



## Διπλωματική Εργασία

---

«Ανάλυση οργανοχλωριωμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε δείγματα νερού και προϊόντων φρούτων με χρήση μικροεκχύλισης στερεάς φάσης με υπερκείμενη δειγματοληψία υπό συνθήκες κενού»



**Σοφία-Μαρία Μελά**

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Καθηγήτρια Ελευθερία Ψυλλάκη (Επιβλέπουσα)

Καθηγητής Νικόλαος Καλογεράκης

Δρ. Κωνσταντίνα Τυροβολά

Χανιά, Οκτώβριος 2018

### *Ευχαριστίες*

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2017-2018 στο εργαστήριο Υδατικής Χημείας της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Ελευθερία Ψυλλάκη για τη βοήθεια της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου για την πολύτιμη στήριξη και ηθική συμπαράσταση της όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

*Αφιερωμένη στον πατέρα μου*

## Περιεχόμενα

Περιεχόμενα Εικόνων .....	3
Περιεχόμενα Διαγραμμάτων .....	4
Περιεχόμενα Πινάκων .....	4
1. Περίληψη .....	5
Abstract .....	6
2. Εισαγωγή .....	7
2.1. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα .....	7
2.1.1. Ιστορική αναδρομή .....	7
2.1.2. Χρησιμοποιημένη ποσότητα .....	8
2.1.3. Ταξινόμηση φυτοπροστατευτικών προϊόντων .....	10
2.1.4. Επιπτώσεις στην υγεία .....	12
2.1.5. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις .....	13
2.1.6. Επίμονοι οργανικοί ρύποι .....	14
2.2. Οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα .....	17
2.2.1. Αναλυτική περιγραφή κατηγοριών των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων .....	18
2.2.2. Χαρακτηριστικά – Ιδιότητες – Τοξικότητα – Κατανομή και τύχη στο περιβάλλον .....	18
2.3. Ανάλυση δείγματος – Χρωματογραφία .....	24
2.3.1. Αέρια Χρωματογραφία .....	24
2.4. Εκχύλιση .....	27
2.4.1. Εκχύλιση υγρού-υγρού .....	27
2.4.2. Εκχύλιση στερεού-υγρού .....	27
2.4.3. Εκχύλιση στερεής φάσης .....	28
2.5. Μικροεκχύλιση .....	29
2.5.1. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Micro Extraction, SPME) 29	
3. Πειραματικό μέρος .....	42
3.1. Εργαστηριακός Εξοπλισμός .....	42
3.1.1. Αντιδραστήρια .....	42
3.1.2. Όργανα και συσκευές .....	42
3.2. Πειραματική διαδικασία .....	44

3.3. Ανάλυση με GC-ECD .....	45
4. Πειραματικά Αποτελέσματα και Συζήτηση .....	46
4.1. Προκαταρκτικές μελέτες .....	46
4.2. Βελτιστοποίηση της μεθόδου .....	46
4.2.1. Επίδραση της θερμοκρασίας.....	46
4.2.2. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης .....	49
5. Αξιολόγηση της μεθόδου.....	52
5.1. Γραμμικότητα.....	52
5.2. Επαναληψιμότητα .....	55
5.3. Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα .....	56
6. Συμπεράσματα.....	56
7. Βιβλιογραφία .....	56

## Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Οργανολογία του GC.....	25
Εικόνα 2: Σύστημα GC.....	26
Εικόνα 3: Πειραματική διάταξη της Direct SPME.....	31
Εικόνα 4: Δειγματοληψία HSSPME.....	32
Εικόνα 5: Απεικόνιση της HSSPME πειραματικής διάταξης και του μοντέλου των δύο στρωμάτων της διεπιφάνειας αέρα-νερού όπου $w$ , $g$ και $f$ είναι η υδατική φάση, η αέρια φάση και η φάση της SPME ίνας $C_g$ και $C_w$ είναι οι συγκεντρώσεις της αέριας και υδατικής φάσης αντίστοιχα.....	33
Εικόνα 6: Διάγραμμα χρόνου συναρτήσεως της μάζας που έχει εκχυλιστεί.....	34
Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση δύο πιθανών διαδικασιών εκχύλισης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Vac-HSSPME.....	35
Εικόνα 8: Εύρος τιμών σταθεράς Henry που σχετίζεται με την θέση της αντίστασης στους ρυθμούς εξάτμισης και την προβλεπόμενη επίδραση του κενού στη δειγματοληψία HSSPME νερού ή δειγμάτων που περιέχουν νερό.....	37
Εικόνα 9: Διαδικασία σχεδιασμού τροποποιημένου πώματος για φιαλίδιο που χρησιμοποιείται για Vac-HSSPME.....	43
Εικόνα 10: Πειραματική διάταξη για Regular HSSPME.....	44
Εικόνα 11: Πειραματική διάταξη για Vac-HSSPME.....	44

## Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα θερμοκρασίας για τη μέθοδο Vac-HSSPME.....	48
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα θερμοκρασίας για τη μέθοδο Regular HSSPME.....	49
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα χρόνου εκχύλισης για τη μέθοδο Vac-HSSPME.....	50
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα χρόνου εκχύλισης για τη μέθοδο Regular HSSPME.....	51
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα γραμμικότητας για τη μέθοδο Vac-HSSPME.....	52
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα γραμμικότητας για τη μέθοδο Regular HSSPME.....	54

## Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Πίνακας φυσικοχημικών ιδιοτήτων εξεταζόμενων ενώσεων.....	41
Πίνακας 2: Βέλτιστες συνθήκες Vac-HSSPME και Regular HSSPME.....	51
Πίνακας 3: Εξισώσεις ευθείας και συντελεστές συσχέτισης διαγράμματος γραμμικότητας για Vac-HSSPME.....	53
Πίνακας 4: Εξισώσεις ευθείας και συντελεστές συσχέτισης διαγράμματος γραμμικότητας για Regular HSSPME.....	54
Πίνακας 5: Τυπικό σφάλμα για Vacuum HSSPME.....	55
Πίνακας 6: Τυπικό σφάλμα για Regular HSSPME.....	55

## 1. Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι ερευνητές ασχολούνται με ένα θέμα μείζονος σημασίας που είναι η ρύπανση του περιβάλλοντος. Ειδικά ρύποι που απαντώνται σε μικρές συγκεντρώσεις είναι επικίνδυνοι όχι μόνο για το περιβάλλον και τα οικοσυστήματα, αλλά και για την υγεία των ανθρώπων. Η εργασία αυτή προτείνει τη χρήση της μεθόδου της μικροεκχύλισης στερεής φάσης με υπερκείμενη δειγματοληψία υπό συνθήκες κενού (vacuum assisted headspace solid phase microextraction: Vac-HSSPME) για την ανάλυση οργανοχλωριωμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει ταχεία εκχύλιση και ως διαδικασία είναι απλή και γρήγορη για να εφαρμοστεί καθώς απαιτεί και μικρούς όγκους δειγμάτων. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης. Οι βέλτιστες συνθήκες για την Vac-HSSPME και για την Regular HSSPME βρέθηκαν να είναι η θερμοκρασία των 55°C και χρόνο εκχύλισης βρέθηκε ότι για την Vac-HSSPME βέλτιστος ήταν αυτός των 30 λεπτών και για την Regular HSSPME αυτός των 45 λεπτών. Η μέθοδος έδειξε πολύ καλή γραμμικότητα τόσο σε συνθήκες κενού όσο και σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκε είναι 0,5-50 ng/L. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου κρίθηκε αρκετά καλή. Η μέθοδος Vac-HSSPME σε σχέση με την Regular HSSPME έχει υψηλότερη απόδοση εκχύλισης, μεγαλύτερη ευαισθησία και χρειάζεται μικρότερος χρόνος εκχύλισης για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα.

## Abstract

In recent years, more and more researchers have been dealing with the major issue of environmental pollution. In particular, pollutants occurring in small concentrations are dangerous not only for the environment and ecosystems, but also for human health. This study proposes the use of the headspace solid phase microextraction under vacuum conditions (vacuum assisted headspace solid phase microextraction: Vac-HSSPME) for the analysis of organochlorinated pesticides. This method achieves rapid extraction and as a process is simple and fast to apply as it requires small sample volumes. The parameters studied were temperature and extraction time. The optimum conditions for Vac-HSSPME and for Regular HSSPME were found to be the temperature of 55°C and optimum extraction time for Vac-HSSPME was found to be 30 minutes and for Regular HSSPME 45 minutes. The method showed very good linearity in both vacuum and atmospheric pressure conditions. The range of concentrations studied is 0,5-50 ng/L. The repeatability of the method was considered good too. The Vac-HSSPME method compared to Regular HSSPME has higher extraction efficiency, greater sensitivity and requires less extraction time to achieve the same result.

## 2. Εισαγωγή

### 2.1. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι ουσίες που προορίζονται να καταπολεμήσουν τα παράσιτα, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων. Γενικά, ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν είναι ένας χημικός ή βιολογικός παράγοντας που αποτρέπει, καταστρέφει, σκοτώνει ή με άλλο τρόπο αποθαρρύνει τα παράσιτα. Παρόλα τα οφέλη, μερικά έχουν επίσης μειονεκτήματα, όπως πιθανή τοξικότητα στον άνθρωπο και σε άλλα είδη.<sup>[1]</sup>

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) έχει ορίσει τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ως κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή ή τον έλεγχο κάθε επιβλαβούς οργανισμού, συμπεριλαμβανομένων των φορέων ασθενειών ανθρώπων ή ζώων, ανεπιθύμητων ειδών φυτών ή ζώων, που προκαλούν βλάβη κατά την παραγωγή, επεξεργασία, αποθήκευση, μεταφορά ή εμπορία τροφίμων, αγροτικών προϊόντων, ξύλου και προϊόντων ξύλου ή ζωοτροφών ή ουσιών που μπορούν να χορηγηθούν σε ζώα για τον έλεγχο εντόμων, αραχνοειδών ή άλλων παρασίτων. Ο όρος περιλαμβάνει ουσίες προοριζόμενες για χρήση ως ρυθμιστή ανάπτυξης φυτών, αποφυλλωτικό, ξηραντικό ή την πρόληψη της πρόωρης πτώσης των καρπών. Χρησιμοποιούνται επίσης ως ουσίες που εφαρμόζονται στις καλλιέργειες πριν ή μετά τη συγκομιδή για την προστασία του εμπορεύματος από την υποβάθμιση κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά.<sup>[2]</sup>

#### 2.1.1. Ιστορική αναδρομή

Πριν ακόμα από το 2000 π.Χ. οι άνθρωποι έχουν χρησιμοποιήσει φυτοπροστατευτικά προϊόντα για την προστασία των καλλιεργειών τους. Το πρώτο γνωστό ήταν στοιχειακό σκόνισμα θείου που χρησιμοποιήθηκε στην αρχαία Σουμερία περίπου 4.500 χρόνια πριν στην αρχαία Μεσοποταμία. Το Rig Veda, το οποίο έχει ηλικία περίπου 4.000 ετών, αναφέρει τη χρήση δηλητηριωδών φυτών για έλεγχο παρασίτων.<sup>[3]</sup> Μέχρι τον 15ο αιώνα, τοξικές χημικές ουσίες όπως το αρσενικό, ο υδράργυρος και ο μόλυβδος εφαρμόστηκαν στις καλλιέργειες για να σκοτώσουν τα παράσιτα. Τον 17ο αιώνα, η θειική νικοτίνη εξήχθη από φύλλα καπνού για χρήση ως εντομοκτόνο. Ο 19ος αιώνας είδε την εισαγωγή δύο ακόμη φυσικών ζιζανιοκτόνων, πυρεθρού, που προέρχεται από χρυσάνθεμα, και της ροτενόνης, η οποία προέρχεται από τις ρίζες των τροπικών λαχανικών.<sup>[4]</sup> Μέχρι τη δεκαετία του 1950, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα με βάση το αρσενικό κυριαρχούσαν.<sup>[5]</sup> Ο Paul Müller ανακάλυψε ότι το DDT ήταν ένα πολύ αποτελεσματικό εντομοκτόνο. Τα οργανοχλωρίδια όπως το DDT ήταν κυρίαρχα, αλλά αντικαταστάθηκαν στις Η.Π.Α.



από οργανοφωσφορικά και καρβαμικά από το 1975. Έκτοτε, οι ενώσεις πυρεθρίνης έχουν καταστεί το κυρίαρχο εντομοκτόνο.<sup>[5]</sup> Η χρήση ζιζανιοκτόνων ήταν συνηθισμένη στη δεκαετία του 1960, με επικεφαλής την τριαζίνη και άλλες ενώσεις με βάση το άζωτο, καρβοξυλικά οξέα όπως το 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ και το glyphosate.

Η πρώτη νομοθεσία που θέσπισε ομοσπονδιακή αρχή για τη ρύθμιση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων τέθηκε σε ισχύ το 1910,<sup>[6]</sup> ωστόσο δεκαετίες αργότερα κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1940 οι κατασκευαστές άρχισαν να παράγουν μεγάλα ποσά συνθετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων και η χρήση τους έγινε ευρέως διαδεδομένη.<sup>[7]</sup> Ορισμένες πηγές θεωρούν ότι η δεκαετία του 1940 και του 1950 ήταν η αρχή της εποχής των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.<sup>[8]</sup> Αν και η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ ιδρύθηκε το 1970 και οι τροποποιήσεις του νόμου για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα το 1972, η χρήση τους αυξήθηκε 50 φορές από το 1950 και 2,3 εκατομμύρια τόνοι βιομηχανικών παρασιτοκτόνων χρησιμοποιούνται κάθε χρόνο.<sup>[4]</sup> Το 75% όλων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στον κόσμο χρησιμοποιείται στις ανεπτυγμένες χώρες, αλλά η χρήση τους στις αναπτυσσόμενες χώρες αυξάνεται.<sup>[9]</sup> Μια μελέτη των τάσεων χρήσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων των ΗΠΑ μέχρι το 1997 δημοσιεύθηκε από το Κέντρο για την Ολοκληρωμένη Διαχείριση των Παρασίτων του Εθνικού Ιδρύματος Επιστημών.<sup>[5,10]</sup>

Στη δεκαετία του 1960, ανακαλύφθηκε ότι το DDT εμποδίζει την αναπαραγωγή πολλών πουλιών που καταναλώνουν ψάρια, γεγονός που αποτελεί σοβαρή απειλή για τη βιοποικιλότητα. Η Rachel Carson έγραψε το best-selling βιβλίο *Silent Spring* για τη βιολογική μεγέθυνση. Η γεωργική χρήση του DDT απαγορεύεται πλέον σύμφωνα με τη Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους επίμονους οργανικούς ρύπους, αλλά εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες για την πρόληψη της ελονοσίας και άλλων τροπικών ασθενειών με ψεκασμό σε εσωτερικούς τοίχους για να σκοτώνουν ή να απωθούν τα κουνούπια.<sup>[11]</sup>

### 2.1.2. Χρησιμοποιημένη ποσότητα

Το 2006 και το 2007, ο κόσμος χρησιμοποίησε περίπου 2,4 megatons φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ενώ τα ζιζανιοκτόνα αντιπροσωπεύουν το 40% της παγκόσμιας χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ακολουθούμενα από εντομοκτόνα (17%) και μυκητοκτόνα (10%). Το 2006 και το 2007, οι ΗΠΑ χρησιμοποίησαν περίπου 0,5 megatons φυτοπροστατευτικών προϊόντων, που αντιστοιχούσαν στο 22% του παγκόσμιου συνόλου, συμπεριλαμβανομένων των 857 εκατομμυρίων λιρών συμβατικών φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται στον αγροτικό τομέα (80% της συμβατικής χρήσης) καθώς και στους βιομηχανικούς, εμπορικούς, κυβερνητικούς και οικιακούς και κήπους.<sup>[12,13]</sup>

Για την παγκόσμια αγορά προϊόντων φυτοπροστασίας, οι αναλυτές της αγοράς προβλέπουν έσοδα άνω των 52 δισ. Δολαρίων το 2019.<sup>[14]</sup>

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων έχει υποχωρήσει συνολικά από το 2007. Είναι ένα θετικό σημάδι για τη μείωση της ρύπανσης από φυτοπροστατευτικά προϊόντα παγκοσμίως. Παρόλα αυτά, πρέπει να γνωρίζουμε την πιθανή αναζωπύρωση της κατάχρησης τους στο μέλλον. Δεδομένου ότι η ανάπτυξη της οικονομίας στις αναπτυσσόμενες χώρες, ο κίνδυνος απότομης αύξησης της χρήσης τους στις χώρες αυτές μπορεί να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια. Η διατήρηση ή η ενίσχυση της φθίνουσας τάσης της χρήσης φυτοφαρμάκων σε μεγάλες χώρες εξακολουθεί να είναι ένα δύσκολο έργο. Από την άλλη πλευρά, η ίδια ποσότητα χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων μπορεί να έχει διαφορετικό ισοδύναμο ρύπανσης για διαφορετικές χώρες λόγω της πολύπλοκης σύνθεσης των ποικιλιών τους. Γενικά, οι ανεπτυγμένες χώρες τείνουν να χρησιμοποιούν χαμηλής τοξικότητας ζιζανιοκτόνα και βιο-παρασιτοκτόνα και οι αναπτυσσόμενες χώρες τείνουν να χρησιμοποιούν τοξικά χημικά εντομοκτόνα. Πρέπει να αποφεύγεται η κατάχρηση όταν γίνεται άμεση σύγκριση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων μεταξύ δύο χωρών.

Οι γενικές εργασίες για τη μείωση της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων και της ρύπανσης περιλαμβάνουν:

- 1) Ανάπτυξη ιδιαίτερα αποτελεσματικών, χαμηλών τοξικών και χαμηλών υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ιδιαίτερα βιοπαρασιτοκτόνων. Μείγμα παρασιτοκτόνων, ως στρατηγική διαχείρισης της αντίστασης, καθώς και ένα μέτρο μείωσης της ρύπανσης, μπορούν επίσης να διερευνηθούν.
- 2) Ελαχιστοποίηση της χρήσης χημικών παρασιτοκτόνων, αύξηση της χρήσης βιο-παρασιτοκτόνων, εφαρμογή ολοκληρωμένης διαχείρισης επιβλαβών οργανισμών (IPM), προστασία φυσικών εχθρών και βιοποικιλότητας και μεγιστοποίηση του ρόλου της φυσικής ισορροπίας.
- 3) Προώθηση της ακριβείας χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων, μείωση των φαινομένων εκτός στόχου.
- 4) Εντατικοποίηση των προσπάθειών εποπτείας, διαχείρισης και τυποποίησης της παραγωγής, της διανομής και της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων.
- 5) Να ενισχυθεί περαιτέρω η νομοθεσία και η κανονιστική ρύθμιση της παραγωγής και της χρήσης φυτοφαρμάκων, για παράδειγμα, να εφαρμοστεί η καταχώριση και η διαχείριση των αγορών και της χρήσης φυτοφαρμάκων.
- 6) Να ενισχυθεί η εκπαίδευση των γεωργών όσον αφορά τη χρήση φυτοφαρμάκων και να βελτιωθεί η συνειδητοποίηση και η αίσθηση της προστασίας του περιβάλλοντος. <sup>[15]</sup>

### 2.1.3. Ταξινόμηση φυτοπροστατευτικών προϊόντων

1) Ταξινόμηση με βάση την **προέλευση** των φυτοπροστατευτικών προϊόντων:

- ❖ Χημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα
- ❖ Βιολογικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Τα χημικά εντομοκτόνα χωρίζονται περαιτέρω σε τέσσερις τύπους με βάση την προέλευσή τους:

- Οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα
- Καρβαμικά άλατα
- Οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα
- Πυρεθροειδή εντομοκτόνα

#### Οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα:

Αυτά είναι τα χημικά που παράγονται λόγω της αντίδρασης μεταξύ φωσφορικού οξέος και αλκοολών. Αυτό επηρεάζει το νευρικό σύστημα αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Αυτό προκαλεί μη αναστρέψιμη απόφραξη που οδηγεί σε συσσώρευση του ενζύμου που έχει ως αποτέλεσμα την υπερδιέγερση των μυών. Αυτά περιλαμβάνουν κυρίως εντομοκτόνα, νευρικά αέρια, ζιζανιοκτόνα κ.λπ.

#### Καρβαμικά άλατα:

Αυτοί είναι εστέρες καρβαμικών οξέων. Ο τρόπος δράσης αναστέλλει την ακετυλοχολινεστεράση παρόμοια με εκείνη των οργανοφωσφορικών ενώ ο δεσμός που σχηματίζεται για αναστολή είναι λιγότερο ανθεκτικός και συνεπώς αναστρέψιμος. Περιλαμβάνουν κυρίως εντομοκτόνα.

#### Οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα:

Αυτά προέρχονται από χλωριωμένους υδρογονάνθρακες. Αυτοί είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες που επηρεάζουν τα ορμονικά συστήματα του σώματος, δρουν ως αντίγραφα κανονικών ορμονών και προκαλούν έτσι δυσμενή προβλήματα υγείας. Παραμένουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, σπάζοντας αργά και συσσωρεύοντας τους λιπώδεις ιστούς των ζώων. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα είναι το DDT (διχλωροδιφαινυλ-τριχλωροαιθάνιο).

#### Πυρεθροειδή εντομοκτόνα:

Αυτά είναι ισχυρά ουδέτερα δηλητήρια, προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές και παράλυση. Τα πυρεθροειδή είναι μια συνθετική μορφή πυρεθρίνης, ενός φυσικού εντομοκτόνου. Έχουν παρόμοια χημική δομή και παρόμοιο τρόπο δράσης με την πυρεθρίνη που προέρχεται από χρυσάνθεμο. Αυτά είναι παράγωγα των

κετοαλκοολικών εστέρων του χρυσάνθρακα και των πυρεθροϊκών οξέων και είναι πιο σταθερά στο ηλιακό φως από ό, τι οι πυρεθρίνες. Αυτά είναι τα πιο δημοφιλή εντομοκτόνα, καθώς μπορούν εύκολα να περάσουν από το εξωσκληρωτό του εντόμου. Μερικά παραδείγματα είναι η δελταμεθρίνη, η κυπερμεθρίνη κλπ. <sup>[16]</sup>

Τα βιολογικά παρασιτοκτόνα είναι υλικά που απαντώνται φυσικά ή προέρχονται από φυσικούς οργανισμούς ή τους μεταβολίτες τους, όπως βακτήρια, μύκητες, φυτά κλπ. Αυτά ταξινομούνται σε τρεις κύριες ομάδες:

- Μικροβιακά εντομοκτόνα
- Βιοχημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα
- Φυτοπροστατευτικά εντομοκτόνα

#### Μικροβιακά εντομοκτόνα:

Αυτά έχουν μικροοργανισμούς που δρουν ως ελεγκτές παρασίτων όπως βακτηρίδια, μύκητες ή ιούς. Κάθε ένα από αυτά περιέχει έναν συγκεκριμένο στόχο. Τα στελέχη *Bacillus Thuringensis* ή Bt και τα υποείδη του χρησιμοποιούνται ευρέως. Ο τρόπος δράσης γενικά δημιουργεί μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται με τον υποδοχέα των προνυμφών που λιπαίνει τις προνύμφες.

#### Βιοχημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα:

Είναι φυσικοί, μη τοξικοί ελεγκτές παρασίτων. Αυτές περιλαμβάνουν φερομόνες, φυσικούς ρυθμιστές φυτών και εντόμων, ένζυμα, βιο-απωθητικά ή προσελκυστικά.

#### Φυτοπροστατευτικά εντομοκτόνα:

Αυτές οι ουσίες προέρχονται φυσικά από φυτά, αλλά το γονίδιο που απαιτείται για την παραγωγή τους εισάγεται στο φυτό μέσω της γενετικής μηχανικής. <sup>[16]</sup>

### 2) Ταξινόμηση με βάση τους **στόχους** που ελέγχουν:

- ✓ Εντομοκτόνα: δρουν ειδικά στα έντομα
- ✓ Φυκοκτόνα: ελέγχουν ή σκοτώνουν την ανάπτυξη των φυκών
- ✓ Ζιζανιοκτόνα: ελέγχουν ή σκοτώνουν τα ζιζάνια
- ✓ Βακτηριοκτόνα: δρουν ενάντια στα βακτηρίδια
- ✓ Μυκητοκτόνα: δρουν ενάντια στους μύκητες
- ✓ Ροντοκτόνα (ποντικοφάρμακα): σκοτώνουν ή αποτρέπουν τρωκτικά, δηλαδή αρουραίους ή ποντίκια
- ✓ Νυμφοκτόνα: αναστέλλουν την ανάπτυξη των προνυμφών
- ✓ Απωθητικά: απωθούν τους στόχους από τη γεύση ή τη μυρωδιά των φυτών

- ✓ Αποξηραντικά: δρουν στα φυτά στεγνώνοντας τους ιστούς τους
- ✓ Ωοκτόνα: αναστέλλουν την ανάπτυξη των αυγών των εντόμων και των ακάρεων
- ✓ Ιοκτόνα: δρουν ενάντια στους ιούς
- ✓ Μαλακιοκτόνα: αναστέλλουν ή καταστρέφουν τα μαλάκια όπως το σαλιγκάρι
- ✓ Ακαρεοκτόνα: σκοτώνουν αραχνίδες όπως τα ακάρεα
- ✓ Νηματοκτόνα: έχουν την τάση να σκοτώνουν νηματώδη που δρουν ως παράσιτα φυτών
- ✓ Πτηνοκτόνα: αυτά χρησιμοποιούνται για να σκοτώσουν τα πουλιά
- ✓ Σκωροκτόνα (ναφθαλίνη): χρησιμοποιούνται για να σταματήσουν τυχόν ζημιές στα υφάσματα από τις προνύμφες σκώρων ή μούχλα
- ✓ Νυμφοκτόνα: αυτά έχουν σχεδιαστεί για να στοχεύουν τις προνύμφες των μυρμικών που είναι ψαροκόκαλα όπως τα σπονδυλωτά στον ποταμό
- ✓ Ιχθυοκτόνα: είναι ουσίες που δρουν ενάντια στα ψάρια <sup>[16]</sup>

### 3) Ταξινόμηση με βάση το είδος των φυτοπροστατευτικών προϊόντων:

Η σύνθεση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων αποτελείται από ένα μείγμα του δραστικού συστατικού και των ανόργανων συστατικών. Τα ενεργά συστατικά είναι χημικά που αποσκοπούν στον έλεγχο των στόχων, ενώ τα αδρανή συστατικά (όπως νερό, διαλύτης πετρελαίου, παράγοντες διαβροχής, διασκορπιστές, αυτοκόλλητα, επεκτάσεις) είναι ασφαλέστερα, αποτελεσματικότερα και ευκολότερα στη μέτρηση, είναι επίσης πιο βολικά στο χειρισμό. Τα σκευάσματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων μπορούν να χωριστούν σε τρεις κύριους τύπους: 1) στερεά, 2) υγρά ή 3) αέρια. Κάποια σκευάσματα είναι έτοιμα για χρήση, ενώ άλλα χρειάζονται περαιτέρω αραιώση με νερό ή με διαλύτη με βάση το πετρέλαιο ή με αέρα πριν από την εφαρμογή τους. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μορφές παρατίθενται παρακάτω:

- Υγρή μορφή
- Μορφή πούδρας
- Μορφή κόκκων
- Δολώματα
- Μορφή σκόνης
- Μορφή υγρού εξαιρετικά χαμηλής περιεκτικότητας <sup>[17]</sup>

#### 2.1.4. Επιπτώσεις στην υγεία

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ενδέχεται να προκαλέσουν οξεία και καθυστερημένη επίδραση στην υγεία σε άτομα που εκτίθενται. <sup>[18]</sup>

Η έκθεση σε αυτά μπορεί να προκαλέσει ποικίλες επιπτώσεις στην υγεία, που κυμαίνονται από τον απλό ερεθισμό του δέρματος και των ματιών έως τις πιο

σοβαρές επιδράσεις, όπως στο νευρικό σύστημα, οι μιμικές ορμόνες που προκαλούν προβλήματα αναπαραγωγής αλλά ακόμα και καρκίνο.<sup>[19]</sup> Σύμφωνα με μία συστηματική ανασκόπηση του 2007 διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες μελέτες για το non-Hodgkin λέμφωμα και τη λευχαιμία έδειξαν θετικές συσχετίσεις με την έκθεση σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η χρήση καλλυντικών παρασιτοκτόνων θα πρέπει να μειωθεί.<sup>[20]</sup> Υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις συσχετίσεων μεταξύ έκθεσης οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και αλλαγών στο νευρικό σύστημα.<sup>[21,22,23,24]</sup> Υπάρχουν επίσης περιορισμένα στοιχεία για άλλες αρνητικές συνέπειες από την έκθεση σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των νευρολογικών, γενετικών ελαττωμάτων και θανάτου εμβρύων.<sup>[25]</sup>

Λόγω ανεπαρκούς ρύθμισης και προληπτικών μέτρων ασφαλείας, το 99% των θανάτων που σχετίζονται με φυτοπροστατευτικά προϊόντα συμβαίνουν στις αναπτυσσόμενες χώρες που αντιπροσωπεύουν μόλις το 25% της χρήσης φυτοφαρμάκων.<sup>[26]</sup>

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και το Πρόγραμμα Περιβάλλοντος του ΟΗΕ εκτιμούν ότι κάθε χρόνο 3 εκατομμύρια εργαζόμενοι στη γεωργία στον αναπτυσσόμενο κόσμο αντιμετωπίζουν σοβαρή δηλητηρίαση από φυτοπροστατευτικά προϊόντα, εκ των οποίων περίπου 18.000 πεθαίνουν.<sup>[18]</sup> Σύμφωνα με μια μελέτη, περίπου 25 εκατομμύρια εργαζόμενοι στις αναπτυσσόμενες χώρες ενδέχεται να υποφέρουν από ήπια δηλητηρίαση από φυτοπροστατευτικά προϊόντα ετησίως.<sup>[27]</sup> Υπάρχουν διάφορα επαγγέλματα εκτός από τη γεωργία, τα οποία ενδέχεται επίσης να θέσουν τα άτομα σε κίνδυνο με επιπτώσεις στην υγεία από την έκθεση σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα, περιλαμβανομένων των περιποιητών ζώων, των κηπουρών κ.ά.<sup>[53]</sup>

#### 2.1.5. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων εγείρει ορισμένες περιβαλλοντικές ανησυχίες. Πάνω από το 98% των ψεκασμένων εντομοκτόνων και 95% των ζιζανιοκτόνων φτάνουν σε άλλο προορισμό εκτός από τα είδη-στόχους τους, συμπεριλαμβανομένων των μη στοχευόμενων ειδών, του αέρα, του νερού και του εδάφους.<sup>[9]</sup> Τα σωματίδια των φυτοπροστατευτικών προϊόντων παρασύρονται και μεταφέρονται από τον άνεμο σε άλλες περιοχές, τις οποίες ενδεχομένως ρυπαίνουν. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αποτελούν μία από τις αιτίες της ρύπανσης των υδάτων και ορισμένα από αυτά είναι επίμονοι οργανικοί ρύποι και συμβάλλουν στη ρύπανση του εδάφους.

Επιπλέον, η χρήση τους μειώνει τη βιοποικιλότητα, συμβάλλει στην κάμψη των επικονιαστών,<sup>[29]</sup> καταστρέφει τους βιότοπους (ειδικά για τα πτηνά)<sup>[30]</sup> και απειλεί τα υπό εξαφάνιση είδη.<sup>[9]</sup>

Προκειμένου να μειωθούν οι αρνητικές συνέπειες, επιθυμητό είναι τα εντομοκτόνα να αποικοδομούνται ή τουλάχιστον να απενεργοποιούνται γρήγορα στο

περιβάλλον. Αυτή η απώλεια δραστηριότητας ή τοξικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων οφείλεται τόσο στις έμφυτες χημικές ιδιότητες των ενώσεων όσο και στις περιβαλλοντικές διεργασίες ή συνθήκες.<sup>[31]</sup> Για παράδειγμα, η παρουσία αλογόνων μέσα σε μια χημική δομή συχνά επιβραδύνει την αποικοδόμηση σε ένα αερόβιο περιβάλλον.<sup>[32]</sup> Η προσρόφηση στο έδαφος μπορεί να επιβραδύνει την κίνηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, αλλά μπορεί επίσης να μειώσει τη βιοδιαθεσιμότητα σε μικροβιακούς αποικοδομητές.<sup>[33]</sup>

#### 2.1.6. Επίμονοι οργανικοί ρύποι

Οι επίμονοι οργανικοί ρύποι (POPs) είναι τοξικές χημικές ουσίες που επηρεάζουν δυσμενώς την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον σε όλο τον κόσμο. Επειδή μπορούν να μεταφερθούν με τον άνεμο και το νερό, οι περισσότεροι οργανικοί ρύποι που παράγονται σε μια χώρα μπορούν και επηρεάζουν τους ανθρώπους και την άγρια φύση μακριά από το σημείο όπου χρησιμοποιούνται και απελευθερώνονται. Παραμένουν για μεγάλες χρονικές περιόδους στο περιβάλλον και μπορούν να συσσωρευτούν και να περάσουν από το ένα είδος στο άλλο μέσω της τροφικής αλυσίδας. Για να αντιμετωπιστεί αυτή η παγκόσμια ανησυχία, οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής ένωσαν τις δυνάμεις τους με άλλες 90 χώρες και την Ευρωπαϊκή Κοινότητα για να υπογράψουν μια πρωτοποριακή συνθήκη των Ηνωμένων Εθνών στη Στοκχόλμη της Σουηδίας τον Μάιο του 2001. Σύμφωνα με τη Συνθήκη, η οποία είναι γνωστή ως Σύμβαση της Στοκχόλμης, οι χώρες συμφώνησαν να μειώσουν ή να εξαλείψουν την παραγωγή, τη χρήση ή / και την απελευθέρωση 12 βασικών POPs και προσδιόρισαν σύμφωνα με τη Σύμβαση μια επιστημονική διαδικασία αναθεώρησης που οδήγησε στην προσθήκη και άλλων επίμονων οργανικών ρύπων στη λίστα με τους ρύπους παγκόσμιας σημασίας.

Αν και τα πιο ανεπτυγμένα έθνη έχουν αναλάβει ισχυρή δράση για τον έλεγχο των POPs, ένας μεγάλος αριθμός αναπτυσσόμενων εθνών έχουν αρχίσει μόλις πρόσφατα να περιορίζουν την παραγωγή, τη χρήση και την απελευθέρωσή τους.

Η Σύμβαση της Στοκχόλμης προσθέτει μια σημαντική παγκόσμια διάσταση στις εθνικές και περιφερειακές προσπάθειές μας για τον έλεγχο των POPs. Για παράδειγμα, η EPA και τα κράτη έχουν μειώσει σημαντικά την απελευθέρωση διοξινών και φουρανίων στη γη, τον αέρα και το νερό από τις πηγές των ΗΠΑ. Εκτός από την αξιολόγηση των διοξινών, η EPA ασχολείται επίσης επιμελώς με τη μείωση του DDT από παγκόσμιες πηγές. Οι ΗΠΑ και ο Καναδάς υπέγραψαν συμφωνία για την εικονική εξάλειψη των ανθεκτικών τοξικών ουσιών για τη μείωση των εκπομπών από τοξικές ουσίες. Οι ΗΠΑ υπέγραψαν επίσης το περιφερειακό πρωτόκολλο της Οικονομικής Επιτροπής των Ηνωμένων Εθνών για την Ευρώπη για τους POPs στο πλαίσιο της σύμβασης για τη διασυννοριακή ατμοσφαιρική ρύπανση.

Πολλοί POPs χρησιμοποιήθηκαν ευρέως κατά τη διάρκεια της έκρηξης της βιομηχανικής παραγωγής μετά τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο, όταν χιλιάδες συνθετικές χημικές ουσίες εισήχθησαν σε εμπορική χρήση. Πολλές από αυτές τις

χημικές ουσίες αποδείχθηκαν ευεργετικές στην καταπολέμηση παρασίτων και ασθενειών στην καλλιέργεια και στη βιομηχανία. Ωστόσο, τα ίδια χημικά προϊόντα είχαν απρόβλεπτες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον.

Μια σημαντική ώθηση για τη Σύμβαση της Στοκχόλμης ήταν η διαπίστωση ρύπανσης με POPs σε σχετικά παρθένες περιοχές της Αρκτικής, δηλαδή χιλιάδες μίλια από οποιαδήποτε γνωστή πηγή. Μεγάλο μέρος των στοιχείων για τη μεταφορά σε μεγάλες αποστάσεις αερίων και σωματιδιακών ουσιών στις ΗΠΑ επικεντρώνεται στη σκόνη ή τον καπνό επειδή είναι ορατά σε δορυφορικές εικόνες. Η ανίχνευση της κίνησης των περισσότερων POPs στο περιβάλλον είναι περίπλοκη, επειδή αυτές οι ενώσεις μπορούν να υπάρχουν σε διαφορετικές φάσεις (π.χ. ως αέριο ή προσαρτημένες σε σωματίδια που εκπέμπονται στον αέρα) και μπορούν να ανταλλάσσονται μεταξύ περιβαλλοντικών μέσων. Για παράδειγμα, ορισμένοι POPs μπορούν να μεταφερθούν για πολλά μίλια όταν εξατμίζονται από το νερό ή τις επιφάνειες γης στον αέρα, ή όταν προσροφώνται σε αιωρούμενα σωματίδια. Στη συνέχεια, μπορούν να επιστρέψουν στη Γη με σωματίδια ή με χιόνι, βροχή ή ομίχλη. Οι οργανικοί ρύποι μετακινούνται επίσης μέσω ωκεανών, ποταμών, λιμνών και σε μικρότερο βαθμό, με τη βοήθεια φορέων ζώων, όπως τα μεταναστευτικά είδη.

Μελέτες έχουν συνδέσει τις εκθέσεις POPs με μειώσεις, ασθένειες ή ανωμαλίες σε ορισμένα είδη άγριας πανίδας, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων ειδών ψαριών, πτηνών και θηλαστικών. Η άγρια φύση μπορεί επίσης να λειτουργήσει ως φρουρός για την ανθρώπινη υγεία: ανωμαλίες ή μειώσεις που εντοπίζονται σε πληθυσμούς άγριων ζώων μπορεί να ακούγεται ένα κουδούνι έγκαιρης προειδοποίησης για τους ανθρώπους.

Στα άτομα, οι αναπαραγωγικές, αναπτυξιακές, συμπεριφορικές, νευρολογικές, ενδοκρινικές και ανοσολογικές επιπτώσεις στην υγεία έχουν συνδεθεί με τους POPs. Οι άνθρωποι εκτίθενται κυρίως σε POPs μέσω ρυπασμένων τροφίμων. Οι λιγότερο συνήθεις οδοί έκθεσης περιλαμβάνουν το πόσιμο ρυπασμένο νερό και την άμεση επαφή με τα χημικά. Στους ανθρώπους και σε άλλα θηλαστικά, οι POPs μπορούν να μεταφερθούν μέσω του πλακούντα και του μητρικού γάλακτος στην ανάπτυξη των απογόνων.<sup>[34]</sup>

Η σύμβαση της Στοκχόλμης για τους επίμονους οργανικούς ρύπους, η οποία εγκρίθηκε το 2001 και τέθηκε σε ισχύ το 2004, είναι μια παγκόσμια συνθήκη που αποσκοπεί στη διαφύλαξη της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος από πολύ επιβλαβείς χημικές ουσίες που παραμένουν στο περιβάλλον και επηρεάζουν την ευημερία των ανθρώπων καθώς και των άγριων ζώων. Η Σύμβαση απαιτεί από τα μέρη να εξαλείψουν και / ή να μειώσουν τους POPs, οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν καταστροφικές επιπτώσεις όπως είναι ο καρκίνος και η μειωμένη νοημοσύνη και να έχουν τη δυνατότητα να ταξιδεύουν σε μεγάλες αποστάσεις.

Η Σύμβαση της Στοκχόλμης διοικείται από το Πρόγραμμα των Ηνωμένων Εθνών για το Περιβάλλον και η Γραμματεία της εδρεύει στη Γενεύη της Ελβετίας. Η Συνδιάσκεψη των Ηνωμένων Εθνών ή η Διάσκεψη των Συμβαλλομένων Μερών της Σύμβασης της Στοκχόλμης διέπει τη Σύμβαση για τους POPs, με τα μέλη της να είναι τα Μέρη της Συνέλευσης.

Ο ρόλος των μερών είναι η εφαρμογή των υποχρεώσεων της σύμβασης,



συμπεριλαμβανομένης της εξάλειψης ή του περιορισμού της παραγωγής και χρήσης των σκόπιμα παραγόμενων POPs, της απαγόρευσης και της εξάλειψης της παραγωγής και χρήσης ή εισαγωγής POPs, η διεξαγωγή έρευνας, ο εντοπισμός περιοχών ρυπασμένων με POPs.<sup>[34]</sup>

“The dirty dozen”

1. Aldrin
2. Dieldrin
3. Chlordane
4. DDT
5. Endrin
6. Mirex
7. Heptachlor
8. Hexachlorobenzene
9. PCBs
10. Toxaphene
11. Dioxins
12. Furans

Παρόλο που η Συνέλευση αρχικά επικεντρώθηκε σε 12 χημικά προϊόντα που παράγονται σκόπιμα και ακούσια (βλ. παραπάνω), η Συνέλευση άρχισε να προσθέτει και άλλες ουσίες στη συμφωνία τον Μάιο του 2009 και θα συνεχίσει να το κάνει.<sup>[34]</sup>

## 2.2. Οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Τα οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (ή χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες) είναι ουσίες στις οποίες το χλώριο συνδέεται χημικά με τον άνθρακα. Οι περισσότερες είναι τοξικές, πολύ σταθερές και έχουν την τάση να συσσωρεύονται στους ζωντανούς οργανισμούς, ιδιότητες που τις κάνουν να είναι οι πιο επικίνδυνες χημικές ουσίες στις οποίες μπορούν να εκτεθούν τα φυσικά συστήματα.<sup>[35]</sup>

Υπάρχουν περίπου 11.000 οργανοχλωριωμένες ενώσεις, από τις οποίες ελάχιστες απαντώνται στη φύση. Η μεγάλη πλειοψηφία τους παράγεται μέσω των βιομηχανικών διεργασιών, είτε πρωτογενώς με τη μορφή προϊόντων και υποπροϊόντων της παραγωγικής διαδικασίας, είτε δευτερογενώς μέσα από τυχαίες χημικές αντιδράσεις στο ευρύτερο περιβάλλον. Όπως αναφέρθηκε η μεγάλη πλειοψηφία των οργανοχλωριωμένων ενώσεων δεν υπάρχει στη φύση. Μόνο 700 περίπου ενώσεις που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς περιέχουν χλώριο ή συγγενή αλογόνα στοιχεία (ιώδιο, βρώμιο ή φθόριο) αλλά αυτές βρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα υδάτινα οικοσυστήματα.<sup>[37]</sup>

Η βιομηχανική παραγωγή χλωρίου, η οποία ήταν το πρώτο βήμα για τη δημιουργία των οργανοχλωριωμένων ενώσεων ξεκίνησε το 1893, γνώρισε τεράστια αύξηση τα τελευταία πενήντα χρόνια και τώρα φτάνει στα 40 εκατομμύρια τόνους το χρόνο. Το χλώριο δεν υπάρχει στη φύση στην στοιχειακή του μορφή, αλλά μόνο με τη μορφή “ιόντων χλωρίου” δεσμευμένων σε ενώσεις που αφθονούν στη φύση όπως το χλωριούχο νάτριο (το κοινό αλάτι) και άλλα χλωριούχα άλατα στην επιφάνεια της γης. Η βιομηχανία μετατρέπει το χλωριούχο νάτριο, μέσα από τη διαδικασία της ηλεκτρόλυσης, σε αέριο χλώριο και υδροξείδιο του ασβεστίου (καυστική σόδα).<sup>[35,36,37]</sup>

Η χημική συμπεριφορά του χλωρίου σε αέρια μορφή είναι τελείως διαφορετική από εκείνη των ιόντων φυσικού χλωρίου, τα οποία είναι αβλαβή. Το στοιχειακό χλώριο είναι τρομακτικά δηλητηριώδες γι' αυτό άλλωστε χρησιμοποιήθηκε ως χημικό όπλο στον Α' Παγκόσμιο Πόλεμο. Το αέριο χλώριο μπορεί να συνδεθεί με ουσίες που περιέχουν άνθρακα και σχηματίζει οργανοχλωριωμένες ενώσεις σε ατελείωτους συνδυασμούς.

Στη Δυτική Ευρώπη πάνω από το 80% του χλωρίου συνδυάζεται με πετροχημικά προϊόντα (υδρογονάνθρακες) για να σχηματίσει οργανοχλωριωμένα παράγωγα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα εξής:<sup>[37]</sup>

- 1) φυτοφάρμακα (κυρίως εντομοκτόνα)
- 2) χλωροφθοράνθρακες (CFCs) όπως προωθητικά
- 3) πολυχλωριούχο βινύλιο (PVC) – πλαστικά
- 4) χλωροφόρμιο/τετραχλωράνθρακας – διαλύτες
- 5) πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PVBs) – λιπαντικά

Το υπόλοιπο 20% χρησιμοποιείται για την προετοιμασία άλλων ενώσεων ή στη στοιχειακή του μορφή για λεύκανση ξυλοπολτού και χαρτοπολτού και για την

απολύμανση του πόσιμου νερού.

Πολύ περισσότερο όμως οργανοχλωριωμένες ενώσεις δημιουργούνται τυχαία, ως υποπροϊόντα άλλων διαδικασιών. Οργανοχλωριωμένες ενώσεις παράγονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την παραγωγή σιδήρου, χάλυβα και μαγνησίου. Επίσης απελευθερώνονται κατά την ανακύκλωση χάλκινων καλωδίων, όταν καίγεται και λιώνει το περίβλημα από PVC.

Όταν το χλώριο χρησιμοποιείται ως λευκαντικό στους μύλους ξυλοπολτού και χαρτοπολτού ή ως απολυμαντικό του νερού, παράγονται εκατοντάδες οργανοχλωριωμένα υποπροϊόντα πολλά από τα οποία δεν είναι ακόμη γνωστά.

Τελικά, οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις ή και άλλες χλωριωμένες ενώσεις που απελευθερώθηκαν στο περιβάλλον, αντιδρούν για να σχηματίσουν ένα αριθμό νέων ανεπιθύμητων και πολύ πιο βλαβερών οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Έτσι π.χ. μερικά συστατικά των αποβλήτων από την λεύκανση με χλώριο μπορεί να μετατραπούν σε ενώσεις που είναι πιο σταθερές και πιο τοξικές από τις αρχικές, από τις οποίες προήλθαν.<sup>[35,36]</sup>

#### **2.2.1. Αναλυτική περιγραφή κατηγοριών των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων**

Στη συνέχεια αναφέρονται αναλυτικά τα σημαντικά οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν σε μεγάλη κλίμακα στο παρελθόν.

- ✓ Ομάδα του DDT και ανάλογα χλωριωμένα παράγωγα, όπως DDD ή TDE Rothane, Methoxychlor, Dicofol
- ✓ Εξαχλωροκυκλοεξάνιο (HCH και 8 ισομερή, εκ των οποίων το πιο γνωστό είναι το Lindane (BHC)
- ✓ Ομάδα των χλωριωμένων κυκλοδιενίων (περιλαμβάνει τα aldrin, endrin, isodrin, dieldrin, heptachlor, chlordane, endosulfan)
- ✓ Το toxaphene (μίγμα ενώσεων)

#### **2.2.2. Χαρακτηριστικά – Ιδιότητες – Τοξικότητα – Κατανομή και τύχη στο περιβάλλον**

##### **➤ Heptachlor**

Το Heptachlor παρασκευάστηκε κατά την παρασκευή του Chlordane. Στην συνέχεια απομονώθηκε από το Chlordane από το οποίο έχει 4-5 φορές μεγαλύτερη εντομοτοξικότητα.

Το χημικά καθαρό Heptachlor είναι μία άσπρη κρυσταλλική σκόνη με ελαφρά μυρωδιά καμφοράς. Έχει σημείο τήξης 95-96°C και πολύ χαμηλή τάση ατμών στη συνηθισμένη θερμοκρασία. Είναι σταθερό στη θερμοκρασία των 150-160°C και σε

5% αλκαλικό ή όξινο περιβάλλον, στο φως, στην υγρασία και στον αέρα. Πρακτικά αδιάλυτο στο νερό, διαλυτό όμως στους οργανικούς διαλύτες, αρωματικούς υδρογονάνθρακες, στην αιθυλική αλκοόλη και στο καθαρό πετρέλαιο.

Το τεχνικά καθαρό προϊόν περιέχει 72% χημικά καθαρό Heptachlor και 28% συγγενικές ουσίες. Έχει σημείο τήξης 46-47°C. Δεν αφυδροχλωριώνεται (αλλοιώνεται) εύκολα.

Έχει μεγάλη υπολειμματική δράση (3 βδομάδες περίπου στην ύπαιθρο) όταν όμως χρησιμοποιείται στις κανονικές δόσεις, δεν αφήνει επικίνδυνα υπολείμματα στα προϊόντα που πρόκειται να φαγωθούν ή στις κτηνοτροφές. Για το λόγο αυτό δεν πρέπει να εφαρμόζεται στις τελευταίες 10-15 μέρες πριν από συγκομιδή φαγώσιμων προϊόντων. Στο βαμβάκι, το περιθώριο αυτό, μπορεί να περιορισθεί σε 5 ημέρες.

Έχει ισχυρές εντομοτοξικές ιδιότητες. Είναι φάρμακο επαφής και στομάχου, δρα όμως κατά κάποιο τρόπο και με τα αέρια που παράγει.<sup>[35,39]</sup>

#### ➤ Aldrin

Η σύνθεση του, όπως του Dieldrin που είναι δίδυμος αδελφός του, έγινε το 1948. Το Aldrin και το Dieldrin είναι τα πιο γνωστά μέλη της ομάδας των Κυκλοδιενίων εντομοκτόνων και ονομάστηκαν από τους Diels και Alder που ανακάλυψαν την δυαδικά σύνθεση.

Το Aldrin και το Dieldrin έχουν το χαρακτηριστικό σε αντίθεση με άλλα χλωριωμένα παράγωγα, πως είναι πολύ σταθερά σε αλκαλικό περιβάλλον. Το τεχνικά καθαρό Aldrin στους 20°C είναι στερεό, έχει χρώμα μελαψό προς το σκούρο καστανό και ελαφρά μυρωδιά. Έχει σημείο τήξης 49-60°C. Είναι αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, τις παραφίνες και τα έλαια. Είναι ένωση σταθερή στα οξέα.

Στην αποθήκευση είναι διαβρωτικό γιατί σχηματίζεται HCl. Πάντως η εντομοκτόνο δράση του δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Είναι εντομοκτόνο επαφής, στομάχου, δρα όμως και σαν ασφυκτικό, με τα αέρια που παράγει. Έχει την ίδια εντομοτοξικότητα που έχει το Lindane και την ίδια τάση ατμών.

Το Aldrin είναι ισχυρά τοξικό εντομοκτόνο για τον άνθρωπο και τα θερμόαιμα με αθροιστικές ιδιότητες και απορροφάται από το δέρμα. Η μέση θανατηφόρα δόση (LD<sub>50</sub>), για οξεία από το στόμα δηλητηρίαση, είναι για τους ποντικούς 50 mg/kg.

Ανεκτά όρια: 0,1 ppm για γεωργικά προϊόντα.

Στο εμπόριο κυκλοφορεί με τις εξής μορφές:

- Βρέξιμα (WP) και γαλακτωμαποιήσιμα σκευάσματα: 25 και 50% σε δραστική ουσία
- Σκόνες επιπάσεων 2,5% δραστική ουσία
- Κοκκώδη σκευάσματα για εφαρμογές στο έδαφος

Το Aldrin έχει χρησιμοποιηθεί με άριστα αποτελέσματα κυρίως, ως εντομοκτόνα εδάφους. Είναι εξαιρετικό για την καταπολέμηση των ακριδών και φυλλοφάγων εντόμων καθώς και των προνυμφών των κουνουπιών σε στάσιμα νερά.<sup>[35,39]</sup>

#### ➤ Chlordane

Η χημική ονομασία του Chlordane είναι 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 8-οκτάχλωρο-4,7-μεθύλενο-3α, 4, 7, 7α-τετραϋδρινδράνιο. Λέγεται και Οκταχλώρ ή ουσία 10, 6, 8 από τον εμπειρικό του τύπο. Το Chlordane είναι ένα ιξώδες υγρό, με χρώμα κεχριμπάρι (υποκίτρινο) και οσμή κεδρελαίου. Είναι αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Διασπάται από την επίδραση αλκαλίων και αποχλωριώνεται.

Είναι εντομοκτόνο επαφής και στομάχου αλλά δρα και με τα αέρια που παράγει. Είναι άοσμο και χωρίς γεύση. Γι' αυτό και δεν παρουσιάζει γευστικές και οσμητικές παρενέργειες.

Έχει μεγαλύτερη εντομοτοξικότητα από το DDT, μικρότερη όμως από γ-ισομερές του BHC. Αναφορικά με την υπολειμματική του δράση, αυτή είναι μικρότερη από το DDT, μεγαλύτερη όμως από το γ-ισομερές του BHC.<sup>[36,39]</sup>

Παρουσιάζει μέτρια από το στόμα, οξεία τοξικότητα για τα θηλαστικά (LD<sub>50</sub> 335-430 mg/kg). Πρέπει να αποφεύγετε η επαφή με το δέρμα, τα μάτια και τα ρούχα ή η αναπνοή της σκόνης. Είναι επικίνδυνο στα ψάρια και στις μέλισσες γι' αυτό πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή.<sup>[39]</sup>

Δεν είναι φυτοτοξικό, εφ' όσον χρησιμοποιείται στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις. Όμως πολύ πυκνά ψεκαστικά υγρά παρουσιάζουν φυτοτοξικά φαινόμενα σε μερικά φυτά αλλά και υπολείμματα Chlordane στο έδαφος, που συνήθως διατηρούνται για πολύ, να μπορούν να επηρεάσουν το φυτόμα.

Ανεκτά όρια: 300 μg/L για τα περισσότερα γεωργικά προϊόντα. Συνδυάζεται με όλα τα γνωστά φυτοφάρμακα εκτός από εκείνα που έχουν έντονη αλκαλική αντίδραση όπως το θειοασβέστιο.

Στο εμπόριο κυκλοφορεί με τις εξής μορφές:

- Γαλακτωματοποιήσιμα σκευάσματα
- Σκόνες επιπάσεων 4-5%
- Κοκκώδη
- Πετρελαϊκά διαλύματα

Έχει φάσμα δράσης μικρότερο σε σχέση με το DDT και το γ-BHC. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στην καταπολέμηση των εντόμων του εδάφους. Απαγορεύεται η χρησιμοποίησή του για γενικούς ψεκασμούς (επιφανειών ή χώρου) σε κατοικημένους χώρους εξαιτίας της μεγάλης χρόνιας τοξικότητας του για τα θερμόαιμα.

Παλιότερα το Chlordane χρησιμοποιήθηκε με αυτόν τον τρόπο στη χώρα μας και συγκεκριμένα το καλοκαίρι του 1951, ο Δήμος Αθηναίων έκανε μεγάλης έκτασης

ψεκασμούς με Chlordane σε κατοικημένους χώρους και καταστήματα για καταπολέμηση της μύγας.<sup>[39]</sup>

#### ➤ Endrin

Το τεχνικά καθαρό Endrin περιέχει τουλάχιστον 85% χημικά καθαρή ουσία. Είναι μια ανοιχτοκίτρινη σπυρωτή σκόνη, αδιάλυτη στο νερό, διαλυτή όμως σε οργανικούς διαλύτες της ομάδας των αρωματικών υδρογονανθράκων. Αποσυντίθεται στους 200°C. Παρουσιάζει σταθερότητα σε ελαφρά όξινο και αλκαλικό περιβάλλον και γι' αυτό μπορεί να συνδυασθεί με οποιοδήποτε από τα γνωστά γεωργικά φάρμακα, χωρίς να χάσει την εντομοτοξικότητά του.

Όπως το Dieldrin, έχει πολύ μεγάλη υπολειμματική δράση. Δεν είναι φυτοτοξικό και έχει μεγάλη διεισδυτική δράση. Είναι φάρμακο στομάχου και επαφής, δρα όμως και με τα αέρια που παράγει. Δεν αφήνει δυσάρεστη μυρωδιά, ούτε αλλοιώνει τη γεύση των προϊόντων πάνω στα οποία εφαρμόζεται.

Όπως το Dieldrin, είναι σφοδρό δηλητήριο για τα θερμόαιμα και τον άνθρωπο. Μπορεί να προκαλέσει οξεία δηλητηρίαση από το στόμα (παρουσιάζει LD<sub>50</sub> για τα ποντίκια, 10-35 mg/kg). Μπορεί να απορροφηθεί και από το δέρμα, αλλά και από τους πνεύμονες με την εισπνοή σκόνης ή αερίων. Οι επεμβάσεις στο βρώσιμο μέρος των φυτών πρέπει να σταματάνε 4-5 εβδομάδες πριν τη συγκομιδή. Μορφές που πωλούνται στο εμπόριο είναι σκόνη για σκονίσματα και γαλακτοποιήσιμο υγρό.

Το Endrin καταπολεμά μια πλατιά σειρά εντόμων, κοινά σχεδόν με τα προηγούμενα της ομάδας αυτής των Κυκλοδιενίων.<sup>[35,39]</sup>

#### ➤ Endosulfan

Πρωτοεμφανίστηκε στο εμπόριο το 1956, υπό το εμπορικό όνομα Thiodan. Το τεχνικώς καθαρό προϊόν είναι στερεό, κρυσταλλικό, χρώματος καφετί και συνίσταται από δύο στερεοϊσομερή: το α-ισομερές με σ.τ. 108°C και το β-ισομερές με σ.τ. 206°C. Το endosulfan (α και β) αποικοδομείται στο περιβάλλον με LD<sub>50</sub> 30-70 ημέρες. Ενώ το DT<sub>50</sub> για το ολικό Endosulfan (alpha, beta και sulphate) στον αγρό είναι 5-8 μήνες.

Το Endosulfan είναι ευρείας χρήσης διασυστηματικό εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο που δρα με την επαφή. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο εντόμων που δρουν επιβλαβώς σε διάφορα λαχανικά, ελιές, σταφύλια, τσάι και καφέ. Επίσης χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της μύγας τσε-τσε. Είναι σταθερό στο φως του ηλίου. Υδρολύεται αργά σε υδατικά οξέα και αλκάλια. Στο εμπορικό προϊόν το μίγμα των ισομερών, alpha-endosulfan και beta-endosulfan, είναι σε αναλογία 70-80% και 30-20% αντίστοιχα.<sup>[35,39]</sup>

Τα υπολείμματα του endosulfan συσσωρεύονται περισσότερο στο συκώτι παρά στο λίπος. Μεταβολίζεται γρήγορα στα θηλαστικά σε λιγότερους τοξικούς

μεταβολίτες και σε πολικά συζυγή. Στο έδαφος βρίσκουμε συνήθως το endosulfan sulfate το οποίο αποσυντίθεται πιο αργά από τα α και β-endosulfan, γι' αυτό και είναι ο πιο σημαντικός μεταβολίτης. Οι οργανοχλωριωμένες ουσίες που βρίσκονται ακόμα και σήμερα κατάλοιπα αυτών είναι το Endosulfan και το Lindane.<sup>[39]</sup>

➤ DDD (ή TDE Rothane)

Είναι ένας χλωριωμένος υδρογονάνθρακας που συγγενεύει με το DDT. Περιέχει ένα άτομο χλωρίου λιγότερο. Η ονομασία του προέρχεται από τα αρχικά γράμματα της χημικής ένωσης δίχλωρο-διφαινυλο-δίχλωρο αιθάνιο. Όπως συμβαίνει και με το DDT, το παρά-παρά ισομερές του DDD, είναι κατά πολύ δραστικότερο και τοξικότερο των δύο άλλων ισομερών του.

Το χημικά καθαρό π-π-ισομερές του DDD είναι στερεό κρυσταλλικό, άχρωμο και άοσμο, με σημείο τήξης τους 109-110°C. Παρουσιάζει μεγάλη διαλυτότητα στην ακετόνη και στη μεθυλική και αιθυλική κετόνη, μικρότερη όμως στους άλλους οργανικούς διαλύτες. Είναι αδιάλυτο στο νερό, όπως και το DDT. Είναι σταθερότερο του DDT στην επίδραση των αλκαλίων και της υπεριώδους ακτινοβολίας.<sup>[36,38]</sup>

Η τοξικότητά του από το στόμα, είναι κατά πολύ μικρότερη από εκείνη του DDT. Μόλις φθάνει το 1/4 -1/10 της ( $LD_{50}$  = 2500 mg/kg έναντι 250 mg/kg του DDT). Η υπολειμματική του δράση είναι όμοια με το DDT. Έχει λίγο μικρότερη φυτοτοξικότητα από το DDT, είναι και αυτό όμως φυτοτοξικό κυρίως στα κολοκυθοειδή.<sup>[38]</sup>

Ανεκτά όρια: ανάλογα του DDT (έως 7 mg/L για τα περισσότερα γεωργικά προϊόντα)

Στο εμπόριο έχει κυκλοφορήσει με τις ακόλουθες μορφές:

- Γαλακτωματοποιήσιμα σκευάσματα (EC) 40%
- Διαβρεχόμενες σκόνες (WP) 50%
- Σκόνες επιπάσεων 5 και 10%
- Πυκνά διαλύματα

Χρησιμοποιείται σε όλες τις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται και το DDT και με τις ίδιες δόσεις. Ιδιαίτερα χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των εξωτερικών παρασίτων των ζώων. Είναι εντομοκτόνο στομάχου και επαφής. Συσσωρεύεται στο λιπώδη ιστό όπως και το DDT.

Το DDD είναι λιγότερο δραστικό και εντομοτοξικό από το DDT έναντι πολλών φυτοφάγων εντόμων, αλλά είναι δραστικότερο έναντι των προνυμφών των κουνουπιών. Είναι φορέας ελέγχου των κουνουπιών για την εξάλειψη της ελονοσίας. Σύμφωνα με υπολογισμούς έσωσε 12-15 εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές από την ελονοσία και άλλες παρασιτικές ασθένειες.<sup>[38]</sup>

## ➤ DDT

Τα οργανοσυνθετικά εντομοκτόνα κάνουν την πρώτη εμφάνιση τους με τους χλωριωμένους κυκλικούς υδρογονάνθρακες το 1939, με πρώτο αντιπρόσωπο το DDT (Δίχλωρο-Διφαινύλιο-Τριχλωροαιθάνιο).

Η ουσία αυτή έκανε την εμφάνιση της για πρώτη φορά το 1874 από τον Γερμανό χημικό Zeidler, ο οποίος όμως αγνοούσε τότε τις αξιόλογες εντομοτοξικές ιδιότητες του DDT με αποτέλεσμα η σπουδαία αυτή χημική σύνθεση να περάσει απαρατήρητη και να παραμένει στο σκοτάδι για πολλά χρόνια έκτοτε.

Το 1939, οι χημικοί Lauder, Martin και Muller (το 1948 ο Paul Muller τιμήθηκε με το βραβείο Nobel Ιατρικής και Φυσιολογίας για την ανακάλυψη της εντομοτοξικής δράσεως του DDT) των χημικών εργαστηρίων της Φαρμακευτικής Εταιρείας Geigy (στη Βασιλεία της Ελβετίας) προσπαθώντας να συνθέσουν νέα εντομοκτόνα, κατόρθωσαν, ξεκινώντας από συγγενείς του DDT ενώσεις να επιτύχουν την ανασύνθεση αυτού. Έτσι το DDT ύστερα από 65 χρόνια ξανακάνει την εμφάνιση του στο χημικό εργαστήριο.

Οι πρώτες δοκιμές και εφαρμογές του DDT έγιναν από τους Ελβετούς επιστήμονες, οι οποίοι το χρησιμοποίησαν για την καταπολέμηση της ασθένειας του “Δορυφόρου” των γεωμήλων με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Το 1942 η εταιρεία Geigy έστειλε στις Η.Π.Α μία ποσότητα DDT για δοκιμές και μελέτη της νέας αυτής σύνθεσης. Από τότε άρχισε εκεί η παρασκευή του σε βιομηχανική πλέον κλίμακα, καθώς και η ευρεία διάδοση και εφαρμογή του, τόσο για την καταπολέμηση φυτοφάγων εντόμων, όσο και εναντίον πολλών οικοδαιτών και μολυσματικών, όσο και εναντίον των κουνουπιών που ανήκουν στο γένος των ανωφελών κουνουπιών, τα οποία ήταν φορείς της ελονοσίας της φοβερής αυτής μαστίγας, με ανθρωποσωτήρια αποτελέσματα. Η πρώτη ευρεία χρήση του DDT για τη δημόσια υγεία έγινε το 1944 όταν ξέσπασε στη Νάπολη της Ιταλίας η μεγάλη επιδημία τύφου.<sup>[36,38]</sup>

Το DDT είναι πιθανότατα ένα από τα πιο διάσημα και αμφιλεγόμενα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που υπήρξαν ποτέ. Εκτιμάται ότι 4 δισεκατομμύρια λίβρες ( $1,81 \cdot 10^9$  Kg) αυτού του φθινοφύλου και ιστορικά αποτελεσματικού χημικού έχουν παραχθεί και εφαρμοστεί παγκοσμίως από το 1940. Στις ΗΠΑ, το DDT χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα για τις γεωργικές καλλιέργειες, ιδιαίτερα για το βαμβάκι, από το 1945 έως το 1972. Το DDT χρησιμοποιήθηκε επίσης για την προστασία των στρατιωτών από ασθένειες που μεταδίδονται από τα έντομα όπως η ελονοσία και ο τύφος κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου και παραμένει ένα πολύτιμο εργαλείο δημόσιας υγείας σε τροπικές περιοχές. Η βαριά χρήση αυτού του εξαιρετικά ανθεκτικού χημικού, ωστόσο, οδήγησε σε εκτεταμένη ρύπανση του περιβάλλοντος και τη συσσώρευση DDT στους ανθρώπους και την άγρια πανίδα - ένα φαινόμενο που έφερε στην δημοσιότητα η Rachel Carson στο βιβλίο της, *Silent Spring*, του 1962. Ένας πλούτος επιστημονικών εργαστηριακών και πεδίων δεδομένων επιβεβαίωσε τώρα την έρευνα από τη δεκαετία του 1960 που πρότεινε, μεταξύ άλλων επιδράσεων, ότι υψηλά επίπεδα DDE (ενός μεταβολίτη του DDT) σε



ορισμένα θηλυκά πουλιά προκάλεσαν τα αυγά τους να λεπτύνουν τόσο δραματικά ότι δεν μπορούσαν να παράγουν ζωντανούς απογόνους. [34]

## 2.3. Ανάλυση δείγματος – Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινούμενης και μια στατικής φάσης. Ανάλογα με τη φύση της κινούμενης και της στατικής φάσης, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως αέριος ή υγρή. Ανάλογα με την αρχή στην οποία στηρίζεται ο διαχωρισμός, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται σαν κατανομής, προσρόφησης, ιονανταλλαγής ή πηκτής. Τέλος ανάλογα με την τεχνική συγκράτησης της στατικής φάσης, έχουμε χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδας και χαρτοχρωματογραφία.

Στην χρωματογραφία κατανομής η στατική φάση αποτελείται από ένα λεπτό σώμα υγρού προσροφημένου στην επιφάνεια ενός αδρανούς υλικού. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στον διαφορετικό συντελεστή κατανομής των συστατικών ενός μίγματος σε ορισμένο σύστημα διαλυτών.

Στην χρωματογραφία προσρόφησης, η κινούμενη φάση είναι υγρή και η στατική ένα λεπτοτριμμένο στερεό υλικό με προσροφητικές ιδιότητες. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των συστατικών του μίγματος πάνω στην επιφάνεια του στερεού.

Στην χρωματογραφία ιονανταλλαγής διαχωρίζουμε μίγμα ουσιών διαφορετικής ιοντικής ισχύος. Οι δυνάμεις συγκράτησης μεταξύ των συστατικών του μίγματος και της στερεής φάσης είναι ηλεκτροστατικής φύσης.

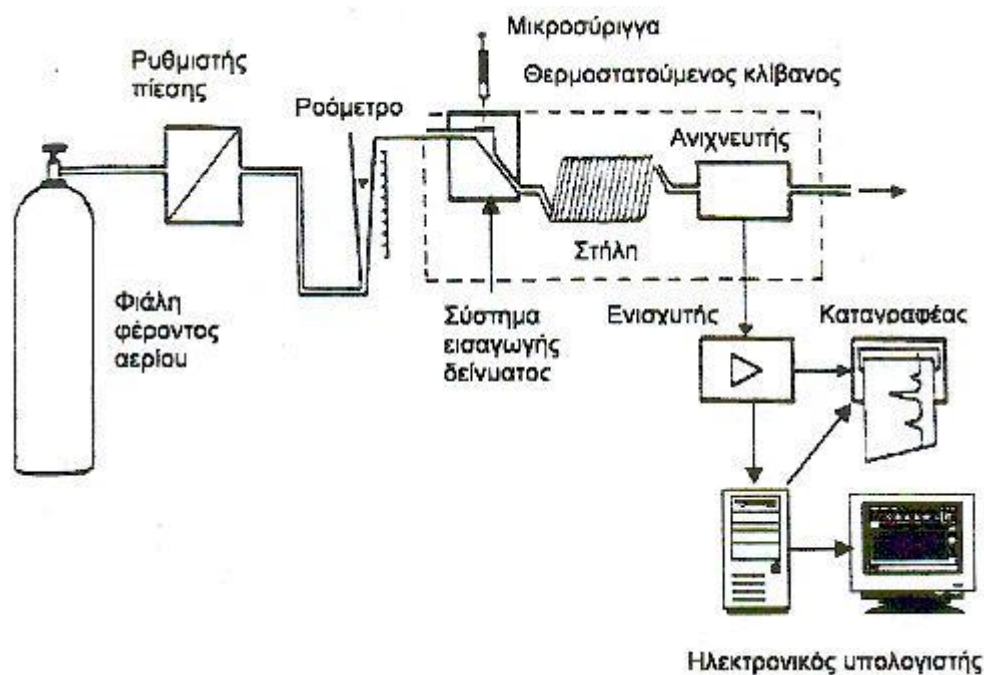
Στην χρωματογραφία πηκτής την στατική φάση αποτελεί πορώδες υλικό υπό την μορφή πηκτής, το οποίο ανάλογα με το μέγεθος των πόρων του είναι δυνατόν να διαχωρίσει μίγμα ουσιών που διαφέρουν σημαντικά στην τιμή του μοριακού τους βάρους. Η χρωματογραφία πηκτής στηρίζεται στο φαινόμενο της διάχυσης των ουσιών σχετικά μικρού μοριακού βάρους εντός της πηκτής.<sup>[40]</sup>

### 2.3.1. Αέρια Χρωματογραφία

Σε αυτήν η κινητή φάση είναι αέριο και η όλη οργανολογία είναι αρκετά πολύπλοκη. Το δείγμα εισάγεται σε ένα χώρο που αεριοποιείται άμεσα. Αυτό σημαίνει ότι όλα τα συστατικά του δείγματος πρέπει να μπορούν να αεριοποιηθούν (αναλυτικός περιορισμός). Το αέριο πλέον δείγμα παρασύρεται μέσα σε μια στήλη που περιέχει ένα προσροφητικό υλικό, οπότε γίνεται ο διαχωρισμός. Έτσι από την άλλη άκρη της στήλης εξέρχονται με τη σειρά τα διαχωρισθέντα συστατικά. Από εκεί οδηγούνται στον ανιχνευτή (ηλεκτρονικό μέρος) ο οποίος στέλνει ένα σήμα σε ένα καταγραφικό ανάλογα με την ένταση ανίχνευσης. Πετυχαίνει πάρα πολύ καλούς διαχωρισμούς, ενώ η ικανότητα ανίχνευσης των αναλυόμενων συστατικών είναι πολύ

μεγάλη (φτάνει και μερικά τρισεκατομυριοστά του γραμμαρίου (pg) σε κάποιες περιπτώσεις - συνήθως είναι σε μερικά δισεκατομυριοστά (ng)). Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά όλη η διαδικασία της αέριας χρωματογραφίας.

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.λπ. Η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου δίνεται στο παρακάτω σχήμα:<sup>[41,42,43]</sup>



Εικόνα 1. Οργανολογία του GC

Το φέρον αέριο (συνήθως  $N_2$ , He,  $H_2$ , Ar) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου.

Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, για αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι

απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται.

Η καρδιά του χρωματογράφου είναι η στήλη. Υπάρχουν δύο είδη στηλών οι πληρωμένες στήλες και οι τριχοειδείς. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο χώρο, από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό, μήκους 1-2 m για της πληρωμένες στήλες, μέχρις αρκετών εκατοντάδων μέτρων για τις τριχοειδείς, εσωτερικής διαμέτρου της τάξεως των mm στις αναλυτικές στήλες, πολλών δεκάδων cm στις παρασκευαστικές στήλες.

Το δείγμα, συνήθως όγκου 1μL εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος (septum). Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά.

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου.

Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα.<sup>[41,42,43]</sup>



Εικόνα 2. Σύστημα GC

## 2.4. Εκχύλιση

Η εκχύλιση είναι μία φυσική μέθοδος διαχωρισμού διαλυμάτων η οποία βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, που αναμιγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Η ευρύτητα της μεθόδου αυτής, οφείλεται στην απλότητα, στην ταχύτητα, στην ευελιξία και στη δυνατότητα εφαρμογής της σε δείγματα που περιέχουν είτε ίχνη, είτε μεγάλες ποσότητες μιας ουσίας. Η εκχύλιση είναι μια διεργασία που βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην βιομηχανία, είτε στην διαδικασία επεξεργασίας πρώτων υλών, είτε στον διαχωρισμό τελικών προϊόντων, είτε σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Οι τεχνικές εκχύλισης που χρησιμοποιούνται σήμερα για αναλυτικούς σκοπούς είναι, κυρίως, η εκχύλιση υγρού-υγρού, η εκχύλιση στερεού-υγρού και η εκχύλιση στερεάς φάσης, οι οποίες κυριαρχούν και στις βιοαναλυτικές εφαρμογές.

### 2.4.1. Εκχύλιση υγρού-υγρού

Στην εκχύλιση υγρού-υγρού χρησιμοποιείται διαλύτης μη αναμίξιμος με το διαλύτη του δείγματος. Οι επιθυμητές ενώσεις κατανέμονται στον κατάλληλο διαλύτη ανάλογα με τις ιδιότητές τους. Αφού διαχωριστούν τα μη-αναμίξιμα υγρά, η οργανική στιβάδα που περιέχει την εκχυλισμένη ένωση απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, και επαναδιαλύεται σε έναν κατάλληλο διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό σύστημα. Ένας περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι ότι πολικοί υδατοδιαλυτοί διαλύτες δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση. Άλλα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, η οποία οδηγεί σε ένα υπολογίσιμο κόστος για την απόκτηση και τη διάθεσή τους, όπως και ο σχηματισμός γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της ανάμιξης και το γεγονός ότι απαιτείται απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη με εξάτμιση, η οποία συνεπάγεται αύξηση του χρόνου προκατεργασίας. Επίσης, δε μπορεί να αποφευχθεί η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του υποστρώματος που παρεμποδίζουν, λόγω του ότι έχουν παραπλήσιες ιδιότητες, καθώς οι διαλύτες δεν είναι εκλεκτικοί.<sup>[44]</sup>

### 2.4.2. Εκχύλιση στερεού-υγρού

Η εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid Liquid Extraction-SLE) αναφέρεται στην κλασική τεχνολογία εκχύλισης, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση του κατάλληλου διαλύτη, οποίος διαλύει επιλεκτικά την ένωση που μας ενδιαφέρει, όχι όμως και το υπόστρωμα. Η πιο κοινή μορφή της τεχνικής SLE είναι η μέθοδος “shake-filter” η οποία περιλαμβάνει την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη για τις οργανικές ενώσεις ή αραιού οξέος ή βάσης για τις ανόργανες ενώσεις, στο δείγμα και

την ανάδευση, για να επιτρέψει στις ενώσεις να διαλυθούν στο υγρό περιβάλλον, έως ότου παραληφθούν πλήρως. Η διαδικασία εκχύλισης μπορεί να επιταχυνθεί με θέρμανση, καθώς και με επίδραση υπερήχων ή και μικροκυμάτων. Οι αδιάλυτες ενώσεις απομακρύνονται στη συνέχεια με διήθηση ή φυγοκέντρηση.<sup>[44]</sup>

#### 2.4.3. Εκχύλιση στερεής φάσης

Η αρχή της SPE περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε 2 φάσεις: τη στερεή φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και την υγρή που αποτελεί το υπόστρωμα με όλες τις παρεμποδίσεις. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεής φάσης, έτσι ώστε να διαχωριστούν. Η παραλαβή των ενώσεων από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με την επιλογή κατάλληλων διαλυτών. Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των προσδιοριζόμενων συστατικών, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του διαλύτη, είναι υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλουσης των ενώσεων. Τα στάδια της SPE είναι:

- 1) Ενεργοποίηση του προσροφητικού
- 2) Φόρτωση του δείγματος
- 3) Έκπλυση για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων πολικών συστατικών του υποστρώματος
- 4) Έκλουση του δείγματος με τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών
- 5) Εξάτμιση του διαλύτη

Τα βασικά πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι ότι:

- ❖ Απαιτείται σχετικά μικρός χρόνος εκτέλεσης
- ❖ Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλυτών
- ❖ Είναι κατάλληλη τεχνική για συνδυασμό με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας (HPLC, GC κ.ά.).
- ❖ Μπορεί να αυτοματοποιηθεί και να αναλυθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων
- ❖ Επιτυγχάνεται ικανοποιητικός καθαρισμός του δείγματος
- ❖ Επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των συστατικών με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στην ανάλυση
- ❖ Έχει καλή επαναληψιμότητα
- ❖ Παρέχει υψηλά ποσοστά ανάκτησης<sup>[44]</sup>

## 2.5. Μικροεκχύλιση

Η μικροεκχύλιση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού διαλυμάτων όπου μειώνεται η κατανάλωση του εκχυλιστικού μέσου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του συνολικού κόστους της όλης διεργασίας, καθώς χρησιμοποιούνται πολύ μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη. Στις τεχνικές αυτές συμπεριλαμβάνονται η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro Extraction) και η υγρής φάσης μικροεκχύλιση (Liquid Phase Micro Extraction). Στα πλεονεκτήματα και των δύο μεθόδων μικροεκχύλισης συμπεριλαμβάνονται η ταχύτητα, η απλότητα, το χαμηλό κόστος καθώς και ότι χαρακτηρίζονται ως φιλικές προς το περιβάλλον. Επιπλέον, με τις τεχνικές αυτές καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση ρυπαντών σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα όπου συνήθως απαντώνται σε ίχνη.<sup>[44]</sup>

### 2.5.1. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Micro Extraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αναπτύχθηκε το 1990 από τους Arthur και Pawliszyn και επιτρέπει την επίτευξη ορίων ανίχνευσης της τάξης των 5 – 50 ng/L για πτητικά, ημιπτητικά και μη πτητικά συστατικά με καλή γραμμικότητα και ευαισθησία. Είναι μια γρήγορη, απλή, αποδοτική, ευαίσθητη, εύκολα αυτοματοποιούμενη, οικονομική και χωρίς χρήση διαλυτών (solvent-free), διαχωριστική τεχνική και απαιτεί μικρούς όγκους δειγμάτων. Παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών διαχωρισμού, καθώς συνδυάζει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού από αέρια, υγρά ή στερεά δείγματα, με άμεση μεταφορά του για ανάλυση σε ένα κλασικό σύστημα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας.

Πρόκειται για μια διαδικασία δύο σταδίων η οποία περιλαμβάνει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των αναλυτών από το υπόστρωμα των δειγμάτων. Στο πρώτο στάδιο, μια ίνα τετηγμένου διοξειδίου του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) επικαλυμμένη με μια στατική φάση (coating) από πολυμερές υλικό, εκτίθεται στο φιαλίδιο το οποίο περιέχει το δείγμα ενώ το προσδιοριζόμενο συστατικό κατανέμεται μεταξύ του υποστρώματος και του πολυμερούς υλικού της στατικής φάσης. Σε δεύτερο στάδιο, η ίνα με τα επιθυμητά συστατικά μεταφέρεται στον εισαγωγέα του αναλυτικού οργάνου για εκρόφηση, διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Συνήθως, δεν απαιτείται ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού, λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας του πολυμερούς υλικού.

Η αρχική συσκευή στηριζόταν σε μια επικαλυμμένη ίνα στερεωμένη σε ακροφύσιο σύριγγας. Σε αυτήν την κατασκευή, η λεπτή στερεωμένη ίνα τετηγμένου  $\text{SiO}_2$  επικαλύπτεται με μια πολυμερική στατική φάση στην οποία προσροφάται εκλεκτικά το επιθυμητό συστατικό.

Η εκχύλιση με την τεχνική SPME βασίζεται στην κατανομή του επιθυμητού συστατικού μεταξύ της υδατικής φάσης και της στατικής φάσης του πολυμερούς. Τυπικά, η εκχύλιση με την τεχνική SPME θεωρείται ότι έχει ολοκληρωθεί, όταν η



συγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού έχει φτάσει σε ισορροπία μεταξύ του υποστρώματος του δείγματος και του πολυμερούς της ίνας. Αυτό σημαίνει ότι, όταν επέλθει ισορροπία, το ποσό του επιθυμητού συστατικού που εκχυλίζεται είναι σταθερό μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και ανεξάρτητο του επιπλέον χρόνου εκχύλισης.<sup>[44]</sup>

Τα στάδια της SPME είναι:

- ✚ διάτρηση του ελαστικού διαφράγματος του φιαλιδίου από τη βελόνα
- ✚ μεταφορά των συστατικών στην ίνα
- ✚ προστασία της ίνας εντός της βελόνας και απόσυρσή της από το φιαλίδιο
- ✚ εισαγωγή της βελόνας στον εισαγωγέα δείγματος του χρωματογράφου
- ✚ εκρόφηση των επιθυμητών συστατικών από την ίνα και μεταφορά τους από την κινητή φάση προς τη χρωματογραφική στήλη (για διαχωρισμό και στη συνέχεια ανίχνευση/μέτρηση) και
- ✚ εξαγωγή της βελόνας από τον εισαγωγέα δείγματος.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία εκχύλισης και την εκχυλιστική ικανότητα της SPME εξαρτώνται από:

- την επίστρωση της ίνας
- το χρόνο δειγματοληψίας και εκρόφησης
- τη θερμοκρασία δειγματοληψίας και εκρόφησης
- την ανάδευση του δείγματος
- την ιοντική ισχύ του διαλύματος (αναλόγως της προσδιοριζόμενης ένωσης)

Άλλοι παράγοντες που μπορούν να επιδράσουν θετικά, με αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης και σημαντική ελάττωση του απαιτούμενου χρόνου, είναι η προσθήκη αλάτων όπως το  $\text{NaCl}$  και το  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Επίσης, βελτίωση της εκλεκτικότητας και ταχύτερη αποκατάσταση της ισορροπίας μπορεί να επιτευχθεί με ρύθμιση του pH, ανάλογα με την pKa της προσδιοριζόμενης ένωσης. Παραδείγματος χάρη, στην περίπτωση που το επιθυμητό συστατικό είναι όξινη ή βασική ένωση, συνιστάται η προσθήκη κάποιου οξέος ή βάσης αντίστοιχα στο διάλυμα του δείγματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή ανάδευσης μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερους συντελεστές εμπλουτισμού, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της απόδοσης της εκχύλισης. Η επίδραση της θερμοκρασίας διαφέρει ανάλογα με το είδος της SPME (στον υπερκείμενο χώρο-headspace ή με εμβάπτιση και εξαρτάται, συνεπώς, από την πτητικότητα του επιθυμητού συστατικού.

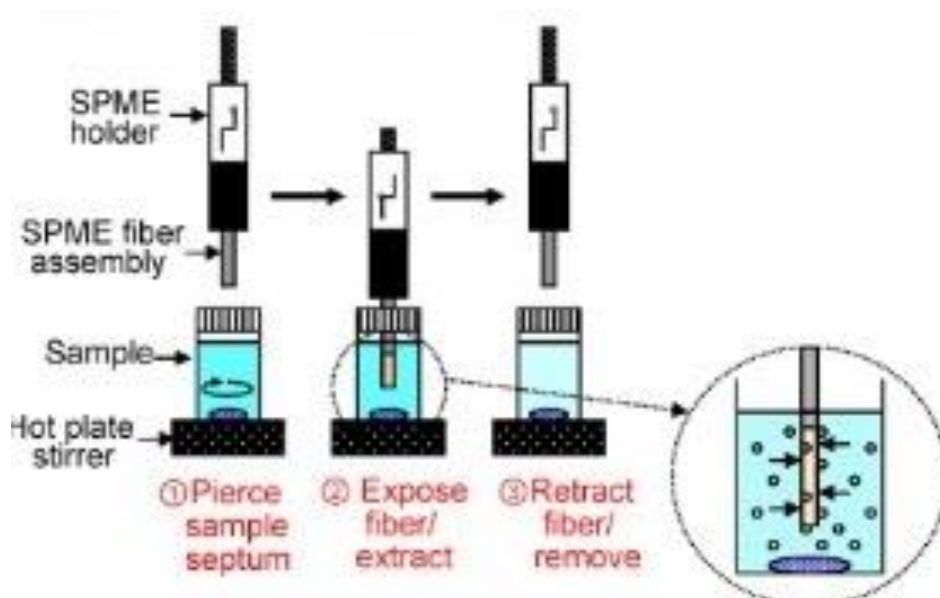
Με τα χρόνια η τεχνολογία SPME έχει προχωρήσει σε διάφορες κατευθύνσεις (ανάπτυξη νέων μορφών SPME) αν και η αρχικά προτεινόμενη μορφή παρέμεινε η πιο διαδεδομένη της τεχνικής αυτής.<sup>[44]</sup>

### 2.5.1.1. Άμεση δειγματοληψία στερεής φάσης (Direct SPME)

Η απευθείας εκχύλιση του επιθυμητού συστατικού, με απευθείας εμβάπτιση δηλ. με βύθιση της ίνας στο διάλυμα του δείγματος εφαρμόζεται, όταν η προσδιοριζόμενη ένωση εμφανίζει πολύ μικρή ή καθόλου πτητικότητα. Στην περίπτωση της άμεσης εκδοχής, λόγω της άμεσης επαφής της ίνας με το διάλυμα του δείγματος, θα πρέπει να αποφεύγονται οι ιδιαίτερα όξινες ή αλκαλικές συνθήκες, για την απομάκρυνση του ενδεχόμενου καταστροφής της ίνας.

Η εφαρμογή της DI – SPME προϋποθέτει την έκθεση της ίνας στο διάλυμα του δείγματος, σε ορισμένη θερμοκρασία που ποικίλλει (από 30–100°C) με παράλληλη ανάδευση για 15–60 min, ενώ έπεται ένα σύντομο στάδιο καθαρισμού με εμβάπτιση της ίνας σε διαλύτη, πριν την έγχυση στο GC/LC/HPLC για ανάλυση.

Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η καταστροφή της ίνας από πολύπλοκες μήτρες με πολλές προσμίξεις.



Εικόνα 3. Πειραματική διάταξη της Direct SPME

### 2.5.1.2. Δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου στερεάς φάσης (Headspace Solid Phase Micro Extraction, HSSPME)

Η headspace εκδοχή της SPME επιλέγεται στην περίπτωση που το επιθυμητό συστατικό είναι μία πτητική ή ημιπτητική ουσία. Με εφαρμογή της SPME υπερκείμενης φάσης μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματικός διαχωρισμός του επιθυμητού συστατικού, όταν συνυπάρχουν στο ίδιο υπόστρωμα μη πτητικές παρεμποδίσσεις, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιείται η προσρόφηση ουσιών που μπορούν να αλλοιώσουν ή να καταστρέψουν την ίνα. Με τον τρόπο αυτό, περισσότερες από



100 επαναλήψιμες εκχυλίσσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν με τη χρήση της ίδιας ίνας.



Εικόνα 4. Δειγματοληψία HSSPME

Η θεωρία πίσω από την HSSPME είναι η διαδικασία κατανομής της ισορροπίας της αναλυόμενης ουσίας μεταξύ της επίστρωσης της ίνας, του υπερκεείμενου χώρου και του δείγματος της μήτρας.

Στην ισορροπία, σύμφωνα με τη θερμοδυναμική θεωρία, οι μερικές πιέσεις και οι συγκεντρώσεις είναι ανεξάρτητες της συνολικής πίεσης αφού οι συντελεστές κατανομής και οι σταθερές Henry επηρεάζονται μόνο σε υψηλές πιέσεις λειτουργίας. Ως εκ τούτου η θεωρία προβλέπει ότι η ποσότητα του αναλύτη που εξάγεται από την ίνα στην ισορροπία θα είναι ίδια ανεξάρτητα από το αν η δειγματοληψία γίνεται υπό συνθήκες κενού ή ατμοσφαιρικής πίεσης.

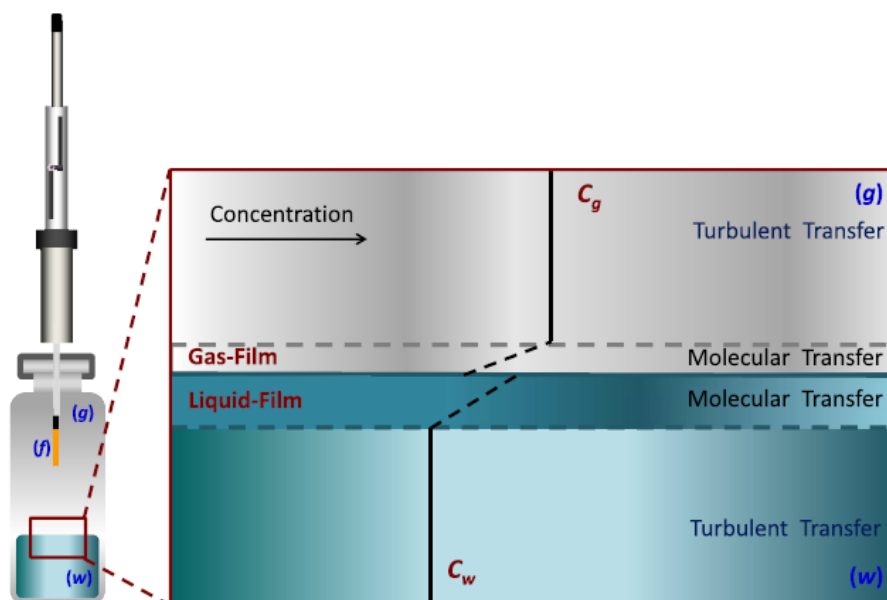
Η HSSPME είναι μία διαδικασία πολλών σταδίων που περιλαμβάνει τη μεταφορά μάζας σε τρεις φάσεις (στο δείγμα, στον υπερκεείμενο χώρο και στην ίνα) και σε δύο διεπιφάνειες (δείγματος-υπερκεείμενου χώρου και υπερκεείμενου χώρου-ίνας). Πριν την εισαγωγή της ίνας, το δείγμα αφήνεται να ισορροπήσει με τον υπερκεείμενο χώρο. Μετά από αυτή την περίοδο, η ίνα εκτίθεται στον υπερκεείμενο χώρο και αρχίζει αμέσως να απορροφά μόρια αναλυόμενης ουσίας από την αέρια φάση.

Για ενώσεις με υψηλή τιμή σταθεράς Henry, η ποσότητα αναλυόμενης ουσίας που έχει απορροφήσει η ίνα, κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, μπορεί να είναι πολύ μικρή σε σχέση με αυτή που υπάρχει ήδη στον υπερκεείμενο χώρο, με αποτέλεσμα την επίτευξη μίας γρήγορης ισορροπίας μεταξύ των τριών φάσεων που εμπλέκονται.

Από την άλλη, για ενώσεις με χαμηλή τιμή σταθεράς Henry, γίνεται ταχεία απορρόφηση αναλυόμενης ουσίας από την ίνα που μπορεί να προκαλέσει πτώση της συγκέντρωσης στον υπερκεείμενο χώρο κάτω από το επίπεδο ισορροπίας σε σχέση με το δείγμα νερού.

Λίγα ακόμα μόρια ένωσης θα πρέπει να μεταφέρονται από την υδατική φάση

στον υπερκείμενο χώρο, κάνοντας έτσι τη διαδικασία ισορροπίας της HSSPME αργή, καθώς μπορεί να υπάρχουν μόνο τόσα μόρια ένωσης στην αέρια φάση ανάλογα με την τιμή της σταθεράς Henry.<sup>[45]</sup>



Εικόνα 5. Απεικόνιση της HSSPME πειραματικής διάταξης και του μοντέλου των δύο στρωμάτων της διεπιφάνειας αέρα-νερού όπου w, g και f είναι η υδατική φάση, η αέρια φάση και η φάση της SPME ίνας  $C_g$  και  $C_w$  είναι οι συγκεντρώσεις της αέριας και υδατικής φάσης αντίστοιχα

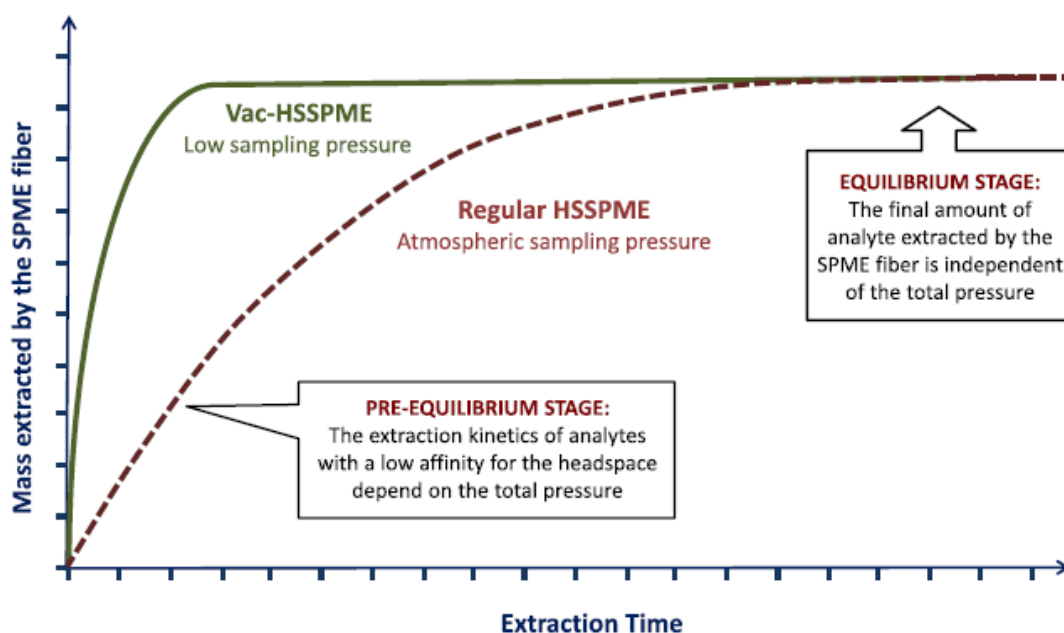
Σύμφωνα με το συγκεκριμένο μοντέλο, τα κυρίως σώματα του νερού και του υπερκείμενου χώρου είναι καλά αναμεμιγμένα και μόνο δύο λεπτά στρώματα γειτονεύουν με τη διεπιφάνεια αέρα-νερού και η συνολική αντίσταση στη μεταφορά μάζας προκύπτει από την αντίσταση αυτών των δύο λεπτών στρωμάτων. Ανάλογα με τις ιδιότητες της ένωσης, η αντίσταση μπορεί να βρίσκεται στο υγρό στρώμα, στο αέριο στρώμα ή και σε συνδυασμό των δύο. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, για ενώσεις που ο ρυθμός εξάτμισης ελέγχεται από την αντίσταση του αέριου στρώματος (δηλαδή για ενώσεις με χαμηλή σταθερά Henry), η ισορροπία της HSSPME θα επιτυγχάνεται γρηγορότερα όταν η δειγματοληψία γίνεται υπό συνθήκες κενού. Αυτό συμβαίνει γιατί η μείωση της πίεσης κατά τη διάρκεια του σταδίου πριν την ισορροπία, μειώνει την αντίσταση της αέριας φάσης, αυξάνοντας έτσι τους συντελεστές διάχυσης και μεταφοράς μάζας στο αέριο στρώμα και συνεπώς αυξάνει τους συντελεστές της συνολικής μεταφοράς μάζας αυτών των ενώσεων.<sup>[45]</sup>

Στις περιπτώσεις που οι ενώσεις στόχοι είναι ημι-πτητικές μπορούν να διαφοροποιηθούν κάποιες παράμετροι οι οποίοι μπορούν να αυξήσουν την κινητική των ενώσεων αυτών ώστε να μεταφέρονται στην αέρια φάση πιο γρήγορα. Οι παράμετροι αυτοί μπορεί να είναι είτε η αύξηση της ανάδευσης είτε η αύξηση της

θερμοκρασίας. Ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε αποσύνθεση των ενώσεων ή την δημιουργία παραπροϊόντων.<sup>[45]</sup>

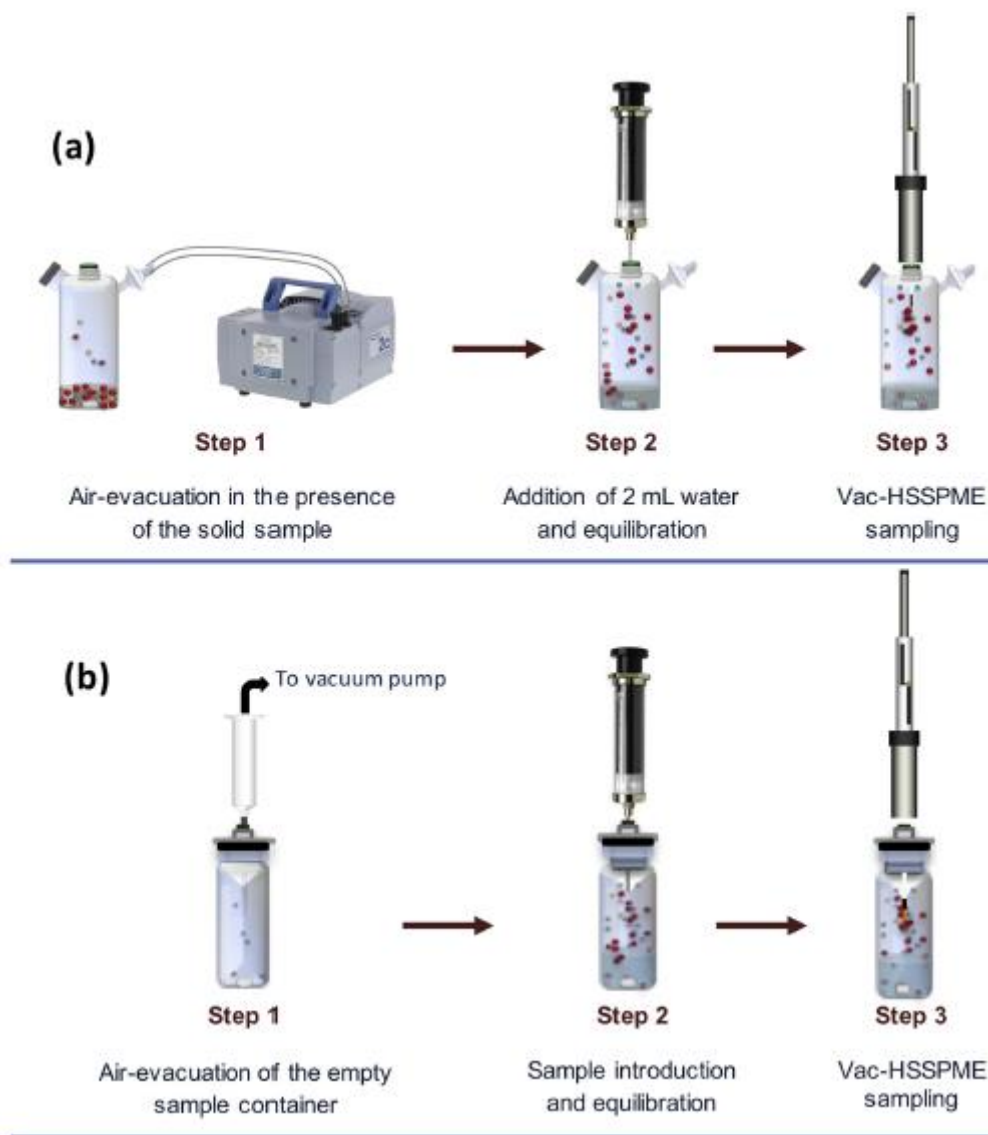
### 2.5.1.3. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού (Vac-HSSPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού, είναι μία καινούρια μέθοδος δειγματοληψίας η οποία πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες χαμηλής πίεσης. Αν και οι συγκεντρώσεις ισορροπίας είναι ανεξάρτητες της ολικής πίεσης του φιαλιδίου, παρατηρήθηκε ότι η μείωση της πίεσης επιφέρει πριν το στάδιο της ισορροπίας την αύξηση της κινητικής των ημι-πτητικών ενώσεων. Για τις ενώσεις αυτές η εφαρμογή της δειγματοληψίας υπερκείμενου χώρου στερεάς φάσης σε συνθήκες κενού (Vac-HSSPME) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασης στην μεταφορά μάζας των ενώσεων από την υγρή στην αέρια φάση. Η Vac-HSSPME έχει υψηλότερη αποδοτικότητα και ευαισθησία σε μικρότερο χρονικό διάστημα και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες δειγματοληψίας σε σύγκριση με την δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου στερεάς φάσης υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Το κύριο πλεονέκτημα αυτή της μεθόδου είναι η μείωση του χρόνου ισορροπίας και κατ' επέκταση δειγματοληψίας σε συνθήκες ήπιων θερμοκρασιών, επίσης αποκλείει τη δημιουργία διαφόρων προβλημάτων όπως είναι η αποσύνθεση των προς ανάλυση ενώσεων και τη δημιουργία συστατικών τα οποία μπορούν να δημιουργηθούν με την ψύξη της SPME ίνας.<sup>[45]</sup>



Εικόνα 6. Διάγραμμα χρόνου συναρτήσει της μάζας που έχει εκχυλιστεί

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζεται το διάγραμμα του χρόνου εκχύλισης για τις μεθόδους HSSPME κάτω από συνθήκες χαμηλής και ατμοσφαιρικής πίεσης. Όπως φαίνεται στη μέθοδο Vac-HSSPME η ισορροπία του συστήματος έχει επέλθει σε πολύ πιο σύντομο χρονικό διάστημα συγκριτικά με την Regular HSSPME. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στη μέθοδο Vac-HSSPME να μειώνεται ο χρόνος δειγματοληψίας χωρίς να επηρεάζεται η απόδοση της μεθόδου. Ωστόσο ο χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας τους συστήματος ή της ποσότητας που εκχυλίζεται από την ίνα δεν επηρεάζονται σημαντικά όταν στο διάλυμα προς ανάλυση οι ενώσεις στόχοι είναι πτητικές. Επομένως σε περιπτώσεις που οι ενώσεις στόχοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη πτητικότητα τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις δύο μεθόδους (Vac-HSSPME και Regular HSSPME) δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά.<sup>[45]</sup>



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση δύο πιθανών διαδικασιών εκχύλισης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Vac-HSSPME

Η διαδικασία της εξάτμισης οργανικών ενώσεων από υδάτινο περιβάλλον θεωρείται αντίδραση πρώτης τάξεως

$$C_S = C_S^0 \times e^{-kt} \quad (1)$$

Όπου οι όροι  $C_S$ ,  $k$  αποτελούν την μεταβολή της συγκέντρωσης της ένωσης προς τον χρόνο ( $t$ ) και την σταθερά ταχύτητας της εξάτμισης αντίστοιχα.<sup>[50]</sup>

Ολοκληρώνοντας την εξίσωση (1) ως προς το χρόνο, η εξίσωση που προκύπτει εκφράζει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ένωσης στη διεπιφάνεια που δημιουργείται μεταξύ της αέριας φάσης και του δείγματος.

$$V_S \frac{dC_S}{dt} = -K_L \times A \times (C_S - C_i) \quad (2)$$

Όπου  $C_i$  είναι η συγκέντρωση της ένωσης στην διεπιφάνεια αέριας φάσης και δείγματος,  $A$  είναι η διεπιφάνεια της αέριας φάσης και του δείγματος,  $K_L$  ο ολικός συντελεστής μεταφοράς μάζας μεταξύ της διεπιφάνειας και  $V_S$  είναι ο όγκος του δείγματος.

Η ολοκλήρωση της εξίσωσης (2) καταλήγει σε μία νέα εξίσωση η οποία συνδέει τη σταθερά ταχύτητας της εξάτμισης ( $k$ ) με τον συντελεστή της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και υδάτινης φάσης μέσα στη περιοχή της διεπιφάνειας ( $K_L$ ).<sup>[50]</sup>

$$k = \frac{K_L}{L} \quad (3)$$

Όπου το  $L$  είναι το βάθος τους διαλύματος μέσα σε δοχείο με ομοιόμορφη κατανομή.

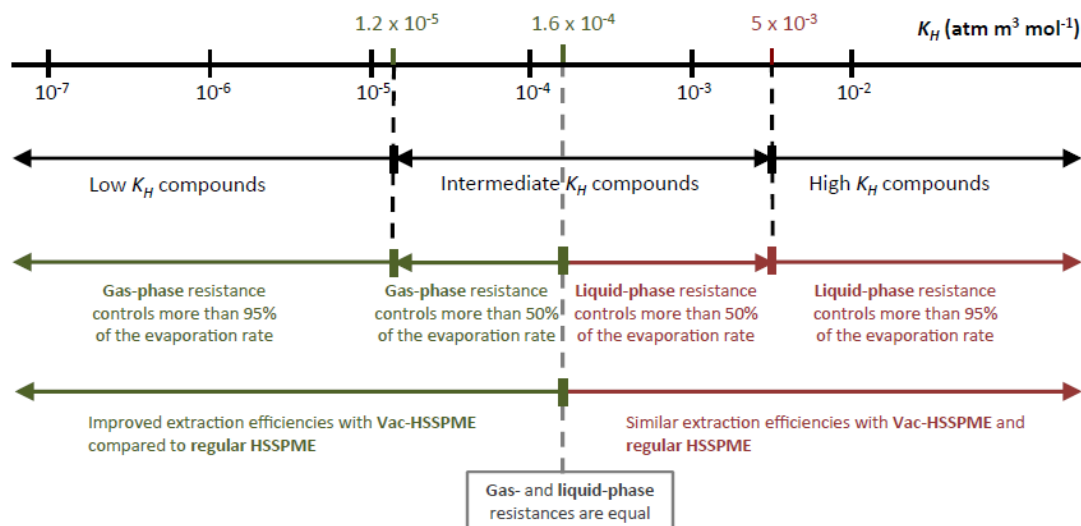
Ο Liss και ο Stater και αργότερα ο Mackay με τον Leinonen ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τον συντελεστή της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και της υδάτινης φάσης μέσα στη ζώνη της διεπιφάνειας ( $K_L$ ). Ο αναφερόμενος συντελεστής περιγράφεται από την εξίσωση, η οποία βασίζεται στην θεωρία των δύο φάσεων (two-film theory), στο μοντέλο πλήρης ανάδευσης του συστήματος (flux-matching boundary condition) και στην υπόθεση ότι η συνολική αντίσταση στην μεταφορά μάζας προέρχεται είτε από το λεπτό στρώμα της αέριας φάσης είτε της

υγρής ή και από τα δύο στρώματα που είναι παρακείμενα στην ζώνη της διεπιφάνειας δείγματος/υπερκείμενης φάσης.<sup>[50]</sup>

$$K_L = \left[ \frac{1}{k_L} + \frac{RT}{K_H k_g} \right]^{-1} \quad (4)$$

Όπου  $k_L$  είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην υδάτινη φάση,  $K_H$  είναι η σταθερά του Henry και  $k_g$  είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση.

Οι πτητικές ενώσεις μεταφέρονται πιο γρήγορα στην αέρια φάση καθώς έχουν μεγάλη τιμή σταθεράς Henry ( $K_H$ ) και τάση ατμών. Στις περιπτώσεις των ημιπτητικών ενώσεων, όπου χαρακτηρίζονται από μικρές τιμές  $K_H$  και χαμηλή τάση ατμών η αδιάστατη σταθερά Henry ( $K_H/RT$ ) η οποία δείχνει σε ποια φάση η ένωση θα βρίσκει τη μεγαλύτερη δυσκολία για να τη διαπεράσει.



Εικόνα 8. Εύρος τιμών σταθεράς Henry που σχετίζεται με την θέση της αντίστασης στους ρυθμούς εξάτμισης και την προβλεπόμενη επίδραση του κενού στη δειγματοληψία HSSPME νερού ή δειγμάτων που περιέχουν νερό

Παρακάτω ακολουθεί η περιγραφή του κριτηρίου της σταθεράς Henry, το οποίο για λόγους ευκολίας απεικονίζεται και στην παραπάνω εικόνα.

Η θετική επίδραση του κενού στην HSSPME είναι σημαντική για τιμές  $K_H$  κάτω από  $1,6 \times 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ , δεδομένου ότι κάτω από αυτό το όριο, η αντίσταση

της αέριας φάσης αρχίζει να ελέγχει περισσότερο από το 50% του ρυθμού εξάτμισης.

Συγκεκριμένα για τιμές κάτω από  $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$  (αναφερόμενη τιμή κατωφλιού για ενώσεις με χαμηλή  $K_H$ ), οι συνθήκες κενού θα έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην HSSPME επειδή κάτω από αυτή την τομή κατωφλιού, η αντίσταση της αέριας φάσης κυριαρχεί της εξάτμισης και αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 95% της συνολικής αντίστασης.<sup>[47]</sup>

Οι συνθήκες κενού δεν αναμένεται να έχουν σημαντική επιρροή στην κινητική της εκχύλισης HSSPME των αναλυτών με μεγαλύτερη τιμή  $K_H$  από  $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ . Πάνω από αυτή την τιμή, η αντίσταση της υγρής φάσης (ανεξάρτητα από τις συνθήκες πίεσης στον υπερκείμενο χώρο) αρχίζει να ελέγχει περισσότερο από το 50% του ρυθμού εξάτμισης.

Η δειγματοληψία Vac-HSSPME δεν θα επηρεάσει την κινητική της εκχύλισης των αναλυτών με  $K_H$  μεγαλύτερη από  $5 \cdot 10^{-3} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ . Αυτή η τιμή κατωφλιού αναφέρθηκε ως η κατά προσέγγιση τιμή  $K_H$  όπου η υγρή φάση ελέγχει περισσότερο από το 95% του ρυθμού εξάτμισης.

Ο μοριακός συντελεστής διάχυσης στην αέρια φάση ( $D_g$ ) της ένωσης- στόχου είναι ανεξάρτητος της πολικότητας των ενώσεων και αντιστρόφως ανάλογος της ολικής πίεσης (P). Η σχέση για τον υπολογισμό του  $D_g$  από τους Fuller-Schettler-Giddings παρουσιάζεται από τη σχέση (5).

$$D_g = \frac{0,001 \times T^{1,75} \times \sqrt{(1/M_{air}) + (1/M_c)}}{P \left[ (\Sigma V_{air})^{1/3} + (\Sigma V_c)^{1/3} \right]^2} \quad (5)$$

Όπου T είναι η απόλυτη θερμοκρασία,  $M_{air}$  και  $M_c$  είναι τα μοριακά βάρη για τον αέρα και την οργανική ένωση αντίστοιχα, P είναι η ολική πίεση,  $V_{air}$  και  $V_c$  είναι οι γραμμομοριακοί όγκοι του αέρα και της ένωσης αντίστοιχα. Ο συντελεστής μεταφοράς μάζας ( $k_g$ ) είναι σχετίζεται ανάλογα με τη μοριακή διάχυση των ενώσεων ( $D_g$ ) υψωμένη στην δύναμη m που παίρνει τιμές 1/2, 2/3, 1.

Η χρήση προ εκκενωμένης φιάλης πριν την εισαγωγή του δείγματος οδηγεί στην μείωση της ολικής πίεσης του κλειστού συστήματος. Αυτό έχει ως συνέπεια, με τη προϋπόθεση ότι η θερμοκρασία παραμένει σταθερή, να αυξηθεί ο συντελεστής της μοριακής διάχυσης ( $D_g$ ) των ημι-πτητικών ενώσεων. Η αύξηση του  $D_g$  οδηγεί σε αύξηση του συντελεστή μεταφοράς ( $K_L$ ), καθώς σχετίζονται ανάλογα, και στη συνέχεια αύξηση του συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση ( $k_g$ ). Επομένως στην περίπτωση των ημι-πτητικών ενώσεων η διαδικασία της εξάτμισης από την υδατική φάση στην υπερκείμενη φάση εξαρτάται από τον συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση και ο ρυθμός εξάτμισης αυξάνεται με την μείωση της πίεσης

του συστήματος. Η δειγματοληψία με τη μέθοδο HSSPME πριν φτάσει σε ισορροπία το σύστημα οδηγεί σε ταχύτερη εξάτμιση των αναλυτών καθώς η μείωση της συγκέντρωσής τους στην υπερκείμενη αέρια φάση κατά την δειγματοληψία (λόγω της ρόφησής τους πάνω στην ίνα) αναπληρώνεται αμέσως. Αυτό αποδεικνύει ότι το καθοριστικό στάδιο για όλη την διεργασία της HSSPME είναι η μεταφορά της μάζας από το υδάτινο δείγμα στην υπερκείμενη αέρια φάση και για αυτό στη HSSPME μέθοδο η ισορροπία επέρχεται ταχύτερα υπό συνθήκες κενού σε σύγκριση με αυτή υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

Το θεωρητικό μοντέλο που περιγράφει την θετική επίδραση της μειωμένης πίεσης στο χρονικό διάστημα πριν την ισορροπία σε δειγματοληψία HSSPME με χαμηλή συγγένεια για τον υπερκείμενο χώρο (δηλ. χαμηλή σταθερά Henry) διαμορφώθηκε και επαληθεύτηκε πειραματικά. Αν και οι συνθήκες χαμηλής πίεσης δειγματοληψίας δεν αναμένονταν να αυξήσουν την ποσότητα του αναλύτη που εξάγεται από την ίνα στην ισορροπία, βελτίωσαν σημαντικά την κινητική της εκχύλισης των ενώσεων με χαμηλή  $K_H$ . Για αυτούς τους αναλύτες εφαρμόζοντας την προσέγγιση της Vac-HSSPME, είχε ως αποτέλεσμα την υψηλή απόδοση εκχύλισης και υψηλή ευαισθησία σε μικρούς χρόνους δειγματοληψίας και σε ήπια θερμοκρασία δείγματος σε σχέση με την HSSPME υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Εκτός από την υψηλή ταχύτητα εκχύλισης, η ικανότητα της μεθόδου Vac-HSSPME να εμφανίζει υψηλή απόδοση σε ήπιες θερμοκρασίες ήταν ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό που επέτρεψε τη διατήρηση του χαρακτήρα του δείγματος εξαιρώντας προβλήματα όπως η αποσύνθεση του αναλύτη ή/και η δημιουργία άλλων στοιχείων.

Το κύριο εμπόδιο για την εφαρμογή της διαδικασίας Vac-HSSPME ήταν πιθανότατα η ανάγκη κατασκευής ενός αεροστεγούς δοχείου για την εισαγωγή του δείγματος καθώς δεν υπάρχουν εμπορικοί δειγματολήπτες που μπορούν να εγγυηθούν σταθερές συνθήκες χαμηλής πίεσης για μεγάλο χρόνο δειγματοληψίας με την HSSPME. Το σχέδιο που έχει προταθεί σε παλαιότερη έρευνα, είναι εύκολο να κατασκευαστεί και μπορεί να διατηρήσει συνθήκες σταθερής χαμηλής πίεσης για εκτεταμένους χρόνους δειγματοληψίας. Υπάρχει, επίσης, η λανθασμένη εντύπωση ότι η Vac-HSSPME είναι μία περίπλοκη μέθοδος για να εφαρμοστεί. Στην πραγματικότητα η διαδικασία διατηρεί την απλότητα της HSSPME και το μόνο επιπλέον βήμα που απαιτείται είναι η εκκένωση του αέρα από το δοχείο εισαγωγής του δείγματος.

Εκτός από τις ποσοτικές μελέτες Vac-HSSPME αρκετές έρευνες ανέφεραν ποιοτικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της χαμηλής πίεσης δειγματοληψίας στη δειγματοληψία HSSPME. Αν και σκοπός των ερευνών αυτών δεν ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση νέων αναλυτικών μεθόδων, όλοι ανέφεραν μία αξιοσημείωτη βελτίωση στην ευαισθησία της HSSPME όταν μειώνεται η πίεση της δειγματοληψίας, και ανάλογα με την περίπτωση, αύξησε τον αριθμό των προσδιορισμένων ενώσεων. Για παράδειγμα, δειγματοληψία HSSPME πτητικών ενώσεων από ακατέργαστη γαλοπούλα υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης και σε θερμοκρασία δωματίου είχε ως αποτέλεσμα μία αξιοσημείωτη ενίσχυση στα



χρωματογραφήματα της Vac-HSSPME σε σχέση με αυτά της κανονικής HSSPME.

Οι Darouzes κ.ά. ανέφεραν βελτιωμένες αποδόσεις εκχύλισης HSSPME για αιθυλιωμένα παράγωγα ενώσεων βουτυλίου και φαινυλαλτανίου από δείγματα νερού όταν γίνεται δειγματοληψίες υπό συνθήκες κενού. Η δειγματοληψία HSSPME σε συνθήκες χαμηλής πίεσης εφαρμόστηκε επίσης σε ανάλυση αρώματος (πτητικά συστατικά των φύλλων καπνού τσιγάρων και φρέσκο χυμό μουριάς) που έχει ως αποτέλεσμα τη βελτιωμένη ευαισθησία και τον αυξημένο αριθμό των εξαγόμενων στοιχείων. Τέλος, δειγματοληψία HSSPME υπό χαμηλή πίεση, χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη βελτίωση της ανάκτησης φωσφορικών επιφανειακών ρύπων από γυαλί.<sup>[45,46,47,48,49,50,51]</sup>

#### Ουσίες όπου εφαρμόζεται η Vac-HSSPME:

Κατά την δειγματοληψία της μεθόδου Vac-HSSPME στην ίνα προσκολλούνται κατά κύριο λόγο πτητικές και ορισμένες ημιπτητικές ουσίες. Αυτό συμβαίνει διότι οι πτητικές ουσίες έχουν σχετικά μικρή σταθερά κατανομής μεταξύ της υπερκείμενης αέριας φάσης και του στρώματος επικάλυψης της ίνας (k<sub>fh</sub>), εμφανίζουν μεγάλη σταθερά κατανομής μεταξύ του υγρού δείγματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης (k<sub>hs</sub>) και έχουν σχετικά μεγάλη σταθερά Henry (K<sub>H</sub>). Λόγω των τριών αυτών ιδιοτήτων, οι πτητικές ουσίες προτιμούν την αέρια φάση από την υγρή. Παρόλη την ευκινησία και την ευκολία με την οποία οι πτητικές ουσίες διαχέονται από την υδατική στην αέρια φάση, κατανέμονται δύσκολα στο εσωτερικό της επικάλυψης της ίνας λόγω του μικρού συντελεστή διάχυσης.<sup>[52,55,56]</sup>

Οι ημιπτητικές ενώσεις με την σειρά τους εμφανίζουν μεγάλη σταθερά κατανομής μεταξύ της υπερκείμενης αέριας φάσης και της επικάλυψης της ίνας (k<sub>fh</sub>), μικρή σταθερά κατανομής μεταξύ του υγρού δείγματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης (k<sub>hs</sub>) και μικρή σχετικά σταθερά του Henry (K<sub>H</sub>). Αυτές οι ουσίες προτιμούν την υγρή φάση αλλά κατανέμονται με μεγαλύτερη ευκολία στο εσωτερικό της επικάλυψης της ίνας λόγω του μεγάλου συντελεστή διάχυσης με αποτέλεσμα, κατά την ανάλυση ημιπτητικών ουσιών, να απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος ανάλυσης έτσι ώστε να έχει μεγαλύτερη ακρίβεια το πείραμα.<sup>[52,53,55]</sup>

Από τα παραπάνω, παρατηρείται ότι οι πτητικές ουσίες ευνοούνται κατά το στάδιο της δειγματοληψίας με την μέθοδο Vac-HSSPME, καθώς η δειγματοληψία γίνεται στην υπερκείμενη αέρια φάση, με έκθεση της ίνας, όπου είναι το ιδανικότερο περιβάλλον για τις πτητικές ουσίες. Όσο μειώνεται η σταθερά του Henry για διάφορες ουσίες τόσο αυξάνεται ο χρόνος που χρειάζεται για να επέλθει ισορροπία μεταξύ των τριών φάσεων (δείγματος υπερκείμενης αέριας-στρώμα ίνας). Αντίθετα, όσες ουσίες έχουν υψηλό συντελεστή οκτανόλης-νερού (K<sub>ow</sub>) και χαμηλή σταθερά Henry, δίνουν υψηλή ευαισθησία στην μέθοδο με μεγάλο όμως χρονικό διάστημα ως προς την ισορροπία των τριών φάσεων.<sup>[47,52,53,54,56]</sup>

Η μέθοδος Vac-HSSPME είναι πολύ σημαντική λόγω της υψηλής απόδοσης της έναντι της κανονικής HSSPME. Αν και βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνική. Παρακάτω φαίνεται ο πίνακας που παρουσιάζει τις εξεταζόμενες ενώσεις της εργασίας αυτής και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Από αυτόν τον πίνακα φαίνεται ότι οι ενώσεις Aldrin, Heptachlor epoxide, Endrin, Endosulfan II, DDD, Endrin aldehyde Endrin ketone έχουν συντελεστές Henry με τιμή μικρότερη της  $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ , όπου η αέρια φάση αρχίζει να ελέγχει περισσότερο από το 50% του ρυθμού εξάτμισης. Για αυτές τις ενώσεις η δειγματοληψία HSSPME υπό συνθήκες κενού αναμένεται να βελτιώσει την απόδοση της μεθόδου σημαντικά και να συντελέσει στην επιτάχυνση της διαδικασίας εκχύλισης. Για τις υπόλοιπες αναμένεται σχετικά ταχεία επίτευξη ισορροπίας και ως εκ τούτου οι συνθήκες πίεσης στον υπερκείμενο αέριο χώρο δεν αναμένεται να επηρεάσουν την απόδοση της μεθόδου εφόσον το σύστημα είναι σε ισορροπία.

Πίνακας 1. Φυσικοχημικές ιδιότητες εξεταζόμενων ενώσεων

Compounds	Molecular formula	Molecular weight (g/mol)	Water solubility at 25°C (mg/L)	Density (g/cm <sup>3</sup> )	Boiling point (°C)	Vapor pressure at 25°C (mm Hg)	log K <sub>ow</sub>	K <sub>H</sub> ((atm·m <sup>3</sup> )/mol)
Heptachlor	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub>	373,3177	0,0276	1,58	330,54	0,000238	6,1	4,236*10 <sup>-3</sup>
Aldrin	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub>	364,896	0,01415	1,6	389,26	1,87*10 <sup>-6</sup>	6,5	6,346*10 <sup>-5</sup>
Heptachlor epoxide	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>7</sub> O	389,3167	0,1991	1,91	340,81	8,99*10 <sup>-6</sup>	4,98	2,313*10 <sup>-5</sup>
γ-Chlordane	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>8</sub>	409,758	0,01299	1,6	351,09	2*10 <sup>-5</sup>	6,22	8,302*10 <sup>-4</sup>
Endrin	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	380,9089	1,216	1,72	339,62	1,7*10 <sup>-5</sup>	4,12	7,007*10 <sup>-6</sup>
Endosulfan II	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>6</sub> O <sub>3</sub> S	406,9239	1,487	1,74	401,28	1,25*10 <sup>-6</sup>	3,83	4,501*10 <sup>-7</sup>
DDD	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>	320,0412	0,06764	1,385	366,75	1,95*10 <sup>-5</sup>	6,02	1,214*10 <sup>-4</sup>
Endrin aldehyde	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	380,9089	1,216	1,72	339,62	1,7*10 <sup>-5</sup>	4,12	7,007*10 <sup>-6</sup>
DDT	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	354,4863	0,007307	0,99	367,95	7,47*10 <sup>-6</sup>	6,91	4,768*10 <sup>-4</sup>
Endrin ketone	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>6</sub> O	380,9089	1,216	1,72	339,62	1,7*10 <sup>-5</sup>	4,12	7,007*10 <sup>-6</sup>

### 3. Πειραματικό μέρος

#### 3.1. Εργαστηριακός Εξοπλισμός

##### 3.1.1. Αντιδραστήρια

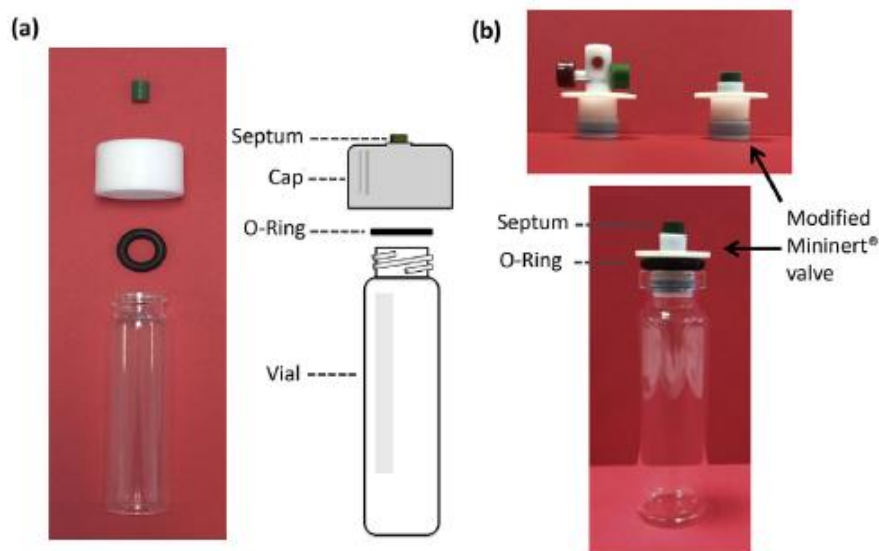
- Organochlorine Pesticide Mix AB#3 του οίκου Restek (Bellefonte, USA) και συγκέντρωσης  $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$ , Hexane / Toluene = 50:50
- Acetone της εταιρείας Honeywell (product of France), Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich και καθαρότητας  $\geq 99,5\%$
- Hexane for pesticide residue analysis της εταιρείας Fluka, Riedel-de Haën

Το πρότυπο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκε σε ακετόνη και ήταν συγκέντρωσης  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Επειδή το αρχικό αντιδραστήριο είχε μεγάλη συγκέντρωση ( $2000 \mu\text{g}/\text{mL} = 2000 \text{ ppm}$ ) παρασκευάστηκε ένα ενδιάμεσο διάλυμα συγκέντρωσης  $10 \text{ mg}/\text{L}$  και όγκου  $5 \text{ mL}$  παίρνοντας από το αρχικό  $25 \mu\text{L}$ . Το πρότυπο διάλυμα παρασκευάστηκε από το παραπάνω διάλυμα παίρνοντας  $25 \mu\text{L}$  και έχοντας τελικό όγκο  $5 \text{ mL}$ . Για τα καθημερινά διαλύματα χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό από τα συστήματα καθαρισμού ύδατος Barnstead EASYPURE II και Barnstead EASYpureRF της εταιρείας Thermo Scientific (Dubuque, USA). Επίσης σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι παρασκευάστηκε σε εξάνιο, διάλυμα συγκέντρωσης  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  και όγκου  $5 \text{ mL}$  το οποίο χρησιμοποιήθηκε για απευθείας ενέσεις του  $1 \mu\text{L}$  στον GC. Καθημερινά γίνονταν μία τέτοια ένεση πριν την έναρξη του πειράματος ώστε να γίνεται έλεγχος του σήματος του μηχανήματος ώστε να αποφευχθεί η οποιαδήποτε διαρροή.

##### 3.1.2. Όργανα και συσκευές

- ✓ Γυάλινο διαφανές φιαλίδιο με στρογγυλεμένο κάτω μέρος (SPME vial) των  $20 \text{ mL}$  με διαστάσεις  $75,5 \times 22,5 \text{ mm}$  και πτυχωτό λαιμό (Supelco, Bellefonte-USA)
- ✓ Γυάλινο διαφανές φιαλίδιο με στρογγυλεμένο κάτω μέρος των  $20 \text{ mL}$  με διαστάσεις  $75 \times 22 \text{ mm}$  και βιδωτό λαιμό (Restek, USA)
- ✓ Μαγνητικό βιδωτό πώμα διαμέτρου  $18 \text{ mm}$  με PTFE/Silicone (Restek, USA)
- ✓ Ειδικό τροποποιημένο πώμα που κλείνει αεροστεγώς
- ✓ Γυάλινο διαφανές φιαλίδιο των  $10 \text{ mL}$  με διαστάσεις  $22,5 \times 46 \text{ mm}$  (Supelco, Bellefonte-USA)
- ✓ Μαγνητάκια των  $11 \text{ mm}$  και  $25 \text{ mm}$  (Sigma Aldrich)
- ✓ Gastight SGE σύριγγα των  $10 \text{ mL}$  (Supelco, Bellefonte-USA)
- ✓ Μικροσύριγγες των  $2 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{L}$ ,  $25 \mu\text{L}$  και  $50 \mu\text{L}$  (Supelco, Bellefonte-USA)

- ✓ PDMS/DVB, SPME Fiber Assembly, 65μm, crosslinked
- ✓ PDMS, SPME Fiber Assembly, 100μm, fused silica, 24 Ga
- ✓ Πιπέτες των 10 mL και pipetus junior (hirschmann, laborgerate)
- ✓ Σέπτουμ, thermogreen LB-1 septa (conditioned and ready for use), half hole type (Supelco, Bellefonte-USA)
- ✓ Ογκομετρικές φιάλες των 25 mL (Normax, Portugal και PYREX, U.K.)
- ✓ Ογκομετρικές φιάλες των 50 mL (Glasfurn Duran, Germany)
- ✓ Ογκομετρικές φιάλες των 100 mL (Isolab, Germany)
- ✓ Ποτήρι ζέσεως των 100 mL, borosilicate glass 3.3
- ✓ Αντλία κενού Vacuubrand GMBH+CO KG, MZ 2C NT με τα χαρακτηριστικά: max 2.0/2.3 m<sup>3</sup>/h, 7.0 mbar, 230V, 50/60 Hz, 18A (Vacuubrand, Germany)
- ✓ Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης Heidolph MR 3001 K8 με τα χαρακτηριστικά 230V, 50/60 Hz, 825W και εύρος στροφών 100-1250 rpm
- ✓ GC-17A Gas Chromatograph με χαρακτηριστικά 230V, 50/60 Hz (Shimadzu Corporation, Japan)



Εικόνα 9. Διαδικασία σχεδιασμού τροποποιημένου πώματος για φιαλίδιο που χρησιμοποιείται για Vac-HSSPME



Εικόνα 10. Πειραματική διάταξη για Regular HSSPME



Εικόνα 11. Πειραματική διάταξη για Vac-HSSPME

### 3.2. Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα εργασία αναπτύσσονται δύο μέθοδοι, η μικροεκχύλιση στερεής φάσης με υπερκείμενη δειγματοληψία υπό συνθήκες κενού (Vacuum-HSSPME) και υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (regular HSSPME). Τα πειραματικά στάδια που ακολουθούνται και στις δύο μεθόδους είναι ίδια, με τη μόνη διαφορά στη μέθοδο Vacuum-HSSPME ότι χρειάζεται να γίνει εκκένωση του αέρα στο γυάλινο φιαλίδιο πριν την εισαγωγή του δείγματος.

Αρχικά σε ένα γυάλινο φιαλίδιο χωρητικότητας 20 mL τοποθετούνται ένας μικρός μαγνήτης και 7mL από το υδατικό διάλυμα το οποίο επιμολύνεται με την αντίστοιχη ποσότητα από το αρχικό πρότυπο διάλυμα των OCPs ανάλογα με τη συγκέντρωση που απαιτείται να επιτευχθεί. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιείται με τη βοήθεια της σύριγγας των 10 mL. Στη συνέχεια το φιαλίδιο τοποθετείται στο κέντρο της συσκευής ανάδευσης και θέρμανσης όπου και αφήνεται εκεί για 10 λεπτά προκειμένου το διάλυμα να αναδευθεί και έτσι να επέλθει ισορροπία. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου τοποθετείται η ίνα μέσω του ειδικά τροποποιημένου πώματος αν το πείραμα πραγματοποιείται υπό συνθήκες κενού ή μέσω του βιδωτού πώματος αν το πείραμα πραγματοποιείται υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης ώστε να ξεκινήσει η εκχύλιση που έχει διάρκεια 30 λεπτά. Ύστερα από το πέρας της εκχύλισης τοποθετείται η ίνα στην ειδική είσοδο που διαθέτει ο GC-ECD προκειμένου να γίνει η ανάλυση και παραμένει εκεί για 15 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται τρεις φορές.

### 3.3. Ανάλυση με GC-ECD

Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το σύστημα GC-17A κατασκευασμένο από την εταιρεία Shimadzu (Kyoto, Japan), το οποίο περιλαμβάνει τον ανιχνευτή λήψης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector – ECD). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιείται είναι η Agilent J&W GC Column με μήκος 30m, διάμετρο 0,25mm, φιλμ 0,25μm (Agilent Technologies, USA). Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου ήταν το ακόλουθο: αρχική θερμοκρασία 150°C, στη συνέχεια θέρμανση 4°C/min με τελική θερμοκρασία αυτή των 250°C και παραμονή σε αυτή για 3 λεπτά. Ο χρόνος ανάλυσης του προγράμματος είναι 28 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή παρέμενε στους 310°C. Η ροή του αερίου στη στήλη είναι 1,2 mL/min. Για τα πρώτα 5 λεπτά ανάλυσης ο διαχωριστής του εισαγωγέα παρέμενε κλειστός και στη συνέχεια εφαρμοζόταν λόγος διαχωρισμού 15:1.

## 4. Πειραματικά Αποτελέσματα και Συζήτηση

### 4.1. Προκαταρκτικές μελέτες

Πραγματοποιήθηκαν κάποια προκαταρκτικά πειράματα για τον προσδιορισμό της καταλληλότερης ίνας και του όγκου του διαλύματος. Επίσης έγινε και μία προκαταρκτική μελέτη όσον αφορά την εύρεση του καταλληλότερου προγράμματος ανάλυσης ώστε ο διαχωρισμός των ενώσεων να είναι όσο το δυνατό καλύτερος.

#### Επιλογή ίνας

Εξετάστηκαν δύο είδη επίστρωσης ινών, η PDMS/DVB (65μm) και η PDMS (100μm). Παρόλο που η PDMS/DVB έχει ικανή απορροφητικότητα σε ενώσεις με μεσαία πολικότητα, χρησιμοποιείται επίσης και για γενική ανάλυση των ημιπτητικών ενώσεων, η PDMS είναι η πιο συχνά αναγνωρισμένη ως η επίστρωση ινών με την καλύτερη απορροφητικότητα και την καλύτερη απόδοση διαχωρισμού για μη πολικές ενώσεις. Η PDMS έδειξε υψηλή απόδοση εκχύλισης, χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μεγαλύτερη ευαισθησία στις εξεταζόμενες ενώσεις. Επίσης είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη επίστρωση ινών για SPME για την εξαγωγή υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων από δείγματα φρούτων και λαχανικών και προτιμάται ειδικά για την εξαγωγή των μη πολικών φυτοφαρμάκων. Ωστόσο χρησιμοποιείται ευρέως για την εξαγωγή όλο και περισσότερων πολικών παρασιτοκτόνων, όμως ύστερα από την βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης. Η PDMS είναι ανθεκτική και αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες εγχυτήρων έως περίπου 300°C. Λαμβάνοντας υπόψη τις φυσικοχημικές ιδιότητες των οργανοχλωριωμένων ενώσεων, η εμφανής επιλογή της PDMS ως επίστρωση ίνας, χρησιμοποιήθηκε για να επιτύχει την καλύτερη επίδοση εκχύλισης.

### 4.2. Βελτιστοποίηση της μεθόδου

#### 4.2.1. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για τον έλεγχο της συμβατικής HSSPME. Η θέρμανση του δείγματος υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης βελτιώνει περαιτέρω την κινητική της εκχύλισης Vac-HSSPME. Για νερό και δείγματα που περιέχουν νερό, αυτή η ενίσχυση στην κινητική της εκχύλισης συμβαίνει ως μία ορισμένη τιμή θερμοκρασίας, πάνω από την οποία οι συνθήκες κενού μέσα στο δείγμα δεν μπορούν να διατηρηθούν λόγω της αύξησης της μερικής πίεσης όταν θερμαίνεται το δείγμα.

Τα πειράματα που αφορούν την παράμετρο της θερμοκρασίας για τις

μεθόδους vacuum και regular HSSPME έγιναν για τον ίδιο χρόνο εκχύλισης ο οποίος ήταν 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρουσιάζονται παρακάτω στα αντίστοιχα διαγράμματα. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η μέθοδος Vac-HSSPME παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την regular HSSPME.

Στην πράξη, η θεωρητική πρόβλεψη για την θετική επίδραση της θερμοκρασίας στις συνθήκες κενού δεν επαληθεύεται πάντα πειραματικά και πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η απόδοση της Vac-HSSPME σε υψηλότερες θερμοκρασίες δειγματοληψίας εξαρτάται από την παρουσία μορίων σε υγρή και αέρια φάση, τον βαθμό αλληλεπίδρασης τους με την ίνα και τη συγγένεια της ίνας με τους αναλύτες στόχους.

Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει την τάση ατμών του νερού και ως εκ τούτου την ποσότητα αυτού που υπάρχει στον υπερκείμενο χώρο. Έτσι τα μόρια ύδατος ανταγωνίζονται άλλα πτητικά μόρια και καταλαμβάνουν ένα μέρος ενεργών θέσεων στην προσροφητική επιφάνεια της επίστρωσης της ίνας με αποτέλεσμα να αφήνουν λιγότερες διαθέσιμες θέσεις για την προσρόφηση των πτητικών μορίων. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες ( $>60^{\circ}\text{C}$ ) έχουν δυσμενή επίδραση στην Vac-HSSPME καθώς η αυξημένη υγρασία στον υπερκείμενο χώρο επηρεάζει τα χαρακτηριστικά της ίνας. Κατά τη Vac-HSSPME δειγματοληψία σε δεδομένη θερμοκρασία, παρατηρούμε ότι η επίστρωση της ίνας απορροφά αέρια μόρια πολύ ταχύτερα από την συμβατική HSSPME, δεδομένου ότι το ποσοστό των μορίων σε έναν χώρο εκκενωθέντα από αέρα που συγκρούεται με την ίνα είναι μεγαλύτερο από εκείνο με την παρουσία αέρα.

Οι ρυθμοί εξάτμισης των χημικών ενώσεων μπορούν να ελεγχθούν κατά τη μεταφορά μάζας στην υγρή φάση, στην αέρια φάση ή σε συνδυασμό και των δύο ανάλογα με την τιμή της σταθεράς Henry ( $K_H$ ). Στο πλαίσιο αυτό αρκετές προηγούμενες αναφορές υποδεικνύουν ότι η αντίσταση μεταφοράς μάζας στην υγρή φάση ελέγχει περισσότερο από το 95% του ρυθμού εξάτμισης όταν η τιμή της  $K_H$  είναι μεγαλύτερη από  $5 \cdot 10^{-3} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ . Αν η τιμή της  $K_H$  είναι μικρότερη από  $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ , η αέρια φάση ελέγχει περισσότερο από το 50% του ρυθμού εξάτμισης. Αν η τιμή της  $K_H$  βρίσκεται ενδιάμεσα των δύο παραπάνω τιμών τότε η μεταφορά μάζας στην αέρια και την υγρή φάση είναι εξίσου σημαντικές.

Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο αυξάνονται και οι σταθερές Henry των ενώσεων, με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι συντελεστές διάχυσης, συνεπώς η απόδοση της εκχύλισης είναι υψηλότερη και ευνοούμενος χώρος είναι ο υπερκείμενος χώρος.<sup>[58,59]</sup>

Η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης μπορεί να έχει δραματική βελτίωση στην ταχύτητα της εκχύλισης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας δειγματοληψίας, ο συντελεστής μοριακής διάχυσης της ένωσης στην αέρια φάση  $D_g$  αυξάνεται, με αποτέλεσμα να έχουμε ταχύτερους χρόνους ισορροπίας.

Το μειονέκτημα όταν εφαρμόζονται σχετικά υψηλές θερμοκρασίες δειγματοληψίας και εκχύλισης είναι ότι ενδέχεται να μειωθεί ο συντελεστής κατανομής μεταξύ της ίνας-υπερκείμενης φάσης  $K_f$ , και ως εκ τούτου να μειωθεί το τελικό ποσό αναλύτη που μπορεί να εκχυλιστεί από την ίνα.<sup>[58,59,60]</sup>

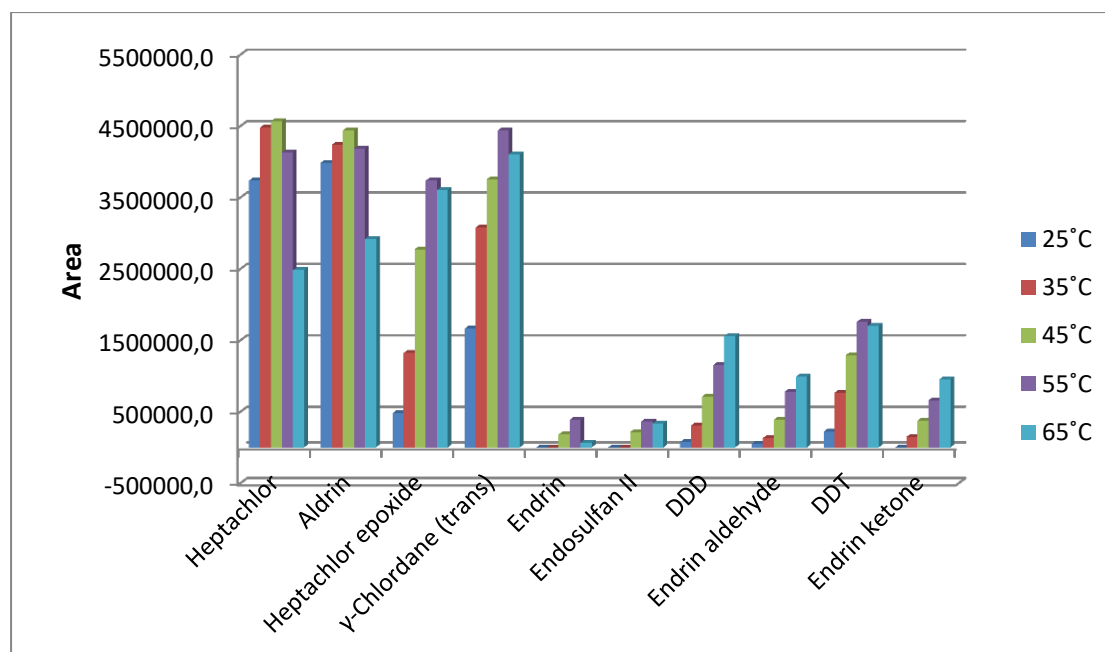
Για τον λόγο αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η θερμοκρασία εκχύλισης



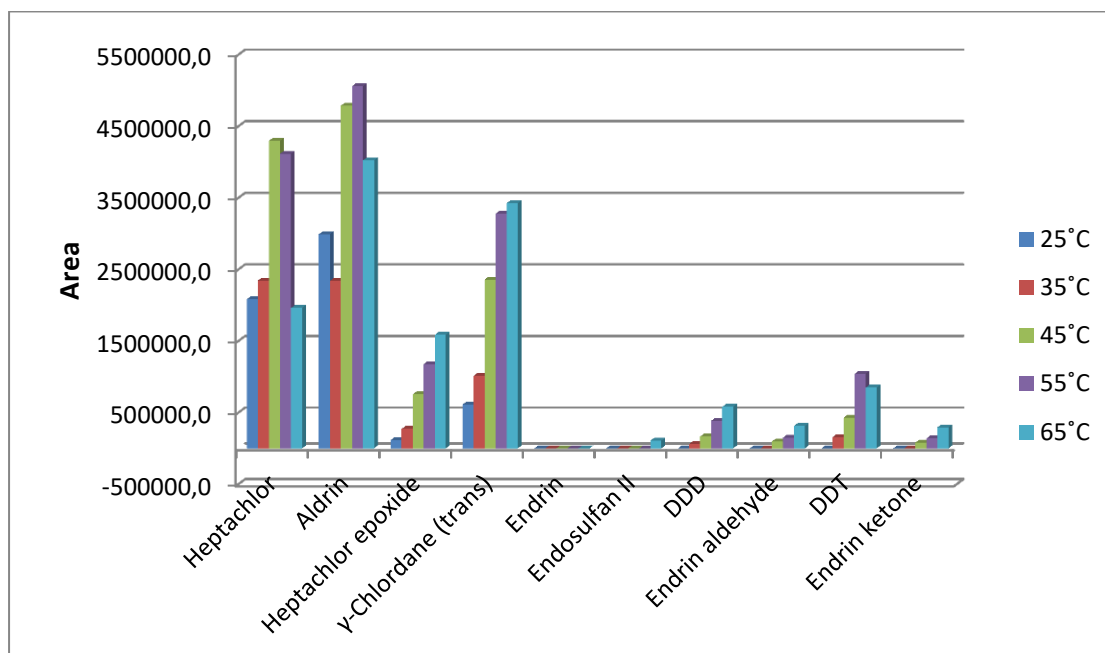
έτσι ώστε να βελτιστοποιείται η εκχύλιση των ημιπτητικών ουσιών στην υπερκείμενη φάση.

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της θερμοκρασίας με χρήση της μεθόδου Vac-HSSPME και στο διάγραμμα 2 της μεθόδου regular HSSPME. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1, και στις δύο μεθόδους η αύξηση της θερμοκρασίας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της εκάστοτε μεθόδου. Εξαίρεση αποτέλεσε το Heptachlor, Aldrin και Endrin όπου στους 65°C μείωση της απόδοσης της εκάστοτε μεθόδου πιο πιθανά λόγω της αντίστοιχης μείωσης του συντελεστή κατανομής μεταξύ αέριας φάσης και ίνας κάτω και από τις δύο συνθήκες πίεσης. Η βέλτιστη θερμοκρασία και για τις δύο μεθόδους επιλέχθηκε να είναι αυτή των 55°C.

Με βάση τα αποτελέσματα στη βέλτιστη αυτή θερμοκρασία ο λόγος των αποτελεσμάτων επιφάνειας για κάθε αναλύτη υπό δειγματοληψία κενού σε σχέση με δειγματοληψία υπό κανονικές συνθήκες (Vac / Regular peak area ratios) κυμάνθηκαν από 0,83-5,27 (για το Heptachlor 1, για το Aldrin 0,83, για το Heptachlor epoxide 3,17, για το γ-Chlordane 1,35, για το DDD 3, για το Endrin aldehyde 5,27 και για το DDT 1,69). Για τιμές κοντά στη μονάδα, οι λόγοι αυτοί υποδηλώνουν ότι η διαδικασία εκχύλισης για τη συγκεκριμένη ένωση-στόχο βρίσκεται σε ισορροπία με αποτέλεσμα να μην επηρεάζουν οι συνθήκες πίεσης τον υπερκείμενο αέριο χώρο. Εξάλλου τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα καθώς όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι ενώσεις αυτές έχουν συντελεστή κατανομής Henry που υποδεικνύει ότι η υγρή φάση ελέγχει σε μεγαλύτερο ποσοστό του 50% τη διαδικασία εξάτμισης της εκάστοτε ένωσης.



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα θερμοκρασίας για την μέθοδο Vac-HSSPME



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα θερμοκρασίας για την μέθοδο Regular HSSPME

#### 4.2.2. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης

Προκειμένου να ερευνηθεί η επίδραση του χρόνου στην απόδοση της εκχύλισης το υδατικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε είχε συγκέντρωση 5 ng/L. Στα εξεταζόμενα δείγματα, υιοθετώντας την προσέγγιση της Vac-HSSPME, οι συνθήκες κενού βρέθηκαν να βελτιώνουν την κινητική της εκχύλισης και να έχουν δραματική επίδραση σε αυτή, με αποτέλεσμα να οδηγούν σε μικρότερους χρόνους εκχύλισης σε σύγκριση με την προσέγγιση της regular HSSPME.

Ο χρόνος μετά τον οποίο η ποσότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών παραμένει σταθερή και ανταποκρίνεται στη ν ποσότητα που εκχυλίζεται σε άπειρο χρόνο, είναι ο χρόνος ισορροπίας. Ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζεται από το πάχος της επικάλυψης της ίνας και είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται η λεπτότερη επικάλυψη η οποία δίνει αποδεκτή ευαισθησία.<sup>[57]</sup>

Παρατηρούμε ότι η μέθοδος HSSPME είναι πολύ πιο αποτελεσματική και γρήγορη υπό συνθήκες κενού απ' ότι υπό συνθήκες κανονικής πίεσης. Η Vac-HSSPME αυξάνει αποτελεσματικά την μέθοδο μόνο όταν οι συνθήκες μειωμένης πίεσης παραμένουν σταθερές μέσα στο φιαλίδιο δειγματοληψίας.

Η μείωση της πίεσης βοηθάει τον αναλυτή να εντοπίσει κυρίως ημιπτητικές ενώσεις, ουσίες δηλαδή που χαρακτηρίζονται από χαμηλό  $K_H$  και χαμηλές σταθερές κατανομής μεταξύ της υπερκείμενης αέριας φάσης και της ίνας, αντί πτητικών ενώσεων. Αυτό συμβαίνει διότι οι πτητικές ουσίες έχουν ήδη πολύ μικρό χρόνο

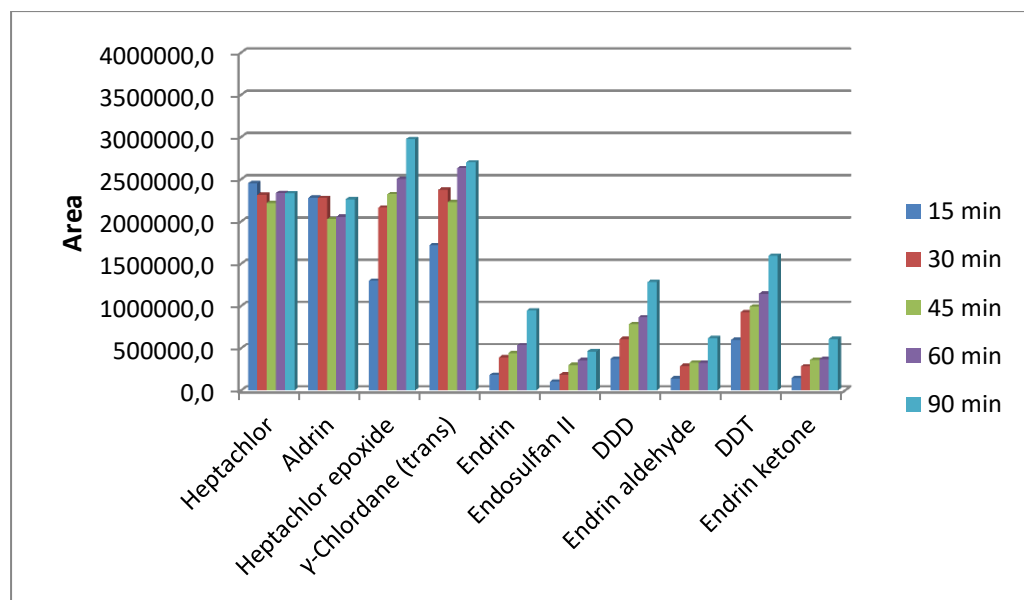
εκχύλισης και δεν παρατηρείται ιδιαίτερη επίδραση κατά την διαδικασία εκχύλισης των ουσιών αυτών.<sup>[52,53]</sup>

Για ενώσεις με χαμηλή  $K_H$  και μεγάλη τιμή  $K_{OW}$  αναμένεται μεγαλύτερος χρόνος ισορροπίας. Η θετική επίδραση της μειωμένης πίεσης στην Vac-HSSPME είναι έντονη ακόμα και για παρατεταμένο χρόνο δειγματοληψίας.

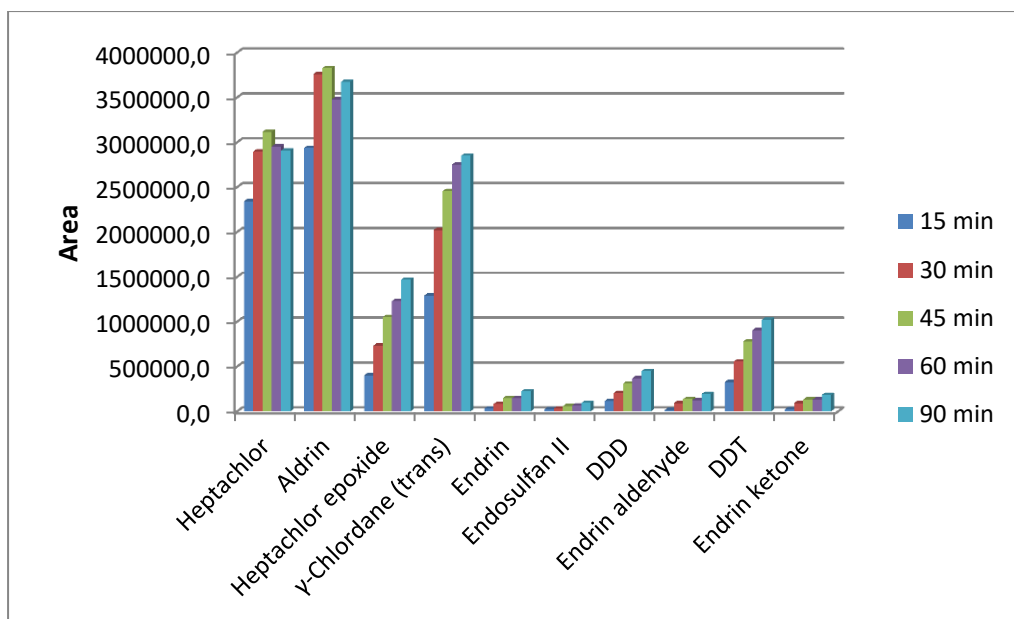
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρουσιάστηκε αύξηση της προσρόφησης των ενώσεων στην επίστρωση της ίνας με τον χρόνο. Αυτή η παρατήρηση ήταν πιο εμφανής με την Vac-HSSPME, δεδομένου ότι όλοι οι αναλυόμενοι στόχοι έφταναν στο μέγιστο γρηγορότερα.

Τα πειράματα του χρόνου εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 55°C και ανάδευση στα 500 rpm τόσο για την Vac-HSSPME όσο και για την regular HSSPME. Οι χρόνοι που μελετήθηκαν ήταν τα 15, 30, 45, 60 και 90 λεπτά.

Όπως παρατηρείται στα παρακάτω διαγράμματα, στη μέθοδο Vac-HSSPME χρειάζεται λιγότερος χρόνος εκχύλισης για να επέλθει ισορροπία, άρα σε μικρότερο χρονικό διάστημα επιτυγχάνεται το ίδιο αποτέλεσμα. Αυτό επιτρέπει την πραγματοποίηση μεγαλύτερου αριθμού δειγματοληψιών κατά τη διάρκεια της πειραματικής μέρας. Στη μέθοδο Vac-HSSPME παρατηρείται ότι επιτυγχάνεται πιο γρήγορα ισορροπία σε σχέση με τη συμβατική HSSPME και ειδικά οι ενώσεις heptachlor και aldrin ήδη από τα 15 λεπτά όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3 έχουν φτάσει σε ισορροπία.



Διάγραμμα 3. Διάγραμμα χρόνου εκχύλισης για τη μέθοδο Vac-HSSPME



Διάγραμμα 4. Διάγραμμα χρόνου εκχύλισης για τη μέθοδο Regular HSSPME

Ως βέλτιστος χρόνος εκχύλισης στην Vac-HSSPME επιλέχθηκαν τα 30 min και στην regular HSSPME τα 45min.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για τις μεθόδους Vac-HSSPME και regular HSSPME.

Πίνακας 2. Συνθήκες που επιλέχθηκαν για Vac-HSSPME και Regular HSSPME

Παράμετρος	Vac-HSSPME	Regular HSSPME
Θερμοκρασία	55°C	55°C
Όγκος διαλύματος	7mL	7mL
Χρόνος εκχύλισης	30 min	45 min
Ανάδευση	1000 rpm	1000 rpm

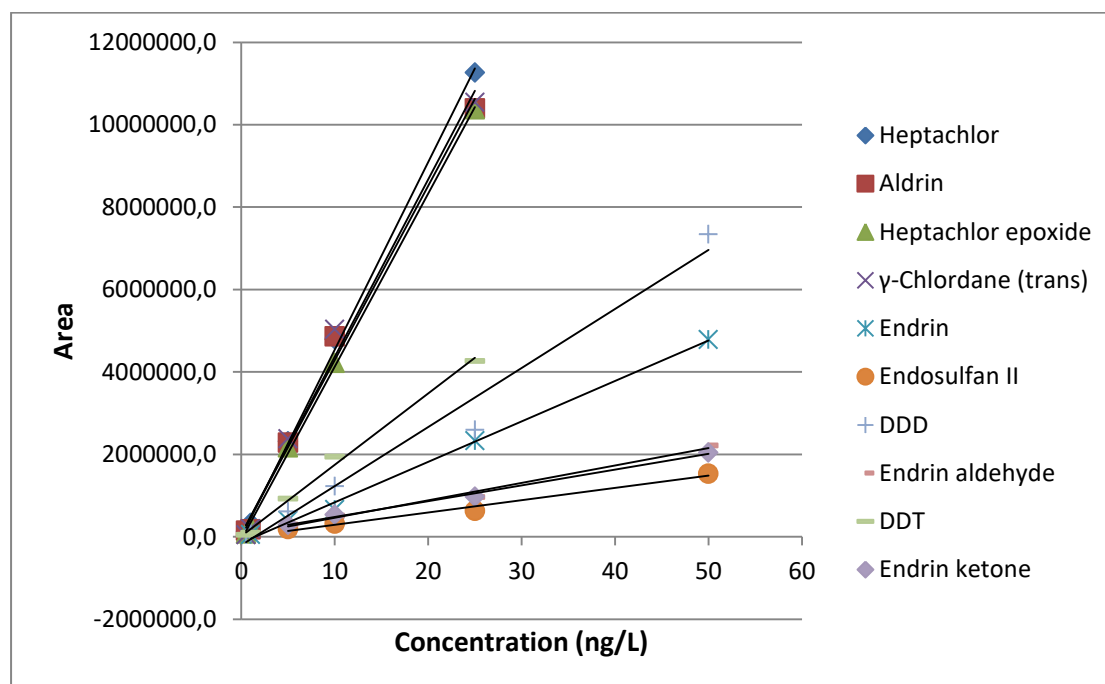
## 5. Αξιολόγηση της μεθόδου

Τα πειράματα για την αξιολόγηση της μεθόδου έγιναν στις βέλτιστες συνθήκες που επιλέχθηκαν προηγουμένως με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα.

### 5.1. Γραμμικότητα

#### Μέθοδος Vac-HSSPME

Η γραμμικότητα της μεθόδου Vac-HSSPME ερευνήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 0,5 ng/L έως 50 ng/L. Βέβαια κάποιες ενώσεις δεν ανιχνεύονταν σε χαμηλές συγκεντρώσεις και συγκεκριμένα στα 0,5 και 1 ng/L. Οι Endosulfan II, Endrin aldehyde και Endrin ketone είναι οι ενώσεις που δεν ήταν ανιχνεύσιμες στα 0,5 και 1 ng/L και η Endrin δεν ήταν ανιχνεύσιμη στα 0,5 ng/L. Επίσης υπήρχαν και ενώσεις που στα 50 ng/L είχαν τόσο δυνατό σήμα που οι κορυφές τους κόβονταν στο χρωματογράφημα. Αυτές οι ενώσεις ήταν οι Heptachlor, Aldrin, Heptachlor epoxide και γ-Chlordane. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα της γραμμικότητας για τη μέθοδο Vac-HSSPME παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα. Από τους συντελεστές συσχέτισης που έχουν προκύψει, παρατηρείται ότι η γραμμικότητα της μεθόδου είναι πολύ καλή.



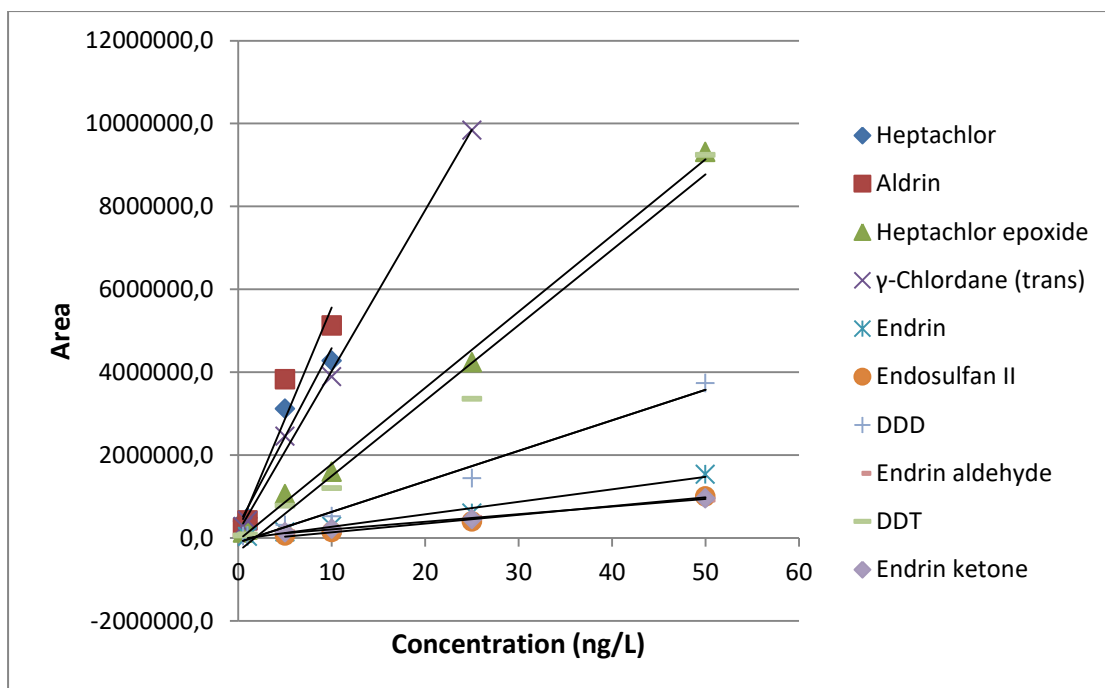
Διάγραμμα 5. Διάγραμμα γραμμικότητας για Vac-HSSPME

Πίνακας 3. Εξισώσεις ευθείας και συντελεστές συσχέτισης διαγράμματος γραμμικότητας για Vac-HSSPME

Compounds	Εύρος συγκεντρώσεων μελέτης (ng/L)	Εξίσωση ευθείας	Συντελεστής συσχέτισης R <sup>2</sup>
Heptachlor	0,5-25	$y = 455225x - 10666$	0,9989
Aldrin	0,5-25	$y = 422451x + 65286$	0,9931
Heptachlor epoxide	0,5-25	$y = 419554x - 64446$	0,9994
γ-Chlordane (trans)	0,5-25	$y = 430055x + 68793$	0,9908
Endrin	1-50	$y = 98133x - 143227$	0,9971
Endosulfan II	5-50	$y = 29733x - 4477,4$	0,9840
DDD	0,5-50	$y = 143178x - 199308$	0,9787
Endrin aldehyde	5-50	$y = 42189x + 43220$	0,9883
DDT	0,5-25	$y = 172993x + 16472$	0,9953
Endrin ketone	5-50	$y = 38357x + 94710$	0,9940

### Μέθοδος Regular HSSPME

Η γραμμικότητα της μεθόδου Regular-HSSPME ερευνήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 0,5 ng/L έως 50 ng/L. Βέβαια κάποιες ενώσεις δεν ανιχνεύονταν σε χαμηλές συγκεντρώσεις και συγκεκριμένα στα 0,5 και 1 ng/L. Οι Endosulfan II, Endrin aldehyde και Endrin ketone είναι οι ενώσεις που δεν ήταν ανιχνεύσιμες στα 0,5 και 1 ng/L και η Endrin δεν ήταν ανιχνεύσιμη στα 0,5 ng/L. Επίσης υπήρχαν και ενώσεις που στα 50 ng/L είχαν πολύ δυνατό σήμα για τον ανιχνευτή. Αυτές οι ενώσεις ήταν οι Heptachlor, Aldrin και γ-Chlordane. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα της γραμμικότητας για τη μέθοδο Regular HSSPME παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα. Από τους συντελεστές συσχέτισης που έχουν προκύψει, παρατηρείται ότι η γραμμικότητα της μεθόδου είναι πολύ καλή.



Διάγραμμα 6. Διάγραμμα γραμμικότητας για Regular HSSPME

Πίνακας 4. Εξισώσεις ευθείας και συντελεστές συσχέτισης διαγράμματος γραμμικότητας για Regular HSSPME

Compounds	Εύρος συγκεντρώσεων μελέτης (ng/L)	Εξίσωση ευθείας	Συντελεστής συσχέτισης R <sup>2</sup>
Heptachlor	0,5-10	$y = 427409x + 308880$	0,9449
Aldrin	0,5-10	$y = 537409x + 189326$	0,9316
Heptachlor epoxide	0,5-50	$y = 183693x - 48548$	0,9967
γ-Chlordane (trans)	0,5-25	$y = 387709x + 155872$	0,9971
Endrin	1-50	$y = 30120x - 27750$	0,9866
Endosulfan II	5-50	$y = 20982x - 70277$	0,9924
DDD	0,5-50	$y = 73636x - 104031$	0,9856
Endrin aldehyde	5-50	$y = 17828x + 31876$	0,9973
DDT	0,5-50	$y = 181853x - 318665$	0,9804
Endrin ketone	5-50	$y = 18222x + 30174$	0,9960

## 5.2. Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα της κάθε μεθόδου, εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD), αξιολογήθηκε με την εκτέλεση πέντε πειραματικών αναλύσεων σε συγκέντρωση 10 ng/L, σε θερμοκρασία 55°C και ανάδευση 1000rpm.

### Μέθοδος Vacuum HSSPME

Για τη μέθοδο Vacuum HSSPME, τα πειράματα επαναληψιμότητας έγιναν για χρόνο εκχύλισης 30 λεπτά. Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται οι τυπικές αποκλίσεις (RSD) για τις εξεταζόμενες ενώσεις.

Πίνακας 5. Τυπικό σφάλμα για Vacuum HSSPME

Ένωση	RSD (%)
Heptachlor	12,2
Aldrin	9,6
Heptachlor epoxide	11,9
$\gamma$ -Chlordane (trans)	16,7
Endrin	15,0
Endosulfan II	7,2
DDD	13,0
Endrin aldehyde	8,9
DDT	12,8
Endrin ketone	7,5

### Μέθοδος Regular HSSPME

Για τη μέθοδο Regular HSSPME, τα πειράματα επαναληψιμότητας έγιναν για χρόνο εκχύλισης 45 λεπτά. Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται οι τυπικές αποκλίσεις (RSD) για τις εξεταζόμενες ενώσεις.

Πίνακας 6. Τυπικό σφάλμα για Regular HSSPME

Ένωση	RSD (%)
Heptachlor	6,5
Aldrin	8,4
Heptachlor epoxide	12,2
$\gamma$ -Chlordane (trans)	7,4
Endrin	18,2
Endosulfan II	6,0
DDD	12,2
Endrin aldehyde	14,0
DDT	9,6
Endrin ketone	10,7



### 5.3. Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα

Στη δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου η ίνα δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το υδατικό διάλυμα με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση ενώσεων από διάφορα και πολύπλοκα διαλύματα. Παλαιότερα έγινε εφαρμογή της μεθόδου για εκχύλιση αιθυλιωμένων παραγώγων ενώσεων βουτυλίου και φαινυλαλτανίου, για την ανάλυση αρώματος, για την ανάκτηση φωσφονιακών επιφανειακών ρύπων από γυαλί κ.ά.. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν δείγματα από τρεις χυμούς με τη μέθοδο Vac-HSSPME (χωρίς προσθήκη των ενώσεων) για την ανίχνευση οργανοχλωριωμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Το αποτέλεσμα από αυτή την έρευνα έδειξε ότι δεν υπήρχε κάποιο ίχνος από τις εξεταζόμενες ενώσεις σε αυτούς τους τρεις χυμούς.

## 6. Συμπεράσματα

Η μέθοδος δειγματοληψίας υπερκείμενου χώρου με μικροεκχύλιση στερεής φάσης υπό συνθήκες κενού που μελετάται στη συγκεκριμένη εργασία είναι μία αποτελεσματική μέθοδος καθώς είναι απλή, γρήγορη, αποδοτική, επιλεκτική και απαιτεί μικρούς όγκους δειγμάτων. Εκτός από τα παραπάνω πλεονεκτήματα της μεθόδου, ένα ακόμα είναι η ανίχνευση πολύ μικρών συγκεντρώσεων οργανικών ρύπων. Η χρήση φιαλιδίου εκκενωμένου από αέρα προκαλεί μείωση της ολικής πίεσης του συστήματος με συνέπεια τη μείωση της αντίστασης που αντιμετωπίζουν οι ημιπτητικές ενώσεις στην αέρια φάση. Επακόλουθο της παραπάνω διαδικασίας είναι η μεταφορά των ημιπτητικών ενώσεων αυτών από την υδατική στην υπερκείμενη φάση. Το παραπάνω οδηγεί σε μείωση του χρόνου ισορροπίας του συστήματος και σε συνέχεια μείωση του χρόνου δειγματοληψίας σε σχέση με τη μέθοδο Regular HSSPME, της οποίας και υπερτερεί επειδή έχει καλύτερη ευαισθησία και ακρίβεια, αλλά και υψηλότερη απόδοση.

## 7. Βιβλιογραφία

1. US Environmental, What is a pesticide?, Basic Information about pesticide ingredients, [www.epa.gov](http://www.epa.gov), 2007
2. “International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides”, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2002
3. Rao GV, Rupela OP, Rao VR, Reddy YV, “Role of biopesticides in crop protection: present status and future prospects”, Indian Journal of Plant Protection, 2007
4. Miller GT, “Living in the Environment” (12<sup>th</sup> edition), Belmont: Wadsworth/Thomson Learning, 2002
5. Ritter SR, “Pinpointing Trends In Pesticide Use In 1939”, Chemical and Engineering News, ACS Publications, 2009
6. Goldman LR, “Managing pesticide chronic health risks: US policies”, Journal of Agromedicine, 2007
7. Daly H., Doyen JT, and Purcell AH III, “Introduction to insect biology and diversity” (2<sup>nd</sup> edition), Chapter 14, Oxford University Press, New York, 1998
8. Murphy G., “Pesticide Rotation”, Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2005
9. Miller GT, “Chapter 9”, Sustaining the Earth (6<sup>th</sup> edition), Pacific Grove, California: Thompson Learning, 2004
10. Arnold L.Aspelin, “PESTICIDE USAGE IN THE UNOTED STATES: Trends During the 20<sup>th</sup> Century”, NSF CIPM Technical Bulletin 105, 2003
11. Lobe J, “WHO urges DDT for malaria control strategies, Inter Press Service, 2006
12. “Pesticides Industry Sales and Usage 2008-2012”, US EPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov), 2012
13. “US: Number of households 1960-2017”, Statista, 2018
14. “Market Study: Crop Protection”, Ceresana research, 2012
15. Wenjun Zhang, “Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more”, [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net), 2018
16. “Classification of Pesticides Based on Origin and Pest Control”, [www.biotechnologyforums.com](http://www.biotechnologyforums.com), 2012
17. Ishwar Chandra Yadav, Ningombam Linthoingambi Devi, “Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment”, [www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)
18. U.S. Environmental Protection Agency, “Pesticides: Health and Safety”, National Assessment of the Worker Protection Workshop #3, [www.epa.gov](http://www.epa.gov), 2007
19. “Human Health Issues|Pesticides|US EPA”, [www.epa.gov](http://www.epa.gov) , 2006
20. Bassil KL, Vakil C, Sanborn M., Cole DC, Kaur JS, Kerr KJ, “Cancer health effects of pesticides: systematic review”, Official Publication of The College of Family Physicians of Canada, US National Library of Medicine, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), 2007
21. Jurewicz J, Hanke W, “Prenatal and childhood exposure to pesticides and neurobehavioral development: review of epidemiological studies”,

- International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, US National Library of Medicine , [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), 2008
22. Weselak M., Arbuckle TE, Foster W., “Pesticide exposures and developmental outcomes: the epidemiological evidence”, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Critical Reviews, [www.tandfonline.com](http://www.tandfonline.com) , 2007
  23. Wigle DT, Arbuckle TE, Turner MC, Bérubé A, Yang Q., Liu S., Krewski D., “Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants”, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Critical Reviews, [www.tandfonline.com](http://www.tandfonline.com) , 2008
  24. Mink PJ, Mandel JS, Lundin JI, Scurman BK, “Epidemiologic studies of glyphosate and non-cancer health outcomes: a review”, Regulatory Toxicology and Pharmacology, [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) , 2011
  25. Sanborn M., Kerr KJ, Sanim LH, Cole DC, Bassil KL, Vakil C., “Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors”, Official Publication of The College of Family Physicians of Canada, US National Library of Medicine, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), 2007
  26. Goldmann L., “Childhood Pesticide Poisoning”, Information for Advocacy and Action, World Health Organization, <http://www.who.int> , 2004
  27. Jeyaratham J, “Acute pesticide poisoning: a major global health problem”, World Health Statistics Quarterly, US National Library of Medicine, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) , 1990
  28. “Pesticide Illness & Injury Surveillance”, NIOSH Workplace Safety and Health Topic, [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov) , 2016
  29. Wells M., “Vanishing bees threaten US crops”, BBC News, [www.bbc.co.uk](http://www.bbc.co.uk) , 2007
  30. Palmer WE, Bromley PT., Brandenburg RL, “Wildlife & Pesticides – Peanuts”, North Carolina Cooperative Extension Service, 2007
  31. Sims GK, Cupples AM, “Factor controlling degradation of pesticides in soil”, Pesticide Science, 1999
  32. Sims GK, Sommers LE, “Biodegradation of pyridine derivatives in soil suspensions”, Environmental Toxicology and Chemistry, [www.setac.onlinelibrary.wiley.com](http://www.setac.onlinelibrary.wiley.com) , 1986
  33. Wolt JD, Smith JK, “Products and kinetics of choramsulam-methyl aerobic soil metabolism”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, [www.pubs.acs.org](http://www.pubs.acs.org), 1996
  34. “Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response”, EPA, [www.epa.gov](http://www.epa.gov)
  35. Τσιουμπλέκου Μαρία, “Οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα στο περιβάλλον”, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα, 2005
  36. Cremly R.J., “Agrochemicals-Preparation and Mode of Action, John Wiley & Son, 1985
  37. Brown A., “Ecology of Pesticides”, John Wiley & Son, Part I, 1978

38. Garabrant D.H., Held J., Langholz B., Peters J.M., Mack T.M., “DDT and Related Compounds and Risk of Pancreatic Cancer”, Journal of the National Cancer Institute, 2001
39. Βαλαβανίδης Α., “Ίχνη φυτοφαρμάκων στο πιάτο μας”, Η Νέα Οικολογία, Αθήνα, 1989
40. “Χρωματογραφία”, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, [www.bat.uoi.gr](http://www.bat.uoi.gr)
41. Παπαδογιάννης Ι.Ν., Σαμανίδου Β.Φ., Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών, Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Θεσσαλονίκη 2001
42. Χατζιωάννου Θ.Π., Κουμπάρης Μ.Α., Αέρια Χρωματογραφία-Φασματομετρία μαζών, Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Αθήνα 2003
43. Αργυρόπουλος Ν., Βαρέλλα Μ., Σημειώσεις Πειραματικής Οργανικής Χημείας – Α΄, Α.Π.Θ., 1997
44. Βικτώρια Σαμανίδου, Κεφάλαιο 6: Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων, Εκδόσεις Πήγασος, 2000
45. Eleftheria Psillakis, Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction: A tutorial review, Analytica Chimica Acta, 2017
46. Meekin Chai, Guanhuat Tan, Asha LAL, Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction for the Determination of Pesticides Residues in Vegetables and Fruits, Analytical Sciences, The Japan Society for Analytical Chemistry, 2008
47. Eleftheria Psillakis, Antonia Mousouraki, Evangelia Yiantzi, Nicolas Kalogerakis, Effect of Henry’s law constant and operating parameters on vacuum-assisted headspace solid phase microextraction, Journal of Chromatography A, 2012
48. María J. Trujillo-Rodríguez, Verónica Pino, Eleftheria Psillakis, Jared L. Anderson, Evangelia Yiantzi, Ana M. Afonso, Vacuum-assisted headspace-solid phase microextraction for determining volatile free fatty acids and phenols, Investigations on the effect of pressure on competitive adsorption phenomena in a multicomponent system, Analytica Chimica Acta, 2017
49. Lukman Bola Abdulra’uf, Wasin Adebayo Hammed, Guan Huat Tan, SPME fibers for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables: A Review, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2012
50. Eleftheria Psillakis, Evangelia Yiantzi, Lucia Sanchez-Prado, Nicolas Kalogerakis, Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction: Improved extraction of semivolatiles by non-equilibrium headspace sampling under reduced pressure conditions, , Analytica Chimica Acta, 2012
51. Mee Kin Chai, Guan Huat Tan, Validation of a solid-phase microextraction procedure with gas chromatography-electron capture detection of pesticide residues in fruits and vegetables, Food Chemistry, 2009
52. Τσιγαρίδα Αναστασία, 2011. Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση οργανοχλωριωμένων ενώσεων με χρήση μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

53. Αντωνία Μουσουράκη, Χανιά (2012). Διερεύνηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού “Vac-HSSPME”, Πολυτεχνείου Κρήτης, Χανια
54. Pawliszyn J. 1997. Solid Phase Microextraction, Theory and Practice. Wiley-VHC
55. Pawliszyn J., Pawliszyn B. Pawliszyn M., 1997. The chemical Educator, vol. 2, No 4.
56. Haiou Zhu, Zhigang Lu, Jianjun Li and Lirong Gao. Development of a headspace–SPME– GC/MS method to determine volatile organic compounds released from textiles. China 2009
57. Μπούκη Χρυσούλα, 2008. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΕΝΕΨΛΟΔΑΙΝΟΛΗΣ ΣΕ BIOMAZA ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ.
58. Ai, J., 1997. Headspace Solid Phase Microextraction. Dynamics and Quantitative Analysis before Reaching a Partition Equilibrium. Anal. Chem.
59. Pawliszyn, J., 2000. Theory of Solid-Phase Microextraction. Journal of Chromatographic Science
60. Górecki, T., Khaled, A., Pawliszyn, J., 1998. The Effect of Sample Volume on Quantitative Analysis by Solid-Phase Microextraction. Part 2.Experimental Verification