ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ανίχνευση οργανοφωσφορικών ενώσεων σε δείγματα ελαιολάδου με χρήση της τεχνικής SPME, GC-ECD

Άρτεμις Παλαιογιάννη-Μπέλλου

Εξεταστική Επιτροπή:

- **Επικ. Ψυλλάκη Ε. (επιβλέπουσα)**
- **Καθ. Καλογεράκης Ν.**
- **Καθ. Διαμαντόπουλος Ε.**
- **Καθ. Γκέκας Β.**

Χανιά, Οκτώβριος 2008

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά ορισμένα πρόσωπα που με την καθοδήγηση και τη συμπαράστασή τους βοήθησαν στην διεκπεραίωση αυτής της εργασίας:

- Την Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος και επιβλέπουσα της παρούσας εργασίας κ. Ελευθερία Ψυλλάκη, για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις συμβουλές της καθ'όλη τη διάρκεια της εργασία, καθώς επίσης και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου.

- Τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογεράκη, τον Καθηγητή κ. Ευάγγελο Διαμαντόπουλο και τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Γκέκα για τις σημαντικές υποδείξεις τους κατά την αξιολόγηση και εξέταση της διπλωματικής εργασίας.

- Τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Dr.Lucia Sanchez-Prado καθώς επίσης και την υπεύθυνη του εργαστηρίου Δρ.Κωνσταντίνα Τυροβολά για την πολύτιμη καθοδήγηση και την υποστήριξή τους.

- Το φίλο και συνεργάτη, Πάρη Πιττάκαρα διότι χωρίς τη πολύτιμη συμβολή του, η εργασία αυτή δεν θα είχε το αναμενόμενο αποτέλεσμα.

- Το πρόγραμμα ΄΄ΦΥΤΩΡΙΟ ΙΔΕΩΝ-UNISTEPLUS, ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟΣ ΠΟΛΟΣ ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ ΚΡΗΤΗΣ΄΄ για τη χρηματοδότηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και τη στήριξη τους καθ'όλη τη διάρκεια υλοποίησής της.

- Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, για την ηθική συμπαράσταση κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η ανίχνευση οργανοφωσφορικών ενώσεων σε δείγματα ελαιολάδου με χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία μέσω ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD).

Το ελαιόλαδο είναι ένα φυσικό προϊόν πλούσιο σε θρεπτική και βιολογική αξία, που αποτελεί τη βασικότερη πηγή λιπαρών στη Μεσογειακή διατροφή. Οι ευεργετικές επιδράσεις του ελαιολάδου στον ανθρώπινο οργανισμό είναι γνωστές σε όλο τον κόσμο και αποτελούν τη βασικότερη αιτία της μακροβιότητας των λαών της Μεσογείου.

Παρόλα αυτά, η ποιότητα του ελαιολάδου συνεχώς υποβαθμίζεται από την ύπαρξη υπολειμμάτων των γεωργικών φαρμάκων που οφείλονται στη μη εφαρμογή των κανόνων ορθής γεωργικής πρακτικής στο στάδιο παραγωγής του ελαιοκάρπου. Αντικείμενο του προτεινόμενου έργου είναι η ανάπτυξη ενός απλού και γρήγορου πρωτοκόλλου, βασισμένο στην καινοτόμο μέθοδο της μικροεκχύλισης, για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων ομάδας φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε δείγματα ελαιολάδου.

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που εξετάζονται στην παρούσα εργασία ανήκουν στην ομάδα των οργανοφωσφορικών ενώσεων, οι οποίες είναι ουσίες που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές και αποτελούν το επίκεντρο πολλών ερευνητικών ομάδων ανά τον κόσμο. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις που αναλύονται είναι οι Diazinon, Dichlofention, Parathion methyl, Fenitrothion, Malathion, Parathion, Bromophos methyl, Ethion και Ethoprophos. Λόγω της επικινδυνότητας των ουσιών αυτών, έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ανώτερα επιτρεπτά όρια στο ελαιόλαδο για την προστασία του ανθρώπου και του περιβάλλοντος.

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των οργανοφωσφορικών ενώσεων περιλαμβάνει την μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid-Phase Microextraction, SPME) σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία μέσω ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD). Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME), είναι μια ευρέως διαδεδομένη, απλή και γρήγορη μέθοδος, που χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολλών περιβαλλοντικών δειγμάτων και αναπτύχθηκε στη δεκαετία του '90 από τους Pawliszyn και Arthur. Η σύζευξή της, με την αέρια χρωματογραφία ολοκληρώνει την διαδικασία ποιοτικού προσδιορισμού των ενώσεων αυτών.

Μέχρι σήμερα, ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την ανίχνευση των οργανοφωσφορικών ενώσεων στο ελαιόλαδο με χρήση της καινοτόμου αυτής τεχνολογίας. Έτσι εξετάζονται τρόποι βελτιστοποίησης της μεθόδου ρυθμίζοντας διάφορες παραμέτρους λειτουργίας όπως είναι: η θερμοκρασία, η επιρροή άλλων διαλυτών, η ταχύτητα ανάδευσης, ο χρόνος εκχύλισης, το είδος της ίνας SPME και η μάζα του δείγματος ελαιολάδου. Τέλος, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου στο ελαιόλαδο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ 8

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 8

1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ 9

1.3 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ 9

ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ 10

1.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ 11

1.5 ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ 13

1.6 ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΠΟΥ ΑΠΕΙΛΟΥΝ ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ 14

ΕΧΘΡΟΙ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ 15

2 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ 16

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 16

2.2 ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ. 16

2.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ. 17

2.3.1 ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΝΕΡΟ 17

2.3.2 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΟΚΤΑΝΟΛΗΣ-ΥΔΑΤΟΣ, K_{ow} 17

2.3.3 ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ 18

2.3.4 ΣΤΑΘΕΡΑ ΤΟΥ ΝΟΜΟΥ HENRY,H 18

2.4 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ 19

2.4.1 ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ 19

2.4.2 ΧΡΟΝΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ 20

2.5 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ 21

3 ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ 22

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 22

3.2 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ 22

3.3 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ 23

3.4 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ. 27

3.5 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ 33

4 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID PHASE MICROEXTRACTION, SPME) 34
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 34
4.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ SPME 34
4.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ SPME ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ 36
4.4 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ SPME 37
4.4.1 ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ 38
4.4.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ. 40
4.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ 41
4.5.1 ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 41
4.5.2 ΥΛΙΚΟ ΕΠΙΚΑΛΥΨΗΣ ΙΝΑΣ 42
4.5.3 ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 46
4.5.4 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 47
4.5.5 ΟΓΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 47
4.5.6 ΑΝΑΔΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 47

5 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC) 50
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ 50
5.2 ΘΕΩΡΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ 51
5.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ 53
5.3.1 ΦΕΡΟΝ ΑΕΡΙΟ 53
5.3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ 55
5.3.3 ΦΟΥΡΝΟΣ-ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΣΤΗΛΗΣ 55
5.3.4 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 56
5.3.5 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ 57

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
6.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ-ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ 58
6.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ 59
6.2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΛΥΤΗ 59
6.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΚΕΤΟΝΗ 59
6.2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΞΑΝΙΟ 60
6.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΟΥ SPME 60
6.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ GC-ECD 62

6.5 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΥ 64

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

7.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HS-SPME 65

7.1.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΙΝΑΣ 65

7.1.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΑΖΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ 66

7.1.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΛΥΤΗ 67

7.1.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 71

7.1.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΟΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ 72

7.1.6 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ 73

7.2 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΥ 76

7.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ. 76

7.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 77

7.5 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ 80

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

8.1 ΒΙΒΛΙΑ-ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ 81

8.2 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 83

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση των διαφόρων τύπων ελαιολάδων με βάση την ελεύθερη οξύτητα 12

Πίνακας 2: Χημική ταυτότητα των οργανοφωσφορικών ενώσεων 27

Πίνακας 3: Οι κύριες χημικές ομάδες των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων 29

Πίνακας 4: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. 31

Πίνακας 5: Ανώτερα επιτρεπτά όρια οργανοφωσφορικών ενώσεων 33

Πίνακας 6: Χρωματογραφικές τεχνικές 50

Πίνακας 7: Συνήθη αέρια που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία 54

Πίνακας 8: Τύποι ανιχνευτών αέριας χρωματογραφίας 57

Πίνακας 9: Ουσίες διαλυτές στο λάδι 59

Πίνακας 10: Εξεταζόμενοι παράμετροι εκχύλισης 61

Πίνακας 11: Συνιστώμενες θερμοκρασίες για τη σωστή χρήση των ινών σύμφωνα με τις οδηγείες του κατασκευαστη (Supelco) 61

Πίνακας 12: Πρόγραμμα θερμοκρασιών φούρνου 62
Πίνακας 13: Χρόνοι συγκράτησης των αναλυόμενων ουσιών 63
Πίνακας 14: Βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου SPME 75
Πίνακας 15: Ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδο 77
Πίνακας 16: Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών ενώσεων στο ελαιόλαδο 80

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Διατροφική πυραμίδα 10
Σχήμα 2: Δομές ορισμένων οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων. Σχηματική παρουσίαση της λειτουργίας της νευρικής σύναψης και της τοξικής δράσης με τη παρεμπόδιση της ακετυλενοχολιστεράσης στο νευρικό σύστημα 23
Σχήμα 3: Γενική δομή οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων 29
Σχήμα 4: Εισαγωγή της σύριγγας στον αέριο χρωματογράφο σε τρία στάδια 35
Σχήμα 5: Τυπική διάταξη SPME 36
Σχήμα 6: Τρόποι εκχύλισης της μεθόδου 42
Σχήμα 7: Κίνηση αναλυόμενων στοιχείων προς το υλικό επικάλυψη της ίνας. 43
Σχήμα 8: Εκχύλιση των αναλυόμενων στοιχείων στο υλικό επικάλυψης της ίνας με το φαινόμενο: α) απορρόφησης, β) προσρόφησης 45
Σχήμα 9: Εκχύλιση στον υπεκείμενο όγκο του δείγματος με ανάδευση 49
Σχήμα 10: Γενική μορφή χρωματογραφήματος με τις βασικές παραμέτρους 52
Σχήμα 11: Σχηματική περιγραφή της συσκευής GC 53
Σχήμα 12: Σχηματική περιγραφή των ορίων ανίχνευσης LOD και LOQ 65
Σχήμα 13: Χρωματογράφημα που πρόεκυψε από την απευθείας έκχυση του μείγματος των ουσιών σε εξάνιο 76
Σχήμα 14: Χρωματογράφημα που πρόεκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου SPME χωρίς όμως την προσθήκη των εξεταζόμενων ουσιών 76
Σχήμα 15: Χρωματογράφημα που προέκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου SPME με την προσθήκη 1mg/l από τις αναλυόμενες ουσίες 76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1:	Επιλογή ίνας	65
Διάγραμμα 2:	Επιλογή μάζας δείγματος ελαιολάδου	66
Διάγραμμα 3:	Επιλογή διαλύτη 1	67
Διάγραμμα 4:	Επιλογη διαλύτη 2	68
Διάγραμμα 5:	Επιλογή διαλύτη 3	69
Διάγραμμα 6:	Επιλογή διαλύτη 4	70
Διάγραμμα 7:	Επιλογή θερμοκρασίας εκχύλισης	71
Διάγραμμα 8:	Επιλογή χρόνου εκχύλισης για τις ουσίες Ethoprophos, Diazinon, Dichlofenthion	72
Διάγραμμα 9:	Επιλογή χρόνου εκχύλισης για τις ουσίες Parathion methyl, Fenitrothion, Malathion	72
Διάγραμμα 10:	Επιλογή χρόνου εκχύλισης για τις ουσίες Parathion, Bromophos methyl, Ethion	73
Διάγραμμα 11:	Επιλογή ταχύτητας ανάδευσης	73
Διάγραμμα 12:	Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα	77

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

"Ελαιόλαδο" χαρακτηρίζεται το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς της Ελιάς της Ευρωπαϊκής (Olea europea) με μέσα αποκλειστικά μηχανικά και μεθόδους ή επεξεργασίες οπωσδήποτε φυσικές, σε θερμοκρασίες που να μην προκαλούν αλλοίωση του ελαίου [1]. Είναι προϊόν απολύτως φυσικό που μπορεί να καταναλωθεί μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία παραλαβής του. Στη μορφή αυτή, το ελαιόλαδο διατηρεί τα σπουδαία συστατικά του (γευστικά και αρωματικά), που περιέχει όταν βρίσκεται στον ελαιόκαρπο, τα οποία και του προσδίδουν την ιδιαίτερη γευστικότητα που το ξεχωρίζει από τα άλλα φυτικά έλαια.

Το ελαιόλαδο, εξαιτίας των θρεπτικών και βιολογικών του ιδιοτήτων, παίζει σημαντικό ρόλο στη διατροφή των κατοίκων των περιοχών που περιβάλλουν τη Μεσόγειο από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα, συμβάλλοντας σε μεγάλο βαθμό στην οικονομία και τον πολιτισμό τους [2]. Πολλοί ιστορικοί ήδη αναφέρονταν στις θρεπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες του ελαιολάδου και στη χρησιμοποίησή του από τα αρχαία χρόνια και δικαίως έχει χαρακτηριστεί από πολλούς ως «υγρός χρυσός» [i]. Επίσης, χρησιμοποιούνταν ως σύμβολο ειρήνης, σοφίας και νίκης. Ακόμα και οι νικητές των Ολυμπιακών Αγώνων έπαιρναν ως έπαθλο για τη νίκη τους ένα κλαδί αγριελιάς (κότινο), ενώ η θεά Αθηνά καθιερώθηκε ως θεά της Αττικής προσφέροντας το δέντρο της ως πηγή πλούτου. Επιπλέον, εκτός από τη χρήση του στις τροφές, το ελαιόλαδο χρησιμοποιούνταν και χρησιμοποιείται και για άλλες χρήσεις:

- για φωτισμό (λύχνοι)
- για τα αρώματα (αρωματικά λάδια)
- σαν συντηρητικό
- για περιποίηση του σώματος/καθαρισμό
- στη βυρσοδεψία

Η ιστορική εξέλιξη της διαδικασίας παραγωγής του ελαιολάδου έχει ώς εξής:

- Παραγωγή χωρίς πιεστήριο–πρωτόγονη παραγωγή
- Παραγωγή με περιστροφικό μύλο
- Εμφάνιση και διάδοση των πιεστήριων
- Μεταγενέστερες αλλαγές του 19ου αιώνα

Στις ημέρες μας, οι κύριοι παραγωγοί ελαιολάδου είναι η Ιταλία, η Ισπανία και η Ελλάδα, με τη χώρα μας να έρχεται τρίτη στον κόσμο σε παραγωγή ελαιολάδου καλύπτοντας περίπου το 16 % της παγκόσμιας παραγωγής και παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη κατανάλωση, σε διεθνές επίπεδο. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η κατανάλωση ελαιολάδου, στα διάφορα διαμερίσματα της χώρας μας, κυμαίνεται σημαντικά και είναι μεγαλύτερη στις ελαιοκομικές περιοχές [3].

1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Η διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου πραγματοποιείται μέσα από τρία βασικά στάδια τα οποία δεν υπέστησαν ουσιαστικές αλλαγές στο πέρασμα των αιώνων [ii]:

- Τη σύνθλιψη του καρπού
- Τη συμπίεση του καρπού
- Το διαχωρισμό του λαδιού από το νερό και τις άλλες ακαθαρσίες

Στη σύγχρονη εποχή, η συγκομιδή του καρπού μπορεί να γίνει με τους ακόλουθους τρόπους:

- Μετά από φυσιολογική πτώση
- Με ραβδισμό
- Με μηχανήματα
- Με χημικά παρασκευάσματα

Μετά τη συγκομιδή, ο καρπός μεταφέρεται στο ελαιοτριβείο όπου τα βασικά στάδια επεξεργασίας είναι τα εξής:

1. Παραλαβή του καρπού και ζύγισμα
2. Τροφοδοσία και αποφύλλωση*
3. Πλύσιμο
4. Σπάσιμο και άλεση
5. Μάλαξη
6. Παραλαβή του ελαιόλαδου από την ελαιοζύμη
7. Τελικός διαχωρισμός και καθαρισμός του ελαιόλαδου
8. Τυποποίηση

*Το ξεκαθάρισμα των φύλλων είναι απαραίτητο γιατί η σύνθλιψη μεγάλης ποσότητας φύλλων μαζί με τον ελαιόκαρπο προσδίδει πικρή γεύση στο ελαιόλαδο και το εμπλουτίζει σε χλωροφύλλη η οποία επιδρά αρνητικά στη διατήρηση της ποιότητάς του.

1.3 ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

Το ελαιόλαδο αποτελεί τη βασικότερη πηγή λιπαρών στη Μεσογειακή Διατροφή [4]. Πηγές λιπαρών είναι όλα τα λίπη και τα βούτυρα, ζωϊκής και φυτικής προέλευσης. Τα λιπαρά φυτικής προέλευσης περιέχουν περισσότερα πολυακόρεστα (σπορέλαια) και μονοακόρεστα (ελαιόλαδο) λιπαρά οξέα και θεωρούνται φιλικά για τον οργανισμό και την υγεία, ενώ δεν περιέχουν καθόλου χοληστερίνη. Αντιθέτως, τα ζωικά λιπαρά περιέχουν μεγάλο αριθμό κορεσμένων λιπαρών οξέων και χοληστερίνης και αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να αφομοιώσει το ελαιόλαδο σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Μελέτες έδειξαν ότι ο βαθμός αφομοίωσης του λαδιού αυτού μπορεί να φτάσει το 98 %, ενώ αποδίδει τον ίδιο αριθμό θερμίδων με όλα τα άλλα φυτικά έλαια που είναι το 9.3 για κάθε γραμμάριό του. Εξαιτίας της μεγάλης αφομοίωσης του ελαιόλαδου, διευκολύνεται και η απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών οι οποίες περιέχονται σ' αυτό .

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί διεθνώς, έχει πλέον διαπιστωθεί η άμεση σχέση της κατανάλωσης ελαιολάδου με την ελάττωση του κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνο, υπέρταση, σακχαρώδη διαβήτη, νόσο Alzheimer, έλκος, σεξουαλική ανικανότητα, ακόμα και με την ανάπτυξη του οργανισμού και τη γήρανση [5].

Όλα τα παραπάνω οφείλονται στην ποικιλία των συστατικών του, όπως:

- ✓ Φαινόλες, οι οποίες αυξάνουν την αντίσταση στην οξείδωση
- ✓ Στερόλες, οι οποίες εμποδίζουν την απορρόφηση της χοληστερόλης από το έντερο
- ✓ Καροτένια, τα οποία βοηθούν την ανάπτυξη του κυττάρου και την αιμοποίηση και επιταχύνουν την διαδικασία της επούλωσης
- ✓ Τερπενικές αλκοόλες, οι οποίες βοηθούν την αποβολή της χοληστερόλης
- ✓ Τοκοφερόλες, οι οποίες εμποδίζουν την αυτοοξείδωση
- ✓ β-καροτίνη, η οποία είναι αντιοξειδωτική και απαραίτητη για την όραση

ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τα τελευταία χρόνια, επιστημονικές και ιατρικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η Μεσογειακή διατροφή αποτελεί την καλύτερη συνταγή μακροζωίας και γίνεται όλο και περισσότερο ευρέως αποδεκτή για τις θετικές της επιδράσεις στην υγεία.

Η Μεσογειακή διατροφή περιλαμβάνει τις διατροφικές συνήθειες των κατοίκων της Νότιας Ευρώπης, δηλαδή της Ελλάδας, της Ιταλίας, της Ισπανίας, της Νότιας Γαλλίας και της Πορτογαλίας και βασίζεται στην παρασκευή πιάτων χρησιμοποιώντας προϊόντα από την ευρεία γκάμα των προϊόντων που παράγονται στις χώρες αυτές [5].

Όπως φαίνεται και από τη διατροφική πυραμίδα στο σχήμα που ακολουθεί, σύμφωνα με τις αρχές της Μ εσογειακής διατροφής είναι απαραίτητη η καθημερινή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, όσπριων, ζυμαρικών, ψωμιού, δημητριακών, ρυζιού, γαλακτοκομικών προϊόντων και κυρίως ελαιολάδου για την απόκτηση ενός γερού και υγιούς οργανισμού.

Σχήμα 1: Διατροφική πυραμίδα [iii]

1.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Το τυποποιημένο ελαιόλαδο διατίθεται στην κατανάλωση, ανάλογα με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του σε τρεις βασικές κατηγορίες, οι οποίες αναγράφονται στην συσκευασία του και είναι σύμφωνες με τον κανονισμό 1513/2001 της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΟΚ) [i]:

- ***Παρθένα ελαιόλαδα***

Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους υπό συνθήκες ιδίως θερμικές, οι οποίες δεν συνεπάγονται αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί άλλη επεξεργασία πλην της πλύσης, της καθίζησης, της φυγοκέντρησης και της διήθησης, εξαιρουμένων των ελαίων που έχουν ληφθεί μετά από επεξεργασία με διαλύτη ή με μεθόδους επανεστεροποίησης και κάθε μίγματος με έλαια άλλης φύσης.

Τα έλαια αυτά κατατάσσονται στις ακόλουθες κατηγορίες και λαμβάνουν τις ακόλουθες ονομασίες:

α) Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 6,5 του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 0,8 g ανά 100 g. Προέρχεται από την πρώτη πίεση του ελαιοκάρπου.

β) Παρθένο ελαιόλαδο

Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 5,5 του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 2,0 g ανά 100 g. (μπορεί να χρησιμοποιείται και ο χαρακτηρισμός "εκλεκτό" στο στάδιο της παραγωγής και του χονδρικού εμπορίου). Προέρχεται από τη δεύτερη πίεση του ελαιοκάρπου.

γ) LAMPANTE ελαιόλαδο

Πρόκειται για παρθένο ελαιόλαδο που έχει υποστεί επεξεργασια και του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι ανώτερη των 2,0 g ανά 100 g.

- ***Εξευγενισμένο ελαιόλαδο***

Ελαιόλαδο που έχει παραχθεί από εξευγενισμένα παρθένα ελαιολάδα, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g.

- ***Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα***

Ελαιόλαδο προερχόμενο από ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένου ελαιολάδου εκτός από το ελαιόλαδο λαμπαντέ, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1,0 g ανά 100 g.

Επίσης, τα τελευταία χρόνια έχουν εμφανιστεί και οι παρακάτω νέες κατηγορίες ελαιολάδου:

ο **Ελαιόλαδο Π.Ο.Π. (Προστατευμένης Ονομασίας Προέλευσης)**:

Πρόκειται για Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο, το οποίο παράγεται στα συγκεκριμένα γεωγραφικά όρια κάποιας περιοχής, της οποίας το κλίμα, οι εδαφολογικές συνθήκες και οι ποικιλίες της ελιάς ευνοούσαν από τα ιστορικά χρόνια και ευνοούν την παραγωγή εξαιρετικής ποιότητας ελαιολάδου. Το περιβάλλον αυτό περιλαμβάνει τους φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία του προϊόντος λαμβάνουν χώρα στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή. Τα ελαιόλαδα Π.Ο.Π. έχουν την έγκριση της αρμόδιας Επιτροπής της Ευρωπαϊκής Κοινότητας και υπόκεινται σε αυστηρούς εθνικούς και κοινοτικούς ελέγχους. Η τυποποίηση τους γίνεται σε αριθμημένα μπουκάλια.

ο **Ελαιόλαδο Προϊόν Οργανικής Καλλιέργειας**:

Πρόκειται για Εξαιρετικό Παρθένο ή Παρθένο Ελαιόλαδο, το οποίο προέρχεται από ελαιώνες στους οποίους εφαρμόζονται οι αυστηροί κανόνες της βιολογικής (οργανικής) καλλιέργειας. Όλη η διαδικασία, από την ελαιοκαλλιέργεια, την έκθλιψη του ελαιοκάρπου, τη διατήρηση του ελαιολάδου και την εμφιάλωση, ελέγχονται από ειδικούς Οργανισμούς Πιστοποίησης του τελικού προϊόντος. Στα ελαιόδεντρα που υπάγονται στο καθεστώς της Οργανικής Καλλιέργειας δεν επιτρέπεται η λίπανση με χημικά λιπάσματα και η χρήση χημικών φυτοφαρμάκων ή ζιζανιοκτόνων.

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση των διαφόρων τύπων ελαιολάδων με βάση την ελεύθερη οξύτητα [i]

	Εξαιρετικό Παρθένο Ελαιόλαδο	Παρθένο Ελαιόλαδο	LAMPANTE Ελαιόλαδο	Εξευγενισμένο Ελαιόλαδο	Ελαιόλαδο
Οξύτητα (wt/wt %)	≤ 0,8	≤ 2,0	> 2,0	≤ 0,3	≤ 1,0

Η οξύτητα αποτελεί το βασικότερο κριτήριο ποιοτικής αξιολόγησης του ελαιολάδου και με βάση αυτήν διαμορφώνεται η εμπορική του αξία. Η οξύτητα εκφράζεται είτε σε γραμμάρια ελεύθερου ελαϊκού οξέος ανά 100 gr λιπαρής ύλης (βαθμός οξύτητας) είτε σαν αριθμός οξύτητας που αποδίδει τα χιλιοστά του KOH τα οποία απαιτούνται για την εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, που υπάρχουν σε ένα γραμμάριο λαδιού. Η σχέση η οποία συνδέει τις δύο αυτές εκφράσεις (οξύτητα-αριθμός οξύτητας), είναι: οξύτητα (σε ελαϊκό) (%) = αριθμός οξύτητας Χ 0,503.

1.5 ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Με το όρο ποιότητα εννοούμε το σύνολο των βασικών χαρακτηριστικών ή ιδιοτήτων ενός αγαθού. Στο ελαιόλαδο τα πράγματα είναι πιο σύνθετα, με αποτέλεσμα η ποιότητα να περιλαμβάνει πολλές παραμέτρους [3]. Οι παράμετροι, που παρουσιάζονται ακολούθως, είναι που καθορίζουν την ανταγωνιστικότητά του, σε συνδυασμό με απαιτούμενες δράσεις προβολής και διαφήμισης.

Η ποιοτική κατάταξη του ελαιολάδου ακολουθεί διεθνείς σταθερές που συμβάλλουν στην τελική αξιολόγησή του:

- Χρώμα: το χρώμα του ελαιολάδου μπορεί να ποικίλει από σκούρο πράσινο μέχρι ανοιχτό πράσινο (χρυσαφί), με πολλές ενδιάμεσες και άλλες αποχρώσεις. Αυτό οφείλεται στις ουσίες που κυριαρχούν στον ελαιόκαρπο από τον οποίο παράγεται το λάδι.
- Παχύτητα: η παχύτητα του ελαιολάδου εξαρτάται από την περιοχή που παράγεται, για παράδειγμα το ελαιόλαδο της Κέρκυρας έχει χαμηλή παχύτητα, σε αντίθεση με το ελαιόλαδο της Πελοποννήσου.
- Διαύγεια: το ελαιόλαδο που προέρχεται από ώριμο καρπό έχει υψηλή διαύγεια, σε αντίθεση με το ελαιόλαδο που προέρχεται από πρώιμο καρπό.
- Οσμή–Γεύση: η οσμή και η γεύση του ελαιολάδου μπορεί να δείξει πολλά για την ποιότητά του. Η ευχάριστη οσμή και γεύση υποδηλώνουν ιδιαίτερα γνωρίσματα και μπορεί να οφείλονται στην περιοχή στην οποία καλλιεργήθηκαν τα ελαιόδενδρα, καθώς και στον τρόπο καλλιέργειάς τους. Η πικρή γεύση φανερώνει ότι ο ελαιόκαρπος μαζεύτηκε πριν ωριμάσει.
- Οξύτητα: ο βαθμός οξύτητας του ελαιολάδου υποδηλώνει την περιεκτικότητα του σε ελαϊκό οξύ και εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης του ελαιοκάρπου, τον τρόπο συγκομιδής του και το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ συγκομιδής και παραγωγής ελαιολάδου.

Γενικά, το ελαιόλαδο είναι ένα προϊόν που μπορεί εύκολα να νοθευτεί. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος νοθείας είναι με σπορέλαια, καθώς και με ζωικά λίπη και εστέρες, πράγμα όμως σπάνιο. Η νοθεία παρατηρείται κυρίως στο χύμα ελαιόλαδο που διατίθεται στην αγορά, γεγονός που δυστυχώς είναι δύσκολο για τον καταναλωτή να το αντιληφθεί.

1.6 ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΠΟΥ ΑΠΕΙΛΟΥΝ ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Το ελαιόλαδο είναι ένα φυσικό προϊόν πλούσιο σε θρεπτική και βιολογική αξία το οποίο όμως μπορεί να επιμολυνθεί με επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία ουσίες και ξένα σώματα, κατά τα διάφορα στάδια της παραγωγής, του εξευγενισμού, της τυποποίησης και της εμπορίας του [iii].

Μεταξύ των **χημικών ουσιών** ιδιαίτερη σπουδαιότητα έχουν:

- **Τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων** που οφείλονται στην μη εφαρμογή των κανόνων ορθής γεωργικής πρακτικής στο στάδιο παραγωγής του ελαιοκάρπου.
- **Οι πτητικοί αλογονωμένοι διαλύτες** (τετραχλωροαιθυλένιο, FREON, τριχλωροαιθάνιο και τριχλωροαιθυλένιο). Η παρουσία του τετραχλωροαιθυλενίου έχει αποδοθεί στην προσθήκη υπολειμμάτων ελαίου από τον ποσοτικό προσδιορισμό ελαίου σε ελιές ο οποίος γίνεται με διαλύτη τετραχλωροαιθυλένιο. Η παρουσία FREON σε ελαιόλαδο αποδίδεται κυρίως σε διαρροές ψυγείων οινοποιητικών μονάδων που γειτνιάζουν με ελαιουργεία ή τυποποιητήρια ελαιολάδου. Η προέλευση των άλλων δύο χλωριωμένων διαλυτών έχει αποδοθεί σε διαλύτες κόλας λάστιχου σε πώματα βυτίων μεταφοράς ελαιολάδου, σε διαλύτες λιπαντικών, καθαρισμού,κλπ.
- **Τα βαρέα μέταλλα** των οποίων η παρουσία στα έλαια οφείλεται στην επαφή τους με τα μεταλλικά μέρη των μηχανημάτων ή των δεξαμενών. Τα έλαια μπορούν επίσης να επιμολυνθούν με βαρέα μέταλλα και κατά το στάδιο της παραγωγής τους από την μη τήρηση κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής.
- **Οι περιβαλλοντικοί ρυπαντές.** Είναι κυρίως οι διοξίνες, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) και οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, (βενζόλιο, τολουόλιο, αιθυλοβενζόλιο, ξυλόλιο, κλπ.).
- **Επικίνδυνες ουσίες που μεταναστεύουν στα έλαια από τα υλικά συσκευασίας** οι οποίες οφείλονται στη χρήση ακατάλληλων υλικών. Υλικά συσκευασίας μπορούν για διάφορους λόγους (κακή κατασκευή, εγκλεισμός μονομερούς κλπ.) να επιμολύνουν τα έλαια με ξένες ουσίες π.χ. πλαστικοποιητές, μονομερές VC (βινυλοχλωρίδιο) προερχόμενο από PVC.

Οι **φυσικοί κίνδυνοι** αφορούν κυρίως στην παρουσία ξένων σωμάτων όπως θραύσματα γυαλιού, πλαστικών, μετάλλων, σκόνης και ακαθαρσιών.

Στην παρούσα εργασία γίνεται ο έλεγχος για την παρουσία υπολειμματικών ενώσεων από γεωργικά φάρμακα στο ελαιόλαδο. Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται για την προστασία του ελαιοκάρπου από διαφόρους εχθρούς και ασθένειες, η παρουσία των οποίων προκαλεί μείωση της παραγωγής και υποβάθμιση της ποιότητας του ελαιολάδου.

ΕΧΘΡΟΙ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΕΛΑΙΟΚΑΡΠΟΥ

Οι κυριότεροι εντομολογικοί εχθροί και οι πιο σημαντικές ασθένειες που προσβάλλουν την ελιά, με κριτήριο την οικονομική ζημιά που προκαλείται είναι οι εξής:

- Εντομολογικοί εχθροί:

i. Δάκος της ελιάς-Bactrocera (Dacus) oleae (Gmelin)
ii. Πυρηνοτρήτης της ελιάς-Prays oleae (Bernard)
iii. Λεκάνιο ή ‘’μαύρη ψώρα’’ της ελιάς-Saissetia oleae (Bernard)
iv. Ασπιδιωτός της ελιάς-Aspidiotus nerii (Bouché)
v. Βαμβακάδα της ελιάς–Euphyllura olivina (Costa)
vi. Θρίπας-Leothrips oleae (Costa)
vii. Καλόκορη-Calocoris trivialis (Costa)
viii. Ρυγχίτης-Rhynchites (Coenorrhinus) cribripennis (Desbr.)

Από τους προαναφερθέντες εχθρούς της ελιάς ο δάκος θεωρείται ο σοβαρότερος εχθρός της, επειδή προξενεί σημαντική ζημιά στην ελαιοπαραγωγή (βρώσιμες ελιές και ελαιόλαδο). Η ζημιά είναι τόσο ποσοτική όσο και ποιοτική [4].

- Ασθένειες:

1. Κυκλοκόνιο-Cycloconium oleaginum (Spilocaea oleagina)
2. Καρκίνωση ή φυματίωση της ελιάς–Pseudomonas syringae pv. Savastanoi
3. Βερτισιλλίωση της ελιάς–Verticillium dahliae

2. ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Φυτοφάρμακα λέγονται μια σειρά άπό φάρμακα και χημικές ουσίες που φτιάχνονται για την αποτελεσματική καταπολέμηση των εχθρών των φυτών. Είναι δυνατά δηλητήρια, προϊόντα υψηλής τεχνολογίας, που δρουν και σκοτώνουν ζωϊκούς και φυτικούς οργανισμούς που βλάπτουν τις καλλιέργειες.

Αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1942 ο Ελβετός Muller ανακαλύπτει το DDT, ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων BAYER κατασκευάζουν το παράθειο. Τα πρώτα χρόνια της ανακάλυψής τους, η συμβολή τους στην προστασία της αγροτικής παραγωγής, γέννησε πολλές ελπίδες για τη λύση του προβλήματος τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα με την αύξηση του πληθυσμού.

Ταυτόχρονα η προσφορά τους ήταν μεγάλη και στην προστασία της δημόσιας υγείας με την καταπολέμηση ενοχλητικών εντόμων, που έφεραν διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο και ανοίχθηκαν νέοι ορίζοντες στη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής. Έτσι οι βιομηχανίες φαρμάκων άρχισαν να συναγωνίζονται μεταξύ τους για την παραγωγή νέων φυτοφαρμάκων με μεγαλύτερη δράση.

Όμως, παρόλα τα πλεονεκτήματα των φυτοφαρμάκων, τα τελευταία χρόνια άρχισαν να διαπιστώνονται οι αρνητικές επιπτώσεις τους στο φυσικό περιβάλλον και στην υγεία του ανθρώπου. Ομάδες φυτών και ζώων άρχισαν να εξαφανίζονται και να γίνονται αντιληπτές οι δυσμενείς συνέπειές τους στα επιφανειακά και υπόγεια νερά στο έδαφος και στον αέρα.

Σήμερα όλοι πλέον γνωρίζουν ότι τα φυτοφάρμακα κατέχουν σημαντικό μερίδιο στην αλλοίωση του φυσικού περιβάλλοντος και γίνεται προσπάθεια ώστε να παρθούν μέτρα για την καλύτερη αξιοποίησή τους, ελαχιστοποιώντας τις αρνητικές τους επιπτωσεις. Για το λόγο αυτό, η Ευρωπαϊκή Ένωση και η Επιτροπή Κώδικα Διατροφής Τροφίμων και Γεωργίας του Οργανισμού των Ηνωμένων Εθνών (FAO) έχουν καθιερώσει τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (MRL) στα τροφιμα [2].

2.2 ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η χρήση των φυτοφαρμάκων στη σύγχρονη γεωργία με τις σημερινές συνθήκες και με ορισμένες προϋποθέσεις είναι αναγκαία για την αγροτική παραγωγή. Τα φυτοφάρμακα όταν χρησιμοποιούνται στη σωστή αναλογία και με την καθοδήγηση ειδικών γεωπόνων, συμβάλλουν στην αύξηση της αγροτικής παραγωγής και στη βελτίωση της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων, αφού καταστρέφουν τους βλαβερούς οργανισμούς που εμποδίζουν την ανάπτυξη των φυτών ή τους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα προϊόντα και καταστρέφουν πολλές φορές ολόκληρη την παραγωγή.

Η χρήση τους εξοικονομεί χρόνο, αφού χωρίς αυτά οι γεωργοί θα έπρεπε να δουλεύουν στις καλλιέργειές τους πολύ περισσότερο, και μάλιστα με αρκετά μικρότερη απόδοση. Επίσης για να καταπολεμηθούν οι διάφορες ασθένειες χωρίς τα φυτοφάρμακα θα απαιτούνταν περισσότερη και πιο κοπιαστική δουλειά από όλα τα μέλη της οικογένειας κάθε αγρότη. Με τη χρήση τους οι αγροτικές ασχολίες γίνονται λιγότερο κουραστικές και απαιτητικες. Ακόμα, τα φυτοφάρμακα σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να καθυστερήσουν ή να κάνουν πιο γρήγορη την αγροτική παραγωγή, ανάλογα με τις επιθυμίες του παραγωγού, έτσι ώστε να μπορεί να προλάβει τις καιρικές συνθήκες [iv].

2.3 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των φυτοφαρμάκων μετρώνται σύμφωνα με πρωτόκολλα αναγνωρισμένα από εθνικές και διεθνείς υπηρεσίες (οδηγίες U.S. EPA, πρωτόκολλα της Ευρωπαϊκής Ένωσης κ.ά.). Οι κυριότερες παράμετροι που βοηθούν στην πρόβλεψη της περιβαλλοντικής συμπεριφοράς ενός φυτοφαρμάκου είναι οι εξής [13]:

- Διαλυτότητα στο νερό
- Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-ύδατος, Kow
- Τάση ατμών
- Σταθερά του νόμου του Henry, H ή KH

2.3.1 ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΝΕΡΟ

Είναι η συγκέντρωση σε g/l μιας χημικής ουσίας που είναι διαλυμένη στο νερό, όταν το νερό βρίσκεται σε επαφή και σε ισορροπία με την καθαρή ουσία. Η γνώση της τιμής της διαλυτότητας είναι απαραίτητη στην ανάλυση φυτοφαρμάκων στο νερό. Σαν γενικός κανόνας, ουσίες με μεγάλη διαλυτότητα (πάνω από μερικά g/l) δεν εκχυλίζονται εύκολα από το νερό με τις υπάρχουσες διαδικασίες εκχύλισης. Ουσίες με πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό (μικρότερη από 0,5-1 mg/l) είναι δύσκολο να αναλυθούν σε επίπεδα ιχνών γιατί έχουν την τάση να προσροφώνται παντού, ιδιαίτερα στα γυάλινα τοιχώματα των φιαλιδίων. Ταυτόχρονα, η τιμή της διαλυτότητας δείχνει την τάση ενός φυτοφαρμάκου να απομακρύνεται από το έδαφος, με τη βοήθεια του νερού της απορροής ή της άρδευσης, και να φτάνει έτσι στα επιφανειακά νερά. Επιπλέον, είναι ένας δείκτης της τάσης για καθίζηση στην επιφάνεια του εδάφους [6].

2.3.2 ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΟΚΤΑΝΟΛΗΣ-ΥΔΑΤΟΣ, K_{ow}

Η παράμετρος αυτή συνήθως δίνεται σε λογαριθμική μορφή, σαν log K_{ow}. Ορίζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων ισορροπίας ενός διφασικού συστήματος που αποτελείται από νερό και η-οκτάνιο. Ο συντελεστής χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη φαρμακευτική βιομηχανία, σαν ένδειξη της συμπεριφοράς ενός φαρμάκου σε ένα

οργανισμό, γιατί η κατανομή μιας ουσίας ανάμεσα στο νερό και στην οκτανόλη μοιάζει με την κατανομή ανάμεσα στην υδατική και τη λιπόφιλη φάση του οργανισμού. Η παράμετρος αυτή είναι χαρακτηριστική της λιποφιλικότητας του μορίου και δίνει μία ένδειξη για την τάση του συστατικού να συσσωρεύεται σε βιολογικές μεμβράνες και ζωντανούς οργανισμούς. Θεωρείται γενικά ότι ουσίες με τιμή log K_{ow} μεγαλύτερη από 3 μπορεί να παρουσιάζουν βιοσυσσώρευση. Ο κίνδυνος αυτός μετράται πειραματικά με συντελεστές βιοσυγκέντρωσης σε υδρόβιους οργανισμούς.

Η πολικότητα ενός μορίου σχετίζεται με το συντελεστή K_{ow}. Η πολικότητα μιας ουσίας δείχνει σε ποιο βαθμό το φορτίο της είναι κατανεμημένο ασύμμετρα μέσα στο μόριο, καθώς επίσης και την παρουσία πολικών ομάδων σε αυτό. Σαν γενικός κανόνας, μη-πολικές ουσίες χαρακτηρίζονται από τιμές log Kow μεγαλύτερες από 4-5, ενώ οι πολικές ουσίες έχουν log Kow κάτω από 1 με 1,5. Ανάμεσα σε αυτές τις τιμές, τα συστατικά ταξινομούνται ως μέτρια πολικά.

Ο συντελεστής K_{ow} εκτός του ότι επιτρέπει την πρόβλεψη της βιοσυσσώρευσης σε υδρόβιους και χερσαίους οργανισμούς, έχει αποδειχθεί χρήσιμος και στην πρόβλεψη της παραμονής και κινητικότητας σε εδάφη, καθώς και τη ρόφηση σε αυτά. Εντούτοις, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-ύδατος από μόνος του δεν οδηγεί σε ασφαλή συμπεράσματα, καθώς αντιπροσωπεύει μία κατανομή ανάμεσα σε δύο φάσεις μη αναμίξιμες, ενώ οι πραγματικές διαδικασίες ρόφησης στο έδαφος περιλαμβάνουν άλλους μηχανισμούς όπως η κατανομή, η ιοντοεναλλακτική ικανότητα, η συμπλοκοποίηση και η καθίζηση. Κατά τη μέτρηση του Kow έχουν παρατηρηθεί ασάφειες και αβεβαιότητες και αυτό αποδίδεται στη δυσκολία αλλά και στους διάφορους τρόπους προσδιορισμού του συντελεστή [7].

2.3.3 ΤΑΣΗ ΑΤΜΩΝ

Πρόκειται για τη μερική πίεση μιας χημικής ουσίας στην αέρια κατάσταση, όταν αυτή είναι σε ισορροπία με το καθαρό στερεό ή υγρό. Η τάση ατμών εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Εκφράζεται σε Pa ή mmHg [6].

2.3.4 ΣΤΑΘΕΡΑ ΤΟΥ ΝΟΜΟΥ HENRY, H

Η σταθερά του νόμου του Henry H είναι ένας συντελεστής κατανομής που ορίζεται σαν ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ουσίας στην αέρια φάση προς τη συγκέντρωσή της στην υδατική φάση, όταν οι δύο φάσεις βρίσκονται σε ισορροπία. Οι τιμές H αποτελούν καλύτερη ένδειξη της πτητικότητας των φυτοφαρμάκων από ότι η τάση ατμών. Έτσι μία μικρή τιμή τάσης ατμών δεν συνεπάγεται και αμελητέα πτητικότητα. Για παράδειγμα το DDT έχει μικρή τάση ατμών αλλά και μικρή διαλυτότητα στο νερό, έτσι η πτητικότητά του δεν είναι αμελητέα. Ουσίες που έχουν υψηλή τιμή της σταθεράς H έχουν και υψηλή πτητικότητα [6].

2.4 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Πολλά φυτοφάρμακα είναι τοξικά όχι μόνο για τους οργανισμούς για τους οποίους προορίζονται, αλλά και σε ένα ορισμένο βαθμό και για τον άνθρωπο, τα ζώα και το περιβάλλον. Το αν ένα συγκεκριμένο φυτοφάρμακο π.χ. στο υπόγειο νερό είναι επικίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία ή όχι εξαρτάται από :

• τη συγκέντρωσή του
• το κατά πόσο έχει απορροφηθεί από το νερό
• τη διάρκεια της έκθεσης
• το πόσο γρήγορα μεταβολίζεται και εκκρίνεται από το σώμα

Όταν αναφερόμαστε στον άνθρωπο ή τα ζωα γίνεται διάκριση ανάμεσα στην οξεία και τη χρόνια τοξικότητα [8]:

- Η **οξεία τοξικότητα** μιας χημικής ουσίας είναι η δυνατότητά της να προκαλέσει βλάβη μετά από βραχυχρόνια έκθεση (λιγότερο από 30 ημέρες).

- Η **χρόνια τοξικότητα** περιλαμβάνει μακροχρόνια έκθεση κατά την οποία η τοξική ουσία συσσωρεύεται στο σώμα, κάνοντας την ανάπτυξη και την παρακολούθηση της απόκρισης αρκετά πιο περίπλοκη.

2.4.1 ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Μετά από βραχυχρόνια έκθεση στα φυτοφάρμακα είναι δυνατόν να προκληθούν συμπτώματα όπως αναπνευστικά προβλήματα, διαταραχές του νευρικού συστήματος ή επιδείνωση προβλημάτων που προϋπήρχαν, όπως για παράδειγμα το άσθμα. Τα συμπτώματα ποικίλουν από ελαφριές ενοχλήσεις έως το θάνατο. Τα φυτοφάρμακα μπορεί να επιφέρουν ακόμα ενοχλήσεις στα μάτια, τη μύτη και το λαιμό, εξανθήματα, φαγούρα, κάψιμο, ναυτία, βήχα, πονοκέφαλο και γενική αδιαθεσία. Επειδή τα συμπτώματα αυτά μοιάζουν πολύ ή είναι ίδια με αυτά άλλων ασθενειών, σε πολλές περιπτώσεις γίνεται λανθασμένη διάγνωση της οξείας δηλητηρίασης από φυτοφάρμακα.

Η βραχυχρόνια έκθεση στα φυτοφάρμακα πραγματοποιείται κυρίως κατά τη διάρκεια ατυχημάτων δηλητηριάσεων με αυτά λόγω κακής χρήσης, φύλαξης ή άγνοιας. Έχουν συμβεί αρκετά ατυχήματα με διαρροή επικίνδυνων ουσιών που χρησιμοποιούνται σε εργοστάσια για την κατασκευή φυτοφαρμάκων με αποτέλεσμα το θάνατο πολλών ανθρώπων και την πρόκληση βλαβών στον οργανισμό πολύ περισσότερων [v].

2.4.2 ΧΡΟΝΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Οι μακροχρόνιες όμως αρνητικές συνέπειες που προκαλούνται στην υγεία μας από τη χρήση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων είναι περισσότερες και οι πλέον ανησυχητικές, αφού αφορούν το σύνολο της ανθρωπότητας.

Τα υπολείμματα επικίνδυνων ουσιών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φυτοφαρμάκων περνάνε, πριν προλάβουν να διασπαστούν, μέσα από την τροφική αλυσίδα στον ανθρώπινο οργανισμό με τη λήψη φυτικών τροφών ή με προϊόντα ζώων (γάλατα, κρέατα κ.ά.) τα οποία τρέφονται με φυτικές τροφές και έτσι φτάνουν σ' αυτά οι βλαβερές ουσίες. Ακόμη και με τη λήψη νερού όμως μπορεί να προκληθούν βλάβες.

Οι κυριότερες επιπτώσεις που προκαλούνται στον ανθρώπινο οργανισμό είναι: προβλήματα στο νευρικό και αναπνευστικό σύστημα, βλάβες στο συκώτι και τα νεφρά, προβλήματα στην αναπαραγωγή, διάφορες αλλεργίες, επιδράσεις στο αίμα, πρόκληση καρκίνου διαφόρων μορφών κ.ά. Επιπλέον μπορεί να προκαλέσουν μεταλλαξογένεση (φυσική αλλαγή στα χρωμοσώματα ή βιοχημική αλλαγή στα γονίδια), τερατογένεση (γενετικές ανωμαλίες στο έμβρυο) ή καρκινογένεση (υπερβολική αύξηση κυττάρων).

Έτσι για παράδειγμα η πολιτεία της Καλιφόρνια κατατάσσει 40 φυτοφάρμακα στη λίστα με τα χημικά που πιστεύεται ότι προκαλούν καρκίνο στα ζώα. Παράλληλα, τα περιστατικά καρκίνου του εγκεφάλου σε παιδιά έχουν αυξηθεί κατά 30% τα τελευταία 20 χρόνια. Τα παιδιά με καρκίνο στον εγκέφαλο έχουν πάνω από διπλάσια πιθανότητα να έχουν εκτεθεί σε φυτοφάρμακα από ότι τα υγιή παιδιά.

Είναι παρ’όλα αυτά γεγονός ότι οι χρόνιες επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων είναι δύσκολο να μελετηθούν και γίνονται πιο ορατές και πιο άμεσες όταν γίνεται αλόγιστη χρήση των φυτοφαρμάκων, όταν δεν υπάρχει έλεγχος όσον αφορά την ποιότητα, την ποσότητα και τη χρονική διάρκεια χρήσης τους [v].

2.5 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες με βάση τον οργανισμό που στοχεύουν να εξουδετερώσουν: ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα. Μικρότερες κατηγορίες αποτελούν τα ακαρεοκτόνα, τα τρωκτικοκτόνα, τα νηματοδοκτόνα και τα απολυμαντικά εδάφους. Στη συνέχεια γίνεται μία σύντομη περιγραφή των τριών μεγάλων κατηγοριών [iv].

Τα *ζιζανιοκτόνα* είναι η μεγαλύτερη κατηγορία φυτοφαρμάκων αποτελώντας π.χ. στις Η.Π.Α. τα 2/3 περίπου του συνόλου των χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων. Περιλαμβάνουν διάφορες οργανικές ενώσεις (paraquat, dinoseb, atrazine κ.λπ.) που καθαρίζουν τα εδάφη από ζιζάνια, επιτρέποντας έτσι την εντατική μονοκαλλιέργεια. Τα εδάφη όμως που καθαρίζουν με τέτοια μέθοδο παρουσιάζουν σημαντικό βαθμό διάβρωσης.

Τα *εντομοκτόνα* περιλαμβάνουν ανόργανες χημικές ουσίες (ενώσεις του υδραργύρου, του μολύβδου, του αρσενικού), οργανοχλωριωμένες ενώσεις (DDT, aldrin, dieldrin κ.λπ.), οργανοφωσφορικές ενώσεις (parathion, malathion, diazinon κ.λπ.) και διάφορες άλλες οργανικές ουσίες. Τα εντομοκτόνα είναι η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία φυτοφαρμάκων και παρ'όλο που χρησιμοποιούνται σε μικρότερες ποσότητες από τα ζιζανιοκτόνα, προκαλούν μεγαλύτερο περιβαλλοντικό πρόβλημα, λόγω της αυξημένης τοξικότητάς τους.

Τα *μυκητοκτόνα* είναι χημικές ενώσεις (dichlofluanid, carbendazim, triadimefon κ.λπ.) που χρησιμοποιούνται ιδίως για την προστασία των φρούτων και λαχανικών. Εξαιτίας της χρήσης τους, είτε πριν είτε μετά τη συγκομιδή, η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. (Environmental protection Agency, EPA) έχει εντάξει επτά μυκητοκτόνα στον κατάλογο με τα δέκα επιβλαβέστερα για την υγεία φυτοφάρμακα. Τα άλλα τρία είναι δύο εντομοκτόνα και ένα ζιζανιοκτόνο.

Τα φυτοφάρμακα που εξετάζονται στην παρούσα διπλωματική εργασία και χρησιμοποιούνται για την προστασία του ελαιοκάρπου ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

3. ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη βιβλιογραφία [vi], αναφέρονται και ως οργανοφωσφορικοί εστέρες ή οργανοφωσφορούχες ενώσεις. Πρόκειται για οργανικά φωσφορούχα εντομοκτόνα τα πλείστα των οποίων είναι φωσφορικοί, φωσφοροθειικοί, φωσφοροθειονικοί και φωσφοροθειολικοί εστέρες. Χαρακτηρίζονται ως εντομοκτόνα επαφής και στομάχου, δηλαδή δρουν στα έντομα, όταν βρεθούν σε επαφή με το σώμα τους ή μέσω της φυτικής τροφής τους. Ορισμένες δραστικές ουσίες διαθέτουν και δράση με ατμούς, δηλαδή προσλαμβάνονται από τα έντομα και με την αναπνοή. Η υπολειμματική τους διάρκεια κυμαίνεται από μικρή έως σχετικά μεγάλη. Ο κύριος τρόπος της τοξικής τους δράσης στα έντομα και άλλα ζώα, είναι η παρεμπόδιση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Αποτέλεσμα της παρεμπόδισης αυτής, είναι η περίσσεια ακετυλοχολίνης, γεγονός που προκαλεί πληθώρα νευρωμεταδόσεων στους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος, με συνέπεια υπερδιέγερση, σπασμούς, παράλυση και θάνατο. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μερικά από τα τοξικότερα για τα έντομα, τα θερμόαιμα ζώα και τον άνθρωπο εντομοκτόνα, όπως και μερικά από τα λιγότερο τοξικά και επικίνδυνα για τον άνθρωπο.

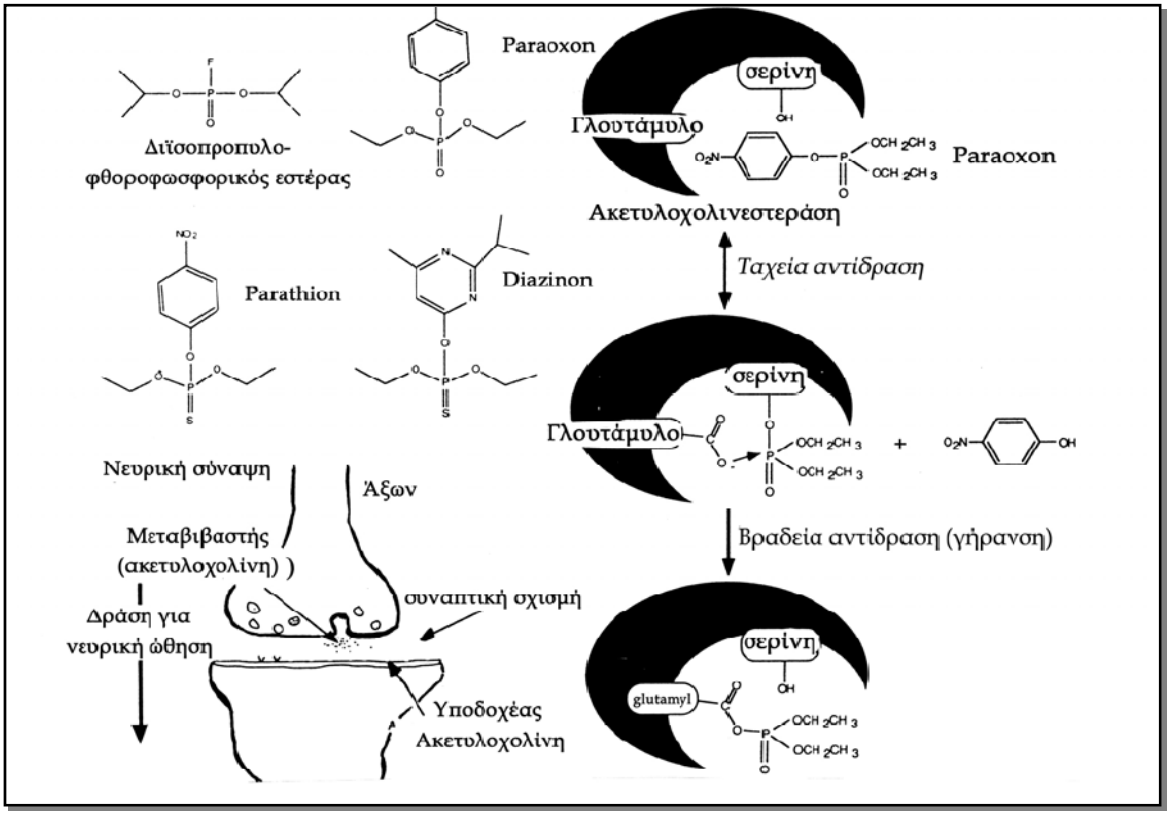
Λόγω της επικινδυνότητας των ουσιών αυτών απέναντι στον άνθρωπο και το περιβάλλον έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση και τα διάφορα κράτη ανώτερα επιτρεπτά όρια στο ελαιόλαδο [4]. Δηλαδή, οι υπολειμματικές ποσότητες αυτών των εντομοκτόνων εάν βρίσκονται στο ελαιόλαδο δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα ανώτερα επιτρεπτά όρια (MRL) που έχουν θεσπιστεί.

Μερικά από τα εντομοκτόνα της κατηγορίας αυτής τα οποία αποτελούν αντικείμενο της διπλωματικής αυτής εργασίας είναι τα εξής: Diazinon, Dichlofention, Parathion methyl, Fenitrothion, Malathion, Parathion ethyl, Bromophos methyl, Ethion, Ethoprophos.

3.2 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Η θέση δράσης αυτών των εντομοκτόνων είναι το νευρικό σύστημα των εντόμων. Τα νευρικά μηνύματα είναι ηλεκτρικά σήματα, όπως π.χ. στα νεύρα του ποδιού του εντόμου. Η μεταφορά του σήματος γίνεται με ένα νευροδιαβιβαστή την ακετυλοχολίνη. Όταν το σήμα μεταφερθεί από το ένα κύτταρο στο άλλο, το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, διασπά την ακετυλοχολίνη και ελευθερώνει τον υποδοχέα ώστε το σήμα να μεταφερθεί πιο πέρα. Αν αυτό δεν γίνει τότε οι νευρικές ίνες θα παραμένουν συνέχεια φορτισμένες.

Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις δεσμεύονται από την ακετυλοχολινεστεράση, εμποδίζοντας έτσι την δράση της. Αυτό προκαλεί διατάραξη της ισορροπίας του νευρικού συστήματος του εντόμου. Τα ορατά συμπτώματα είναι νευρικός υπερεθισμός του εντόμου, αναπηρία και τελικά θάνατος [vii].



Σχήμα 2: Δομές ορισμένων οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων. Σχηματική παρουσίαση της λειτουργίας της νευρικής σύναψης και της τοξικής δράσης με τη παρεμπόδιση της ακετυλενοχολιστεράσης στο νευρικό σύστημα [viii].

Θεωρητικά αυτές οι ουσίες μπορούν να έχουν την ίδια δράση στους θερμόαιμους οργανισμούς. Όμως υπάρχουν ουσίες με μέτρια ή μικρή τοξικότητα για τους οργανισμούς αυτούς, που ταυτόχρονα είναι πολύ αποτελεσματικές εναντίον των εντόμων. Παρά ταύτα όμως όσοι χειρίζονται οργανοφωσφορικά σκευάσματα όπως άλλωστε και γενικά όλα τα σκευάσματα φυτοπροστασίας, πρέπει να είναι προσεκτικοί και να λαμβάνουν τα ενδεδειγμένα μέτρα προστασίας.

3.3 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Το **Parathion** είναι ίσως το γνωστότερο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο με ευρύ φάσμα δράσης (μυζητικά και μασητικά έντομα) και δυνατότητες εφαρμογής σε πολλές καλλιέργειες. Διαθέτει γρήγορη αρχική δράση και διεισδυτική ικανότητα, ώστε να καταπολεμά και τα έντομα στην κάτω επιφάνεια του φύλλου. Αναπτύχθηκε αρχικά από την IG Farben στη δεκαετία του '40. Είναι ιδιαίτερα τοξικό σε οργανισμούς μη-στόχων. Η χρήση του απαγορεύεται ή περιορίζεται σε πολλές χώρες. Στην καθαρότερη μορφή του, αποτελείται από άσπρους κρυστάλλους, αν και οι συχνότερα διανεμημένες μορφές λαμβάνουν τη μορφή ενός καφετιού δύσοσμου υγρού. Το Parathion μεταβολίζεται

γρήγορα σε Paraoxon στο οποίο το άτομο θείου αντικαθίσταται από το οξυγόνο. Η έκθεση στο Paraoxon μπορεί να οδηγήσει σε πονοκέφαλους, σπασμούς, εμετό, κοιλιακό πόνο, διάρροια, έλλειψη συναίσθησης, δύσπνοια και αναπνευστικά προβλήματα. Τέλος, το parathion είναι πολύ τοξικό στις μέλισσες, τα ψάρια, τα πουλιά, και άλλες μορφές άγριας φύσης.

Το **Malathion** είναι άλλο πολύ γνωστό οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, που καταπολεμά μασητικά και μυζητικά έντομα σε διάφορες καλλιέργειες και δεσμεύει αμετάκλητα τη χολινεστεράση. Αντίθετα στα θερμόαιμα αυτό διασπάται σε μη τοξικό μεταβολίτη. Γι' αυτό και το malathion βρίσκει εφαρμογή ως εντομοκτόνο σε αποθήκες τροφίμων, στα σπίτια και στην κτηνιατρική. Εντούτοις, η απορρόφηση ή η κατάποση στο ανθρώπινο σώμα οδηγεί εύκολα στο μεταβολισμό της στο malaoxon, το οποίο είναι 61 φορές πιο τοξικό από το malathion. Για αυτόν τον λόγο, εάν το malathion χρησιμοποιηθεί ή εισαχθεί σε ένα εσωτερικό περιβάλλον, μπορεί να δηλητηριάσει σοβαρά τους κατόχους που ζουν ή που εργάζονται σε αυτό το περιβάλλον. Δεν υπάρχει μέχρι στιγμής καμία αξιόπιστη πληροφορία για τις δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία της χρόνιας έκθεσης στο malathion. Η οξεία έκθεση κυριως σε υψηλά επίπεδα του μαλαθείου προκαλεί συμπτώματα η ένταση των οποίων εξαρτάται από τη δριμύτητα της έκθεσης πιθανά συμπτώματα κατά την οξεία έκθεση στο malathion περιλαμβάνουν την ενόχληση του δέρματος και των ματιών, ναυτία, διάρροια, τον υπερβολικό ιδρώτα, ακόμη και το θάνατο. Τα περισσότερα συμπτώματα τείνουν να επιλυθούν μέσα σε μερικές εβδομάδες.

Το **Diazinon**, είναι ένας θειοφωσφορικός όξινος εστέρας που αναπτύχθηκε το 1952 από μια ελβετική χημική επιχείρηση. Είναι ένα υγρό με χρώμα από άχρωμο έως σκοτεινό καφετί. Είναι ένα μη-συστημικο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο που χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για να ελέγξει τις κατσαρίδες, τα μυρμήγκια, και τους ψύλλους στα κατοικημένα κτήρια. Στις δυτικές ΗΠΑ οι οικιακές χρήσεις της διαζινόνης ακυρώθηκαν το 2004 παρόλα αυτά εγκρίνεται ακόμα για τις γεωργικές χρήσεις. Η διαζινόνη σκοτώνει τα έντομα με την παρεμπόδιση της ακετυλενοχολιστεράσης, ένα ένζυμο απαραίτητο για την κατάλληλη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η διαζινόνη έχει μια χαμηλή συγκράτηση στο χώμα. Ο χρόνος ημιζωής είναι 2 έως 6 εβδομάδες. Τα συμπτώματα που συνδέονται με τη δηλητηρίαση διαζινόνης στους ανθρώπους περιλαμβάνουν αδυναμία, πονοκέφαλους, συμπίεση στο στήθος, θολωμένη όραση, ιδρώτα, ναυτία, εμετό, διάρροια, και αργή ομιλία. Οι καταναλωτές που χρησιμοποιήσουν προϊόντα διαζινόνης πρέπει να ακολουθούν όλες τις κατευθύνσεις και τις προφυλάξεις που αναγράφονται στις ετικέτες των προϊόντων αυτών. Η διαζινόνη είναι γνωστή ως το αποτελεσματικότερο συστημικό εντομοκτόνο κατά των παρασίτων αφήνοντας τις εγκαταστάσεις αβλαβείς.

Το **Dichlofenthion** έχει ένα σχετικά σύντομο χρόνο ημιζωής. Ενώ έχει πραγματοποιηθεί λίγη έρευνα γύρω από την περιβαλλοντική τύχη αυτής της ένωσης, παρόλα αυτά είναι γνωστή για τη σύνθετη κατηγορία στην οποία ανήκει. Το Dichlofenthion ως οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο βιοδιασπάται σχετικά γρήγορα, με αποτέλεσμα γενικά να θεωρείται ασφαλής η χρήση του. Επειδή η προσρόφηση στο χώμα και το ίζημα θεωρείται υψηλή, το dichlofenthion δεν είναι μια ιδιαίτερα κινητή ένωση. Η κατ' εκτίμηση ημιζωή του dichlofenthion στο νερό, το χώμα, και το ίζημα είναι

λιγότερο από μερικά λεπτά. Η κατ' εκτίμηση ημιζωή στον αέρα είναι 2.78 ώρες, πολύ υψηλότερες από αυτή στο νερό, το χώμα, και το ίζημα.

Το **Methyl parathion,** είναι ένα χημικό φυτοφάρμακο που πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο σε ανοικτούς χώρους προκειμένου να ελέγθουν τα έντομα. Το Methyl parathion δεν προορίζεται να χρησιμοποιείται μέσα στα κτήρια ή τα σπίτια. Τέτοια χρήση είναι παράνομη. Είναι ένα καφετί υγρό που γυρίζει σε γαλακτώδες λευκό όταν αναμιγνύεται με το νερό. Μπορεί να αφήσει έναν κίτρινο λεκέ στις περιοχές όπου έχει ψεκαστεί. Υπαίθρια, η ουσία αυτή μετατρέπεται σε αβλαβή υποπροϊόντα. Εντούτοις, ακόμα και έξω, οι εργαζόμενοι έχουν την υποχρέωση να μείνουν μακριά από τις περιοχές που έχουν ψεκαστεί για 48 ώρες [vix]. Στο εσωτερικό των κτιρίων ή των σπιτιών, το φυτοφάρμακο αυτό δε διασπάται γρήγορα, ιδιαίτερα όταν ψεκάζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επίσης, οι άνθρωποι είναι πιθανότερο να έρθουν σε επαφή με τη χημική ουσία στα σπίτια τους από ότι όταν ψεκάζεται σε έναν υπαίθριο χώρο. Η είσοδος της ουσίας αυτής στο σώμα γίνεται μέσω της αναπνευστικής οδού, της επαφής με επιφάνειες που ψεκάστηκαν με τη χημική ουσία ή την κατανάλωση των μολυσμένων τροφίμων. Σε μικρές συγκεντρώσεις, το Methyl parathion μπορεί να προκαλέσει πονοκέφαλους, ναυτία, εμετό, διάρροια και ίλιγγο. Τα πιο υψηλά επίπεδα έκθεσης μπορούν να προκαλέσουν τη θολωμένη όραση, τη δύσκολη αναπνοή και τρέμουλο [x].

Το **Ethoprophos** είναι ένα μη-συστημικό οργανοφωσφορικό φυτοφάρμακο που είναι εξαιρετικά τοξικό στα θηλαστικά και δεν είναι φυτοτοξικός όταν χρησιμοποιείται όπως πρέπει. Είναι πολύ τοξικό κατά την απορρόφηση μέσω του δέρματος και την εισπνοή. Παράλληλα, είναι παρά πολύ τοξικό όταν εισέρχεται μέσω της στοματικής κοιλότητας και η πιθανή στοματική θανατηφόρα δόση για τους ανθρώπους είναι 5-50 mg/kg [xi].

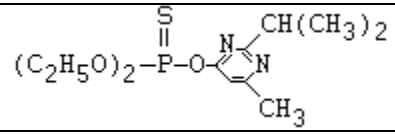
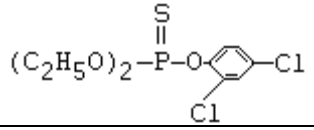
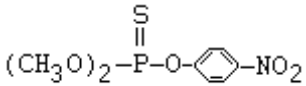
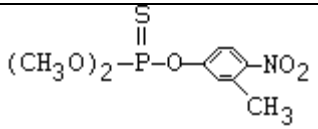
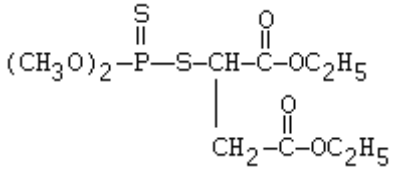
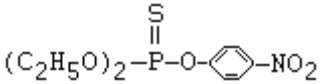
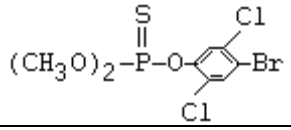
Το **Bromophos methyl** είναι ένα φυτοφάρμακο της ομάδας των organophosphate, το οποίο είναι τοξικό και προκαλεί στον ανθρώπινο οργανισμό προβλήματα όπως πονοκέφαλο, υπνηλία, ναυτία, θολωμένη όραση, σπασμούς και παράλυση των μυών και των άκρων. Παράλληλα, είναι ιδιαίτερα τοξικό στους υδρόβιους οργανισμούς.

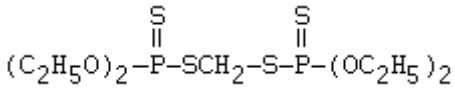
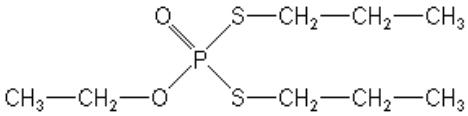
Το **Ethion** είναι ένα φυτοφάρμακο της ομάδας των organophosphate που χρησιμοποιείται σε μια ευρεία ποικιλία των τροφίμων, καθώς καταπολεμά αποτελεσματικά πολλές κατηγορίες εντόμων. Αναμιγνύεται με το πετρέλαιο και ψεκάζεται στα δέντρα για να σκοτώσει τα αυγά και τις προνύμφες. Το ethion είναι ιδιαίτερα τοξικό από την εισπνοή, τη δερμική έκθεση, και την κατάποση. Όπως τα περισσότερα organophosphates σε βραχυχρόνια έκθεση, το ethion απορροφάται εύκολα μέσω του δέρματος και μπορεί με τον τροπο αυτο να προκαλέσει σοβαρά εγκαύματα. Είναι σχεδόν αμετάβλητο στις κανονικές θερμοκρασίες, αλλά όταν χρησιμοποιείται ως ψεκασμός, εισπνέεται εύκολα, με αποτέλεσμα να προκαλεί αναπνευστικά προβλήματα. Επίσης, προκαλεί ερεθισμούς στα μάτια, θολωμένη όραση, αδυναμία, κούραση και παράλυση τνω άκρων και των μυών. Σε βαριές περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει έλλειψη συναίσθησης, σπασμούς και κώμα.

Η επαναλαμβανόμενη ή παρατεταμένη έκθεση του μπορεί να οδηγήσει στα ίδια αποτελέσματα με την οξεία έκθεση συμπεριλαμβανομένων των καθυστερημένων συμπτωμάτων. Άλλα αποτελέσματα που αναφέρονται στους εργαζομένους που εκτίθενται επανειλημμένα περιλαμβάνουν την εξασθενισμένη μνήμη και τη συγκέντρωση, τον αποπροσανατολισμό, τις βαριές καταθλίψεις, την οξυθυμία, τη σύγχυση, τον πονοκέφαλο, τις λεκτικές δυσκολίες, τους καθυστερημένους χρόνους αντίδρασης, τους εφιάλτες, την υπνοβασία και την υπνηλία ή την αϋπνία [xii].

Το **Fenitrothion** είναι ένα εντομοκτόνο επαφών και ανήκει στη οικογένεια των εντομοκτόνων της ομάδας των organophosphate. Θεωρείται ανασταλτικός παράγοντας χολινεστεράσεων. Το fenitrothion είναι επίσης αποτελεσματικό ενάντια στα οικιακά έντομα και όλα τα έντομα ενόχλησης που απαριθμούνται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας. Η αποτελεσματικότητά της ως διανυσματικός πράκτορας ελέγχου για την ελονοσία επιβεβαιώνεται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας. Το Fenitrothion εισήχθη το 1959 από τις Sumitomo Chemical Company και Bayer Λεβερκούζεν. Το fenitrothion είναι λιγότερο τοξικό από το parathion παρόλο που το φάσμα της εντομοκτόνου δραστηριότητας και η δομή τους είναι παρόμοιες. Τα χρόνια συμπτώματα στους ανθρώπους περιλαμβάνουν: γενικός δυσφορία, κούραση, πονοκέφαλος, απώλεια μνήμης και δυνατότητα να συγκεντρωθεί, ανορεξία, ναυτία, δίψα, απώλεια βάρους, αρμοσφίκτες, μυϊκές αδυναμία και δονήσεις [xiii].

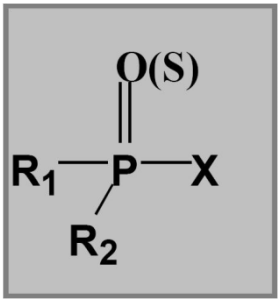
Πίνακας 2: Χημική ταυτότητα των οργανοφωσφορικών ενώσεων

Pesticide	**CAS *(Χημικό όνομα)***	***Μοριακός τύπος***	***Μοριακή δομή***	**CAS *Registry number***
Diazinon	Phosphorothioc acid, *O,O* -diethyl *O* -[6-methyl-2-(1- methylethyl)-4- pyrimidinyl] ester	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$		333-41-5
Dichlofention	Phosphorothioic acid, *O* -(2,4-di- chlorophenyl) *O,O* - diethyl ester	$C_{10}H_{13}Cl_2O_3PS$		97-17-6
Parathion methyl	Phosphorothioic acid, *O,O* -dimethyl *O* -(4-nitrophenyl) ester	$C_8H_{10}NO_5PS$		298-00-0
Fenitrothion	Phosphorothioic acid, *O,O* -dimethyl *O* -(3-methyl-4- nitrophenyl) pester	$C_9H_{12}NO_5PS$		122-12-5
Malathion	Butanedioic acid, [(dimethoxyphos-phinothioyl)thio]-, diethyl ester	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$		121-75-5
Parathion ethyl	Phosphorothioic acid, *O,O* -diethyl *O* -(4-nitrophenyl) ester	$C_{10}H_{14}NO_5PS$		56-38-2
Bromophos methyl	Phosphorothioic acid, *O* -(4-bromo-2,5-dichlorophenyl) *O,O* -dimethyl ester	$C_8H_8BrCl_2O_3PS$		2104-96-3

Ethion	Phosphorodithioic acid, *S,S′* -methy- lene *O,O,O′,O′*- tetramethyl ester	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$		22756-17-8
Ethoprophos	*o*-ethyl *S,S*-dipropyl phosphorodithioate	$C_8H_{19}O_2PS_2$		13194-48-4

3.4 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Οι διάφορες δομές των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων είναι διευκρινισμένες στον πίνακα (4). Οι ενώσεις είναι κανονικά εστέρες, αμίδια ή παράγωγα του φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος:

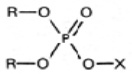
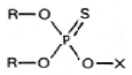
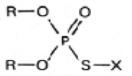
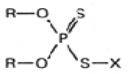
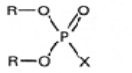
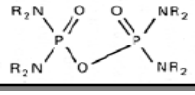


Σχήμα 3: Γενική μορφή οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων

Όπου, R1 και R2 είναι συνήθως απλές αλκυλικές ομάδες, εκ των οποίων και οι δύο μπορούν να συνδεθούν άμεσα με το φώσφορο (στην ομαδα των phosphinates), ή να συνδεθεί μέσω -O, ή -του S (στα φωσφορικά άλατα), ή το R_1 συνδέεται άμεσα και R_2 ειναι συνδεμένο μέσω μιας από τις ανωτέρω ομάδες, την ομάδα phosphonates.

Στις φωσφοροαμίδες (phosphoramidates), ο άνθρακας συνδέεται με το φώσφορο κατευθείαν–με μια ομάδα NH. Η ομάδα X μπορεί να είναι οποιαδήποτε από μια ευρεία ποικιλία αλειφατικών, αρωματικών, ή ετεροκυκλικών ομάδων που συνδέονται με το φώσφορο μέσω ενός δεσμού κάποιας αστάθειας (συνήθως -o ή -s). Το διπλό-συνδεμένο άτομο μπορεί να είναι οξυγόνο ή θείο και οι σχετικές ενώσεις, παραδείγματος χάριν, θα καλούνταν τα φωσφορικά άλατα ή φωσφοροθειικοί. Η μορφή P=O ενός εστέρα thioate μπορεί να αναφερθεί ως oxon, και αυτό ενσωματώνεται συχνά στο τετριμμένο όνομα (π.χ., parathion είναι η ένωση P=S του paraoxon) [xiv].

Πίνακας 3: Οι κύριες χημικές ομάδες των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων [vii].

	Main group		Examples
1.	Orthophosphates		Chlorfenvinphos, dichlorvos, mevinphos, phosphamidon
2.	Thionphosphates (phosphoro*thion*ates		Bromophos, diazinon, fenitrothion, parathion, pirimiphos (methyl and ethyl)
3.	Thiolphosphates (phosphoro*thiol*ates)		Demeton-*S*-methyl, oxydemeton-methyl, vamidothion
4.	Dithiophosphates (phosphoro*thiolothion*ates)		Azinphos-methyl, dimethoate, disulfoton, malathion, menazon, phorate
5.	Phosphonates (isomeric phosphonates exist, as do related thiophosphonates)		Trichlorphon, butonate
6.	Pyrophosphoramides		Schradan

Δεδομένου ότι η μορφή P=S είναι πραγματικά η σταθερότερη, πολλά εντομοκτόνα κατασκευάζονται με αυτήν την μορφή που μπορεί να μετατραπεί στο βιολογικά ενεργό οxon στους ιστούς.

Τα περισσότερα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα είναι ουσίες ελάχιστα διαλυτές στο νερό και έχουν έναν υψηλό συντελεστή διαχωρισμού μεταξύ ελαίου-νερού καθώς επίσης και χαμηλή πίεση ατμών και συγκριτικά χαμηλής αστάθειας (volatility). Διασπορά λόγω του αέρα των σταγονιδίων των εντομοκτόνων κατά τη διαδικασία του ψεκασμού είναι δυνατή, αλλά, γενικά, μόνο μικρές ποσότητες είναι πιθανό να διανεμηθούν κατά αυτόν τον τρόπο. Στο χώμα και το υδάτινο περιβάλλον, ο χρόνος επιβίωσης και η δυνατότητα διανομής στο νερό μπορούν να επηρεαστούν από την ελαφριά ένταση (light intensity) και το pH. Τα περισσότερα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι σταθερότερα σε εύρος pH που απαντάται συνήθως στο περιβάλλον (pH: 3-6), από ό τι στο ουδέτερο pH, ενώ είναι ιδιαίτερα ασταθή σε επίπεδα pH κάτω από 2. Οι διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες, ιδιαίτερα η θερμοκρασία και η υγρασία, πριν, κατά τη διάρκεια, και μετά από τον ψεκασμό μπορούν προφανώς να επηρεάσουν το χρόνο επιβίωσης.

Πίνακας 4: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εξεταζόμενων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων

	Diazinon	Dichlofention	Parathion methyl	Fenitrothion	Malathion	Parathion ethyl	Bromophos methyl	Ethion	Ethoprophos
Σημείο βρασμού (°C) (στους 0,2 mmHg)	120	120-123	143	140-145 (0,1 mmHg)	156–157 (0,7 mmHg)	157-162 (0,6 mmHg)	140-142	164–165 (0,3 mmHg)	86-91
Φυσική κατάσταση	Υγρό	Υγρό	Στερεό	Υγρό	Υγρό	Υγρό	Στερεό (κρύσταλλοι)	Υγρό	Υγρό
Χρώμα	Άχρωμο*	Άχρωμο	Άσπρο*	Κίτρινο/ Καφέ	Άχρωμο*	Κίτρινο*	Άσπρο	Άσπρο/ Άχρωμο	Κίτρινο
Μοριακή μάζα(g/mol)	304,38	315,16	263,22	277,25	330,38	291,28	366,0	384,49	242,3
Πυκνότητα (g/mL) (στους 20°C)	1,11	1,32	1,36	1,32	1,23	1,26	-	1,22	1,09
Σταθερά Henry (atm m^3/mol) (στους 25°C)	$1,40 \times 10^{-6}$	$9,48 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-7}$	-	$4,90 \times 10^{-9}$	30×10^{-7}	-	$6,90 \times 10^{-7}$	1.30×10^{-7}
Διαλυτότητα στο νερό (mg/L)(στους 20 °C)	40	0,25	37,70	14 (στους 25°C)	145	24 (στους 25°C)	40 (στους 25°C)	2	1300
Τάση ατμών (mmHg) (στους 20 °C)	$1,40 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-4}$	$9,70 \times 10^{-6}$	$1,35 \times 10^{-4}$	$5,03 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-5}$	$1,30 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-4}$
Συντελεστής κατανομής, (Log K_{ow})	3,81	5,14	2,86	3,16	2,36	3,83	4,88	5,07	2,99

* Σε καθαρή μορφή ή καφετί/κίτρινο υγρό (ως τεχνικό προϊόν)

3.5 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην αποτελεσματική προστασία της γεωργίας ενάντια σε βλαβερούς οργανισμούς, καθώς και στον έλεγχο των εντόμων που μεταδίδουν ασθένειες. Εν τούτοις, οι ίδιες χημικές ουσίες, λόγω των τοξικών τους ιδιοτήτων, θέτουν σε ενδεχόμενο κίνδυνο τους χρήστες των φυτοφαρμάκων αυτών, το περιβάλλον και τους καταναλωτές των τροφίμων. Αυτοί οι κίνδυνοι πρέπει να ελαχιστοποιηθούν με τη σωστή και ασφαλή χρήση τους. Η όλο και μεγαλύτερη δραστικότητα και πολυπλοκότητα αυτών των φυτοφαρμάκων, καθώς και η αυξανόμενη ανησυχία της κοινής γνώμης σχετικά με τις παρενέργειές τους, έχουν οδηγήσει τις κυβερνήσεις στο να θέσουν κανόνες και όρια σχετικά με την κατάλληλη χρήση τους και να παρέχουν συνεχή υποστήριξη από την κατασκευή έως την τελική χρήση τους.

Ο στόχος της σχετικής με τα φυτοφάρμακα νομοθεσίας είναι να προστατεύσει την κοινωνία από τις βλαβερές συνέπειες της ακατάλληλης χρήσης φυτοφαρμάκων. Για το σκοπό αυτό, έχει θεσπίσει ανώτερα επιτρεπτά όρια των υπολειμμάτων των ενώσεων αυτών που βρίσκονται στο ελαιόλαδο.

Μέγιστο Όριο Υπολειμμάτων (Maximum Residue Level-MRL) σε προϊόντα φυτικής προέλευσης είναι η μέγιστη ποσότητα υπολείμματος που αναμένεται κατά την εφαρμογή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σύμφωνα με την Ορθή Γεωργική Πρακτική [xv].

Γενικά, ως υπόλειμμα χαρακτηρίζεται μία ή περισσότερες ουσίες, παρούσες είτε εντός είτε επί των φυτών, των προϊόντων φυτικής προέλευσης, ή αλλού στο περιβάλλον, οι οποίες προκύπτουν από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, περιλαμβανομένων των μεταβολιτών τους και των προϊόντων που προέρχονται από την αποικοδόμηση ή την αντίδρασή τους.

Η Ορθή Γεωργική Πρακτική είναι ο τρόπος εφαρμογής ενός εγκεκριμένου φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε μία καλλιέργεια, ο οποίος εξασφαλίζει την αποτελεσματικότητα στην χρήση, έχοντας ως κύριες παραμέτρους τη δόση ανά επιφάνεια (γρ. ή κ. εκ. φυτοπροστατευτικού προϊόντος ανά στρέμμα ή εκτάριο), τον αριθμό των εφαρμογών του φυτοπροστατευτικού προϊόντος, τον ψεκαστικό όγκο (λίτρα νερού ανά στρέμμα ή εκτάριο), καθώς και την τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (ημέρες).

Το MRL εκφράζεται σε mg ουσίας ανά kg βάρους φυτικού προϊόντος ή ppm (parts per million=μέρη στο εκατομμύριο) και αναφέρεται πάντα σε συγκεκριμένο ζευγάρι ουσίας και φυτικού προϊόντος [xv].

Συνδέεται με τη διαδικασία έγκρισης κυκλοφορίας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ευρωπαϊκό και σε εθνικό επίπεδο και ορίζεται είτε σε ευρωπαϊκό επίπεδο, οπότε ισχύει υποχρεωτικά για όλα τα Κράτη Μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.), είτε σε επίπεδο ενός Κράτους Μέλους και ισχύει για τις συναλλαγές του συγκεκριμένου Κράτους Μέλους με όλες τις υπόλοιπες χώρες. Το MRL ορίζεται με στόχο τη διευκόλυνση του εμπορίου μεταξύ των Κρατών Μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.),

καθώς και μεταξύ Ε.Ε. και Τρίτων Χωρών. Δεν αποτελεί τοξικολογική παράμετρο της υπό έλεγχο ουσίας. Αντιθέτως, η ύπαρξη του εξασφαλίζει την υγεία των καταναλωτών από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, στο ελαιόλαδο το μέγιστο όριο υπολειμμάτων των αναλυόμενων οργανοφωσφορικών ενώσεων είναι [9]:

Πίνακας5: Ανώτερα επιτρεπτά όρια οργανοφωσφορικών ενώσεων

Οργανοφωσφορικές ενώσεις	**Ανώτερα επιτρεπτά όρια (MRLs) (μg/Kg=ppb)**
Ethoprophos	δεν έχει οριστεί
Diazinon	20
Dichlofenthion	δεν έχει οριστεί
Parathion methyl	200
Fenitrothion	500
Malathion	500
Parathion	2
Bromophos methyl	δεν έχει οριστεί
Ethion	100

4. ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID PHASE MICROEXTRACTION, SPME)

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι οργανικοί διαλύτες, που χρησιμοποιούνταν ευρέως κατά το παρελθόν στα αναλυτικά εργαστήρια όλου του κόσμου, αποτελούσαν σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον γενικότερα. Σαν συνέπεια αυτού του προβλήματος, κατά την τελευταία δεκαετία αναπτύχτηκαν πολλές μέθοδοι εκχύλισης που δεν χρησιμοποιούν οργανικούς διαλύτες και οι οποίες γίνονται όλο και πιο δημοφιλείς λόγω της απλότητας και της ασφαλούς χρήσης τους. Μια από τις μεθόδους εκχύλισης που δεν χρησιμοποιεί διαλύτες είναι η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME), που είναι μέθοδος εκχύλισης με απορροφητικά υλικά παρόμοια με την εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) [10].

Η μέθοδος μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) αναπτύχθηκε στη δεκαετία του '90 από τους J. Pawliszyn και Arthur και αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη και αποδεκτή μέθοδο εκχύλισης. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση πτητικών και μη πτητικών ενώσεων σε υγρά και αέρια δείγματα καθώς επίσης και σε πολύ σύνθετα δείγματα, όπως το χώμα και η ιλύς [11], ενώ πλέον στις μέρες μας, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος ενώσεων σε ποικίλα περιβάλλοντα.

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) πλεονεκτεί σε σύγκριση με άλλες τεχνικές εκχύλισης καθώς είναι μια πολύ απλή, γρήγορη, ευαίσθητη, και ακριβής τεχνική για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικρορρύπων που απαντώνται στο ευρύτερο περιβάλλον του ανθρώπου.

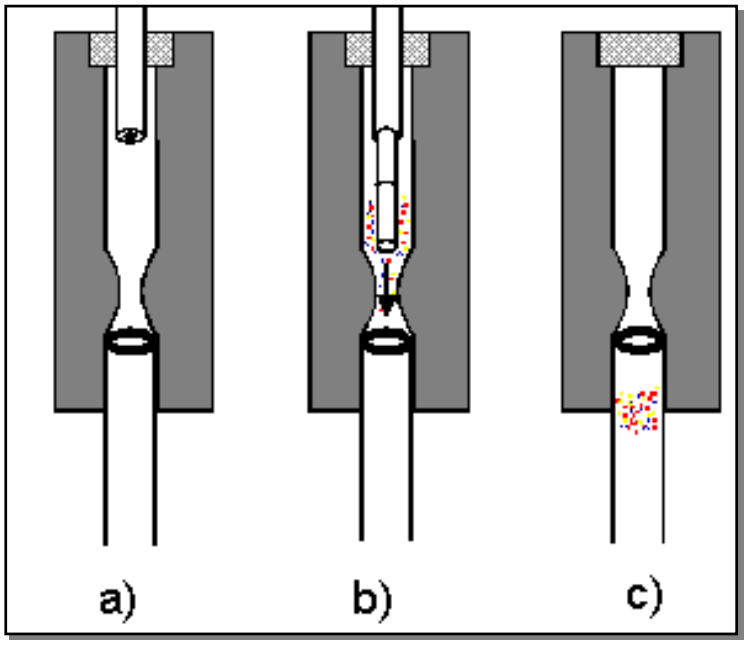
Παρόλο όμως που είναι μια απλή τεχνική εντούτοις υπάρχουν κάποιοι παράγοντες οι οποίοι θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη κα να ελέγχονται αυστηρά προκειμένου η SPME να δίνει τα βέλτιστα κάθε φορά αποτελέσματα. Τέτοιοι παράγοντες είναι η κατάλληλη επιλογή του τρόπου εκχύλισης, της επικάλυψης της ίνας, της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης, της ανάδευσης, του χρόνου εκρόφησης και τέλος του όγκου του δείγματος.

4.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ SPME

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελεί μια μέθοδο εκχύλισης η οποία έχει κερδίσει ευρεία αναγνώριση τα τελευταία χρόνια. Η SPME είναι μια γρήγορη διαδικασία, η οποία δεν απαιτεί διαλύτες και πολύπλοκο εργαστηριακό εξοπλισμό και αναπτύχθηκε κυρίως για να ικανοποιήσει την ανάγκη της γρήγορης προετοιμασίας δειγμάτων στο εργαστήριο και στο πεδίο όπου βρίσκεται το προς μελέτη σύστημα [12]. Η τεχνική της SPME μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση απλών ή πολύπλοκων υγρών και αέριων δειγμάτων.

Σε αυτή την τεχνική χρησιμοποιείται μια λεπτή πολυμερής ίνα (fiber) από οξείδιο του πυριτίου (SiO_2), η οποία είναι επικαλυμμένη από μια στατική φάση. Η επικαλλυμένη ίνα είναι προσαρμοσμένη σε ένα ειδικό σύστημα υποδοχής και στήριξης (Holder), τύπου σύριγγας που εξυπηρετεί τόσο την προστασία της ίνας όσο και τον τρόπο δειγματοληψίας [10]. Η ίνα είτε βυθίζεται στο δείγμα, είτε εκτίθεται στον υπερκείμενο

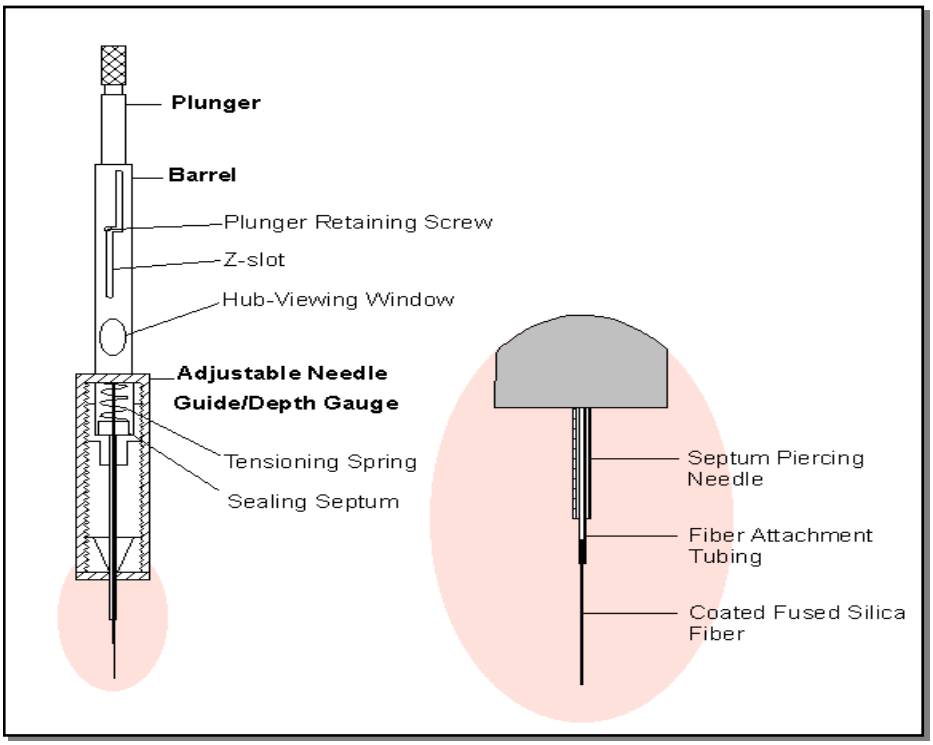
χώρο πάνω από αυτό. Οι αναλυόμενες ουσίες προσροφώνται ή απορροφώνται από τη στατική φάση της ίνας ανάλογα με τις ιδιότητες της επίστρωσής της, όπως είναι η πολικότητα και η δομή. Ο διαχωρισμός αυτός των ουσιών συνεχίζεται έως ότου επέλθει ισορροπία. Η τελική ποσότητα των εκχυλισμένων συστατικών στην επίστρωση της ίνας στην ισορροπία, καθορίζεται από το συντελεστή κατανομής ανάμεσα στη μήτρα του δείγματος και στο υλικό επίστρωσης. Ως μήτρα δείγματος ορίζονται τα συστατικά που υπάρχουν σε ένα δείγμα πέραν της προσδιοριζόμενης ουσίας (π.χ αέρας, νερό). Η ίνα επανατραβάται στη σύριγγα και η σύριγγα απομακρύνεται από το δείγμα [10]. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η εισαγωγή της σύριγγας στον εισαγωγέα (injector) του αέριου χρωματογράφου (GC) για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Στο διάστημα αυτό (χρόνος εκρόφησης), γίνεται θερμική εκρόφηση των εκχυλισμένων ουσιών (Σχήμα 4) και ακολουθεί η ανάλυσή τους με τη βοήθεια ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή που είναι προσαρμοσμένος στον αέριο χρωματογράφο.



Σχήμα 4: Εισαγωγή της σύριγγας στον αέριο χρωματογράφο σε τρία στάδια
a) Διείσδυση βελόνας στο διάφραγμα (septum)
b) Θερμική εκρόφηση των εκχυλισμένων ουσιών
c) Είσοδος των αναλυόμενων ουσιών στην είσοδο της στήλης

Η συσκευή για τη μέθοδο SPME που διατίθεται στο εμπόριο (Σχήμα 5) είναι εφοδιασμένη με έναν οδηγό ρυθμιζόμενου μεγέθους (adjustable depth gauge), που ελέγχει την απόσταση που η βελόνα της συσκευής επιτρέπεται να τρυπήσει το δοχείο του δείγματος ή τον εισαγωγέα. Η ύπαρξη του οδηγού αυτού είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς εάν η ίνα χτυπήσει σε ένα εμπόδιο μπορεί εύκολα να καταστραφεί. Ένας πλαστικός δακτύλιος τοποθετείται σε μια αριθμημένη κλίμακα πάνω στη συσκευή στο σημείο μέχρι το στο οποίο επιθυμούμε να ανεβάσουμε τον οδηγό ρυθμιζόμενου μεγέθους Μια μικρή βίδα περιορίζει την κίνηση του εμβολου σε μια σχισμή σχήματος ζ της συσκευής. Το έμβολο μπορεί να κινηθεί στην κατώτερη θέση μόνο όταν θέλουμε να αντικαταστήσουμε την ίνα. Κάθε είδος ίνας φέρει ένα διαφορετικό χρώμα, το οποίο όταν η ίνα είναι τοποθετημένη στη συσκευή, ελέγχεται από ένα παράθυρο παρατήρησης (hub-viewing window). Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, της μεταφοράς από το δείγμα στον εισαγωγέα και του τρυπήματος του διαφράγματος (όποτε αυτό είναι

απαραίτητο), η ίνα βρίσκεται στο εσωτερικό της βελόνας, με την βίδα να βρίσκεται στην υψηλότερη θέση. Ουσιαστικά, η ίνα βρίσκεται εξω από τη βελόνα μόνο κατά τη διάρκεια της εκχύλισης και της εκρόφησης των αναλυόμενων ουσιών.



Σχήμα 5: Τυπική διάταξη SPME

4.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ SPME ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Οι μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνταν ευρέως για την ανάλυση μικρορρύπων πριν από την εφαρμογή της SPME ήταν κυρίως η υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE). Οι μέθοδοι αυτές έχουν αρκετά μειονεκτήματα που τις καθιστούν μη αποτελεσματικές για τον προσδιορισμό και την παρακολούθηση των μικρορρύπων. Τα πλέον σημαντικά μειονεκτήματα των κλασσικών μεθόδων εκχύλισης είναι ότι είναι χρονοβόρες, ακριβές και ότι απαιτούν μεγάλες ποσότητες διαλυτών υψηλής καθαρότητας οι οποίοι είναι ακριβοί καθώς και σε πολλές περιπτώσεις πολύ τοξικοί αποτελώντας κίνδυνο για την υγεία και το περιβάλλον. Ένα επιπλέον μειονέκτημα των τεχνικών αυτών είναι ότι στο τελικό στάδιο, απαιτούν μείωση στον όγκο του εκχυλίσματος μέσω εξάτμισης λόγω του ότι μπορεί να εισαχθεί μόνο πολύ μικρή ποσότητα (μl) στο μηχάνημα διαχωρισμού και ανίχνευσης ρύπων (GC, HPLC). Έτσι, έχουμε όχι μόνο απώλεια των πιο πτητικών ουσιών, αλλά και απώλεια στην ευαισθησία αυτών των τεχνικών [4, 13].

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) πλεονεκτεί έναντι της υγρής–υγρής εκχύλισης επειδή αποβάλλει πλήρως τους διαλύτες από τη διαδικασία εκχύλισης και δεν απαιτεί ογκώδη γυαλικά. Ενώ η υγρή-υγρή και η στερεάς φάσης εκχύλιση στηρίζονται στην εξαντλητική αφαίρεση των αναλυτών από το δείγμα, η SPME είναι μια διαδικασία ισορροπίας που στηρίζεται στον αναλύτη. Αποτελεί μια αρκετά γρήγορη

τεχνική αφού ο χρόνος προετοιμασίας των δειγμάτων μπορεί να μειωθεί σε μερικά λεπτά [14, xvi]. Το ισχυρότερο πλεονέκτημά της οφείλεται στον πολύ μικρό όγκο δείγματος που χρειάζεται για την πραγματοποίηση μιας ανάλυσης. Για μικρούς όγκους δείγματος, πλήρης εκχύλιση μπορεί να γίνει όταν οι σταθερές κατανομής είναι μεγάλες και αυτό χρησιμεύει όταν είναι απαραίτητη η εκχύλιση μέχρι εξάντληση. Η φάση της εκχύλισης μπορεί να είναι ένα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερές υγρό ή στερεό απορροφητικό υλικό, αλλά τυπικά είναι ένα πορώδες υλικό πολύ μεγάλου εμβαδού επιφάνειας. Η τεχνική SPME επιτρέπει, ακόμα, την γρήγορη εκχύλιση δείγματος και μεταφοράς των αναλυόμενων στοιχείων στο αναλυτικό όργανο. Η εμπορικά διαθέσιμη ίνα είναι απλή στο να χρησιμοποιηθεί, ανέξοδη, και εξαιρετικά ανθεκτική, δεδομένου ότι πάρα πολλές εκχυλίσεις μπορούν να εκτελεσθούν από μια ενιαία ίνα χωρίς κάποια απώλεια απόδοσης, ακόμη και με δείγματα που είναι ιδιαίτερα ρυπασμένα [14, xvi]. Εξαιτίας της διάταξης μιας συσκευής SPME που είναι μικρή και βολική, οι επικαλυμμένες ίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση στοιχείων από πολύ μικρά δείγματα. Επίσης, η μέθοδος ενδείκνυται για εφαρμογή σε φυσικά συστήματα. Πρέπει, ακόμα, να σημειωθεί ότι το κλάσμα των στοιχείων που εκλύονται αυξάνει, καθώς η αναλογία του επικαλυμμένου όγκου της ίνας προς τον όγκο του δείγματος αυξάνεται.

Συμπερασματικά, η SPME είναι μια πολύ απλή, γρήγορη, ευαίσθητη, και ακριβής τεχνική για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικρορρύπων [14, xvi]. Η ποσοτική ανάλυση σύνθετων δειγμάτων μπορεί να γίνει σε λίγα λεπτά, ακόμα κι αν οι χρόνοι ισορρόπησης για τις αναλυόμενες ουσίες κυμαίνονται από μερικά λεπτά μέχρι αρκετές ώρες. Έτσι η τεχνική της SPME αποτελεί μια εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών αναλυτικών τεχνικών που απευθύνονται σε πτητικά και ημι-πτητικά οργανικά συστατικά. Παρέχει γραμμικά αποτελέσματα και είναι συμβατή με ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Με τον έλεγχο της πολικότητας και το πάχος επικάλυψης της ίνας, διατηρώντας σταθερό το χρόνο της δειγματοληψίας και προσαρμόζοντας άλλες παραμέτρους εκχύλισης, μπορεί και εξασφαλίζει υψηλής σταθερότητας ποσοτικοποιημένα αποτελέσματα σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενώσεων. Σήμερα χρησιμοποιείται με επιτυχία για την ανάλυση: αέριων, υδάτινων και εδαφικών περιβαλλοντικών δειγμάτων που περιέχουν κυρίως οργανικές ενώσεις. Επίσης, αποτελεί αντικείμενο έρευνας για πολλές ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο σε διαφορετικά πεδία έρευνας περιλαμβάνοντας περιβάλλον, ποιότητα τροφίμων, φυσικά προϊόντα, φαρμακευτική, βιολογία και τοξικολογία [14,xvi].

4.4 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ SPME

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) είναι μια μέθοδος ισορροπίας πολλαπλών φάσεων. Συχνά το σύστημα εκχύλισης είναι πολύπλοκο, όπως στην περίπτωση ενός δείγματος που αποτελείται από μια υδατική φάση και μια αέρια υπερκείμενη φάση, με αιωρούμενα στερεά που έχουν διάφορες προσροφητικές αλληλεπιδράσεις με τις προς ανάλυση ουσίες. Για την απλοποίηση του συστήματος, λαμβάνονται υπόψη μόνο τρεις φάσεις: η επικάλυψη της ίνας, η αέρια φάση ή η υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος και ένα ομοιογενοποιημένο περιβάλλον, όπως καθαρό νερό ή αέρας. Κατά την διάρκεια της περιόδου ανάλυσης, τα στοιχεία μετακινούνται μεταξύ των τριών φάσεων μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία. Βέβαια αυτό είναι ένα ιδανικό σύστημα που δεν λαμβάνει υπόψη την ανομοιογένεια του περιβάλλοντος του δείγματος και τα χημικά ή φυσικά

χαρακτηριστικά των προς ανάλυση στοιχείων, όπως η αστάθεια και η αποικοδόμηση [10].

Η θεωρία της μικροεκχύλισης στερεής φάσης καλύπτει τις κύριες διαδικασίες τις SPME εφαρμόζοντας τις βασικές αρχές της κινητικής [10] και της θερμοδυναμικής [10]. Οι απλοποιημένες μαθηματικές σχέσεις οι οποίες αναφέρονται αναλυτικότερα παρακάτω μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για περισσότερο πολύπλοκα και ετερογενή δείγματα ως μια πρώτη προσέγγιση.

4.4.1 ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ

Η ολική μάζα των προς ανάλυση ουσιών που εκχυλίζεται από μια ίνα σχετίζεται με την όλη ισορροπία των προς ανάλυση ουσιών με τις τρεις φάσεις. Καθώς η συνολική μάζα των προς ανάλυση ουσιών πρέπει να παραμείνει η ίδια κατά τη διάρκεια της εκχύλισης,θα ισχύει το παρακάτω ισοζύγιο μάζας:

$$C_0 \cdot V_S = C_c^{\infty} \cdot V_c + C_h^{\infty} \cdot V_h + C_s^{\infty} \cdot V_s \qquad (5)$$

Όπου,

C_0 : αρχική συγκέντρωση των προς ανάλυση στοιχείων στο δείγμα

$C_c^{\infty}, C_h^{\infty}, C_s^{\infty}$: τελικές συγκεντρώσεις ισορροπίας των στοιχείων στην επικάλυψη της ίνας στην υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος και στο δείγμα (coating,headspace, sample)

V_c, V_h και V_s : οι όγκοι της επικάλυψης, της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος και του δείγματος.

Η μάζα των στοιχείων που απορροφώνται είτε πάνω είτε στο εσωτερικό της επικάλυψης δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$n = C_c^{\infty} \cdot V_c \qquad (6)$$

Η σταθερά κατανομής, επικάλυψη ίνας / υπερκείμενου αέρα (coating / headspace) του δείγματος μπορεί να οριστεί ως εξής:

$$K_{ch} = C_c^{\infty} / C_h^{\infty} \qquad (7)$$

Η σταθερά κατανομής, υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος / δείγμα (headspace / sample) μπορεί να οριστεί ως εξής:

$$K_{hs} = C_h^{\infty} / C_s^{\infty} \qquad (8)$$

Η σωστή έκφραση των παραπάνω σταθερών κατανομής θα έπρεπε να περιλαμβάνει ενεργότητες, αλλά οι συγκεντρώσεις είναι μια καλή προσέγγιση θεωρώντας τις προς ανάλυση ουσίες σε επίπεδα ιχνοποσοτήτων στο δείγμα και θεωρώντας καθαρή μήτρα.

Από τις προηγούμενες σχέσεις (5)-(8) προκύπτει η πιο κάτω εξίσωση:

$$n = \frac{K_{ch} \cdot K_{hs} \cdot V_c \cdot V_s \cdot V_0}{K_{ch} \cdot K_{hs} \cdot V_c + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (9)$$

Αν θεωρήσουμε την επίδραση της υγρασίας στον υπερκείμενο χώρο της αέριας φάσης μηδαμινή, τότε ισχύει $K_{cs} = K_{ch} \cdot K_{hs}$ (10) (όπου K_{cs} : σταθερά κατανομής επικάλυψη ίνας/ μήτρα δείγματος) και η προηγούμενη εξίσωση μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$n = \frac{K_{cs} \cdot V_c \cdot V_s \cdot V_0}{K_{cs} \cdot V_c + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (11)$$

Η πιο πάνω εξίσωση (11) δηλώνει, όπως ήταν αναμενόμενο από τις συνθήκες ισορροπίας, ότι η ποσότητα των στοιχείων που εκχυλύονται είναι ανεξάρτητη από την θέση της ίνας στο σύστημα. Η ίνα μπορεί να τοποθετηθεί στον υπερκείμενο χώρο ή απευθείας στο δείγμα όσο ο όγκος της επικάλυψης της ίνας, ο υπερκείμενος χώρος, και το δείγμα είναι σταθερά. Οι όροι του παρανομαστή της εξίσωσης (11) παριστάνουν την χωρητικότητα καθεμιάς από τις τρεις φάσεις: επικάλυψη της ίνας ($K_{cs}V_c$), της υπερκείμενης αέριας φάσης του δείγματος ($K_{hs}V_h$) και της μήτρας του δείγματος (V_s). Αν θεωρήσουμε ότι το δοχείο είναι πλήρως γεμάτο με το δείγμα (δεν υπάρχει υπερκείμενος χώρος) ($K_{hs} \cdot V_h$ = 0) τότε προκύπτει:

$$n = \frac{K_{cs} \cdot V_c \cdot V_s \cdot V_0}{K_{cs} \cdot V_c + V_s} \quad (12)$$

Η εξίσωση (12) περιγράφει τη μάζα που προσροφήθηκε από το πολυμερικό υλικό επικάλυψης αφού είχε επέλθει ισορροπία στο σύστημα συστατικών στη μήτρα. Επιπλέον, η εξίσωση αυτή μπορεί να μετατραπεί για τον υπολογισμό της ύπαρξης και άλλων συστατικών στη μήτρα λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο κάθε μιας φάσης χωριστά καθώς επίσης και τις κατάλληλες σταθερές κατανομής. Η εκχύλιση μπορεί να διακοπεί και να γίνει ανάλυση των ουσιών πριν απο την ισορροπία. Όμως για να έχουμε επαναλήψιμα αποτελέσματα, είναι απαραίτητη η σταθερή θερμοκρασία και ο ακριβής χρόνος εκχύλισης.

Η εξίσωση (12) δείχνει ότι υπάρχει απευθείας ανάλογη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του δείγματος και του ποσού που εκχυλίζεται. Επιπλέον όταν ο όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγάλος ($K_{cs}V_c << V_s$) τότε η εξίσωση (12) απλοποιείται σε:

$$n = K_{cs} \cdot V_c \cdot V_0 \quad (13)$$

Σε αυτή την εξίσωση η ποσότητα των στοιχείων που εκχυλίζονται από την επικαλυμμένη ίνα είναι ανεξάρτητη του όγκου του δείγματος (V_s) που παρέχεται προς εκχύλιση. Έτσι υποδηλώνεται ότι ο λόγος της συγκέντρωσης των αναλυόμενων

στοιχείων μεταξύ του δείγματος και της επικάλυψης της ίνας σε κατάσταση ισορροπίας πρέπει να είναι ο ίδιος για αρκετές τάξεις μεγέθους διαφοράς όγκου μεταξύ των δύο φάσεων. Για τον λόγο αυτό, η μέθοδος SPME μπορεί εύκολα να προσαρμοστεί σε εφαρμογές πεδίου και να χρησιμοποιηθεί απευθείας για μετρήσεις σε άγνωστους όγκους δείγματος. Στην πράξη δεν υπάρχει ανάγκη συλλογής ενός συγκεκριμένου όγκου δείγματος πριν την ανάλυση, καθώς η ίνα μπορεί να εκτεθεί απευθείας σε αέρα περιβάλλοντος, νερό, γραμμή παραγωγής, κ.λ.π. Η ποσότητα των στοιχείων που θα εκχυλιθούν ανταποκρίνεται στη συγκέντρωση αυτών στο περιβάλλον του δείγματος, χωρίς να εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος [10].

Όλες οι παραπάνω εξισώσεις περιορίζονται σε υγρού τύπου πολυμερικές επικαλύψεις, όπου η εκχύλιση βασίζεται σε φαινόμενα απορρόφησης και εξαρτάται ισχυρά από τη φάση του όγκου εκχύλισης. Παρόλα αυτά, η θεώρηση για στερεά απορροφητικά υλικά επικάλυψης (με βάση την απορρόφηση) είναι με μερικούς περιορισμούς ανάλογη για χαμηλές συγκεντρώσεις των αναλυτών [10].

4.4.2 ΚΙΝΗΤΙΚΗ

Η ταχύτητα της εκχύλισης καθορίζεται από την κινητική της διαδικασίας εκχύλισης. Η τεχνική SPME είναι μια μέθοδος εκχύλισης που βασίζεται στην αποκατάσταση της ισορροπίας. Ο χρόνος που απαιτείται για να αποκατασταθεί η ισορροπία του αναλύτη μεταξύ του πολυμερικού υλικού της φάσης εκχύλισης και της μήτρας του δείγματος εξαρτάται μόνο από το πάχος της επικάλυψης και τον συντελεστή διάχυσης των αναλυόμενων στοιχείων στην επικάλυψη. Δηλαδή:

$$t_c = \frac{a^2}{2 \cdot D} \quad (14)$$

Όπου,
t_c : χρόνος αποκατάστασης ισορροπίας
α : πάχος πολυμερούς υλικού της φάσης εκχύλισης
D : συντελεστής διάχυσης των αναλυόμενων συστατικών στην εκχυλυόμενη φάση [10]

Το δείγμα είναι πάντα στάσιμο σε μια πολύ μικρή περιοχή γύρω από την ίνα και μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα οριακό στρώμα γύρω από αυτή, όπου τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας που οφείλονται σε εξωτερική ανάδευση του δείγματος δεν είναι αποτελεσματικά. Καθώς η διάχυση είναι η κύρια διαδικασία που ευθύνεται για την μεταφορά μάζας σε αυτή την ζώνη, ο χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας των αναλυτών στη φάση εκχύλισης μπορεί να υπολογιστεί με την χρήση της ακόλουθης εξίσωσης:

$$t_c = 3\frac{K_{cs} a^2}{D} \quad (15)$$

Όπου,

K_{cs}: συντελεστής κατανομής μεταξύ της επικάλυψης της ίνας και της μήτρας του δείγματος
α : πάχος πολυμερούς υλικού επικάλυψης της ίνας
D: συντελεστής διάχυσης των αναλυόμενων στοιχείων στη μήτρα του δείγματος [10]

Το πάχος του οριακού στρώματος γύρω από την ίνα είναι ισχυρά εξαρτώμενο από την παρουσία μεταφοράς μάζας με συναγωγή (που είναι το αποτέλεσμα της ανάδευσης του δείγματος), ο ακριβής έλεγχος αυτού του παράγοντα είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Η θεωρία της μεταφοράς μάζας βασίζεται στον δεύτερο νόμο της διάχυσης του Fick περιγράφοντας το ισοζύγιο μάζας σε ένα δυναμικό σύστημα ως εξής:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (16)$$

Όπου,
C: Συγκέντρωση
D: Συντελεστής διάχυσης της προς ανάλυση ουσίας

Θεωρώντας την ίνα κυλινδρική και το σύστημα δειγματοληψίας σε τρεις διαστάσεις, η προηγούμενη εξίσωση μετατρέπεται σε:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\frac{1}{r}\left[\frac{\partial}{\partial r}\left(r\frac{\partial C}{\partial r}\right)\right] \quad (17)$$

Η θεωρία υποθέτει ότι υπάρχουν μηδενικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προς ανάλυση ουσιών και της επιφάνειας του δοχείου ή το εσωτερικό τμήμα της ίνας. Επίσης, παράγοντες όπως θερμική διαστολή, διόγκωση και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προς ανάλυση ουσιών θεωρούνται αμελητέες.

4.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ SPME

Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την αποδοτικότητα της μεθόδου SPME και θα πρέπει να εξετάζονται κατά την ανάπτυξή της. Οι σημαντικότεροι εξ αυτών είναι η κατάλληλη επιλογή του τρόπου εκχύλισης, του υλικού επικάλυψης της ίνας, της θερμοκρασίας εκχύλισης, του χρόνου εκχύλισης, του όγκου της οργανικής φάσης και της ανάδευσης του δείγματος:

4.5.1 ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

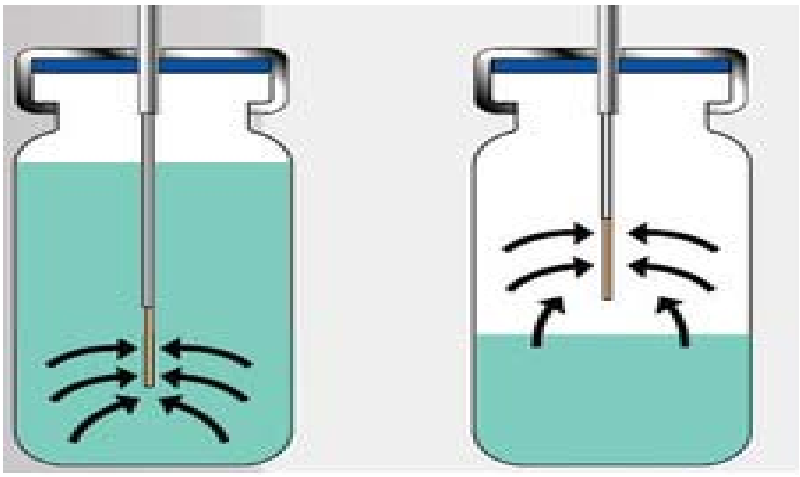
Ανάλογα με τη φύση του δείγματος, την πτητικότητα των ουσιών και τη συγγένειά τους με τη μήτρα διακρίνονται δύο τεχνικές δειγματοληψίας με χρήση της μεθόδου SPME [15]:

A) Απευθείας εκχύλιση (Direct SPME):

Στην περίπτωση της απευθείας εκχύλισης, η ίνα εισάγεται απευθείας στο δείγμα και οι ουσίες μεταφέρονται από τη μήτρα του δείγματος στην ίνα και εκχυλίζονται. Για ταχύτερη εκχύλιση, απαιτείται κάποιο επίπεδο ανάδευσης, ώστε να ενταθεί η μεταφορά των αναλυτών από το διάλυμα προς την περιοχή γύρω από την ίνα, όπου λαμβάνουν χώρα φαινόμενα απορρόφησης και προσρόφησης πάνω σε αυτή. Στα υδάτινα διαλύματα, απαιτούνται τεχνικές ανάδευσης ισχυρότερες από ότι στα αέρια διαλύματα, στα οποία η φυσική μεταφορά και διάχυση στο μέσο είναι αρκετή για να επιτευχθεί γρήγορη ισορροπία. Τέτοιου είδους τεχνικές ανάδευσης είναι η δόνηση της ίνας, η χρήση υπερήχων, η μηχανική ανάδευση, η γρήγορη κίνηση της φιάλης που περιέχει το δείγμα και τέλος, η γρήγορη ροή του δείγματος. *Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως για μη πτητικές ενώσεις και για αέρια και υγρά δείγματα (συνήθως απλά).*

B) Στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος SPME (Headspace SPME):

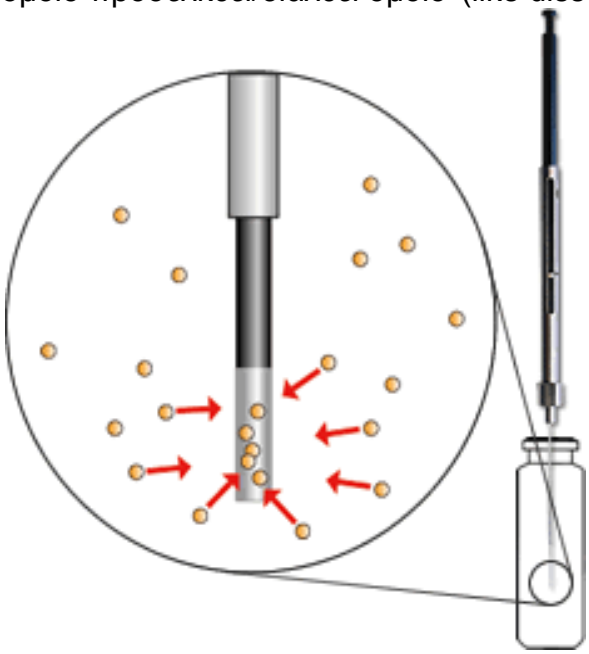
Με αυτόν τον τρόπο η ίνα εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Οι ουσίες μεταφέρονται πρώτα στον υπερκείμενο χώρο και στη συνέχεια από τον αέρα στην ίνα. Έτσι, επιτυγχάνεται αρχικά η προστασία της ίνας από βλάβες που μπορεί να προκαλέσουν σε αυτή στοιχεία υψηλού μοριακού βάρους και άλλα μη πτητικά υποπαράγωγα που βρίσκονται στο υγρό περιβάλλον του δείγματος. Επιπλέον, η εκχύλιση αυτού του είδους επιτρέπει τη μετατροπή διαφόρων συνθηκών του περιβάλλοντος, όπως το pH, χωρίς την καταστροφή της ίνας. Οι ποσότητες ως προς ανάλυση που εκχυλίζονται στην ίνα από το ίδιο φιαλίδιο δείγματος μέχρι την ισορροπία, τόσο με χρήση της απευθείας εκχύλισης, όσο και με χρήση της εκχύλισης στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος, είναι ακριβώς οι ίδιες. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η συγκέντρωση των συστατικών σε κατάσταση ισορροπίας είναι ανεξάρτητη από τη θέση της ίνας στο σύστημα δείγματος και χώρου πάνω από αυτό. Αν η παραπάνω συνθήκη δεν ικανοποιείται, σημαντική διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ των δύο μορφών εκχύλισης παρατηρείται μόνο στην περίπτωση πολύ πτητικών στοιχείων. *Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως για πτητικές και ημι-πτητικές ουσίες καθώς επίσης για υγρά (συμπεριλαμβανομένων πολύπλοκων υποστρωμάτων) και στερεά δείγματα.*



Σχήμα 6: Τρόποι εκχύλισης της μεθόδου [43]:
(a) Απευθείας εκχύλιση (Direct SPME)
(b) Στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος (HS-SPME)

4.5.2 ΥΛΙΚΟ ΕΠΙΚΑΛΥΨΗΣ ΤΗΣ ΙΝΑΣ

Οι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την κατάλληλη επιλογή του υλικού επικάλυψης της ίνας σε κάθε επιμέρους πείραμα είναι το μοριακό βάρος, το μέγεθος, η χημική φύση, το σημείο βρασμού και η τάση ατμών των προς ανάλυση ουσιών, η πολικότητα και οι χαρακτηριστικές ομάδες της ίνας και των αναλυόμενων ουσιών και τέλος, ο τύπος του ανιχνευτή. Οι παράγοντες που μόλις αναφέρθηκαν εκφράζουν τις ιδιότητες της επικάλυψης της ίνας και τις αιτίες της εκλεκτικότητάς της προς τα αναλυόμενα στοιχεία σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά του περιβάλλοντος του δείγματος. Κάθε υλικό επικάλυψης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Σε γενικές γραμμές, για την επιλογή του καταλληλότερου κάθε φορά τύπου ίνας, χρησιμοποιείται ο απλός κανόνας ‘‘όμοιο προσελκύει/διαλύει όμοιο’’(like dissolves like) [10] (Σχήμα 7).



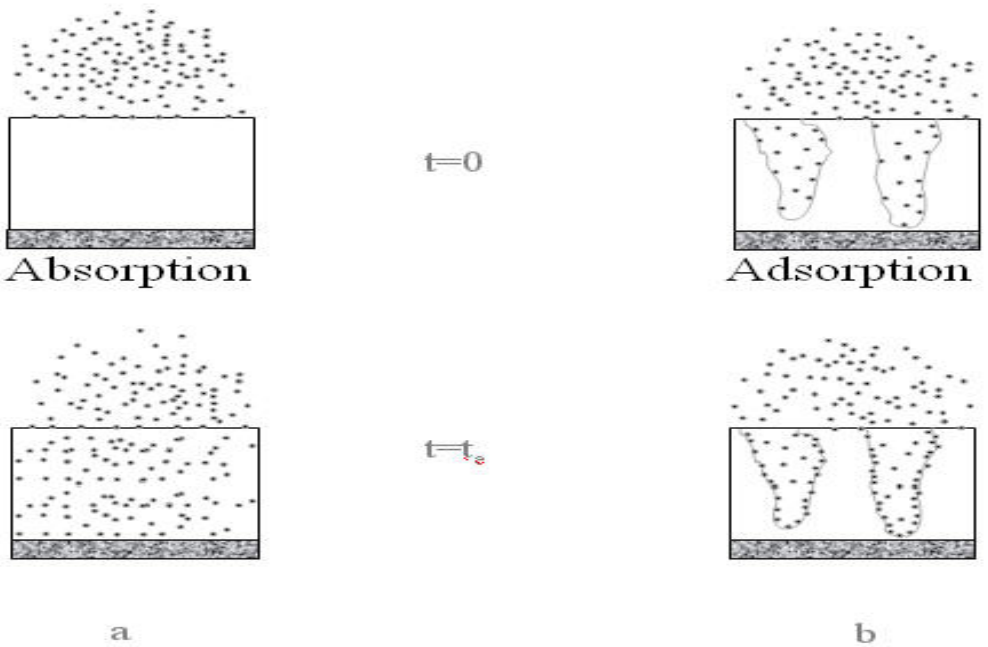
Σχήμα 7: Κίνηση αναλυόμενων στοιχείων προς το υλικό επικάλυψη της ίνας [xvii]

Το πάχος της επικάλυψης της ίνας και ο συντελεστής κατανομής καθορίζουν τον χρόνο εκχύλισης. Ο χρόνος εκχύλισης είναι μικρότερος σε πιο λεπτά στρώματα και παρατηρούνται μικρότεροι συντελεστές κατανομής στα συστατικά που θέλουμε να αναλύσουμε. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται η λεπτότερη επικάλυψη η οποία δίνει αποδεκτή ευαισθησία, σε αντίθεση με τις παχιές επικαλύψεις οι οποίες προσφέρουν αυξημένη ευαισθησία, απαιτούν όμως μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης. Η επιλογή της επικάλυψης της ίνας και ο σχεδιασμός αυτής μπορεί να βασιστεί σε εμπειρία χρήσης χρωματογραφικών διατάξεων [10].

Στις μέρες μας, υπάρχει διαθέσιμο στο εμπόριο πλήθος ινών επικάλυψεις με διαφορετικές ιδιότητες και εκλεκτικότητες. Οι ίνες αυτές ανάλογα με το είδος των ουσιών που εκχυλίουν διακρίνονται σε τρεις βασικές κατηγορίες: τις πολικές, τις μη-πολικές και της μεικτής φάσης ίνες. Παράλληλα, ανάλογα με τον τρόπο εκχύλισης οι ίνες χωρίζονται σε απορροφητικές και προσροφητικές. Στην απορρόφηση οι προς ανάλυση ουσίες

διαλύονται στην επικάλυψη και διαχέονται στο bulk της επικάλυψης, ενώ στην προσρόφηση μένουν στην επιφάνεια του στερεού [16].

Ανεξάρτητα από τη φύση του υλικού επικάλυψης, τα μόρια των αναλυόμενων στοιχείων έρχονται αρχικά σε επαφή με την επιφάνεια. Στην συνέχεια, είτε μεταναστεύουν στο σώμα του υλικού επικάλυψης(απορρόφηση), είτε παραμένουν στην επιφάνειά του(προσρόφηση) και αυτό εξαρτάται από το μέγεθος του συντελεστή διάχυσης του συστατικού στο υλικό επικάλυψης της ίνας. Σύμφωνα με τον Pawliszyn, η εκχύλιση των ενώσεων με SPME βασίζεται περισσότερο στην προσρόφηση παρά στην απορρόφηση.



Σχήμα 8: Εκχύλιση των αναλυόμενων στοιχείων στο υλικό επικάλυψης της ίνας με το φαινόμενο της [45]: a) απορρόφησης (absorption) b)προσρόφησης (adsorption)

Τα υλικά επικάλυψης που διατίθενται στο εμπόριο από τη Supelco και τα οποία χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία είναι τα εξής:

- *Polydimethylsiloxane (PDMS)*

Είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη επικάλυψη, η οποία αποτελείται από ένα υψηλού ιξώδους μη νευτωνικό υγρό, το οποίο μοιάζει με στερεό και το οποίο απορροφά τις ουσίες στην επιφάνειά του. Είναι μια μη πολική φάση και εκχυλίζει ιδιαίτερα καλά μη πολικές ουσίες. Παρόλα αυτά εάν έχουν βελτιστοποιηθεί οι συνθήκες εκχύλισης μιας εφαρμογής μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία και για πιο πολικές ουσίες.

- *Polyacrylate (PA)*

Η ίνα αυτή είναι ένα στερεό κρυσταλλικό υλικό επικάλυψης που μεταμορφώνεται σε υγρό σε θερμοκρασίες εκρόφησης και το οποίο είναι κατάλληλο για πολικές ουσίες όπως οι φαινόλες και τα πολικά μικροβιοκτόνα. Δεσμεύει τους αναλύτες απορροφώντας τους στην επιφάνειά της με βαθμό απορρόφησης μεγαλύτερο σε σύγκριση με αυτό του PDMS. Οι συντελεστές διάχυσης είναι μικρότεροι σε σχέση με αυτούς του PDMS, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεγαλύτεροι χρόνοι ισορροπίας για τις πτητικές ουσίες στην υπερκείμενη φάση με τη χρήση αυτή της ίνας [xvi].

Τα παρακάτω υλικά επικάλυψης είναι μείγματα υλικών (μεικτή φάση), στα οποία η κύρια φάση εκχύλισης είναι ένα στερεό πορώδες υλικό, το οποίο εκχυλίει τα αναλυόμενα στοιχεία με το μηχανισμό της προσρόφησης. Η ομοιότητα των ονομασιών είναι παραπλανητική, αφού οι βασικές αρχές της απορρόφησης και της προσρόφησης είναι διαφορετικές. Αυτές οι μεικτής φάσης επικαλύψεις έχουν συμπληρωματικές ιδιότητες σε σχέση με τις PDMS και PA. Είναι πιο κατάλληλες για πτητικές ουσίες καθώς η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων καθορίζεται από τη διαδικασία της προσρόφησης και έχουν ως αποτέλεσμα οι συντελεστές κατανομής να είναι πιο μεγάλοι σε σχέση με αυτούς του PDMS. Οι χρόνοι προσρόφησης είναι τυπικά πιο σύντομοι για τα αέρια δείγματα σε σύγκριση με τα 100μm PDMS, καθώς οι προς ανάλυση ουσίες δεν χρειάζεται να διαχυθούν διαμέσου της υγρής πολυμερικής φάσης.

- *Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB)*

Το DVB αναμιγνυόμενο με PDMS κρατάει τις μικρότερες προς ανάλυση ουσίες και επιτυγχάνει καλύτερη συγγένεια για τις πολικές ενώσεις από ό,τι εάν χρησιμοποιηθεί το PDMS μόνο του. Οι μέσοι-πόροι του DVB είναι κατάλληλοι για να δεσμεύουν τις προς ανάλυση ουσίες C_6-C_{15}. Σε αυτού του είδους την ίνα έχουν πραγματοποιηθεί πολλές βελτιώσεις προκειμένου να έχει καλή εκλεκτικότητα στην εκχύλιση των αμινών και των αλκοολών .

- *Carbowax® / Divinylbenzene (CW/DVB)*

Η ίνα Carbowax έχει χρησιμοποιηθεί στην αέρια χρωματογραφία ως μέτρια πολική φάση. Η ανάμιξη του DVB με Carbowax αυξάνει την πολικότητα της ίνας, σε σχέση με το PDMS/DVB. Το Carbowax τείνει να διογκώνεται και είναι διαλυτό στο νερό, αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της φάσης από την ίνα. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα και να επιτύχουμε υψηλή πολικότητα στο αναμιγνυόμενο πολυμερές, κατασκευάστηκε ένα ειδικό polyethyleneglycol πολυμερές. Αυτό το πολυμερές διογκώνεται σε μικρότερο ποσοστό στο νερό. Καθώς το Carbowax είναι ευαίσθητο στο οξυγόνο σε υψηλές θερμοκρασίες, αυτή η επικάλυψη θα οξειδωθεί παρουσία αέρα και οξυγόνου, η ίνα θα σκουρύνει και η επικάλυψη θα γίνει σκόνη. Οι συντελεστές διάχυσης των οργανικών μορίων στο σώμα του Divinylbenzene και του Carbonex είναι τόσο μικροί που μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα ανάλυσης με SPME σχεδόν όλα τα μόρια παραμένουν στην επιφάνεια του υλικού επικάλυψης. Αν τα οργανικά μόρια παραμείνουν εκεί για ένα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (μέρες ή εβδομάδες), υπάρχει και πάλι μικρή πιθανότητα να διαχυθούν στο εσωτερικό του υλικού επικάλυψης και πάλι σε πολύ μικρή απόσταση. Έτσι, η προσρόφηση θεωρείται ο μοναδικός μηχανισμός εκχύλισης για αυτά τα υλικά επικάλυψης [16].

- *Carboxen / Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS)*

Το πορώδες Carboxen αναμιγνύεται στο υγρό πολυμερές όμοια με το PDMS/DVB. Το Carboxen είναι μια σειρά από πορώδη υλικά συνθετικού άνθρακα που έχουν διακριτικό σχέδιο πόρων. Αποτελείται από μικρό, μέσο, και μάκρο πόρους και είναι ιδανικό για την εκχύλιση μικρών μορίων. Για το λόγο αυτό μια ίνα PDMS/Carboxen είναι ιδανική για την ανάλυση μορίων C_2-C_{12}. Μόρια μεγαλύτερα από C_{12} κρατούνται ισχυρά στην επιφάνεια των σωματιδίων και εκροφούνται δύσκολα. Επειδή το Carboxen παράγεται συνθετικά, ο όγκος των πόρων και το μέγεθος των σωματιδίων μπορούν να ελεγχθούν προσεκτικά. Το σχήμα των πόρων στον άνθρακα επηρεάζουν τον ρυθμό προσρόφησης και εκρόφησης των προς ανάλυση ουσιών. Τα σωματίδια του Carboxen έχουν ομοιόμορφους πόρους συγκρινόμενα με άλλους πόρους ανθράκων. Τα μόρια που παγιδεύονται στους μεσο-πόρους πρέπει να εκροφηθούν με αντιστροφή της κατεύθυνσης της κίνησης με τη βοήθεια υψηλής θερμοκρασίας [14]. Πειράματα με την ίνα αυτής της κατηγορίας, έδειξαν ότι δεν είναι κατάλληλη για την εκχύλιση των περισσότερων φθαλικών ενώσεων, ενώ είναι καλή για την εκχύλιση αέριων δειγμάτων καθώς και ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος (<5 ατόμων άνθρακα).

4.5.3 ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Ένας από τους πλέον σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου SPME, είναι το χρονικό διάστημα κατά το οποίο η ίνα και το αναλυόμενο δείγμα μπορούν να φτάσουν σε κατάσταση ισορροπίας. Ως χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας ορίζεται ο χρόνος μετά την πάροδο του οποίου η ποσότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών παραμένει σταθερή και ίση, στα όρια του πειραματικού σφάλματος, με την ποσότητα που θα εκχυλισθεί μετά από άπειρο χρόνο. Ο χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας επηρεάζεται από το πάχος της επικάλυψης της ίνας και από τη σταθερά κατανομής [10]. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται η λεπτότερη επικάλυψη η οποία δίνει τη μεγαλύτερη δυνατή ευαισθησία. Η ουσία που έχει τη μεγαλύτερη συγγένεια με την επικάλυψη της ίνας φτάνει σε ισορροπία σε μεγαλύτερους χρόνους. Αντιθέτως, ο χρόνος ισορροπίας δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του δείγματος. Δηλαδή, εάν το σύστημα παρουσιάζει γραμμική συμπεριφορά(οι σταθερές κατανομής των συστατικών του δείγματος δεν μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου), τότε στην περίπτωση που ο χρόνος ισορροπίας έχει βελτιστοποιηθεί για μια συγκεκριμένη συγκέντρωση θα είναι ίδιος και για άλλες συγκεντρώσεις.

Στην κατάσταση ισορροπίας, το σύστημα παραμένει σταθερό με αποτέλεσμα μικρές διακυμάνσεις στο χρόνο εκχύλισης και στη μεταφορά μάζας να μην επηρεάζουν τα τελικά αποτελέσματα. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στον προσδιορισμό του χρόνου αποκατάστασης της ισορροπίας καθώς μια σημαντική μείωση στην κλίση της εφαπτομένης της καμπύλης μπορεί λανθασμένα να θεωρηθεί σαν το σημείο αποκατάστασης της ισορροπίας. Όταν ο χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας μιας εφαρμογής είναι ιδιαίτερα μεγάλος τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερος χρόνος εκχύλισης. Στην περίπτωση αυτή, ο χρόνος εκχύλισης και η μεταφορά μάζας θα πρέπει να ελέγχονται αυστηρά για να εξασφαλίζεται μεγάλη ακρίβεια στη μέθοδο. Όταν η καμπύλη ισορροπίας αυξάνει απότομα, ο χρόνος είναι πολύ κρίσιμος παράγοντας για μικρούς χρόνους εκχύλισης.

4.5.4 ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Η θερμοκρασία εκχύλισης ως παράμετρος αποδοτικότητας της μεθόδου SPME είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επηρεάζει την ευαισθησία και την κινητική της εκχύλισης. Αύξηση στη θερμοκρασία εκχύλισης οδηγεί σε μικρότερο χρόνο εκχύλισης, καθώς αυξάνοντας τη θερμοκρασία αυξάνονται παράλληλα οι συντελεστές διαχυσης και επομένως ο ρυθμός εκχύλισης ενώ ταυτόχρονα μειώνονται οι σταθερές κατανομής. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται πιο έντονο κατά την εκχύλιση στον υπερκείμενο όγκο του δείγματος, καθώς αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των προς ανάλυση ουσιών στην υπερκείμενη φάση [17]. Σε γενικές γραμμές, στις διάφορες εφαρμογές θα πρέπει να χρησιμοποιήται η υψηλότερη δυνατή θερμοκρασία που δίνει ικανοποιητική ευαισθησία.

Υπάρχει πλήθος εργαστηριακών μετρητών θερμοκρασίας στο εμπόριο, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στις μεταβολές της θερμοκρασίας και απαντώνται σε πλήθος πειραματικών εφαρμογών SPME. Εκτός από αυτού του είδους τους μετρητές θερμοκρασίας, υπάρχει και μια εσωτερικά θερμαινόμενη ίνα συσκευής SPME, μη διαθέσιμη στο εμπόριο η οποία αποτρέπει την απώλεια ευαισθησίας. Η συσκευή αυτή λειτουργεί σαν δακτύλιος ψύξης που οδηγεί σε συνθήκες εξαντλητικής εκχύλισης [18].

4.5.5 ΟΓΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η επιλογή του όγκου του διαλύματος θα πρέπει να γίνεται με βάση τη σταθερά κατανομής K_{fs}. Όπως εκφράζεται στην εξίσωση $C_0 \cdot V_S = C_c^{\infty} \cdot V_c + C_h^{\infty} \cdot V_h + C_s^{\infty} \cdot V_s$ η ευαισθησία επηρεάζεται από τον όγκο του δείγματος εάν ο συντελεστής κατανομής των συστατικών που θέλουμε να αναλύσουμε, είναι πολύ μεγάλος. Για την αύξηση της ευαισθησίας της εκχύλισης στον υπερκείμενο όγκο του δείγματος θα πρέπει ο όγκος της αέριας φάσης να ελαχιστοποιείται. Στην εκχύλιση αυτού του είδους, οι αναλυόμενες ουσίες πηγαίνουν τόσο στην αέρια φάση όσο και στην επικάλυψη της ίνας, έχοντας ιδιαίτερη προτίμηση στην αέρια φάση [10]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου, όταν ο υπερκείμενος χώρος είναι μεγάλος καθώς οι πολύ πτητικές ουσίες προτιμούν να συσσωρρεύονται στην αέρια φάση και επομένως να μην ανιχνεύονται από την ίνα.

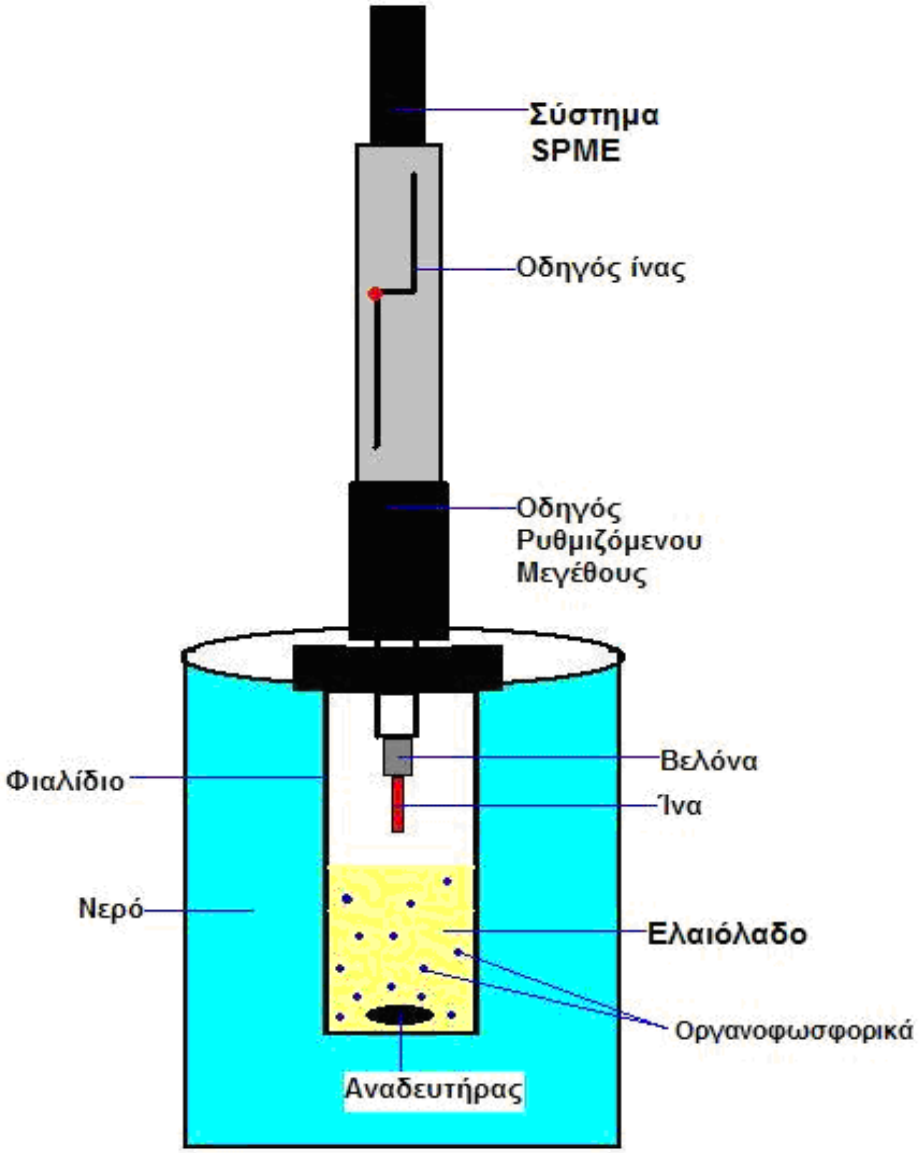
4.5.6 ΑΝΑΔΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Σε δείγματα που περιέχουν πτητικά συστατικά και η δειγματοληψία γίνεται με τη μέθοδο headspace SPME, ο χρόνος που χρειάζεται για να επέλθει ισορροπία είναι μικρός και επομένως η ανάδευση δεν είναι απαραίτητη. Η διαδικασία διάχυσης στον αέρα είναι πολύ γρήγορη σε σχέση με τη διάχυση στο υγρό και περιορίζεται μόνο από τη διάχυση στο στρώμα επικάλυψης της ίνας. Γενικά, στις περιπτώσεις που η υδατική και η αέρια φάση βρίσκονται σε ισορροπία πριν από την έναρξη της δειγματοληψίας, το μεγαλύτερο ποσοστό των ενώσεων βρίσκεται στον υπερκείμενο χώρο με αποτέλεσμα οι χρόνοι εκχύλισης να είναι μικροί ακόμα και όταν δεν χρησιμοποιείται η ανάδευση.

Όταν δεν ισχύουν οι παραπάνω προϋποθέσεις, απαιτείται η χρήση μιας διαδικασίας ανάδευσης. Η αποτελεσματικότητα της ανάδευσης καθορίζει το ρυθμό εκχύλισης και τον χρόνο που χρειάζεται για να επέλθει ισορροπία, καθώς με τη βοήθεια

της ανάδευσης διευκολύνεται η μεταφορά μάζας μεταξύ υδατικού δείγματος και ίνας. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ανάδευσης που χρησιμοποιούνται στην SPME, με τη μαγνητική ανάδευση να αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο.

Η μαγνητική ανάδευση είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος ανάδευσης, καθώς έχει χαμηλό κόστος με αποτέλεσμα να βρίσκεται στην πλειοψηφία των αναλυτικών εργαστηρίων και επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί με όλους τους τρόπους εκχύλισης της SPME (Σχήμα 9). Βέβαια, όπως όλες οι μέθοδοι έτσι και αυτή έχει τα αρνητικά της. Κατά τη διεξαγωγή ενός πειράματος με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, θα πρέπει να διασφαλίζεται ότι η ταχύτητα περιστροφής της ράβδου ανάδευσης είναι σταθερή και ότι η πλάκα είναι θερμικά απομονωμένη από το δοχείο που περιέχει το δείγμα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Σε αντίθετη περίπτωση, το αποτέλεσμα είναι φτωχή επαναληψιμότητα και μειωμένη ακρίβεια της μεθόδου.



Σχήμα 9: Εκχύλιση στον υπερκείμενο όγκο του δείγματος με ανάδευση

5. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC)

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στις μέρες μας, υπάρχουν πολλές χρωματογραφικές τεχνικές (Πίνακας 6) και 0

Πίνακας 6: Χρωματογραφικές Τεχνικές

1. Κλασσικές
Χρωματογραφία στήλης (Column Chromatography, CC)
Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC)
Χρωματογραφία σε χαρτί (Paper Chromatography, PC)
2. Ενόργανες
Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)
Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)

Η κατάταξη των χρωματογραφικών μεθόδων σε είδη γίνεται ανάλογα με:
1) Τη φύση της στατικής και της κινητής φάσης
   (στερεού-υγρού, υγρού-αερίου, υγρού-υγρού)
2) Τη μορφή της στατικής φάσης
   (στήλης, λεπτής στοιβάδας, χαρτιού)
3) Τη μέθοδο διαχωρισμού
   (προσρόφησης, κατανομής, κλπ)

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα (6), η χρωματογραφία αερίου (GC) αποτελεί μια κατηγορία χρωματογραφικών τεχνικών. Η αέρια χρωματογραφία είναι μια τεχνική που βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση του συνόλου σχεδόν των οργανικών ρύπων, πχ. φυτοφάρμακα, διαλύτες, πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, διοξίνες, τριαλομεθάνια και αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού ενός μίγματος ενώσεων (διαλυτές ουσίες) στα επιμέρους συστατικά του. Υπολογίζεται ότι 10-20% των γνωστών ενώσεων μπορεί να αναλυθεί από την αέρια χρωματογραφία. Για να είναι κατάλληλη για την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία, μια ένωση πρέπει να έχει την ικανοποιητική πτητικότητα και τη θερμική σταθερότητα [19].

Τη δεκαετία του ’40, έγινε για πρώτη φορά η πρόταση να χρησιμοποιηθεί ένα αέριο ως κινητή φάση. Από τότε, η χρωματογραφία αερίου έχει αναπτυχθεί γρήγορα, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του ’60 και η χρήσης της τεχνικής έχει εφαρμοστεί σχεδόν σε κάθε τομέα των αναλυτικών και βιοχημικών ερευνών. Στη δεκαετία του ’70, οι ηλεκτρονικοί ολοκληρωτές και τα βασισμένα σε υπολογιστή συστήματα επεξεργασίας δεδομένων έγιναν κοινά. Στην δεκαετία του ’80 βλέπουμε τους υπολογιστές να χρησιμοποιούνται για τον αυτόματο έλεγχο των περισσότερων παραμέτρων των οργάνων, όπως η θερμοκρασία στηλών, τα ποσοστά ροής, η πίεση του σημείου εισαγωγής και η έγχυση δειγμάτων.

Σήμερα η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται ως ουσιαστικό αναλυτικό εργαλείο για ένα ευρύ φάσμα των βιομηχανιών και των εφαρμογών συμπεριλαμβανομένης της έρευνας, του ποιοτικού ελέγχου, και της περιβαλλοντικής δοκιμής. Όλες οι μορφές χρωματογραφίας αερίου είναι αποδοτικότερες από πολλές απόψεις από την υγρή χρωματογραφία όπου ένα υγρό είναι η κινητή φάση, λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών γνωρισμάτων που παρέχονται από το χαμηλό ιξώδες και την υψηλή διάχυση των αερίων.

Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιήσει υγρή ή στερεή στατική φάση. Τα συστατικά (αναλυτές) διαχωρίζονται μέσω της διαφορετικής τους κατανομής μεταξύ των δύο φάσεων. Ο χρόνος παραμονής κάθε συστατικού εξαρτάται από την πτητικότητα του και από την ποσότητα αλληλεπίδρασης με την στατική φάση. Η πτητικότητα μπορεί να αυξηθεί και ο χρόνος παραμονής να μειωθεί με θέρμανση της στήλης από 50-300°C. Ο τελικός διαχωρισμός ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος επηρεάζεται από τη στατική φάση της στήλης, τη δομή της ένωσης, τη θερμοκρασία του φούρνου, καθώς επίσης μπορεί να επιδράσουν έμμεσα οι διαστάσεις της στήλης και το φέρον αέριο που τη διατρέχει. Ενδεχομένως το GC να φαίνεται σύνθετο και πολύπλοκο μηχάνημα, είναι παρόλα αυτά σχετικά απλό στη χρήση του δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα [19].

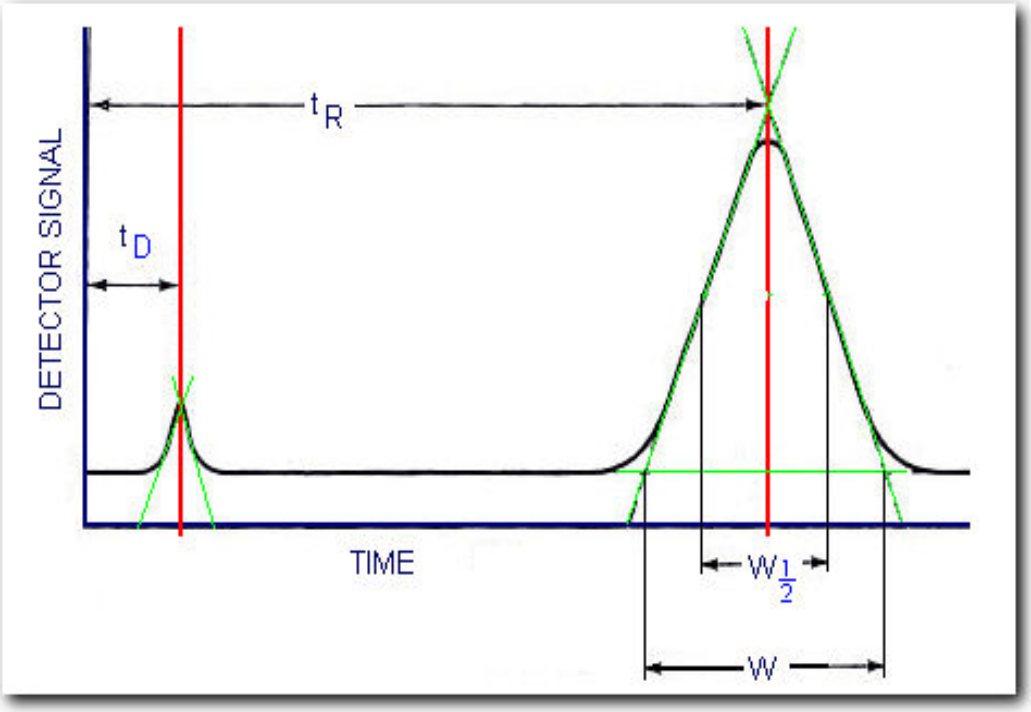
5.2 ΘΕΩΡΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών στις επιμέρους ενώσεις που αποτελούν το μίγμα. Ο διαχωρισμός αυτός επιτυγχάνεται με την κατανομή των συστατικών του μίγματος μεταξύ δύο φάσεων, μιας *κινητής* και μιας *στατικής που* πρακτικά δεν αναμιγνύονται.

$$K= C_s / C_m \quad (18)$$

Όπου,
K : Συντελεστής κατανομής
C_s : Συγκέντρωση της ουσίας στη στατική φάση
C_m : Συγκέντρωση της ουσίας στην κινητή φάση

Το προς διαχωρισμό μίγμα εισάγεται με τη βοήθεια μιας ρευστής (κινητή) φάσης σε μια προσροφητική (στατική) φάση με μεγάλη ειδική επιφάνεια, και τα συστατικά του διαπερνούν με διαφορετική ταχύτητα την προσροφητική φάση λόγω της διαφορετικής κατανομής τους μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Το σήμα καταγράφεται ως συνάρτηση του χρόνου από έναρξη της ροής του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη όπως φαίνεται στο σχήμα 10. Τα σήματα των συστατικών που ανιχνεύονται από τους ανιχνευτές απεικονίζονται στα χρωματογραφήματα με τη μορφή κορυφών έκλουσης (peaks) που μοιάζουν με καμπύλες Gauss. Οι ζώνες των συστατικών, που στην είσοδο της στήλης είναι οξείες, διευρύνονται καθώς διέρχονται μέσα από τη στήλη και κατά συνέπεια γειτονικές κορυφές έκλουσης δεν διαχωρίζονται τέλεια γιατί αλληλεπικαλύπτονται. Ο μηχανισμός της διεύρυνσης των κορυφών έκλουσης έχει μελετηθεί από τη θεωρία των πλακών και τη θεωρία της ταχύτητας [xx].



Σχήμα 10: Γενική μορφή χρωματογραφήματος με τις βασικές παραμέτρους [xx]

Όπου,

t_R : Ο χρόνος διατήρησης(retention time), είναι ο χρόνος μεταξύ της έγχυσης του δείγματος στη στήλη και της εμφάνισης της ουσίας(εμφάνιση του μεγίστου της κορυφής), υπό καθορισμένες συνθήκες. Κάθε ουσία ενός δείγματος έχει έναν διαφορετικό χρόνο διατήρησης.

t_D: Ο νεκρός χρόνος(dead time),είναι ο απαιτούμενος χρόνος για τη διέλευση του αδρανούς αερίου από τη στήλη, χωρίς να συγκρατείται από αυτή.

W : εύρος κορυφής έκλουσης, το οποίο μετριέται μεταξύ των τομών των εφαπτομένων με τη γραμμή βάσης

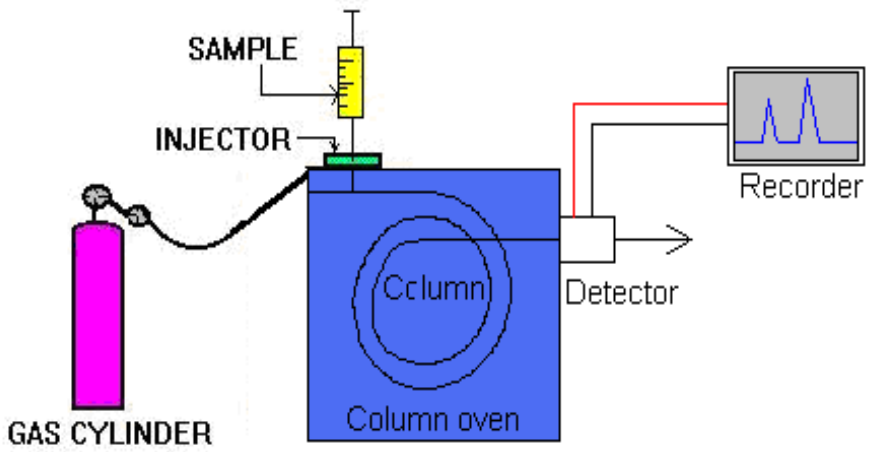
$W_{1/2}$:εύρος της κορυφής έκλουσης στο ήμισυ του ύψους της

Η ανάπτυξη και βελτίωση μιας χρωματογραφικής μεθόδου έχει τους ακόλουθους αντικειμενικούς σκοπούς.

- Μεγάλη διαχωριστική ικανότητα: για πολύπλοκα μείγματα.
- Μικρός χρόνος ανάλυσης: για κινητικές μελέτες ή διεργασίες ελέγχου.
- Μεγάλη ποσότητα δείγματος: για παρασκευαστική εργασία ή για τη συγκέντρωση συστατικών σε ίχνη.

5.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΣΥΣΚΕΥΗΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός συστήματος αέριας χρωματογραφίας φαίνονται στο σχήμα 13. Το φέρον αέριο περιέχεται σε χαλύβδινους κυλίνδρους με μεγάλη πίεση και παρέχεται στη συσκευή με έναν ή περισσότερους ρυθμιστές πίεσης, που ρυθμίζουν την ταχύτητα ροής. Το δείγμα εισάγεται σ'ένα θερμαινόμενο θάλαμο (εισαγωγέας) που βρίσκεται η αρχή της στήλης είτε με μια σύριγγα που τρυπάει ένα λεπτό ελαστικό δίσκο, είτε με μια ειδική βαλβίδα εισαγωγής. Το φέρον αέριο μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος μέσα στη στήλη όπου διαχωρίζονται και το ένα μετά το άλλο διέρχονται από τον ανιχνευτή, ο οποίος στέλνει ένα σήμα στον καταγραφέα για κάθε ένωση που ανιχνεύει. Η στήλη, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος και ο ανιχνευτής βρίσκονται μέσα σε ένα θερμοστατούμενο φούρνο, αν και τα δύο τελευταία μπορούν να θερμανθούν ξεχωριστά [19].



Σχήμα 11: Σχηματική περιγραφή της συσκευής GC

5.3.1 ΦΕΡΟΝ ΑΕΡΙΟ

Σε κανονικές πιέσεις και θερμοκρασίες, το φέρον αέριο πρέπει να είναι χημικά αδρανές. Τα πιο συνηθισμένα φέροντα αέρια είναι αυτά που παρουσιάζονται στον παακάτω πίνακα. Είναι αέρια φτηνά και ακίνδυνα εκτός από το υδρογόνο που είναι εύφλεκτο και απαιτεί ορισμένες προφυλάξεις, καθώς επίσης και καθαρά (καθαρότητα μεγαλύτερη από 99,99%). Επίσης, επειδή είναι αδρανή, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του δείγματος και των μορίων του φέροντος αερίου μπορούν να αγνοηθούν.

Πίνακας 7: Συνήθη αέρια που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία [xx]

Συνήθη αέρια που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία		
Αέριο	**Εφαρμογή**	**Παρατηρήσεις**
Ήλιο	Γενικά ως φέρον ή ως make up (βοηθητικό αέριο)	Ιδανικό αλλά ακριβό. Πρέπει να είναι μίγμα με άλλο αέριο για να χρησιμοποιηθεί ως make up σε ECD
Άζωτο	Γενικά ως make up ή ως φέρον σε γεμισμένες στήλες	Φθηνό. Όχι κατάλληλο ως φέρον σε τριχοειδείς στήλες
Υδρογόνο	Φέρον για τριχοειδείς στήλες. Αέριο καύσης για ανιχνευτές FID, NPD, FPD	Φθηνό. Εκρηκτικό, χρειάζεται καλός εξαερισμός. Κατάλληλο φέρον για τριχοειδείς στήλες.
Αέρας	Αέριο καύσης για FID, NPD, FPD	Φθηνό και άμεσα διαθέσιμο
Οξυγόνο	Αέριο καύσης σε ορισμένους FPD	
Αργό	Φέρον για TCD	
Μίγμα Αργού-μεθανίου	Make up και φέρον για γεμισμένες στήλες με ECD	Καλύτερη γραμμικότητα και εκλεκτικότητα από το άζωτο αλλά μικρότερα όρια ανίχνευσης
Μίγμα Ηλίου-υδρογόνου	Φέρον για TCD	

Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, οι ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας εργάζονται καλύτερα με υδρογόνο ή ήλιο. Στις περισσότερες περιπτώσεις σαν φέρον αέριο χρησιμοποιείται το ήλιο.

Εάν η ροή είναι αυξημένη, αυτό σημαινει ότι το ποσοστό εισαγωγής του δείγματος στη στήλη πραγματοποιείται με αργούς ρυθμούς, δηλαδή έχουμε μειωμένη απόδοση. Αντίθετα, αν η ροή είναι μικρή έχουμε γρήγορη μεταφορά του αντίστοιχου δείγματος στη στήλη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, αφενός να μην προλάβει να γίνει η εξάτμιση όλων των συστατικών του δείγματος σε ικανοποιητικό βαθμό, αφετέρου να έχουμε αύξηση της απόδοσης. Επομένως, η ρύθμιση της ροής του φέροντος αερίου είναι ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας.

5.3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ

Η χρωματογραφική στήλη είναι η καρδιά του οργάνου, και επομένως ειδική προσοχή πρέπει να ληφθεί στην επιλογή και την προετοιμασία της. Υπάρχουν δύο γενικόι τύποι στηλων, οι στήλες με πληρωτικό υλικό (packed) και οι τριχοειδείς(capillary) στήλες [19].

Οι στήλες με πληρωτικό υλικό είναι σωλήνες με εσωτερική διάμετρο 1,6 έως 6 mm και μηκος 1 εως 2 m,κατασκευασμένες από γυαλί, μεταλλο ή Teflon και γεμισμένες με πληρωτικό υλικό (ζεολιθο, αλουμινα, ενεργο ανθρακα). Μπορούν να υιοθετηθούν όταν ο όγκος εγχύσεων δειγμάτων είναι μεγάλος. Γενικά, οι πεπληρωμένες στήλες είναι δυσμενείς για την ανάλυση ιχνών λόγω των ασταθειών βασικών γραμμών με συνεπεία τις αλλαγές πίεσης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας χορήγησης της δόσης ως αποτέλεσμα της υπερβολικής διαρροής στηλών στις υψηλές ευαισθησίες.

Οι τριχοειδείς στήλες έχουν εσωτερική διάμετρο λίγων δεκάτων του μικρομέτρου και είναι πολύ ακριβές. Στις στήλες αυτές, η στάσιμη φάση είναι μια ομοιόμορφη ταινία υγρού που ντύνει το εσωτερικό μιας τριχοειδούς σωλήνωσης ομοιόμορφα. Ο χωρισμός των συστατικών εμφανίζεται από το χώρισμα μεταξύ της κινητής και της στάσιμης φάσης στη στήλη. Τα αέρια που χρησιμοποιούν την πρώτη κατηγορία στηλών ονομάζονται χρωματογράφοι αέριας–στερεής φάσης και αυτοί που χρησιμοποιούν το δεύτερο είδος στήλης, χρωματογράφοι αέριας–υγρής φάσης [19].

5.3.3 ΦΟΥΡΝΟΣ–ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

Η χρωματογραφική στήλη στεγάζεται στο φούρνο, ο οποίος είναι ένας κανονικά ελεγχόμενος καφετής φούρνος. Τα πρόσθετα επιθυμητά χαρακτηριστικά του φούρνου χρωματογράφων είναι πρώτον, γρήγορη απάντηση θερμοκρασίας για να ακολουθήσει το σχεδιάγραμμα προγράμματος θερμοκρασίας και δεύτερον, χαμηλή θερμική μάζα για γρήγορη ψύξη στο τέλος της ανάλυσης [19].

Η βέλτιστη θερμοκρασία της στήλης, εξαρτάται από το σημείο βρασμού του δείγματος. Σαν γενικός κανόνας ισχύει ότι μια θερμοκρασία λίγο μεγαλύτερη από το σημείο βρασμού δίνει χρόνο εξαγωγής από 2 έως 30 λεπτά. Οι μικρές θερμοκρασίες δίνουν καλή ανάλυση αλλά αυξάνουν τους χρόνους εξαγωγής. Ο χρόνος που χρειάζεται μια ουσία να διατρέξει τη στήλη, ελαττώνεται καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται. Για αυτό το λόγο συνήθως χρησιμοποιούμε ανεβασμένες θερμοκρασίες που εξασφαλίζουν εξάτμιση ευρύτερου φάσματος ουσιών και μειώνουν το χρόνο της ανάλυσης [xxi].

Για δείγματα με σημεία βρασμού περιορισμένου εύρους, η θερμοκρασία του φούρνου διατηρείται σταθερή(ισόθερμη ανάλυση). Αντιθέτως, εάν ένα δείγμα έχει ευρεία περιοχή βρασμού, τότε είναι χρήσιμο ένα θερμοκρασιακό πρόγραμμα (προγραμματισμένη ανάλυση), στο οποίο η θερμοκρασία ξεκινά από μια χαμηλή τιμή και σταδιακά αυξάνεται. Ο ρυθμός αύξησης και η χρονική στιγμή στην οποία γίνεται, επιλέγονται κάθε φορά κατάλληλα από το πρόγραμμα φούρνου και ορίζεται πριν την έναρξη των αναλύσεων. Η επιλογή του προγράμματος θερμοκρασίας λειτουργίας της στήλης είναι πολύ σημαντική και επιλέγεται κατάλληλα κάθε φορά, ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός στο μικρότερο δυνατό χρόνο ανάλυσης. Το πρόγραμμα

αυτό επομένως, επιτρέπει το διαχωρισμό δειγμάτων που περιέχουν συστατικά με υψηλή και με χαμηλή πτητικότητα [xxi].

5.3.4 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Για την καλύτερη απόδοση της στήλης θα πρέπει η εισαγωγή του δείγματος να γίνεται σε πολύ μικρό χρόνο και στο μικρότερο δυνατό όγκο. Η αργή εισαγωγή μεγάλων δειγμάτων προκαλεί διεύρυνση των κορυφών και μειώνει την ποιότητα της ανάλυσης. Ο θάλαμος του δείγματος θα πρέπει να θερμαίνεται για τη γρήγορη εξαέρωση των υγρών δειγμάτων (θερμοκρασία συνήθως μεγαλύτερη από 50 ^{o}C πάνω από το σημείο βρασμού του λιγότερου πτητικού συστατικού του μείγματος) και να σχεδιάζεται έτσι ώστε το φέρον αέριο να μεταφέρει το δείγμα αμέσως στη στήλη. Αν δεν υπάρχουν οι παραπάνω προϋποθέσεις, το δείγμα θα απλώνεται προτού αρχίσει η διεργασία του διαχωρισμού [19].

Υπάρχουν τρία είδη συστημάτων εισαγωγής [19,xxi]:

1) <u>Εισαγωγέας με διαχωρισμό(Split Injection System):</u> Ο εισαγωγέας αυτού του τύπου ενδείκνυται για δείγματα με λίγα συστατικά. Η εξάτμιση του δείγματος δημιουργεί μια πίεση και αλλάζει το ιξώδες του μείγματος φέρον αέριο-δείγμα, με αποτέλεσμα να στέλνει μεγαλύτερη αναλογία των πολύ πτητικών συστατικών στη στήλη. Αυτό είναι και το κύριο πρόβλημα που προκαλεί ο διαχωρισμός αυτός. Επιπλέον, ακριβείς μετρήσεις των δειγμάτων αυτού του μεγέθους είναι αμφισβητήσιμες και πιθανόν τα μεγαλύτερα σφάλματα στην ποσοτική ανάλυση να οφείλονται σ' αυτό το λόγο. Για αυτό συνίσταται για ποιοτική ανάλυση και λιγότερο για ποσοτική.

2) <u>Εισαγωγέας χωρίς διαχωρισμό (Splitless Injection System):</u> Χρησιμοποιείται ο ίδιος θάλαμος εισαγωγής δείγματος και σε αυτόν το διαχωρισμό επιτρέποντας τη διέλευση μεγαλύτερου όγκου 0,5-5 μl. Το μεγαλύτερο μέρος του δείγματος που εξατμίζεται οδηγείται στη στήλη. Ο εισαγωγέας είναι κατάλληλος για ιχνοανάλυση στοιχείων και δεν ενδείκνυται για δείγματα υψηλών συγκεντρώσεων. Η τεχνική αυτή, χωρίς διαχωρισμό, είναι κατάλληλη για ιχνοαναλύσεις. Οι εισαγωγείς αυτής της κατηγορίας προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και αποδεκτή επαναληψημότητα. Παρόλα αυτά, η ακρίβεια των χρόνων έκλουσης είναι μικρότερη από ότι με διαχωρισμό και η βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων δύσκολη.

3) <u>Εισαγωγέας με/χωρίς διαχωρισμό (Split/Splitless Injection System)</u> : Είναι συνδυασμός των δύο προαναφερθέντων συστημάτων. Στο κάτω μέρος του εισαγωγέα υπάρχει κατάλληλη βαλβίδα, η οποία επιτρέπει την εκλεκτική διέλευση αερίου από την οδό διαχωρισμού (split). Στον τύπο αυτό έχουμε δύο καταστάσεις λειτουργίας, όπου η μία ακολουθεί την άλλη. Κατά την εισαγωγή του δείγματος και για ένα μικρό χρονικό διάστημα (60 sec περίπου) η βαλβίδα παραμένει κλειστή με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η διέλευση αερίου από την οδό διαχωρισμού, (purgeoff), ενώ η στήλη διατηρείται κατά 10-30 °C λιγότερο από το σημείο βρασμού του διαλύτη. Έτσι, όλη η ποσότητα του δείγματος που εισάγεται αυτό το χρονικό διάστημα, αναμειγνύεται με το φέρον αέριο και οδηγείται στη στήλη με πολύ μικρή ταχύτητα ροής, όση είναι και η ταχύτητα μέσα στη στήλη, περίπου 1-3 ml/min. Μετά την πάροδο κάποιου χρόνου που επιλέγεται κατάλληλα και καθορίζεται κυρίωςαπό την παρουσία πτητικών ενώσεων, η βαλβίδα ανοίγει (purge on) και μέρος του φέροντος αερίου χρησιμοποιείται για το

καθαρισμό του διαφράγματος. Από εκεί και πέρα ο εισαγωγέας συμπεριφέρεται σαν έναν εισαγωγέα διαχωρισμού (split). Επειδή στην αρχική κατάσταση η ροή αερίου είναι πολύ μικρή, υπάρχει ο κίνδυνος να χαθεί μέρος των πτητικών ενώσεων από την οδό καθαρισμού.

5.3.5 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ

Σκοπός ενός ανιχνευτή είναι να ελέγχει όλους τους διαχωρισμούς πού γίνονται μέσα στη στήλη. Οι ουσίες πού δίνουν οξείες κορυφές έκλουσης διέρχονται από τον ανιχνευτή σε χρόνο λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο, ενώ άλλες κορυφές έκλουσης εμφανίζονται μετά από ώρες και είναι τόσο μικρές, ώστε μόλις διακρίνονται επάνω από τη γραμμή βάσης [19]. Στην αέρια χρωματογραφία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι ανιχνευτών που επιλέγονται ανάλογα με την εκλεκτικότητά τους, καθένας από τους οποίους στηρίζεται σε διαφορετική αρχή λειτουργίας (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Τύποι ανιχνευτών αέριας χρωματογραφίας [46]

Τύποι ανιχνευτών αέριας χρωματογραφίας					
Ανιχνευτής	**Τύπος[α]**	**Βοηθητικά Αέρια**	**Εκλεκτικότητα**	**Ανιχνευσιμότητα[β]**	**Δυναμικό Εύρος[β]**
Ιονικής φλογός (FID)	MF	H_2 & Αέρας	Περισσότερες οργανικές ενώσεις	100 pg	10^7
Θερμικής Αγωγιμότητας (TCD)	C	Συμπληρωματικό Αναφοράς[γ]	Καθολικός	1 ng	10^7
Σύλληψης Ηλεκτρονίων (ECD)	C	Συμπληρωματικό Αναφοράς[δ]	Αλογονομένα, Αμινο-ενώσεις, Νιτρίλια, Υπεροξείδια, Ανυδρίτες, Όργανομεταλλικές ενώσεις	50 fg	10^5
Αζώτου-Φωσφόρου (NPD)	MF	H_2 & Αέρας + δυνατότητα O_2	Άζωτο – Φωσφόρος	10 pg	10^6
Φωτομετρικής φλογός (FPD)	MF	H_2 & Αέρας	Θείο, Φωσφόρος, Κασσίτερος, Βόριο, Αρσενικό, Γερμάνιο, Σελήνιο, Χρώμιο	100 pg	10^3
Φώτο-ιονισμού (PID)	C	Συμπληρωματικό Αναφοράς[γ]	Αλιφατικές-Αρωματικές ενώσεις, Κετόνες, Αλδεΰδες, Αμίνες, Ετεροκυκλικές ενώσεις, Οργανοθειικά	2 pg	10^7
Ηλεκτρολυτικής Αγωγιμότητας (HECD)	MF	H_2, O_2	Άζωτο, Θείο, Νιτροζαμίνες		

[α]Αποκρίνεται σε, ροή μάζας (MF), συγκέντρωση,(C), [β] Τυπικό όριο για ενώσεις με μεγάλη απόκριση, [γ] Σε τριχοειδής στήλες, [δ] Πρέπει να είναι άζωτο ή μεθάνιο (από 5 μέχρι 10%) σε αργό ή ήλιο.

Ωστόσο, όλοι οι παραπάνω ανιχνευτές έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά [19,xxi]:

Νεκρός όγκος:

Ο χώρος από την έξοδο της στήλης έως το σημείο όπου γίνεται ανίχνευση. Όσο περισσότερο χρόνο σπαταλούν τα συστατικά ενός δείγματος στον χώρο αυτό, τόσο περισσότερο αλλοιώνεται το τελικό χρωματογράφημα με εμφάνιση ουρών στις κορυφές (καθυστέρηση στο χρόνο έκλουσης), μείωση του μεγέθους και της διαπλάτυνση τους.

Θερμοκρασία:

Η θερμοκρασία του ανιχνευτή πρέπει να είναι αρκετά υψηλή έτσι ώστε να μην υπάρχει ο κίνδυνος συμπύκνωσης ουσιών στην επιφάνεια του που θα τον μολύνουν. Καλό είναι βέβαια να αποφεύγονται θερμοκρασίες υψηλότερες από αυτές του φούρνου γιατί μπορεί να κάνουν την στήλη πολύ ευαίσθητη και εύθραυστη.

Ελάχιστο όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection-LOD):

Το μικρότερο ποσό μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευτεί. Καθορίζεται από το λόγο Σήμα /Θόρυβο υποστρώματος, όπου ο παρανομαστής αντιστοιχεί σε ένα σταθερό σήμα που παίρνουμε καθ'όλη τη διάρκεια λειτουργίας του ανιχνευτή. Μια κορυφή που ανιχνεύεται στο χρωματογράφημα θεωρείται ότι πραγματικά αντιστοιχεί σε ουσία που διέρχεται από τη στήλη, εάν ο λόγος αυτός έχει τιμή μεγαλύτερη από 3-4.15.

Εκλεκτικότητα:

Κάποιοι ανιχνευτές φαίνονται να είναι πολύ εξειδικευμένοι σε ορισμένες ουσίες. Ειδικότερα, κάποιοι δίνουν για ορισμένες ουσίες ενός δείγματος μεγάλη απόκριση και για άλλες μικρή. Κάποιοι άλλοι δίνουν για ορισμένες ουσίες μεγάλη απόκριση και για άλλες καμία. Βέβαια οι ουσίες που δεν εμφανίζουν κανένα σήμα,εξακολουθούν να περνούν μέσα από την στήλη και τον ανιχνευτή επηρεάζοντας τοτελικό χρωματογράφημα, χωρίς αυτή η επίδραση να είναι ορατή.

Εύρος Γραμμικής Απόκρισης:

Είναι η περιοχή στην οποία ο ανιχνευτής συμπεριφέρεται γραμμικά, δηλαδή η συγκέντρωση μιας ουσίας είναι ανάλογη με το εμβαδόν της αντίστοιχης κορυφής που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Όσο μεγαλύτερο είναι το εύρος της περιοχής αυτής τόσο πιο υψηλές είναι οι συγκεντρώσεις των ουσιών που ανιχνεύονται. Οπωσδήποτε, ο ανιχνευτής πρέπει να αγνοεί το μεγάλο ποσόν του φέροντος αερίου και να ανιχνεύει και τα μικρότερα ίχνη κάθε συστατικού πού περιέχεται στο φέρον αέριο.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ–ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Τα αντιδραστήρια και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι τα ακόλουθα:

- Ethoprophos, diazinon, dichlofenthion, parathion methyl, fenitrothion, malathion, parathion, ethion, bromophos methyl (Fluka, Riedel de Haën, Seelze, Germany)
- Γυάλινα φιαλίδια των 7 ml (Supelco, Bellefonte, USA)
- Ακετόνη (Fluka, Riedel de Haën, Seelze, Germany)
- Εξάνιο (Fluka, Riedel de Haën, Seelze, Germany)
- Ίνες SPME (Supelco, Bellefonte, USA)
- Γυάλινα φιαλίδια των 7 ml (Supelco, Bellefonte, USA screw cap Vials with Black Viton® septa)
- Μαγνητικός πλαστικός αναδευτήρας
- Συσκευή ανάδευσης Heidolph MR3001K, 800W
- Σύριγγα 10 μl Hamilton Gastight (Hamilton Bonaduz, NEVADA), Model 170SNR με αμβλεία βελόνα
- Σύστημα GC-ECD: Shimadzu GC-17A (version 3)-ECD (version 2), με σύστημα εισαγωγής split/splitless
- He (>99.99% pure) ως φέρον αέριο στο GC πίεσης 96 kPa
- Λογισμικό συστηματος GC-ECD: Shimadzu Class-VP Chromatographic Data System (Version 4.3)
- Τριχοειδής στήλη HP5-MS, 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm
- Ελαστικό πώμα για το GC, Thermogreen LB-2 (Supelco)
- Απιονισμένο νερό, από το σύστημα EASYPURE RF της Barnstead/Thermolyne
- Ελαιόλαδο ΑΒΕΑ Κλασσικό(Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα και παρθένα ελαιόλαδα)(οξύτητα <1%)

6.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

6.2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΛΥΤΗ

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές μεταξύ λαδιού και διαφόρων διαλυτών με στόχο την εύρεση των διαλυτών εκείνων που είναι αναμίξιμοι με το λάδι, προκειμένου να γίνει η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9: Ουσίες διαλυτές στο λάδι

ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΛΑΔΙ
Μεθανόλη	ΟΧΙ
Εξάνιο	ΝΑΙ
Οκτανόλη	ΝΑΙ
Ακετονιτρίλιο	ΟΧΙ
Ακετόνη	ΝΑΙ
Αιθανόλη	ΟΧΙ
Τολουόλιο	ΝΑΙ
Κυκλοεξάνιο	ΝΑΙ
Προπανόλη	ΝΑΙ

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων επιλέχθηκαν από τον παραπάνω πίνακα η ακετόνη και το εξάνιο καθώς είναι ουσίες διαλύτες στο λάδι, χαμηλού κόστους και η χρήση τους είναι ευρέως διαδεδομένη σε όλα τα αναλυτικά εργαστήρια.

6.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΑΚΕΤΟΝΗ

Αρχικά, έγινε η παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων κάθε μιας από τις εξεταζόμενες ουσίες σε ακετόνη με τον εξής τρόπο: Σε μπουκαλάκι των 7 ml ζυγίζονται σε ζυγαριά ακριβείας και εισάγονται περίπου 10 mg της ουσίας. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 ml ακετόνης και το διάλυμα ξαναζυγίζεται. Η τελική τιμή που παίρνουμε είναι αυτή που θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα ακετόνης. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τις υπόλοιπες ουσίες. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής τα διαλύματα φυλάσσονται σε μικρότερα φιαλίδια και τοποθετούνται στην κατάψυξη καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Έπειτα, από τα παραπάνω πυκνά διαλύματα παρασκευάζεται μείγμα 200 mg/l σε 10 ml ακετόνης, προκειμένου το μείγμα να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για την επιμόλυνση των δειγμάτων ελαιολάδου και την εφαρμογή της μεθόδου SPME. Η παρασκευή του μείγματος ακολουθεί το νόμο της αραίωσης. Παρασκευάστηκε επομένως μείγμα συγκέντρωσης 200 ppm όλων των ουσιών εκτός από τις ουσίες diazinon και ethoprophos οι οποίες έχουν συγκέντρωση 400 mg/l. Οι δύο αυτές ουσίες είχαν πολύ χαμηλή απόκριση από το μηχάνημα με αποτέλεσμα το διπλασιασμό της συγκέντρωσής τους στο μειγμα προκειμένου οι καμπύλες τους να είναι πιο μεγάλες και ευδιάκριτες.

6.2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΞΑΝΙΟ

Από τα πυκνά ακετονικά διαλύματα κάθε μιας από τις οργανοφωσφορικές ουσίες, παρασκευάστηκαν διαλύματα σε εξάνιο συγκέντρωσης 1 mg/l. Η παρασκευή κάθε ενός από τα εννέα διαλύματα έγινε με το νόμο της αραίωσης. Έπειτα, με βάση τον ίδιο νόμο παρασκευάστηκε μείγμα συγκέντρωσης 500 ng/g σε εξάνιο. Κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της μεθόδου, γινόταν κάθε μέρα έγχυση 1 μl στο μηχάνημα GC-ECD από το μείγμα των ενώσεων σε εξάνιο. Με τον τρόπο αυτό γινόταν ο έλεγχος για τη σωστή ή μη λειτουργία του μηχανήματος.

6.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΟΥ SPME

Η διαδικασία της μικροεκχύλισης στερεής φάσης είχε ως εξής:

Σε φιαλίδιο όγκου 7 ml το οποίο έκλεινε με βιδωτό καπάκι ζυγιζόταν συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος ελαιολάδου. Από το διάλυμα του μείγματος των οργανοφωσφορικών ενώσεων στην ακετόνη συγκέντρωσης 200 mg/l λαμβανόταν με σύριγγα των 10 μl, συγκεκριμένος όγκος διαλύματος και εισαγόταν στο λάδι προκειμένου στο νέο διάλυμα το ποσοστό της ακετόνης να μην ξεπερνά το εύρος τιμών 0.5-1 %. Εισαγωγή διαλύτη με ποσοστό μεγαλύτερο από 1 % μπορεί να επιφέρει αλλαγή στη μήτρα του λαδιού και επομένως να επηρεάσει τα απότελέσματα της μεθόδου. Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετούνταν στη συσκευή ανάδευσης (vortex) για 1,0 min και με ταχύτητα 2000 rpm. Έπειτα, το φιαλίδιο καλυπτόταν με αλουμινόχαρτο και αφηνόταν σε ισορροπία για 10 min Μετά την ισορροπία, το δοχείο τοποθετούταν σε υδατόλουτρο για να διατηρείται η θερμοκρασία της εκχύλισης σταθερή σε όλη τη διάρκεια της εκχύλισης, σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και ταχύτητα ανάδευσης για άλλα 10 min. Ακολούθως, γινόταν η τοποθέτηση της ίνας σε καθορισμένη θέση πάνω από το φιαλίδιο, η οποία βρισκόταν εκτεθειμένη στον υπερκείμενο όγκο (HS-SPME), ενώ το δείγμα αναδευόταν με μαγνητική ράβδο ανάδευσης και για συγκεκριμένο χρόνο εκχύλισης. Στη συνέχεια, η ίνα επανατραβιόταν στη σύριγγα και η σύριγγα εισαγόταν στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου GC-ECD για 7 min, όπου γινόταν θερμική εκρόφηση των ουσιών και τέλος πραγματοποιούνταν η ανάλυσή τους.

Στην παρούσα εργασία, επιλέγεται η ίνα να βρίσκεται εκτεθειμένη στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος (HS-SPME) και να μην τοποθετείται απευθείας στο δείγμα (Direct SPME), γιατί το λάδι είναι αρκετά πολύπλοκη μήτρα, η οποία περιέχει υψηλού μοριακού βάρους στοιχεία, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν βλάβες στην ίνα.

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της SPME μελετήθηκαν οι παράμετροι της εκχύλισης όπως ο τύπος της ίνας, η μάζα του δείγματος, η προσθήκη ή μη άλλου διαλύτη, η θερμοκρασία εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης και τέλος η ταχύτητα ανάδευσης. Πιο συγκεκριμένα, οι παράμετροι της εκχύλισης που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 10: Παράμετροι εκχύλισης

Τύπος ίνας	100 μm PDMS, 65 μm PDMS/DVB, 85 μm PA, 75 μm CAR/PDMS, 65 μm CW/DVB
Μάζα δείγματος (g)	0,7-2,5
Προσθήκη διαλύτη	Νερο, εξανιο (Hx), ακετονη (Ac), ακετονιτριλιο (ACN), αιλυθοακετονη (EtAc), μεθανολη (MeOH)
Θερμοκρασία εκχύλισης (^oC)	25-100
Χρόνος εκχύλισης (min)	0-60
Ανάδευση (rpm)	0-1250

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ίνες, οι περισσότερες εκ των οποίων είτε χρησιμοποιούνταν για πρώτη φορά είτε είχαν πολύ καιρό να χρησιμοποιηθούν. Για το λόγο αυτό, προτού χρησιμοποιηθούν έγινε conditioning (σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Supelco)) για την ενεργοποίηση των πόρων των ινών. Στο conditioning η ίνα εκτίθεται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Οι συνθήκες conditioning, όπως επίσης και οι συνθήκες για τη σωστή χρήση των ινών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 11: Συνιστώμενες θερμοκρασίες για τη σωστή χρήση των ινών σύμφωνα με τις οδηγείες του κατασκευαστη (Supelco)

Είδος ίνας	**Πάχος ίνας (μm)**	**Προτεινόμενο εύρος θερμοκρασιών (^oC)**	**Θερμοκρασία Conditioning (^oC)**	**Χρόνος Conditioning (hr)**
PDMS	100	200-280	250	0,5
PDMS/DVB	65	200-270	250	0,5
PA	85	220-310	300	2
CAR/PDMS	75	250-310	300	1-2
CW/DVB	65	200-250	220	0,5

6.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ GC-ECD

Όλες οι αναλύσεις κατά τη διεξαγωγή της μεθόδου, έγιναν στο σύστημα Shimadzu GC-17A (version 3)-ECD (version 2), με σύστημα εισαγωγής split/splitless. Αυτό το όργανο είχε εξοπλιστεί με την τριχοειδή στήλη HP5-MS, 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm. Οι χρωματογραφικές συνθήκες που τελικά χρησιμοποιήθηκαν, είχαν προηγουμένως βελτιστοποιηθεί έτσι ώστε να επιτυγχάνεται τέλειος διαχωρισμός μεταξύ των ουσιών-στόχων. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 270°C και χρησιμοποιήθηκε στη μορφή χωρίς διαχωρισμό (splitless) με τον διαχωριστή κλειστό για 3 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ήταν 300°C. Σαν φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (αγνότητα >99,99 %) με σταθερή πίεση 96 kPa. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου ήταν το εξής:

Πίνακας 12: Πρόγραμμα θερμοκρασιών φούρνου

Βήμα	**Ρυθμός αύξησης (^{o}C / min)**	**Θερμοκρασία (^{o}C)**	**Χρόνος ισορροπίας (min)**
Αρχικά		70	2
1	25	200	10
2	2	220	2
3	25	280	3

Τέλος, ο αέριος χρωματογράφος ήταν συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είχε εγκατασταθεί κατάλληλο πρόγραμμα επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων και ολοκλήρωσης των χρωματογραφικών κορυφών (Shimadzu Class-VP Chromatographic Data System (Version 4.3)).

Αρχικά, πριν από την εφαρμογή της μεθόδου SPME, έγινε έκχυση 1 μl στο μηχάνημα για κάθε μια από τις εννέα ουσίες. Η ποσότητα αυτή λήφθηκε από τα ξεχωριστά διαλύματα των ουσιών-στόχων σε εξάνιο συγκέντρωσης 1 mg/l (που παρασκευαστήκαν όπως αναφέρθηκε προηγουμένως). Η διαδικασία αυτή έγινε με στόχο να υπολογιστεί ο χρόνος συγκράτησης (retention time) της κάθε ουσίας από το μηχάνημα (Πίνακας 13). Γνωρίζοντας το χρόνο συγκράτησης, έγινε εύκολα η αναγνώριση των ουσιών αυτών, γεγονός πολύ σημαντικό καθώς κατά την εφαρμογή της μεθόδου SPME χρησιμοποιήθηκε το μείγμα των ουσιών και όχι κάθε ουσία χωριστά.

Πίνακας 13: Χρόνοι συγκράτησης των αναλυόμενων ουσιών

Αναλυόμενη ουσία	**Χρόνος Συγκράτησης (min)**
Ethoprophos	8,46
Diazinon	11,39
Dichlofenthion	13,82
Parathion methyl	14,78
Fenitrothion	16,45
Malathion	16,81
Parathion	18,14
Bromophos methyl	19,33
Ethion	28,48

Στην αρχή κάθε ημέρας, η ίνα μαζί με το σύστημα συγκράτησής της (Holder) τοποθετούνταν στον εισαγωγέα για 7 λεπτά ενώ η ανάλυση συνεχιζόταν κανονικά έως ότου να ολοκληρωθεί το πρόγραμμα θερμοκρασιών του φούρνου. Αυτό γινόταν για τον πλήρη καθαρισμό της στήλης και της ίνας. Στη συνέχεια, γινόταν έγχυση 1 μl στο μηχάνημα GC-ECD από το μείγμα των ενώσεων σε εξάνιο. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιούνταν ο έλεγχος για τη σωστή λειτουργία ή μη του μηχανήματος.

Στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου τοποθετούνταν ένα ελαστικό πώμα Thermogreen LB-2 (Supelco), το οποίο αντικαθιστόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα. Επίσης, στο πώμα αυτό γινόταν μια τρύπα στο κέντρο πριν από τη χρήση του, προκειμένου να αποφευχθεί το πρόβλημα εισόδου μικρών κομματιών του πώματος στο φέρον αέριο με αποτέλεσμα την επιμόλυνση του δείγματος.

6.5 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια από τις πλέον επιθυμητές ιδιότητες ενός αναλυτικού οργάνου, είναι η ικανότητα διάκρισης της πραγματικής τιμής της ποσότητας μέσα από ανεπιθύμητα σήματα.

Σήμα (signal): είναι ο φορέας στον οποίο κωδικοποιείται η ζητούμενη πληροφορία κατά τη διαδικασία μιας μέτρησης.

Θόρυβος (noise): είναι το σύνολο των ανεπιθύμητων πληροφοριών, οι οποίες συνοδεύουν το σήμα και υποβαθμίζουν την ορθότητα και την ακρίβεια μιας μέτρησης.

Από τις δύο αυτές παραμέτρους (σήμα, θόρυβος) εξαρτώνται τα όρια ανίχνευσης (LOD, LOQ), τα όποια συμβάλλουν σημαντικά στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων της μεθόδου.

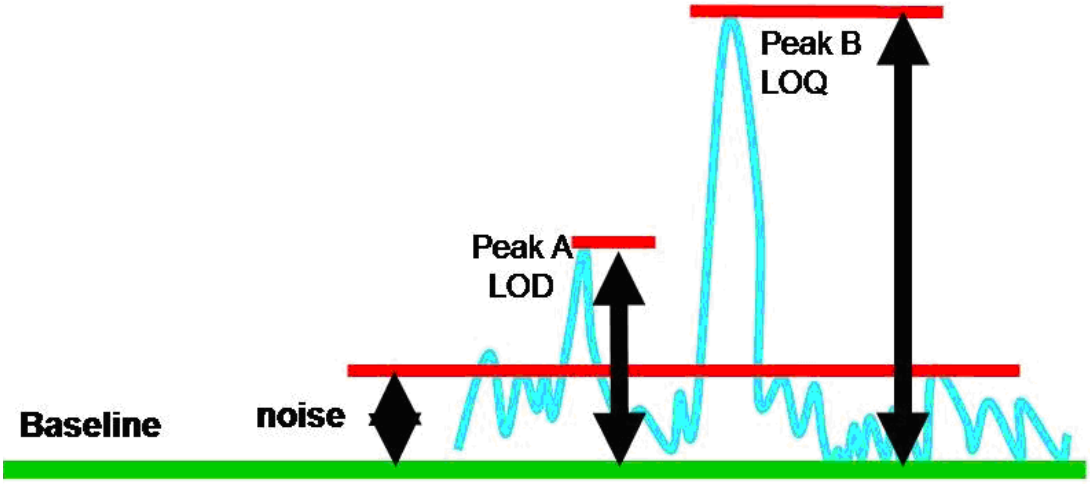
«LOD»: Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection), η μικρότερη μετρούμενη ποσότητα από την οποία μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα για την παρουσία του αναλύτη με

ικανοποιητική στατιστική βεβαιότητα, μέσα σε ένα δηλωμένο όριο εμπιστοσύνης (γενικά 1 %).Το όριο ανίχνευσης είναι αριθμητικώς ίσο με το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης (3σ).

«LOQ»: Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantitation), η κατώτατη περιεκτικότητα του αναλύτη που μπορεί να μετρηθεί με ικανοποιητική στατιστική βεβαιότητα. Αν τόσο η ορθότητα όσο και η πιστότητα είναι σταθερές σε μια περιοχή τιμών συγκεντρώσεων γύρω από το όριο ανίχνευσης, τότε το όριο του ποσοτικού προσδιορισμού είναι αριθμητικώς ίσο με το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης (10σ).

Όπου, σ είναι η τυπική απόκλιση από εφτά επαναλήψιμες μετρήσεις ενός πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης που αντιστοιχεί στο τελευταίο σημείο της καμπύλης αναφοράς.

Γενικά, κάθε προσπάθεια βελτίωσης μιας ενόργανης αναλυτικής τεχνικής δεν πρέπει να αποβλέπει στην απλή ενίσχυση του αναλυτικού σήματος, αλλά στην αύξηση του λόγου S/N. Αύξηση του λόγου S/N συνεπάγεται αντίστοιχη μείωση της τυπικής απόκλισης των μετρήσεων, επομένως η εφαρμοσιμότητα της τεχνικής επεκτείνεται και σε δείγματα με ακόμη χαμηλότερες συγκεντρώσεις των αναλυόμενων ουσιών.



Σχήμα 12: Σχηματική περιγραφή των ορίων ανίχνευσης LOD και LOQ.

Επαναληψιμότητα (repeatability): δηλώνει την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μιας σειράς πειραμάτων που διεξάγονται από τον ίδιο αναλυτή, στο ίδιο όργανο, με τα ίδια αντιδραστήρια και στη διάρκεια της ίδιας ημέρας (intra-day repeatability).

«RSD» : Σχετική τυπική απόκλιση, υπολογιζόμενη με βάση τα αποτελέσματα που ελήφθησαν υπό συνθήκες επαναληψιμότητας [(μέση τιμή (average) / τυπική απόκλιση (standard deviation)) × 100].

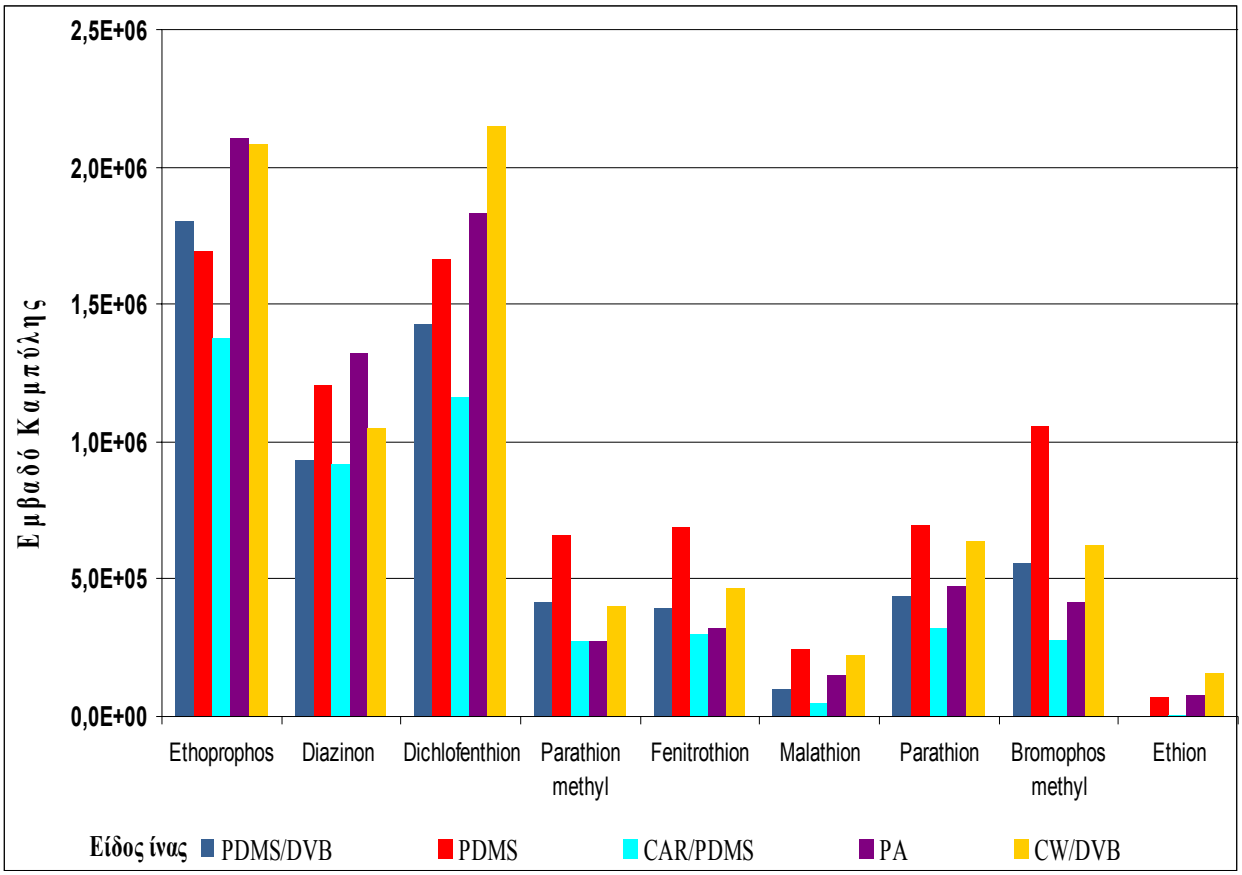
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ–ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

7.1 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HS-SPME

Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου SPME έγινε ο έλεγχος έξι παραμέτρων, με τη σειρά που παρατίθενται παρακάτω. Στις ακόλουθες γραφικές παραστάσεις, στον άξονα χ είναι τοποθετημένο το όνομα της κάθε εξεταζόμενης ουσίας, ενώ ο άξονας ψ δηλώνει την περιοχή της κάθε καμπύλης, δηλαδή το εμβαδό που βρίσκεται κάτω από τη χρωματογραφική καμπύλη που αντιπροσωπεύει την αναλυόμενη ουσία.

7.1.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΙΝΑΣ

Οι τύποι της ίνας που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου ήταν οι εξής: 100 μm PDMS, 65 μm PDMS/DVB, 85 μm PA, 75 μm CAR/PDMS και 65 μm CW/DVB.



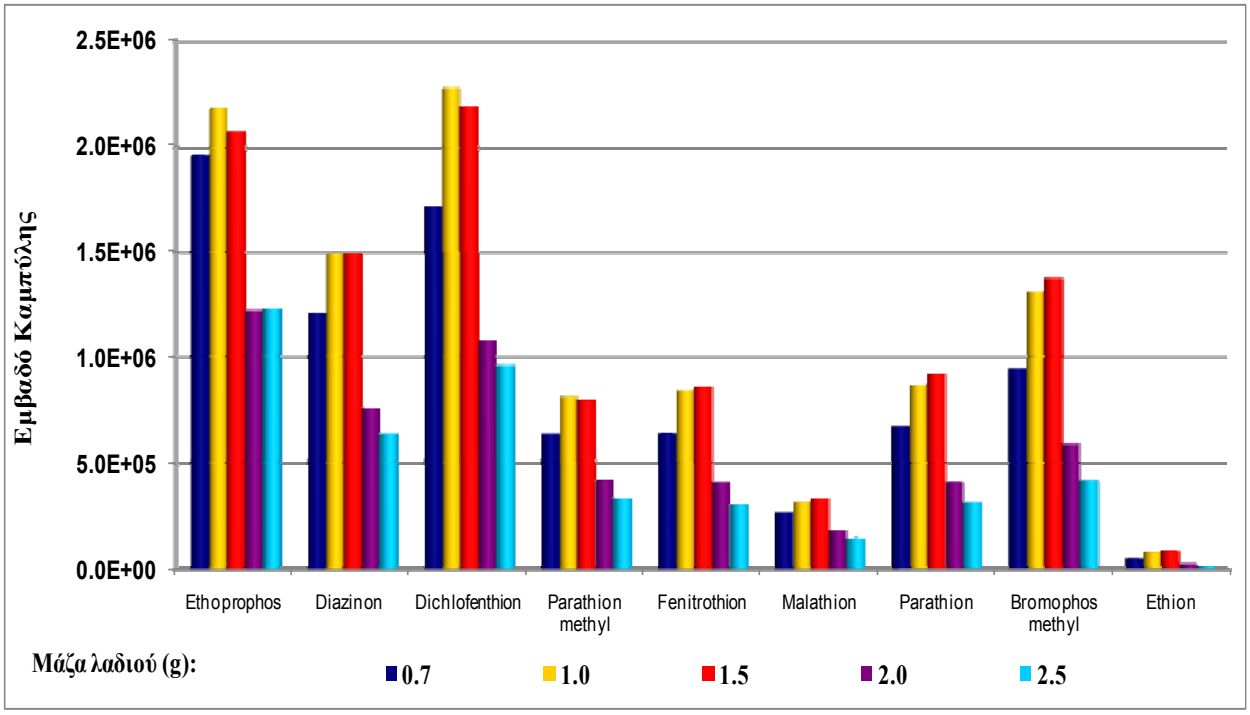
Διάγραμμα 1: Επιλογή ίνας

Η επιλογή της ίνας που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα πραγματοποιείται μεταξύ των ινών CW/DVB, PA και PDMS. Συγκεκριμένα, η ίνα CW/DVB δίνει καλύτερα αποτελέσματα για τις ουσίες dichlofenthion και ethion, ενώ η ίνα PA για την ουσία diazinon. Για την αναλυόμενη ουσία ethoprophos και οι δύο ίνες έχουν περίπου τα ίδια αποτελέσματα. Παράλληλα, η ίνα PDMS δίνει καλύτερη ανάκτηση για τις ουσίες parathion methyl, fenitrothion και bromophos methyl, ενώ για τις ουσίες malathion και

parathion η ανάκτηση από τις ίνες PDMS και CW/DVB είναι περίπου η ίδια. Οι ίνες CW/DVB και PA απορρίπτονται ως επιλογές, καθώς τα χρωματογράφηματά τους έχουν πάρα πολλές κορυφές, αρκετές από τις οποίες επικαλύπτουν τις κορυφές των ουσιών-στόχων με αποτέλεσμα να δυσκολεύουν την εξαγωγή των αποτελεσμάτων και επομένως και των συμπερασμάτων. Έτσι, επιλέγεται η ίνα PDMS καθώς δίνει πολύ καλα αποτελέσματα κυρίως για τις ουσίες με χαμηλή απόκριση από το μηχάνημα και επιπλέον το χρωματογράφημα της ίνας αυτής δεν έχει κορυφές που να επικαλύπτουν τις κορυφές των εξεταζόμενων ουσιών.

7.1.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΑΖΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Στο βήμα αυτό, ελέχθηκε η μάζα που πρέπει να έχει το δείγμα του ελαιολάδου για να επιφέρει η μέθοδος τα βέλτιστα αποτελέσματα. Οι τιμές της μάζας του ελαιολάδου που εξεταστήκαν ήταν οι εξής: 0,7, 1,0, 1,5, 2,0 και 2,5 (g).

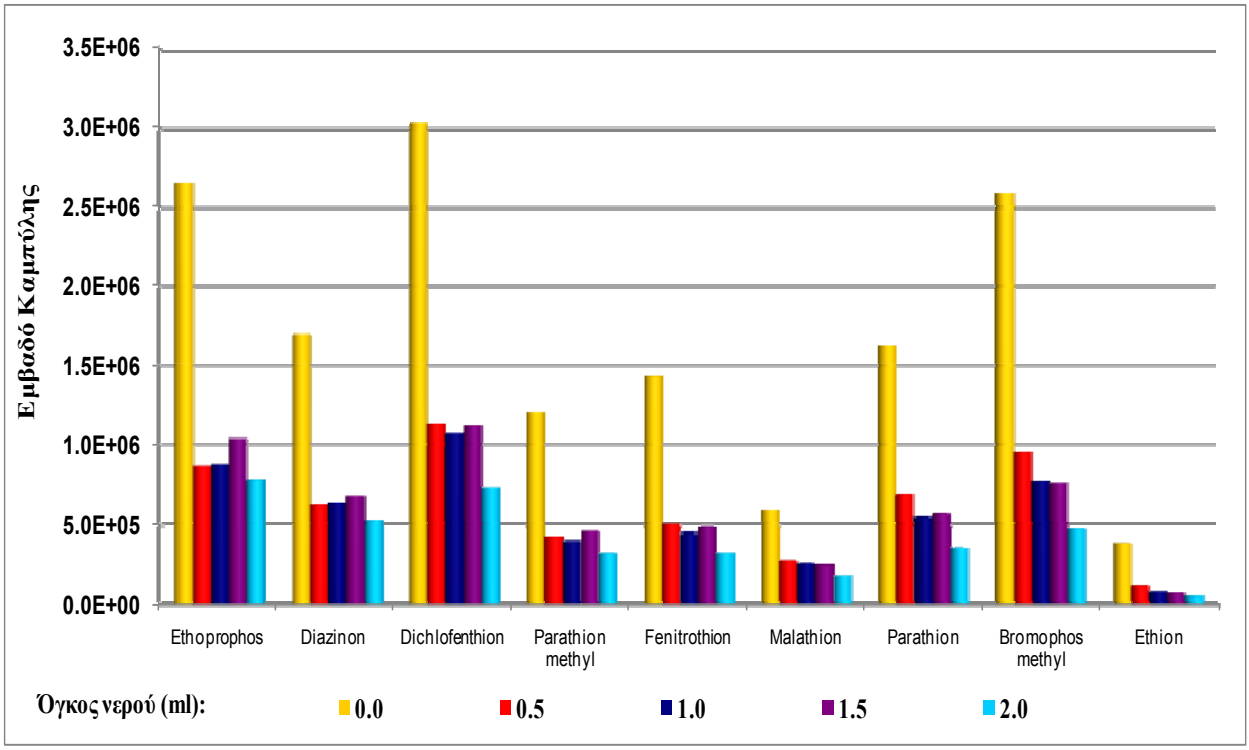


Διάγραμμα 2: Επιλογή μάζας δείγματος ελαιολάδου

Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι οι μάζες του ελαιολάδου των 1,0 g και 1,5 g δίνουν περίπου τα ίδια αποτελέσματα, τα οποία σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είναι τα βέλτιστα. Οι τιμές της μάζας των 2,0 g και 2,5 g δίνουν πολύ μικρές αποκρίσεις γιατί στις περιπτώσεις αυτές η ποσότητα του λαδιού ήταν τόση ώστε να μην ευνοείται η ανάδευση. Τέλος, από τις τιμές των 1,0 και 1,5 g επιλέγεται η τιμή του 1,0 g, εφόσον δίνει παρόμοια αποτελέσματα για όλες τις ουσίες με την τιμή του 1,5 g και επιπλέον χρησιμοποιείται λιγότερο δείγμα για ανάλυση.

7.1.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΙΑΛΥΤΗ

Στο σημείο αυτό, έγινε ο έλεγχος για τον εάν η προσθήκη κάποιου διαλύτη μπορεί να βελτιώσει ή όχι την απόκριση της μεθόδου. Αρχικά, ελέχθηκε η επίδραση της προσθήκης υπερκάθαρου νερού στο ελαιόλαδο και εξετάστηκαν οι εξής μάζες: 0, 0,5, 1,0, 1,5 και 2,0 (ml).

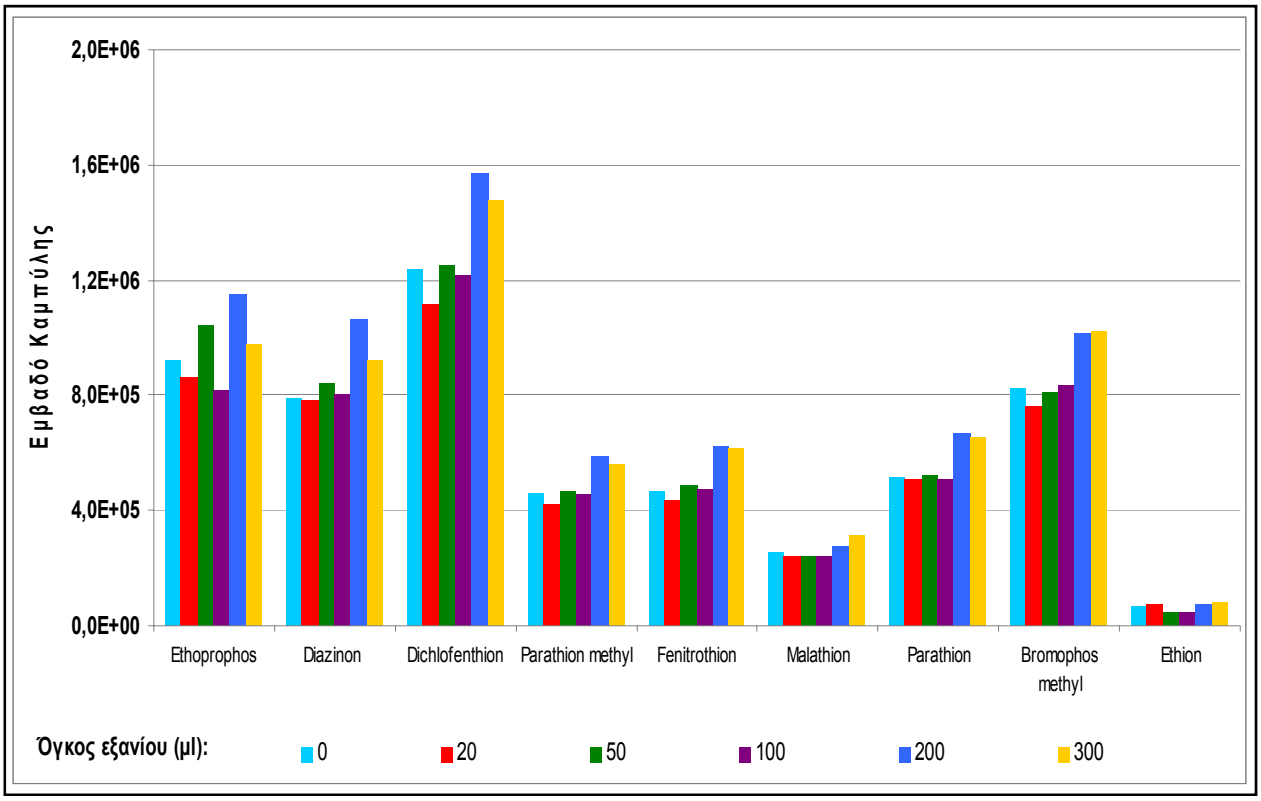


Διάγραμμα 3: Επιλογή διαλύτη 1

Από το διάγραμμα, γίνεται φανερό ότι η προσθήκη υπερκάθαρου νερού στο ελαιόλαδο μειώνει κατά πολύ την απόκριση της μεθόδου και επομένως δεν προστίθεται νερό ως επιπλέον διαλύτης στο ελαιόλαδο.

Στη συνέχεια, στο ελαιόλαδο προστίθεται εξάνιο το οποίο σε αντίθεση με το νερό είναι αναμείξιμο με το λάδι. Στο διάγραμμα που ακολουθεί, γίνεται ο έλεγχος για

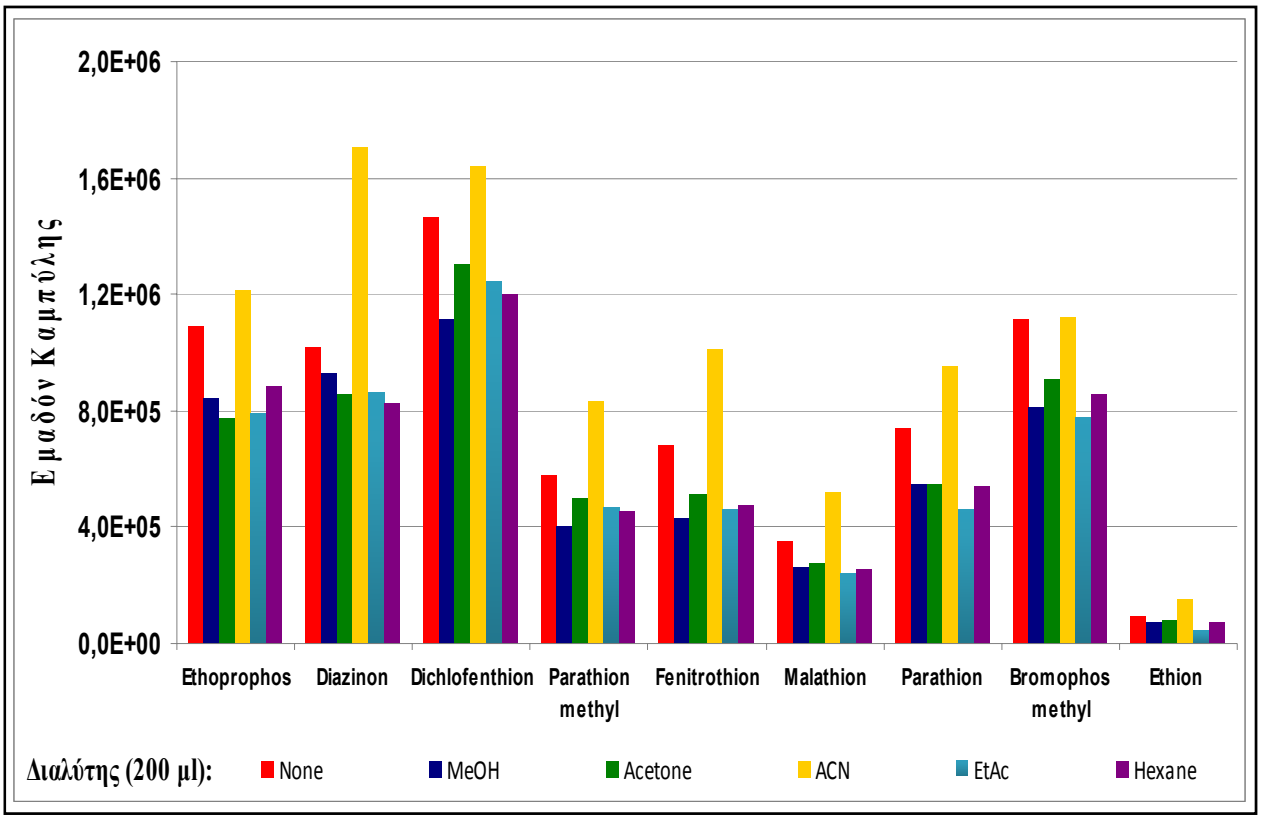
τηνεύρεση της ποσότητας εκείνης του εξανίου που βελτιώνει την απόκριση της μεθόδου. Εξετάζονται οι όγκοι 0, 20, 50, 100, 200 και 300 μl.



Διάγραμμα 4: Επιλογή διαλύτη 2

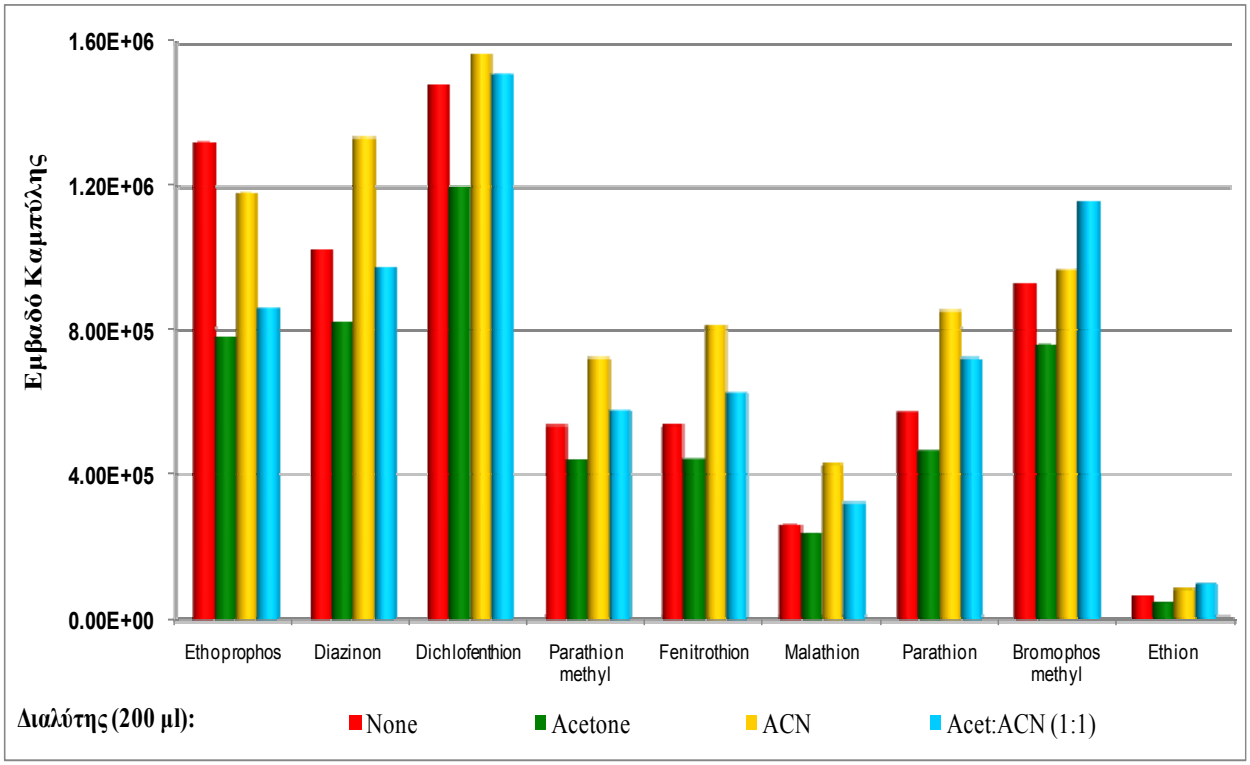
Από τη γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων, παρατηρούμε ότι οι όγκοι των 200 και 300 μl έχουν περίπου τα ίδια αποτελέσματα, με την ποσότητα των 200 μl, να υπερισχύει στην απόκριση κάποιων ουσιών. Για το σύνολο των ουσιών, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις ποσότητες 0, 20, 50, 100 μl δηλώνουν ότι ο όγκος του εξανίου στις περιπτώσεις αυτές δεν είναι αρκετός ώστε να βελτιώσει την απόδοση της μεθόδου. Τελικά, επιλέγεται η ποσότητα των 200 μl εξανίου ως η βέλτιστη δυνατή και σύμφωνα με την ποσότητα αυτή, γίνεται ο έλεγχος για την επιλογή άλλου διαλύτη ως καταλληλότερου για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου.

Οι εξεταζόμενοι διαλύτες ήταν: το εξάνιο (Hexane), η μεθανόλη (MeOH), η ακετόνη (Acetone), το ακετονιτρίλιο (ACN) και η αιθυλακετόνη (EtAc), στην ποσότητα των 200 μl.



Διάγραμμα 5: Επιλογή διαλύτη 3

Από το διάγραμμα παρατηρούμε ότι η προσθήκη ακετονιτριλίου καθώς επίσης και η επιλογή της μη προσθήκης διαλύτη δίνουν περίπου τα ίδια αποτελέσματα για όλες σχεδόν τις ουσίες εκτός από την ουσία diazinon όπου η προσθήκη του ακετονιτριλίου βελτιώνει κατά πολύ την απόκριση της μεθόδου. Στη συνέχεια, ελέγχεται εάν κάποιο μείγμα μεταξύ των προαναφερθέντων διαλυτών μπορεί να επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα.

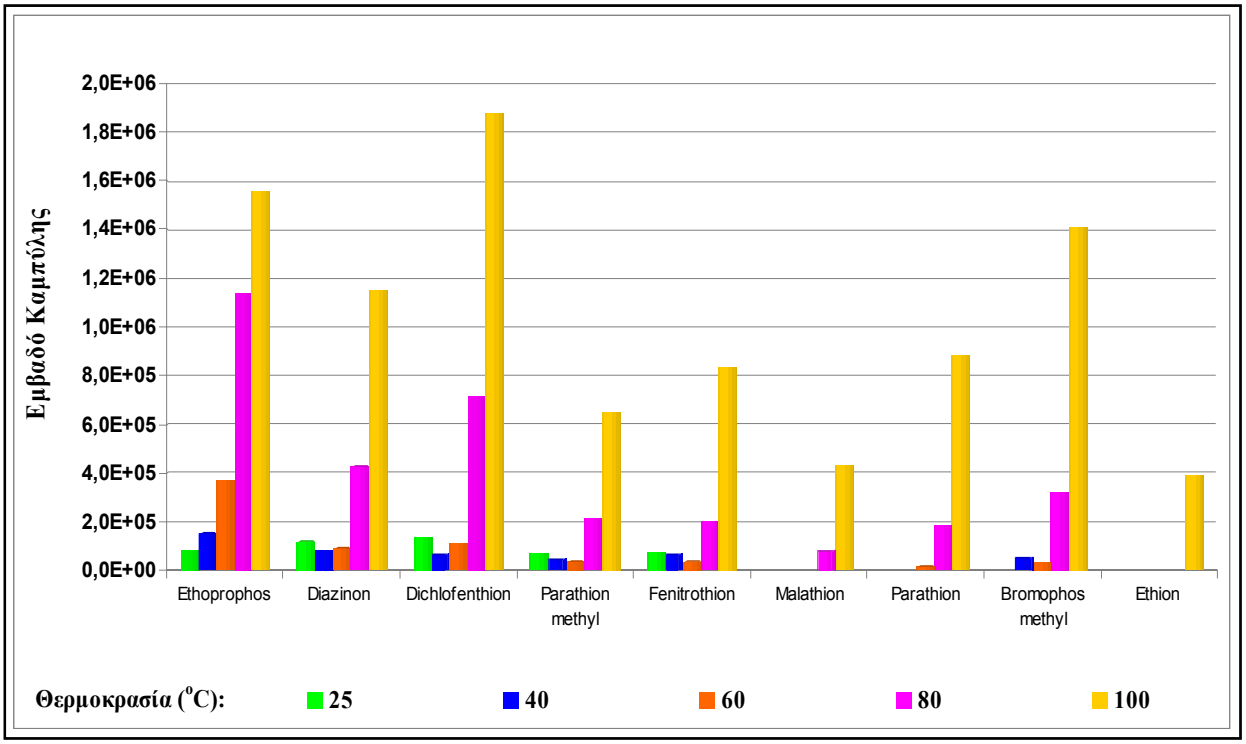


Διάγραμμα 6: Επιλογή διαλύτη 4

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την προσθήκη του ακετονιτρίλίου καθώς επίσης και από την επίλογή της μη προσθήκης διαλύτη δίνουν περίπου τα ίδια αποτελέσματα, τα οποία είναι και τα βέλτιστα. Επίσης, και το μείγμα ακετόνης/ακετονιτριλίου δίνει πολύ καλά αποτελέσματα για τις περισσότερες από τις εξεταζόμενες ενώσεις. Παρόλα αυτα, η προσθήκη διαλυτών δεν επιφέρει αξιοσημείωτη βελτίωση στην απόκριση της μεθόδου, ενώ παράλληλα επιβαρύνει το περιβάλλον. Για τους λόγους αυτούς, δεν γίνεται η προσθήκη κανενός διαλύτη για την βελτίωση της μεθόδου SPME.

7.1.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Σε αυτό το βήμα, έγινε ο έλεγχος της θερμοκρασίας εκχύλισης, η οποία αυξήθηκε από τους 25 ^{o}C έως τους 100 ^{o}C. Συγκεκριμένα, οι τιμές της παραμέτρου που εξετάστηκαν ήταν 25, 40, 60, 80 και 100 ^{o}C.



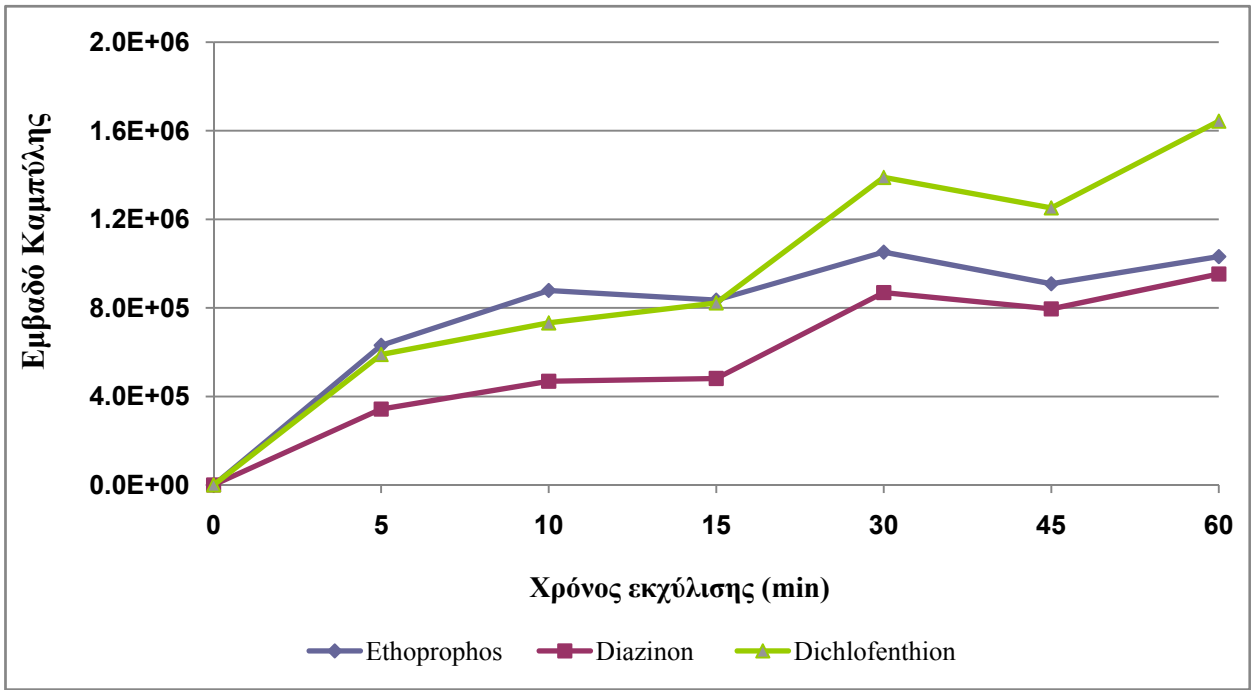
Διάγραμμα 7: Επιλογή θερμοκρασίας εκχύλισης

Τα βέλτιστα αποτελέσματα για όλες τις ουσίες με σημαντικά μεγάλη διαφορά ήταν στους 100 ^{o}C. Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των προς ανάλυση ουσιών στην υπερκείμενη φάση και επομένως, των ουσιών που ανιχνεύονται από την ίνα. Έτσι, η βέλτιστη θερμοκρασία εκχύλισης είναι στους 100 ^{o}C.

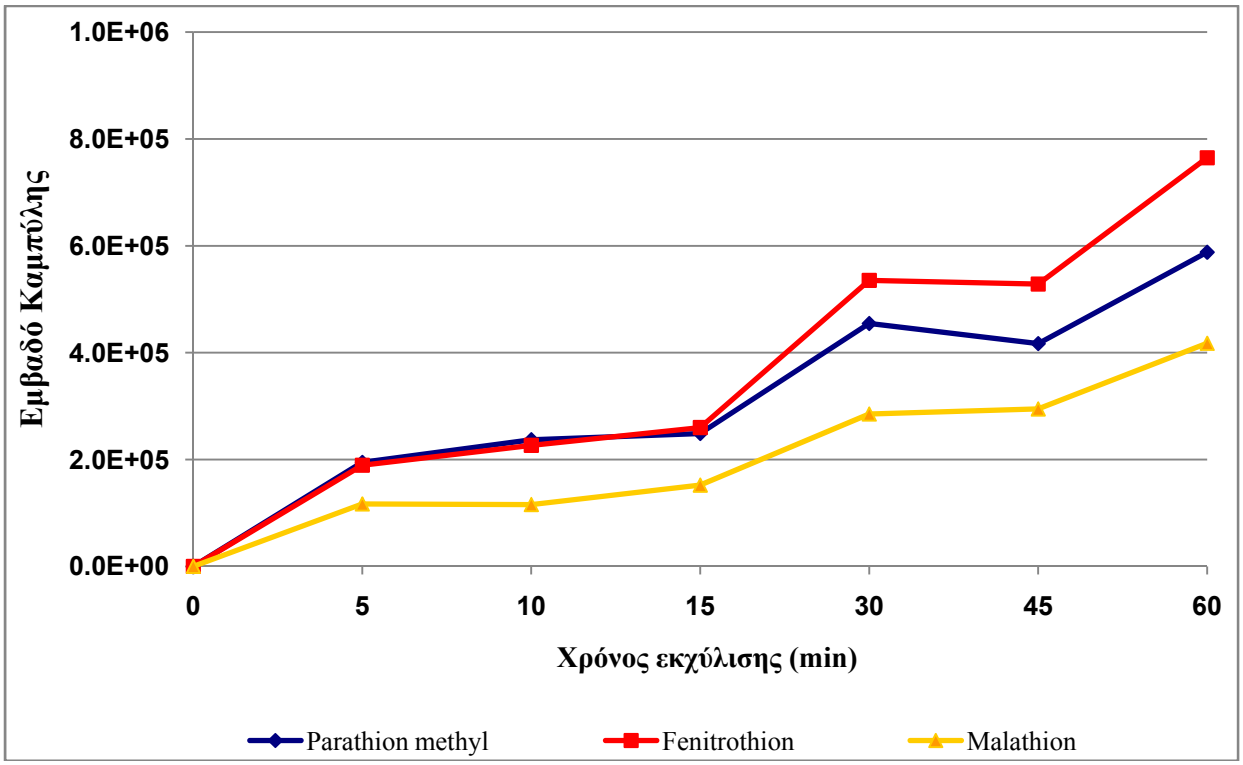
7.1.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΧΡΟΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Ως χρόνοι εκχύλισης, εξετάστηκαν οι τιμές 5, 10, 15, 30, 45 και 60 λεπτά.

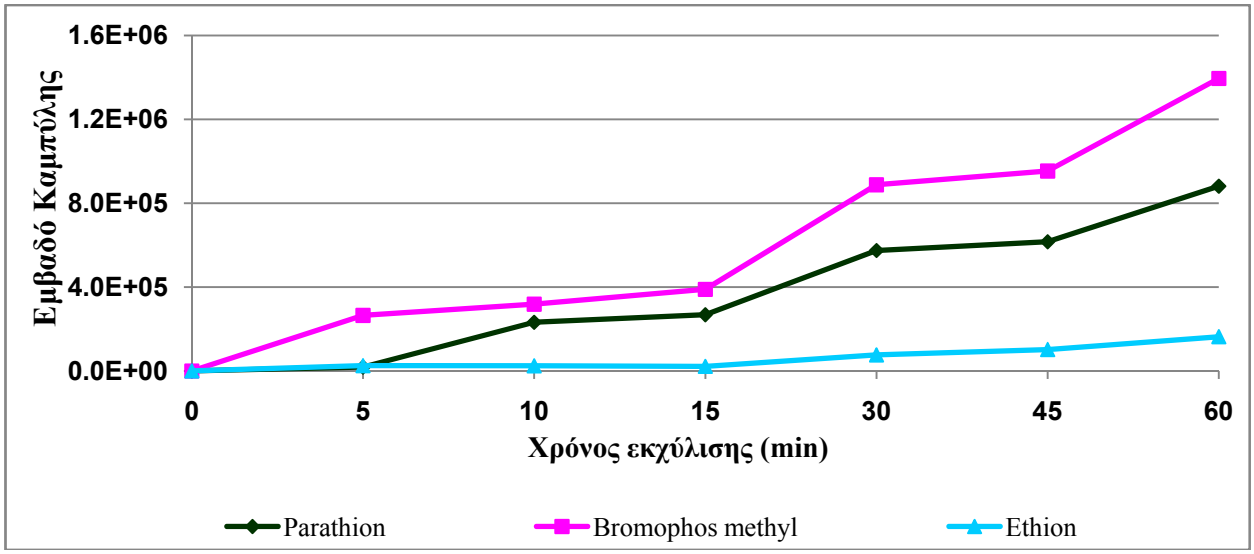
1



Διάγραμμα 8: Επιλογή χρόνου εκχύλισης για τις ουσίες Ethoprophos, Diazinon, Dichlofenthion



Διάγραμμα 9: Επιλογή χρόνου εκχύλισης για τις ουσίες Parathion methyl, Fenitrothion, Malathion

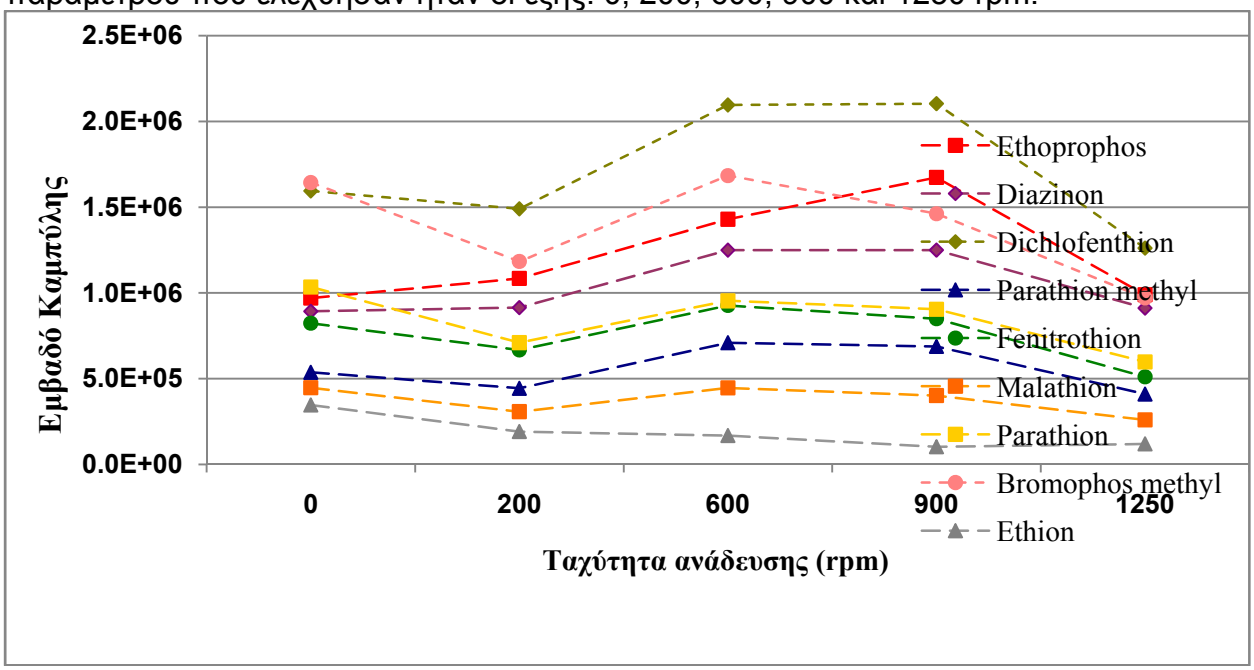


Διάγραμμα 10: Επιλογή χρόνου εκχύλισης για τις ουσίες Parathion, Bromophos methyl, Ethion

Από τα παραπάνω διαγράμματα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο χρόνος που χρειάζεται το σύστημα για να φτάσει σε ισορροπία είναι περισσότερος από 60 λεπτά για όλες τις ουσίες εκτός από τις diazinon και dichlofenthion, οι οποίες φτάνουν σε ισορροπία στα 30 λεπτά. Επιλέγεται ως βέλτιστος χρόνος εκχύλισης η τιμή των 60 λεπτών καθώς ο χρόνος αυτός είναι αρκετός για να δώσει η μέθοδος πολύ καλά αποτελέσματα για όλες τις ουσίες και παράλληλα, να γίνεται η ανάλυση αρκετών δείγματων λαδιού σε διάστημα μιας μέρας.

7.1.6 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΑΧΥΤΗΤΑΣ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ

Ως τελευταία παράμετρος, εξετάζεται η ταχύτητα της ανάδευσης. Οι τιμές της παραμέτρου που ελέχθησαν ήταν οι εξής: 0, 200, 600, 900 και 1250 rpm.



Διάγραμμα 11: Επιλογή ταχύτητας ανάδευσης (rpm)

Από το διάγραμμα, γίνεται φανερό ότι τα αποτελέσματα που προκύπτουν κατά την εφαρμογή της μέγιστης δυνατής ταχύτητας ανάδευσης (1250 rpm) είναι αρκετά χαμηλά καθώς στην ταχύτητα αυτή, η ανάδευση είναι πολύ γρήγορη και ασταθής. Επίσης, στην χαμηλή ταχύτητα ανάδευσης των 200 rpm, η ανάδευση είναι πολύ αργή με αποτέλεσμα να μην ευνοείται η διαδικασία της εκχύλισης. Τα βέλτιστα αποτελέσματα προκύπτουν κατά την εφαρμογή των 600 και 900 rpm. Τελικά, επιλέγεται ως βέλτιστη τιμή της παραμέτρου αυτής, η ταχύτητα των 900 rpm, καθώς σε αυτή την ταχύτητα ο κώνος ανάδευσης είναι πιο σταθερός σε όλη τη διάρκεια του πειράματος από ότι στην ταχύτητα των 600 rpm. Έτσι, η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιείται σε πιο σταθερές και ελεγχόμενες συνθήκες με συνέπεια, να δίνει πιο αξιόπιστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

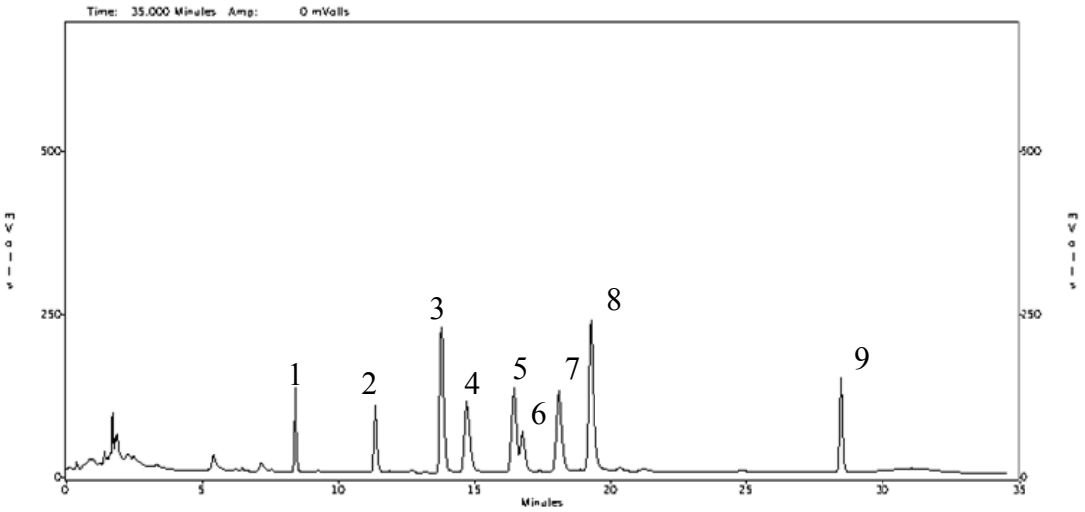
Πίνακας 14: Βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου SPME

Μέθοδος SPME	HS-SPME
Ίνα	PDMS
Μάζα δείγματος λαδιού (g)	1,0
Προσθήκη νερού (ml)	Καμία προσθήκη
Προσθήκη οργανικού διαλύτη (μl)	Καμία προσθήκη
Θερμοκρασία εκχύλισης (^oC)	100
Χρόνος εκχύλισης (min)	60
Ταχύτητα ανάδευσης κατά την εκχύλιση (rpm)	900

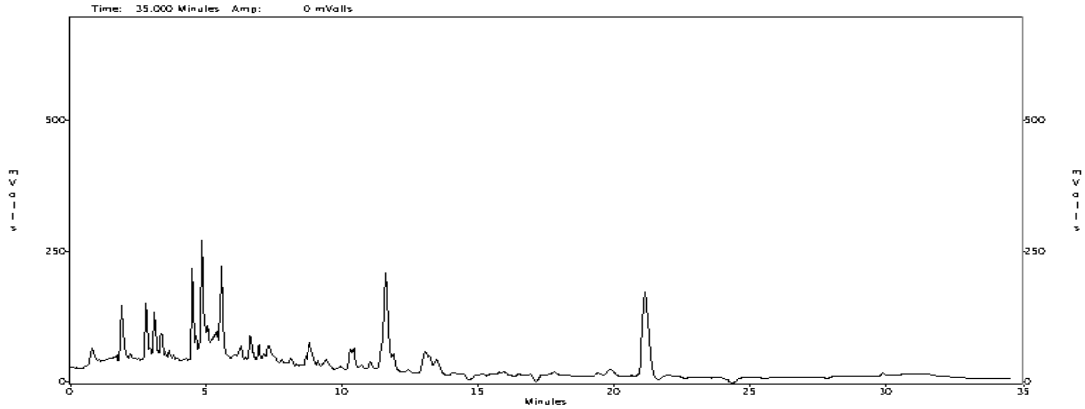
Η διαδικασία της μεθόδου συνοψίζεται στα παρακάτω διαδοχικά βήματα:

Σε φιαλίδιο όγκου (7 ml) το οποίο έκλεινε με βιδωτό καπάκι ζυγιζόταν 1,0 g λάδι. Από το διάλυμα του μείγματος των οργανοφωσφορικών ενώσεων στην ακετόνη συγκέντρωσης 200 mg/l, λαμβανόταν με σύριγγα των 10 μl, όγκος διαλύματος ίσος με 5μl και εισαγόταν στο λάδι, προκειμένου στο νέο διάλυμα η συγκέντρωση των οργανοφωσφορικών ενώσεων να είναι 2 mg/l για τις ουσίες ethoprophos και diazinon και 1 mg/l για τις υπόλοιπες εξεταζόμενες ουσίες. Στη συνέχεια, το διάλυμα τοποθετούνταν στη συσκευή ανάδευσης (vortex) για 1,0 min και με ταχύτητα 2000 rpm. Έπειτα, το φιαλίδιο καλυπτόταν με αλουμινόχαρτο και αφηνόταν σε ισορροπία για 10 min. Μετά την ισορροπία, το δοχείο τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο για να διατηρείται η θερμοκρασία της εκχύλισης σταθερή σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, σε θερμοκρασία 100 ^oC και ταχύτητα ανάδευσης 900 rpm για άλλα 10 min. Ακολούθως, γινόταν η τοποθέτηση της ίνας σε καθορισμένη θέση πάνω από το φιαλίδιο, η οποία βρισκόταν εκτεθειμένη στον υπερκείμενο όγκο του δείγματος (HS-SPME), ενώ το δείγμα αναδευόταν με μαγνητική ράβδο ανάδευσης για 60 min. Στη συνέχεια, η ίνα επανατραβιόταν στη σύριγγα και η σύριγγα εισαγόταν στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου GC-ECD για 7 min, όπου γινόταν θερμική εκρόφηση των ουσιών και τέλος γινόταν η ανάλυσή τους.

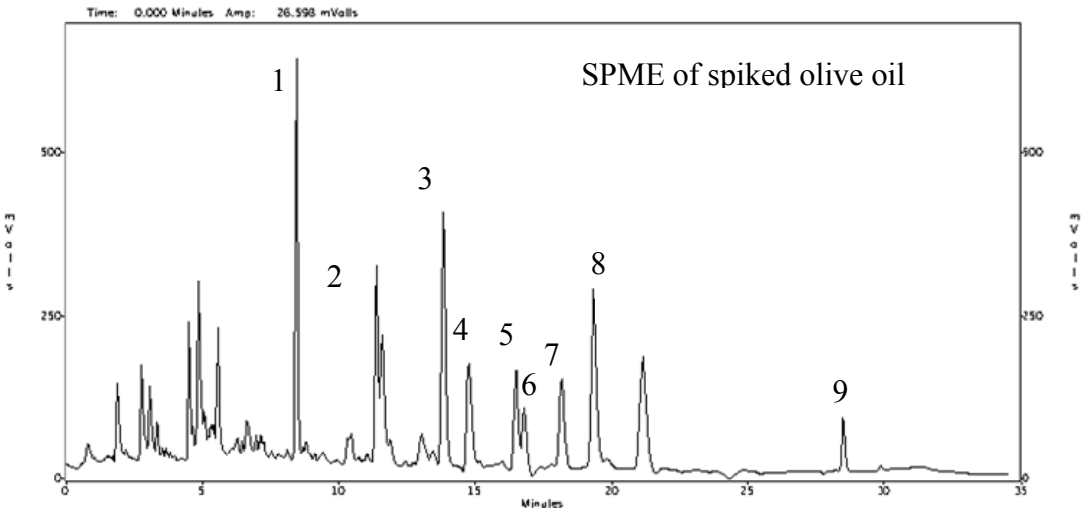
Παρακάτω παρατίθενται κάποια τυπικά χρωματογραφήματα κατά την εφαρμογή της μεθόδου:



Σχήμα 13: Χρωματογράφημα που πρόεκυψε από την απευθείας έκχυση του μείγματος των ουσιών σε εξάνιο



Σχήμα 14: Χρωματογράφημα που πρόεκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου SPME χωρίς όμως την προσθήκη των εξεταζόμενων ουσιών



Σχήμα 15: Χρωματογράφημα που προέκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου SPME με την προσθήκη 1 mg/l από τις αναλυόμενες ουσίες

7.2 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στο σημείο αυτό γίνεται η αξιολόγηση της μεθόδου. Η επαναληψημότητα της μεθόδου η οποία μελετήθηκε κατά τη διάρκεια της ίδιας μέρας, εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες του πειράματος, είναι σχετικά καλή, καθώς η τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD) κυμαίνεται από 4,8 έως 15,6 %. Παράλληλα, όλες οι ουσίες έχουν μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής στα επίπεδα συγκεντρώσεων ng/g. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αποδεικνύεται γραμμική για τις ουσίες ethoprophos και diazinon σε εύρος τιμών από 20 έως 2000 ng/g, ενώ το εύρος κυμαίνεται από 10 έως 1000 ng/g για τις υπόλοιπες ουσίες. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) κυμαίνεται από 0,948 (ethion) έως 0,998 (dichlofenthion). Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (S/N=3) κυμαίνονται από 1 (malathion) μέχρι 13 (ethion) ng/g, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης από 3 έως 44. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα.

Πίνακας 15: Ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου

Ουσία	**Γραμμική περιοχή (ng/g)**	***r*[a]**	**RSD[b]**	**LOD[c] (ng/g)**	**LOQ[d] (ng/g)**
Ethoprophos	20-2000	0,997	8,0	2	8
Diazinon	20-2000	0,998	7,3	5	15
Dichlofenthion	10-1000	0,998	8,7	2	8
Parathion methyl	10-1000	0,990	10,5	2	7
Fenitrothion	10-1000	0,985	11,4	2	5
Malathion	10-1000	0,993	4,8	1	3
Parathion	10-1000	0,987	9,7	3	10
Bromophos methyl	10-1000	0,986	10,4	7	22
Ethion	10-1000	0,948	15,6	13	44

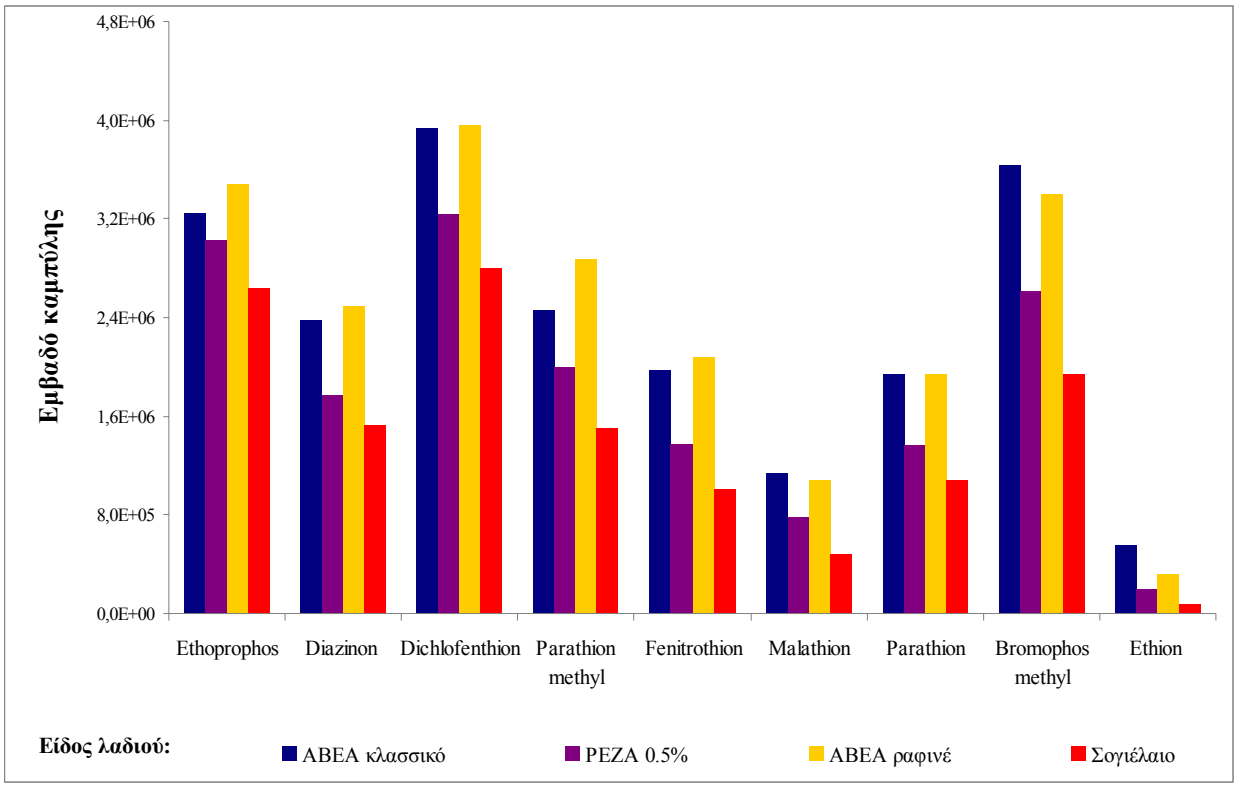
[a]*r:* Συντελεστής συσχέτισης που προέκυψε από τα πειράματα γραμμικότητας.
[b]RSD: Σχετική τυπική απόκλιση (intra-day).
[c]LOD: όριο ανίχνευσης, (S/N=3).
[d]LOQ: όριο ποσοτικοποίησης.

7.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τελικό βήμα της εργασίας αυτής ήταν η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα. Ως πραγματικά δείγματα ελέχθησαν τα παρακάτω επιτραπέζια λάδια:

- ΑΒΕΑ κλασσικό <1 %, Χανιά, Λίπη 22 %, Κεκορεσμένα 11 %, Ελαιόλαδο.
- ΡΕΖΑ 0.5 %, Ηράκλειο, Λίπη 92 g/100ml, Κεκορεσμένα 13 g/100ml, Ελαιόλαδο.
- ΑΒΕΑ ραφινέ, Χανιά, Λίπη 22 %, Κεκορεσμένα 11 %, Ελαιόλαδο.
- Carrefour ραφινέ, Κεκορεσμένα 10-22 Kcal/100 g, Σογιέλαιο.

Σε κάθε δείγμα εφαρμόστηκε η μέθοδος τουλάχιστον τρεις φορές προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει επαναληψιμότητα της μεθόδου σε αυτά και άρα να είμαστε σίγουροι για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



Διάγραμμα 12: Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα

Σε αυτό το σχήμα γίνεται εφαρμογή της μεθόδου SPME σε διαφορετικά δείγματα λαδιού προκειμένου να διαπιστωθεί εάν επηρεάζεται η συμπεριφορά της από αυτά. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η μέθοδος ήταν οι βέλτιστες. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, δεν υπάρχουν ιδιαίτερα μεγάλες διαφορές μεταξύ των τιμών που προκύπτουν από τα διάφορα λάδια. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τα ελαιολάδα ΑΒΕΑ είναι σχεδόν τα ίδια γιατί παρόλο που ανήκουν σε διαφορετική κατηγορία ελαιολάδου εντούτοις έχουν τα ίδια βασικά χαρακτηριστικά (λίπη 22 %). Επομένως, φαίνεται ότι η αποδοτικότητα της μεθόδου SPME που αναπτύσσεται στην παρούσα εργασία, δεν επηρεάζεται πολύ από την επίδραση της μήτρας.

7.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με τη χρήση της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεής φάσης έγινε εφικτή στην παρούσα εργασία, η ταυτόχρονη ανίχνευση υπολειμμάτων εννιά οργανοφωσφορικών ενώσεων (Ethoprophos, Diazinon, Dichlofenthion, Parathion methyl, Fenitrothion, Malathion, Parathion, Bromophos methyl, Ethion) στο ελαιόλάδο. Η μέθοδος αυτή παρέχει γραμμικά αποτελέσματα, καλή επαναληψιμότητα (4,8 έως 15,6 %), χαμηλά όρια ανίχνευσης (1-13 ng/g) και ποσοτικοποίησης (3-44 ng/g) και μεγάλο εύρος

συγκεντρώσεων (10-1000 ng/g). Είναι μια μέθοδος ιδιαίτερα ανταγωνιστική, η οποία μπορεί να αντικαταστήσει τις μεθόδους ανάλυσεις που χρησιμοποιούνταν μέχρι τώρα στο ελαιόλαδο.

Μέχρι στιγμής, έχουν εφαρμοστεί αρκετές μέθοδοι με διαφορετικές τεχνικές καθαρισμού και ποικίλους τρόπους ανίχνευσης για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών ενώσεων στο ελαιόλαδο (Πίνακας 16). Οι μέθοδοι αυτές συνοψίζονται στις εξής κατηγορίες:

- *Χρωματογραφία διείσδυσης πηκτωμάτων (Gel-permeation Chromatography*)

Η τεχνική αυτή, απαιτεί μεγάλους χρόνους ανάλυσης, μεγάλη ποσότητα οργανικών διαλυτών με αποτέλεσμα να αποτελεί πρόβλημα η ασφαλής διάθεσή τους στο περιβάλλον και επιπλέον δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως στα βιομηχανικά εργαστήρια [20]. Επίσης, τα όρια ανίχνευσης των οργανοφωσφορικών ενώσεων στο ελαιόλαδο με βάση αυτή την τεχνική είναι αρκετά υψηλά (parathion:100 ng/g, malathion: 50 ng/g) σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της τεχνικής SPME (parathion:3 ng/g, malathion: 1ng/g) [6].

- *Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)*

Η μέθοδος αυτή αν και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την παρακολούθηση μικρορρύπων σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως ειναι η ανίχνευση οργανοφωσφορικών ενώσεων στο ελαιόλαδο, εντούτοις έχει αρκετά μειονεκτήματα που την καθιστούν μη αποτελεσματική για την ανίχνευση ουσιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η μέθοδος αυτή ειναι χρονοβόρα, ακριβή και επιπλέον δεν έχει πολύ υψηλή ανιχνευσιμότητα όπως για παραδειγμα στην ουσία parathion όπου το LOD είναι 50 ng/g, σε αντίθεση με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεής φάσης όπου το LOD της ίδιας ουσίας είναι 3 ng/g [13]. Επίσης, απαιτεί μεγάλες ποσότητες διαλυτών υψηλής καθαρότητας οι οποίοι είναι ακριβοί καθώς και σε πολλές περιπτώσεις πολύ τοξικοί. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να προσθέσουμε ότι η μικροεκχύλιση στερεής φάσης αποτελεί εξέλιξη της εκχύλισης στερεής φάσης και οι κύριοι λόγοι για αυτή την εξέλιξη είναι αυτοί που μόλις αναφέρθηκαν.

- *Υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE)*

Οι τεχνικές υγρής-υγρής εκχύλισης για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων στο ελαιόλαδο βασίζονται στο διαχωρισμό ελαιολάδου και ακετονιτριλίου [4]. Αυτές οι τεχνικές, όπως και η τεχνική εκχύλισης στερεής φάσης *(SPE)* απαιτούν μεγάλες ποσότητες διαλυτών υψηλής καθαρότητας, οι οποίοι είναι ακριβοί καθώς και σε πολλές περιπτώσεις πολύ τοξικοί. Επιπλέον, οι ποσότητες που εκχυλίονται, περιέχουν λιπίδια σε ποσοστό 4-6%, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση του χρόνου ανάλυσης του δείγματος από τα μηχανήματα αέριας χρωματογραφίας, δημιουργώντας παράλληλα κίνδυνο καταστροφής των ευαίσθητων αυτών μηχανημάτων. Έτσι, αυξάνεται και το κόστος της μεθόδου ενώ παράλληλα μειώνεται η ευαισθησία της.

Εν κατακλείδει, η μέθοδος μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) είναι μια μέθοδος απλή, φιλική προς το περιβάλλον (δεν χρησιμοποιεί οργανικούς διαλύτες), γρήγορη (ο χρόνος προετοιμασίας των δειγμάτων είναι μερικά λεπτά) και η οποία δεν απαιτεί πολύπλοκο εργαστηριακό εξοπλισμό. Απαιτεί πολύ μικρό όγκο δείγματος για την πραγματοποίηση μιας ανάλυσης ενώ παράλληλα είναι ευαίσθητη, και ακριβής τεχνική για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό των μικρορρύπων. Η εμπορικά διαθέσιμη ίνα είναι απλή στο να χρησιμοποιηθεί, ανέξοδη, και εξαιρετικά ανθεκτική, δεδομένου ότι πάρα πολλές εκχυλίσεις μπορούν να εκτελεσθούν από μια ενιαία ίνα χωρίς κάποια απώλεια απόδοσης, ακόμη και με δείγματα που είναι ιδιαίτερα ρυπασμένα. Η μέθοδος SPME λόγω των χαρακτηριστικών της που μόλις αναφέρθηκαν, μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα εργαστήρια, δίνοντας αξιόπιστα και γρηγορα αποτελέσματα.

Πίνακας 16: Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών ενώσεων στο ελαιόλαδο

Αναλύτες	**Τεχνικές Καθαρισμού και εκχύλισης**	**Μέθοδοι Προσδιορισμού**	**Αναφορές**
GPC and related methods			
Multi-residue of 32 multiclass pesticides (organochlorine, triazines and organophosphorus)	Liquid-liquid partition with acetonitrile saturated with hexane followed by GPC clean-up	GC-ECD GC-TSD GC-MS2	[21]
Multi-residue of 50 multiclass pesticides (e.g., organochlorine, organophosphorus, triazines and pyrethroids	0.5 g olive oil dissolved in 5 ml THF. Direct extraction and clean-up by GPC	GC-Q-MS (SIM mode) LC-ESI-Q-MS (SIM mode)	[22]
Liquid-liquid-SPE-based methods			
Organochlorine, organophosphorus and PCBs	Olive oil dissolved with hexane. Extraction on Extrelut-QE column; followed by SPE clean-up with two cartridges (C18 and alumina)	GC-NPD GC-ECD GC-MS2	[23]
18 Organophophorus insecticides	SPE with two cartridges “on-line” (Extrelut-3 and C18	GC-NPD	[13]
Multi-residue of 17 pesticides (3 triazines and 14	Liquid-liquid partition with acetonitrile followed by	GC-NPD	[24]

organophophorus insecticides	low-temperature fat precipitation and removal at -20ºC. Clean-up with Sep-Pak alumina-N column		
15 organophosphorus insecticides	Liquid-liquid partition (twice) (olive oil dissolved in hexane) with acetonitrile saturated with hexane.	GC-NPD GC-FID	[4]
13 organophosphorus insecticides	Liquid-liquid partition (twice) (2 g olive oil dissolved in 2 ml hexane) with 10 ml acetonitrile	GC-NPD	[25]
Multiclass pesticides (triazines and organophosphorus)	Extraction and clean-up by on-line coupling (TOTAD interface) of RPLC and GC (RPLC-GC).	RPLC-GC-FID RPLC-GC-NPD	[26]
17 organophosphorus pesticides	Extraction, clean-up and determination by on-line coupling GPC-GC. 1g olive oil dissolved in AcOEt:cyclohexane; 30μl injected on GPC-GC	GPC-GC-NPD GPC-GC-FID	[20]

7.5 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Η μέθοδος μικροεκχύλισης στερής φάσης (SPME) είναι μια ευρέως διαδεδομένη και αναπτυγμένη μέθοδος, με λίγες όμως εφαρμογές σε δείγματα ελαιολάδου. Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων για την ανίχνευση οργανοφωσφωρικών ενώσεων στο ελαιόλαδο, διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος αυτή μπορεί και έχει ακόμη περιθώρια ανάπτυξης και μελέτης. Έτσι, δίνεται η ευκαιρία ανάπτυξης σύνθετων αναλυτικών πρωτοκόλλων, με σκοπό τον προσδιορισμό ευρέως φάσματος ενώσεων, επικίνδυνων για την ανθρώπινη υγεία που βρίσκονται στο ελαιόλαδο. Επίσης, μπορεί στο μέλλον να γίνει ανάλυση πολλών δειγμάτων ελαιολάδου με χρήση της μεθόδου SPME προκειμένου να διαπιστωθεί εάν περιέχουν τις επικίνδυνες αυτές ουσίες. Τέλος, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση και άλλων λαδιών, εκτός του ελαιολάδου, μιας και αποδείχθηκε ότι η μήτρα δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

8.1 ΒΙΒΛΙΑ-ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

[1] J. García-Reyes, C. Ferrer, M. Gσmez-Ramos, A. Fernαndez-Alba, 'Determination of pesticide residues in olive oil and olive', Trends in Analytical Chemistry 26 (2007) 239

[2] C. Tsoutsi, I. Konstantinou, D. Hela, T. Albanis, 'Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography', Analytica Chimica Acta 573 (2006) 216

[3] Α. Κυριτσάκης, 'Το ελαιόλαδο', Δημοσιεύσεις Γεωργικής Ένωσης Θεσσαλονίκη,(1988)

[4] A. Hiskia, M. Atmajidou, D. Tsipi, 'Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Greek Virgin Olive Oil by Capillary Gas Chromatography', J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 570

[5] F. Hu, 'The Mediterranean Diet and Mortality—Olive Oil and Beyond', n engl j med 26 (2003) 348

[6] D.Barcelo, M. Hennion 'Trace determination of pesticides and their degradation products in water', Elsevier, (1997).

[7] Ε. Βουδριάς,. 'Εξυγίανση Εδαφών και Υπογείων Υδάτων από Επικίνδυνα Απόβλητα', Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Ξάνθη, (2000)

[8] Ε. Γιδαράκος, 'Τοξικά απόβλητα, Διαχείριση, Επεξεργασία, Διάθεση', Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Χανιά, (2006)

[9] Codex Alimentarius Commission (1996) (2nd ed.) Codex alimentarius pesticide residues in food-maximum residuew limits (Vol.2B). Rome: FAO/WHO Press.

[10] Z. Mester, R. Sturgeon, J. Pawliszyn, 'Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation', Spectrochimica Acta Part B 56 (2001) 233

[11] Dj. Djozan, Y. Assadi, 'Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Capillary Gas Chromatograph', Microchemical Journal 63 (1999) 276

[12] H. Lord, J. Pawliszyn, 'Evolution of solid-phase microextraction technology', Journal of Chromatography A 885 (2000) 153

[13] C. Ferrer, M. Gomez, A. Fernandez-Alba, 'Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas

chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography /tandem mass spectrometry', Journal of Chromatography A 1069 (2005) 183

[14] J. Pawliszyn, 'Applications of Solid Phase MicroExtraction, Royal Society of Chemistry, Hertfordshire, UK, (1999)

[15] E. Psillakis, N.Kalogerakis, 'Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples', Analytica Chemistry 907 (2001) 177

[16] T. Gorecki, X. Yu, J. Pawliszyn, 'Theory of analyte extraction by selected porous polymer fibers', The Analyst 124 (1999) 643

[17] Z. Zhang, M. Yang, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction, Analytical Chemistry 66 (1994) 844A

[18] A. Saraullo, P. Martos, J. Pawliszyn, 'Water Analysis by SPME Based on Physical Chemical Properties of the Coating', Anal. Chem. 69 (1992-1998 (1997).

[19] Α.Οικονομόπουλος, 'Χημεία και Έλεγχος ρύπανσης της Ατμόσφαιρας', Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Χανιά, (1999)

[20] J. Vreuls, R. Swen, U. Brinkman, 'Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil', Journal of Chromatography A 750 (1996) 275

[21] M. Guardia-Rubio, M. Fernandez-De Cordova, 'Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection', Journal of Chromatography A, 1108 (2006) 231

[22] S. Barrek, O. Paisse, M. Loustalot, 'Determination of residual pesticides in olive oil by GC-MS and HPLC-MS after extraction by size-exclusion chromatography', Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 355

[23] C. Yague, S. Bayarri, ,A. Arino, 'Determination of Pesticides and PCBs in Virgin Olive Oil by Multicolumn Solid-Phase Extraction Cleanup Followed by GC-NPD/ECD and Confirmation by Ion-Trap GC-MS', J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5105

[24] C. Lentza-Rizosa , E. Avramidesa, F. Cherasco, 'Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil', Journal of Chromatography A, 912 (2001) 135

[25] P. Cabras , A. Anglont , F. Pirisi, 'Simplified multiresidue method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil', Journal of Chromatography A, 761 (1997) 327

[26] R. Sanchez, A. Vazquez, J. Andini, J. Villén, 'Automated multiresidue analysis of pesticides in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography–gas chromatography using the through oven transfer adsorption–desorption interface', Journal of Chromatography A, 1029 (2004) 167

8.2 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[i] http://www.efet.gr/elaiolado.html

[ii]http://www.oliveoil.gr/el/history/index.jsp;jsessionid=318B1958C658F19405F6D448E36FA6EA

[iii] http://easlakonia.gr/olive.oil/health-el.html

[iv] http://3dim-kater.pie.sch.gr/fitofarmaka.htm

[v] http://www.provet.co.uk/lorgue/5a8effa.html

[vi] http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm

[vii]www.biotech.aua.gr/BSC_COURSES/molrec/Dialexeis_PPS_MolRec/Ch11_Pestides.pdf

[viii] www.chem.uoa.gr/courses/organiki_1/oikotoxikologia/oiktx_K02.pdf

[ix] http://www.idph.state.il.us/public/hb/hbmeth.htm

[x] http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/methylpa.htm

[xi] http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest70_e.htm

[xii] http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlorglyphosate/ethion-ext.html

[xiii] http://www.the-piedpiper.co.uk/th13(h).htm

[xiv] http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm

[xv] www.esyf.gr/newsite/ekdoseis.php?id=34&file=**The_final_upoleimmata**.pdf

[xvi]http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-0519200114455/unrestricted/Thesis.pdf

[xvii] www.brechbuehler.com

[xviii] (http://www.labhut.com/products/autosamplers/autosampler_ht280t.php)

[xvix] http://www.science.uwaterloo.ca/.../onsiteTWA.htm)

[xx] http://medlab.cs.uoi.gr/env/online_lessons.html
[xxii] www.cartage.org.lb/.../Gaschromatography.htm