



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΔΑΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

---

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ  
ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΕΝΟΥ**

---

**ΤΣΙΓΑΡΙΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΨΥΛΛΑΚΗ Ε. (ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)**

**ΠΑΡΑΝΥΧΙΑΝΑΚΗΣ Ν. (ΔΕΚΤΟΡΑΣ)**

**ΤΥΡΟΒΟΛΑ Κ. (ΔΙΔΑΚΤΩΡ)**

**ΧΑΝΙΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2011**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτριά μου κ. Ε. Ψυλλάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση της εργασίας, καθώς και τη συνεχή υποστήριξη και καθοδήγησή της. Οι συμβουλές της υπήρξαν καθοριστικές για την εξέλιξη της εργασίας μου.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτωρ κ. Κ. Τυροβολά για το προσωπικό ενδιαφέρον που έδειξε και τις πολύτιμες συμβουλές της, καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη φοιτήτρια κ. Ε. Γιαντζή, που πραγματοποιεί τη διδακτορική διατριβή της στο Πολυτεχνείο Κρήτης, για το προσωπικό ενδιαφέρον που μου έδειξε και για την ουσιαστική αρωγή της στη φάση της πειραματικής διαδικασίας, καθώς επίσης και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Υδατικής Χημείας για το καλό κλίμα και την άριστη συνεργασία μας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή, την κ. Ε Ψυλλάκη, τον κ. Ν. Παρανυχιανάκη και την κ. Κ. Τυροβολά για την παρουσία και το χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Καθώς η ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας σηματοδοτεί και τη λήξη της περιόδου φοίτησής μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη συνεχή υποστήριξη και βοήθεια προκειμένου να ολοκληρώσω τις σπουδές μου. Ελπίζω το αποτέλεσμα να δικαιώνει τις προσδοκίες της.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα (OCPs – OrganoChlorinated Pesticides) είναι πολύ τοξικές και μη βιοδιασπάσιμες (ή επίμονες) ουσίες. Η συνεχής εισβολή τους στη βιόσφαιρα και η αναπόφευκτη βιοσυγκέντρωσή τους στους οργανισμούς είναι αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας και της κακής περιβαλλοντικής διαχείρισης. Για τον προσδιορισμό αυτών των ουσιών στο περιβάλλον απαιτείται η ανάλυση δειγμάτων που περιέχουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις τις ενώσεις αυτές και ταυτόχρονα σε μεγάλο αριθμό άλλες ουσίες που παρεμβαίνουν και παρεμποδίζουν την ανίχνευση τους. Απαιτείται δηλαδή η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδων απλών και ευαίσθητων που θα επιτρέπουν την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των OCPs σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων (ίχνη).

Το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας βασίζεται ακριβώς σε αυτή τη ανάγκη και αφορά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου μικροεκχύλισης σε στερεή φάση υπό συνθήκες κενού (VAC-SPME) με τη ρηξικέλυση αλλαγή στις βασικές αρχές λειτουργίας της κλασσικής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME), τη δημιουργία κενού στην υπερκείμενη επιφάνεια. Η δημιουργία κενού στην υπερκείμενη επιφάνεια επιτρέπει την καλύτερη ανάλυση των δειγμάτων και τη γρηγορότερη ανίχνευση των προβληματικών ουσιών με τη χρήση μικρότερων ποσοτήτων δείγματος.

Το πειραματικό στάδιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε σε εμβολιασμένα υδάτινα διαλύματα που περιέχουν τρεις οργανοχλωριωμένες ενώσεις, το Lindan, το a-Endosulfan και το 4,4-DDD. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν η ποσότητα του νερού, το ποσοστό ανακίνησης, η ποσότητα χλωριούχου νατρίου, η θερμοκρασία εκχύλισης και ο χρόνος εκχύλισης. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επίσης σε πραγματικά δείγματα. Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων βασίστηκε στον αέριο χρωματογράφο με χρήση ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (Gas Chromatography- Electron-Capture Detector- GC-ECD).

Τα αποτελέσματα από τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, με τη χρήση κενού στην υπερκείμενη επιφάνεια, έδειξαν ότι έγινε δυνατή η ανίχνευση των ουσιών σε συγκεντρώσεις πολύ μικρής τάξης (ppt). Επίσης, η πειραματική διαδικασία εξελίσσεται, εκτός των άλλων, σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες και η ισορροπία επιτυγχάνεται σε πολύ μικρότερους χρόνους σε σχέση με μελέτες που έχουν γίνει με την κλασική μέθοδο SPME (Goncalves et al. 2002, Chunzhou et al. 2005, Mmualefe et al. 2009). Τελικά, αν και βρίσκεται σε αρχικά στάδια, η SPME υπό συνθήκες κενού φαίνεται να είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνική.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

1.1.1.Μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LLE).....	9
1.1.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) .....	11
1.2.1. Η θεωρία .....	12
1.2.1.1.Βασικά χαρακτηριστικά SPME .....	12
1.2.1.2.Βασικές αρχές μικροεκχύλισης στερεάς φάσης.....	13
1.2.2.Τρόποι χρήσης μικροεκχύλισης στερεάς φάσης.....	15
1.2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης.....	17
1.2.3.1. Η ίνα.....	17
1.2.3.2. Ανάδευση του δείγματος.....	19
1.2.3.3.Συνθήκες εκχύλισης.....	19
1.2.4. Πλεονεκτήματα μεθόδου .....	20
1.3.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες .....	21
1.3.2.Τρόπος δράσης ουσιών .....	25
1.3.3. Τύχη και μεταφορά των ουσιών στο περιβάλλον .....	25
1.3.4. Τοξικότητα και όρια έκθεσης ουσιών.....	28
1.3.5.Επίδραση στη γλωρίδα και στη πανίδα.....	31
1.3.6. Επιρροή ουσιών στους ανθρώπους.....	33
2.1.1. Αντιδραστήρια & Χημεία .....	36
2.1.2. Όργανα & Συσκευές .....	36

2.1.3. Χαρακτηριστικά υδατικών περιβαλλοντικών δειγμάτων .....	37
2.3.1. Γενικές αρχές λειτουργίας αέριου χρωματογράφου-ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων (Gas Chromatography Electron Capture Detector – GC- ECD) .....	39
2.3.2.Συνθήκες αέριου χρωματογράφου .....	42
2.3.3.Γραμμικότητα μεθόδου στο CD-ECD .....	43

## Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1.1. Απεικόνιση των δύο μεθόδων μικροεκχύλισης με διαλύτη (Guardia et al. 2011) .....	10
Εικόνα 1.2. Τυπική συσκευή για μικροεκχύλιση μονής σταγόνας που δείχνει 1-2 $\mu\text{L}$ οργανικής φάσης να αιωρείται από την άκρη μίας μικροσύριγγας (Archana et al. 2011). .....	11
Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση της SPME ίνας.....	12
Εικόνα 1.4. Απεικόνιση των δύο βημάτων στην SPME .....	13
Εικόνα 1.7. Carboxen-PDMS ίνα (Alpendurada 2000). .....	18
Εικόνα 1.8. Μεταβολισμός θηλαστικών για την ουσία Endosulfan και την απέκκρισή της. ....	22
Εικόνα 2.1. Συνοπτική περιγραφή της δειγματοληψίας .....	38
Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση μίας συσκευής αέριου χρωματογράφου. ....	40
Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων. ....	42
Εικόνα 2.4. Διάγραμμα απευθείας εκχύσεων των τριών ουσιών Lindan, $\alpha$ -Endosulfan και 4,4-DDD .....	44
Εικόνα 3.1. Επίδραση αλατότητας στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.....	47
Εικόνα 3.2. Επίδραση όγκου υδατικού διαλύματος στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.....	48
Εικόνα 3.3. Επίδραση όγκου δειγματοληπτικής φιάλης (100, 500, 1000ml) στη VAC-SPME. ....	49
Εικόνα 3.5. Επίδραση χρόνου εκχύλισης στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.....	52
Εικόνα 3.6. Επίδραση χρόνου εκχύλισης στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης χωρίς κενό.....	53
Εικόνα 3.7. Σύγκριση επίδρασης χρόνου εκχύλισης στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης με κενό και χωρίς κενό.....	53
Εικόνα 3.8. Επίδραση θερμοκρασίας εκχύλισης στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης με κενό.....	54
Εικόνα 3.9. Επίδραση θερμοκρασίας στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης χωρίς κενό.....	55
Εικόνα 3.10. Σύγκριση επίδρασης θερμοκρασίας με/χωρίς κενό .....	56
Εικόνα 3.11. Διάγραμμα γραμμικότητας βελτιστοποιημένης μεθόδου.....	57

## Περιεγόμενα Πινάκων

Πίνακας 1. 1 Μέθοδοι Προεπεξεργασίας δείγματος σε νερό.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 1.2. Κριτήρια επιλογής τρόπου δειγματοληψίας .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 1.3. :Λίστα με ίνες με επικάλυψη που είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και διάφορα χαρακτηριστικά τους .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 1.4. :Φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό εξέταση ουσιών. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 1.5. : Κατηγορίες τοξικότητας.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 1.6. : Βαθμός τοξικότητας των υπό εξέταση ουσιών. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 1.7. : Κριτήρια ποιότητας νερού και τιμές κατωφλιού οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε φρέσκο και θαλασσινό νερό.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 2.1.: Χαρακτηριστικά Υδατικών Περιβαλλοντικών δειγμάτων .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 2.2. Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 2.3. Παράμετροι Στήλης (Column Parameters).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 3.1 Παράμετροι που θα βελτιστοποιηθούν. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 3.2. Βέλτιστες Συνθήκες Μεθόδου VAC-HSSPME.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 3.3. Γραμμικότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου VAC-HSSPME.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 3.4. Ποσοστά ανάκτησης ουσιών από νερό βρύσης και εκροή βιολογικού καθαρισμού Χανίων .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Πίνακας 3.5. Παράμετροι βελτιστοποίησης της τεχνικής SPME σε διάφορες μελέτες	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάλυση του νερού είναι χρήσιμη ώστε να αξιολογηθεί η ποιότητα και η χρησιμότητα του για κάποιο σκοπό και συνήθως πραγματοποιείται με σκοπό να καθοριστούν μόνο συγκεκριμένοι και επικίνδυνοι ρύποι. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων εξετάζονται και αξιολογούνται ώστε να γίνει η επιλογή των κατάλληλων μεθόδων καθαρισμού του νερού και να βρεθεί αν το νερό πληροί τις απαιτήσεις (Pawliszyn 2002).

Τα δείγματα που έχουν συλλεχθεί από μία υδάτινη πηγή συνήθως υφίστανται μία προεπεξεργασία με διάφορους τρόπους πριν την τελική ανάλυση. Μερικά βήματα της προεπεξεργασίας μπορούν να διεξαχθούν είτε κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας ή αμέσως μετά από αυτήν. Ο κύριος σκοπός αυτών των διαδικασιών που απαιτούν κόπο και χρόνο είναι: η διασφάλιση των κατάλληλων φυσικοχημικών παραμέτρων των δειγμάτων, η απομάκρυνση όσων συστατικών παρεμβάλλονται, η συντήρηση του δείγματος και η μεταφορά των αναλυτών σε μία άλλη μήτρα που θα είναι πιο βολική για μία συγκεκριμένη μέθοδο ανάλυσης. Στον Πίνακα 1.1 φαίνονται τα βασικά βήματα προετοιμασίας υδάτινων δειγμάτων.

**Πίνακας 1. 1. Μέθοδοι προεπεξεργασίας δείγματος σε νερό.**

<b>Βασικές λειτουργίες προεπεξεργασίας δείγματος</b>	<b>Διαδικασία</b>
Απομάκρυνση της αιωρούμενης ύλης	Διήθηση, φυγοκέντρωση
Συντήρηση δείγματος	Ρύθμιση pH ώστε να εφαρμόζεται γενικά, εφαρμογή υπερϊόδους ακτινοβολίας, προσθήκη βιοκτόνου, παραγωγοποίηση των αναλυτών, αποθήκευση δείγματος σε θερμοκρασία 4°C
Απομόνωση ή/και προεμπλουτισμός αναλυτών	Εκχύλιση με διαλύτη, υγρή εκχύλιση, εκχύλιση στερεάς φάσης, αέρια εκχύλιση, εκχύλιση με μεμβράνη, διαδικασίες όσμωσης και υπερδιήθησης,
Εμπλουτισμός εκχυλισμάτων	Εξάτμιση περίσσειας διαλύτη
Καθαρισμός εκχυλισμάτων	Υγρή χρωματογραφία, Gel χρωματογραφία
Ξήρανση εκχυλισμάτων (extracts drying)	Προσθήκη άλατος

Πηγή: Pawliszyn 2002



Οι παραδοσιακές τεχνικές παρασκευής δείγματος είναι συνήθως χρονοβόρες απαιτούν πολύ κόπο, έχουν πολλές διαδικασίες που πρέπει να ακολουθηθούν, είναι επιρρεπείς στην απώλεια των αναλυτών και χρησιμοποιούν τοξικούς οργανικούς διαλύτες. Έτσι, τελικά πάνω από 80% του χρόνου ανάλυσης δαπανάται μόνο για τη δειγματοληψία και τη προετοιμασία του δείγματος. Η χρήση των οργανικών διαλυτών, επίσης, είναι ένα κομμάτι της διαδικασίας ιδιαίτερα σημαντικό και καθόλου φιλικό στο περιβάλλον. Τα τελευταία χρόνια γίνονται έντονες προσπάθειες για την ανάπτυξη και εφαρμογή καινοτόμων μεθόδων που θα είναι περιβαλλοντικά φιλικές, οικονομικές, απλές και γρήγορες. Παρακάτω δίνεται μία συνοπτική περιγραφή των βασικότερων εξελίξεων όσων αφορά τις μεθόδους προετοιμασίας δείγματος.

## **1.1.ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

Η αναλυτική διαδικασία συνήθως αποτελείται από διάφορα αλλά συγκεκριμένα βήματα: δειγματοληψία, προετοιμασία δείγματος, διαχωρισμό ουσιών, ποσοτικοποίηση και τέλος ανάλυση των δεδομένων. Κάθε βήμα όμως επηρεάζει την ακρίβεια και την ταχύτητα ανάλυσης του δείγματος. Φυσικά με τη χρήση οργάνων όπως ο αέριος χρωματογράφος, ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση βελτιώθηκαν όμως το βήμα της προετοιμασίας του δείγματος παραμένει βασικό τμήμα που απαιτεί χρόνο και συχνά τη χρήση σημαντικής ποσότητας οργανικών διαλυτών. Τελευταία όμως είναι διαθέσιμες διάφορες τεχνικές προετοιμασίας δείγματος που χρησιμοποιούν ελάχιστα ή καθόλου οργανικούς διαλύτες.

Παρακάτω δίνονται βασικά χαρακτηριστικά διάφορων μεθόδων όπως είναι η υγρή-υγρή εκχύλιση (liquid-liquid extraction - LLE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-phase extraction-SPE) και η μικροεκχύλιση μονής σταγόνας (Single-Drop microextraction) που χρησιμοποιούν οργανικούς διαλύτες καθώς επίσης και η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid phase microextraction-SPME) που δεν χρησιμοποιεί οργανικούς διαλύτες.

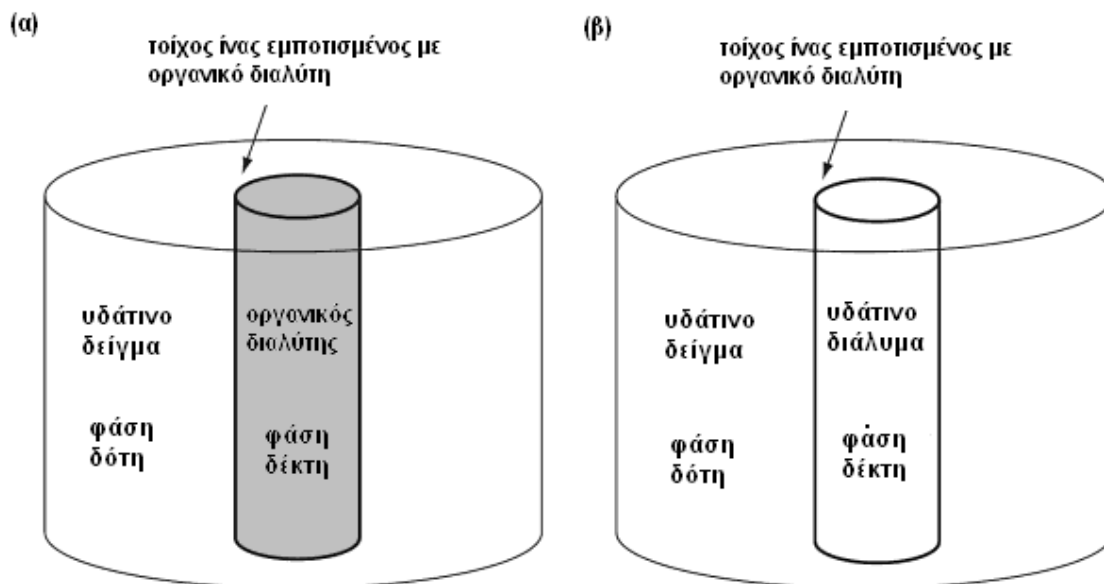
### **1.1.1.Μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LLE)**

Η υγρή – υγρή εκχύλιση (Liquid-liquid phase) είναι μία πολύ δημοφιλής μέθοδο για τη προετοιμασία δείγματος και έχει αναγνωριστεί ως μία αποδοτική μέθοδο για τον έλεγχο φυτοφαρμάκων, όχι μόνο λόγω της απλότητάς της αλλά και γιατί απαιτεί ελάχιστη κατάρτιση από το χειριστή της μεθόδου, είναι αποτελεσματική, υπάρχει πληθώρα αναλυτικών δεδομένων και έχει ευρεία αποδοχή σε πολλές πρότυπες μεθόδους (Lambropoulou et al. 2006).

Παρ' όλα αυτά αυτή η τεχνική απαιτεί μεγάλη ποσότητα οργανικού διαλύτη υψηλής καθαρότητας, αποδίδει μικρές αναλογίες όγκου δείγματος-διαλύτη και είναι χρονοβόρα (Archana et al. 2011, Guardia et al. 2011). Τα τελευταία χρόνια λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος που έχει αναπτυχθεί γι'

αυτές τις μεθόδους έχουν εισαχθεί και αναπτυχθεί νέες μέθοδοι που αποτελούν ουσιαστικά βελτιώσεις της κλασσικής υγρής - υγρής εκχύλισης.

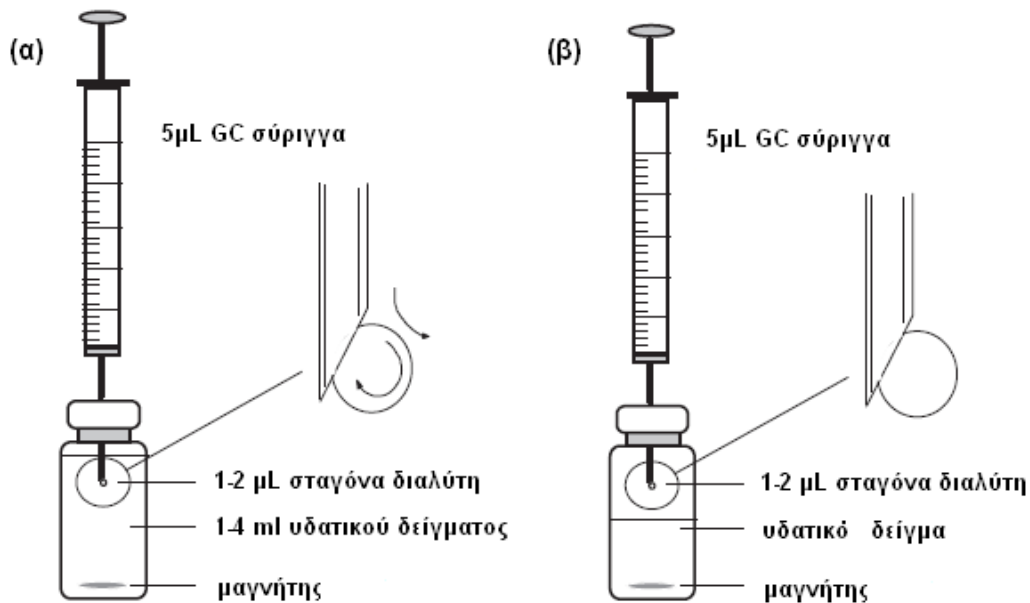
Η μικροεκχύλιση με διαλύτη ή αλλιώς μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME) χαρακτηρίζεται από το βασικό πλεονέκτημα ότι πραγματοποιείται σημαντική μείωση του λόγου των όγκων της φάσης δέκτη προς τη φάση δότη. Στην LPME υπάρχουν δύο τρόποι δειγματοληψίας που μπορούν να χρησιμοποιηθούν: με δύο φάσεις και με τρεις φάσεις. Στην LPME δύο φάσεων οι ουσίες εξάγονται από το υδατικό δείγμα (φάση δότης) στον οργανικό διαλύτη (φάση δέκτης) ο οποίος είτε αιωρείται από την άκρη μιας μικροσταγόνας είτε βρίσκεται στους πόρους ή στο εσωτερικό μίας υδρόφοβης μεμβράνης. Στην τριφασική LPME οι αναλύτες εξάγονται από το υδατικό διάλυμα του δείγματος (φάση δότη), μέσω ενός οργανικού διαλύτη που βρίσκεται ακινητοποιημένος στους πόρους μίας υδρόφοβης μεμβράνης (οργανική φάση), σε ένα υδατικό συνήθως διάλυμα (φάση δέκτη) (Lambropoulou et al. 2006, Guardia et al. 2011).



Εικόνα 1.1. Απεικόνιση των δύο μεθόδων μικροεκχύλισης με διαλύτη: (α) σε σύστημα δύο φάσεων και (β) σε σύστημα τριών φάσεων (Guardia et al. 2011)

Η μικροεκχύλιση μονής σταγόνας (SDME – Single Drop MicroExtraction) είναι μία άλλη απλή και γρήγορη τεχνική εκχύλισης (Εικόνα 1.2.). Στην SDME χρησιμοποιείτε μία σταγόνα από ένα μη υδατοδιαλυτό οργανικό διαλύτη αιωρούμενη από τη μύτη μίας μικροσύριγγας. Παρ' όλα αυτά είναι μία απαιτητική μέθοδος και παρουσιάζει προβλήματα πτώσης της σταγόνας, μικρή ευαισθησία και ακρίβεια. Τα προβλήματα ευαισθησίας και ακρίβειας οφείλονται κατά κύριο λόγο στο ότι δεν συνίσταται η χρήση παρατεταμένων χρόνων εκχύλισης και γρήγορης ανακίνησης, αφού μπορεί να προκαλέσουν διάλυση, αστάθεια ή πτώση της σταγόνας (Pawliszyn 1997, Archana et al. 2011). Αυτή

η βασική μεθοδολογία αναπτύχθηκε περαιτέρω και από τότε έχουν προταθεί διάφορες προσεγγίσεις που είναι εξέλιξη αυτής της πρώτης μεθόδου αλλά δεν αφορούν την παρούσα εργασία.



Εικόνα 1.2. Τυπική συσκευή για μικροεκχύλιση μονής σταγόνας που δείχνει 1-2 µL οργανικής φάσης να αιωρείται από την άκρη μίας μικροσύριγγας: (α) με απευθείας εμβάπτιση της SDME, (β) με ειδικό δειγματολήπτη SDME. Η μεγέθυνση δείχνει τη σταγόνα που αναδύεται και το βέλος δείχνει ότι αναπτύσσεται μία κυκλική κίνηση της σταγόνας που προκαλείται από τη μεταφορά ορμής από την υδατική φάση (Archana et al. 2011).

### **1.1.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)**

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase extraction, SPE) αποτελεί κι αυτή τεχνική προετοιμασίας δείγματος όμως είναι αποτελεσματικότερη από την τεχνική υγρής-υγρής εκχύλισης αφού επιτυγχάνονται εύκολα ποσοτικοί διαχωρισμοί, εφαρμόζεται ταχύτατα και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί. Παρ' όλα αυτά τόσο η SPE όσο και LLE είναι μέθοδοι που χρησιμοποιούν τοξικούς οργανικούς διαλύτες, απαιτούν πολλά βήματα, προσυγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας και συχνά εμφανίζονται προβλήματα κατά τη διάρκεια της εκχύλισης.

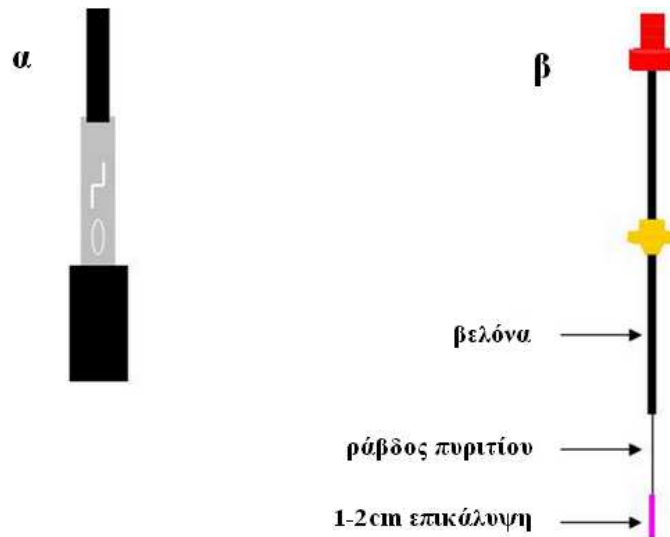
## **1. 2. ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID-PHASE MICROEXTRACTION – SPME)**

Η μέθοδος μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid phase microextraction) στο εξής SPME, εφευρέθηκε το 1989. Σκοπός της ήταν να καλύψει την ανάγκη για πιο γρήγορη προετοιμασία του υπό εξέταση δείγματος, τόσο στον εργαστηριακό χώρο, όσο και στο φυσικό περιβάλλον του και μάλιστα χωρίς τη χρήση οργανικού διαλύτη.

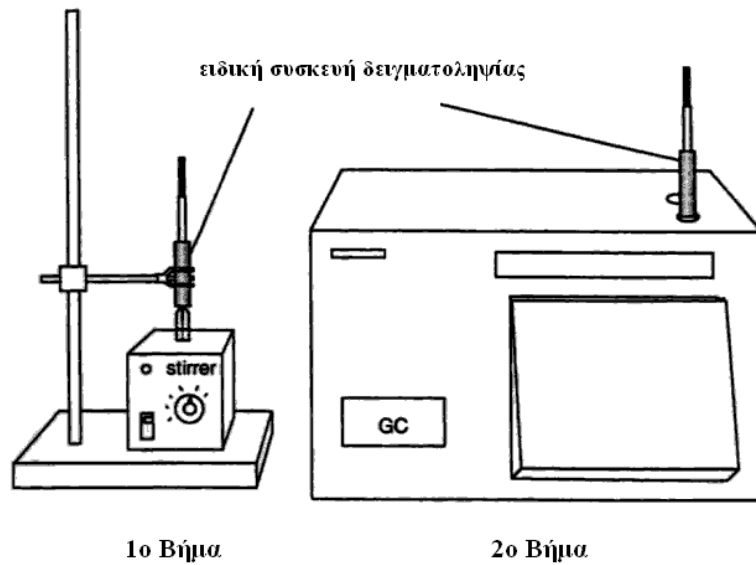
## 1.2.1. Η θεωρία

### 1.2.1.1.Βασικά χαρακτηριστικά SPME

Σ' αυτήν την τεχνική πραγματοποιούνται δύο βασικά βήματα: Πρώτον, χρησιμοποιείται η ειδική συσκευή δειγματοληψίας (Εικόνα 1.3.) για την απομόνωση και συγκέντρωση των αναλυτών σ' αυτήν και δεύτερον μετά από καθορισμένο χρονικό διάστημα η ίνα μεταφέρετε η συσκευή στο όργανο ανάλυσης για ποσοτικοποίηση των δεδομένων (Εικόνα 1.4.). Πιο συγκεκριμένα η ανάλυση ρύπων με τη μέθοδο SPME, περιλαμβάνει την εισαγωγή της ίνας με επικάλυψη στο δείγμα της υδατικής μήτρας ή στην υπερκείμενη επιφάνεια, πίεση του εμβόλου ώστε να εκτεθεί η ίνα στο δείγμα, επαναφορά της ίνας όταν επιτευχθεί ισορροπία και τέλος εισαγωγή της ίνας στο όργανο ανάλυσης. Η ίνα είναι έτοιμη να ξαναχρησιμοποιηθεί απευθείας αφού καθαρίζεται κατά την εκρόφηση των αναλυτών. Η εκρόφηση των αναλυτών πραγματοποιείται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών στον εισαγωγέα του οργάνου ανάλυσης.



Εικόνα 1.3.Σχηματική απεικόνιση της SPME ίνας.



Εικόνα 1.4. Απεικόνιση των δύο βημάτων στην SPME: 1. Ισορροπία του αναλύτη μεταξύ της ίνας και της μήτρας, 2. Μεταφορά της ίνας στο αναλυτικό όργανο (GC)

#### 1.2.1.2. Βασικές αρχές μικροεκχύλισης στερεάς φάσης

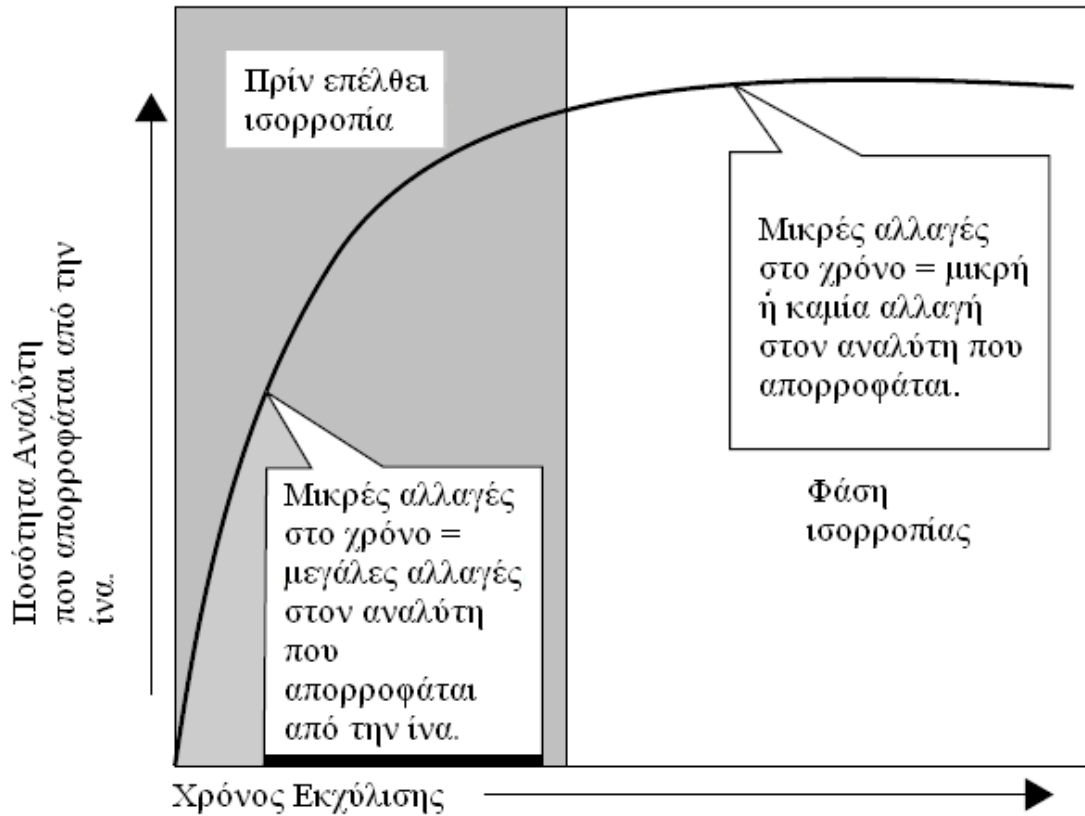
Η SPME είναι μία πολυφασική διαδικασία εξισορρόπησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις το σύστημα εκχύλισης είναι πολύπλοκο αφού περιλαμβάνει υδατικό δείγμα που περιέχει αιωρούμενα στερεά σωματίδια, υπάρχει υπερκείμενη αέρια επιφάνεια και λαμβάνουν χώρα διάφορες αλληλεπιδράσεις προσρόφησης μεταξύ της ίνας και των αναλυτών.

Η μεταφορά των αναλυτών από τη μήτρα του δείγματος στην ίνα ξεκινάει τη στιγμή που η επικαλυμμένη ίνα τοποθετείται σε επαφή με το δείγμα. Ο χρόνος εκχύλισης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στη διαδικασία της SPME μεθόδου. Η εικόνα 1.5. δείχνει τη σχέση του χρόνου εκχύλισης και της ποσότητας του αναλύτη που προσροφάτε στην ίνα (Gyorgy et al. 2004). Τυπικά, η εκχύλιση ολοκληρώνεται όταν η συγκέντρωση του αναλύτη έχει φτάσει σε ισορροπία μεταξύ της μήτρας και της ίνας. Αυτό σημαίνει ότι μόλις επιτευχθεί ισορροπία, η εκχυλισμένη ποσότητα παραμένει σταθερή, εντός φυσικά διακυμάνσεων λόγω πιθανού πειραματικού λάθους, και δεν επηρεάζεται από περαιτέρω αύξηση του χρόνου εκχύλισης (Pawliszyn 1997).

Η κατάσταση ισορροπίας περιγράφεται με την παρακάτω εξίσωση (1):

$$n = (K_{fs} V_f V_s C_0) / (K_{fs} V_f + V_s) \quad (1)$$

Όπου  $n$  η εκχυλισμένη ποσότητα,  $K_{fs}$  ο συντελεστής διανομής ανάμεσα στην ίνα και τη μήτρα,  $V_f$  ο όγκος της επικάλυψης της ίνας,  $V_s$  ο όγκος του δείγματος και  $C_0$  η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα (Pawliszyn 1997).



Εικόνα 1.5. Επίδραση χρόνου για την SPME (Gyorgy et al. 2004)

Η εξίσωση (1) δείχνει μία αναλογική σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα και της ποσότητας που έχει εκχυλιστεί από αυτή και αποτελεί τη βάση για τη ποσοτικοποίηση του αναλύτη (Pawliszyn et al. 1997). Επιπλέον, δείχνει ότι η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται είναι ανεξάρτητη από τη τοποθεσία της ίνας στο σύστημα. Έτσι, η ίνα μπορεί να τοποθετηθεί μέσα στο υδατικό δείγμα, ή στην υπερκείμενη επιφάνεια, και η ποσότητα του εκχυλισμένου αναλύτη να παραμένει σταθερή, αρκεί να παραμένει σταθερός ο όγκος της επικάλυψης της ίνας, ο όγκος της υπερκείμενης επιφάνειας και το δείγμα (Eisert et al. 1997).

Αν ο όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγαλύτερος συγκριτικά με τον όγκο της επικαλυμμένης ίνας, δηλαδή αν η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται στην ίνα είναι πολύ μικρότερη από αυτή που υπάρχει στο δείγμα, τότε η εξίσωση 1 απλοποιείται στη παρακάτω μορφή:

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (2)$$

Στην εξίσωση 2, η ποσότητα του εκχυλισμένου αναλύτη δεν εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος. Έτσι, δεν υπάρχει καμία ανάγκη να συλλεχθεί ένα συγκεκριμένο ποσό του δείγματος πριν την ανάλυση. Η ίνα μπορεί να εκτεθεί κατευθείαν στο απαιτούμενο υπό εξέταση περιβάλλον (όπως στον περιβάλλοντα αέρα ή στο νερό). Με την απευθείας έκθεση της ίνας στο υπό εξέταση περιβάλλον ή

δείγμα, καταργείται το στάδιο της δειγματοληψίας και έτσι επιταχύνεται η αναλυτική διαδικασία ενώ ταυτόχρονα μειώνονται τυχόν λάθη που σχετίζονται με τις απώλειες του αναλύτη λόγω αποσύνθεσης ή απορρόφησής του στα τοιχώματα του δοχείου (Pawliszyn 1997).

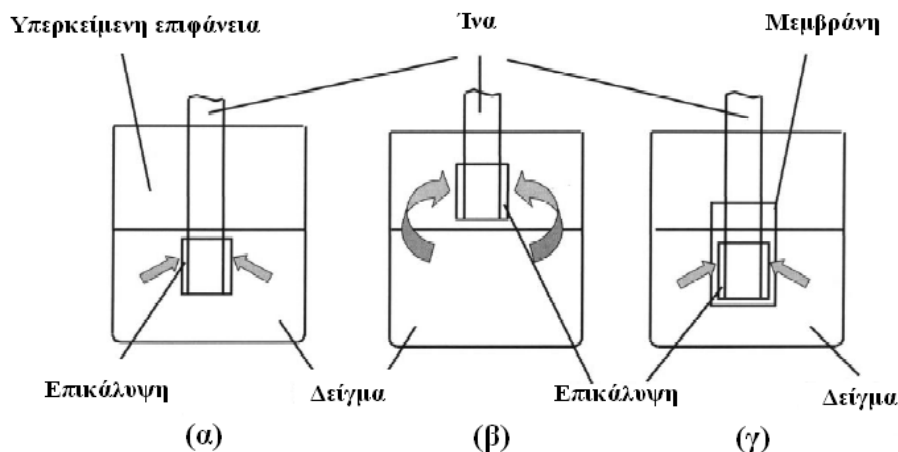
Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών πραγματοποιείται με τη χρήση ενός αναλυτικού μηχανήματος, συνήθως αέριο χρωματογράφο. Πρώτα γίνεται ανάλυση με την ίνα κενή (blank fiber) ώστε να εξακριβωθεί αν η ίνα ή το μηχανήμα έχουν επιμολυνθεί από τον αναλύτη ή άλλες ουσίες.

### **1.2.2. Τρόποι χρήσης μικροεκχύλισης στερεάς φάσης**

Η SPME μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τρεις βασικούς τρόπους, την απευθείας εμφύσηση της ίνας στο δείγμα ( direct SPME – DI-SPME ), την έκθεση της ίνας στην υπερκείμενη αέρια φάση ( headspace SPME – HS-SPME) και την απευθείας έκθεση της ίνας χρησιμοποιώντας μεμβράνη για τη προστασία της (membrane protection – MP-SPME) (Εικόνα 1.6.).

Στην απευθείας δειγματοληψία, η επικαλυμμένη ίνα εισέρχεται απευθείας μέσα στο δείγμα, και οι αναλύτες εκχυλίζονται απευθείας από τη μήτρα (δείγμα) στο πολυμερές υλικό. Συνήθως, για να διευκολυνθεί η γρήγορη εκχύλιση απαιτείται κάποια ανακίνηση ώστε να ενισχυθεί η μεταφορά των αναλυτών από το δείγμα στην ίνα. Όσον αφορά τη δεύτερη περίπτωση, τα πτητικά συστατικά διαχέονται από το εξεταζόμενο δείγμα στο εσωτερικό διάκενο (headspace) του φιαλιδίου και στη συνέχεια τα πτητικά συστατικά συγκρατούνται στο πολυμερικό υλικό (επικάλυψη ίνας). Η μέθοδος MP-SPME χρησιμοποιείται για την εκχύλιση αναλυτών που βρίσκονται σε πολύ ρυπασμένα δείγματα ώστε να προστατευτεί η ίνα (Pawliszyn 1997, Lord et al. 2000).

Η δειγματοληψία στο διάκενο έχει το προτέρημα ότι προστατεύει την ίνα από οποιαδήποτε ζημιά μπορεί να προέλθει λόγω κάποιας εχθρικής μήτρας, όπως για παράδειγμα μήτρες που έχουν πολύ χαμηλό ή υψηλό pH, ή αυτές που περιέχουν πολύ μεγάλα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και τα χουμικά οξέα, που έχουν τη τάση να καλύπτουν την επιφάνεια της επικάλυψης (Pawliszyn et al. 1997). Η μέθοδος HS-SPME επιτρέπει εκτός των άλλων και μετατροπές στη φύση της μήτρας, όπως αλλαγή του pH, χωρίς να επηρεαστεί ή να καταστραφεί η ίνα (Lord et al. 2000). Επιπλέον, η χρήση της SPME με αυτό τον τρόπο επιτρέπει τη δειγματοληψία και σε στερεά δείγματα.



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση τρόπων δειγματοληψίας της SPME. (α) Απευθείας εκχύλιση, (β) Υπερκείμενη εκχύλιση, (γ) Εκχύλιση με μεμβράνη προστασίας (Lord et al. 2000).

Η δειγματοληψία στο διάκενο έχει το προτέρημα ότι προστατεύει την ίνα από οποιαδήποτε ζημιά μπορεί να προέλθει λόγω κάποιας εχθρικής μήτρας, όπως για παράδειγμα μήτρες που έχουν πολύ χαμηλό ή υψηλό pH, ή αυτές που περιέχουν πολύ μεγάλα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και τα χουμικά οξέα, που έχουν τη τάση να καλύπτουν την επιφάνεια της επικάλυψης (Pawliszyn et al. 1997). Η μέθοδος HS-SPME επιτρέπει εκτός των άλλων και μετατροπές στη φύση της μήτρας, όπως αλλαγή του pH, χωρίς να επηρεαστεί ή να καταστραφεί η ίνα (Lord et al. 2000). Επιπλέον, η χρήση της SPME με αυτό τον τρόπο επιτρέπει τη δειγματοληψία και σε στερεά δείγματα.

Αν και θεωρητικά η επιλογή του τρόπου με τον οποίο θα γίνει η δειγματοληψία όταν επιτευχθεί θερμοδυναμική ισορροπία δεν επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα, παρ' όλα αυτά έχει ιδιαίτερη σημασία στη κινητική εκχύλισης (extraction kinetics) (Lord et al. 2000). Τα κριτήρια του τρόπου δειγματοληψίας φαίνονται συνοπτικά στο Πίνακα 1.2.

Πίνακας 1. 1 Κριτήρια επιλογής τρόπου δειγματοληψίας.

Τρόπος δειγματοληψίας	Πητικότητα	Μήτρες
Απευθείας Εκχύλιση	Μεσαία προς χαμηλή	Αέρια δείγματα, Υγρά (Καθαρά)
Εκχύλιση στην υπερκείμενη επιφάνεια (Headspace)	Υψηλή προς μεσαία	Υγρά (συμπεριλαμβάνονται πολύπλοκες μήτρες), εδάφη
Προστασία μεμβράνης	Χαμηλή	Πολύπλοκα δείγματα

Πηγή: Eisert et al. 1997



### **1.2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης**

Παρακάτω περιγράφονται οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση και την ακρίβεια της μεθόδου SPME.

#### 1.2.3.1. Η ίνα

Η επιλογή της ίνας εξαρτάται από την πολικότητα και τη πτητικότητα του αναλύτη-στόχου. Στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελείται από μία πολυμερική οργανική φάση που διασταυρώνεται και είναι μόνιμα συνδεδεμένη με τη ράβδο. Οι ράβδοι αποτελούνται από μία οπτική ίνα διοξειδίου του πυριτίου που είναι χημικά αδρανής (Εικόνα 1.4.).

Η ίνα προστατεύεται με μία στρώση από πολυμερές που αποτελεί την επικάλυψη (coating) της ίνας. Στην αγορά υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη επικαλύψεων όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (poly dimethylsiloxane - PDMS) και το πολυακρυλικό (polyacrylate - PA) (Apendurada 2000). Το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο συμπεριφέρεται σαν υγρό και προκαλεί γρηγορότερη εκχύλιση σε σχέση με το πολυακρυλικό που είναι στερεό (Pawliszyn et al. 1997). Η επιλογή της κατάλληλης επικάλυψης είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη χημική δομή του αναλύτη και η επιλογή βασίζεται στη πτητικότητα και πολικότητα των μορίων.

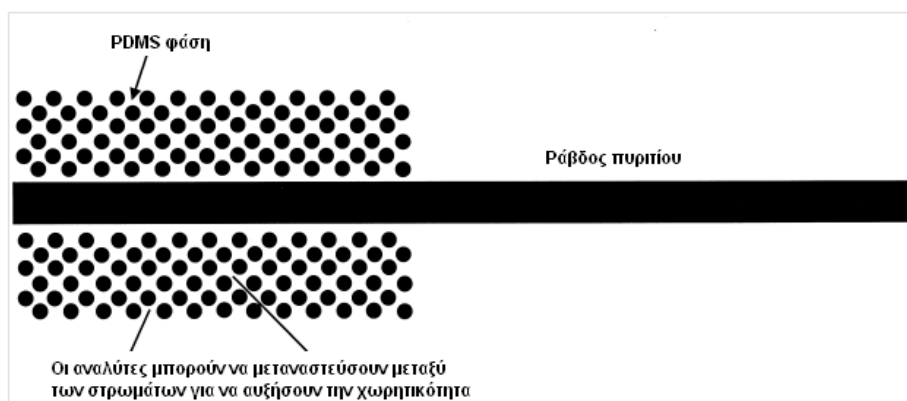
Η πιο δημοφιλής ίνα είναι η PDMS ίνα και όταν μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι η πρώτη επιλογή αφού αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες του εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου μέχρι και 300°C. Η PDMS είναι μη πολική και εκχυλίζει πολύ καλά μη πολικούς αναλύτες. Η επιλογή του πάχους της ίνας πρέπει να είναι τέτοια ώστε να πετυχαίνει το απαιτούμενο όριο ανίχνευσης (Apendurada 2000).

Στον Πίνακα 1.3. δίνονται πληροφορίες για τις διάφορες ίνες με επικάλυψη που είναι διαθέσιμες, το πάχος τους, η προτεινόμενη χρήση, η μέγιστη θερμοκρασία στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου ώστε να μην καταστραφεί η ίνα και τέλος με ποιους διαλύτες πρέπει να χρησιμοποιούνται. Στην εικόνα 1.7. απεικονίζεται μία ίνα με επικάλυψη. Φαίνεται η ράβδος πυριτίου και το πολυμερές υλικό που τη καλύπτει.

**Πίνακας1. 2** Λίστα με ίνες με επικάλυψη που είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και διάφορα χαρακτηριστικά τους

Είδος Ίνας	Πάχος επικάλυψης (μm)	Συνιστάμενη Χρήση	Μέγιστη Θερμοκρασία εισαγωγή (°C)	Εφαρμογή
Poly (dimethylsiloxane) (PDMS)	100	GC, HPLC	280	μη πολικές οργανικές ουσίες όπως VOCs, PAH, OCPs, βενζόλιο/τολουένιο/αιθυλοβενζόλιο/ξυλόλιο
	30	GC, HPLC	280	
	7	GC, HPLC	340	
Polyacrylate (PA)	85	GC, HPLC	320	Πολικές οργανικές ουσίες όπως OPPs, φαινόλες και τριαζίνες
Poly (dimethylsiloxane divinylbenzene) (PDMS-DVB)	65	GC, HPLC	270	Αρωματικοί υδρογονάνθρακες και αμίνες, VOCs
	60	GC	270	
Carboxen-poly (dimethylsiloxane) (Carboxen-PDMS)	75	GC	320	VOCs, υδρογονάνθρακες
Carbowax-templated resin (CW-TR)	65	GC	260	Πολικές οργανικές ουσίες όπως αλκοόλες, κετόνες, νιτροαρωματικές

Πηγή: Apendurada 2000.



Εικόνα 1.7. Carboxen-PDMS ίνα (Apendurada 2000).

### 1.2.3.2. Ανάδευση του δείγματος

Η ανάδευση του δείγματος χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί ταχύτερα ισορροπία. Με την ανάδευση του δείγματος επιταχύνεται η διάχυση των ενώσεων από την υδατική φάση στη στερεή. Με την αύξηση της ταχύτητας τα μόρια των ενώσεων κινούνται γρηγορότερα και επομένως φτάνουν στη στερεή φάση γρηγορότερα. Συνήθως η ανάδευση πραγματοποιείται με μαγνητικό αναδευτήρα ή με τη χρήση συσκευής ανάδευσης. Στη περίπτωση που επιλεγεί μαγνητικός αναδευτήρας πρέπει να δοθεί προσοχή στη σύσταση του ώστε να μην αντιδράει το δείγμα με το μαγνήτη (Pawliszyn 1997, Eisert et al. 1997, Γιαντζή 2007).

### 1.2.3.3. Συνθήκες εκχύλισης

Η διαδικασία της εκχύλισης περιλαμβάνει την έκθεση της ίνας σε ένα μικρό όγκο δείγματος ή στην υπερκείμενη επιφάνειά του για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Οι ουσίες που έχουν χαμηλό συντελεστή διάχυσης έχουν μεγάλους χρόνους εκχύλισης αντίθετα πιο πτητικά συστατικά που βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο διάκενο, προσροφώνται γρηγορότερα στην ίνα (Eisert et al. 1997, Apendurada 2000). Συνήθως για τις ουσίες με χαμηλούς συντελεστές διάχυσης κατασκευάζονται καμπύλες, που δείχνουν τη σχέση της ποσότητας της υπό εξέταση ουσίας που εκχυλίζεται συναρτήσει του χρόνου και επιλέγεται ο μικρότερος χρόνος για τον οποίο εκχυλίζεται κάποια αποδεκτή ποσότητα της ουσίας. Γενικά, ο χρόνος εκχύλισης αποτελεί σημαντικό παράγοντα και πρέπει να είναι στενά ελεγχόμενος ώστε να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Εκτός από το χρόνο εκχύλισης, σημαντικό ρόλο παίζει και η θερμοκρασία εκχύλισης που επηρεάζει την ευαισθησία και την κινητική της εκχύλισης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας ενισχύεται ο συντελεστής διάχυσης αλλά ταυτόχρονα μειώνεται η κατανομή του αναλύτη αφού η προσρόφηση είναι εξώθερμη διαδικασία (Eisert et al. 1997, Apendurada 2000). Στην περίπτωση της HS-SPME η θερμοκρασία βοηθάει στη μεταφορά του αναλύτη στην υπερκείμενη επιφάνεια

Τέλος, ένας τρίτος παράγοντας είναι η προσθήκη NaCl. Η επίδραση της προσθήκης άλατος εξαρτάται από τη φύση των ενώσεων που εξετάζονται γι' αυτό και δεν έχει απαραίτητα θετικά αποτελέσματα αλλά αντίθετα μπορεί να έχει ακόμα και αρνητικά ή ουδέτερα αποτελέσματα. Με τη προσθήκη NaCl αυξάνεται η ιοντική ισχύ του διαλύματος μετατρέποντας τις οργανικές ουσίες σε λιγότερο διαλυτές και ενισχύοντας έτσι τη μεταφορά τους από την υδατική φάση στην ίνα (Apendurada 2000). Η επίδραση αυτή δεν είναι γενική και εξαρτάται από την πολικότητα του αναλύτη, τη συγκέντρωση του άλατος και τη μήτρα των δειγμάτων (Penalver et al. 1999, Che 2006).

Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει ακόμα ένας παράγοντας που έχει μελετηθεί σε διάφορες εργασίες (Magdic et al. 1996, Tomkins et al. 2002, Zambonin et al. 2002), η τιμή του pH. Όσον αφορά όμως τις

οργανοχλωριωμένες ενώσεις φαίνεται ότι οποιαδήποτε προσπάθεια βελτίωσης της απόδοσης της εκχύλισης με προσαρμογή της τιμής pH μεταξύ 2 και 11, ήταν ανεπιτυχής (Magdic et al. 1996, Tomkins et al. 2002, Zambonin et al. 2002) γι' αυτό και στη παρούσα εργασία δεν έγινε κάποια τροποποίηση του pH.

#### **1.2.4. Πλεονεκτήματα μεθόδου**

Η μέθοδος SPME έχει πολλά πλεονεκτήματα:

Καταρχήν, με τη μέθοδο αυτή η αναλυτική διαδικασία απλοποιείται αφού σε ένα μόνο βήμα πραγματοποιείται δειγματοληψία, εκχύλιση και συγκέντρωση ενώ οι εκχυλισμένες ουσίες μεταφέρονται άμεσα στο όργανο ανάλυσης περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο τις απώλειες που πιθανόν να προέκυπταν λόγω πολύπλοκων διεργασιών. Επιπλέον, η απουσία διαλύτη αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της SPME, αφενός γιατί την καθιστά φιλική προς το περιβάλλον και αφετέρου γιατί πραγματοποιείται γρηγορότερος διαχωρισμός και επιτρέπει τη χρήση απλούστερων συσκευών (Pawliszyn et al. 1997).

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της μεθόδου είναι το μικρό της μέγεθος, που είναι πρακτικό και βολικό για το σχεδιασμό συσκευών για το πεδίο. Μάλιστα, ο Pawliszyn και οι συνεργάτες του (1997) αναφέρουν ότι με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατόν να μελετηθούν πολύ μικρά αντικείμενα με τη χρήση πολύ μικρών ινών.

Η ευαισθησία της τεχνικής είναι συγκρίσιμη με υπάρχουσες τεχνικές που βασίζονται στην υγρή εκχύλιση. Στη μικροεκχύλιση στερεής φάσης αν και μόνο ένα μικρό μέρος των αναλυτών εκχυλίζεται από τη μήτρα, το σύνολο που έχει εκχυλιστεί θα μεταφερθεί ολόκληρο στο αναλυτικό όργανο. Στην υγρή εκχύλιση αντίθετα αν και η πλειοψηφία των αναλυτών μεταφέρεται από ένα δείγμα στην οργανική φάση μόνο ένα μικρό ποσοστό (1/100 ή 1/1000) του εκχυλισμένου αναλύτη εισέρχεται στο αναλυτικό όργανο (Pawliszyn et al. 1997).

### **1.3. ΟΥΣΙΕΣ MONTEAA (MODEL COMPOUNDS)**

Σύμφωνα με το Ν.2538/97 τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ορίζονται ως οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες και προορίζονται για να προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς ή να προλαμβάνουν τη δράση τους. Επίσης, χρησιμοποιούνται με σκοπό να επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών (π.χ. ρυθμιστικές αυξήσεις των φυτών), εκτός αν πρόκειται για θρεπτικές

ουσίες και να διατηρούν τα φυτικά προϊόντα, εκτός αν πρόκειται για ουσίες ή προϊόντα που υπόκεινται σε ειδικές διατάξεις σχετικά με τα συντηρητικά. Τέλος, προορίζονται εκτός από τα παραπάνω για να καταστρέφουν μέρη των φυτών και να επιβραδύνουν ή να εμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη φυτών. Στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα περιλαμβάνονται τα εντομοκτόνα, τα ζιζανιοκτόνα, τα ακαρεοκτόνα, τα μυκητοκτόνα, τα λιπάσματα, φυτορρυθμιστικές ουσίες, βελτιωτικά εδάφους κ.α. (Πολυράκης 2002).

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αποτελούν στις μέρες μας ίσως τη μεγαλύτερη παρέμβαση που έχει κάνει ποτέ ο άνθρωπος στη φύση. Δηλητηριάζουν κάθε χρόνο εκατομμύρια ανθρώπους, συμβάλουν στη ρύπανση του περιβάλλοντος και επιπλέον επιδρούν στην υγεία του ανθρώπου έμμεσα μέσω της τροφής, της αναπνοής και της πόσης. Λόγω της τοξικότητάς τους και των αρνητικών επιπτώσεων που συνεπάγεται η ύπαρξή τους στο περιβάλλον, ειδικά στο νερό, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη αποδοτικών μεθόδων ανίχνευσης των ουσιών αυτών.

Στη παρούσα διπλωματική εργασία θα μελετηθεί ο προσδιορισμός τριών ουσιών που υπάγονται στη κατηγορία των εντομοκτόνων, το Lindan, το  $\alpha$ -Endosulfan και το 4,4-DDD. Για το σκοπό αυτό απαραίτητη ήταν η μελέτη των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των ουσιών αυτών, καθώς επίσης και διάφορα σημαντικά στοιχεία όπως η τοξικότητα και η τύχη τους στα διάφορα περιβάλλοντα.

### **1.3.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες**

Οι υπό εξέταση ουσίες περιλαμβάνονται στη κατηγορία εντομοκτόνα, είναι και οι τρεις οργανοχλωριωμένες ενώσεις ή πολυχλωριωμένοι υδρογονάνθρακες. Πρόκειται για εντομοκτόνα επαφής με μεγάλη υπολειμματική διάρκεια και η δράση τους είναι νευροτοξική.

Οι ουσίες αυτές χαρακτηρίζονται από μεγάλη λιποδιαλυτότητα, πολύ μικρή υδατοδιαλυτότητα κι έχουν μικρή πτητικότητα. Επίσης, και οι τρεις ουσίες χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες της βιοσυσσώρευσης και της βιομεγένθυσης. Οι παραπάνω ιδιότητες, η χημική τους σταθερότητα και οι κίνδυνοι που δημιουργούνται για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, οδήγησαν στον περιορισμό ή την απαγόρευση της χρήσης των χλωριωμένων υδρογονανθράκων που ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία σε πολλές χώρες. Παρ' όλα αυτά στην Ελλάδα, το Lindan και το Endosulfan δεν έχουν ακόμα απαγορευτεί (Πολυράκης 2002).

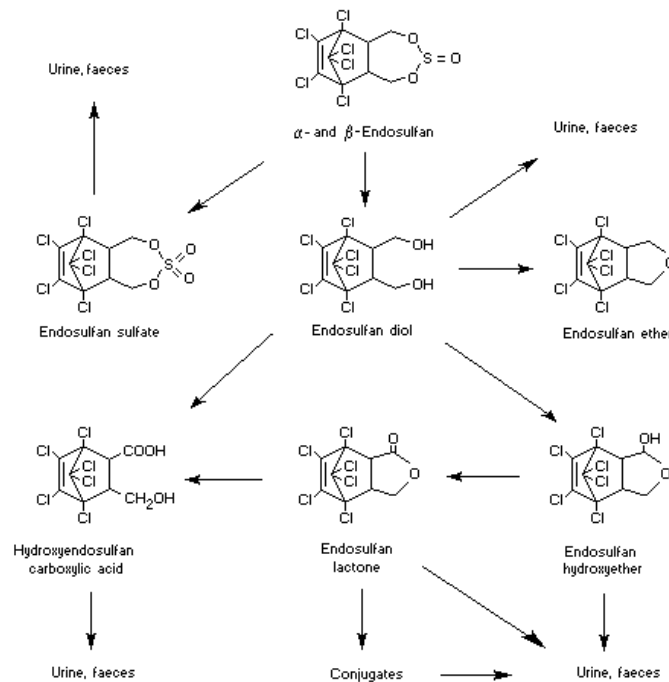
Πιο συγκεκριμένα:

Το Endosulfan είναι ένα νευροτοξικό εντομοκτόνο και οργανοχλωριωμένος υδρογονάνθρακας. Ανήκει στην ομάδα των χλωριωμένων κυκλοδιενίων η οποία ενεργεί ως δηλητήριο επαφής σε μία μεγάλη ποικιλία εντόμων και τερμίτες (mites) και χρησιμοποιείται σε όλον τον κόσμο στη γεωργία ως

εντομοκτόνο σε καλλιέργειες τσαγιού, δημητριακά, βαμβάκι, φρούτα, λαχανικά και καπνά. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί και ως συντηρητικό του ξύλου για την προστασία του από τη φθορά και την επίθεση εντόμων (Nishad 2006, McGregor 1998).

Μερικά εμπορικά ονόματα περιλαμβάνουν εκτός από το Endosulfan, Θιοντάν (Thiodan), Endocrine, Beosit, Malix, Thimul και Thimor. Το εμπορικό προϊόν έχει δημιουργηθεί από την ανάμειξη δύο ισομερών: της α και β διαμόρφωσης, αλλά θεωρείται ως ένα ομογενοποιημένο προϊόν εκτός κι αν δηλωθεί διαφορετικά. Είναι φυτοφάρμακο και είναι πολύ τοξικό αν δεν χρησιμοποιηθεί σωστά (Nishad 2006, McGregor 1998). Βασικό υποπροϊόν του Endosulfan είναι το Endosulfan Sulphate (Εικόνα 1.8.).

Το χημικό του όνομα είναι 7,7,8,10,10-hexachloro-1,5,5,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,3,4-benzodioxathiepin 3-oxide. Ο μοριακός τύπος είναι  $C_9H_6Cl_6O_4$ . Το σημείο τήξης είναι 108-110°C και το μοριακό του βάρος είναι 406.93. Η διαλυτότητά του στο νερό είναι 0.15mg/l στους 22 °C και σε pH 7.2, στο τολουένιο είναι 20gr/100gr και στο εξάνιο είναι 2.4 gr/ 100gr (Nishad 2006). Μερικά εντομοκτόνα που περιλαμβάνονται στην ίδια ομάδα με το Endosulfan όπως το Aldrin και το Endrin έχουν απαγορευτεί στη γεωργία λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητας των τοξικών τους υπολειμμάτων στο περιβάλλον. Μάλιστα το Endosulfan κατατάσσεται στη 3<sup>η</sup> κατηγορία της περιβαλλοντικής ανθεκτικότητας, δηλαδή είναι μέτρια ανθεκτικό. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι σε τροπικές συνθήκες, το εντομοκτόνο αποσυντίθεται γρηγορότερα (McGregor 1998).



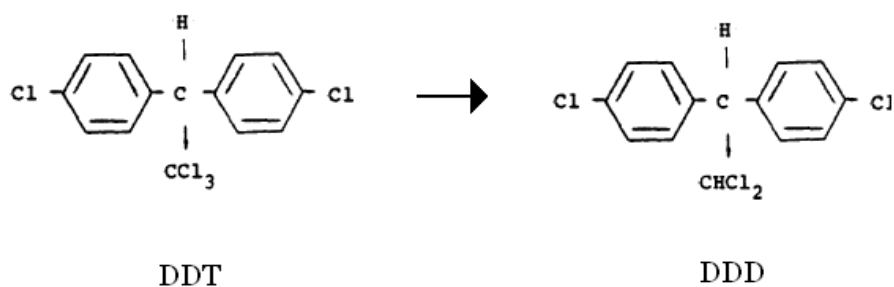
Εικόνα 1.8. Μεταβολισμός θηλαστικών για την ουσία Endosulfan και την απέκκρισή της.

Το φυτοφάρμακο Hexachlorocyclohexane (HCH) είναι μίγμα πέντε ισομερών όπου το γ-ισομερές είναι το Lindan που αποτελεί και το κύριο συστατικό με εντομοκτόνο δράση. Το Lindan (Lindan) είναι οργανοχλωριωμένη ένωση, είναι άχρωμο, κρυσταλλικό στερεό, χωρίς οσμή. Ανήκει στην ομάδα των εξαχλωροκυκλοεξανίων και η χημική ονομασία είναι Lindan ή gamma-hexachlorocyclohexane ενώ άλλα συνώνυμα είναι γ-benzene hexachloride, BHC ή γ-BHC. Ο μοριακός του τύπος είναι  $C_6H_6Cl_6$  και το μοριακό του βάρος είναι 290.85. Έχει σημείο τήξης 112-113°C και σημείο βρασμού 323.4°C. Η διαλυτότητα στο νερό είναι 10mg/lit ενώ ο συντελεστής log Kow είναι 3.83.

Είναι σχεδόν αδιάλυτο στο νερό, μέτρια διαλυτό στην αιθανόλη και ελαφρά διαλυτό σε ορυκτά έλαια, στην ακετόνη και σε χλωριωμένους διαλύτες. Μεταβολίζεται γρήγορα σε υδατοδιαλυτές χλωροφαινόλες και χλωροβενζόλια που απομακρύνονται εύκολα. Επίσης έχει μικρή διάρκεια ζωής μετά την εφαρμογή στους αγρούς, στους ιστούς των ζώων και στα αυγά τους. (Nantel 2001). Παρ' όλα αυτά είναι επίμονο στις αβιοτικές διαδικασίες όπως η φωτόλυση και η υδρόλυση (εκτός κι αν πραγματοποιείται σε υψηλό pH) και αποδομείται πολύ αργά λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Edwards 2002). Το φυτοφάρμακο έχει αποσυρθεί εθελοντικά από το 1978 στις ΗΠΑ λόγω της δυσάρεστης οσμής που προκαλεί στις φυτικές και ζωικές τροφές.

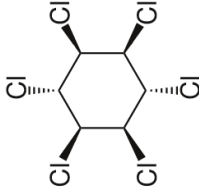
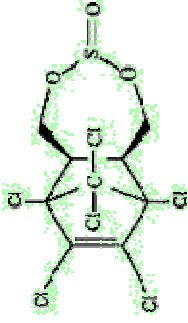
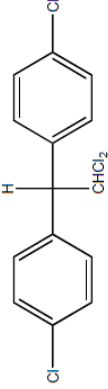
Τέλος, το DDT παρασκευάστηκε το 1874. Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως εντομοκτόνο το 1939 (P.Muller, Βραβείο Νόμπελ) και σύμφωνα με υπολογισμούς έσωσε 12-15 εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές από την ελονοσία και άλλες παρασιτικές ασθένειες σε μικρό χρονικό διάστημα. Το DDD αποτελεί μεταβολίτη του DDT και προέρχεται από την αφαλογόνωσή του (Εικόνα 1.9.) (Turusov et al. 2002).

Το 4,4-DDD ή αλλιώς TDE ή tetrachlorodiphenylethane έχει μοριακό τύπο  $C_{14}H_{10}Cl_4$  και μοριακό βάρος 320.05. Η φυσική του κατάσταση είναι στερεή και είναι άχρωμο ή λευκό πούδρας. Το σημείο τήξης είναι 109-110 °C και το σημείο βρασμού είναι 350 °C. Η διαλυτότητά του στο νερό είναι 0.090mg/lit στους 25 °C. Ο συντελεστής log Kow είναι 6.02. Στον Πίνακα 1.4. φαίνονται βασικά χαρακτηριστικά των τριών ουσιών.



Εικόνα 1.9. Αφαλογόνωση του DDT (Ανώνυμος 1986).

Πίνακας 1. 3 Φυσεκοχημικές ιδιότητες των υπό εξέταση ουσιών.

Ουσία	Cas-Number	Χημική Δομή	Μοριακό βάρος	Διαλυτότητα στο νερό (mg/lt)	Πίεση Ατμών (mmHg)	Σταθερά (m <sup>3</sup> Atm/mol)	Henry	Log K <sub>ow</sub>
Lindan	58-89-9		290.85	10	0.03 (20°C)	2.43x10 <sup>-7</sup> (23 °C)		3.20-3.89
a-Endosulfan	959-95-6		406.93	0.15 (22 °C)	1x10 <sup>-5</sup> (25°C)	1x10 <sup>-5</sup> (25°C)		3.83
4,4-DDD	72-54-8		320.05	0.090 (25°C)	1.35x10 <sup>-6</sup> (25°C)	4x10 <sup>-6</sup>		6.02

Πηγές: Nantel 2001, Ανώνυμος 1980, Ανώνυμος II.



### **1.3.2. Τρόπος δράσης ουσιών**

Όπως προαναφέρθηκε οι τρεις ουσίες ενεργούν ως δηλητήρια επαφής σε μία μεγάλη ποικιλία εντόμων και τερμίτες (mites). Έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα επανειλημμένες και συχνές νευρικές ώσεις που καταλήγουν στο θάνατο του εντόμου. Τα Lindan και Endosulfan δρουν στον παρεμποδιστικό μηχανισμό του νευρικού συστήματος που είναι γνωστός ως δέκτης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) και που αυξάνει την περατότητα των μεμβρανών των νευρώνων, σε ιόντα χλωρίου. Εμποδίζουν, δηλαδή, την είσοδο ιόντων χλωρίου στους νευρώνες κι έτσι ανταγωνίζονται την ηρεμιστική δράση του GABA. Το DDD δρα στους νευράξονες διαταράσσοντας την κατά μήκος τους κανονική μετάδοση της νευρικής ώσης, σε έντομα και θηλαστικά. Δρώντας στη δίοδο νατρίου, προκαλεί απώλεια ιόντων νατρίου με συνέπεια μεγάλη νευρική διέγερση, συχνές ώσεις, σπασμούς και θάνατο (Πολυράκης 2002).

### **1.3.3. Τύχη και μεταφορά των ουσιών στο περιβάλλον**

Ο Πολυράκης παρατηρεί ότι τα φυτοφάρμακα, ενώ χρησιμοποιούνται ως ένα παροδικό μέσο που να ανταποκρίνεται στις ανάγκες ενός δεδομένου τόπου, χρόνου και αιτίου, στην πραγματικότητα η δράση τους επεκτείνεται και πέρα του χρόνου χρησιμοποίησής τους, εναντίον αιτιών διαφορετικών του αρχικού στόχου και σε τόπους πιο μακρινούς από εκείνον στον οποίο είχαν εφαρμοστεί αρχικά.

Πράγματι, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα μετά την εφαρμογή τους υφίστανται μια σειρά διαδικασιών χημικών, φυσικών και βιολογικών και αρχίζουν να ρυπαίνουν την ατμόσφαιρα, το έδαφος και τα νερά. Διαταράσσουν την ισορροπία των οικοσυστημάτων ενώ κάποια από αυτά εμφανίζουν επικίνδυνες συγκεντρώσεις στα τρόφιμα αλλά και στον ανθρώπινο οργανισμό (Πολυράκης 2002).

Κατά την εφαρμογή τους, κάποιες ποσότητες παρασύρονται από τον άνεμο ενώ μετά την εφαρμογή ένα μέρος του σκευάσματος εξατμίζεται ή εξαχνούνται από το έδαφος ή τη φυτική επιφάνεια στην οποία ψεκάστηκε. Σε κάθε περίπτωση οι ποσότητες αυτές εισέρχονται στην ατμόσφαιρα από όπου παρασύρονται με τον άνεμο ή τη βροχή και ρυπαίνουν τις γύρω περιοχές αλλά πολλές φορές και περιοχές αρκετά απομακρυσμένες. Στο έδαφος καταλήγουν είτε λόγω απευθείας εφαρμογής είτε λόγω κατάληξης σε αυτό ύστερα από επεμβάσεις διάφορων τύπων. Όταν βρεθούν στο έδαφος υφίστανται διάφορες διαδικασίες όπως εξάτμιση, προσρόφηση, έκπλυση, χημική διάσπαση και μικροβιακή αποσύνθεση. Οι διαδικασίες αυτές καθορίζουν την υπολειμματικότητά τους, τη διάρκεια δηλαδή παραμονής και δράσης τους στο έδαφος. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι περισσότεροι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες παραμένουν στο έδαφος από 3 μέχρι 15 χρόνια (Πολυράκης 2002).

Τα επιφανειακά νερά μπορούν επίσης να ρυπανθούν μέσω της απευθείας εφαρμογής των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην επιφάνεια λιμνών και παράκτιων περιοχών για την αντιμετώπιση επιβλαβών εντόμων ή για τη καταστροφή υδροχαρών φυτών, μέσω των νερών αποστράγγισης και μέσω των ρεόντων υδάτων. Τα νερά αποστράγγισης και τα ρέοντα ύδατα αποτελούν μία από τις κυριότερες πηγές ρύπανσης λιμνών, ποταμών, ρυακιών, θαλασσών κτλ. Επιπλέον, τα ρυπασμένα επιφανειακά νερά και το ρυπασμένο έδαφος ρυπαίνουν και τα υπόγεια στρώματα που πιθανόν να τροφοδοτούν με νερό (Πολυράκης 2002).

Οι κυριότερες ιδιότητες που καθορίζουν τη μεταφορά και τη διάχυση των ουσιών στο περιβάλλον είναι η φωτόλυση, η οξειδωση, η υδρόλυση, η πτητικότητα, οι μικροβιακές αντιδράσεις, η προσρόφιση και εκρόφιση και η βιοσυσσώρευση.

Η διάσπαση των φυτοφαρμάκων πραγματοποιείται κάτω από τις πιο κοινές περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι διαδικασίες διάσπασης που αφορούν μικροβιακές αντιδράσεις πραγματοποιούνται λόγω της δράσης βακτηρίων, μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών που χρησιμοποιούν τα φυτοφάρμακα για τη διατροφή τους. Επίσης, τα φυτοφάρμακα μπορούν να διασπαστούν σε επιμέρους προϊόντα λόγω χημικής αποικοδόμησης όπως η υδρόλυση. Η υδρόλυση λαμβάνει χώρα τόσο σε όξινο όσο και σε αλκαλικό περιβάλλον, ανάλογα με το είδος της ουσίας. Κατά τη φωτοχημική διάσπαση, οι ουσίες διασπώνται με το φως και ειδικά με το ηλιακό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το προϊόν μετασηματισμού του  $\alpha$ -Endosulfan (το Endosulfan sulphate) που σύμφωνα με το Nishad (2006) σε πολλές μελέτες που αφορούν φυτά έχει παρατηρηθεί ότι είναι πολύ επίμονο και αυξάνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι και το φως του ήλιου παίζει σημαντικό ρόλο στην παρουσία του στα φυτά.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ταχύτητα διάσπασης εκφράζεται από την ημιπερίοδο ζωής, τη χρονική περίοδο δηλαδή που απαιτείται για τη διάσπαση της μισής από την αρχική ποσότητα της ουσίας. Για παράδειγμα, σε ουδέτερες συνθήκες ο χρόνος ημιζωής του  $\alpha$ -Endosulfan είναι 35 μέρες για το έδαφος. Όσο πιο όξινο γίνεται το περιβάλλον τόσο περισσότερο παραμένει σε αυτό. Διαχωρίζεται σε υποπροϊόντα από τους μύκητες και τα βακτήρια που βρίσκονται στο χώμα και όταν το υποπροϊόν απελευθερωθεί στο χώμα αναμένεται να απορροφηθεί από αυτό και όχι να προχωρήσει στα υπόγεια νερά. Αν απελευθερωθεί στην ατμόσφαιρα, το Endosulfan sulphate αντιδρά με ρίζες υδροξυλίου με αποτέλεσμα να βρίσκεται στην αέρια φάση για περίπου 1,13 ώρες (Nishad 2006)

Μία άλλη χαρακτηριστική ιδιότητα των φυτοφαρμάκων είναι η πτητικότητα, δηλαδή η ικανότητά τους να αεριοποιούνται (volatility) και εκφράζεται με τη σταθερά του νόμου του Henry  $K_H$ . Η σταθερά του Henry είναι πολύ σημαντική σταθερά αφού είναι ενδεικτική της τάσης των φυτοφαρμάκων να αεριοποιούνται και να απομακρύνονται προς την ατμόσφαιρα. Εξίσου σημαντική είναι και η διαλυτότητα, η τάση δηλαδή μιας ουσίας να διαλύεται στο νερό (Αντωνόπουλος 2001).

Τα περισσότερα από τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και οι ουσίες που ενδιαφέρουν τη παρούσα εργασία, χαρακτηρίζονται και από την ιδιότητα της βιοσυσσώρευσης. Αυτό σημαίνει ότι οι ουσίες αυτές δεν αποικοδομούνται ούτε αποβάλλονται μέσω του απεκκριτικού συστήματος αλλά αντίθετα, η συγκέντρωσή τους αυξάνει σταθερά (σε συνάρτηση με το χρόνο χορήγησης) στο λιπώδη ιστό εντόμων και ζώων, στο συκώτι και σε ορισμένα άλλα όργανα στα ανώτερα σπονδυλωτά, όπου μένουν σχεδόν αναλλοίωτα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα εντομοκτόνα και τα τοξικά προϊόντα της αποικοδόμησής τους, μετακινούνται επίσης κατά μήκος των τροφικών αλυσίδων με συνέπεια τη βιομεγέθυνσή της συγκέντρωσής τους σε έμβια όντα και ειδικά σε ανώτερα ζώα. Η λειτουργία αυτή της βιολογικής μεγέθυνσης παίζει σημαντικό ρόλο στο περιβάλλον αφού σε ουσίες που διατηρούνται στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσής τους κατά  $10^5$ - $10^7$  φορές στους ιστούς ασπόνδυλων, ψαριών, θηλαστικών και πουλιών και φτάνει σε συγκεντρώσεις ppm στα ζωντανά ζώα ( Πολυράκης 2002, Schnoor 1992).

Ένα παράδειγμα βιοσυσσώρευσης αποτελεί αυτό σε μία θαλάσσια περιοχή όπου το DDT βρισκόταν σε συγκεντρώσεις της τάξης του 1 ppb. Η *Laminaria*, είδος φύκους που τρεφόταν σε αυτή τη περιοχή, είχε συγκέντρωση του DDT 1 ppb δηλαδή όση και το περιβάλλον. Όμως, η συγκέντρωσή του στο συκώτι ενός ψαριού της ίδιας θαλάσσιας περιοχής ήταν 1500 φορές μεγαλύτερη (Πολυράκης 2002).

Τέλος, καθοριστικό παράγοντα παίζει και η προσρόφιση από το έδαφος. Η οργανική ουσία και το κλάσμα της αργίλου του εδάφους προσροφά τις ουσίες των φυτοφαρμάκων. Η προσρόφιση των φυτοφαρμάκων από το έδαφος εκφράζεται με δύο παραμέτρους, το συντελεστή προσρόφισης (adsorption coefficient,  $K_{OC}$ ) και το συντελεστή κατανομής (adsorption partition coefficient,  $K_d$ ). Η ικανότητα προσρόφισης από τα υλικά του εδάφους εκφράζεται από το συντελεστή προσρόφισης. Ουσίες που έχουν τιμές μεγαλύτερες από 1000 είναι ουσίες που προσκολλούνται ισχυρά στα εδαφικά μόρια, αντίθετα ουσίες που έχουν τιμές μικρότερες από 500 δείχνουν ουσίες που κινούνται με το νερό με τη διαδικασία της έκπλυσης (Αντωνόπουλος 2001).

Το Lindan μπορεί να μεταναστεύσει σε μεγάλες αποστάσεις και μέσα από διάφορα περιβάλλοντα και περιβαλλοντικές οδούς, μέσω του αέρα, του νερού και των ιζημάτων. Όμως η σταθερά του Henry υποδεικνύει ότι η εξαέρωση του είναι περισσότερο πιθανή από το νερό ή υγρά εδάφη ακολουθούμενη από εναέρια μεταφορά σε μεγάλες αποστάσεις. Η απορρόφιση των ισομερών στο έδαφος και τα ιζήματα αποτελεί την αμέσως επόμενη προτιμητέα εναλλακτική διαδρομή. Η στράγγιση των ισομερών μέσω του εδάφους εξαρτάται από τη διαλυτότητα του λιντανίου στο νερό και τη δυνατότητά τους να δεσμευτούν στο χώμα. Το υπολογισμένο όμως  $K_{OC}$  δείχνει ότι το Lindan έχει χαμηλή δυνατότητα να στραγγιστεί (Edwards 2002).

Το Endosulfan και τα υποπροϊόντα του έχουν βρεθεί σε πολλά τρόφιμα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Σε λαχανικά έχουν ανιχνευτεί σε συγκεντρώσεις 0.0005-0.013 ppm, σε διάφορα θαλασσινά σε συγκεντρώσεις 0.2 ppt -1.7 ppb. Έχουν επίσης ανιχνευτεί σε καπνό και στο γάλα (Nishad 2006, Turusov et al. 2002).

#### **1.3.4. Τοξικότητα και όρια έκθεσης ουσιών**

Ο ρόλος των φυτοφαρμάκων είναι να εξολοθρεύουν ανεπιθύμητους οργανισμούς και για να το επιτύχουν αυτό πρέπει να έχουν συγκεκριμένες ιδιότητες οι οποίες δεν είναι απαραίτητα ασφαλής για άλλους οργανισμούς ή τα φυτά. Επιπλέον, πολλά φυτοφάρμακα δυστυχώς δεν επηρεάζουν απαραίτητα ένα οργανισμό, με αποτέλεσμα η χρήση τους να τα καθιστά επικίνδυνα και για άλλα ζωικά είδη εκτός από αυτό που προορίζονται. Σύμφωνα με τον Αντωνόπουλο (2001), ο πραγματικός κίνδυνος προκαλείται όταν τα φυτοφάρμακα δεν παραμένουν στην περιοχή εφαρμογής αλλά μεταφέρονται σε άλλες περιοχές όπου αποτελούν πηγές έκθεσης σε άλλους οργανισμούς.

Οργανοχλωριωμένα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στον εγκέφαλο και στο ήπαρ πτηγών και άλλων ζώων δίνουν ακριβή εικόνα της δηλητηρίασης και των πρόωρων θανάτων για διάφορα επίπεδα εκθέσεων. Η τοξικότητα επηρεάζεται από το είδος, την ηλικία και το φύλο του οργανισμού, τον τύπο της έκθεσης, την επίδραση άλλων ρύπων κλπ. Επίσης διάφοροι παράγοντες, όπως διατροφή, το υπερβολικό κρύο και η αναπαραγωγική δραστηριότητα παίζουν σημαντικό ρόλο.

Για την εκτίμηση της τοξικότητας έχουν προσδιοριστεί συγκεκριμένοι δείκτες, οι οποίοι αποτελούν μέτρο της οξείας τοξικότητας της εξεταζόμενης ουσίας στο μελετημένο πληθυσμό. Ένας τέτοιος βασικός δείκτης είναι ο LD<sub>50</sub> (θανατηφόρος δόση, Lethal Dose 50%) που ορίζεται ως η υπολογισμένη δόση μίας ουσίας, η οποία αναμένεται να προκαλέσει θάνατο στο 50% ενός εκτιθέμενου πληθυσμού υπό πειραματικές συνθήκες. Προσδιορίζεται με έκθεση σημαντικού πληθυσμού σε μία ουσία, μέσω οποιασδήποτε διαδικασίας εκτός από την εισπνοή (Γιδαράκος 2006).

Στο παρακάτω Πίνακα 1.5. φαίνονται οι κατηγορίες τοξικότητας ανάλογα με τις τιμές της θανατηφόρου δόση σε περίπτωση κατάποσης και επαφής με το δέρμα. Τα πειράματα έγιναν σε σκυλιά, ποντίκια, λαγούς και γουρούνια.

Πίνακας1. 4 Κατηγορίες τοξικότητας.

Δείκτης Επικινδυνότητας	Κατηγορίες τοξικότητας			
	I	II	III	IV
LD <sub>50</sub> κατάποσης (mg/kg)	<50	50-500	500-5000	>5000
LD <sub>50</sub> δερματική επαφή (mg/kg)	<200	200-2000	2000-20000	>20000
Επίδραση στο δέρμα (72 ώρες μετά)	Διαβρωτική	Σοβαρός ερεθισμός	Μέτριος ερεθισμός	Ελαφρύς ερεθισμός
Επίδραση στα μάτια* -ερεθισμός -θολερότητα στο κερατοειδή χιτώνα	Διαβρωτική  Μη αντιστρέψιμη	Επίμονη  Αντιστρέψιμη	Αντιστρέψιμη  Καμία	Καμία  Καμία
Σήμανση	ΚΙΝΔΥΝΟΣ/ ΔΗΛΗΤΗΡΙΟ	ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ	ΠΡΟΣΟΧΗ	ΠΡΟΣΟΧΗ

\* = Η αντιστρεψιμότητα της θολερότητας του κερατοειδούς χιτώνα και η επιμονή του ερεθισμού υπολογίζονται σε περίοδο επτά ημερών μετά τη μόλυνση. Πηγή: Oudejans 1991.

Στον Πίνακα 1.6. δίνονται συγκριτικά ο βαθμός τοξικότητας των ουσιών που αφορούν τη παρούσα εργασία σε σχέση με τη θανατηφόρα δόση.

Πίνακας1. 5 Βαθμός τοξικότητας των υπό εξέταση ουσιών.

Ουσία	LD <sub>50</sub> κατάποσης (mg/kg)	LD <sub>50</sub> δερματική επαφή (mg/kg)	Κίνδυνος/ Κατηγορία τοξικότητας
Lindane	88	900 <sup>α</sup>	Υψηλός/II
Endosulfan	80	359 <sup>β</sup>	Υψηλός/II
DDT	113	2510 <sup>α</sup>	Υψηλός/II

<sup>α</sup> Σε Ποντίκια, <sup>β</sup> Σε Λαγούς. Πηγή: Oudejans 1991.

Ένας άλλος δείκτης είναι το μέγιστο επιτρεπόμενο επίπεδο του ρύπου (MCL, maximum contaminant level) που εκφράζει το κίνδυνο από τη παρουσία των φυτοφαρμάκων στο πόσιμο νερό δηλαδή τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση της ουσίας στο πόσιμο νερό που δεν επηρεάζει την υγεία του ανθρώπου και έχει σκοπό τη πρόληψη της ρύπανσης των πόσιμων νερών (Αντωνόπουλος 2001).

**Πίνακας 1. 6 Κριτήρια ποιότητας νερού και τιμές κατώφλιου οξείας και χρόνιας τοξικότητας σε φρέσκο και θαλασσινό νερό.**

	Συγκέντρωση σε µg/l <sup>t</sup>						MCL
	P. Π. <sup>α</sup>	Καρκινογενής	Κ. Ο. Τ. <sup>β</sup>	Κ. Χ. Τ. <sup>β</sup>	Κ. Ο. Τ. <sup>γ</sup>	Κ. Χ. Τ. <sup>γ</sup>	
<b>Lindan</b>	N	N	2.0	0.08	0.16		0.004mg /lt
<b>Endosulfan</b>	N	O	0.22	0.056	0.034	0.0087	
<b>DDD</b>	N	N	0.06*		3.6*		

α N = ναι, O = όχι. β Σε φρέσκο νερό, γ Σε θαλασσινό νερό. P. Π. = Ρύπος προτεραιότητας, Κ. Ο. Τ. = Κατώφλι οξείας τοξικότητας, Κ. Χ. Τ. = Κατώφλι χρόνιας τοξικότητας. Πηγή: Schnoor 1992.

\* = ανεπαρκή δεδομένα για να αναπτυχθούν κριτήρια. Η τιμή που παρουσιάζεται είναι το χαμηλότερο επίπεδο παρατηρούμενης επίδρασης.

Γενικά, το Endosulfan αποδομείται και εξαφανίζεται από τα θηλαστικά με πολύ μικρή απορρόφηση στο γαστρεντερικό σωλήνα. Σε πειράματα που έχουν γίνει σε βοοειδή, με ημερήσια πρόσληψη 0.15 Mg/kg για 60 μέρες δεν είχαν μείνει υπολείμματα και το Endosulfan φεύγει από το σώμα μέσα σε μερικές μέρες μέχρι μερικές εβδομάδες (Nishad 2006)

Σύμφωνα με την EPA τα όρια έκθεσης δεν πρέπει να υπερβαίνουν τα 0.1 με 0.2 ppm Endosulfan σε τρόφιμα. Επιπλέον, Το Αμερικάνικο Τμήμα Διαχείρισης Τροφίμων και Ναρκωτικών (The Food and Drug Administration) συνιστά να μην υπερβαίνουν τα 24 ppm σε ξηρό τσάι. Τέλος, το τμήμα Επαγγελματικής Διαχείρισης της Ασφάλειας και Υγείας (the Occupational Safety And Health Administration) έχει ορίσει ένα όριο έκθεσης για εργαζόμενους σύμφωνα με το οποίο ένας εργάτης δεν πρέπει να εκτίθεται περισσότερο από 0.1 mg/m<sup>3</sup> Endosulfan για ένα οκτάωρο εργασίας την ημέρα, και εργασία 40 ώρες την εβδομάδα.

### 1.3.5.Επίδραση στη γλωρίδα και στη πανίδα

Η χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη γεωργία μπορεί να προκαλέσει επιδράσεις στο φυτό που δέχεται την επέμβαση του σκευάσματος. Γενικά, μπορεί να προκαλέσει σε μία φυτοκοινότητα μείωση της πυκνότητας των φυτών, μείωση του αριθμού των ειδών και επικράτηση ανθεκτικών βιοτύπων των ευαίσθητων φυτών (Πολυράκης 2002).

Εξίσου σοβαρά είναι τα προβλήματα που δημιουργούνται από τα εντομοκτόνα λόγω της διατάραξης στη βιολογική ισορροπία σ' ένα βιότοπο που προκαλείται από τη δυσμενή επίδραση που ασκεί στη πανίδα των ωφέλιμων εντόμων. Συνήθως οι φυσικοί εχθροί των επιβλαβών εντόμων μειώνονται και η μείωση αυτή πραγματοποιείται με δύο τρόπους: είτε με την εμφάνιση εθισμού του επιβλαβούς εντόμου στο συγκεκριμένο εντομοκτόνο και την ανάγκη συχνότερης εφαρμογής μεγαλύτερων δόσεων εντομοκτόνων για την αντιμετώπισή του, είτε με την εξέλιξη ενός άλλου είδους εντόμου σε σοβαρό εχθρό των τοπικών καλλιεργειών, λόγω της απουσίας φυσικών εχθρών (Πολυράκης 2002).

Ο Πολυράκης αναφέρει ότι στη χώρα μας ήδη από το 1950 παρατηρήθηκε αύξηση των πληθυσμών τετρανύχου σε μηλεώνες της περιοχής Νάουσας, ύστερα από εκτεταμένη χρήση του DDT εναντίον της καρπόκαμψας των μήλων και το ίδιο είχε παρατηρηθεί και στο Λεωνίδιο το 1955 από τη χρήση του ίδιου εντομοκτόνου σε αχλαδιές. Ένα άλλο περιστατικό που αναφέρει, αφορά την ελιά στην Κρήτη. Οι εξάρσεις των πληθυσμών ορισμένων κοκκοειδών και ειδικότερα του *Aspidiotus nerii* Bouche είχε αποδοθεί στην ελάττωση των πληθυσμών του Υμενοπτέρου παρασίτου του *Aphytis chilensis* Howard ως συνέπεια των αεροψεκασμών εναντίον του δάκου της ελιάς. Μάλιστα στη συγκεκριμένη περίπτωση έγινε ξεκάθαρη και η επίδραση που έχει όχι μόνο κατά του δάκου αλλά γενικότερα στη πανίδα του οικοσυστήματος. Μία έρευνα που είχε γίνει στη πεδιάδα της Μεσσαράς στη Κρήτη είχε δείξει ότι με την έναρξη των αεροψεκασμών εξαφανίστηκαν από τη περιοχή πολλά είδη πτηνών που τρέφονταν με έντομα, όπως τα: *Falco eleonora* (μαυροπετρίτης), *Falco tinnunculus* (βραχοκιρκίνεζο) και *Luscinia Mecarhynchos* (αηδόνη), ενώ αντίθετα το *Buteo-buteo* (ποντικοβαρβακίνα) που είναι άφθονο στη περιοχή και τρέφεται από τρωκτικά και ερπετά δεν παρουσίασε καμία αυξομείωση των πληθυσμών του. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τους σπουργίτες που είναι παμφάγοι και τρώνε και έντομα που δεν εξαφανίστηκαν αν και πολλά μικρά τους βρέθηκαν νεκρά έξω από τη φωλιά του.

Όσων αφορά τον εθισμό των εντόμων στα εντομοκτόνα από τη αλόγιστη χρήση τους, αρκεί να αναφερθεί ότι ο αριθμός των ανθεκτικών παρασίτων και εντόμων από 24 που ήταν το 1954, έφτασε τα 448 το 1984 και τα 490 μέχρι το τέλος του 1986. Η δημιουργία όμως ανθεκτικών πληθυσμών εντόμων οδηγεί αναπόφευκτα σε ένα φαύλο κύκλο που επαναλαμβάνεται και επιτείνεται αφού η αύξηση των πληθυσμών των εντόμων οδηγεί σε χρήση πιο δυνατών σκευασμάτων πιο συχνά, με αποτέλεσμα τη

εμφάνιση νέων εντομολογικών εχθρών με αποτέλεσμα την αύξηση των επεμβάσεων και ούτω καθεξής (Πολυράκης 2002).

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις παρουσιάζουν επίσης υψηλή σταθερότητα και δεν διασπώνται στο περιβάλλον. Η ιδιότητα αυτή καθιστά τις ενώσεις και τα υπολείμματά τους επικίνδυνα για μελλοντικές βλάβες καθώς βιοσυσσωρεύονται στους οργανισμούς. Συσσωρεύονται στα λιπίδια των διαφόρων ιστών των ζώων και σε περιόδους φυσικής έντασης ή μείωσης του βάρους μετατοπίζονται στο αίμα και μπορούν να μεταφερθούν στον εγκέφαλο ή σε άλλα όργανα προκαλώντας επιδράσεις στην υγεία των οργανισμών ή/και το θάνατο τους. Η διάρκεια ημιζωής κυμαίνεται από μήνες σε χρόνια και για μερικά υπολείμματα φυτοφαρμάκων διαρκεί μερικές δεκαετίες, ανάλογα με τη θερμοκρασία, το pH, το ηλιακό φως και την υγρασία. Επίσης, καθώς συσσωρεύονται στους ιστούς των ζώων αλληλεπιδρούν και με άλλες τοξικές ουσίες, μεταβολίτες και υπολείμματα και οι επιδράσεις τότε είναι προσθετικές, συνεργικές, αυξητικές ή ανταγωνιστικές. Υπάρχουν αρκετές έρευνες που έχουν προσδιορίσει αλληλοεπιδράσεις τοξικών παραγόντων και οργανοχλωριωμένων ενώσεων (Πολυράκης 2002).

Η βιομεγένθυση σε ιστούς και αυγά πτηνών που τρέφονται με ψάρια είναι περίπου 30-100 φορές μεγαλύτερη για διάφορες οργανοχλωριωμένες ενώσεις και σε ορισμένα χερσαία ζώα περίπου 10 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τις συγκεντρώσεις στο περιβάλλον. Υπάρχουν επίσης και περιπτώσεις που δεν ταιριάζουν με τα απλά σχήματα βιοσυσσώρευσης λόγω του ότι οι οργανισμοί έχουν εκτεθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις από διάφορες οδούς και προκαλούν οξείες δηλητηριάσεις. Ο μηχανισμός τοξικότητας των ενώσεων αυτών σε ζωικούς οργανισμούς είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης με υποδοχείς (receptors) μέσα στο σώμα του οργανισμού (που ονομάζεται βιοχημική βλάβη ή αλλοίωση, biochemical lesion), ως πρώτο βήμα βλαβερών επιδράσεων.

Πέρασαν αρκετά χρόνια για να τεκμηριωθούν οι βλαβερές επιδράσεις του DDT (para-para ισομερή του DDT, και των μεταβολιτών DDD, DDE) και οι μηχανισμοί τοξικότητας. Αρχικά, προσδιορίστηκε η λέπτυνση του κελύφους των αυγών, η μειωμένη αναπαραγωγικότητα και η μείωση του πληθυσμού στο είδος ιέρακας ο μεταναστευτικός (κν. πετρίτης, peregrine falcon, Falco peregrinus). Η εκτεταμένη χρήση του DDT είχε ως αποτέλεσμα το θάνατο μεγάλου αριθμού πτηνών και μικρών ζώων. Ιδιαίτερα, η συσσώρευσή του σε γεωσκώληκες αποδείχθηκε τοξική σε κοκκινόλεμιδες (ερίθακος) και άλλα πτηνά (Πολυράκης 2002).

Όσον αφορά το Lindan αν και έχει αποδειχθεί τοξικό σε πειράματα με περιστέρια και σε πτηνά που τρέφονται με κατεργασμένους σπόρους, δεν έχει προκαλέσει προβλήματα σε πληθυσμούς αγρών. Λόγω της χαμηλής βιοσυσσώρευσης και των σχετικά περιορισμένων προβλημάτων τοξικότητας σε ζώα του ανώτερου επίπεδου της τροφικής αλυσίδας, το Lindan έχει αντικαταστήσει το heptachlor και είναι από τα λίγα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται ακόμη. Παρόλα αυτά το



Lindan είναι αρκετά τοξικό και έχει περιορισμένες χρήσεις. Σε πειράματα με κοτόπουλα προκαλεί μείωση της παραγωγής αυγών, αυξημένη εμβρυϊκή θνησιμότητα και λέπτυνση του κελύφους των αυγών.

Τα περιστατικά της λανθασμένης χρήσης του Endosulfan και των επιπτώσεών του στο περιβάλλον είναι επίσης πολλά. Ενδεικτικά, αναφέρεται περιστατικό το 1969 στο Ρήνο όπου η απόρριψη αποβλήτων εργοστασίου παρασκευής Endosulfan είχε σαν συνέπεια το θάνατο εκατομμυρίων ψαριών. Άλλο ενδιαφέρον περιστατικό αποτελεί αυτό στον κόλπο της Θεσσαλονίκης τη διετία 1978-1979 όπου βρέθηκαν στο θαλασσινό νερό και στα μύδια σημαντικές ποσότητες παραγώγων και μεταβολιτών του DDT όπως pp-DDT, pp-DDE και pp-DDD, εξαχλωριούχο βενζόλιο και πολυχλωριωμένα διφαινύλια και σε μύδια μικρή ποσότητα Aldrin. Αξίζει να σημειωθεί τα φυροφάρμακα αυτά είχαν απαγορευτεί ήδη πριν 4-5 χρόνια από την περίοδο των παρατηρήσεων αυτών (Πολυράκης 2002). Τέλος, στους ποταμούς Λουδία και Αλιάκμονα παρατηρούνται συχνά νεκρά ψάρια ενώ παρόμοιο περιστατικό υπήρξε και στη λίμνη Βιστωνίδα.

### **1.3.6. Επιρροή ουσιών στους ανθρώπους**

Το Endosulfan μπορεί να εισέλθει στο σώμα μας με την εισπνοή, ή να απορροφηθεί από το δέρμα όταν έρθει σε επαφή με αυτό. Συνήθως, η έκθεση γίνεται μέσω της κατάποσης ρυπασμένου νερού ή φαγητού ή εισπνέοντας ρυπασμένο αέρα. Είναι πιθανό επίσης, να εκτεθεί μέσω της εισπνοής ρυπασμένου καπνού ή μέσω της χρήσης τσιγάρων που αποτελούνται από σοδειές καπνού που έχουν ρυπανθεί με Endosulfan. Τέλος, μπορούν να εκτεθούν άνθρωποι που δουλεύουν σε βιομηχανίες που το παράγουν ή το χρησιμοποιούν. Το Endosulfan εγκαταλείπει το σώμα μέσω των ούρων μερικές μέρες μετά την έκθεση (Ανώνυμος).

Ο πρώτος στόχος του Endosulfan είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα. Αν το Endosulfan εισέλθει σε μεγάλη συγκέντρωση μέσω της εισπνοής ή της κατάποσης τότε μπορεί να έχει σπασμούς, να βιώσει τρέμουλο, να είναι υπερευαίσθητος ή να έχει δυσκολία στην αναπνοή και στη δυνατότητα να παράγει σάλιο. Μπορεί επίσης τελικά να επέλθει θάνατος (Ανώνυμος).

Η τοξικότητα των φυτοφαρμάκων έχει μελετηθεί μέσω διάφορων πειραμάτων που έχουν γίνει σε ζώα. Η έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα δεν είναι γνωστές. Όμως ζώα που έχουν εκτεθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις Endosulfan βίωσαν διάφορα συμπτώματα όπως μειωμένη ικανότητα του ανοσοποιητικού να καταπολεμήσει κάποια μόλυνση, προβλήματα με το συκώτι και τα νεφρά, προβλήματα με τα αντρικά μέρη και προβλήματα κατά την εγκυμοσύνη στο έμβρυο. Η EPA (U.S. Environmental Protection Agency), το Τμήμα Υγείας και Ανθρώπου (Department of Health and Human Services) και το Διεθνές Πρακτορείο Έρευνας κατά του καρκίνου ( International Agency for Research on Cancer) δεν έχουν εντάξει το Endosulfan ως καρκινογόνα ουσία (Ανώνυμος)

Επίσης, σύμφωνα με μία μελέτη όπου έγινε χρήση του Endosulfan με εναέριο ψεκάσμο στη περιοχή Muliyar Panchayath, το Endosulfan θεωρήθηκε υπαίτιο για όλα τα προβλήματα υγείας των κατοίκων. Ο ψεκάσμος με Endosulfan για τη καταπολέμηση των κουνουπιών πραγματοποιείται τα τελευταία 20 χρόνια και σήμερα δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα διάφορα ασυνήθιστα προβλήματα υγείας των κατοίκων οφείλονται σ' αυτό. Τα προβλήματα υγείας περιλαμβάνουν αναπνευστικά προβλήματα, ερεθισμό στα μάτια, πονοκεφάλους, βήχα και δερματικές αρρώστιες. Επίσης, με το Endosulfan έχουν συνδεθεί και ο ασυνήθιστα μεγάλος ρυθμός αποβολών στις γυναίκες και στα ζώα καθώς επίσης έχει συνδεθεί με παιδιά που γεννιούνται με ανωμαλίες και σωματικές και νοητικές αναπηρίες (Nishad 2006).

Η ανθρώπινη έκθεση σε Lindan είναι κυρίως αποτέλεσμα της τροφής (κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν υπολείμματα φυτοφαρμάκων). Αποβάλλεται από τον οργανισμό μέσω των ούρων και των κοπράνων, αφού μεταβολιστεί στο συκώτι. Τα παραπροϊόντα αποβάλλονται είτε αυτούσια είτε συνδεδεμένα με γλυκονουρικό ή σουλφουρικό οξύ.

Τα συμπεράσματα που υπάρχουν σήμερα σχετικά με το Lindan και την επιρροή του στους ανθρώπους είναι περιορισμένα και κυρίως βασίζονται σε μελέτες που έχουν γίνει σε ζώα. Το Lindan κατά κύριο λόγο επιδράει στο νευρικό σύστημα. Σε μελέτες που έχουν γίνει το Lindan προκαλεί νευροτοξικές επιδράσεις και ενδοκρινικές διαταραχές. Επιπλέον, τα έμβρυα και τα παιδιά αναμένεται να είναι περισσότερο ευπαθή απ' ότι οι ενήλικες (Edwards 2002).

Οι έρευνες για την τοξικότητα του DDT είναι ανάμικτες. Μερικές έρευνες έχουν δείξει ότι το DDT δεν είναι τοξικό για τον άνθρωπο. Όμως πειράματα που έχουν γίνει από διάφορα πρακτορεία καταλήγουν σε διαφορετικά συμπεράσματα, όπως το Διεθνές Πρακτορείο Έρευνας κατά του καρκίνου ( International Agency for Research on Cancer) που έχει κατατάξει το DDT ως πιθανή καρκινογόνα ουσία για τον άνθρωπο, κυρίως γιατί σε πειράματα που έχουν γίνει σε ζώα έχει προκαλέσει καρκίνο στο συκώτι ενώ σε πειράματα που έγιναν από το Διεθνές Πρόγραμμα Τοξικότητας στην Αμερική (US National Toxicology Program, NTP) βρήκαν ότι δεν είναι μεταλλαξιογόνο (Key et al. 1994). Άλλοι αναφέρουν ότι έκθεση στο DDD αυξάνει σχετικά τα περιστατικά καρκίνου στο συκώτι στα αρσενικά ποντίκια ενώ αυξάνει σημαντικά τα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα και στα δύο φύλα (Turusov et al. 2002).

Σε μία έρευνα στην Ινδία, παρατηρήθηκε ότι μία ομάδα ανδρών που εργαζόταν με το DDT παρουσίασαν μικρή γονιμότητα, αυξημένες γεννήσεις νεκρών παιδιών, θανάτους νεογέννητων ή τα παιδιά γεννιόνταν με ελαττώματα (Κιρλάππου 2004). Η EPA αναφέρει επίσης ότι το DDT είναι καρκινογόνο στα ποντίκια και πιθανός καρκινογόνο στον άνθρωπο αλλά τονίζει ότι υπάρχει έλλειψη στοιχείων όσων αφορά τις επιδράσεις του DDT και των μεταβολιτών του (Ανώνυμος, 1975).

Σύμφωνα με τα παραπάνω η πιθανή συνεισφορά του DDT και των μεταβολιτών του στο κίνδυνο παρουσίασης καρκίνου στον άνθρωπο δεν είναι ακόμα ξεκάθαρη και απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

---

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

---

### 2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΟΡΓΑΝΑ

#### 2.1.1. Αντιδραστήρια & Χημεία

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα χημικά για την προετοιμασία των δειγμάτων και την ανάλυση τους. Τα χημικά αυτά αντιδραστήρια είναι:

1. Lindan, a- Endosulfan και 4,4,-DDD τα οποία προμηθεύτηκαν από τον οίκο Riedel- De Haen (R.D.H.)
2. Ακετόνη (acetone) με βαθμό καθαρότητας ‘analytical grade’ του οίκου Fisher Scientific
3. Μεθανόλη (methanol) με βαθμό καθαρότητας ‘super gradient’ του οίκου Lab-Scan Analytical Sciences
4. Εξάνιο (Hexane) του οίκου Merck για αέριο χρωματογράφο
5. Χλωριούχο Νάτριο (Sodium Chloride) του οίκου R.D.H

Τα αρχικά πυκνά πρότυπα διαλύματα (individuals) παρασκευάστηκαν σε 5 ml ακετόνης με συγκεντρώσεις το Lindan 5838,1 ppm, το Endosulfan 5505 ppm και το 4,4-DDD 8648 ppm. Τα πρότυπα εργασίας (working standard) παρασκευάζονταν καθημερινά, ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων, στις επιθυμητές συγκεντρώσεις και ποσότητες. Οι εμβολιασμοί (spike) των δειγμάτων έγιναν με μικροσύριγγες για μεγαλύτερη ακρίβεια ενώ για τα υδατικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό από το σύστημα καθαρισμού ύδατος Easy Pure RF του οίκου Barnstead/Thermolyne.

#### 2.1.2. Όργανα & Συσκευές

Ο αέριος χρωματογράφος είναι το μοντέλο GC-17A gas chromatography του οίκου Shimadzu ενώ ο ανιχνευτής είναι ECD-17 Ver2 (Electron Capture Detector). Ο επωαστικός θάλαμος (Heating-cooling chamber) προμηθεύτηκε από τον οίκο J.P. Selecta. Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε είναι SPME-PDMS 100µm και προμηθεύτηκε από τη Supelco. Οι γυάλινες δειγματοληπτικές συσκευές RGSB (Round

Gas Sampling Bulb) σχεδιάστηκαν με βάση τις ανάγκες των πειραμάτων, που αφορούν τη μέθοδο μικροεκχύλιση υπό συνθήκες κενού, που πραγματοποιούνται στο εργαστήριο Υδατικής Χημείας του Πολυτεχνείου Κρήτης. Η σύριγγα κενού (gas tight syringe) είναι του οίκου SGE Analytical Science. Τα septum που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από τον οίκο Shimadzu και είναι τύπου Thermogreen LB-2 για τον αέριο χρωματογράφο ενώ για τη βαλβίδα της δειγματοληπτικής συσκευής είναι τύπου Thermogreen LB-1, με τρύπα στη μέση (halfhole type). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μία αντλία κενού Vacuubrand GmbH & Co. KG, το μοντέλο MZ 2C NT (Wertheim, Germany) καθώς επίσης και όργανο μέτρησης pH.

### **2.1.3. Χαρακτηριστικά υδατικών περιβαλλοντικών δειγμάτων**

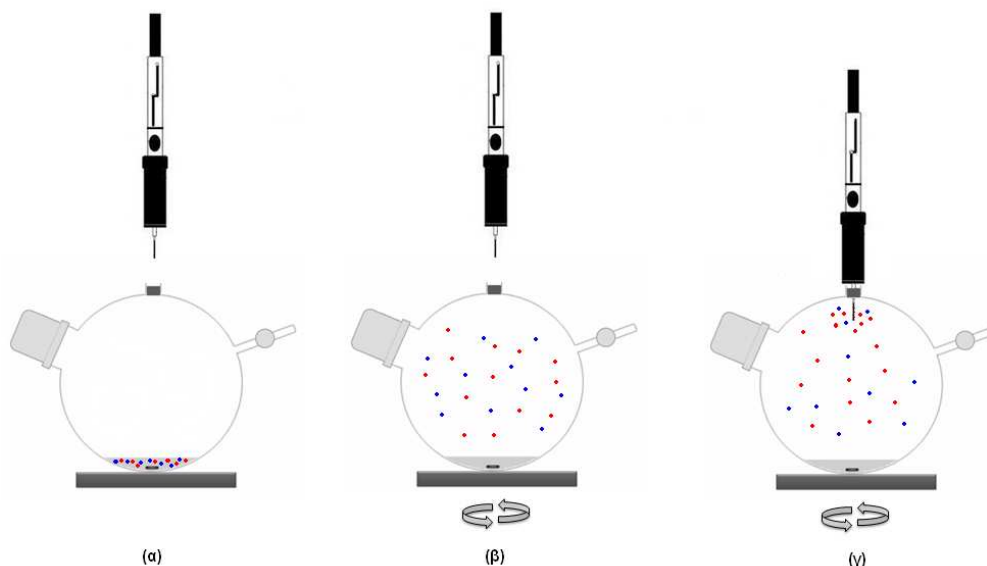
Το νερό της βρύσης συλλέχθηκε από το χώρο του εργαστηρίου αυθημερόν ενώ τα δείγματα εκροής βιολογικού καθαρισμού συλλέχθηκαν από τη Βιολογική Μονάδα Χανίων στις 21 Ιουνίου 2011. Τα λύματα προέρχονται από την εκροή της δευτεροβάθμιας δεξαμενής καθίζησης πριν τη χλωρίωση. Τα χαρακτηριστικά των παραπάνω δειγμάτων φαίνονται στο Πίνακα 2.1. που ακολουθεί:

**Πίνακας 2. 1 Χαρακτηριστικά Υδατικών Περιβαλλοντικών δειγμάτων, (α)Χαρακτηριστικά Δειγμάτων Εκροής Βιολογικού καθαρισμού Χανίων, (β) Χαρακτηριστικά νερού βρύσης.**

<b>(α)Χαρακτηριστικά Δειγμάτων Εκροής Βιολογικού Καθαρισμού</b>	
PH	8.24
TDS (mg/l)	456
Αλατότητα (Salinity, ‰)	0.46
Αγωγιμότητα (Conductivity, $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	927
Αντίσταση ( Resistivity, $\text{K}\Omega\text{-cm}$ )	1075
<b>(β)Χαρακτηριστικά Νερού Βρύσης</b>	
PH	7.91
TDS (mg/l)	140
Αλατότητα (Salinity, ‰)	0.14
Αγωγιμότητα (Conductivity, $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	294
Αντίσταση ( Resistivity, $\text{K}\Omega\text{-cm}$ )	3.43

## 2.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗ VAC – HSSPME ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Αρχικά, παρασκευάζουμε τα επιθυμητά υδατικά διαλύματα, εμβολιασμένα με τις τρεις ουσίες που μας ενδιαφέρουν, γνωστής συγκέντρωσης. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί ώστε οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων να μπορούν να ανιχνευθούν από τον αέριο χρωματογράφο και να μην βρίσκονται εκτός των ορίων του. Στην ειδικά διαμορφωμένη γυάλινη δειγματοληπτική συσκευή RGSB (Round Gas Sampling Bulb) τοποθετείται μαγνήτης (του οίκου Heldolph Instruments). Έπειτα, η δειγματοληπτική φιάλη συνδέεται με ειδική συσκευή παραγωγής κενού, και εφόσον έχει δημιουργηθεί το απαραίτητο κενό, αρχικά κλείνει η βάννα της δειγματοληπτικής συσκευής και στη συνέχεια τίθεται εκτός λειτουργίας η συσκευή κενού. Εισάγουμε στη συσκευή RGSB ορισμένα ml (μέγιστη τιμή τα 10ml) του υδατικού διαλύματος με σύριγγα κενού από το ειδικό στόμιο μέσω του septum στην άνω επιφάνεια της συσκευής. Η δειγματοληπτική συσκευή, έπειτα, τοποθετείται στον επωαστικό θάλαμο πάνω σε συσκευή ανάδευσης για δέκα λεπτά ώστε να επέλθει η απαραίτητη ισορροπία ενώ ταυτόχρονα ανακινείται με τη βοήθεια του μαγνήτη. Στα δέκα λεπτά ακριβώς τοποθετείται η SPME κάθετα στο δοχείο μέσω του στομίου στην άνω επιφάνεια της συσκευής για καθορισμένο χρόνο. Τέλος, μετά το τέλος της δειγματοληψίας η SPME αφαιρείται από τη συσκευή και τοποθετείται στον αέριο χρωματογράφο για ανάλυση και ποσοτικοποίηση (Εικόνα 2.1.). Η SPME παραμένει στον αέριο χρωματογράφο για 5 λεπτά, ύστερα απομακρύνεται από τον εισαγωγέα και είναι έτοιμη να χρησιμοποιηθεί ξανά. Όλα τα πειράματα έγιναν εις διπλούν.



Εικόνα 2.1. Συνοπτική περιγραφή της δειγματοληψίας: (α) πρώτη φάση πριν τη δημιουργία κενού, (β) φάση ισορροπίας, (γ) εισαγωγή της ίνας στην υπερκείμενη επιφάνεια και δειγματοληψία.

Κατά τη πειραματική διαδικασία πέντε βασικές παράμετροι θα ελεγχθούν για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου: η επιρροή του χλωριούχου νατρίου, η ποσότητα του υδατικού διαλύματος, το μέγεθος της δειγματοληπτικής φιάλης, η ταχύτητα ανάδευσης, η θερμοκρασία και τέλος ο χρόνος δειγματοληψίας.

## **2.3 ΑΕΡΙΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ (GC-ECD)**

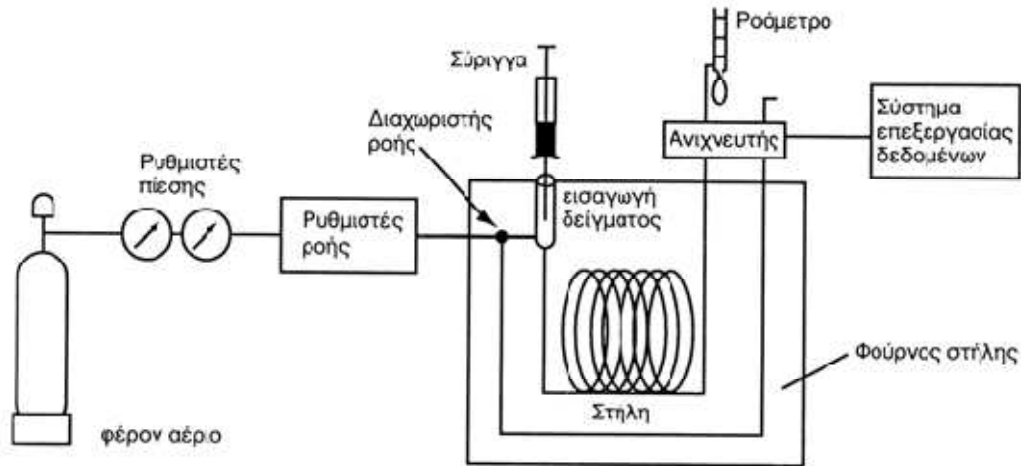
Η χρωματογραφία είναι αναλυτική τεχνική διαχωρισμού ουσιών από το μίγμα τους. Ονομάστηκε έτσι επειδή αρχικά χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό εγχρώμων ουσιών. Εφαρμόζεται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα δηλαδή οι ποσότητες των δειγμάτων πρέπει να είναι μικρότερες από  $10^{-6}$  μg/συστατικό. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταυτότητας (ποιοτική ανάλυση) και της ποσότητας (ποσοτική ανάλυση) των ενώσεων. Οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές και θα πρέπει να μεταβαίνουν στην αέρια φάση χωρίς ταυτόχρονη διάσπαση.

Σ' αυτήν τη τεχνική το δείγμα τοποθετείται στη μία άκρη ενός υλικού προσρόφησης που ονομάζεται ακίνητη φάση. Στη συνέχεια αυτό εκλούεται ή ξεπλένεται από την κινητή φάση, που μπορεί να είναι ένας διαλύτης ή ένα αέριο, η οποία κινείται προς την άλλη άκρη της ακίνητης φάσης. Όσες ουσίες είναι πολύ διαλυτές στην κινητή φάση και προσροφώνται λίγο από την ακίνητη φάση "τρέχουν" πρώτες, ενώ όσες προσροφώνται ισχυρά κινούνται πιο αργά. Το αποτέλεσμα είναι ο διαχωρισμός τους [16,18].

Υπάρχουν διάφορα είδη χρωματογραφίας όπως η χρωματογραφία χάρτου ή λεπτής στήλης, στη παρούσα μελέτη όμως θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στην αέρια χρωματογραφία.

### **2.3.1. Γενικές αρχές λειτουργίας αέριου χρωματογράφου-ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (Gas Chromatography Electron Capture Detector – GC- ECD)**

Το σύστημα του αέριου χρωματογράφου αποτελείται από μία φιάλη ηλίου υπό πίεση (gas), τον εισαγωγέα του δείγματος (sample injector), το φούρνο με τη τριχοειδή στήλη, τον ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (ECD) και τέλος έναν καταγραφέα (ηλεκτρονικό υπολογιστή) στον οποίο καταγράφονται τα σήματα που έρχονται από τον ανιχνευτή (Prichard 2003).



Εικόνα 2.2. Σχηματική απεικόνιση μίας συσκευής αέριου χρωματογράφου.

Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές γι' αυτό συνήθως χρησιμοποιείται άζωτο, ήλιο, αργό ή διοξείδιο του άνθρακα. Το φέρον αέριο (ή αλλιώς η κινητή φάση) παίζει μικρό ρόλο στο διαχωρισμό των ουσιών αλλά μεταφέρει τα μόρια του δείγματος κατά μήκος της στήλης. Το φέρον αέριο πρέπει να απαλλάσσεται από τυχόν υγρασία, οξυγόνο και υδρογονάνθρακες πριν εισέλθει στο μηχάνημα. Ιδιαίτερα το οξυγόνο είναι πολύ σημαντικό να απομακρύνεται διότι μπορεί να προκαλέσει προβλήματα σε κάποιους ανιχνευτές όπως ο ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίου και ο φασματομετρητής μάζας (Sewell 2003, Prichard 2003, Mc Nair et al. 2009).

Το δείγμα εισάγεται από τη βαλβίδα εισαγωγής στην κορυφή της στήλης διαμέσου ενός πλαστικού septum. Για μεγαλύτερη απόδοση το δείγμα δεν πρέπει να είναι πολύ μεγάλο. Η θερμοκρασία στην είσοδο του δείγματος είναι συνήθως περίπου  $50^{\circ}\text{C}$  υψηλότερη από το σημείο βρασμού των λιγότερο πτητικών συστατικών του δείγματος. Οι στήλες χρειάζονται ένα μέγεθος δείγματος της τάξης των δέκα (10) έως είκοσι (20)  $\mu\text{l}$  όμως οι τριχοειδείς στήλες χρειάζονται πολύ λιγότερο δείγμα συνήθως τρία με δέκα (3-10)  $\mu\text{l}$ . Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία στη στήλη γι' αυτό η στήλη βρίσκεται σε φούρνο του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά (Sewell 2003, Prichard 2003, Mc Nair et al. 2009).

Συνήθως, η εισαγωγή (injection) γίνεται χωρίς (splitless) ή με διαχωρισμό (split) του δείγματος κατά την εισαγωγή. Η εισαγωγή διαμοιρασμού (split) πραγματοποιείται όταν η τριχοειδής στήλη είναι μικρής διαμέτρου. Ένα μέρος του φέροντος αερίου περνά από την κορυφή της στήλης και αποβάλλεται χωρίς να εισέρχεται σε αυτήν. Για να αποφευχθούν τα προβλήματα που δημιουργούνται από την εισαγωγή των δειγμάτων με διαμοιρασμό χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες μεγαλύτερες διαμέτρου και πλέον το φέρον αέριο και κατ' επέκταση και το δείγμα δεν διαχωρίζονται. Εκτός από αυτούς τους δύο τρόπους η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει επίσης με "εισαγωγή στην



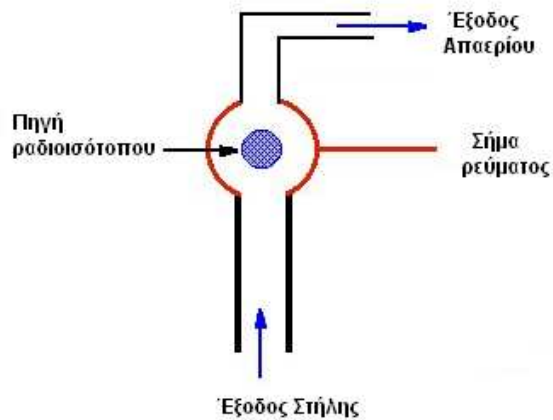
κορυφή της στήλης'' ή αλλιώς άμεση έγχυση (on column injection). Σ' αυτή τη περίπτωση η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει με βελόνη μεγάλου μήκους, η οποία αφού διαπεράσει όλο το μήκος του υάλινου σωλήνα, θα εισαγάγει το δείγμα απευθείας στη στήλη.

Η στήλη είναι πακεταρισμένη (packed column) ή τριχοειδής στήλη (capillary column). Οι πακεταρισμένες στήλες περιέχουν ένα λεπτό αδρανές στερεό υλικό υποστήριξης που επικαλύπτεται με μία υγρή στατική φάση. Οι περισσότερες στήλες είναι 1,5-10m σε μήκος και έχουν εσωτερική διάμετρο 2-4mm. Οι τριχοειδείς στήλες έχουν εσωτερική διάμετρο λίγα δέκατα του χιλιοστού. Ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο θα τοποθετηθεί η στατική φάση στη στήλη διακρίνονται σε αυτές που η υγρή στατική φάση προσδένεται απευθείας στο εσωτερικό τοίχωμα της στήλης (wall coated open tubular column, WCOT) και σε αυτές που προσδένεται σε στερεό υπόστρωμα το οποίο καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα της στήλης (support coated open tubular column, SCOT) (Sewell 2003, Μεκίνη 2004).

Ειδικές βαλβίδες και ροόμετρα ρυθμίζουν την πίεση του αερίου. Είναι πολύ σημαντικό να γίνεται σωστή ρύθμιση και έλεγχος του φέροντος αερίου τόσο για τη στήλη όσο και για τη ποιοτική ανάλυση. Το δείγμα όγκου της τάξης  $\mu\text{L}$ , εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μία μικροσύριγγα, διαμέσου ενός διαφράγματος και όταν εισέρχεται εξατμίζεται και εξαερώνεται. Οι ενώσεις κατανέμονται και διαχωρίζονται ανάλογα με το μοριακό βάρος ανάμεσα στη φάση του μη πτητικού υγρού και του φέροντος αερίου που παρασέρνει τις ουσίες αυτές. Η ταχύτητα και ικανότητα διαχωρισμού είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη θερμοκρασία και εξαρτάται από αυτήν (Mc Nair et al. 2009). Ο χρόνος που θα συγκρατηθεί μια ένωση από τη στήλη και επομένως ο χρόνος που θα απαιτηθεί για να φτάσει στον ανιχνευτή είναι σταθερός για δεδομένη θερμοκρασία. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται ακριβώς σ' αυτή την ιδιότητα των ουσιών να συγκρατούνται λιγότερο ή περισσότερο από τη στατική φάση με αποτέλεσμα να έχουν και διαφορετικές ταχύτητες έκλουσης (Sewell 2003). Έτσι, η στήλη βρίσκεται μέσα σε φούρνο ακριβείας ο οποίος δίνει αυστηρά επαναλήψιμες συνθήκες (Χαραλαμπίκη 2004). Καθώς εξέρχονται οι ουσίες από τη στήλη τις ανιχνεύει ο ανιχνευτής.

Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτή όπως ο ανιχνευτής φλόγας ιονισμού (Flame Ionization detector-FID), ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector-TCD) και ο ανιχνευτής Δέσμευσης Ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector- ECD). Ο FID βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας που προκαλείται από τον ιονισμό της ουσίας από τη φλόγα υδρογόνου ενώ ο TCD στο ότι η ταχύτητα απώλειας θερμότητας εξαρτάται από τη σύσταση του αερίου αφού εξαρτάται και από τη θερμική του αγωγιμότητα. Ο ECD είναι ο πλέον ευαίσθητος ανιχνευτής. Το αέριο έκλουσης ιονίζεται με ένα ρεύμα σωματιδίων που προέρχονται από μία ραδιενεργό πηγή, όπως το  $^3\text{H}$  ή το  $^{43}\text{K}$  κι έτσι δημιουργείτε πλάσμα θεικών ιόντων, ριζών και θερμοηλεκτρονίων. Είναι ουσιαστικά ένας θάλαμος ιονισμού και στηρίζεται στην αρχή ότι η αγωγιμότητα του φέροντος αερίου παραμένει

σταθερή και μπορεί να μετρηθεί με μορφή ρεύματος μεταξύ δύο φορτισμένων ηλεκτροδίων. Στο θάλαμο το φέρον αέριο μεταβάλλεται όταν υπάρχει παρουσία των συστατικών του δείγματος γιατί δεσμεύουν ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα να τροποποιεί το ρεύμα που δημιουργείται (ελάττωση του ρεύματος) με αποτέλεσμα την ανίχνευσή τους (Εικόνα 2.3.). Το οπτικό αποτέλεσμα είναι το χρωματογράφημα (Chunzhou et al. 2005, Che 2006).



Εικόνα 2.3. Σχηματική απεικόνιση ανιχνευτή δέσμωσης ηλεκτρονίων.

Η αέρια χρωματογραφία έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως ότι απαιτεί μικρού μεγέθους δείγματα τα οποία δεν χρειάζεται να έχουν υποστεί κάποια προκατεργασία και η οργανολογία είναι απλή. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στο διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων στα συστατικά τους, και τα αποτελέσματα λαμβάνονται άμεσα. Τέλος, έχει υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία όσον αφορά τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις των τάξεων ppb και ppt (Mc Nair et al. 2009).

### 2.3.2. Συνθήκες αέριου χρωματογράφου

Στη παρούσα εργασία η εισαγωγή του δείγματος θα γίνει με τη τεχνική SPME. Ο εισαγωγέας τέθηκε σε λειτουργία Splitless και ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιον με πίεση 600KPa και συνολική ροή 28 ml/min.. Η μέγιστη θερμοκρασία του φούρνου είναι 310 °C και οι συνθήκες λειτουργίας του φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2. Επιλέχθηκε διαβαθμισμένο πρόγραμμα κλιβάνου δηλαδή η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Η στήλη είναι τριχοειδής και τα χαρακτηριστικά της φαίνονται στο Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2. 1 Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα

Step	Rate (°C/min)	Temp (°C)	Wait (min)
Init		60	2
1	30	200	0
2	3	250	0

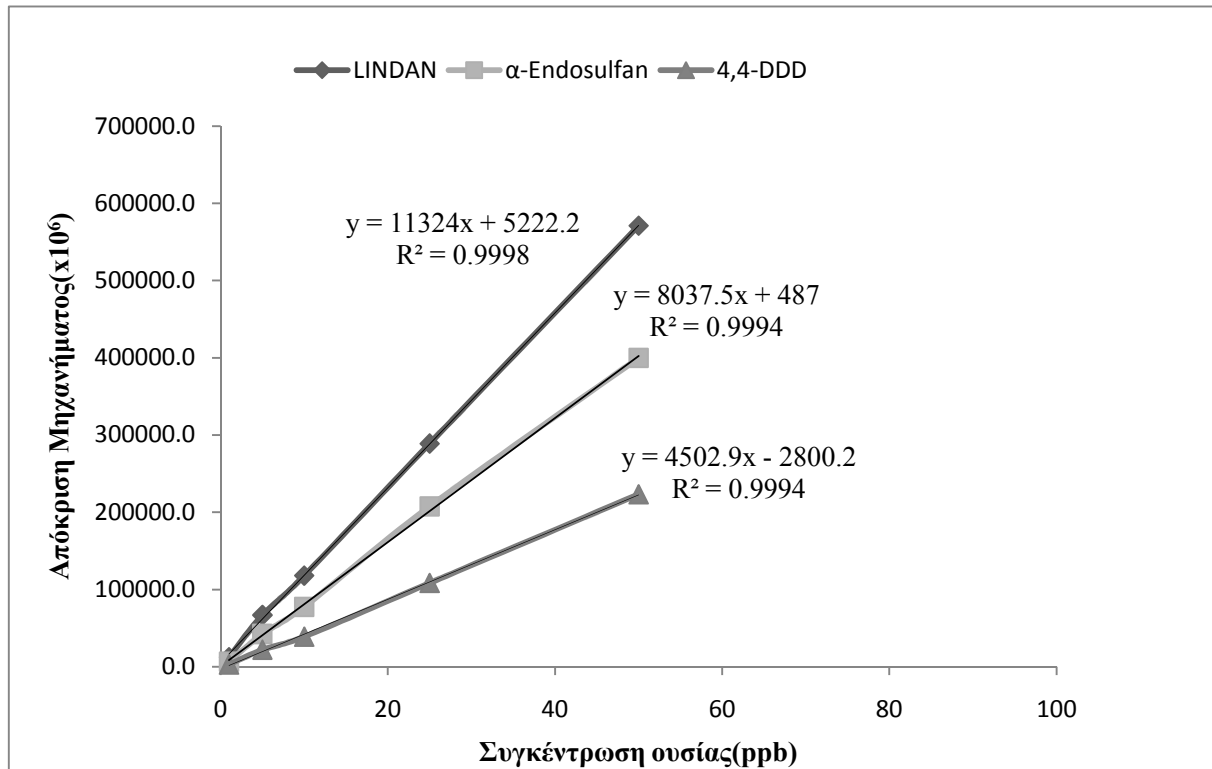
Πίνακας 2. 2 Παράμετροι Στήλης (Column Parameters)

Χαρακτηριστικό	Μέγεθος
Τύπος (Type)	HPSMS
Μήκος (Length)	30m
ID	0.25mm
Φιλμ (Film)	0.25 $\mu$ m

### 2.3.3.Γραμμικότητα μεθόδου στο CD-ECD

Πριν την έναρξη των πειραμάτων είναι απαραίτητη η εύρεση των χρόνων κατακράτησης των ουσιών στον αέριο χρωματογράφο και ο έλεγχος της γραμμικότητας της μεθόδου. Έτσι, έγιναν απευθείας εκχύσεις (direct injections) 1 $\mu$ L στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου με πρότυπα εργασίας που περιείχαν μίγμα των τριών ουσιών. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε εξάνιο και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών βρέθηκαν 4.8, 11 και 13.9 min για το Lindan, το Endosulfan και το DDD αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν 1, 5, 10, 25, 50 και 100 ppb .

Η ανάλυση έδειξε ότι τελικά η μέθοδος αυτή είναι γραμμική αφού τα διαγράμματα και για τις τρεις ουσίες έδωσαν συντελεστή συσχέτισης ( $R^2$ ) που τείνει πολύ κοντά στο ένα (0.999 και για τις τρεις ουσίες).



Εικόνα 2.4. Διάγραμμα απευθείας εκχύσεων των τριών ουσιών Lindan, α-Endosulfan και 4,4-DDD

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προκειμένου να αναπτυχθεί μία ολοκληρωμένη μέθοδος VAC-SPME για το προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων ουσιών είναι απαραίτητο να γίνει έλεγχος των διάφορων πιθανών παραγόντων που μπορούν να την επηρεάσουν θετικά ή ακόμα και αρνητικά.

Στον Πίνακα 3.1 δίνονται οι παράμετροι που θα εξεταστούν . Ύστερα από τον έλεγχο κάθε παραμέτρου, το επόμενο πείραμα πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους που έχουν ήδη βελτιστοποιηθεί. Η SPME θα εφαρμοστεί στην υπερκείμενη επιφάνεια της υάλινης φιάλης.

**Πίνακας 3. 1 Παράμετροι που θα βελτιστοποιηθούν.**

Συνθήκες Πειραματικής Διαδικασίας	
Ποσότητα NaCl (%w/v)	0, 5, 10, 15, 25
Όγκος δείγματος (ml)	5,10, 20
Όγκος Δειγματοληπτικής φιάλης (ml)	100,500,1000
Στροφές (rpm)	750,1000,1400
Χρόνος εκχύλισης (min)	10, 20, 30, 45, 60, 90, 120,150
Θερμοκρασία (°C)	25,35,50

Η επιλογή της ίνας έγινε σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες στις οποίες έχει γίνει σύγκριση διάφορων ινών. Συγκεκριμένα, ο Goncalves και οι συνεργάτες του (2002) έδειξαν ότι η PDMS ίνα έχει τα καλύτερα αποτελέσματα για το a-Endosulfan και το 4,4-DDD ενώ για το Lindan η PDMS ίνα είναι η δεύτερη καλύτερη επιλογή ύστερα από την ίνα PDMS-DVB. Στην εργασία του είχαν μελετηθεί έξι ίνες (7, 30 και 100 μm PDMS, 85 μm PA, 60 μm PDMS-DVB και 65 μm CW-DVB). Στην εργασία του Beceiro-Gonzalez και των συνεργατών του (2007) που μελετήθηκαν τρεις ίνες (100μm PDMS, 85μm PA και 60μm PDMS/DVB) βρέθηκε ότι η PDMS είχε την καλύτερη επίδοση για τις ουσίες Lindan και a-Endosulfan ενώ η καλύτερη επιλογή για την 4,4- DDD ήταν η PA. Αντίθετα, ο Derouiche και οι συνεργάτες του (2007) έδειξαν ότι η ίνα PDMS (100μm) έχει την καλύτερη επίδοση

για την 4,4- DDD σε μελέτη που περιλάμβανε τέσσερις ίνες μεταξύ των οποίων και η PDMS-DVB. Τελικά, για όλα τα πειράματα επιλέχθηκε η ίνα PDMS 100μm.

### 3.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ

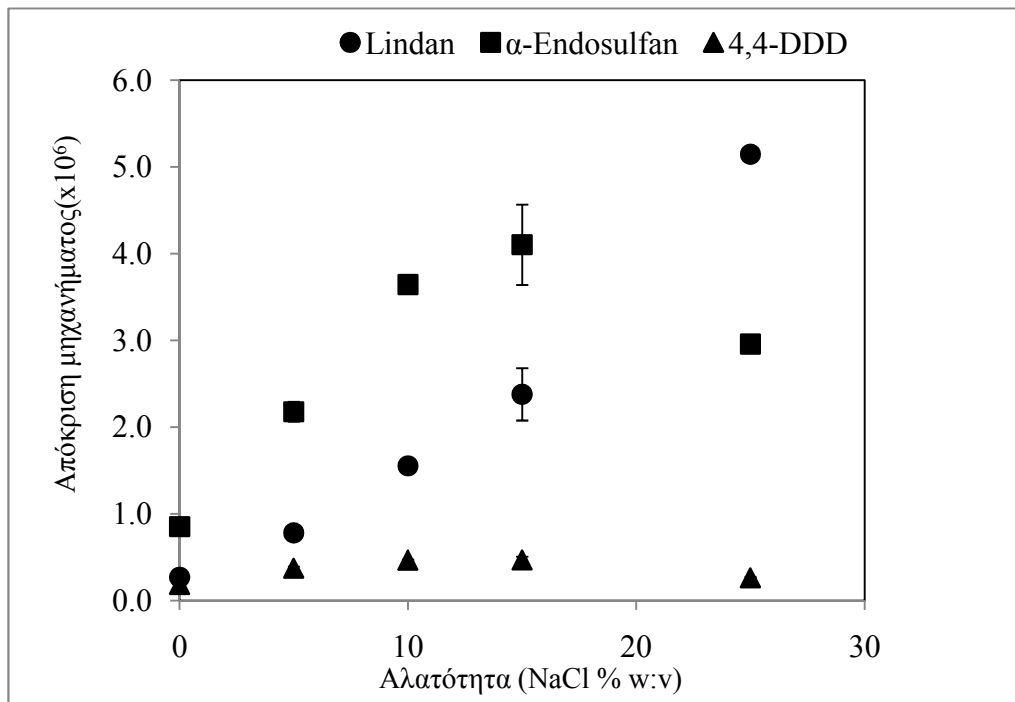
Αρχικά, μελετήθηκε κατά πόσο επηρεάζει τη μέθοδο η προσθήκη χλωριούχου νατρίου. Η παράμετρος αυτή εξετάζεται καθώς στο παρελθόν έχουν γίνει πολλές μελέτες (Magdic et al. 1996, Zambonin et al. 2006) στις οποίες δείχθηκε ότι η προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο υδατινό δείγμα μπορεί να αυξήσει την ικανότητα εκχύλισης για πολλές ουσίες.

Χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες σταθερές συνθήκες και ελέγχθηκαν ποσοστά αλατότητας 0, 5, 10, 15 και 25%w/v NaCl . Πιο αναλυτικά, τοποθετήθηκαν στη δειγματοληπτική συσκευή 10 ml πρότυπου εργασίας 0.5 rrb. Τα πρότυπα εργασίας παρασκευάστηκαν εμβολιάζοντας 1μL από διάλυμα συγκέντρωσης 100 rrb που περιέχει τις ενώσεις διαλυμένες σε ακετόνη, υδατικό διάλυμα με συνολικό όγκο 100ml και με καθορισμένη ποσότητα αλατότητας,. Αφέθηκε να αναδεύεται για 10 λεπτά ώστε να επέλθει ισορροπία και στη συνέχεια εμβαπτίστηκε η ίνα στη συσκευή για άλλα 10 λεπτά. Η ανάδευση τόσο κατά την ισορρόπηση όσο κατά τη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στα 1400rpm. Η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 25°C.

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 25°C, η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 0.5rrb και ο όγκος του ήταν 10ml, ο όγκος της δειγματοληπτικής φυάλης 500ml, ο χρόνος ισορροπίας ήταν 10 λεπτά στα 1400rpm, ο χρόνος εκχύλισης 10 λεπτά στα 1400rpm.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στην Εικόνα 3.1.

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα μέχρι την ποσότητα 15%w/v NaCl όσο αυξάνεται η αλατότητα τόσο αυξάνεται και η απόκριση του μηχανήματος. Τα αποτελέσματα είναι αναμενόμενα αφού η αύξηση της ιοντικής ισχύς στο υδατικό δείγμα μειώνει τη διαλυτότητα των οργανικών ουσιών στο νερό λόγω του φαινομένου εξαλάτωσης (salting-out effect) με αποτέλεσμα την απελευθέρωση στην υπερκείμενη επιφάνεια περισσότερων αναλυτών και την ενίσχυση της προσρόφησης στην ίνα (Lambropoulou et al. 2001). Σε ποσότητα 25% w/v NaCl το Lindan συνεχίζει να αυξάνεται ενώ το 4,4-DDD και το Endosulfan σε ποσοστό αλατότητας 25% μειώνονται. Αντίστοιχα αποτελέσματα όσων αφορά την επίδραση του NaCl στην εκχύλιση είχαν οι εργασίες των Magdic et al. (1996), Pawliszyn (1997) καθώς επίσης και των Zambonin et al (2002). Τελικά, επιλέχθηκε ποσοστό αλατότητας 15% .



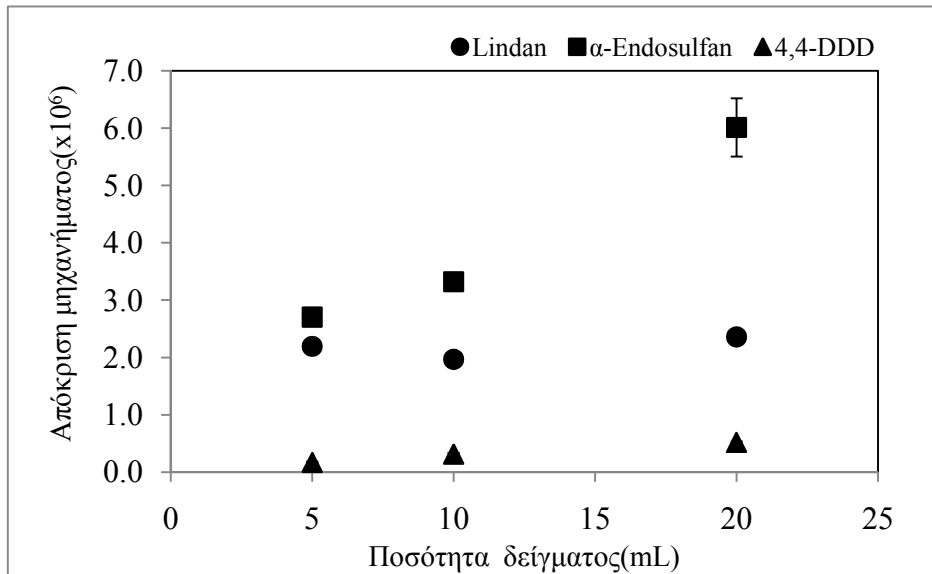
Εικόνα 3.1. Επίδραση αλατότητας στη μικροεγκύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.

### 3.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΓΚΟΥ ΥΔΑΤΙΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση του όγκου του υδατικού διαλύματος αφού ο όγκος της υπερκείμενης επιφάνειας επηρεάζει τόσο τη συγκέντρωση των ουσιών στην υπερκείμενη επιφάνεια αλλά και τους χρόνους ισορροπίας (You et al. 2006).

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 25°C, η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 0.5ppb, ο όγκος της δειγματοληπτικής φιάλης 500ml, ο χρόνος ισορροπίας ήταν 10 λεπτά στα 1400rpm, ο χρόνος εκχύλισης 10 λεπτά στα 1400rpm και η ποσότητα NaCl (%w/v) είναι 15%. Για τις συνθήκες που περιγράφηκαν εισήχθησαν στη υάλινη φιάλη 5, 10 και 20 ml υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 0.5ppb εμβολιασμένο με τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις.

Συνήθως αύξηση του όγκου του υδατικού διαλύματος σημαίνει μείωση του λόγου αέρια-υγρή φάση, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση των ουσιών στην υπερκείμενη επιφάνεια, το οποίο φυσικά ευνοεί τη διαδικασία της εκχύλισης (You et al. 2006). Πράγματι, όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.2. αύξηση του όγκου συνεπάγεται αύξηση της απόκρισης αφού αυξάνεται και ο αριθμός των μορίων στο υδατικό δείγμα που μπορούν να μεταφερθούν στην υπερκείμενη αέρια φάση και τελικά να εκχυλιστούν. Τελικά, λαμβάνοντας υπόψη το σφάλμα στα 20ml για το Endosulfan επιλέξαμε ως όγκο υδατικού διαλύματος για τα επόμενα πειράματα τα 10ml, παρά την εντυπωσιακή αύξηση του Endosulfan.



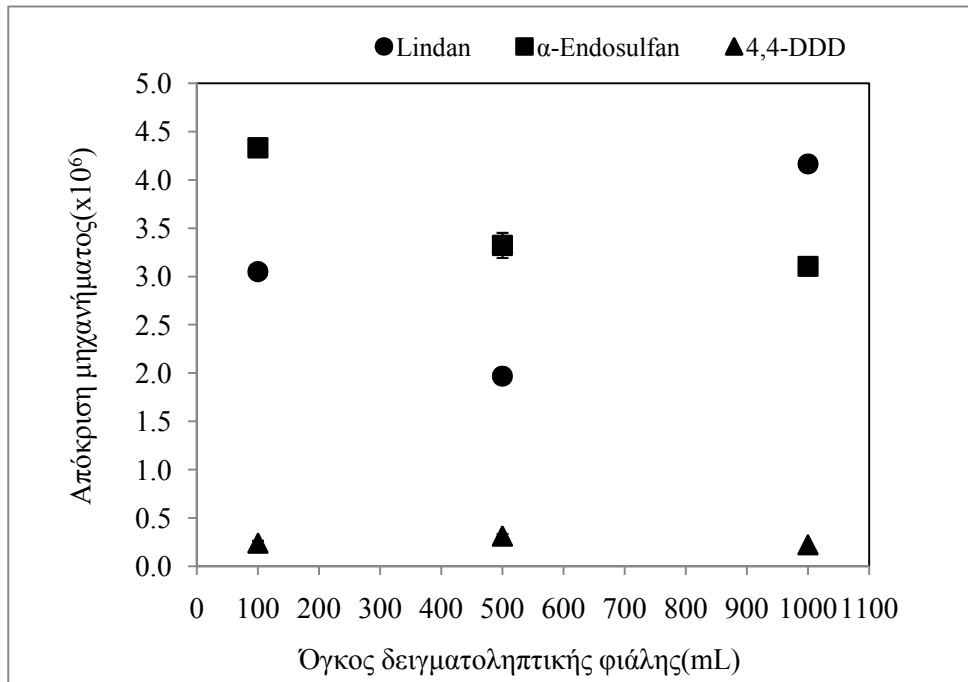
Εικόνα 3.2. Επίδραση όγκου υδατικού διαλύματος στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.

### 3.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΓΚΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΙΚΗΣ ΦΙΑΛΗΣ

Επίσης, έγινε έλεγχος και του όγκου της δειγματοληπτικής φιάλης που θα χρησιμοποιηθεί. Στη παρούσα εργασία έγινε έλεγχος σε τρεις δειγματοληπτικές φιάλες που είχαν όγκο 100, 500 και 1000ml. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 3.3.

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 25°C, η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 0.5 ppb και ο όγκος του 10ml, ο χρόνος ισοροπίας ήταν 10 λεπτά στα 1400rpm, ο χρόνος εκχύλισης 10 λεπτά στα 1400rpm και η ποσότητα NaCl (%w/v) ήταν 15%.





Εικόνα 3.3. Επίδραση όγκου δειγματοληπτικής φιάλης (100, 500, 1000ml) στη VAC-SPME.

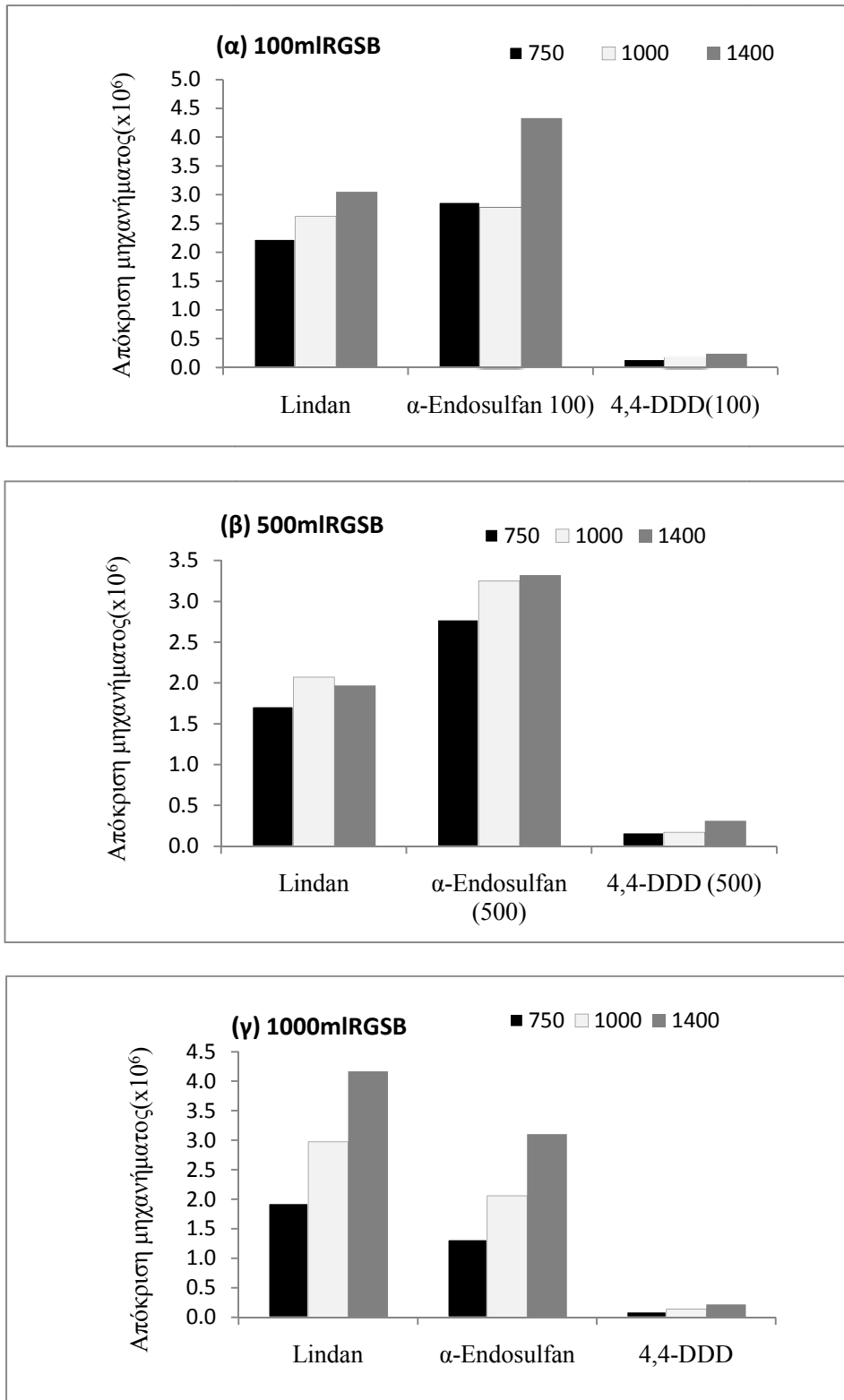
Γενικά, αναμένετε ότι με αύξηση του όγκου της ογκομετρικής φιάλης θα έχουμε και αύξηση της απόκρισης. Πράγματι, το Lindan έχει καλύτερη απόκριση για όγκο δειγματοληπτικής φιάλης 1000ml ενώ η χρήση της RGSB των 500ml έχει σαν αποτέλεσμα μείωση της απόδοσης στο μισό. Τα αποτελέσματα για το Endosulfan είναι παρόμοια για τις δύο ογκομετρικές φιάλες των 500 και 1000ml. Από το διάγραμμα φαίνεται επίσης ότι η φιάλη των 100ml έχει μεγαλύτερο σήμα από το αναμενόμενο που οφείλεται στο γεγονός ότι η ίνα είναι πιο κοντά στη διεπιφάνεια. Αξίζει να σημειωθεί ότι η δειγματοληψία πραγματοποιείται για 10 λεπτά και οι ουσίες δεν έχουν φτάσει σε φάση ισορροπίας (non- equilibrium conditions). Αυτό σημαίνει ότι η απόκριση του χρωματογράφου εξαρτάται από την τάση των ουσιών να φτάσουν σε ισορροπία, δηλαδή οι τιμές έχουν μεγάλες διακυμάνσεις.

Λόγω των παραπάνω δεδομένων η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης πραγματοποιήθηκε και για τις τρεις ογκομετρικές φιάλες ώστε να ληφθεί υπόψη άλλος ένας παράγοντας και η επιλογή της κατάλληλης RGSB να είναι πράγματι η βέλτιστη.

### 3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ

Επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης στην εκχύλιση των ουσιών. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για τις τρεις φιάλες (100, 500 και 1000ml), σε όγκο δείγματος 10ml και συγκέντρωσης 0.5 ppb. Το δείγμα αναδεύτηκε για 10 λεπτά στα 1400rpm και ύστερα εκχυλίστηκε για άλλα 10 λεπτά στα 1400rpm σε θερμοκρασία 25°C . Η ποσότητα NaCl (%w/v) ήταν 15% και η

ανάδευση έγινε σε 750, 1000 και 1400 στροφές. Τα αποτελέσματα για κάθε φιάλη ξεχωριστά φαίνονται στην Εικόνα 3.4.



Εικόνα 3.4. Επίδραση ταχύτητας ανάδευση στη μικροεγκύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού:

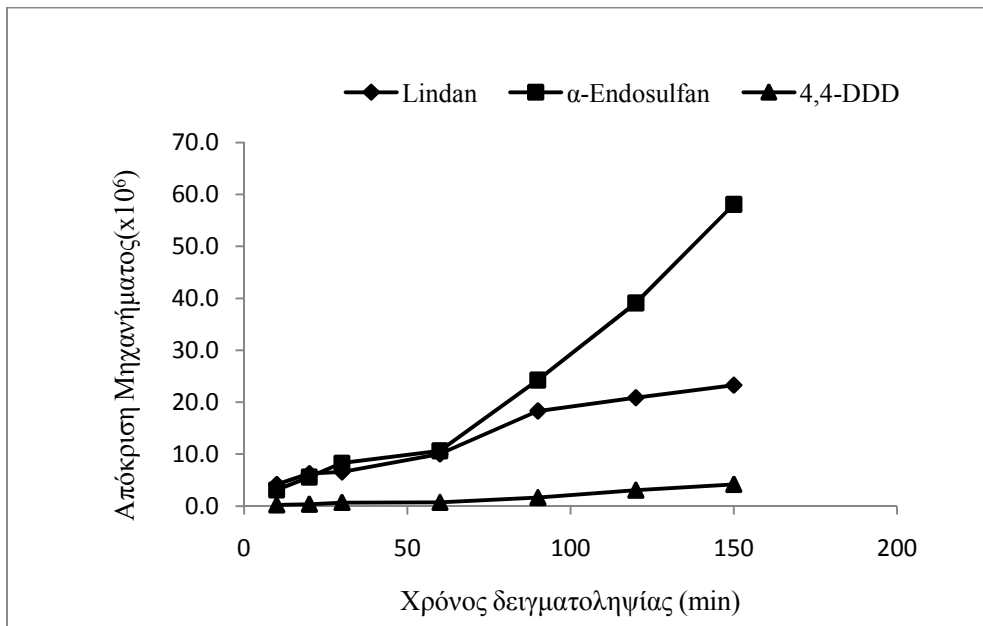
(α)σε φιάλη 100ml, (β) σε φιάλη 500ml, (γ) σε φιάλη 1000ml.

Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κίνησης των μορίων και της αποδοτικότητας της εκχύλισης και ότι το επίπεδο ανάδευσης επηρεάζει θετικά την εκχύλιση και για τις τρεις ουσίες. Αυτό συμβαίνει γιατί, όπως έχει αναφερθεί, η ανάδευση του δείγματος βοηθάει τη διάχυση των αναλυτών προς την υπερκείμενη επιφάνεια και επομένως και προς την ίνα με αποτέλεσμα να απαιτούνται μικρότεροι χρόνοι εκχύλισης. Τελικά, επιλέχθηκε η μέγιστη ανάδευση, δηλαδή 1400rpm.

Τα αποτελέσματα από την επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης επιβεβαιώνουν και τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν για τις φιάλες στην προηγούμενη ενότητα, δηλαδή ότι οι ουσίες Lindan, Endosulfan και DDD έχουν τη καλύτερη απόκριση με την RGSB των 1000ml, των 100ml και των 500ml αντίστοιχα, στη μέγιστη ανάδευση. Όταν εμπλέκονται πολλοί παράγοντες, αναπόφευκτα η βέλτιστη επιλογή για μία παράμετρο δεν σημαίνει απαραίτητα ότι θα αποτελεί βέλτιστη λύση και για τις υπόλοιπες παραμέτρους. Έτσι, και στη παρούσα εργασία παρατηρούμε ότι για το DDD οι τιμές των αποκρίσεων για τις RGSB των 100 και των 1000ml δεν αλλάζουν σημαντικά όμως δεν ισχύει το ίδιο και για τις άλλες δύο ουσίες. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η εκχύλιση του Lindan επηρεάζεται περισσότερο από τον όγκο της φιάλης σε σχέση με το Endosulfan. Για το λόγο αυτό τελικά επιλέχθηκε ογκομετρική φιάλη των 1000ml.

### 3.5.ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΧΡΟΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε υδατικό διάλυμα με 15% w/v NaCl στα οποία έγινε εμβολιασμός με μίγμα των τριών ουσιών. Το τελικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 0.05 ppb. Η ανάδευση και η δειγματοληψία έγιναν σε 1400 στροφές και η ανάδευση διήρκησε 10 λεπτά. Η θερμοκρασία ήταν στους 25°C. Οι χρόνοι που ελέγχθηκαν ήταν 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 και 150 λεπτά. Η Εικόνα 3.5 απεικονίζει την επίδραση του χρόνου εκχύλισης για τις τρεις ενώσεις σε θερμοκρασία 25°C.

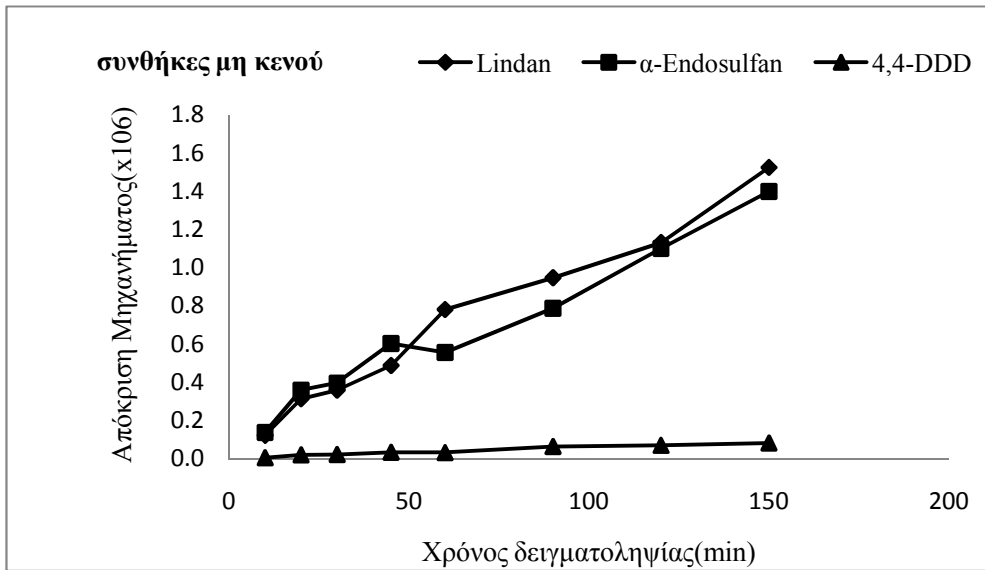


Εικόνα 3.5. Επίδραση χρόνου εκχύλισης στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.

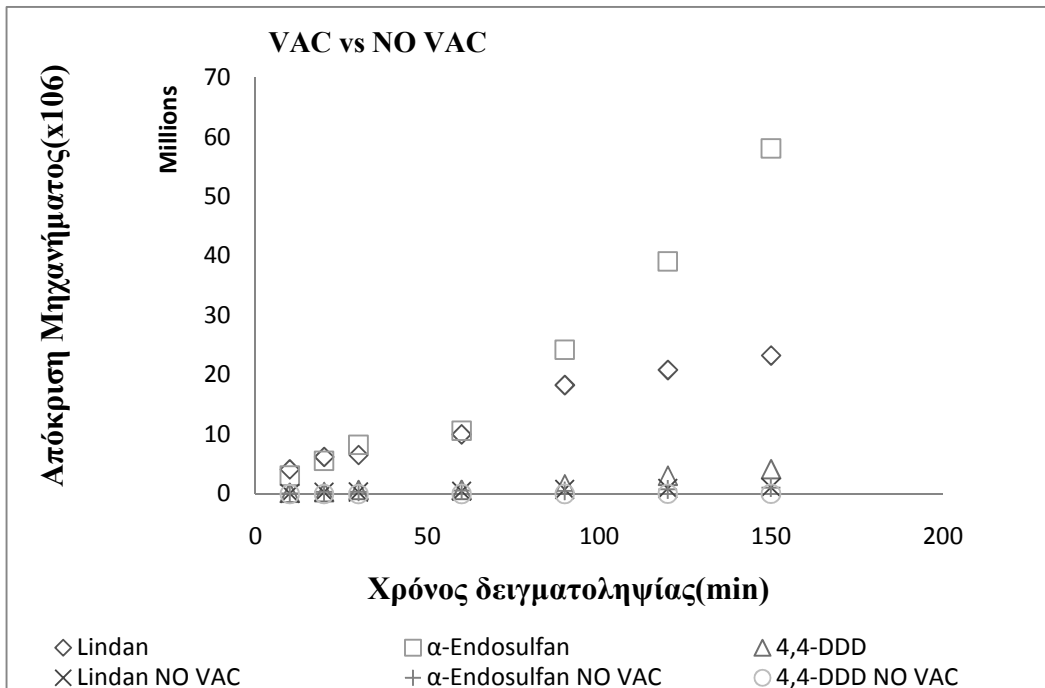
Στην Εικόνα 3.5. γίνεται φανερή η επίδραση που έχει ο χρόνος στην απόδοση της εκχύλισης. Η VAC-HSSPME βασίζεται όπως και η κλασική HSSPME στη μεταφορά μάζας από την υδατική φάση στην υπερκείμενη επιφάνεια κι ύστερα από την υπερκείμενη επιφάνεια στη στερεή φάση (ίνα). Καθώς το σύστημα πλησιάζει σε συνθήκες ισορροπίας ο ρυθμός μεταφοράς μάζας ελαττώνεται (Che 2006). Παρ' όλα αυτά πλήρης ισορροπία επιτυγχάνεται μετά από πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η διαφορά στις δύο μεθόδους έγκειται στις συνθήκες κενού οι οποίες ενισχύουν το φαινόμενο της μεταφοράς μάζας με αποτέλεσμα στις ίδιες συνθήκες, η εκχύλιση σε κενό να έχει πολύ μεγαλύτερη απόδοση. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη κενού μειώνει τη πίεση στον υπερκείμενο χώρο με αποτέλεσμα την αύξηση των συντελεστών διάχυσης των ουσιών προς την αέρια φάση και κατ' επέκταση στην ίνα.

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω, έγινε επανάληψη των πειραμάτων για τις ίδιες συνθήκες αλλά χωρίς τη δημιουργία κενού ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο η εφαρμογή SPME σε κενό είναι πιο γρήγορη και πιο αποτελεσματική από την αντίστοιχη χωρίς κενό. Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις φαίνονται αναλυτικά στα Διαγράμματα 3.6. και 3.7.



Εικόνα 3.6. Επίδραση χρόνου εκχύλισης στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης χωρίς κενό.



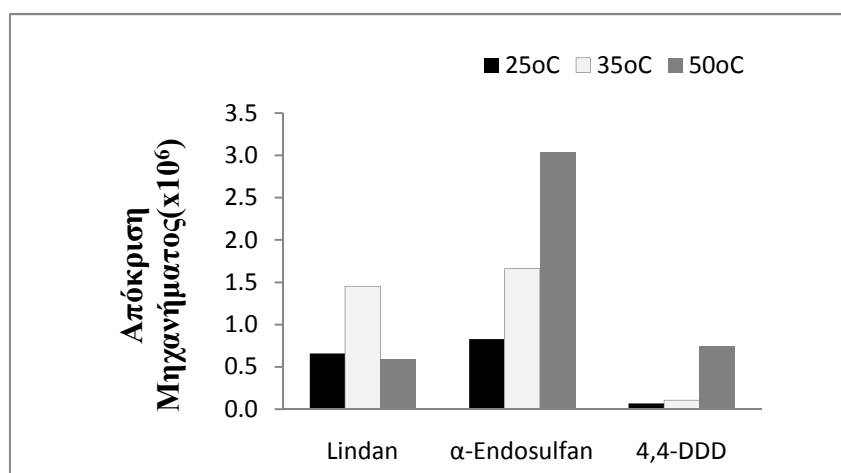
Εικόνα 3.7. Σύγκριση επίδρασης χρόνου εκχύλισης στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης με κενό και χωρίς κενό.

Τα αποτελέσματα είναι πολύ ικανοποιητικά αφού στο Διάγραμμα 3.7 φαίνεται καθαρά η διαφορά στην απόδοση των δύο μεθόδων. Η απόκριση του μηχανήματος σε συνθήκες κενού είναι τουλάχιστον έξι φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με την απόκριση του μηχανήματος σε συνθήκες χωρίς κενό. Τελικά, επιλέχθηκε για τα επόμενα πειράματα χρόνος εκχύλισης 30 λεπτά.

### 3.6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Τέλος, ελέγχθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας. Για να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στη διαδικασία της εκχύλισης, έγιναν πειράματα στις ίδιες συνθήκες αλλά σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: 25, 35 και 50°C. Το δείγμα αναδευόταν συνεχώς στις 1400rpm ενώ η δειγματοληψία διήρκησε 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.8..

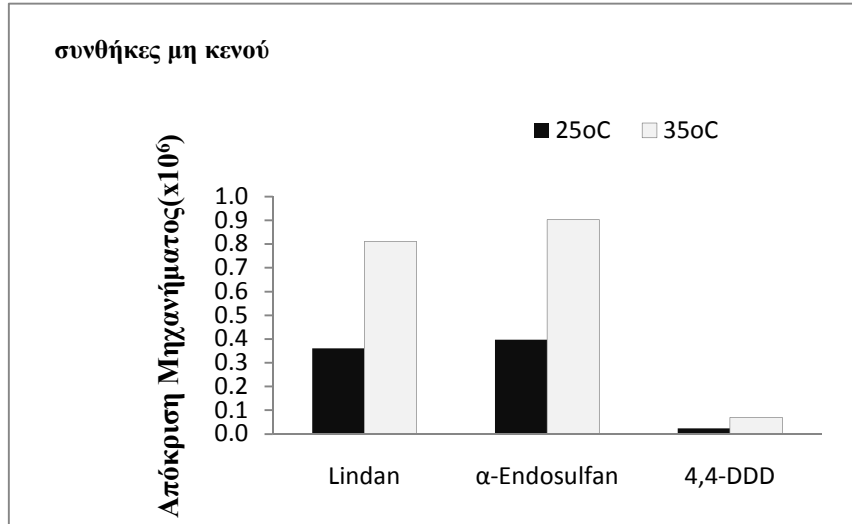
Η Εικόνα 3.8. δείχνει ότι η επίδοση της μεθόδου για τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις γενικά αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι αύξηση της θερμοκρασίας σημαίνει ταχύτερη μεταφορά της μάζας από την υγρή φάση στη στερεή (Pawliszyn et al. 1997, Penalver et al. 1999, Theodoridis et al. 2000) αφού αύξηση της θερμοκρασίας σημαίνει αύξηση της ταχύτητας εξάτμισης με αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού συγκέντρωσης των ουσιών στον υπερκείμενο χώρο και τελικά στην ίνα. Εξάιρεση αποτελεί η απόκριση του μηχανήματος για το Lindan στους 50 °C που ήταν όμοια με αυτήν στους 25 °C και χαμηλότερη από αυτήν στους 35 °C. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι έχει υψηλή πίεση ατμών κι έτσι φτάνει στη μέγιστη εκχύλιση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Επίσης, σύμφωνα με τον Theodoridi και τους συνεργάτους του (2000) η μείωση της απόδοσης μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι ο συντελεστής κατανομής  $K_{fs}$  μειώνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Αντίθετα, η εκχύλιση του DDD, που έχει χαμηλότερη πίεση ατμών, φαίνεται να επηρεάζεται θετικά από την αύξηση της θερμοκρασίας στους 50 °C (You et al. 2006). Τελικά, επιλέχθηκε θερμοκρασία 35 °C.



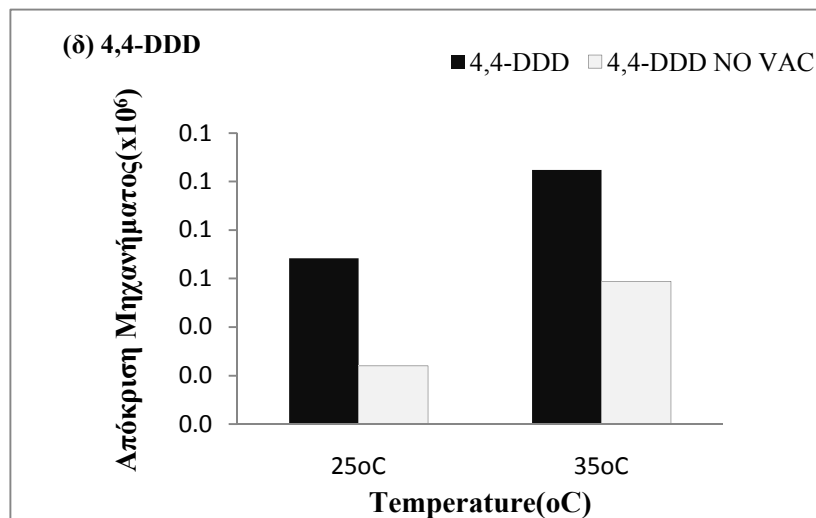
Εικόνα 3.8. Επίδραση θερμοκρασίας εκχύλισης στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης με κενό.

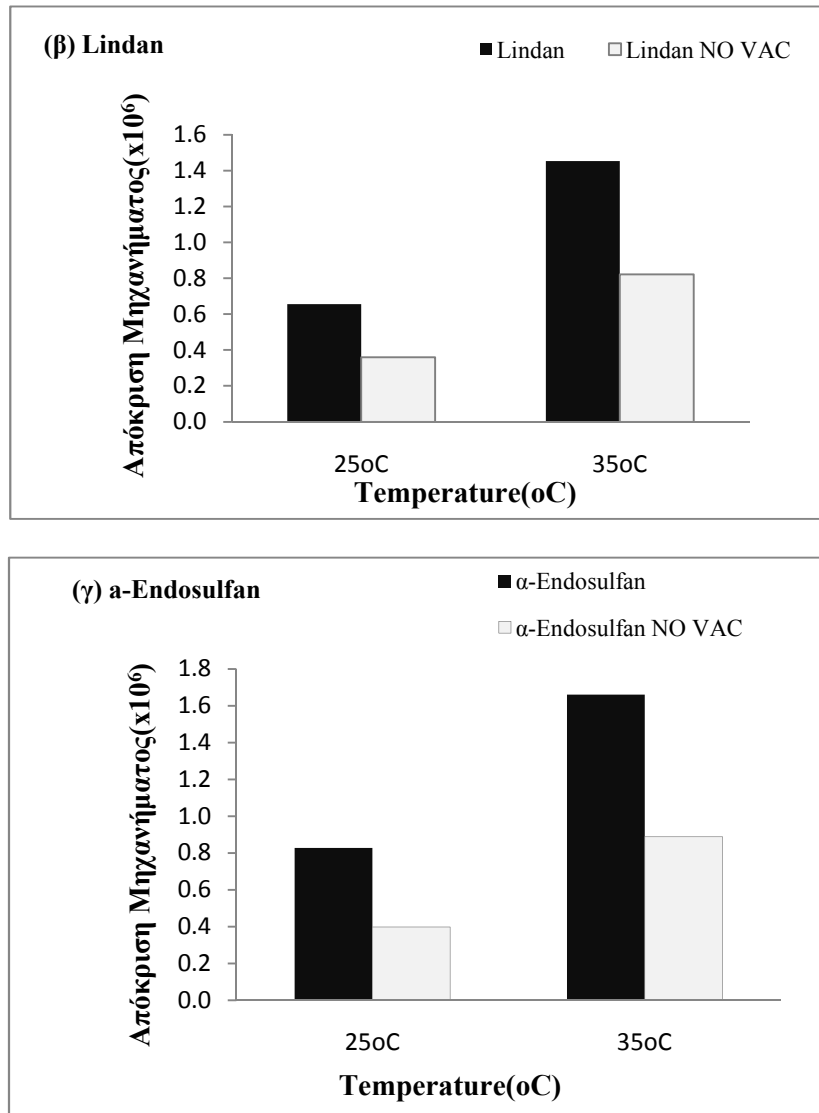
Επαναλαμβάνοντας τα ίδια πειράματα σε θερμοκρασίες 25 και 35°C και στις ίδιες συνθήκες όπως περιγράφηκαν αλλά χωρίς κενό, τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά (Διαγράμματα 3.9., 3.10.). Η μέγιστη απόκριση του αέριου χρωματογράφου σε συνθήκες χωρίς κενό ήταν η μισή της

απόκρισης του μηχανήματος σε συνθήκες κενού και για τις τρεις ουσίες και στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Η μεγαλύτερη επίδραση παρατηρείτε στο DDD στους 25 βαθμούς που η απόκριση τριπλασιάστηκε.



Εικόνα 3.9. Επίδραση θερμοκρασίας στη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης χωρίς κενό.





Εικόνα 3.10. Σύγκριση επίδρασης θερμοκρασίας με/χωρίς κενό για (α) το DDD, (β) το Lindan, (γ) το Endosulfan

### 3.7. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Σύμφωνα με τη βελτιστοποίηση της μεθόδου VAC-HSSPME όπως περιγράφηκε παραπάνω οι βέλτιστες συνθήκες που επιλέχθηκαν φαίνονται στο Πίνακα 3.8

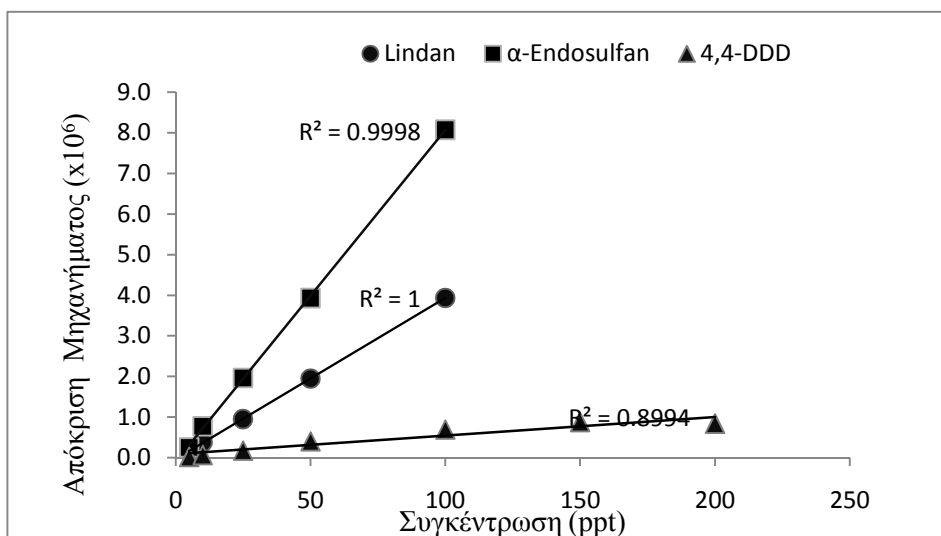


Πίνακας 3. 2 Βέλτιστες Συνθήκες Μεθόδου VAC-HSSPME.

Βέλτιστες Συνθήκες Μεθόδου Στερεάς Φάσης Μικροεκχύλισης υπό συνθήκες κενού	
Συγκέντρωση δείγματος	0.05ppb
Όγκος δείγματος (ml)	10 ml
Όγκος Δειγματοληπτικής φιάλης (ml)	1000ml
Χρόνος ανάδευσης (min)& Στροφές ανάδευσης (rpm)	10min/1400rpm
Χρόνος εκχύλισης (min) & Στροφές (rpm)	30min/ 1400rpm
Θερμοκρασία (°C)	35 °C
Ποσότητα NaCl (%w/v)	15%

Μελετήθηκε επίσης, η γραμμικότητα της μεθόδου για διαλύματα συγκέντρωσης 5, 10, 25, 50, 100 για το Lindan και το Endosulfan και επιπλέον 150 και 200 ppt για το 4,4-DDD. Ο συντελεστής συσχέτισης κυμαίνεται από 0.8994 έως 1 όπως φαίνεται και από το Πίνακα 3.8 οπότε η μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί γραμμική.

Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα, εκτελέστηκαν πέντε αναλύσεις στις βέλτιστες συνθήκες (Πίνακας 3.8) με διαλύματα συγκέντρωσης 10 ppt εμβολιασμένα με τις τρεις ενώσεις. Η επαναληψιμότητα εκφράστηκε ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD).



Εικόνα 3.11. Διάγραμμα γραμμικότητας βελτιστοποιημένης μεθόδου.

Πίνακας 3. 3 Γραμμικότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου Vac-HSSPME.

	Εύρος Συγκεντρώσεων (ppt)	Linearity ( $R^2$ )	RSD (%)
<b>Lindan</b>	5-100	1	2.2
<b>a-Endosulfan</b>	5-100	0.9998	1.6
<b>4,4-DDD</b>	5-200	0.8994	6.0

### 3.8. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΕΛΤΙΣΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (MATRIX EFFECTS)

Η βελτιστοποιημένη μέθοδος είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί σε πραγματικά δείγματα αφού η αποτελεσματικότητά της επηρεάζεται από τη σύνθεση της μήτρας που εξετάζεται. Για τις ανάγκες των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε νερό βρύσης από το εργαστηριακό χώρο και δείγματα από την εκροή της Δευτεροβάθμιας Επεξεργασίας του Βιολογικού Καθαρισμού των Χανίων. Τα χαρακτηριστικά τους φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1.

Αρχικά, έγινε ανάλυση των διάφορων μητρών και στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα επιμολυσμένα δείγματα και αναλύθηκαν. Υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) και η ανάκτηση (recovery) των ουσιών. Η ανάκτηση υπολογίστηκε από το πηλίκο της ποσότητας των οργανοχλωρωμένων ουσιών που αναλύθηκαν από GC-ECD στα πραγματικά δείγματα προς τη ποσότητα των ουσιών που αναλύθηκαν από το GC-ECD σε δις απιονισμένο νερό, πολλαπλασιασμένο με εκατό (100). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3. 4 Ποσοστά ανάκτησης ουσιών από νερό βρύσης και εκροή βιολογικού καθαρισμού Χανίων.

Ουσίες	Νερό βρύσης		Εκροή βιολογικού	
	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)
<b>Lindan</b>	1.2	100	3.6	60
<b>a-Endosulfan</b>	5.2	140	15.6	36
<b>4,4-DDD</b>	12.8	122	14.9	27

Τα δείγματα επιμολύνθηκαν με μίγμα των τριών οργανοχλωριωμένων ενώσεων και το τελικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 10 ppt. Οι αναλύσεις έγιναν στη δειγματοληπτική φιάλη των 1000ml, το δείγματα

αφέθηκαν να αναδεύονται για 10 λεπτά και η εκχύλιση διήρκησε 30 λεπτά. Η ανάδευση πραγματοποιήθηκε στις 1400 στροφές και η θερμοκρασία ήταν 35°C.

Παρατηρούμε ότι η ανάκτηση των ουσιών στα δείγματα από την εκροή του βιολογικού είναι πολύ χαμηλότερα από αυτήν στο νερό βρύσης. Η απομάκρυνση των προσμίξεων και ουσιών από τη δευτεροβάθμια επεξεργασία δεν επιτυγχάνει 100% απόδοση με αποτέλεσμα οι οργανοχλωριωμένες ουσίες να βρίσκουν μία πλούσια μήτρα με την οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να αντιδράσουν, μειώνοντας έτσι το ποσοστό των μορίων που μεταβαίνουν στην αέρια φάση και τελικά εκχυλίζονται.

### **3.9. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Η μέθοδος VAC-SPME αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε με σκοπό να αποτελέσει μία εναλλακτική λύση στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση οργανοχλωριωμένων ενώσεων αλλά και με περαιτέρω σκοπό την εξέλιξη και εφαρμογή αυτής της μεθόδου και σε άλλες ομάδες ενώσεων. Τα αποτελέσματα από τη παρούσα μελέτη είναι παραπάνω από ικανοποιητικά αφού σύμφωνα με αυτά όχι μόνο είναι λειτουργική αλλά περιλαμβάνει και όλα τα θετικά στοιχεία που είναι αναγκαία για να αποτελέσει ένα πρακτικό εργαλείο προσδιορισμού ρύπων που θα χρησιμοποιηθεί από τους αναλυτές. Η χρήση της VAC-SPME εμπεριέχει όλα τα πλεονεκτήματα της κλασσικής SPME, δηλαδή είναι οικονομική, περιβαλλοντικά φιλική και απλή αλλά επιπλέον μειώνει σημαντικά το χρόνο της πειραματικής διαδικασίας, εφαρμόζεται σε πολύ χαμηλότερες θερμοκρασίες γεγονός που ευνοεί τη μελέτη ενώσεων που αποσυντίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες, απαιτεί μικρό όγκο δείγματος και έχει μεγάλη ευαισθησία. Στον Πίνακα 3.5. φαίνονται οι βασικές παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για διάφορες ομάδες ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των οργανοχλωριωμένων ενώσεων, χρησιμοποιώντας τη τεχνική SPME. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των εργασιών αυτών με τη παρούσα μελέτη γίνεται σαφές ότι η μέθοδος αυτή είναι πιο ευαίσθητη, αφού τα αποτελέσματα είναι παρεμφερή (ίδιοι χρόνοι εκχύλισης με Chunzhou et al. 2005, Mmualefe et al. 2009) ή καλύτερα (μικρότερες θερμοκρασίες από το σύνολο των εργασιών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.9.).

Πίνακας 3. 5 Παράμετροι βελτιστοποίησης της τεχνικής SPME σε διάφορες μελέτες.

	Τεχνική Εκχύλισης	NaCl (w/v %)	Ανάδευση (rpm)	Όγκος Δεγμάτος (ml) / Όγκος φιάλης(ml)	Χρόνος (min)	Εκχύλισης	Θερμοκρασία Εκχύλισης (°C)
<b>Goncalves et al. 2002</b>	SPME	0	600 rev/min	3/A	60		60
<b>Chunzhou et al. 2005</b>	SPME	0	500	4/12	30		80
<b>You et al. 2006</b>	SPME	0	900	30/40	35		96
<b>Beceiro et al. 2007</b>	SPME	0	500	18/A	45		60
<b>Derouiche et al. 2007</b>	SPME	0	Λήφθηκε υπόψη	2/4	60		80
<b>Mmualefe et al. 2009</b>	SPME	10	300(max)	2/4	30		80

---

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Η Μικροεκχύλιση στερεάς-φάσης υπό συνθήκες κενού (VAC - SPME) αποδείχθηκε μία απλή και γρήγορη μέθοδος για το προσδιορισμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων Lindan, a-Endosulfan και 4,4-DDD από υδάτινα δείγματα. Η πρωτοποριακή αυτή μέθοδος βασίζεται στην πτητικότητα των ουσιών. Η ανάπτυξη κενού μειώνει τη διαλυτότητα των ουσιών, δηλαδή, αυξάνει την τάση διαφυγής τους στην αέρια φάση με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωσή τους στον υπερκείμενο χώρο και κατ' επέκταση και στην ίνα. Οι συνθήκες της μεθόδου ελέγχθησαν και οι παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν ήταν ο όγκος της δειγματοληπτικής φιάλης, ο όγκος του υδατικού δείγματος, η περιεκτικότητα σε NaCl, η ταχύτητα ανάδευσης, ο χρόνος εκχύλισης και η θερμοκρασία εκχύλισης. Επιπλέον, έγινε σύγκριση με την αντίστοιχη μέθοδο χωρίς τη χρήση κενού και τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικά όσον αφορά τις δυνατότητες που ανοίγονται για τη VAC-SPME. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βελτιστοποιημένη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί επίσης σε πραγματικά δείγματα και πιο συγκεκριμένα σε δείγματα από νερό βρύσης και έξοδο από τη Δευτεροβάθμια Επεξεργασία του Βιολογικού καθαρισμού των Χανίων. Η VAC-SPME είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος προετοιμασίας δείγματος που μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση μικροποσοτήτων ρυπαντών στο υδάτινο περιβάλλον.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Alpendurada M.F., 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis, *J. Chromatography A*. 889 3-14.

Archana J., Krishna K.V., 2011. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A Review, *Analytica Chimica Acta*. Article in Press.

Αντωνόπουλος Β.Ζ., 2001. Ποιότητα και ρύπανση υπόγειων νερών, *Εκδόσεις Ζήτη*, Θεσσαλονίκη.

Ανώνυμος, 1975. DDT: A Review of scientific and economic aspects of the decision to ban its use as a pesticide. *U.S. Environmental Protection Agency*, Washington DC 20460.

Ανώνυμος, 1980. Ambient water quality criteria for DDT. Office of Water Regulations and Standards Criteria and Standards Division, *U.S. Environmental Protection Agency*, Washington DC 20460.

Ανώνυμος. Endosulfan alpha. *U.S. Environmental Protection Agency*, Washington DC 20460.

Ανώνυμος II. Chemical and Physical Information. Ανακτήθηκε από <http://www.atsdr.cdc.gov>.

Beceiro-Gonzalez E., Concha-Grana E., Guimaraes A., Goncalves C., Muniategui-Lorenzo S., Alpendurada M.F., 2007. Optimisation and validation of solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography A*. 1141 165-173.

Che F.N., 2006. Τύχη μικρο-ποσοτήτων Endosulfan α- και β- στο νερό. *Πολυτεχνείο Κρήτης*, Χανιά.

Chunzhou D., Zhaorui Z., Ming Y., 2005. Determination of organochlorine pesticides and their derivations in water after HS-SPME using polymethylphenylvinylsiloxane- coated fiber by GC-ECD, *Water Research*, 4204-4210.

Γιαντζή Ε., 2007. Προσδιορισμός δισφαινόλης Α, οκτυλφαινόλης και νονυλφαινόλης σε υδατικά διαλύματα με χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα, *Πολυτεχνείου Κρήτης*, Χανιά.

Γιδάρacos Ε., 2006. Επικίνδυνα απόβλητα. *Εκδόσεις Ζυγός*, Θεσσαλονίκη.

Derouiche A., Driss M.R., Morizur J., Taphanel M.H., 2007. Simultaneous analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatography A*. 1138 231-243.

- Eisert R., J. Pawliszyn. 1997. New Trends in Solid-Phase Microextraction, *Analytical Chemistry*,103-135.
- Edwards D., 2002. Addendum to the Lindan 2002 registration eligibility decision (RED), case No. 315, U.S. *Environmental Protection Agency*.
- Goncalves C., Alpendurada M.F., 2002. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection. *J Chromatography A*. 968 177-190.
- Guardia M., Armenta S.,2011. *Coprehensive Analytical Chemistry Vol.57: Green Analytical Chemistry*, Wilsons & Wilsons.
- Gyorgy V., Vekey K., 2004. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *JMS*. 39 233-254.
- Key T., G. Reeves, 1994. Organochlorines in the environment and breast cancer. *BMJ*, Volume 308.
- Κίρλαππου Μ., 2004. Οι επιπτώσεις της ρύπανσης του περιβάλλοντος στη τροφική αλυσίδα: Η περίπτωση των παραμένων οργανικών ρύπων και των βαρέων μετάλλων. *Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο*, Αθήνα.
- Lambropoulou D.A., Albanis T.A., 2001.Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus in natural waters, *J. Chromatography A*. 922 243-255.
- Lambropoulou D.A., Albanis T.A., 2006. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis.
- Lord.H., Pawliszyn J., 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology, *J.Chromatography A*. 885 153-193.
- Magdic S., Pawliszyn J.B., 1996. Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction, *J. Chromatography A*. 723 111-122.
- McGregor D.B., 1998. Endosulfan. Ανακτήθηκε από <http://www.inchem.org>.
- Mc Nair H.M., Miller J.M., 2009. *Basic Gas Chromatography-Second Edition*, Wiley.

- Mmualefe L.C., Torto N., Huntsman-Mapila P., Mbongwe, 2009. Headspace solid phase microextraction in the determination of pesticides in water samples from the Okavango Delta with gas chromatography-electron capture detection and time-of-flight mass spectrometry. *Microchemical Journal* 91. 239-244.
- Μεκίνη Δ., 2004. Ανάπτυξη νέας μεθόδου ανάλυσης νιτροπολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε υδατικά δείγματα με χρήση μικροεκχύλισης υγρής και στερεής φάσης (LPM,SPME) – GC/MS και αποδόμηση αυτών με χρήση υπερήχων, *Πολυτεχνείου Κρήτης, Χανιά*.
- Nantel A.J., 2001. , Lindane. Ανακτήθηκε από <http://www.inchem.org>.
- Nishad P.N., 2006. Effects of Endosulfan on human beings, *National Institute of Technology, Calicut*.
- Oudejans J.H., 1991. Agro-pesticides: Properties and functions in integrated crop protection. *United Nations, Bangkok*.
- Pawliszyn J., 1997. Solid phase Microextraction, Theory and Practice. *Wiley-VCH*.
- Pawliszyn J., Pawliszyn B., Pawliszyn M., 1997. *The chemical Educator*, Vol. 2, No 4.
- Pawliszyn J., 2002. Comprehensive Analytical Chemistry Vol. XXXVII: Sampling and Sample Preparation for field and laboratory. *Elsevier Science*.
- Penalver A., Pocurull E., Borrull F., Marce R.M., 1999. Trends in solid-phase microextraction for determining organics pollutants in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 18, No. 8.
- Prichard E., 2003. Practical Laboratory Skills Training Guides: Gas Chromatography, *VAM*.
- Πολυράκης Γ.Θ., 2002. Περιβαλλοντική Γεωργία, *Εκδόσεις Ψυχαλού, Αθήνα*.
- Schnoor J.L., 1992. Fate of pesticides and chemicals in the environment. *John Wiley & Sons, Inc., Iowa*.
- Sewell P.A., 2003. II/Chromatography: Theory of Gas Chromatography, *Encyclopedia of Separation Science*, 558-566.
- Theodoridis G., Koster E.H.M., Jong G.J., 2000. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatography B*. 745 48-82.



Thomkins B.A., Barnard A.R., 2002. Determination of organochlorine pesticides in ground water using solid-phase microextraction followed by dual-column gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatography A*. 964 21-33.

Turusov V., V. Rakitsky, L. Tomatis, 2002. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence and Risks, *Environmental Health Perspectives*, Volume 110 No 2.

Χαραλαμπάκη Μ., 2004. Προσδιορισμός πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε υδατικά δείγματα με χρήση της τεχνικής LPME-GC/MS: εφαρμογή σε δείγματα εκροής από μονάδες βιολογικού καθαρισμού. *Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά*.

You. J., M.J. Lydy, 2006. Determination of pyrethroid, organophosphate and organochlorine pesticides in water by headspace solid-phase microextraction, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, Vol. 86, No. 6, 381-389.

Zambonin C.G., Aresta A., Torbent N., 2002. Analysis of organochlorine pesticides by solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, Vol. 82, No. 10, 651-657.