοσχάτο	Όχι	Μηχάνημα Inox σε συνδυασμό με χρήση πλαστικού σωλήνα μετάγγισης	Πλαστικό	10	25	14,5	Όχι	Πλαστικό	2	18	-

<i>Δείγμα</i>	<i>Τοποθεσία αμπελώνα (Νομός)</i>	<i>Παραγόμενη ποσότητα αποστά/τος (λίτρα)</i>	<i>Ποικιλία αμπέλου</i>	<i>Γειτνίαση αμπελώνα με βιομ/κή περιοχή</i>	<i>Είδη εξαρ/των κατά τη ζύμωση</i>	<i>Υλικό δοχείου ζύμωσης</i>	<i>Διάρκεια παραμονής στο υλικό ζύμωσης (ημέρες)</i>	<i>Θερμ/σία κατά την παραμονή στο υλικό ζύμωσης (°C)</i>	<i>Ποσότητα σακχάρων πριν από τη ζύμωση (°Bé)</i>	<i>Προσθήκη αρωμ/κής ύλης</i>	<i>Υλικό δοχείου φύλαξης</i>	<i>Διάρκεια φύλαξης (μήνες)</i>	<i>Θερμ/σία φύλαξης (°C)</i>	<i>Αλκοολικός βαθμός αποστά/τος (% vol)</i>
26	Ηρακλείου	10000	Σουλτανίνα Μανδηλάρι Syrah,Caber net Sauvignon	Όχι	Μηχάνημα Inox σε συνδυασμό με χρήση πλαστικού σωλήνα μετάγγισης	Inox	-	-	13	Ναι	Inox	-	-	-
27	Λάρισας	400	Μοσχάτο	Όχι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	45	22	13	Ναι	Γυαλί	-	-	-
28	Λάρισας	1200	Μοσχάτο	Όχι	Πλαστικός σωλήνας μετάγγισης	Inox	-	-	12	Ναι	Inox	-	-	67
29	Λάρισας	300	Μοσχάτο	Όχι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	10	17	12	Ναι	Πλαστικό	-	-	72
30	Λάρισας	300	Μοσχάτο Cabernet Sauvignon	Όχι	Πλαστικός σωλήνας μετάγγισης	Πλαστικό	40	-	13	Ναι	Γυαλί	-	-	62
31	Σερρών	100	Μοσχάτο Cabernet Sauvignon	Όχι	Πλαστικός σωλήνας μετάγγισης	Inox	-	-	-	Ναι	Πλαστικό	3	5	50
32	Λάρισας	10000	Μοσχάτο Cabernet Sauvignon	Όχι	Πλαστικός σωλήνας μετάγγισης	Inox	-	-	15	Ναι	Inox	-	-	-



<i>Δείγμα</i>	<i>Τοποθεσία αμπελώνα (Νομός)</i>	<i>Παραγόμενη ποσότητα αποστά/τος (λίτρα)</i>	<i>Ποικιλία αμπέλου</i>	<i>Γειτνίαση αμπελώνα με βιομηκή περιοχή</i>	<i>Είδη εξαρτ/των κατά τη ζύμωση</i>	<i>Υλικό δοχείου ζύμωσης</i>	<i>Διάρκεια παραμονής στο υλικό ζύμωσης (ημέρες)</i>	<i>Θερμ/σία κατά την παραμονή στο υλικό ζύμωσης (°C)</i>	<i>Ποσότητα σακχάρων πριν από τη ζύμωση (°Bé)</i>	<i>Προσθήκη αρωμ/κής ύλης</i>	<i>Υλικό δοχείου φύλαξης</i>	<i>Διάρκεια φύλαξης (μήνες)</i>	<i>Θερμ/σία φύλαξης (°C)</i>	<i>Αλκοολικός βαθμός αποστά/τος (% vol)</i>
34	Ηρακλείου	20	Σουλτανίνα	Ναι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	90	15	10	Ναι	Πλαστικό	3	11	-
35	Καβάλας	10	Σουλτανίνα	Όχι	Πλαστικό βαρέλι	Πλαστικό	35	17	-	Ναι	Γυαλί	-	-	-
36	N. Θεσσαλονίκης	100	Μοσχάτο	Όχι	Μηχάνημα Inox	Πλαστικό	25	27	12	Ναι	Inox	-	18	-
37	N. Πέλλας	100	Merlot GrandNoir Cinsaut	Όχι	Πλαστικό βαρέλι	Πλαστικό	25	27	12	Όχι	Inox	-	18	-
38	N. Θεσσαλονίκης	100	Μοσχάτο Ροδίτης Merlot Cinsaut	Όχι	Πλαστικό βαρέλι	Πλαστικό	25	27	12	Ναι	Inox	-	18	-

«- » δηλώνεται ότι δεν έχει απαντηθεί από τους παραγωγούς.

**Πίνακας Π2.** Δείγματα αποσταγμάτων από στέμφυλα (αρωματισμένα ή μη) τα οποία μελετήθηκαν ως προς το χρόνο παραμονής τους σε πλαστικούς περιέκτες κατά την αποθήκευσή τους.

<b>Παραγωγός</b>	<b>Χρόνος Παραμονής (ώρες)</b>	<b>Δείγμα Αποστάγματος</b>	<b>Αρωματισμένο Απόσταγμα</b>
1ος	0	36	✓
	1	36(1)	✓
	24	36(2)	✓
	168	36(3)	✓
	720	36(4)	✓
2ος	0	37	-
	1	37(1)	-
	24	37(2)	-
	168	37(3)	-
	720	37(4)	-
3ος	0	38	✓
	1	38(1)	✓
	24	38(2)	✓
	168	38(3)	✓
	720	38(4)	✓