



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ  
ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ  
ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ**

**ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ Γ. ΚΑΨΗ**  
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ**  
**ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ**  
**ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ**

**ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ Γ. ΚΑΨΗ**  
ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**





«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών  
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του  
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»



Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 901/13-2-2015

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

(Επιβλέπων)

Τριαντάφυλλος Αλμπάνης

(Μέλη)

Ιωάννης Κωνσταντίνου

Βασίλειος Σακκάς

Ημερομηνία **ορισμού θέματος:** 923<sup>Α</sup>/ 29-01-2016

**Θέμα:** «Ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού παρασιτοκτόνων σε ιχθυοκαλλιέργειες και εκτίμηση επικινδυνότητας»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: Γ.Σ. 1016/14-05-2020**

1. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος: Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. Κωνσταντίνου Ιωάννης: Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. Σακκάς Βασίλειος: Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
4. Βαϊμάκης Τιβέριος: Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. Βλεσσίδης Αθανάσιος: Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
6. Χελά Δήμητρα: Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
7. Γκιώκας Δημοσθένης: Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 10-6-2020

Η πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Η Γραμματέας του Τμήματος

Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Ξανθή Τουτουτζόγλου



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στον κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπεύθυνο για την υπόδειξη του θέματος και την επίβλεψη της διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη του. Παρά τις αυξημένες υποχρεώσεις του, ήταν πάντα δίπλα μου και αποτέλεσε έναν πολύτιμο σύμμαχο κατά τη διάρκεια αυτής της δεκαετούς συνεργασίας συμβάλλοντας σημαντικά στη διαμόρφωση της επιστημονικής μου σκέψης και προσωπικότητας. Θα ήθελα ιδιαίτερα να τον ευχαριστήσω για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ ερευνητικά με διάφορα επιστημονικά προγράμματα και συνεργασίες πέρα από το πλαίσιο της παρούσας Διατριβής. Ήταν έμπρακτα δίπλα μου, σε όλα τα στάδια της Διατριβής συνοδεύοντάς με πάντα ακόμα και στις πολύωρες δειγματοληψίες σε δύσβατες και απομακρυσμένες περιοχές.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ιωάννη Κωνσταντίνου, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για το ενδιαφέρον, τις ουσιαστικές υποδείξεις και παρεμβάσεις του ως προς τη δομή και το περιεχόμενο της Διατριβής.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ Σακκά Βασίλειο οφείλω ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία που είχαμε και τις γνώσεις που μου προσέφερε. Η συνεισφορά του στην πραγματοποίηση και στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής ήταν καταλυτική.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Τιβέριο Βαϊμάκη, κ. Αθανάσιο Βλεσσίδη, κ. Δημοσθένη Γκιώκα και την κα. Δήμητρα Χελά για την αποδοχή να αξιολογήσουν τη Διατριβή.

Ευχαριστώ θερμά για τη συνεργασία μας στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας τους συναδέλφους Δρ Βάσια Μπότη, Δρ. Χαρούλα Τσούτση, Δρ Χριστίνα Κοσμά, Δρ Χριστίνα Νάννου, Αγάπη Βλάχου, Έμη Γότση, Έλσα Μπούση, Παναγιώτη Κώνστα, Νότη Τραντόπουλο, Αγγελική Καλογεροπούλου, Δάφνη Κιφοκέρη, Παναγιώτα Μαρτιναίου, Στέφανο Πατέρα, Cristina Jimenez-Holgado και ιδιαίτερα τη συνάδελφο και φίλη Μερίνα Καλαμπόκα, για την στήριξη και την εμπύχωση που μου προσέφερε απλόχερα.

Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή Βλεσσίδη Αθανάσιο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημοσθένη Γκιώκα για την πρόσβαση στο εργαστήριό τους και συγκεκριμένα στη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (Vacuum Oven), καθώς επίσης τον Καθηγητή Απόστολο Αυγερόπουλο για την πρόσβαση στον φούρνο εξάτμισης.

Ευχαριστώ επίσης τη Μονάδα περιβαλλοντικής, οργανικής και βιοχημικής ανάλυσης υψηλής ευκρίνειας Orbitrap-LC-MS του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και προσωπικά τον Υπεύθυνο Δρ. Αθανάσιο Καρκαμπούνα για την πρόσβαση στις υπηρεσίες της Μονάδας.

Μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο κρυσταλλογραφίας του τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ευχαριστώ θερμά την κ. Παπαχριστοδούλου Χριστίνα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας για την πρόσβαση στη μονάδα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) και τον καθηγητή Βαϊμάκη Τιβέριο για την αμέριστη βοήθειά του στις τεχνικές θερμικές ανάλυσης.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους αγαπητούς μου φίλους που ήταν πάντα πρόθυμοι να μου λύσουν επιστημονικές απορίες και συγκεκριμένα τον ωκεανογράφο-ιχθυολόγο Νικολιδάκη Σάββα, τη βιολόγο Μαρία Χατζησταυράκη και τον τοξικολόγο Αλεξη Ζορμπά.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ, την αδερφή μου Μαρία και τους αγαπημένους μου φίλους Δήμητρα, Βασίλη, Ελίνα, Δημήτρη, Φωτεινή και Θύμιο που με συντροφεύουν ουσιαστικά παρόντες.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Γιώργο και Κατερίνα, για τα ανεκτίμητα που μου προσφέρουν.

Μαργαρίτα Γ. Καψή

Ιωάννινα, 2020

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ  
ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΑΙ ΕΚΤΙΜΗΣΗ  
ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ**

**Μαργαρίτα Γ. Καψή**

**Διδακτορική Διατριβή**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η εντατική χρήση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στις γεωργικές και μη δραστηριότητες έχει σαν αποτέλεσμα την ανίχνευση τους, τόσο αυτών όσο και των μεταβολιτών τους, στα επιφανειακά ύδατα. Η ανάγκη ανάπτυξης ευαίσθητων, αξιόπιστων, οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον αναλυτικών μεθόδων, για τον έλεγχο της υπολειμματικότητάς τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα έχει γίνει ευρέως αντιληπτή διεθνώς.

Σε εθνικό επίπεδο, οι έρευνες που αφορούν τις επιπτώσεις σε παράκτιες περιοχές είναι περιορισμένες. Ακόμα λιγότερες είναι οι έρευνες που αφορούν περιοχές με έντονη δραστηριότητα υδατοκαλλιεργειών, που αποτελούν σημαντική εν δυνάμει πηγή θαλάσσιας ρύπανσης. Προκειμένου να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για την ρύπανση ενός οικοσυστήματος είναι επιτακτική η ανάγκη ανάλυσης εκτός των υδατικών δειγμάτων και άλλων υποστρωμάτων όπως τα ιζήματα και οι φυτικοί- ζωικοί οργανισμοί.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή βελτιστοποιήθηκαν, επικυρώθηκαν και εφαρμόστηκαν αναλυτικές μεθοδολογίες με στόχο τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε υποστρώματα όπως νερά, ιζήματα, μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια-γοβιοί (*gobio-gobio*), αχινούς (*Paracentrotus lividus*) και στο υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna minor*.

Στη συνέχεια οι μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν στον υγρότοπο του Δέλτα των ποταμών Αξιού, Λουδία, Αλιάκμονα καθώς επίσης και σε επτά χώρες προκειμένου να εκτιμηθεί η ρύπανση από την παρουσία φυτοπροστατευτικών ενώσεων από γεωργική και υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα.

Για τον προσδιορισμό των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριου χρωματογράφου συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (GC-MS) και σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας

(LTQ/Orbitrap LC-MS). Η επικύρωση των μεθόδων πραγματοποιήθηκε βάσει της ισχύουσας νομοθεσίας της ΕΕ, όπως αυτή ορίζεται στην οδηγία 2002/657/ΕΚ.

Για την ανάπτυξη της μαγνητικής εκχύλισης στερεάς φάσης (MSPE) συντέθηκαν νέα μαγνητικά υλικά σιδήρου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως προσροφητικά υλικά στην (MSPE). Αυτά χαρακτηρίστηκαν ως προς την δομή- μορφολογία και τις ιδιότητες, με τεχνικές NMR, FT- IR, TGA, SEM, DSC, XRD, ESI-MS και BET.

Για την αξιολόγηση των κύριων επιδράσεων και των τυχόν αλληλεπιδράσεων των σημαντικότερων παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση της MSPE, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη πειραματικού σχεδιασμού βασιζόμενη στο σχέδιο Box-Behnken Design (BBD). Τέλος οι βέλτιστες συνθήκες της προτεινόμενης μεθοδολογίας εκχύλισης, υπολογίστηκαν μέσω της συνάρτησης επιθυμητότητας (desirability function) του στατιστικού πακέτου STATISTICA7.0. Τα μαγνητικά υλικά χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερότητα και παρέχουν τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, χωρίς να παρατηρείται μεταφορά των αναλυτών από το προσροφητικό (carry-over effect).

Η προτεινόμενη μέθοδος υδατικών δειγμάτων MSPE συγκρίθηκε με την υγρή στερεή εκχύλιση (SPE). Επιλέχθηκαν δύο αναλυτικά πρωτόκολλα, ένα για κάθε μείγμα ενώσεων (μείγμα I & II), με διαφοροποιήσεις ως προς το προσροφητικό υλικό των μικροστηλών, τον διαλύτη ενεργοποίησης-έκλουσης και την ιοντική ισχύ.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις του μείγματος I στα ποτάμια νερά, οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν μεταξύ 71,3 και 99,1 % στο μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού ενώ για τα θαλασσινά νερά, οι ανακτήσεις ήταν ελαφρώς υψηλότερες 72-111 %. Η επαναληψιμότητα RSD<sub>r</sub>%-Intra και η αναπαραγωγικότητα RSD<sub>R</sub>%-Inter ήταν μικρότερη από 14%. Τα όρια ποσοτικοποίησης ήταν μεταξύ 3,3 και 40 ng/L για το ποτάμιο νερό και 3,3 και 33 ng/L θαλασσινό. Για το μείγμα II, οι ανακτήσεις σε θαλασσινό νερό κυμάνθηκαν μεταξύ 90,1 και 97,5 % στο μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού. Η επαναληψιμότητα RSD<sub>r</sub>%-Intra ήταν μικρότερη από 8,9 % και η αναπαραγωγικότητα RSD<sub>R</sub>%-Inter ήταν μικρότερη από 11,2 % για όλους τους αναλύτες. Τέλος, τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν μεταξύ 0,3 και 12,5 ng/L.

Η εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα στερεά υποστρώματα όπως: αχινοί (*Paracentrotus lividus*), μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια-γοβιοί (*Gobio-gobio*) και το υδρόβιο μακρόφυτο (*Lemna Minor*) πραγματοποιήθηκε με τη σύγχρονη, οικονομική και «φιλική προς το περιβάλλον» μέθοδο QuEChERS ακολουθούμενη από το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) με εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (d-SPE).



Παράγοντες βελτιστοποίησης αποτέλεσαν το pH, η ποσότητα δείγματος, ο όγκος νερού, οι χρόνοι εκχύλισης και περιδίνησης καθώς επίσης και διαφορετικοί συνδυασμοί προσροφητικών για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων.

Τα αποτελέσματα από την επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για τα παραπάνω πρωτόκολλα, επιβεβαιώνουν την καταλληλότητά της για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων στα παραπάνω υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα, για το μείγμα I στα ιζήματα οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 51,2 και 118 %, τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 3,3 και 29 ng/g. Στους γοβιούς (*gobio-gobio*), οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 53,6 και 109 %, τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 3,3 και 26 ng/g. Για τα μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν εντός εύρους 51,6-108 %, τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 3,3 και 16 ng/g, ενώ για τους αχινοί (*paracentrotus lividus*) οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 52,2 έως 103 %, τα όρια ποσοτικοποίησης από 3,3 έως 33 ng/g. Για το υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna Minor* οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν μεταξύ 59,1 και 116 % ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ από 3,3 έως 33 ng/g.

Για τις ενώσεις του μείγματος II στα ιζήματα οι ανακτήσεις της μεθόδου QuEChERS κυμάνθηκαν μεταξύ 84,3 και 106 %, τα όρια ποσοτικοποίησης από 3,3 έως 29 ng/g, ενώ για το υπόστρωμα των αχινών, οι ανακτήσεις της μεθόδου QuEChERS κυμάνθηκαν μεταξύ 85,9 και 103 % και τα όρια ποσοτικοποίησης από 2,9 έως 31 ng/g.

Με βάση τις παραπάνω μεθοδολογίες, ερευνήθηκε η παρουσία των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στον υγρότοπο του Δέλτα των ποταμών Αξιού, Λουδία, Αλιάκμονα, έναν υδροβιότοπο μεγάλης περιβαλλοντικής σημασίας και έκτασης, ο οποίος προστατεύεται από τις συνθήκες Ramsar και Βέρνης. Συνολικά ορίστηκαν 15 σημεία δειγματοληψίας επί των ποταμών από τις πηγές μέχρι και τις εκβολές στον Θερμαϊκό κόλπο. Κατά την περίοδο Ιανουάριος 2018 έως Σεπτέμβριος 2018 πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες και συλλέχθηκαν πάνω από 80 δείγματα.

Οι συχνότερα απαντώμενες ενώσεις στα νερά ήταν οι resmethrin, parathion-methyl και irgarol, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις ethoxyquine, chlorothalonil και chlorpyrifos-methyl. Αναφορικά με τα ιζήματα, το 70 % των δειγμάτων ήταν απαλλαγμένα από φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Συνολικά ανιχνεύθηκαν επτά φυτοπροστατευτικές ενώσεις τα εντομοκτόνα parathion-methyl, permethrin, chlorpyrifos και λ-cyhalothrin, τα ζιζανιοκτόνα atrazine και irgarol (βιοκτόνο) και το μυκητοκτόνο chlorothalonil. Τα επίπεδα συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν κυμαίνονται από 12,3 ng/g για το atrazine έως 78,2 ng/g για το permethrin.

Στους γοβιούς (*gobio-gobio*) ανιχνεύθηκαν δύο φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα εντομοκτόνα chlorpyrifos (9,3 ng/g) και λ-cyhalothrin (18,1 ng/g), ενώ στα μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) ανιχνεύθηκε μόνο το εντομοκτόνο chlorpyrifos με συγκεντρώσεις 10,1 ng/g (Απρίλιος '18) και 14,1 ng/g (Σεπτέμβριος '18) αντίστοιχα. Στο υδρόβιο μακρόφυτο *L.Minor*, δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης.

Επιπρόσθετα, στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού ερευνητικού έργου «*Real-time monitoring of sea contaminants by an autonomous Lab-on-a-chip biosensor*», οι προτεινόμενες μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν σε περιοχές της Ελλάδα και σε χώρες με έντονη υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα όπως η Αλβανία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Νορβηγία και το Ηνωμένο Βασίλειο.

Το βιοκτόνο irgarol ανιχνεύθηκε σε δείγματα ιζήματος που συλλέχθηκαν από την Πορτογαλία (95,2 ng/g) και από το Ην. Βασίλειο (1,3 ng/g). Η ίδια ένωση ανιχνεύθηκε και σε ένα υδατικό δείγμα από την Ιταλία με συγκέντρωση 4,3 ng/g. Τέλος, στα δείγματα αχινών δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης.

Η εκτίμηση της επικινδυνότητας (οξείας και χρόνιας) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του πηλίκου για τα τρία τροφικά επίπεδα (φύκη, ασπόνδυλα και ψάρια). Από τους υπολογισμούς των πηλίκων επικινδυνότητας για τα δεδομένα οξείας τοξικότητας, σοβαρότερες πιέσεις δέχεται η ταξινομική ομάδα του ζωοπλακτόν. Υψηλή τοξικότητα εμφάνισαν οι ενώσεις parathion-methyl, chlorpyrifos, resmethrin και permethrin. Τα ζιζανιοκτόνα atrazine και irgarol παρουσίασαν πολύ υψηλό κίνδυνο για τα άγλη  $RQ > 1$ , γεγονός που σχετίζεται με την δράση τους έναντι των φυτών-εχθρών, μπλοκάροντας τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Για την ομάδα των ψαριών, υψηλό κίνδυνο εμφάνισαν οι ενώσεις chlorpyrifos, resmethrin, permethrin και λ-cyhalothrin.

Ο υπολογισμός των πηλίκων επικινδυνότητας για τα δεδομένα χρόνιας τοξικότητας στα φύκη, κατέδειξε ότι καμία φυτοπροστατευτική ένωση δεν εμφανίστηκε υψηλή τοξικότητα. Η ταξινομική ομάδα των ψαριών δέχεται τις σοβαρότερες πιέσεις από την παρουσία των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και συγκεκριμένα των εντομοκτόνων chlorpyrifos, resmethrin, permethrin και λ-cyhalothrin. Τέλος, για την ταξινομική ομάδα του ζωοπλακτόν, πολύ υψηλό κίνδυνο παρουσίασαν τα εντομοκτόνα chlorpyrifos και λ-cyhalothrin.

**DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES  
USED IN AQUACULTURE FACILITIES AND ECOTOXICOLOGICAL RISK  
ASSESSMENT**

**Margarita G. Kapsi**

**Ph.D Thesis**

**SUMMARY**

Contamination of water resources by pesticides residues is one of the major challenges for the preservation and sustainability of the environment. Their extensive use in world-wide agricultural practice in addition to non-agriculture purposes like their use in aquaculture's facilities had led to substantial occurrence of pesticide residues and their metabolites in water. Pesticides are among the most dangerous environmental pollutants because of their stability, mobility and long-term effects on living organisms. The pollution of water by pesticides is a topic of considerable environmental interest, owing to the increasing number of pesticides detected in water and to the establishment of strict directives in Europe, aiming the protection of surface waters and water sources used for the production of drinking water.

The use of pesticides may lead to the contamination of surface waters by drift, runoff, drainage and leaching. They can also be transported over long distances through the air. Pesticides that are found in water samples, belong to different structural groups, such as triazines, pyrethrins, organochlorine etc. Several of them have been recently added to the 'priority' and 'watch list' of substances, underlining the significance to study their environmental occurrence. Concerns over the contamination of water by pesticides generally arise from two scenarios, which are, concern over human health risks and concern over ecotoxicological effects when non target organisms (e.g. aquatic organisms and amphibians) are exposed to water in their habitats. That is why pesticides levels in water must be monitored continuously.

Sample pretreatment procedures are crucial for the whole analysis process, which aim at enriching targeted analytes and eliminating matrix effect. Matrix matched calibration approach along with internal standards were employed for quantification and correction of matrix effect. The quantitative determination of pesticides at trace levels environmental was

performed utilizing sensitive analytical methods including Liquid Chromatography-Orbitrap/Mass Spectrometry and Gas Chromatography/ Mass Spectrometry.

Magnetic solid-phase extraction (MSPE), has drawn extensive attention in sample preparation in recent years. Is a new mode of SPE based on the adoption of magnetic nanoparticles (MNPs) as sorbents, at micro- or nano-scale and shows great advantages in separation science. The powdery magnetic adsorbent can be reversibly agglomerated and re-dispersed in solution or suspensions by the application and removal of an appropriate magnetic field, thus realizing the phase separation conveniently.

In this thesis, is described a chemometric optimization and validation of a simple and rapid method based on MSPE, which is followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry for the determination of pesticides in surface waters. The magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles were synthesized by coprecipitation of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$  ions, at alkaline conditions, under hydrothermal treatment. Magnetite octadecylsilane nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ ) were finally obtained by coating magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles with silica and subsequently functionalizing it by trimethoxy(octadecyl)silane. The resultant MNPs are characterized by several techniques, such as scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Elemental Analysis (EA), Fourier transform-infrared (FT-IR) and Brunauer–Emmett–Teller (BET).

For the selection and assessment of the main factors affecting the extraction a Box–Behnken design (BBD) was applied. A total of 15 runs were carried out according to the BBD and low, middle and high levels of the coded values were designated for the variables. Finally, optimal extraction conditions were obtained using the desirability function of the STATISICA 7.0 software. The optimal conditions to extract pesticides with the aid of MSPE are 54 mg of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  as sorbent, extraction time 7 min and elution time 5 min. Under optimal conditions, the model predicted maximum total extraction profitability of 0,9789.

The optimum conditions were implemented to verify the applicability of the proposed method for the quantitative determination of target analytes. Average recoveries of target analytes are found to be in the range of 60-98,7 %. High sensitivity with limits of detection ranging from 6,4-240 ng/L were achieved, as well as, good precision with relative standard deviations lower than 15 % for all cases. Linearity in the range of 6,4–5000 ng/L, with coefficients of determination ( $R^2$ ) higher than 0.9901 for all compounds. The reusability of  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  magnetic sorbents for the extraction of target analytes was also investigated. The recoveries of pesticides and hence the extraction capacity of the remained constant after three successive cycles, indicating good stability and reusability.

The MSPE method was compared with the common, extensively studied and effective SPE and the results were comparable. For the SPE optimization, different analytical protocols were examined for each mix of compounds, testing different cartridges, sample pH, washing and elution solvent. For pesticides (group I), the recovery rates ranged between 71.3 % and 99.1 % in the river water (medium spiking level), while they were slightly higher (72 % -111 %) in sea water due to increased ionic strength but also substrate effect. The repeatability and intra-laboratory reproducibility were less than 14 %. Method quantification limits (group I) ranged from 3.3 ng/L to 40 ng/L for pesticides in river water and from 3.3 ng/L to 33 ng/L in sea water samples. The recoveries for pesticides (group II) in sea waters ranged from 90.1 % to 97.5 % (medium spiking level). In all cases, the repeatability and intra-laboratory reproducibility was less than 8.9 % and 11.2 % respectively. Method quantification limits ranged from 0.3 ng/L to 12.5 ng/L.

Following the current trend to apply cheaper and “environmentally friendly” techniques with sufficiently cleaned-up extracts, the so called “QuEChERS” approach followed by dispersive solid-phase extraction (dSPE) clean-up was selected and modified accordingly. In order to obtain the optimum conditions, pH, extraction salts, sample amount and clean-up sorbents were studied for two groups of pesticides in matrixes such as sediments, urchins (*Paracentrotus lividus*), mussels (*Mytilus galloprovincialis*), fish (*Gobio-gobio*) and in water plantains (*Lemna Minor*).

Recoveries for pesticides of group I in sediment were calculated between 51.2 % and 118 % with relative standard deviation below 14% in all cases. Method’s quantification limits (MQL) were ranged from 3.3 to 29 ng/g. In fish samples (*Gobio-gobio*) recoveries (group I) were calculated between 53.6-109 % while intra-day precision  $RSD_r$  (%) and inter-day precision  $RSD_R$  (%) were lower than 14 % and 16 % respectively. MQL were below 26 ng/g for all compounds. In mussel samples (*Mytilus galloprovincialis*) recoveries (group I) were ranged between 51.6 % and 108 % with relative standard deviation below 17 % in all cases. Method quantification limits (MQL) were ranged from 3.3 to 16 ng/g. In urchin samples (*Paracentrotus lividus*) recoveries for pesticides (group I) were found to be in the range 52.2 % and 103 % with relative standard deviation below 12 % for all compounds and MQL below 33 ng/g for all compounds. Last but not least in water plantains (*Lemna Minor*) recoveries were calculated between 59.1 % and 116 %, MQL were found to be in the range 3.3 to 33 ng/g. Additionally, Intra-day precision  $RSD_r$  (%) and inter-day precision  $RSD_R$  (%) were lower than 11 % and 15 % respectively.

Recoveries for pesticides of group II for method QuEChERS in sediment were found to be between 84.3 % and 106 %. Relative standard deviations were below 10 % in all cases while method quantification limits (MQL) were ranged between 3.3 and 29 ng/g. In urchin (*Paracentrotus lividus*) recoveries (group II) were calculated between 85.9-103 %, intra-day precision  $RSD_r$  (%) and inter-day precision  $RSD_R$  (%) were lower than 9.5 % and 12 % respectively and MQL were below 31 ng/g for all compounds.

Through an extensive sampling in the Rivers Axios, Loudias and Aliakmonas, located in Macedonia Region in the North Greece the presence of currently used pesticides was assessed. Fifteen samples stations were established and more than 80 samples were collected (surface waters, sediment, biota and *Lemna Minor*) between January 2018 and September 2018). The most frequently detected pesticides in surface samples were resmethrin, parathion-methyl, irgarol while three pesticides ethoxyquine, chlorothalonil and chlorpyrifos-methyl were not detected in any sample. Regarding sediments, 70 % of total samples were free of target analytes. The most frequently detected pesticides were parathion-methyl, permethrin, chlorpyrifos, irgarol and  $\lambda$ -cyhalothrin with concentrations ranged between 12.3 and 78.2 ng/g. About biota and especially in fish samples two pesticides were detected chlorpyrifos (9.3 ng/g) and  $\lambda$ -cyhalothrin (18.1 ng/g) while in mussels only chlorpyrifos (10.1 ng/g). In water plantains (*Lemna Minor*) sample was not detected any pesticides.

Moreover, the proposed analytical methodologies were implemented in an EU-wide case study during European project “*Real time monitoring of sea contaminants by autonomous Lab-on-a-chip-biosensor*” including samples from coastal areas where aquaculture is active in Greece, Albania, Italy, Spain, Portugal, the United Kingdom and Norway. Thirty-three samples stations were established and 58 samples were collected (surface waters, sediment and urchins) between April 2016 and June 2016. Italy and Portugal were the countries with the positive findings. Specifically, In Portugal in two samples were detected biocide irgarol with concentration 95.2 ng/g and 1.3 ng/g respectively. Irgarol was also detected in Italy in water sample in concertation of 4.3 ng/L. In urchin samples was not detected any pesticides.

Environmental risk assessment (acute and chronic) was performed implementing the risk quotient method for three trophic levels (algae, daphnids and fish). Atrazine and Irgarol showed high acute toxicity in daphnids as well as chlorpyrifos, resmethrin, permethrin and parathion-methyl in algae and fish. Regarding chronic toxicity, in almost all cases for pesticides RQ values were much  $<0.01$ , corresponding to “low risk”. Chlorpyrifos and  $\lambda$ -cyhalothrin

showed high toxicity in fish. The risk quotient method is useful, indicating the need for further investigation of the presence and exposure of organisms to emerging contaminants, in order to obtain a comprehensive picture of their environmental impact.





# Πίνακας περιεχομένων

## A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΡΥΠΑΝΣΗ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b> .....	1
A. ΡΥΠΑΝΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ .....	1
1.1 Εισαγωγή .....	1
1.2 Κατανομή υδάτινων πόρων και διαθεσιμότητα .....	2
1.3 Υδρολογικός κύκλος .....	4
1.4 Έδαφος και εδαφικά συστατικά.....	5
1.5 Πηγές ρύπανσης και οργανικοί ρύποι στο υδάτινο περιβάλλον.....	7
1.6 Αναδυόμενοι ρύποι.....	8
B. Υδατοκαλλιέργειες .....	11
1.7 Ταξινόμηση υδατοκαλλιέργειας .....	11
1.8 Παραγωγή και στατιστικά δεδομένα στην Ελλάδα .....	11
1.9 Παραγωγή και στατιστικά δεδομένα στην Ευρώπη .....	13
1.10 Επίδραση υδατοκαλλιεργειών στο περιβάλλον .....	14
1.11 Χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο θαλάσσιο περιβάλλον .....	16
1.11.1 Μυκητοκτόνα .....	16
1.11.2 Παρασιτοκτόνα.....	17
1.11.3 Βιοκτόνα .....	17
1.11.4 Ζιζανιοκτόνα.....	18
1.12 Υδρολογικά χαρακτηριστικά και χρόνος παραμονής ρύπων.....	19
1.13 Βιοσυσώρευση .....	19
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</b> .....	<b>21</b>
2.1 Εισαγωγή .....	21
2.2 Ορισμός και κατηγορίες φυτοπροστατευτικών ενώσεων .....	22
2.3 Εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα .....	23
2.4 Ταξινόμηση φυτοπροστατευτικών ενώσεων.....	24
2.5 Κατηγορίες μελέτης παρούσας Διατριβής.....	25
2.5.1 Πυρεθροειδή .....	25
2.5.2 Οργανοφωσφορικά .....	26
2.5.3 Τριαζίνες .....	26
2.6 Σημειακές και μη πηγές ρύπανσης .....	26
2.7 Κατανομή και μεταφορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο περιβάλλον .....	27
2.8 Τύχη φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο περιβάλλον .....	28
2.9 Νομοθεσία στις Ευρωπαϊκές χώρες.....	30
2.10 Τοξικότητα και θεσμοθετημένα όρια.....	31

2.10.1 Τοξικότητα στον άνθρωπο .....	32
2.10.2 Τοξικότητα στο περιβάλλον .....	33
2.11 Στατιστικά δεδομένα παγκόσμιας αγοράς φυτοφαρμάκων .....	34
2.12 Στατιστικά δεδομένα Ευρωπαϊκής αγοράς φυτοφαρμάκων .....	34
2.13 Στατιστικά δεδομένα εθνικής αγοράς φυτοφαρμάκων.....	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΙΚΡΟΡΥΠΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ</b>	<b>41</b>
3.1 Εισαγωγή .....	41
3.2 Τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από υγρά υποστρώματα .....	43
3.2.1. Υγρή- Υγρή Εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE).....	43
3.2.2 Υγρή-στερεή εκχύλιση (Solid Phase Extraction, SPE) .....	44
3.2.3 Μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME).....	46
3.2.4 Μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης (Magnetic Solid Phase extraction, MSPE) .....	47
3.2.5 Εκχύλιση με προσρόφηση σε μαγνήτη ανάδευσης (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE) .....	48
3.2.6 Εκχύλιση με προσρόφηση σε ύφασμα (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE).....	49
3.2.7 Υγρή-υγρή μικρο-εκχύλιση διασποράς (Dispersive Liquid- Liquid Microextraction, DLLME).....	50
3.3. Τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από στερεά υποστρώματα.....	51
3.3.1 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe).....	52
3.3.2 Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (Super Critical Fluid Extraction, SFE) .....	57
3.3.3 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Ultra-sound – assisted extraction, UAE) .....	57
3.3.4 Εκχύλιση με διασπορά υποστρώματος σε στερεά φάση (Matrix solid-phase dispersion, MSPD) .....	58
3.3.5 Εκχύλιση Soxhlet (SOX) .....	59
3.3.6 Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (Microwave-Assisted Extraction, MAE).....	60
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ</b> .....	<b>61</b>
A. ΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ .....	61
4.1 Εισαγωγή .....	61
4.2 Μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου .....	62
4.3 Τεχνικές σύνθεσης νανοσωματιδίων .....	65
4.4 Υδρολυτικές μέθοδοι .....	66
4.4.1 Μέθοδος Συγκαταβύθισης.....	66
4.4.2 Θερμική διάσπαση .....	67
4.4.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων με μικρογαλακτώματα .....	68
4.4.4 Υδροθερμική-Διαλυτοθερμική σύνθεση.....	68
4.5. Μη υδρολυτικές τεχνικές .....	69

4.5.1 Θερμολυτική μέθοδος.....	69
4.5.2 Μέθοδος Πολυόλης .....	70
4.6 Βασικές αρχές μαγνητισμού .....	71
4.6.1 Μαγνητικές περιοχές Weiss .....	71
4.6.2 Βρόγχος Υστέρησης .....	72
4.7 Ταξινόμηση μαγνητικών υλικών .....	74
4.8 Τροποποίηση επιφάνειας μεταλλικών νανοσωματιδίων .....	75
4.9 Νανοσωματίδια πυριτίας.....	76
4.10 Μορφολογία μαγνητικών νανοσωματιδίων .....	77
4.11 Εφαρμογές στην Αναλυτική χημεία .....	78
<b>B ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ (Ionic Liquids ILs) .....</b>	<b>79</b>
4.12 Εισαγωγή .....	79
4.13 Κατηγορίες ιοντικών υγρών .....	79
4.14 Τεχνικές Σύνθεσης ιοντικών υγρών.....	82
4.15 Τεχνικές καθαρισμού- ειδικές διεργασίες .....	83
4.16 Ιδιότητες ιοντικών υγρών.....	84
4.17 Μαγνητικά Ιοντικά Υγρά .....	86
4.18 Εφαρμογές.....	88
4.19 Εφαρμογές στην Αναλυτική Χημεία ως προσροφητικά.....	89
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ, ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ.....</b>	<b>95</b>
<b>A. Τεχνικές χαρακτηρισμού μαγνητικών νανοσωματιδίων .....</b>	<b>95</b>
5.1 Εισαγωγή .....	95
5.2 Τεχνική περίθλασης ακτίνων-Χ (XRD) .....	95
5.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) .....	98
5.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού FOURIER.....	99
5.5 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) .....	101
5.6 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) .....	102
<b>B. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ .....</b>	<b>104</b>
5.7 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης.....	104
5.7.1 Αέρια Χρωματογραφία.....	105
5.7.2 Αναλυτικές στήλες.....	106
5.7.3 Ανιχνευτές .....	107
5.8.1 Υγρή Χρωματογραφία .....	108
5.8.2 Αναλυτικές Στήλες .....	110
5.8.3 Ανιχνευτές .....	111

Γ. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ .....	112
5.9 Φασματομετρία μάζας (MS) .....	112
5.10 Διάταξη φασματογράφου μάζας .....	112
5.11 Τεχνικές ιονισμού .....	114
5.11.1. Ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI) .....	115
5.12 Χαρακτηριστικά Αναλυτών μάζας.....	119
5.12.1 Τετραπολικός Αναλυτής (Quadrupole, Q).....	120
5.12.2 Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of flight, TOF) .....	121
5.12.3 Αναλυτής Παγίδας ιόντων (Quadrupole Ion Trap, QIT) .....	122
5.12.4 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap.....	123
5.13 Συζευγμένη φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS).....	124
Δ. Επεξεργασία δεδομένων με χρήση στατιστικής ανάλυσης.....	126
5.14 Εισαγωγή στην Χημειομετρία .....	126
5.15 Βελτιστοποίηση μεθόδων .....	126
5.16 Πειραματικός σχεδιασμός (Experimental Design ή Design of Experiments - DOE).....	127
5.17 Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM).....	128
5.17.1 Διαλογή των παραμέτρων (Screening of variables).....	129
5.17.2 Επιλογή πειραματικού σχεδιασμού .....	129
5.17.2.1 Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design) .....	129
5.17.2.2 Πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken (BBD) .....	131
5.18 Προσαρμογή μαθηματικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα- Εκτίμηση μοντέλου .....	133
5.19 Μαθηματική - στατιστική επεξεργασία δεδομένων.....	133
5.20 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών.....	134
5.21 Μελέτη επιβεβαίωσης (Confirmation study).....	135
<b>Β. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....</b>	<b>139</b>
<b>Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΜΕΛΕΤΗΣ.....</b>	<b>143</b>
Α Επιλογή φυτοπροστατευτικών ενώσεων.....	143
6.1 Εισαγωγή .....	143
6.1.1 Επιλεγμένα εντομοκτόνα .....	144
6.1.2 Επιλεγμένα ζιζανιοκτόνα.....	146
6.1.3 Μυκητοκτόνα .....	147
Β. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	149
6.2 Σημεία Δειγματοληψίας Ελλάδα.....	149
6.2.1 Αλιάκμων ποταμός.....	149

6.2.2 Λουδίας ποταμός .....	150
6.2.3 Αξίος ποταμός .....	151
6.2.4 Θερμαϊκός κόλπος.....	152
6.3 Μετεωρολογικά και Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά περιοχής.....	158
6.4 Σημεία δειγματοληψίας σε Ευρωπαϊκές μονάδες υδατοκαλλιέργειας .....	160
6.4.1 Λωρίδα Σαγιάδας .....	161
6.4.2 Αλβανία: Λιμνοθάλασσα Βουθρωτού .....	162
6.4.3 Ισπανία: Ποταμός Ebro.....	163
6.4.4 Πορτογαλία: Λιμνοθάλασσα Aveiro.....	164
6.4.5 Νορβηγία: Θαλάσσια περιοχή Rong .....	165
6.4.6 Ηνωμένο Βασίλειο: Εκβολές ποταμού Exe .....	166
6.4.7 Ιταλία: Περιοχή Λιγυρίας και Sacca di Goro .....	167
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>171</b>
A Υλικά και Ενόργανες διατάξεις .....	171
7.1. Πρότυπες Ενώσεις- διαλύματα αυτών.....	171
7.2 Διαλύτες .....	172
7.3 Αντιδραστήρια και προσροφητικά.....	172
7.4 Υαλικά και σκεύη.....	174
7.5 Συσκευές.....	174
7.6 Ενόργανες διατάξεις.....	175
7.7 Συστήματα χρωματογραφίας.....	176
7.7.1 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.....	176
7.7.2 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας.....	178
B Δείγματα.....	180
7.8 Υποστρώματα για την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων.....	180
7.9 Συλλογή πραγματικών δειγμάτων .....	181
7.10 Εμβολιασμός δειγμάτων .....	182
7.11 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας .....	183
7.12 Επίδραση υποστρώματος (Matrix effect) .....	185
Γ. Μέθοδοι.....	188
7.13 Επιφανειακά νερά .....	188
7.14 Στερεά υποστρώματα.....	191
7.14.1 Ιζήματα .....	191
7.14.2 Θαλάσσιοι οργανισμοί.....	193
7.14.3 Υδρόβιο μακρόφυτο <i>Lemna Minor</i> .....	196

## Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ .....</b>	<b>201</b>
A. ΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΥΓΡΑ .....	201
8.1 Σύνθεση μαγνητικών ιοντικών υγρών 1,12 di(3-benzylbenzimidazolium) dodecane-bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]- imide bromo- trichloroferate [(BBnIM) <sub>2</sub> C <sub>12</sub> ][NTf <sub>2</sub> ][FeCl <sub>3</sub> Br].	201
8.2 Σύνθεση ενδιάμεσου 1.....	202
8.3 Χαρακτηρισμός Ενδιάμεσου 1 .....	204
8.3.1 Φασματομετρία με ιοντισμό Electrospray (ESI-MS) .....	204
8.3.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υδρογόνου ( <sup>1</sup> H NMR) .....	205
8.3.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR .....	206
8.4 Σύνθεση ενδιάμεσου 2 (dicationic bromide salt) .....	209
8.5 Χαρακτηρισμός ενδιάμεσου 2 .....	210
8.5.1 Φασματομετρία με ιονισμό Electrospray (ESI-MS).....	210
8.5.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υδρογόνου ( <sup>1</sup> H NMR) .....	210
8.5.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR .....	212
8.6 Σύνθεση ενδιάμεσου 3.....	215
8.7 Χαρακτηρισμός ενδιάμεσου 3 .....	216
8.7.1 Φασματομετρία με ιονισμό Electrospray (ESI-MS).....	216
8.7.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υδρογόνου ( <sup>1</sup> H NMR) .....	216
8.8 Σύνθεση ενδιάμεσου 4.....	218
8.9 Σύνθεση τελικού προϊόντος 5 .....	219
8.10 Χαρακτηρισμός ενδιάμεσης ένωσης 4 και τελικού προϊόντος.....	220
8.10.1 Θερμοσταθμική ανάλυση και διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης.....	220
8.10.2 Ιδιότητες μαγνητικού ιοντικού υγρού .....	223
8.11 Εφαρμογή του MIL σε υδατικά δείγματα .....	224
B. ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @C18) .....	226
8.12 Σύνθεση μαγνητίτη (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) .....	226
8.13 Τροποποίηση του μαγνητίτη με διοξειδίου του πυριτίου (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> ) .....	227
8.14 Τροποποίηση σιλανοποιημένου μαγνητίτη με αλκυλομάδα C18 (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @C18) .....	228
8.15 Χαρακτηρισμός συντιθέμενων μαγνητικών υλικών (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> και Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @C18).....	229
8.15.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @C18) .....	229
8.15.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @C18.....	231
8.15.3 Περίθλαση Ακτινών Χ (X-Ray Diffraction, XRD).....	232
8.15.4 Ειδική επιφάνεια .....	235
8.15.5 Μαγνητικές Ιδιότητες.....	235

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: ΜΑΓΝΗΤΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (MSPE) .....</b>	<b>237</b>
9.1 Εισαγωγή .....	237
9.2 Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης και του όγκου αυτού .....	237
9.3 Επίδραση του pH.....	238
9.4 Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης.....	239
9.5 Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken design (BBD).....	240
9.6 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης μεθόδου MSPE.....	246
9.7 Επαναχρησιμοποίηση υλικών .....	249
9.8 Σύγκριση MSPE (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @C18) σε σχέση με συμβατικές μεθόδους .....	249
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ SPE ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ .....</b>	<b>253</b>
A. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ .....	253
10.1 Εισαγωγή .....	253
10.2 Προκαταρκτικά πειράματα SPE.....	254
10.2.1 Επίδραση προσροφητικού υλικού .....	254
10.2.2 Επίδραση του pH.....	255
10.3 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης φυτοπροστατευτικών ενώσεων από τα επιφανειακά νερά (μείγμα I) .....	256
10.4 Άλλοι παράγοντες επίδρασης .....	258
10.5 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης φυτοπροστατευτικών ενώσεων από τα επιφανειακά νερά (μείγμα II) .....	259
10.6 Επίδραση προσροφητικού υλικού, διαλύτη εκχύλισης, pH και ταχύτητας ροής.....	260
B. Επικύρωση.....	262
10.7 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης της μεθόδου (Μείγμα I) και (Μείγμα II) .....	262
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11: ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ QuEChERS ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΡΕΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....</b>	<b>267</b>
A. Βελτιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοφάρμακων στα ιζήματα .....	267
11.1 Εισαγωγή .....	267
11.2 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης για τα ιζήματα (Μείγμα I & II) .....	267
11.3 Επιλογή προσροφητικών εκχύλισης .....	270
11.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS.....	272
11.4.1 Επίδραση προσροφητικών εκχύλισης.....	272
11.4.2 Ποσότητα δείγματος .....	273
11.4.3 Διαλύτης εκχύλισης.....	273
11.4.4 Ενυδάτωση ιζήματος.....	273
11.4.5 Προσροφητικά καθαρισμού (clean-up) .....	274
B. Επικύρωση.....	277

11.5 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης μεθόδου (μείγμα I & II).....	277
B. Βελτιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε δείγματα θαλάσσιων οργανισμών .....	281
11.6 Εισαγωγή .....	281
11.7 Προκαταρκτικά πειράματα .....	282
11.8 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης για το υπόστρωμα θαλάσσιων οργανισμών .....	282
11.9 Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης.....	284
11.10 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS.....	288
11.10.1 Επιλογή προσροφητικών στο clean up .....	288
11.10.2 Διαλύτης εκχύλισης.....	292
11.10.3 Ποσότητα δείγματος .....	292
11.10.4 Χρόνος περιδίνησης .....	293
11.10.5 Επαρκής ενυδάτωση δείγματος.....	293
11.10.6 Ψύξη δειγμάτων πριν από το clean-up.....	294
B. Επικύρωση.....	295
11.11 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης QuEChERS για του θαλάσσιους οργανισμού	295
Γ. Βελτιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο υδρόβιο μακρόφυτο <i>Lemna Minor</i> .....	301
11.12 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης .....	301
11.13 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS.....	303
11.13.1 Επιλογή προσροφητικών clean up .....	303
11.13.2 Ποσότητα δείγματος .....	305
11.13.3 Διαλύτης εκχύλισης.....	305
11.13.4 Χρόνος υπερήχων.....	305
B. Επικύρωση.....	306
11.14 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης της μεθόδου για το υπόστρωμα <i>Lemna Minor</i> (Μείγμα I).....	306
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12: ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΧΩΡΕΣ.....</b>	<b>309</b>
A. Επίπεδα συγκεντρώσεων των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην περιοχή μελέτης Αξιός- Λουδίας-Αλιάκμονας .....	309
12.1 Εισαγωγή .....	309
12.2 Επίπεδα συγκεντρώσεων στα υδατικά δείγματα .....	310
12.3 Εναρμόνιση με τα Περιβαλλοντικά Πρότυπα Ποιότητας .....	316
12.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	318
12.5 Επίπεδα συγκεντρώσεων στα ιζήματα.....	321
12.6 Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	326



12.7 Επίπεδα συγκεντρώσεων στους θαλάσσιους και φυτικούς οργανισμούς.....	327
12.8 Επίπεδα συγκεντρώσεων σε δείγματα Ευρωπαϊκών υδατοκαλλιεργειών.....	331
Γ. Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας .....	337
12.9 Εισαγωγή .....	337
12.10 Μέθοδος του πηλίκου (Risk Quotient Method).....	337
12.11 Εκτίμηση οξείας τοξικότητας .....	338
12.12 Εκτίμηση χρόνιας τοξικότητας .....	347
<b>Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>357</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>365</b>
<b>Συνομογραφίες.....</b>	<b>405</b>
<b>Παράρτημα I-II</b>	



---

## **A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΡΥΠΑΝΣΗ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

### ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

#### A. ΡΥΠΑΝΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

##### 1.1 Εισαγωγή

Το νερό αποτελεί αναμφισβήτητα τον σημαντικότερο φυσικό πόρο του πλανήτη, άμεσα συνυφασμένο με την διατήρηση και την εξέλιξη της ζωής. Σύμφωνα με τον Θαλή τον Μιλήσιο «Το νερό είναι η αρχή των πάντων». Στην ουσία αποτελεί ανακυκλώσιμο πόρο και όχι ανανεώσιμο, γεγονός που σημαίνει ότι τα αποθέματά του παραμένουν σταθερά σε αντίθεση με τον πληθυσμό της γης που συνεχώς αυξάνεται.

Δύο από τις μεγαλύτερες προκλήσεις του 21<sup>ου</sup> αιώνα αποτελούν η έλλειψη και η υποβάθμιση της ποιότητας του νερού. Παρά τις συνεχιζόμενες πιέσεις στο πόσιμο νερό, περίπου το 66% των παγκόσμιων αποθεμάτων χρησιμοποιούνται για αρδευτικούς σκοπούς, ποσοστό που σε άγονες περιοχές μπορεί να φτάσει και το 90%. Σε εθνικό επίπεδο, η κατανάλωση πόσιμου νερού αυξήθηκε κατά 45% τις τελευταίες τρεις δεκαετίες.

Οι χρήσεις των υδάτινων συστημάτων στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν αλόγιστες και βασισμένες στη θεώρηση ότι τέτοια αχανή συστήματα δεν επηρεάζονται εύκολα ενώ ακόμα και σε μία τέτοια περίπτωση, η αποκατάσταση θα ήταν γρήγορη και εύκολη και προπαντός από την ίδια τη φύση. Εν τούτοις, η ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας, η σύνθεση αλλά και η χρήση ολοένα και περισσότερων χημικών ουσιών «εφοδίασε» τα υδάτινα οικοσυστήματα και κυρίως τις θάλασσες με τεράστιες ποσότητες μη ή δύσκολα αποικοδομήσιμων χημικών ουσιών.

Η ρύπανση των θαλασσών αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα και δράσεις λαμβάνονται κυρίως στις παράκτιες περιοχές όπου εντοπίζεται και η μεγαλύτερη αλιευτική δραστηριότητα (90% της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών). Παρόλα αυτά, ο αριθμός επιστημονικών εργασιών που επικεντρώνονται σε περιοχές με έντονη υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα μελετώντας συστηματικά ύδατα, ιζήματα και θαλάσσιους οργανισμούς ταυτόχρονα, είναι

περιορισμένη. Στην παρούσα Διατριβή, επιχειρείται η ταυτόχρονη μελέτη έξι διαφορετικών υποστρωμάτων (νερό, ίζημα, αχινός, μύδι, ψάρι και φυτικών οργανισμών) όπου αυτό είναι εφικτό, προκειμένου να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για τα επίπεδα συγκεντρώσεων και των επιπτώσεων από υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών.

Οι επιπτώσεις της υποβάθμισης των υδάτινων πόρων για τον άνθρωπο και το περιβάλλον αναγνωρίστηκαν από τον Ο.Η.Ε με αποτέλεσμα το 1975 ιδρύθηκε το Παγκόσμιο Περιβαλλοντικό Σύστημα Επιμελητείας (GEMS). Για να τονιστεί η ανάγκη ανάληψης άμεσης δράσης, τα Ηνωμένα Έθνη χαρακτήρισαν το έτος 2003 ως το «Παγκόσμιο Έτος για τα Νερά» (International Year of Fresh water). Τα επόμενα χρόνια, ιδρύθηκαν περιβαλλοντικοί οργανισμοί προστασίας περιβάλλοντος και θεσπίστηκαν Κοινοτικές Οδηγίες Διαχείρισης υδάτων με σκοπό την κατάταξη και την εκτίμηση των πηγών ρύπανσης καθώς επίσης και την αξιολόγηση των επιπτώσεων τους στα υδάτινα οικοσυστήματα και στους οργανισμούς.

## 1.2 Κατανομή υδάτινων πόρων και διαθεσιμότητα

Το νερό αποτελεί έναν περιορισμένο φυσικό αγαθό καθώς το 97% ανήκει στους ωκεανούς και είναι ακατάλληλο για χρήση λόγω υψηλής περιεκτικότητας αλάτων. Το γλυκό νερό αποτελεί μόλις το 3% της συνολικής ποσότητας του νερού στον πλανήτη από το οποίο το 70% βρίσκεται σε μορφή παγετώνων και παγόβουνων και το υπόλοιπο 30% σε μη προσβάσιμους υδροφόρους ορίζοντες.

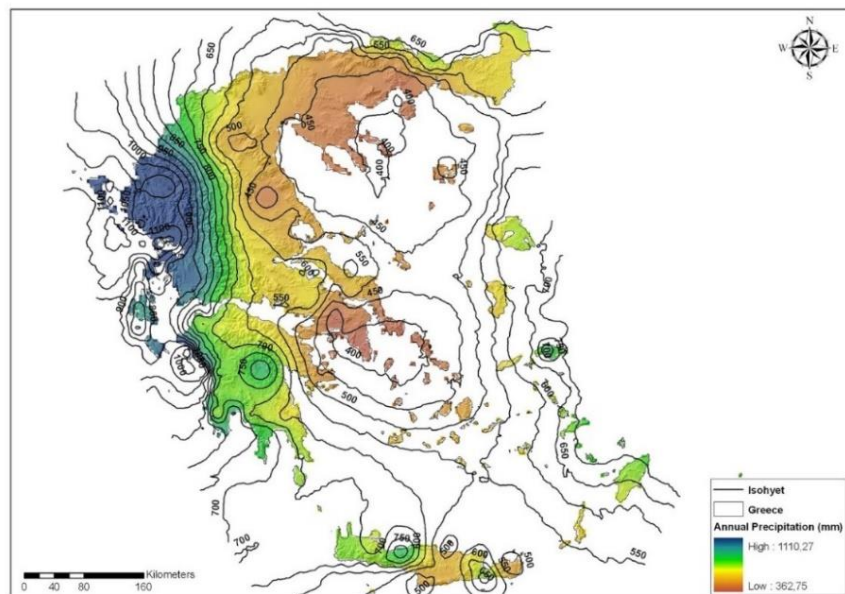
Η μεγαλύτερη δεξαμενή γλυκού νερού είναι τα υπόγεια ύδατα και αποτελούν το 97% των διαθέσιμων γλυκών νερών της γης (χωρίς να υπολογίζονται οι πολικοί πάγοι). Το υπόλοιπο 3% αποτελείται κυρίως από επιφανειακά ύδατα (ποταμοί, λίμνες, λιμνοθάλασσες) και την υγρασία. Επομένως όπως γίνεται αντιληπτό, μόνο ένα μικρό ποσοστό του νερού είναι διαθέσιμο και η διατήρησή του είναι σημαντική καθώς το νερό αποτελεί βιότοπο για το 6% των ειδών του πλανήτη (Pico et al., 2019).

Η ανανέωση του νερού που βρίσκεται στον πλανήτη συνδέεται άμεσα με την μορφή στην οποία βρίσκεται. Έτσι το νερό που βρίσκεται στους ωκεανούς ή είναι δεσμευμένο με τη μορφή πάγου, απαιτεί το πέρασμα πολλών ετών, προκειμένου να ανανεωθεί σε σχέση με τα ποτάμια ύδατα όπου η ανανέωση πραγματοποιείται ταχύτερα (Πίνακας 1.1) (Βούτσιος, 1998).

**Πίνακας 1.1:** Κατανομή νερού και χρόνοι ανανέωσης νερού στην βιόσφαιρα (Πηγή: Βούτσιος, 1998)

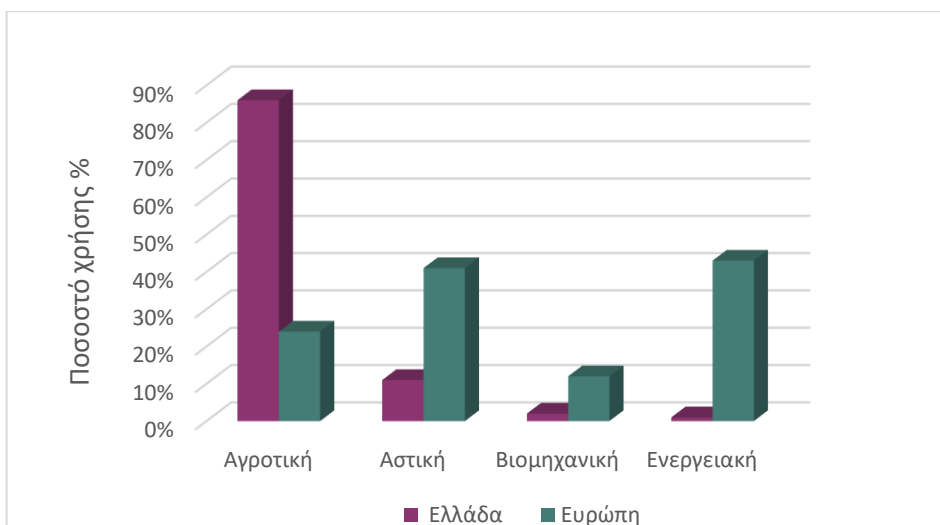
Μορφή νερού	Όγκος (σε χιλιάδες Km <sup>3</sup> )	Ποσοστό επί του συνόλου (%)	Χρόνος ανανέωσης
Ωκεανοί	1370000	97,61	3100 έτη
Πάγοι	29000	2,08	16000 έτη
Υπόγεια ύδατα	4067	0,295	300 έτη
Λίμνες (γλυκό νερό)	126	0,009	1-100 έτη
Λίμνες (αλμυρό νερό)	104	0,008	10-1000 έτη
Υγρασία εδάφους	67	0,005	280 ημέρες
Ποταμοί	1,2	0,00009	12-20 ημέρες
Ατμοί (ατμόσφαιρα)	14	0,0009	9 ημέρες

Στην Ελλάδα παρουσιάζονται αυξημένα ύψη βροχοπτώσεων σε σχέση με τις υπόλοιπες χώρες της Μεσογείου, εντούτοις η κατανομή των βροχοπτώσεων εμφανίζει χωρικές και χρονικές ιδιαιτερότητες. Το έντονο ανάγλυφο, με τις απότομες κλίσεις που την χαρακτηρίζει και ο μεγάλος αριθμός νησιών με άγονο έδαφος (μικρή ικανότητα συγκράτησης), έχει σαν αποτέλεσμα μειωμένη ικανότητα δημιουργίας μεγάλων υδατικών ταμιευτήρων. Επίσης, αποτελείται από μικρές λεκάνες απορροής, οι οποίες ορίζονται ως το τμήμα της επιφάνειας του εδάφους πάνω στο οποίο ρέουν τα επιφανειακά νερά και μέσω του υδρογραφικού δικτύου κατευθύνονται προς την κύρια. Στο Σχήμα 1.1 παρουσιάζεται η κατανομή βροχοπτώσεων στα διάφορα διαμερίσματα της χώρας σε χιλιοστόμετρα βάσει στοιχείων της Εθνικής Μετεωρολογικής Υπηρεσίας.

**Σχήμα 1.1:** Κατανομή βροχοπτώσεων ανά γεωγραφικό διαμέρισμα της χώρας (Πηγή: ΕΜΥ)

Τα 7,7 δισεκατομμύρια ανθρώπων του πλανήτη, ήδη χρησιμοποιούν το 54 % των αποθεμάτων νερού που περιέχεται στα ποτάμια, τις λίμνες και τις υπόγειες πηγές. Εάν η κατά κεφαλή κατανάλωση νερού συνεχίσει να αυξάνεται με τον ίδιο ρυθμό, μέσα στις επόμενες τρεις δεκαετίες θα έχει καταναλωθεί το 90 % των διαθέσιμων αποθεμάτων νερού, αφήνοντας μόλις το 10 % για τα υπόλοιπα είδη του πλανήτη.

Αυτή την στιγμή σε παγκόσμια βάση το 69 % των υδάτων, απορροφάται από τη γεωργία (με τη μορφή άρδευσης). Η βιομηχανία χρησιμοποιεί το 23 % ενώ η οικιακή χρήση (νοικοκυριό) το 8 %. Τα ποσοστά αυτά διαφοροποιούνται ανάλογα με τις περιοχές του πλανήτη. Στην Αφρική για παράδειγμα, η γεωργία «δεσμεύει» το 88 % της συνολικής κατανάλωσης, ενώ η οικιακή χρήση και η βιομηχανία καταναλώνει το 7 % και το 5 % αντίστοιχα. Στην Ευρώπη, το μεγαλύτερο ποσοστό νερού απορροφάται από τη βιομηχανία (54%), ενώ το μερίδιο της γεωργίας φτάνει το 33 % και της οικιακής χρήσης το 13 %. Στο Σχήμα 1.2 παρουσιάζεται η κατανομή των χρήσεων νερού στην Ελλάδα συγκριτικά με την Ευρώπη (Θεοχάρης Μ., 2013).



Σχήμα 1.2: Κατανομή χρήσεων νερού στην Ελλάδα και στην Ευρώπη (Θεοχάρης Μ., 2013)

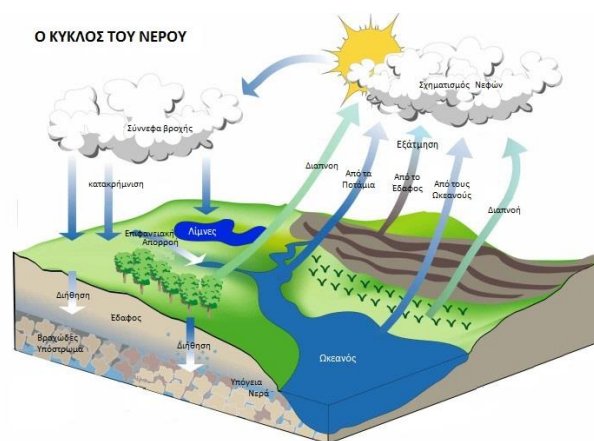
### 1.3 Υδρολογικός κύκλος

Ο υδρολογικός κύκλος του νερού αποτελεί ένα πολύπλοκο σύστημα που διατηρεί την ισορροπία μεταξύ του νερού της ατμόσφαιρας και των υπογείων και επιφανειακών υδάτων. Περιλαμβάνει τη μεταφορά νερού στις διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα με τα φυσικά τους χαρακτηριστικά όπως θάλασσες και ωκεανοί, ποταμοί και χείμαρροι, λίμνες, υγρότοποι, υδρατμοί της ατμόσφαιρας και υπόγεια ύδατα. Η αέναη κίνηση του νερού παρουσιάζεται και στο Σχήμα 1.3.



Υδρολογικός κύκλος του νερού περιλαμβάνει πολλές επί μέρους διεργασίες και εξελίσσεται με διαφορετικά χαρακτηριστικά σε κάθε περιοχή, τα οποία εξαρτώνται από την φύση του περιβάλλοντος (θάλασσα ή επιφάνεια εδάφους), τις κλιματολογικές συνθήκες και τις τοπικές γεωμορφολογικές -γεωλογικές συνθήκες που επιδρούν στην διαμόρφωση των επιφανειακών ή υπόγειων υδάτων (Καψή Μ., 2013).

Οι ανθρώπινες δραστηριότητες δύνανται να προκαλέσουν άμεσα ή έμμεσα αλλαγές στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των διεργασιών του υδρολογικού κύκλου. Για παράδειγμα η ελάττωση βλάστησης, μέσω μετατροπών υγροτόπων και δασών σε αγροτικές εκτάσεις, έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της διαπνοής. Αυτή η απώλεια των υδρατμών από τα φυτά επηρεάζει το μικροκλίμακα της περιοχής αυξάνοντας την βροχόπτωση, τη διάβρωση του εδάφους και τη μεταφορά ιζημάτων. Ένα άλλο παράδειγμα ανθρώπινης δραστηριότητα, με επιπτώσεις στον υδρολογικό κύκλο αποτελεί το φαινόμενο του θερμοκηπίου, κατά το οποίο η ποιοτική αλλοίωση της ατμόσφαιρας συμβάλλει στην αύξηση βροχοπτώσεων υψηλής έντασης σε ορισμένες περιοχές, και αύξηση περιόδων ανομβρίας σε άλλες.



Σχήμα 1.3: Υδρολογικός κύκλος

#### 1.4 Έδαφος και εδαφικά συστατικά

Ο όρος «έδαφος», είναι ένας γενικός όρος, που αναφέρεται στο βιολογικά ενεργό (ανόργανο και οργανικό) υλικό, το οποίο καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της ξηράς. Η κατανομή των σωματιδίων του εδάφους πραγματοποιείται με βάση τη διάμετρο τους. Έτσι τα σωματίδια του εδάφους που έχουν μέγεθος μικρότερο των δύο νανομέτρων, χαρακτηρίζονται ως λεπτόκοκκο κλάσμα και είναι υπεύθυνο κυρίως για τις χημικές ιδιότητες των περισσότερων εδαφών λόγω της μεγάλης επιφάνειας που παρουσιάζουν.

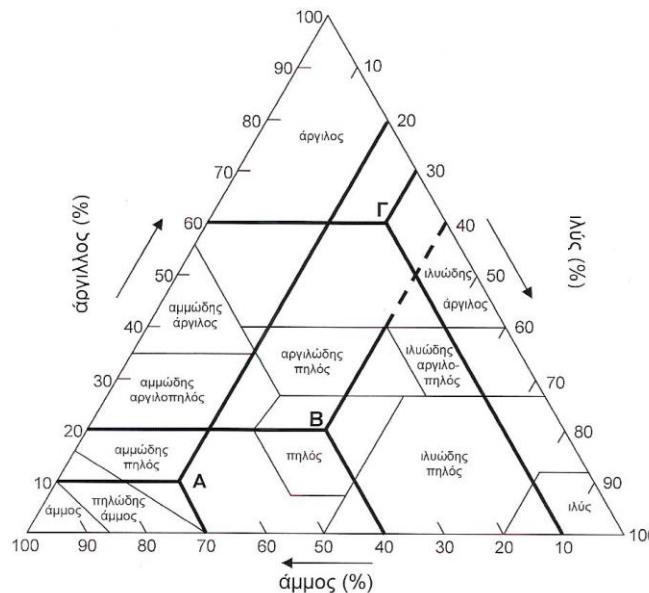
Το λεπτόκοκκο κλάσμα, διαιρείται περαιτέρω στις εξής κατηγορίες μεγέθους: (α) άμμος (sand) με διάμετρο 2mm- 50μm, (β) ιλύς (slit) με διάμετρο 50μm- 2μm, (γ) άργιλος

(clay) με διάμετρο μικρότερη από 2 μm. Τέλος τα σωματίδια με μέγεθος μικρότερα από 5μm ονομάζονται κολλοειδή σωματίδια και τα συνηθέστερα κολλοειδή είναι τα ορυκτά της αργίλου και οι χουμικές ουσίες.

Η υφή του εδάφους, καθορίζεται από τα περιεχόμενα ποσοστά άμμου, ιλύος και αργίλου. Μικρό ποσοστό των εδαφών αποτελούνται από ορυκτά ενός αποκλειστικά ενός κλάσματος μεγέθους, αν και κάποια εδάφη είναι σχεδόν 100 % άμμος ή 100 % άργιλος.

Για την ταξινόμηση του εδάφους με βάση την υφή του, χρησιμοποιείται συνήθως το τριγωνικό διάγραμμα υφής του USDA (Σχήμα 1.4). Κάθε γωνία του διαγράμματος αντιπροσωπεύει το 100 % ενός κλάσματος μεγέθους (άμμος, ιλύς ή άργιλος). Εντός του τριγώνου βρίσκονται περιοχές που αντιπροσωπεύουν τους επιτρεπτούς συνδυασμούς των τριών κλασμάτων μεγέθους για κάθε τάξη υφής. Για να καθοριστεί η υφή ενός εδάφους αρκεί να προσδιοριστεί το ποσοστό της άμμου, της ιλύος και της αργίλου μέσω του τριγωνικού διαγράμματος (Βούτσινος, 1998).

Οι όροι πηλός (loam) και άργιλος (clay) συχνά συγχέονται. Ένα έδαφος που χαρακτηρίζεται ως πηλός (B) μπορεί να περιέχει ποσοστό αργίλου από 7 % έως 27 %, ποσοστό ιλύος από 28 % έως 50 % και άμμου από 23 % έως 52 %. Ένα έδαφος για να χαρακτηριστεί ως άργιλος (Γ) πρέπει να έχει τουλάχιστον 40 % άργιλο και μπορεί να περιέχει μέχρι 40 % ιλύς ή 45 % άμμο.



**Σχήμα 1.4:** Πρότυπο τριγωνικό διάγραμμα υφής του εδάφους σύμφωνα με το USDA

(Πηγή: *Natural Resources Conservation Service Soils*)

### 1.5 Πηγές ρύπανσης και οργανικοί ρύποι στο υδάτινο περιβάλλον

Οι ρύποι είναι χημικές ουσίες που μπορούν να δράσουν βλαπτικά στο περιβάλλον και στους έμβιους οργανισμούς. Όταν ένα ρύπος έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει σοβαρή βλάβη ή ακόμα και θάνατο σε ανθρώπους ή ζώα χαρακτηρίζεται σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία ως τοξικός (Ν. 3199/2003-ΦΕΚ Α' 280/9.12.2003). Η άμεση ή έμμεση εισαγωγή ρύπων στο περιβάλλον (αέρα, νερό, έδαφος), σύμφωνα με την οδηγία 2000/60/ΕΚ δύναται να προκαλέσει έκλυση θερμότητας επιζήμια για την υγεία του ανθρώπου ή την ποιότητα οικοσυστημάτων (υδατικών και των χερσαίων), φθορά υλικής ιδιοκτησίας, ή μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς τις λειτουργίες αναψυχής και τις λοιπές νόμιμες χρήσεις του περιβάλλοντος (European Commission, 2000/60/ΕΚ).

Τα περισσότερα προβλήματα ρύπανσης στο θαλάσσιο περιβάλλον σχετίζονται με την βιομηχανική και αστική ρύπανση, τις ναυτιλιακές δραστηριότητες (κίνηση πλοίων, λειτουργία λιμένων) και την χρήση του πετρελαίου και της πυρηνικής ενέργειας.

Οι ανθρωπογενείς δραστηριότητες επιβαρύνουν τους θάλασσες ως τελικό αποδέκτη, με ένα τεράστιο αριθμό χημικών ουσιών, θρεπτικά συστατικά (ενώσεις αζώτου-φωσφόρου) και βαρέα μέταλλα (υδράργυρος, μόλυβδος, χαλκός, κάδμιο, ψευδάργυρος κ.α.).

Η ρύπανση από τις αγροτικές δραστηριότητες παίζει πρωταρχικό ρόλο στη ρύπανση των θαλασσών τόσο με την επιφανειακή έκπλυση του εδάφους όσο και με την υπεράντληση των υδάτων (Starling et al., 2019). Συγκεκριμένα, έχει επιφέρει σε ορισμένες περιοχές εξάντληση των υπογείων ταμιευτήρων, οδηγώντας σε ελλειμματικό ισοζύγιο με αποτέλεσμα την διεύδυση της θάλασσας και την υφαλμύρωση των νερών. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται και σε σημεία δειγματοληψίας της παρούσας Διατριβής.

Μία άλλη σημαντική πηγή ρύπανσης των θαλασσών αποτελούν οι υδατοκαλλιέργειες, που εφοδιάζουν το υδάτινο περιβάλλον με μεγάλες ποσότητες οργανικών ενώσεων.

Σύμφωνα με παγκόσμια δεδομένα, 6.300.000 χημικές ουσίες είναι αυτή την στιγμή σε χρήση παγκοσμίως με τις 3000 από αυτές να αποτελούν το 90% της παγκόσμιας παραγωγής, ενώ περίπου 1000 νέες συνθετικές ουσίες προστίθενται κάθε χρόνο στην παγκόσμια αγορά. Οι χημικές ουσίες αυτές έχουν την τάση να συσσωρεύονται στο λιπαρό ιστό των θαλάσσιων και των χερσαίων οργανισμών, προκαλώντας ορμονικές δυσλειτουργίες, υπογονιμότητα, ανάπτυξη νεοπλασιών, και καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Με την είσοδό τους στα υδάτινα οικοσυστήματα οι ρύποι μεταφέρονται μέσω των ρευμάτων σε μεγάλες αποστάσεις και αποτίθενται ακόμα και στις παγωμένες περιοχές του πλανήτη (Balmer et al., 2019). Επιπρόσθετα, οι ρύποι που βρίσκονται προσκολλημένοι σε φερτά υλικά καθιζάνουν σταδιακά στον πυθμένα και μέσω της τροφής μπορούν να καταλήξουν στα ανώτερα τροφικά

επίπεδα και τελικά στον άνθρωπο (Balmer et al., 2019; Brumovský et al., 2017 και Vlastos et al., 2016).

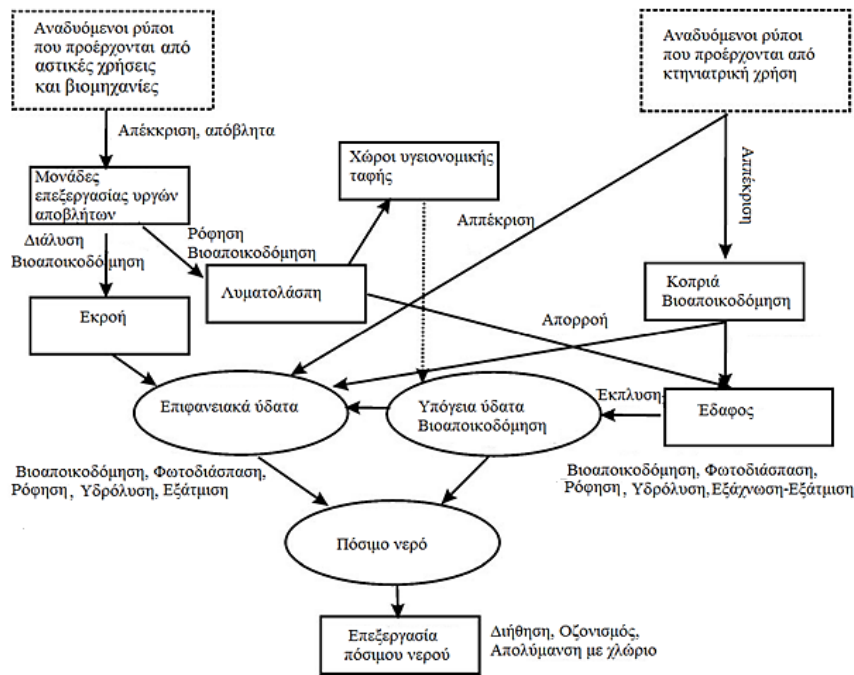
Παρόλο που οι παράκτιες περιοχές δέχονται σοβαρές περιβαλλοντικές πιέσεις μιας και αποτελούν τον τελικό αποδέκτη όλων των προϊόντων της ανθρώπινης δραστηριότητας, ελάχιστες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε σχέση με τα οικοσυστήματα γλυκού νερού (Brumovský et al., 2017). Από όλα τα παραπάνω, είναι εμφανές ότι για να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με την ποιότητα ενός υδάτινου οικοσυστήματος, εκτός από την ανάλυση υδάτων είναι αναγκαία η μελέτη τόσο των έμβιων οργανισμών όσο και του ιζήματος, γεγονός που επιχειρείται στην παρούσα Διατριβή με την μελέτη έξι διαφορετικών υποστρωμάτων σε περιοχές με έντονη γεωργική και υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα.

### 1.6 Αναδυόμενοι ρύποι

Ως «αναδυόμενοι ρύποι» ορίζονται οι χημικές ουσίες που εντοπίζονται συχνά τα τελευταία χρόνια στο περιβάλλον και δεν περιλαμβάνονται στους ήδη υπάρχοντες κανονισμούς της ποιότητας των υδάτων. Η επίδραση τους στο περιβάλλον δεν έχει προηγουμένως μελετηθεί και έχουν αρνητικές επιδράσεις στα έμβια όντα και στην ανθρώπινη υγεία (Brumovský et al., 2017; Kim et al., 2017 και Richardson and Ternes, 2018).

Αυτή η αρκετά διευρυμένη κατηγορία περιλαμβάνει πολυάριθμες υποκατηγορίες ουσιών και μεταβολιτών όπως φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις, κτηνιατρικά φάρμακα, διοξίνες, πλαστικοποιητές, γαλακτωματοποιητές, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, προϊόντα προσωπικής φροντίδας (Personal care products, PCPs), πρόσθετα τροφίμων, συστατικά χρωμάτων, λιπαντικά, καθαριστικά και απορρυπαντικά, επιβραδυντές φλόγας, εκρηκτικά κ.α. (León et al., 2019 και Starling et al., 2019).

Μετά την είσοδο τους στο περιβάλλον, οι οργανικοί ρύποι υπόκεινται σε μία σειρά διεργασιών όπως μετασχηματισμού-αποδόμησης, δέσμευσης και μεταφοράς που σχετίζονται άμεσα με τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων (τάση ατμών, διαλυτότητα στο νερό, πολικότητα κ.α.) (Balmer et al., 2019 και Pérez-Fernández et al., 2017). Ενδεικτικές κατηγορίες των αναδυόμενων ρύπων και οι διεργασίες μεταφοράς τους στο υδάτινο περιβάλλον αναπαρίστανται γραφικά στο Σχήμα 1.5 (Αντωνοπούλου, 2013).



Σχήμα 1.5: Διεργασίες μεταφοράς οργανικών ρύπων στο υδάτινο περιβάλλον

(Πηγή: Αντωνοπούλου, 2013)

Τις τελευταίες δεκαετίες τόσο σε ευρωπαϊκό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, παρατηρείται μία τάση θέσπισης ολοένα και αυστηρότερων νόμων και διατάξεων που αφορούν τη διαχείριση των υδάτων. Το 2000 η Ευρωπαϊκή ένωση αναγνωρίζοντας την σπουδαιότητα του νερού ως αγαθό υψίστης σημασίας για την διατήρηση της ανθρώπινης ζωής και των οικοσυστημάτων, θέσπισε την οδηγία πλαίσιο για τα νερά 2000/60/ΕΚ η οποία αποτελεί μία ολιστική και συνάμα καινοτόμο προσπάθεια διαχείρισης υδάτινων πόρων.

Έκτοτε, καθιερώθηκαν και εφαρμόζονται πλέον κοινές αρχές και κοινοί στόχοι για όλα τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με κοινή συνισταμένη τη σταδιακή επίτευξη και διατήρηση της "καλής κατάστασης" (οικολογικής και χημικής) όλων των υδάτων. Προοίμιο της τελικής κατάταξης των υδάτων, αποτελεί ο εντοπισμός των πηγών ρύπανσης και η αξιολόγηση των επιπτώσεών τους στα υδάτινα σώματα, με στόχο τον προσδιορισμό των υδάτων που ενδέχεται να μην επιτύχουν τους περιβαλλοντικούς στόχους.

Σε εθνικό επίπεδο, το 2003 εκδόθηκε ο Νόμος 3199, για την εναρμόνιση με την Κοινοτική Οδηγία, και αναφέρεται στην θέσπιση και διοικητική οργάνωση φορέων διαχείρισης υδάτων. Η συμμόρφωση με τις διατάξεις της Οδηγίας 2000/60/ΕΚ πραγματοποιήθηκε λίγα χρόνια αργότερα το 2007, με την έκδοση του Προεδρικού Διατάγματος 51/2007 το οποίο θεσπίζει μέτρα και διαδικασίες ολοκληρωμένης προστασίας και διαχείρισης των υδάτων (European Commission, 2000/60/EC).

Όσον αφορά την θάλασσα, η οδηγία 2008/56/ΕΚ, γνωστή ως «οδηγία για τη θαλάσσια στρατηγική» (Marine Strategy Framework Directive, MSFD) καθορίζει τη λίστα που περιλαμβάνει ενώσεις που αποτελούν ρύπους προτεραιότητας ή υπό παρακολούθηση, για την εκτίμηση της κατάστασης και της ποιότητας των υδάτων που εκτείνονται σε απόσταση έως και 12 ναυτικά μίλια μακριά από την πλησιέστερη ακτογραμμή (European Commission, 2008/56/ΕΚ).

## **B. Υδατοκαλλιέργειες**

### **1.7 Ταξινόμηση υδατοκαλλιέργειας**

Η οδηγία 2006/88/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης ορίζει ως «υδατοκαλλιέργεια» την εκτροφή ή καλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών χρησιμοποιώντας τεχνικές σχεδιασμένες για την αύξηση της παραγωγής των οργανισμών αυτών περισσότερο από τη φυσική ικανότητα του περιβάλλοντος (European Commission, 2006/88/EC).

Σκοπός είναι η παραγωγή αλιευμάτων υψηλής θρεπτικής αξίας προς κατανάλωση από τον άνθρωπο, η παραγωγή υδρόβιων οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως τροφή για καλλιεργούμενα είδη, παραγωγή διατροφικών και φαρμακευτικών προϊόντων, ή προϊόντων βιοτεχνολογίας. Πιο σπάνια η υδατοκαλλιέργεια στοχεύει στην παραγωγή καλλωπιστικών ειδών και στην παραγωγή γόνου (αβγά, προνύμφες, νεαρά άτομα) με σκοπό τον εμπλουτισμό των φυσικών αποθεμάτων. Η παραγωγή υδρόβιων ειδών, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα, διακρίνεται σε εκτατικό, ημι-εντατικό και εντατικό τύπο καλλιέργειας (Καραμανλής Ξ., 2018).

Στον εκτατικό τύπο οι οργανισμοί καλλιεργούνται σε φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα (π.χ. μικρές λίμνες ή λιμνοθάλασσες) και εξαρτώνται σχεδόν αποκλειστικά από τροφή που υπάρχει στο φυσικό περιβάλλον με ελάχιστη ανθρώπινη παρέμβαση, όπως η καλλιέργεια μαλακίων με απλή απελευθέρωση πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων στον θαλάσσιο πυθμένα.

Στον ημιεντατικό τύπο η παραγωγή γίνεται σε φυσικές υδατοσυλλογές, με ανθρώπινη παρέμβαση που συνίσταται στην προσθήκη οργανικής ύλης για αύξηση της παραγωγικότητας και ενίσχυση της τροφικής αλυσίδας.

Στον εντατικό τύπο τα επίπεδα της ανθρώπινης συμβολής και ελέγχου είναι τα μέγιστα. Πραγματοποιείται εκτεταμένη χρήση ιχθυοτροφών που μπορεί επιπλέον να συνοδεύεται κι από χορήγηση βιταμινών, ιχνοστοιχείων και αντιβιοτικών.

Μια άλλη ταξινόμηση των υδατοκαλλιεργειών αφορά το στάδιο ζωής των ειδών που καλλιεργούνται και διακρίνεται σε εκκολαπτήρια (χώροι τεχνητής αναπαραγωγής και εκκόλαψης των αυγών), μονάδες προπάχυνσης (χώροι εκτροφής, προνύμφες), μονάδες πάχυνσης (αύξηση των ενήλικων υδρόβιων οργανισμών) και τέλος οι μονάδες πλήρους παραγωγής που μπορούν να καλύψουν όλα τα στάδια παραγωγής.

### **1.8 Παραγωγή και στατιστικά δεδομένα στην Ελλάδα**

Η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους του πρωτογενούς τομέα ζωικής παραγωγής που παρουσιάζει μεγάλο

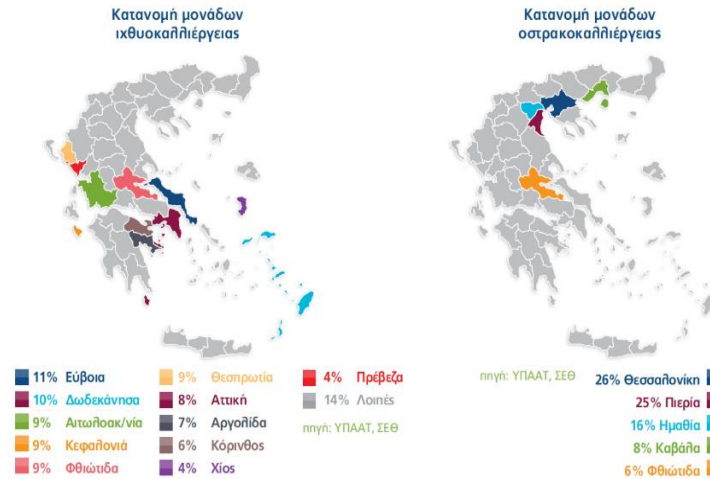
ενδιαφέρον λόγω της συμβολής της στην οικονομική ανάπτυξη και την κοινωνική συνοχή της χώρας. Σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία ο συνολικός αριθμός μονάδων υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα εκτιμάται σε 1.097 εκ των οποίων το 85% βρίσκονται σε θαλάσσια ύδατα (911 μονάδες για παραγωγή ψαριών και μυδιών), το υπόλοιπο 8% αφορά εκτροφές σε εσωτερικά ύδατα (χερσαίες εγκαταστάσεις) και το 7% εκτροφές σε υφάλμυρα νερά (λιμνοθάλασσες) σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) (FAO 2016, ΣΕΘ 2018). Στην Ελλάδα, εκτρέφονται κυρίως ψάρια και όστρακα. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται οι περιοχές με την εντονότερη δραστηριότητα στην Ελλάδα.

**Πίνακας 1.2:** Αριθμός μονάδων και έκταση ανά περιοχές (Πηγή: ΣΕΘ, 2018)

Γεωγραφική περιοχή	Αριθμός μονάδων	Έκταση (στρέμματα)
Αιγαίου	58	1.135
Αττικής	27	486
Ηπείρου- Δυτικής Μακεδονίας	41	753
Θεσσαλίας- Στερ. Ελλάδα	83	2.037
Κρήτης	4	75
Μακεδονία- Θράκης	6	112
Πελοπ/σου- Δυτικής Ελλάδας & Ιονίου	117	2.938
<b>Γενικό άθροισμα</b>	<b>336</b>	<b>7.535</b>

Η παραγωγή στην Ελλάδα έχει ξεπεράσει τους 70-80 χιλιάδες τόνους κατατάσσοντάς την σε έναν από τους μεγαλύτερους παραγωγούς στην Ε.Ε.. Τα κύρια είδη ψαριών που εκτρέφονται είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και αποτελούν περίπου το 98% του συνόλου των πωλήσεων (52% της παραγωγής της τσιπούρας και 46% της παραγωγής του λαυρακιού) (FAO, 2016). Σε πολύ μικρότερη κλίμακα, περίπου 2%, εκτρέφονται άλλα μεσογειακά είδη όπως μυτάκι (*Diplodus puntazzo*), φαγκρί (*Pagrus pagrus*), λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), κρانيός (*Argyrosomus Regius*) και συναγρίδα (*Dentex dentex*) ενώ στις οστρακοκαλλιέργειες, εκτρέφονται κυρίως μύδια. Στο Σχήμα 1.6 παρουσιάζεται η γεωγραφική κατανομή μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας και οστρακοκαλλιέργειας σε εθνικό επίπεδο.

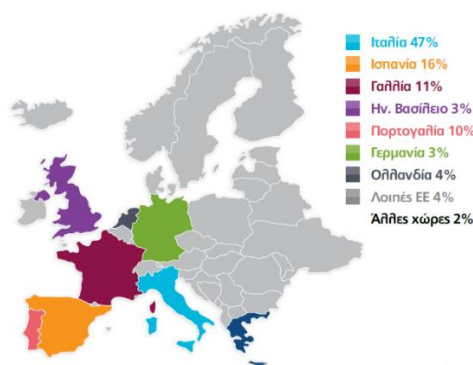




Σχήμα 1.6: Γεωγραφική κατανομή μονάδων υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα (Πηγή: ΣΕΘ, 2018)

### 1.9 Παραγωγή και στατιστικά δεδομένα στην Ευρώπη

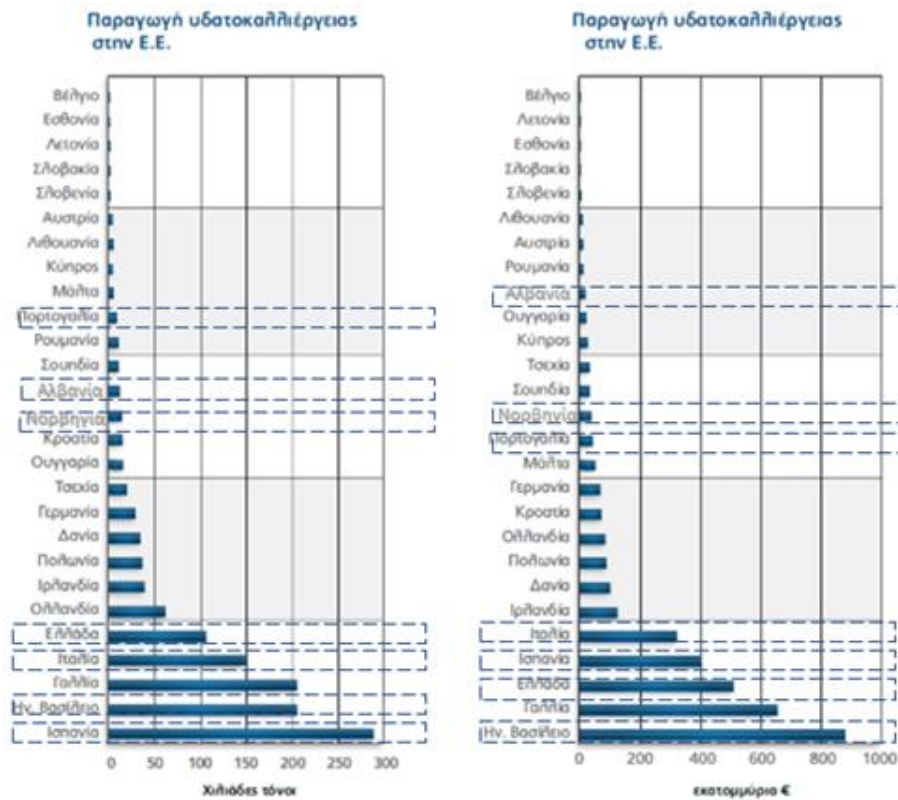
Η ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια χαρακτηρίζεται από έντονη εξωστρέφεια αφού διαχρονικά περίπου το 78% της παραγωγής εξάγεται και το υπόλοιπο 22% διατίθεται στην εγχώρια αγορά, το μέγεθος της οποίας κυμαίνεται μεταξύ 21.000 –23.000 τόνων. Σύμφωνα με τα στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ, το 2016 η τσιπούρα και το λαβράκι εξήχθησαν σε 32 χώρες εντός και εκτός της Ε.Ε (περίπου 82.000 τόνοι ψαριών). Όσον αφορά στην κατανομή των εξαγωγών το 98% πωλήθηκε σε χώρες της Ευρώπης με κυριότερες αγορές της ιχθυοκαλλιέργειας στην Ε.Ε. όπως (η Ιταλία, η Ισπανία και η Γαλλία) και το 2% στη Β. Αμερική και σε τρίτες χώρες (Σχήμα 1.7).



Σχήμα 1.7: Κατανομή εξαγωγών στην Ευρώπη (Πηγή: ΣΕΘ, 2017)

Οι ευρωπαϊκές υδατοκαλλιέργειες εξακολουθούν να εμφανίζουν εντυπωσιακούς ρυθμούς ανάπτυξης, τόσο ως προς τον όγκο παραγωγής όσο και ως προς την αξία (FAO, 2016). Στο Σχήμα 1.8 αποτυπώνεται η συνολική ετήσια παραγωγή ιχθυοκαλλιεργειών στις

χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ παράλληλα επισημαίνονται οι Ευρωπαϊκές χώρες από τις οποίες όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν δείγματα νερού, ιζήματος και θαλάσσιων οργανισμών (μύδια, ψάρια και αχινοί) και στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής.



**Σχήμα 1.8:** Ετήσια παραγωγή Ευρωπαϊκών υδατοκαλλιέργειών σε τόνους και σε αξία (Πηγή: ΣΕΘ, 2017)

### 1.10 Επίδραση υδατοκαλλιέργειών στο περιβάλλον

Η ποιότητα των νερών αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα που καθορίζει την καταλληλότητα ενός υδάτινου περιβάλλοντος για την εγκατάσταση μίας υδατοκαλλιέργειας. Παρόλα αυτά, η ίδια η υδατοκαλλιέργεια επιδρά σημαντικά στο υδάτινο περιβάλλον όπου δραστηριοποιείται καθώς ως ανοικτά υποσυστήματα, οι ιχθυοκαλλιέργειες δέχονται εισροές και παράγουν εκροές. Στις εισροές περιλαμβάνονται: το νερό, η τροφή (φυσική, ή χορηγούμενη), τα υλικά κατασκευής του συστήματος εκτροφής, και οι καλλιεργούμενοι οργανισμοί στα διάφορα στάδια ανάπτυξής τους.

Στις εκροές τους περιλαμβάνονται, τα εμπορεύσιμα καλλιεργούμενα είδη, αλλά και απόβλητα όπως νεκρά ψάρια, κόπρανα, ούρα, προϊόντα μεταβολισμού (CO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>), υπολείμματα της χορηγούμενης τροφής, μικροοργανισμοί, παράσιτα και χημικές ουσίες

όπως υπολείμματα των δραστικών παρασιτοκτόνων, βιοκτόνων, φυτοφαρμάκων και φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των ψαριών (Ziarrusta et al., 2015).

Μετά την χρήση τους, οι ουσίες αυτές απελευθερώνονται στο υδάτινο περιβάλλον και επιδρούν στους οργανισμούς μη-στόχους όπως άλλα είδη ελεύθερων ψαριών, βενθικούς οργανισμούς και μικροοργανισμούς. Εκτός από την επιβάρυνση των οργανισμών μη-στόχων, οι ουσίες αυτές καθορίζουν τη χημεία του ιζήματος και τέλος βοηθούν στην ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής απέναντι στις δραστικές φαρμακευτικές ουσίες.

Σε αντίθεση με τις ιχθυοκαλλιέργειες, οι οστρακοκαλλιέργειες διαφοροποιούνται, ως προς τις εισροές τους καθώς δεν χορηγείται πρόσθετη τροφή και ως προς τις εκροές τους καθώς δεν χρησιμοποιούνται φαρμακευτικές αγωγές ή άλλες χημικές ουσίες.

Με στόχο την προστασία του περιβάλλοντος από τη χρήση δραστικών χημικών ουσιών, στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA), προχώρησε μετά το 2000 στην έκδοση δύο Κατευθυντηρίων Οδηγιών CVMP/VICH Topic GL6 (Ecotoxicity Phase I) και CVMP/VICH Topic GL38 (Phase II). Η Εκτίμηση των Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων κατά τη Φάση I στοχεύει στον υπολογισμό της ποσότητας των δραστικών ουσιών που θα απελευθερωθούν στο υδάτινο περιβάλλον. Ως όριο της εισαγόμενης στο υδάτινο περιβάλλον συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών (Environmental Introduction Concentration, EIC aquatic), για την αποδοχή έλλειψης κινδύνου για το περιβάλλον, ορίζεται το  $1\mu\text{g L}^{-1}$  (Καραμανλής Ξ., 2018).

Η αξιολόγηση των σκευασμάτων κατά την διαδικασία της φάσης II, στηρίζεται στη μέθοδο του πηλίκου (Risk Quotient, RQ) που ορίζεται ως ο λόγος της μέγιστης συγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο δείγμα (Measured Environmental Concentration, MEC) προς την ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση που είναι ικανή να προκαλέσει τοξικό αποτέλεσμα σε μία συγκεκριμένη ταξινομητική μονάδα (Predicted no-effect concentration).

Σύμφωνα με την διαδικασία (Phase II) είναι απαραίτητο να δηλώνονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των δραστικών ουσιών του σκευάσματος (διαλυτότητα στο νερό, σταθερά διάστασης ( $pK_a$ ), ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/ νερού ( $\log K_{ow}$ ), η απορρόφηση/απομάκρυνση από το έδαφος ( $K_d/K_{oc}$ ), η βιοαποδόμηση στο νερό, η φωτόλυση, και η υδρόλυση, η οξεία τοξική δράση (μαλάκια, όστρακα, ψάρια) καθώς επίσης η επίδραση που μπορεί να έχουν οι δραστικές ενώσεις σε οργανισμούς μη-στόχους της θεραπευτικής αγωγής.

### 1.11 Χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο θαλάσσιο περιβάλλον

Οι υδατοκαλλιέργειες δύνανται να αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες ρύπανσης των παράκτιων οικοσυστημάτων, εισάγοντας σε αυτό οργανικούς ρύπους είτε άμεσα με την χρήση σκευασμάτων, είτε έμμεσα, μέσω των συστατικών που εμπεριέχονται στις ιχθυοτροφές (46-51% πρωτεΐνες, 18% υδατάνθρακες, 14% λιπίδια και 17% βιταμίνες, χρωστικές, παρασιτοκτόνα). Η εκτεταμένη χρήση των φυτοφαρμάκων πέρα από τις οικοτοξικολογικές επιπτώσεις στη χλωρίδα εγκυμονεί κινδύνους στην ανάπτυξη των ψαριών καθώς τα φυτοφάρμακα μπορούν να δράσουν ως ενδοκρινικοί διαταράχτες επηρεάζοντας την αναπαραγωγή των ψαριών (μεταλλάξεις) (Ismail et al., 2017 και Starling et al., 2019).

Ένα τρόφιμο στο οποίο έχουν επέλθει μεταβολές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, καθίσταται αφενός ακατάλληλο για κατανάλωση και αφετέρου πιθανόν επικίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή αφού μπορεί να προκληθούν αλλεργικές αντιδράσεις και αλλαγές στην εντερική χλωρίδα του ανθρώπου (Kim et al., 2017).

Η συγκέντρωση μεγάλου αριθμού οργανισμών στα περιορισμένα όρια των κλωβών εκτροφής και οι μεταβολές της ποιότητας των νερών, κάτω από την επίδραση της λειτουργίας της ίδιας της καλλιέργειας, αναπτύσσουν περιβαλλοντικά νοσήματα, τα οποία εμφανίζονται στα καλλιεργούμενα είδη μεταφέρονται μέσω των αποβλήτων τους και του νερού και στα ενδημικά ελεύθερα ψάρια, παρουσιάζοντας τοξική δράση ακόμα και σε μικρή συγκέντρωση.

Κύριες αιτίες χρήσης φυτοφαρμάκων στις μονάδες ιχθυοπαραγωγής αποτελούν η ανάπτυξη παρασίτων (π.χ η θαλάσσια ψείρα), οι επικαθίσεις, η αύξηση των πλαγκτονικών οργανισμών και τέλος η ανάπτυξη μυκοτοξινών (η αφλατοξίνη και η ωχρατοξίνη Α), που αποτελεί τη μεγαλύτερη ανησυχία στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας βάσει της τοξικότητάς τους (Gonçalves et al., 2018).

#### 1.11.1 Μυκητοκτόνα

Τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται κυρίως ως πρόσθετα στα αποθέματα ιχθυοτροφών που περιέχουν υψηλές ποσότητες ιχθυάλευρων, με σκοπό την αποφυγή ανάπτυξης μυκοτοξινών (μούχλας) από τοξικά σπόρια, κατά την έκθεση της τροφή σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Με αυτόν τον τρόπο, τα μυκητοκτόνα μπορούν να περάσουν μέσω της τροφικής αλυσίδας στα ψάρια και να καταλήξουν στο θαλάσσιο περιβάλλον.

Η μείωση των φυσικών ιχθυοαποθεμάτων, από τα οποία παράγονται ιχθυάλευρα, οδήγησε στην ανάγκη εύρεσης εναλλακτικών πηγών πρωτεΐνης όπως τα δημητριακά. Συχνά όμως αυτές οι φυτικές πηγές, τείνουν να έχουν υψηλές συγκεντρώσεις μυκητοκτόνων

προκειμένου να καταπολεμηθούν μύκητες που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της άλεσης και κάτω από ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης (Χατζηχρήστου Ε., 2016).

Συγκεκριμένα τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται για να καταστείλουν την δράση των κοινών μυκοτοξινών όπως οι αφλατοξίνες, φουμονισίνες (FUM), η ζεαραλενόνη (ZEA), τριχοθηκίνες (τοξίνη T-2), δεοξυνιβαλενόλη (DON), ωχρατοξίνες, και η πατουλίνη. Η παρουσία των παραπάνω στις ιχθυοτροφές, μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες στα εκτρεφόμενα είδη όπως μειωμένη πρόσληψη τροφής, μειωμένους ρυθμούς ανάπτυξης, μείωση της απόδοσης, δυσλειτουργία των οργάνων, και αύξηση γλυκογόνου στο ήπαρ (Gonçalves et al., 2018).

### 1.11.2 Παρασιτοκτόνα

Από τα κυρίαρχα προβλήματα των εκτροφών σολομού και λαβρακιού είναι η ανάπτυξη του παρασίτου της θαλάσσιας ψείρας (Sea lice) η οποία μεταφέρεται στους ελεύθερους πληθυσμούς πρωτοζώων. Η θαλάσσια ψείρα είναι το πιο συχνό και οικονομικά σημαντικό παράσιτο για αυτό ένα μεγάλο εύρος παρασιτοκτόνων χρησιμοποιείται για τον έλεγχό της. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα παρασιτοκτόνα είναι τα Dichlorvos, Azamethipros, Deltamethrin, Teflubenzuron και Diflubenzuron (Urbina et al., 2019). Η χρήση παρασιτοκτόνων που χορηγούνται είτε με την τροφή είτε με τη χρήση σάκων θεραπείας στις εκτροφές, έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη αντοχής των μικροβίων απέναντι στην δραστική ουσία του σκευάσματος που σε πολλές περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα τοξική για την υδρόβια χλωρίδα και πανίδα (Taiwo, 2019).

### 1.11.3 Βιοκτόνα

Τα βιοκτόνα είναι χημικές ουσίες που αναστέλλουν την δράση ή θανατώνουν μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, σκώληκες και αρθρόποδα) και την ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών στις εγκαταστάσεις των μονάδων.

Στις μονάδες οστρακοκαλλιέργειας η επίδραση αυτών των επικαθίσεων είναι άμεση επάνω στους καλλιεργούμενους οργανισμούς με αποτέλεσμα την καταστροφή των οστράκων, τη διακοπή ή τον περιορισμό της φυσιολογικής τους λειτουργίας, την επίδραση στη διατροφή τους και στο αναπνευστικό τους και τέλος στην ανάπτυξη ανταγωνιστικών δράσεων και τη μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών του υδάτινου οικοσυστήματος.

Αντίθετα, η επικαθιση και η ανάπτυξη αυτών των οργανισμών στις επιφάνειες των εγκαταστάσεων των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας προκαλεί διάβρωση των επιφανειών (εξαιτίας των εκκρίσεων από τους οργανισμούς), αύξηση βάρους των εγκαταστάσεων,

μείωση της ροής του ύδατος εντός των ιχθυοκλωβών με αποτέλεσμα την μείωση της ανανέωσης του νερού εντός του κλωβού.

Βιοκτόνα επίσης χρησιμοποιούνται και ως πρόσθετα σε υφαλοχρώματα, προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι επικαθίσεις που αναπτύσσονται στα ύφαλα των σκαφών, με αρνητικές επιπτώσεις τόσο στην επιφάνεια των σκαφών (διάβρωση), όσο και στην υδροδυναμική συμπεριφοράς τους.

Λόγω της μεγάλης τοξικότητας στους θαλάσσιους οργανισμούς και στον άνθρωπο των τοξικών συμβατικών υφαλοχρωμάτων TBT (TriButylTin), των οργανοκασσιτερικών ενώσεων και των παραγώγων τους, παρατηρείται μία τάση αντικατάστασή τους από προϊόντα που αποκαλούνται υφαλοχρώματα «νέας γενιάς», όπως τα Irgarol 1051, Sea-Nine 211, και Chlorothalonil, αρετά από τα οποία χρησιμοποιούνται και στην Ελλάδα (Albanis et al., 2002; Amara et al., 2018; Gadelha et al., 2019; Konstantinou and Albanis, 2004a και Muñoz et al., 2010).

#### 1.11.4 Ζιζανιοκτόνα

Οι ιχθυοτροφικές μονάδες (κλωβοί) που βρίσκονται σε κλειστές περιοχές, με τις απώλειες της τροφής, τα περιττώματα και τη χρήση χημικών ουσιών, είναι δυνατόν να προκαλέσουν τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό πλαγκτονικών οργανισμών (bloom) και κυρίως των αυτότροφων (Sun et al., 2018 και Zohdi and Abbaspour, 2019). Οι οργανισμοί αυτοί προκαλούν σημαντική μείωση των αζωτούχων και φωσφορικών θρεπτικών αλάτων, και του διαλυμένου οξυγόνου. Το τελευταίο, θα πρέπει να αναπληρωθεί με τεχνητά μέσα για τη διαβίωση των εκτρεφόμενων ειδών έτσι ώστε να μην παραχθούν τοξίνες, οι οποίες συντελούν στο μαζικό θάνατο των εκτρεφόμενων ειδών. Η χρήση ζιζανιοκτόνου στοχεύει στην αναστολή της παραγωγής χλωροφύλλης από τους υδρόβιους οργανισμούς και επομένως στην καταστροφή των φυτικών οργανισμών (Zohdi and Abbaspour, 2019).

Αρκετές από τις χημικές ουσίες που αναφέρθηκαν σε αυτήν την παράγραφο, λόγω του ευρέως φάσματος δράσης που παρουσιάζουν, χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια στη γεωργία.

Η εισαγωγή των φυτοφαρμάκων στα θαλάσσια οικοσυστήματα είτε με την άμεση εφαρμογή στις ιχθυοκαλλιέργειες, είτε με την έμμεση (επιφανειακές εκπλύσεις), συνδέεται με φαινόμενα όπως ο ευτροφισμός και η αλλοίωση της γεωμορφολογίας του πυθμένα (Sun et al., 2018). Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις μελετώνται εκτενώς στο κεφάλαιο δύο, καθώς αποτελούν την υπό μελέτη κατηγορία αναλυτών την παρούσας Διατριβής.



### 1.12 Υδρολογικά χαρακτηριστικά και χρόνος παραμονής ρύπων

Στους σχετικά περιορισμένους χώρους, όπου δραστηριοποιείται η παραγωγική διαδικασία των υδατοκαλλιεργειών, όπως είναι οι λίμνες, οι κλειστοί κόλποι, αλλά και οι λεκάνες (φυσικές ή τεχνητές) καθώς και οι δεξαμενές, ο χρόνος ανανέωσης του νερού είναι σημαντικός παράγοντας της αειφόρου λειτουργίας τους. Τα υδρολογικά χαρακτηριστικά των υδάτινων οικοσυστημάτων επηρεάζουν τον χρόνο παραμονής των ανεπιθύμητων οργανικών ρύπων.

Ένα από τα κύρια υδρολογικά χαρακτηριστικά που εκτιμώνται είναι το βάθος του υδάτινου οικοσυστήματος. Στην περίπτωση των πλωτών ιχθυοκλωβών, παρατηρείται διασπορά των οργανικών ρύπων σε μεγαλύτερη έκταση στον πυθμένα του οικοσυστήματος, και όχι αποκλειστικά στον πυθμένα κάτω από τους ιχθυοκλωβούς.

Η τοπογραφία του πυθμένα και η σύσταση του ιζήματος αποτελούν παραμέτρους που καθορίζουν τη χωροθέτηση των υδατοκαλλιεργειών στα υδάτινα οικοσυστήματα. Η μεγάλη κλίση του πυθμένα επιτρέπει την παρουσία μεγάλου βάθους νερού σε μικρή απόσταση από την ακτή, επιτρέποντας τη διασπορά των οργανικών ρύπων σε μεγαλύτερη έκταση στον πυθμένα. Ταυτόχρονα, οι εισροές φερτών υλικών καθορίζουν τη φύση του πυθμένα (πετρώδης, αμμώδης, λασπώδης), την περιεκτικότητα σε οργανική ύλη αλλά και σε ανόργανα στοιχεία (μέταλλα) και ως εκ τούτου τα είδη των υδρόβιων βενθικών φυτικών και ζωικών οργανισμών που διαβιούν σε αυτόν (Καραμανλής Ξ., 2018).

Η παρουσία υδάτινων ρευμάτων στην περιοχή των υδατοκαλλιεργειών έχει τόσο θετικό όσο και αρνητικό ρόλο. Αφενός επιτρέπει την ανανέωση του νερού στο χώρο της καλλιέργειας με αποτέλεσμα την ανανέωση του διαλυμένου οξυγόνου, την παροχή φυσικής τροφής. Αφετέρου όμως, η παρουσία ισχυρών υδάτινων ρευμάτων, προκαλεί απώλειες τροφής καθώς επίσης διασπορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται στις εγκαταστάσεις εξαιτίας της ταχείας απομάκρυνσής της από τον χώρο των κλωβών. Στην περίπτωση ισχυρών ρευμάτων έχουν παρατηρηθεί ακόμη και αλλοιώσεις στο σχήμα των καλλιεργούμενων ειδών.

### 1.13 Βιοσυσώρευση

Η περιβαλλοντική συμπεριφορά των φυτοφαρμάκων, ποικίλλει ανάλογα με τη χημική τους δομή. Τα χλωριωμένα φυτοφάρμακα παρουσιάζουν τάση βιοσυσώρευσης τόσο στα ψάρια όσο και στα οστρακοειδή (Starling et al., 2019). Τα φυτοφάρμακα επηρεάζουν έμμεσα τα εκτρεφόμενα είδη μίας υδατοκαλλιέργειας, μέσω της τοξικότητας που παρουσιάζουν στο φυτοπλαγκτόν.

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί προσλαμβάνουν φυτοφάρμακα από το περιβάλλον τους με την άμεση επαφή τους στην επιφάνεια του σώματός τους καθώς επίσης και από τις αναπνευστικές δομές όπως τα βράγχια και οι πνεύμονες, όχι όμως με το πεπτικό σύστημα (όπως βαρέα μέταλλα).

Ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης (bioaccumulation factor, BAF), μπορεί να υπολογιστεί τόσο σε νωπό ιστό (wet weight, fresh weight) όσο και σε αφυδατωμένο ιστό (dry weight) και ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης της χημικής ένωσης στον ιστό του οργανισμού/ λιπώδη ιστό  $C_{\text{tissue}}$  (μg/kg) προς τη συγκέντρωση του ιχνοστοιχείου στο θαλασσινό νερό ή ίζημα  $C_{\text{water/sed}}$  (μg/L και μg/kg αντίστοιχα). Περιγράφεται από την Εξίσωση 1.1.

$$CF_{\text{water/sed}} = \frac{C_{\text{tissue}}}{C_{\text{water/sed}}} \quad (\text{Εξίσωση 1.1})$$

Όπως είναι αντιληπτό, τιμές  $BCF > 1$ , δηλώνουν ότι η συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου στον οργανισμό είναι μεγαλύτερη από εκείνη του περιβάλλοντος (ίζημα ή νερό) από το οποίο απορροφήθηκε το παρασιτοκτόνο.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

#### 2.1 Εισαγωγή

Η Ελλάδα όπως και οι άλλες μεσογειακές χώρες, χαρακτηρίζονται από έντονη αγροτική δραστηριότητα η οποία αποτελεί μια από τις κυρίαρχες συνιστώσες της παγκόσμιας οικονομίας. Η συνεχώς αυξανόμενη ανάγκη για ολοένα και μεγαλύτερη παραγωγή, επέφερε παγκοσμίως αλλαγές στις γεωργικές πρακτικές, οδηγώντας στην εντατικοποίηση των αρδεύσεων και στην αυξανόμενη χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Αρχαιολογικά απολιθώματα υποδηλώνουν ότι οι παράγοντες που προκαλούν ασθένειες στα φυτά, δρούσαν πριν την εμφάνιση του ανθρώπου στη Γη. Τα πρώτα φυτοφάρμακα χρονολογείται ότι ανακαλύφθηκαν πριν από 4500 χρόνια από τους Σουμέριους οι οποίοι απομάκρυναν έντομα και ζώδια από τις καλλιέργειες με ενώσεις θείου. Η ιστορία της χρήσης των φυτοφαρμάκων ανά το πέρασμα των αιώνων θα μπορούσε να χωριστεί σε τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει μόνο φυσικά γεωργικά φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνταν για τον έλεγχο των παρασίτων και λαμβάνει χώρα πριν την δεκαετία του 1870. Η δεύτερη φάση, που αφορά την περίοδο 1870-1945, χαρακτηρίζεται ως η «εποχή των ανόργανων συνθετικών γεωργικών φαρμάκων», ενώ η τρίτη φάση αφορά την περίοδο μετά το 1945 και χαρακτηρίζεται ως «εποχή των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων».

Η κύρια πηγή εισόδου των παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον, σχετίζεται με αγροτικές δραστηριότητες. Εκτιμάται ότι από τη συνολική ποσότητα φυτοφαρμάκων που εφαρμόζονται για έλεγχο ζιζανίων και παρασίτων, μόνο ένα πολύ μικρό μέρος (<0,1%) φτάνει πραγματικά στο φυτό για το οποίο προορίζεται, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα ρυπαίνει τους περιβαλλοντικούς αποδέκτες (έδαφος, αέρα και νερό) (Parween et al., 2016). Η έκταση και η ένταση της ρύπανσης που προκαλούν, εξαρτώνται από τον βαθμό παραμονής, μεταφοράς από και διαμέσου του εδάφους και από τον χρόνο ημίσειας ζωής τους.

Στην Ευρώπη πάνω από 3.000.000 τόνοι φυτοφαρμάκων το χρόνο καταλήγουν στο περιβάλλον με δυσάρεστες συνέπειες για την εύρυθμη λειτουργία της ζωής του ανθρώπου.

Κάθε χρόνο σε παγκόσμιο επίπεδο καταγράφονται περίπου 2.000.000 δηλητηριάσεις εκ των οποίων 10% καταλήγουν στον θάνατο. Όπως γίνεται αντιληπτό, συνιστούν μεγάλο κίνδυνο για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Για όλα τα παραπάνω, τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μία τάση αντικατάστασης ή και απαγόρευσης των κλασικών φυτοπροστατευτικών ενώσεων με τοξική δράση για την χλωρίδα και πανίδα με νέα βιοδιασπώμενα χαμηλότερης τοξικότητας.

## 2.2 Ορισμός και κατηγορίες φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί διάφοροι ορισμοί για τις εν λόγω ουσίες, εξαιτίας της πολυπλοκότητας χρήσεων και εφαρμογών. Σύμφωνα με το άρθρο 1 του Νόμου 721/1977, «περί εγκρίσεως κυκλοφορίας και ελέγχου των γεωργικών φαρμάκων και ρυθμίσεις συναφών θεμάτων», ως γεωργικό φάρμακο (pesticide) ορίζεται κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, που δύναται να χρησιμοποιηθεί ως μέσο καταπολέμησης των εχθρών και ασθενειών των φυτών ή να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών.

Σύμφωνα με την ορολογία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τα φυτοφάρμακα χωρίζονται σε φυτοπροστατευτικές ενώσεις (χρήση στη γεωργία και τις φυτοκαλλιέργειες/ανθοκομία) και σε βιοκτόνα. Ωστόσο, οι δυο αυτοί όροι χρησιμοποιούνται αδιάκριτα και διέπονται από τις ίδιες οδηγίες και κανονισμούς. Πρόκειται για χημικές ουσίες οι οποίες είναι δηλητηριώδεις και είναι αποτελεσματικές κατά οργανισμών-στόχων, αλλά δεν αποτελούν κίνδυνο για τους οργανισμούς-μη στόχους και για το περιβάλλον (Kim et al., 2017).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων, καθώς και σύμφωνα με το Ελληνικό Προεδρικό Διάταγμα υπ. αριθμό 115 του 1997, περί έγκρισης, διάθεσης στην αγορά και ελέγχου φυτοπροστατευτικών προϊόντων (σε συμμόρφωση της παραπάνω οδηγίας), ως φυτοπροστατευτικό προϊόν ορίζεται ένα σκεύασμα, το οποίο περιέχει μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες με σκοπό:

- Να προστατεύει τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς ή να προλαμβάνουν τη δράση τους
- Να επηρεάζει τις βιολογικές διεργασίες των φυτών (π.χ. ρυθμίσεις αύξησης), εκτός αν πρόκειται για θρεπτικές ουσίες
- Να διατηρεί τα φυτικά προϊόντα, εκτός αν πρόκειται για ουσίες ή προϊόντα που υπόκεινται σε ειδικές διατάξεις σχετικά με τα συντηρητικά
- Να επιβραδύνει την ανάπτυξη ή να καταστρέφει τα ανεπιθύμητα φυτά/μέρη αυτών.

Τα φυτοπροστατευτικά σκευάσματα μπορεί να είναι στερεά (σκόνες ή κόκκοι), υγρά (γαλακτωματοποιήσιμα υγρά, αιωρήματα, γαλακτώματα και διαλύματα) και τέλος αερολύματα (aerosols) τα οποία βρίσκουν εφαρμογή κυρίως ως εντομοκτόνα οικιακής χρήσης. Ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν, εκτός από την δραστική ουσία (active ingredient ή substance), περιέχει ακόμα βοηθητικές ουσίες που δρουν ως διαλύτες της δραστικής ουσίας, ως σταθεροποιητές του σκευάσματος, είτε ως διαβρεκτικά ή προσκολλητικά για την αποτελεσματικότερη δημιουργία των σταγονιδίων ψεκασμού.

### 2.3 Εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα

Η γεωργία παγκοσμίως έρχεται αντιμέτωπη με πλήθος παράσιτων που μειώνουν ή και εκμηδενίζουν την παραγωγή. Προκειμένου να αντιμετωπιστούν αυτά τα παράσιτα, σύμφωνα με το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, στη χώρα μας είναι εγκεκριμένες 315 δραστικές ουσίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων και βιοκτόνων, οι οποίες είναι τυποποιημένες σε συνολικά 1782 σκευάσματα. Πολυπληθέστερη κατηγορία σε αριθμό σκευασμάτων αποτελούν τα μυκητοκτόνα, ενώ ακολουθούν τα εντομοκτόνα (Πίνακας 2.1).

**Πίνακας 2.1:** Αριθμός εγκεκριμένων σκευασμάτων ανά κατηγορία

Κατηγορία σκευάσματος	Αριθμός σκευασμάτων
Μυκητοκτόνα	578
Εντομοκτόνα	343
Ζιζανιοκτόνα	295
Παρασιτοκτόνα	228
Τρωκτικοκτόνα	111
Ακαρεοκτόνα	82
Φωτορυθμιστικές	77
Αποθητικά- Προσελκυστικά	16
Κοχλιολειματοκτόνα	15
Εντομοελκυστικές	12
Νηματοδοκτόνα	11
Λοιπά γεωργικά φάρμακα	10
Συντηρητικά ξύλου	4
<b>Σύνολο σκευασμάτων</b>	<b>1782</b>

## 2.4 Ταξινόμηση φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Ο αυξημένος αριθμός των χρησιμοποιούμενων φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων οδήγησε στην ανάγκη κατηγοριοποίησή τους. Η ομαδοποίηση βασίζεται στην φύση τους, στην δραστική ουσία που περιέχουν, στον τρόπο παρασκευής τους, στο φάσμα και στον τρόπο δράσης τους (Καψή Μ., 2013).

Βάσει του τρόπου παρασκευής τους οι δραστικές ουσίες διακρίνονται στις φυσικώς παραγόμενες και τις χημικώς συντιθέμενες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι ουσίες που προέρχονται από ανώτερα φυτά (όπως το πύρεθρο, η ροτενόνη και η νικοτίνη), ή μικροοργανισμούς και εμφανίζουν θεραπευτικές για τις ασθένειες ιδιότητες, εντομοκτόνο ή ζιζανιοκτόνο δράση. Στη δεύτερη κατηγορία υπάγονται ανόργανες ή οργανικές ενώσεις και είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα. Στην καθημερινότητα η χρήση του όρου φυτοφάρμακα έχει επικρατήσει να αναφέρεται σε αυτή την κατηγορία φυτοπροστατευτικών ουσιών.

Ανάλογα με τους οργανισμούς τους οποίους καταπολεμούν, τα φυτοφάρμακα ταξινομούνται κυρίως σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: εντομοκτόνα (insecticides), ζιζανιοκτόνα (herbicides) και μυκητοκτόνα (fungicides). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτές οι τρεις κατηγορίες αποτελούν το 95% περίπου της παγκόσμιας κατανάλωσης παρασιτοκτόνων. Μικρότερες κατηγορίες αποτελούν τα τρωκτικοκτόνα (για τον έλεγχο σπονδυλωτών παρασίτων), τα νηματωδοκτόνα (για την καταπολέμηση νηματωδών), τα μαλακιοκτόνα (για την καταπολέμηση σαλιγκαριών και γυμνοσαλιάγκων) και τα ακαρεοκτόνα (για την καταπολέμηση αραχνοειδών).

Η κατηγοριοποίηση βάσει της χημική δομή, είναι πολύ σημαντική, δεδομένου ότι οι λειτουργικές ομάδες αποτελούν δείκτες των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του εκάστοτε φυτοφαρμάκου. Μερικές από τις πιο διαδεδομένες κατηγορίες αποτελούν οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (*chlorinated hydrocarbons*), οργανοφωσφορικοί εστέρες (*OP-esters*), καρβαμιδικά και αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους (*carbamates and aliphatic acids and their esters*), τριαζίνες, χλωρο- και αμινο- τριαζινών (*triazines, chloro-, amino- triazines derivatives*), ενώσεις της ομάδας των ουριών (*urea derivatives*), φαίνοξυ-οξέα (*phenoxies*), βενζοϊκά οξέα (*benzoic acids*), φαινυλουρίες (*phenylureas*), χλωροακεταμίδια και ανιλίδια (*chloroacetamides/anilides and derivatives*), (δι)νιτρο-ανιλίνες (*dinitroanilines*), θειοκαρβαμιδικό εστέρες (*thiocarbamates*), διπυριδύλια (*bipyridyl*), πυρεθρινοειδή και οι φυσικές πυρεθρίνες (*pyrethroids*), φερομόνες (*pheromones*), αζόλες (*azoles*), φθαλιμιδικά (*phthalimides*), νικοτινοειδή (*nicotinoids*), ανόργανα άλατα των μετάλλων As, Zn, Cu.

Βάσει του τρόπου δράσης, διακρίνονται σε αποφυλλωτικά, απωθητικά, ελκυστικά, ρυθμιστές ανάπτυξης, συνεργιστικά και φυτορυθμιστικά. Διακρίνονται επίσης σε φυλλώματος ή εδάφους, αναλόγως της θέσης απορρόφησής τους από τα φυτά, προσπαρτικά, προφυτρωτικά ή μεταφυτρωτικά, αναλόγως του χρόνου εφαρμογής τους, επαφής ή διασυστηματικά, αναλόγως της αποστάσεως της εκδήλωσης της δράσης τους από τη θέση απορρόφησης, εκλεκτικά ή μη εκλεκτικά, αναλόγως της ικανότητάς τους να θανατώνουν ευρύ ή περιορισμένο φάσμα εχθρών (Καψή Μ., 2013).

Τέλος, τα φυτοφάρμακα διοχετεύονται στα φυτά ως ψεκαζόμενο υδατικό διάλυμα, με τη μορφή ατμών ή ως υδατικό διάλυμα με το οποίο ποτίζεται η ρίζα του φυτού. Οι πιο επικίνδυνοι τρόποι παροχής των φυτοφαρμάκων είναι οι δύο πρώτοι όπου το αερόλυμα του φυτοφαρμάκου μπορεί να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις παρουσία ανέμων.

## 2.5 Κατηγορίες μελέτης παρούσας Διατριβής

### 2.5.1 Πυρεθροειδή

Από χημικής πλευράς, τα συνθετικά πυρεθρινοειδή που χρησιμοποιούνται σήμερα, είναι συγγενείς ενώσεις με τις φυσικές πυρεθρίνες που απομονώθηκαν από φυτά του γένους *Chrysanthemum* αλλά με βελτιωμένες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα σε σχέση με τις φυσικές πυρεθρίνες εμφανίζουν: χημική σταθερότητα στο φως και την αποθήκευση με συνέπεια ικανή υπολειμματική δράση, μεγαλύτερη εντομοτοξικότητα και χαμηλότερη τοξικότητα έναντι των θηλαστικών (Gil-García et al., 2006). Ένα σημαντικό μειονέκτημα τους είναι ότι παρουσιάζουν υψηλό κόστος παραγωγής λόγω της πολύπλοκης χημικής δομής τους.

Η δράση τους είναι σχεδόν ακαριαία και εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα των εντόμων, αλλά κατά τρόπο διαφορετικό από τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμικά (Gil-García et al., 2006). Είναι εντομοκτόνα επαφής και στομάχου ενώ μερικά δρουν και σαν εντομοκτόνα ασφυξίας. Εμφανίζουν ευρύ φάσμα δράσης κατά πολλών ειδών εντόμων.

Τα πυρεθρινοειδή μεταβολίζονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και τα θηλαστικά πολύ γρήγορα προς μη τοξικά παράγωγα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι εφαρμόζονται σε πολύ μικρές δόσεις, δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται σκευάσματα της ομάδας αυτής όχι μόνο στη γεωργία αλλά και στη δημόσια υγεία (απεντομώσεις σε κατοικημένους χώρους, στάβλους κ.λπ.). Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής αποτελούν τα permethrin, deltamethrin, cypermethrin.

### 2.5.2 Οργανοφωσφορικά

Από χημικής πλευράς, τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα είναι συνθετικές οργανικές ενώσεις, προϊόντα (συνήθως εστέρες) του φωσφορικού οξέος. Δρουν σαν εντομοκτόνα επαφής, στομάχου ή και τα δύο μαζί ενώ αρκετά είναι και διασυστηματικά. Η τοξική τους δράση στα έντομα, εντοπίζεται στην παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης στο νευρικό σύστημα. Εμφανίζουν ευρύ φάσμα δράσης κατά πολλών εντόμων και ακάρεων και θεωρούνται ενώσεις υψηλής τοξικότητας για τον άνθρωπο και τα ζώα.

Παρόλο που είναι λιποδιαλυτά, δεν συσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό των θηλαστικών, αλλά διασπώνται γρήγορα προς μη τοξικά παράγωγα και αποβάλλονται από τον οργανισμό του ανθρώπου και των ζώων. Στην ομάδα των οργανοφωσφορικών υπάγονται ενώσεις όπως τα chlorpyrifos, dimethoate, phosmet, pirimiphos-methyl κ.α.

### 2.5.3 Τριαζίνες

Στην κατηγορία αυτή, ανήκουν οι ενώσεις οι οποίες αποτελούν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα. Σε υδατικά διαλύματα συμπεριφέρονται ως βάσεις, θεωρούνται σχεδόν μη πτητικές και σταθερές ενώσεις στις διεργασίες υδρόλυσης, φωτόλυσης και βιοδιάσπασης. Απορροφώνται κυρίως από το ριζικό σύστημα των φυτών και μεταφέρονται στα φύλλα διαμέσου του αποπλάστη. Η ζιζανιοκτόνος δράση οφείλεται στην παρεμπόδιση της λειτουργίας της φωτοσύνθεσης. Αρκετά μέλη αυτής της κατηγορίας, προκαλούν μεταλλαξιγόνα και παθογενετικά φαινόμενα στους ζωικούς οργανισμούς, και είναι ύποπτα για καρκινογένεσεις. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής αποτελούν οι ενώσεις atrazine και simazine.

## 2.6 Σημειακές και μη πηγές ρύπανσης

Οι πηγές ρύπανσης από παρασιτοκτόνα μπορούν να διακριθούν σε σημειακές και μη σημειακές. Οι σημειακές πηγές ρύπανσης είναι εντοπισμένες σε μία συγκεκριμένη περιοχή και περιλαμβάνουν μονάδες αποθήκευσης, βιομηχανικές μονάδες παραγωγής και τυποποίησης εμπορικών σκευασμάτων, αλλά και γεωργικών προϊόντων. Επίσης, η ανακύκλωση χρησιμοποιημένων κενών συσκευασιών και η πλύση του εξοπλισμού ψεκασμού μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση του περιβάλλοντος. Μπορεί να εντοπισθούν σε μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων ή στα όμβρια ύδατα λόγω της εφαρμογής τους στο αστικό περιβάλλον (κήποι, κλπ.).

Οι μη σημειακές πηγές δεν εντοπίζονται σε συγκεκριμένο σημείο αλλά είναι διάχυτες στο χώρο και ταυτίζονται κυρίως με τις αγροτικές δραστηριότητες. Κατά την εφαρμογή τους, λαμβάνουν χώρα διάφορες διεργασίες και μεταφέρονται στο έδαφος, την ατμόσφαιρα και στα ύδατα (φυσικά και υπόγεια) με την έκπλυση της επιφάνειας του εδάφους. Επιπλέον, μπορεί να παρατηρηθεί εξάτμιση και συνακόλουθη κατακρήμνιση των ουσιών αυτών, ειδικά των πιο πτητικών.

## 2.7 Κατανομή και μεταφορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο περιβάλλον

Η κατανομή των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον εξαρτάται τόσο από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δραστικών ενώσεων όσο και από τη σύσταση του μέσου στο οποίο βρίσκονται.

Η υγρασία και το pH του εδάφους, η σύσταση, ο τύπος και η επιφάνεια του ιζήματος, η μορφολογία, η κλίση και το πορώδες του είναι μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν την τύχη των οργανικών ρύπων στο έδαφος. Επιπλέον, η θερμοκρασία και οι κλιματικές συνθήκες της περιοχής (ύψος και συχνότητα βροχοπτώσεων) επιδρούν στην «τύχη» των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο περιβάλλον (Καψή Μ., 2013). Στα υδατικά συστήματα, η κατανομή των δραστικών ουσιών επηρεάζεται από το βάθος και την επιφάνεια της υδατικής μάζας, την ανανέωση ή όχι του υδάτινου συστήματος, την μορφή και την ταχύτητα της ροής του νερού, την αλατότητα και την περιεχόμενη βιομάζα, τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες και την ποσότητα του νερού, το ποσοστό χουμικών ενώσεων και τον κορεσμό σε οξυγόνο (Καψή Μ., 2013).

Όσον αφορά την κατανομή των φυτοφαρμάκων σε σχέση με την ποιότητα των εδαφών, παρατηρείται μια μεγάλη δραστικότητα στα αμμώδη εδάφη έναντι των αργιλωδών και μία μεγάλη κατανομή σε εδάφη με υψηλά ποσά αργίλου και οργανικής ύλης.

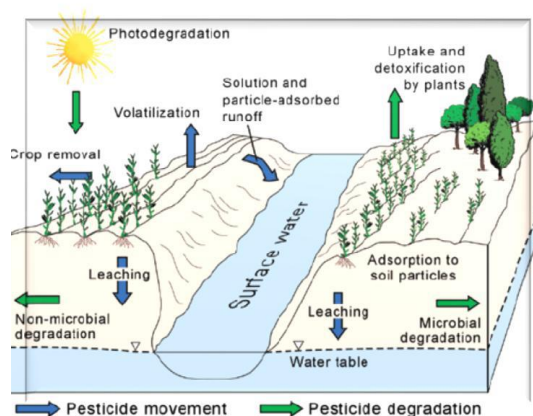
Οι σημαντικότερες φυσικές ιδιότητες των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που επηρεάζουν τη συμπεριφορά τους και την τύχη τους στο περιβάλλον είναι το μοριακό τους βάρος, η διαλυτότητα στο νερό, η τάση ατμών και οι τιμές των συντελεστών κατανομής οκτανόλης/νερού ( $K_{ow}$ ) και οργανικού άνθρακα ( $K_{oc}$ ). Ο συντελεστής  $K_{ow}$  ορίζει την κατανομή μιας ένωσης μεταξύ ενός οργανικού διαλύτη (οκτανόλη) και του νερού ενώ ο συντελεστής  $K_{oc}$ , ορίζει την κατανομή μιας ένωσης μεταξύ του οργανικού άνθρακα των εδαφών (Pérez-Fernández et al., 2017). Οι συντελεστές αυτοί είναι ενδεικτικοί της κατανομής των ενώσεων μεταξύ οργανικής ύλης και υδατικού μέσου, και υψηλές τιμές τους συνήθως αντιστοιχούν σε σημαντική ρόφηση των παρασιτοκτόνων στην οργανική ύλη ή στα σωματίδια του εδάφους (Pérez-Fernández et al., 2017). Η παρουσία ετεροατόμων και δραστικών ομάδων στα μόρια

των φυτοφαρμάκων επηρεάζει το ρυθμό διάσπασής τους κατά την υδρόλυση και τις οξειδοαναγωγικές διεργασίες.

Η μορφή των σκευασμάτων και ο τρόπος με τον οποίο εφαρμόζονται επηρεάζει επίσης την τύχη τους στο περιβάλλον. Τα κοκκώδη σκευάσματα που χρησιμοποιούνται με στόχο τη σταδιακή απελευθέρωση της δραστικής ουσίας, είναι συνήθως τα πιο ανθεκτικά σκευάσματα. Αντίθετα τα σκευάσματα υπό μορφή σκόνης ή γαλακτωμάτων είναι λιγότερο ανθεκτικά.

## 2.8 Τύχη φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο περιβάλλον

Οι σημαντικότερες φυσικές διεργασίες που επηρεάζουν την τύχη των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο περιβάλλον είναι οι διεργασίες μεταφοράς, μετασχηματισμού και διάσπασης και παρουσιάζονται επιγραμματικά στο Σχήμα 2.1 (Starling et al., 2019).



Σχήμα 2.1: Τύχη φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον

- Προσρόφηση

Η προσρόφηση είναι διεργασία αλληλεπίδρασης φυτοφαρμάκου-ιζήματος ή αιωρούμενων σωματιδίων-νερού. Σχετίζεται με τη φύση των στερεών σωματιδίων του συστήματος (κατανομή μεγέθους σωματιδίων, είδος ιζήματος, ποσοστό περιεχόμενης αργίλου, περιεχόμενο σε οργανική ύλη, ικανότητα ιοντοανταλλαγής) καθώς και με φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της δραστικής ουσίας (Καψή Μ., 2013).

Οι δύο κύριοι μηχανισμοί είναι η φυσική και η χημική προσρόφηση. Η φυσική προσρόφηση είναι μία αντιστρεπτή διαδικασία δέσμευσης που οφείλεται σε ασθενείς χημικές δυνάμεις, (δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις Van Der Waals) και εμφανίζεται σε



φυτοφάρμακα χωρίς φορτίο (παράγωγα της ουρίας, δινιτροανιλίνες, καρβαμίδια, τριαζίνες και αμίδια).

Η χημική προσρόφηση είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία που οφείλεται στο σχηματισμό ισχυρών ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Τέτοιου είδους προσρόφηση παρουσιάζουν τα φυτοφάρμακα που μπορούν να υποστούν πρωτονίωση ή ιονισμό.

- **Έκπλυση**

Η έκπλυση (leaching) αφορά κυρίως τη μετακίνηση φυτοφαρμάκων προς βαθύτερα στρώματα εδάφους υπό την επίδραση του νερού. Ο βαθμός έκπλυσης εξαρτάται κυρίως από τη διαλυτότητα της ένωσης στο νερό, από το έδαφος (είδος, υφή και δομή) όπως επίσης και από την ένταση και τη συχνότητα των βροχοπτώσεων και της άρδευσης. Τα φυτοφάρμακα που εμφανίζουν μικρή διαλυτότητα και μεγάλη ικανότητα προσρόφηση από τα κolloειδή του εδάφους (εδάφη πλούσια σε άργιλο ή οργανική ύλη) έχουν μικρό βαθμό έκπλυσης και παραμένουν στα ανώτερα στρώματα του εδάφους.

- **Εξάτμιση**

Η μεταφορά ενός φυτοφαρμάκου από το νερό ή το έδαφος στον αέρα, είναι ανάλογη της πτητικότητας του φυτοφαρμάκου και ελαττώνεται με την ενσωμάτωσή του στο έδαφος, λόγω της προσρόφησης του στα κolloειδή του εδάφους και της μείωσης της ταχύτητας εξάτμισης. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση της ταχύτητας εξάτμισης. Γενικά, έχει παρατηρηθεί, ότι η εξάτμιση της ένωσης είναι λιγότερο έντονη τις πρώτες μέρες μετά την εφαρμογή της και μάλιστα πριν την προσκόλληση στις φυτικές ίνες ή την προσκόλληση της στα κolloειδή του εδάφους.

- **Υδρόλυση**

Η υδρόλυση είναι η κατεξοχήν διεργασία διάσπασης των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον. Τα ιόντα του υδροξειδίου, ως πυρηνόφιλα αντιδραστήρια, έχουν την τάση να προσβάλλουν ηλεκτρονιόφιλα κέντρα των οργανικών μορίων, αναλόγως των συνθηκών που επικρατούν (pH, τη θερμοκρασία, την παρουσία καταλυτικών επιφανειών στο έδαφος, την περιεχόμενη οργανική ύλη και τα μεταλλικά ιόντα). Ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου στο μισό και ποικίλει για τις διάφορες κατηγορίες φυτοφαρμάκων από μερικά λεπτά μέχρι και πολλούς μήνες (αμίδια).

- **Φωτοδιάσπαση**

Η φωτοδιάσπαση αποτελεί μία από τις σημαντικότερες διεργασίες διάσπασης των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον και αφορά μόνο τις ενώσεις που απορροφούν στην περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας (290-400 nm). Λαμβάνει χώρα με δύο μηχανισμούς με άμεση

φωτοδιάσπαση/φωτόλυση και την έμμεση φωτοδιάσπαση. Κατά την άμεση, το φυτοφάρμακο απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία και στη συνέχεια αλληλεπιδρά με διάφορα περιβαλλοντικά αντιδρώντα ή με τον εαυτό του με αποτέλεσμα το μετασχηματισμό του. Η έμμεση φωτοδιάσπαση είναι και η περισσότερο συνηθισμένη και πραγματοποιείται όταν η ακτινοβολία απορροφάται από μόρια άλλων ουσιών (φωτοευαισθητοποιητές) στον αέρα ή το νερό, τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με τα μόρια των φυτοφαρμάκων προκαλώντας την διάσπασή τους. Τέτοια συστατικά μπορεί να είναι τα χουμικά οξέα, χρωστικές, ή ημιαγωγοί όπως τα οξειδία  $TiO_2$ ,  $ZnO$ ,  $Fe_2O_3$  κ.α.

## 2.9 Νομοθεσία στις Ευρωπαϊκές χώρες

Ως γνωστόν οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις ανήκουν πλέον στα προϊόντα των οποίων οι διαδικασίες παραγωγής και εφαρμογής ελέγχονται από αυστηρές νομοθεσίες. Η νομοθετική ρύθμιση αναφορικά με την έγκριση και αδειοδότησή τους με σκοπό την διάθεση και την χρήση ξεκίνησε να υφίσταται στα περισσότερα κράτη μετά τα μέσα του προηγούμενου αιώνα. Μερικά χρόνια αργότερα, οι πρώτες συζητήσεις για τις αρνητικές επιπτώσεις από την χρήση φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων στο περιβάλλον, είχε σαν αποτέλεσμα την ίδρυση διεθνών οργανισμών (FAO, UNEP, WHO, ILO) με αντικείμενό τους την ορθή χρήση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, την υπολειμματικότητα τους στο περιβάλλον και στα τρόφιμα και τις επιπτώσεις τους στην υγεία.

Στην Ευρώπη η πρώτη απόπειρα νομοθεσίας αναφορικά με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα πραγματοποιήθηκε το 1976, όπου και δημοσιεύτηκε η Οδηγία 76/895/EK, με την οποία καθορίστηκαν τα μέγιστα όρια υπολειμμάτων (MRLs) σε φρούτα και λαχανικά για 43 δραστικές ουσίες (European Commission, 2002/79). Μετά από μερικά χρόνια διαπραγματεύσεων, δημοσιεύτηκε η οδηγία Εγκρίσεων 91/414/ΕΟΚ που αποτέλεσε τη βασική Ευρωπαϊκή νομοθεσία η οποία επηρέασε την αγορά των σκευασμάτων στην Ευρώπη τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Περιλαμβάνει τη λεγόμενη “θετική λίστα” με τις δραστικές ουσίες που έχουν έγκριση διάθεσης και χρήσης. Με την οδηγία αυτή πλέον η ΕΕ υιοθετεί ενιαία στρατηγική προκειμένου να εξασφαλιστεί αποτελεσματική χρήση των φυτοφαρμάκων χωρίς επιβλαβείς επιπτώσεις (European Commission, 91/414).

Η οδηγία πλαίσιο για τα νερά 2000/60/EK (Water Framework Directive-WFD), αφορά την προστασία των νερών της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η οδηγία απαιτεί την θέσπιση μέτρων για την προστασία του υδάτινου περιβάλλοντος και των πόσιμων πηγών νερού. Τα μέτρα αφορούν στον περιορισμό της χρήσης χημικών ουσιών στο νερό, μεταξύ των οποίων είναι οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Ο Κανονισμός 396/2005/EK, τέθηκε σε ισχύ τον Σεπτέμβριο

του 2008 και προβλέπει την πλήρη εναρμόνιση των μέγιστων επιτρεπτών υπολειμμάτων σε τρόφιμα και ζωοτροφές για όλα τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα σε όλη την επικράτεια της Ε.Ε. (European Commission, 2005/396/EC). Λίγα χρόνια αργότερα το 2011 τέθηκε σε ισχύ η Οδηγία 2009/128/ΕΚ που αφορά στην αειφόρο χρήση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην Ε.Ε, και απαιτεί από τα κράτη μέλη να θεσπίσουν Εθνικά Σχέδια Δράσης με στόχο την μείωση της χρήσης τους και κατ' επέκταση των κινδύνων που σχετίζονται με την χρήση τους (European Commission, 2009/128/EC).

### 2.10 Τοξικότητα και θεσμοθετημένα όρια

Η τοξικότητα δηλώνει την ικανότητα μίας ουσίας να προκαλεί βλάβη σε έναν οργανισμό, ενώ η επικινδυνότητα δηλώνει την πιθανότητα μίας ουσίας να εμφανίσει τοξικότητα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Το πόσο επικίνδυνο είναι ένα γεωργικό φάρμακο εξαρτάται από την συγκέντρωση που θα εισέλθει στον ανθρώπινο οργανισμό. Επομένως όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.2, η δόση της δραστικής ουσίας στην οποία εκτίθεται ένας οργανισμός, επηρεάζει και τα συμπτώματα τα οποία προκαλεί. Μία υψηλή συγκέντρωση μπορεί να προκαλέσει οξεία δηλητηρίαση.

Τα όρια υπολειμμάτων που έχουν θεσπιστεί περιλαμβάνουν:

- Την συγκέντρωση NOAEL (No Observable Effect Level) που ορίζεται ως η μέγιστη συγκέντρωση μιας ουσίας που προκαλεί μη ορατές διαφοροποιήσεις στη λειτουργικότητα και το χρόνο ζωής του οργανισμού.



Σχήμα 2.2: Σχέση ποσότητα έκθεσης δραστικής ουσίας και συμπτωμάτων

- Οξεία Δόση Αναφοράς (Acute Reference Dose, ARfD), η εκτιμωμένη ποσότητα στα τρόφιμα μιας δραστικής ουσίας που μπορεί να λάβει ένας άνθρωπος σε ένα γεύμα χωρίς να απειλείται η υγεία του
- Μέγιστο Όριο Υπολειμμάτων (Maximum Residue Limit, MRL), μέγιστη συγκέντρωση ενός φυτοφαρμάκου που επιτρέπεται από το νόμο στα τρόφιμα
- Ανώτατη Αποδεκτή Συγκέντρωση (Maximum Admissible Concentration, MAC), μέγιστη συγκέντρωση της δραστικής ουσίας ενός φυτοφαρμάκου στο πόσιμο νερό.

Η Ε.Ε. με την οδηγία για το Πόσιμο Νερό 2000/60/ΕΚ θέτει ως όριο την τιμή 0,1 µg/L για μεμονωμένα φυτοφάρμακα, ενώ όταν πρόκειται για το άθροισμα των ανιχνευθέντων φυτοφαρμάκων η τιμή αυτή ορίζεται στα 0,5 µg/L (Karsi et al., 2019).

Τα πρότυπα περιβαλλοντικής ποιότητας της Ε.Ε. εκτός από τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση έχουν καθορίσει και την ετήσια μέση τιμή (Annual Average Value, AA) στο νερό και ετήσια μέση συγκέντρωση σε έμβιους οργανισμούς για αρκετές από τους αναδυόμενους ρύπους (European Commission, 2008/105 και European Commission, 2013/39).

Σύμφωνα με την οδηγία 2013/39/ΕΚ, που αποτελεί τροποποίηση της οδηγίας 2000/60/ΕΚ έχει οριστεί η ανώτατη αποδεκτή συγκέντρωση για 45 ενώσεις σε ηπειρωτικά, επιφανειακά, μεταβατικά, παράκτια και υπόγεια ύδατα. Πιο συγκεκριμένα, η οδηγία αφορά τα φυτοφάρμακα dichlorvos ( $7 \times 10^{-5}$  mg L<sup>-1</sup>), cypermethrin ( $6 \times 10^{-5}$  mg L<sup>-1</sup>), bifenox ( $4 \times 10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>), heptachlor ( $3 \times 10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>), endosulfan ( $4 \times 10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>), cybutrine ( $1,6 \times 10^{-2}$  mg L<sup>-1</sup>), acclonifen ( $1,2 \times 10^{-2}$  mg L<sup>-1</sup>), terbutryn ( $3,4 \times 10^{-2}$  mg L<sup>-1</sup>), chlorpyrifos (0,1 mg L<sup>-1</sup>), chlorfenvinphos (0,3 mg L<sup>-1</sup>), quinoxifen (54 mg L<sup>-1</sup>), alachlor (0,7 mg L<sup>-1</sup>), isoproturon (1 mg L<sup>-1</sup>), diuron (1,8 mg L<sup>-1</sup>), atrazine (2 mg L<sup>-1</sup>) και simazine (4 mg L<sup>-1</sup>).

### 2.10.1 Τοξικότητα στον άνθρωπο

Η παρουσία μη αποδεκτών υπολειμματικών συγκεντρώσεων γεωργικών φαρμάκων έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπινου οργανισμού. Οι επιδράσεις είναι ανάλογες των ιδιοτήτων του φυτοφάρμακου καθώς επίσης και της συγκέντρωσης. Μπορεί να προέλθουν είτε από απευθείας έκθεση (εργάτες και χρήστες στην παραγωγή) είτε από έμμεση έκθεση αφενός με έκθεση ατόμων κατά την εφαρμογή τους ή αφετέρου από τα υπολείμματά τους στα τρόφιμα και στα ύδατα (Kim et al., 2017).

Η τοξική ενέργεια μπορεί να εκδηλωθεί μετά από λίγες ή μετά από επανειλημμένη έκθεση στο παρασιτοκτόνο και χαρακτηρίζεται σαν οξεία και υποξεία τοξικότητα (Brumovský et al., 2017).

Η χρόνια έκθεση στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, αν και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από ότι η οξεία, είναι δυνατόν να θέσει σε κίνδυνο την υγεία των εκτιθέμενων πληθυσμών και συνδέεται με τη βιοσυσσώρευση και με τις μη αναστρέψιμες βλάβες (καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση, γονιδιοτοξικότητα κ.α) (Kim et al., 2017 και Starling et al., 2019). Δευτερεύοντα κοινά τοξικά φαινόμενα, αλλά εξίσου σημαντικά, που σχετίζονται με την έκθεση στους συγκεκριμένους ρύπους αποτελούν οι αντιδράσεις υπερευαισθησίας (αλλεργίες), η εξασθένηση του ανοσοποιητικού, δυσμενείς επιπτώσεις στο κεντρικό και περιφερειακό νευρικό σύστημα, η επίδραση στο ενδοκρινικό σύστημα, η διαταραχή του μεταβολισμού των ξένων ουσιών στο οργανισμό και η δυσλειτουργία ζωτικών οργάνων.

### 2.10.2 Τοξικότητα στο περιβάλλον

Εκτός από την υγεία του ανθρώπου, η απελευθέρωση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα περιβαλλοντικά συστήματα (αέρας, νερό και έδαφος) μπορεί να οδηγήσει σε δυσμενείς επιπτώσεις σε οργανισμούς μη-στόχους όλων των τροφικών επιπέδων, συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών του εδάφους, των ευεργετικών αρθρόποδων, των φυτών, των υδρόβιων οργανισμών και των πτηνών ή των θηλαστικών.

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε μέχρι πρόσφατα καταπολεμούμενα επιβλαβή έντομα και μάλιστα ταυτόχρονα σε πολλές ομάδες εντομοκτόνων. Η καταστροφή της ωφέλιμης πανίδας η οποία ασκούσε φυσικό έλεγχο των επιβλαβών εντόμων, με αποτέλεσμα εμφάνιση αυξημένων πληθυσμών εντόμων, που κατά το παρελθόν δεν αποτελούσαν σημαντικούς εχθρούς των καλλιεργειών

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα διάφορα είδη του ζωοπλαγκτόν παρουσιάζουν ευαισθησία σε εντομοκτόνα, ενώ τα άλγη είναι ευαίσθητα στα ζιζανιοκτόνα. Ακόμη, μικρές συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε ψάρια μπορούν να επηρεάσουν το ανοσοποιητικό σύστημα και τη γονιμότητά.

Ανακεφαλαιώνοντας, από όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτή η ανάγκη προσδιορισμού με ακρίβεια των συγκεντρώσεων των φυτοφαρμάκων καθώς επίσης και η εκτίμηση της επικινδυνότητας στον άνθρωπο και στο περιβάλλον για την αντιμετώπιση περιβαλλοντικών και βιολογικών προβλημάτων. Γι' αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντική η ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνικών προσδιορισμού τους σε περιβαλλοντικά, βιολογικά υποστρώματα και σε δείγματα τροφίμων.

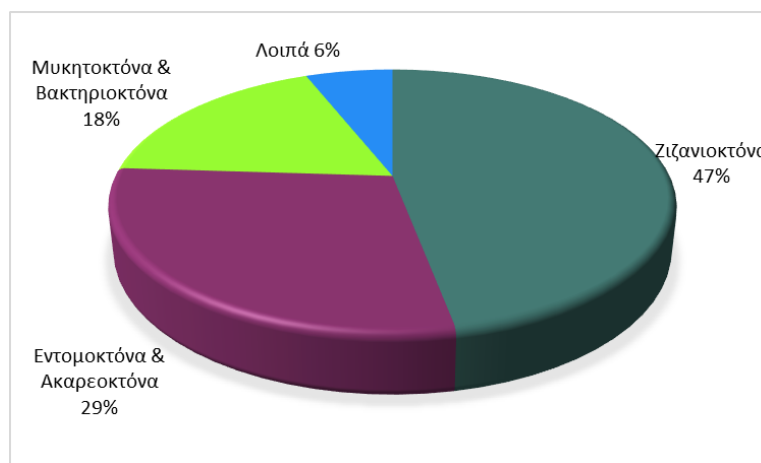
### 2.11 Στατιστικά δεδομένα παγκόσμιας αγοράς φυτοφαρμάκων

Οι καλλιέργειες ανταγωνίζονται 30.000 είδη ζιζανίων, 3.000 είδη νηματωδών και 10.000 είδη επιβλαβών εντόμων, γεγονός που καθιστά το ρόλο των φυτοπροστατευτικών προϊόντων εξαιρετικά σημαντικό. Παρά τη χρήση τους, το 20-40% της πιθανής παραγωγής τροφίμων χάνεται κάθε χρόνο εξαιτίας των παρασίτων (Silva et al., 2019).

Παγκοσμίως, εφαρμόζονται ετησίως πάνω από 3 εκατομμύρια τόνοι φυτοφαρμάκων. Υπάρχουν πάνω από 26000 εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα, που αποτελούν συνδυασμό 700 δραστικών ουσιών (Silva et al., 2019).

Οι πωλήσεις σε παγκόσμιο επίπεδο το 2009 έφτασαν την αξία των 39.7 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Συγκεκριμένα οι πωλήσεις στην Αμερική (Βόρεια και Κεντρική) έφτασαν τα 7.93 δισεκατομμύρια δολάρια ενώ στην Ευρώπη τα 11.48 δισεκατομμύρια δολάρια με τις πωλήσεις αυτές να αφορούν περίπου 280000 τόνους δραστικών ενώσεων.

Τα ζιζανιοκτόνα κατέκτησαν το μεγαλύτερο μερίδιο της παγκόσμιας αγοράς με ποσοστό 47%, τα εντομοκτόνα ακολουθούν στη δεύτερη θέση με 29% και τέλος τα μυκητοκτόνα με 18% (Σχήμα 2.3). Όλοι οι υπόλοιποι τύποι φυτοπροστατευτικών προϊόντων κατέλαβαν συνολικά το 6% της παγκόσμιας αγοράς (Balmer et al., 2019).



**Σχήμα 2.3:** Πωλήσεις φυτοφαρμάκων ανά κατηγορία παγκοσμίως (Πηγή: Balmer et al., 2019)

### 2.12 Στατιστικά δεδομένα Ευρωπαϊκής αγοράς φυτοφαρμάκων

Στην Ευρωπαϊκή ένωση υπάρχουν περίπου 500 εγκεκριμένες δραστικές ουσίες ως φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Οι πωλήσεις κατά το διάστημα 2011-2017 ανέρχονται σε 374000 τόνους και καλύπτουν τόσο τις γεωργικές όσο και τις μη χρήσεις (Silva et al., 2019).

Για τον υπολογισμό του κύριου δείκτη από τα στοιχεία της έρευνας, έγινε καταρχήν εκτίμηση των ποσοτήτων και κατηγοριών φυτοφαρμάκων βάσει της περιεκτικότητας τους σε

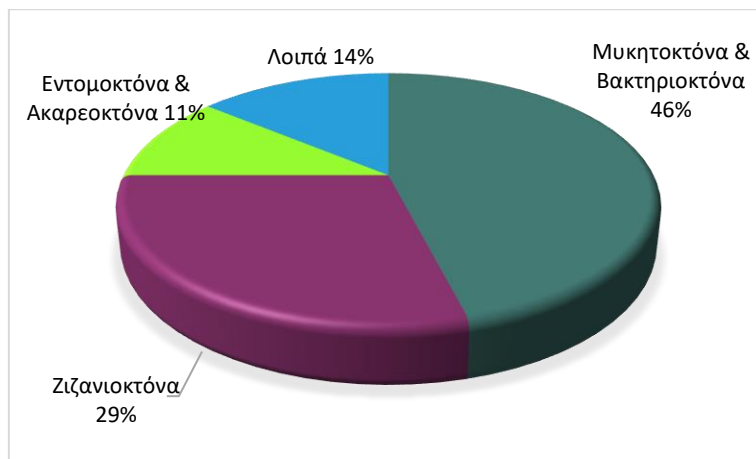
δραστικές ουσίες (used quantities of different pesticide categories). Σημειώνεται ότι δεν υπάρχουν ακόμα διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα και στοιχεία από τη Eurostat για το έτος 2018, για αυτό σε αυτήν την παράγραφο παρουσιάζονται στατιστικά δεδομένα για την τελευταία επταετία 2011-2017. Έτσι στο Σχήμα 2.4 που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι ετήσιες πωλήσεις σε τόνους δραστικών ενώσεων που πωλήθηκαν συνολικά στην Ευρώπη τα τελευταία επτά χρόνια. Παρατηρείται γενικά μία σταθερότητα ως προς τις ποσότητες σε όλο το χρονικό διάστημα με εξαίρεση μία ελαφριά πτώση για τα έτη 2012 και 2013, λόγω της επίδρασης των αυστηρότερων θεσμικών κανόνων που αφορούν την παραγωγή, έγκριση, διάθεση και χρήση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (Eurostat, 2019).



**Σχήμα 2.4:** Πωλήσεις φυτοφαρμάκων σε τόνους ανά έτος στην Ευρώπη (Πηγή: Eurostat 2019)

Σύμφωνα με τα επικαιροποιημένα στατιστικά στοιχεία (για το έτος 2016, Eurostat) στον Ευρωπαϊκό χώρο (ανάμεσα σε 28 χώρες κράτη μέλη) οι πωλήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων ανά κατηγορία ακολουθούν την παγκόσμια τάση ως προς την κατανομή των δραστικών ενώσεων.

Έτσι τα μυκητοκτόνα και τα βακτηριοκτόνα κατέκτησαν το μεγαλύτερο μερίδιο με 46%, τα ζιζανιοκτόνα περιορίζονται στη δεύτερη θέση με 29% και ακολουθούν τα εντομοκτόνα και τα ακαρεοκτόνα με 11%, ενώ όλοι οι υπόλοιποι τύποι φυτοπροστατευτικών προϊόντων κατέλαβαν συνολικά το 14% της Ευρωπαϊκής αγοράς (Σχήμα 2.5). Στην συνέχεια του κεφαλαίου, περιγράφεται η συνεισφορά κάθε δραστικής ομάδας στην συνολικό ποσοστό των χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων ανά χώρα. (Eurostat, 2016).



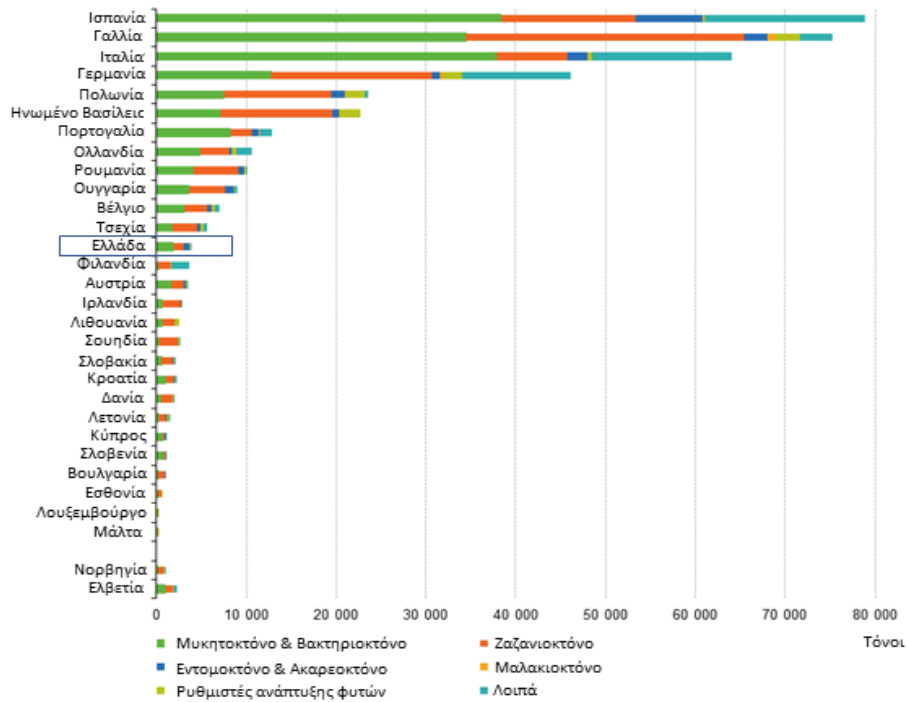
**Σχήμα 2.5:** Πωλήσεις φυτοφαρμάκων ανά κατηγορία στην Ευρωπαϊκή αγορά (Πηγή: Eurostat 2016)

Μεταξύ των 20 κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα πλήρη στοιχεία, η Ισπανία, η Γαλλία, η Ιταλία και η Γερμανία αντιπροσωπεύουν το 79% των συνολικών πωλήσεων φυτοφαρμάκων για το 2016. Γεγονός που είναι απόλυτα λογικό, αν αναλογιστούμε ότι αυτές οι χώρες, αποτελούν τους κύριους γεωργικούς παραγωγούς της ΕΕ, αντιπροσωπεύοντας περίπου το μισό (46%) της συνολικής χρησιμοποιούμενης γεωργικής έκτασης της ΕΕ και το μισό (47%) της συνολικής καλλιεργήσιμης γης (Eurostat, 2016).

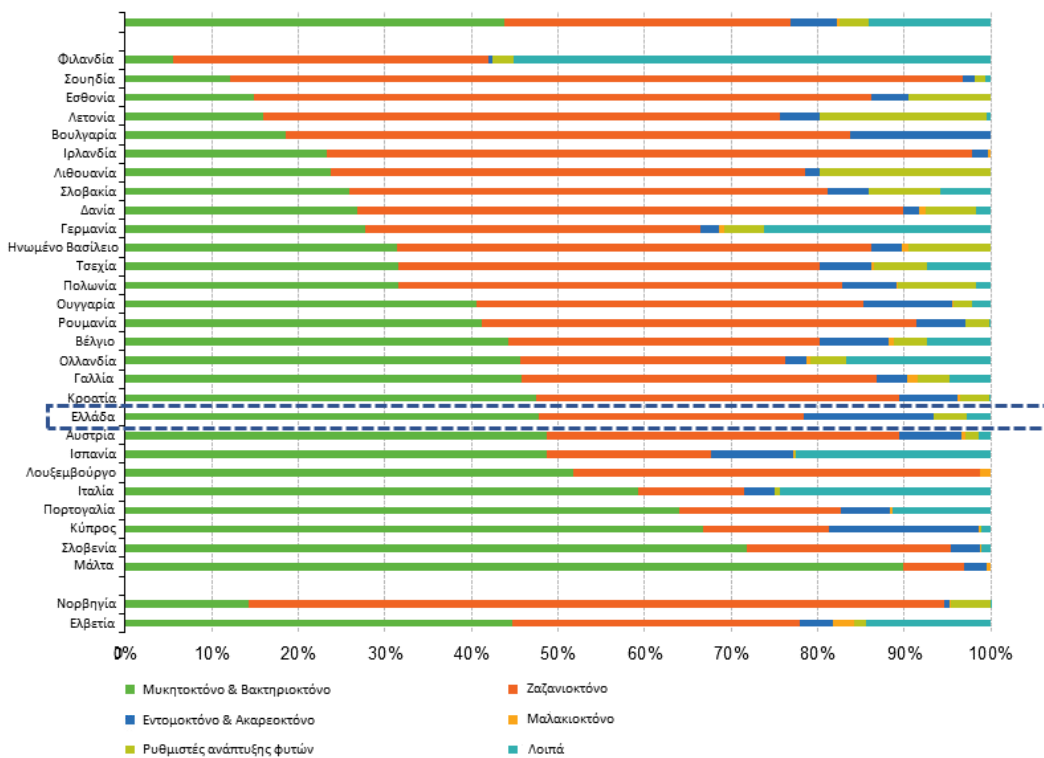
Στα Σχήματα 2.6 και 2.7 που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι ποσότητες σε τόνους και τα επί της % ποσοστά φυτοπροστατευτικών ενώσεων ανά κατηγορία δραστικής ένωσης που καταναλώθηκαν το 2016 σε κάθε μία από τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η Ελλάδα ως προς τους τόνους χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων κατατάσσεται στην 13 θέση, ακολουθώντας το γενικό μοτίβο μεγαλύτερης εφαρμογής μυκητοκτόνων και βακτηριοκτόνων, στη συνέχεια ζιζανιοκτόνων και τέλος εντομοκτόνων και ακαρεοκτόνων.

Τα μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα αποτελούν τις ομάδες γεωργικών φαρμάκων με τις μεγαλύτερες πωλήσεις 46% και μαζί με τα ζιζανιοκτόνα, τα μυκητοκτόνα, τα εντομοκτόνα και τα ακαρεοκτόνα αποτελούν το 94% του συνολικού ποσοστού. Τέλος, το ποσοστό συμπληρώνουν οι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών που αποτελούν μόλις το 5% και τα μαλακιοκτόνα που κατέλαβαν το μικρότερο ποσοστό περίπου 1%.





Σχήμα 2.6: Πωλήσεις φυτοφαρμάκων σε τόνους ανά κατηγορία και χώρα



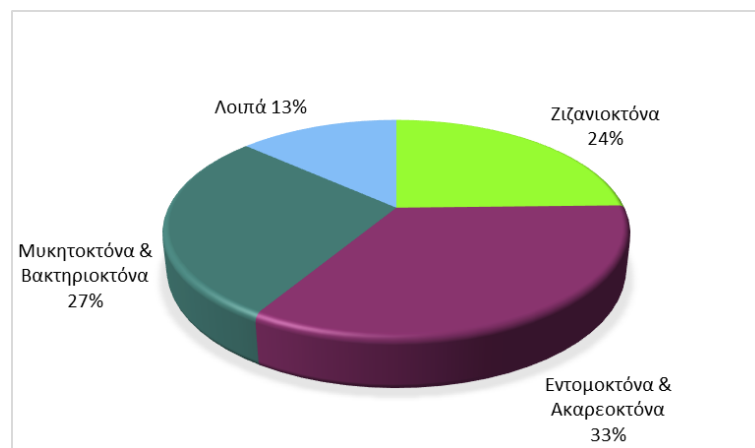
Σχήμα 2.7: Ποσοστά πωλήσεων φυτοφαρμάκων ανά κατηγορία και χώρα

### 2.13 Στατιστικά δεδομένα εθνικής αγοράς φυτοφαρμάκων

Στην Ελλάδα το σύνολο της γεωργικής γης ανέρχεται κατά προσέγγιση σε 51.780.000 στρέμματα (Eurostat, 2012). Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων το 2014, το 54,6% της συνολικής καλλιεργήσιμης έκτασης χρησιμοποιείται για αροτραίες καλλιέργειες, το 32% για μόνιμες καλλιέργειες (κυρίως δενδροκομικές), το 2,8% για κηπευτικές καλλιέργειες, ενώ το 10,6% αντιστοιχεί σε αγραναπαύσεις. Η Ελλάδα είναι από τις λίγες χώρες της ΕΕ που παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό δενδρωδών καλλιεργειών στο σύνολο των καλλιεργούμενων εκτάσεων. Η συνολική αξία της γεωργικής παραγωγής στην Ελλάδα ανέρχεται σε 9,7 δις ευρώ. Από αυτό το σύνολο, το 69% αντιστοιχεί στην φυτική παραγωγή και παίζει σημαντικό ρόλο στην αγροτική οικονομία της χώρας.

Σε εθνικό επίπεδο το μέγεθος της εγχώριας αγοράς από όλες τις εταιρείες μέλη του Ε.ΣΥ.Φ (Ελληνικός Σύνδεσμος Φυτοπροστασίας), διαμορφώθηκε από τα 199.3 εκατομμύρια ευρώ το 2004, σε 170,5 εκατομμύρια ευρώ το 2011. Παρατηρείται μία συρρίκνωση της αγοράς αυτών των προϊόντων κυρίως μετά το 2004 στην Ευρώπη, λόγω της επίδρασης των αυστηρών θεσμικών κανόνων που αφορούν την παραγωγή, έγκριση, διάθεση και χρήση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Η ίδια πτωτική τάση όσον αφορά της πωλήσεις, παρατηρήθηκε και στην Ευρώπη σύμφωνα με τα τελευταία επικαιροποιημένα στατιστικά στοιχεία για τα έτη 2012 και 2013.

Στην Ελληνική αγορά, τα εντομοκτόνα κατακτούν το μεγαλύτερο μερίδιο με 33% και ακολουθούν τα μυκητοκτόνα με 27% και τα ζιζανιοκτόνα με 24% ενώ όλοι οι υπόλοιποι τύποι γεωργικών φαρμάκων καταλαμβάνουν συνολικά το 13% της συνολικής αξίας της αγοράς (Σχήμα 2.8).



**Σχήμα 2.8:** Εγχώρια κατανομή φυτοφαρμάκων ανά κατηγορία δραστικής ουσίας

Στην παρούσα Διατριβή, επιλέχθηκε να αναφερθούν δεδομένα ως προς τις πωλήσεις, ποσότητες και κατανομές ανά δραστική ουσία για τα τελευταία επτά έτη. Σύγκριση με παλαιότερα έτη θα ήταν εσφαλμένη, εξαιτίας των εσωτερικών ανακατατάξεων ορισμένων φυτοφαρμάκων μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών.

Επιπρόσθετα, παράγοντας που περιπλέκει επιπλέον τη σύγκριση είναι αφενός η ιδιότητα μερικών δραστικών ενώσεων να παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης ανήκοντας σε δύο κατηγορίες ταυτόχρονα και αφετέρου ορισμένα νέα εντομοκτόνα που προστίθενται στις επιτρεπόμενες λίστες, τα οποία είναι αποτελεσματικά σε μικρότερες ποσότητες σε σχέση με το απαγορευμένο εντομοκτόνο που αντικαθιστούν (ΕΕΑ, 2018).

Δυστυχώς και στην Ελλάδα όπως και παγκοσμίως, το πρόβλημα των παράνομων προϊόντων είναι αισθητό. Ως εκ τούτου, γίνεται αντιληπτό, ότι όλα τα παραπάνω στατιστικά στοιχεία αφορούν την χρήση των πιστοποιημένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων από τους καλλιεργητές και αδυνατώντας να εμφανίσουν τις συνολικές διακινούμενες ποσότητες.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΜΙΚΡΟΥΡΥΠΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΟΝΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

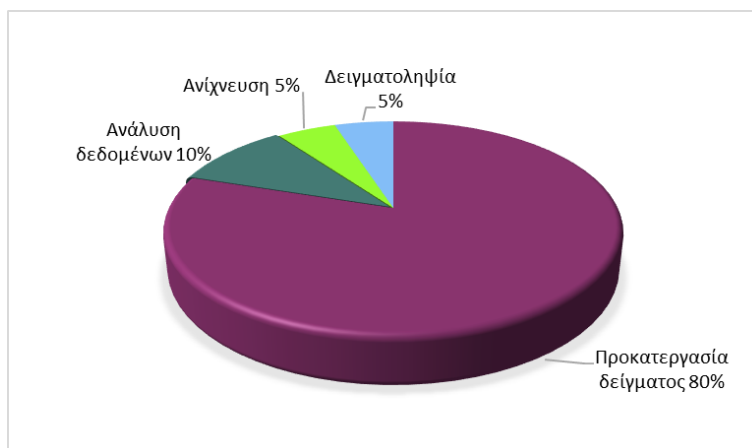
#### 3.1 Εισαγωγή

Ο προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε περιβαλλοντικά υποστρώματα αποτελεί μία σχετικά σύνθετη διαδικασία καθώς οι συγκεντρώσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα υδάτινα συστήματα είναι πολύ χαμηλές της τάξης ng/L (Cruzeiro et al., 2017; Kapsi et al., 2019 και Starling et al., 2019). Η συνύπαρξη παρεμποδιζουσών ενώσεων καθώς επίσης και οι διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων, δυσχεραίνουν σημαντικά τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων (González-Fuenzalida et al., 2019). Για το λόγο αυτό, προηγείται ένα στάδιο διαχωρισμού κατά το οποίο είτε απομακρύνονται οι παρεμποδιζουσες ουσίες είτε απομονώνονται οι προσδιοριζόμενες ενώσεις (Δεληγιαννάκης Ι., 2010). Η εκχύλιση, είναι μία από τις κατ' εξοχήν χρησιμοποιούμενες μεθόδους διαχωρισμού.

Οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων διακρίνονται σε μονοδύναμες (single-residue) όταν προσδιορίζεται ένας ρύπος, και σε πολύ-υπολειμματικές (multi-residue) όταν προσδιορίζονται ταυτόχρονα πολλοί ρύποι ή ομάδες ρύπων (Andrade-Eiroa et al., 2016a). Παρά τη μεγάλη τεχνολογική πρόοδο, οι περισσότερες ενόργανες διατάξεις που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση, αδυνατούν να αναλύσουν απευθείας την μήτρα των δειγμάτων και έτσι ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της προκατεργασίας του δείγματος, είναι απαραίτητο. Η προκατεργασία αποσκοπεί:

- Στον καθαρισμό, του προς ανάλυση δείγματος, από τυχόν παρεμποδίσεις με σκοπό να βελτιωθεί η ευαισθησία και η εκλεκτικότητα της μεθόδου
- Στην απομόνωση και παραλαβή του αναλύτη
- Στην εκλεκτική προσυγκέντρωσή του
- Στην τροποποίηση του υποστρώματος έτσι ώστε να είναι συμβατό με την χρησιμοποιούμενη ενόργανη διάταξη.

Μία αναλυτική διεργασία, αποτελείται από πολλά επιμέρους στάδια, κάθε ένα από τα οποία συμβάλλουν στο συνολικό σφάλμα και στην επαναληψιμότητα της μεθόδου. Η μέθοδος προκατεργασίας εξαρτάται από την πολυπλοκότητα του υποστρώματος, τις ιδιότητες του και το αναμενόμενο επίπεδο συγκέντρωσης της υπό μελέτης ένωσης (Pérez-Fernández et al., 2017). Το πιο σύνθετο και χρονοβόρο στάδιο είναι αυτό της προκατεργασίας του δείγματος και αποτελεί περίπου το 80% του ολικού χρόνου ανάλυσης. Στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζεται η κατανομή του χρόνου μίας αναλυτικής διεργασίας.



Σχήμα 3.1: Κατανομή χρόνου αναλυτικής διεργασίας

Μία ιδανική τεχνική προκατεργασίας δείγματος θα πρέπει εκτός από αποτελεσματική, να είναι εκλεκτική, απλή, να παρέχει επαναλήψιμα αποτελέσματα, να χρησιμοποιεί μικρούς όγκους οργανικών διαλυτών, οικονομική καθώς επίσης να μπορεί ταυτόχρονα να διαχωρίζει και να προσυγκεντρώνει τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Να παρέχει την δυνατότητα αυτοματοποίησης και εφαρμογής απ' ευθείας στο πεδίο δειγματοληψίας καθώς επίσης να παρουσιάζει μεγάλο αριθμό εφαρμογών. Όσον αφορά τα αποτελέσματα, να είναι αξιόπιστα, εκλεκτικά και επαναλήψιμα.

Όλες οι παραπάνω απαιτήσεις, δημιούργησαν την ανάγκη τροποποίησης ή ακόμα και αντικατάστασης των κλασικών τεχνικών με σύγχρονες. Η πιο διαδεδομένη τεχνική των τελευταίων δεκαετιών που αφορά την εκχύλιση οργανικών ενώσεων από υδατικά υποστρώματα, είναι η υγρή στερεή εκχύλιση (Solid-phase extraction, SPE). Αποτελεί την αναλυτική τεχνική εκχύλισης που προτείνεται από διάφορους οργανισμούς προστασίας του Περιβάλλοντος, για τον προσδιορισμό ρύπων προτεραιότητας στο περιβάλλον (Llompart et al., 2019).

Στην παρούσα Διατριβή, η SPE (Παράγραφος 3.2.2) εφαρμόστηκε για την εκχύλιση των υδατικών δειγμάτων και συγκρίθηκε ως προς τα αναλυτικά χαρακτηριστικά με την σύγχρονη

μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης που περιγράφεται εκτενώς στην Παράγραφο 3.2.4. Επιπλέον, αναφορικά με τα στερεά υποστρώματα των δειγμάτων που μελετήθηκαν σε αυτήν την Διατριβή (ψάρια, αχινοί, μύδια, ιζήματα και Lemna Minor) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος QuEChERS (παράγραφος 3.3.1).

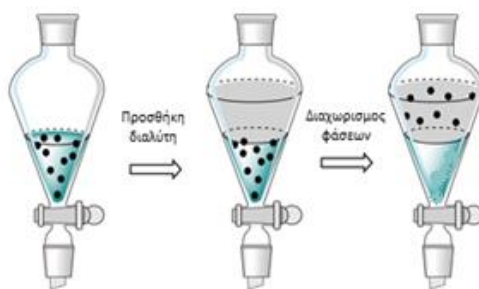
## 3.2 Τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από υγρά υποστρώματα

### 3.2.1. Υγρή- Υγρή Εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Η υγρή- υγρή εκχύλιση αποτελεί μία κλασική μέθοδο προσδιορισμού ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Βασίζεται στην κατανομή της διαλυμένης ουσίας, μεταξύ υδατικού δείγματος και ενός μη αναμειξιμού με το νερό οργανικού διαλύτη, εντός διαχωριστικής χοάνης (separating funnels) (Σχήμα 3.2) (Lehotay et al., 2005. και Yan et al., 2014).

Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης εξαρτάται από τον συντελεστή κατανομής, ο οποίος εκφράζει την χημική συγγένεια του διαλύτη με τον αναλύτη. Οι συνηθέστεροι διαλύτες στην εκχύλιση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων είναι το εξάνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, το ακετονιτρίλιο, το διχλωρομεθάνιο ή μίγματά του με ακετόνη. Από τους διαλύτες αυτούς το διχλωρομεθάνιο χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της υψηλής πτητικότητάς του και της δυνατότητάς του να εκχυλίζει μεγάλου εύρους πολικότητας ενώσεις (Caldas et al., 2016).

Αν και παρουσιάζει μεγάλο αριθμό εφαρμογών, υπάρχει μία τάση αντικατάστασης της LLE, λόγω σημαντικών μειονεκτημάτων. Αποτελεί μία χρονοβόρα τεχνική η οποία δεν προσφέρεται για όλες τις ομάδες των ενώσεων. Δεν είναι συμβατή με όλους τους διαλύτες, καθώς είτε αναμειγνύονται με το νερό είτε σχηματίζονται γαλακτώματα. Απαιτείται κατανάλωση μεγάλων όγκων τοξικών, εύφλεκτων διαλυτών υψηλής καθαρότητας, με μεγάλο οικονομικό κόστος και μικρή εκλεκτικότητα. Περιλαμβάνει συνήθως πολλά στάδια κατά τα οποία είναι πιθανή η απώλεια μέρους των ενώσεων που εκχυλίζονται και απαιτείται επιμελής καθορισμός των συσκευών για την αποφυγή επιμολύνσεων.

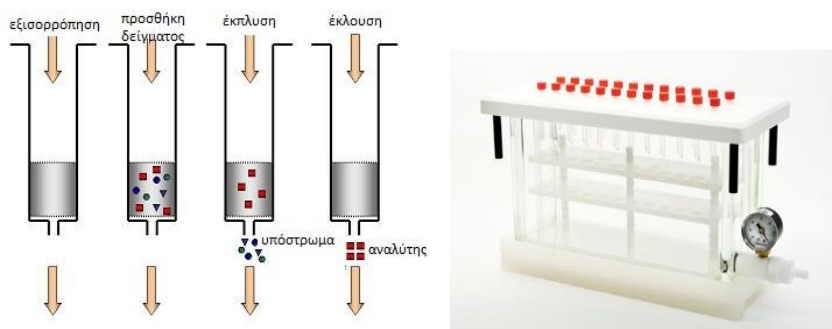


Σχήμα 3.2: Πειραματική πορεία υγρής- υγρής εκχύλισης (LLE)

### 3.2.2 Υγρή-στερεή εκχύλιση (Solid Phase Extraction, SPE)

Η τεχνική της υγρής-στερεής εκχύλισης είναι μία ταχεία, αποτελεσματική τεχνική για την εκλεκτική απομόνωση, προσυγκέντρωση και παραλαβή των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις κλασικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος και είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης. Συνδυάζει την δράση μίας στατικής φάσης (προσοροφητικό) και μίας κινητής φάσης (διαλύτης έκλουσης). Τα στάδια της SPE (Σχήμα 3.3) διακρίνονται στην:

- Ενεργοποίηση του προσροφητικού
- Εκχύλιση του δείγματος
- Έκπλυση του προσροφητικού υλικού για την απομάκρυνση παρεμποδίζουσών ενώσεων
- Εκρόφηση και ανάκτηση των προς ανάλυση ενώσεων.



**Σχήμα 3.3:** Πειραματική πορεία SPE (με χρήση μικροστηλών) και συσκευή εκχύλισης

Η προσρόφηση και η κατανομή είναι οι δύο μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η τεχνική της SPE. Η απομόνωση οργανικών ενώσεων, που βρίσκονται διαλυμένες στο νερό, προσροφώνται στην επιφάνεια προσροφητικών υλικών. Τα συνηθέστερα προσροφητικά υλικά είναι ο ενεργός άνθρακας και τα πορώδη πολυμερή.

Η προσροφητική ικανότητά τους, εξαρτάται τόσο από τις συνθήκες παρασκευής όσο και από την σύστασή τους. Ο ενεργός άνθρακας είναι από τα πρώτα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση φυτοπροστατευτικών ενώσεων από υδατικά δείγματα. Το πλεονέκτημά του είναι η υψηλή συγκράτηση μη πολικών έως μετρίως πολικών ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος καθώς και των μεταβολιτών τους. Τα πολυμερή υλικά χρησιμοποιήθηκαν λόγω της ομοιογένειας που παρουσιάζουν στη δομή τους, παρουσιάζοντας επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η επιλογή του κατάλληλου δίσκου εκχύλισης



ή της μικροστήλης, παίζει καθοριστικό ρόλο στην επίτευξη υψηλών ανακτήσεων, και στον προσδιορισμό των αναλυτών (Andrade-Eiroa et al., 2016b).

Η εκχύλιση είναι αποτέλεσμα των ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων των ιοντικών δυνάμεων που συγκρατούν τις διαλυμένες ουσίες στο νερό και των δυνάμεων διάχυσης που προκαλούν την μεταφορά των ενώσεων από το υδατικό μέσο στα προσδεμένα οργανικά μόρια που βρίσκονται στην προσροφητική επιφάνεια. Η κατακράτηση των αναλυτών στην επιφάνεια του προσροφητικού, επιτυγχάνεται με ισχυρές αλλά αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενώσεων και του προσροφητικού. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, μπορεί να είναι οι υδρόφοβες δυνάμεις (δεσμοί Van Der Waals), οι πολικές (δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις διπόλου-διπόλου), καθώς και αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατική φύσης, οι οποίες εντοπίζονται στα συστήματα ιονταλλαγής.

Για την επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού θα πρέπει να μελετηθούν οι ιδιότητες, η φύση του προσροφητικού υλικού, οι λειτουργικές ομάδες των προς ανάλυση ενώσεων, οι ενέργειες των δεσμών που δημιουργούνται, οι δευτερεύουσες επιδράσεις και οι αλληλεπιδράσεις του προσροφητικού υλικού με τις προς ανάλυση ενώσεις και τα συστατικά του υποστρώματος.

Με επιλογή κατάλληλου επιφανειακά τροποποιημένου υλικού, οι ενώσεις κατανέμονται στην επιφάνειά του και απομακρύνονται από το νερό. Μετά την εκχύλιση οι ενώσεις εκροφώνται από τα προσροφητικά υλικά με μικρό όγκο οργανικών διαλυτών (με μεγαλύτερο συντελεστή διάχυσης). Ο συντελεστής κατανομής σε ένα δεδομένο σύστημα πολυμερούς-υποστρώματος-διαλύτη θα πρέπει να ευνοεί τη μεταφορά των ενώσεων στο διαλύτη έκλουσης (Andrade-Eiroa et al., 2016a).

Παράγοντες βελτιστοποίησης της SPE, αποτελούν η επιλογή του προσροφητικού και των διαλυτών (ενεργοποίησης και έκλουσης), η ιοντική ισχύς και το pH του δείγματος, η ταχύτητα ροής του δείγματος μέσα από το προσροφητικό υλικό, ο όγκος του δείγματος και του διαλύτη έκλουσης και ο χρόνος ξήρανσης του προσροφητικού υλικού πριν την έκλουση.

Συγκριτικά με την εκχύλιση υγρού-υγρού, η SPE, παρουσιάζει υψηλότερες ανακτήσεις και μεγαλύτερο παράγοντα προσυγκέντρωσης (Preconcentration Factor, PF). Η χρήση οργανικών διαλυτών είναι περιορισμένη και η πληθώρα εμπορικά διαθέσιμων προσροφητικών με διαφορετικές ιδιότητες, παρέχουν ευκολία προσαρμογής και αυτοματοποίηση της διαδικασίας, σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ο μικρός εξοπλισμός που απαιτείται κατά την εφαρμογή, δίνει την δυνατότητα ανάλυσης απευθείας στο πεδίο δειγματοληψίας. Επιπλέον τα προσροφητικά υλικά μπορούν να αποθηκευτούν μετά την

εκχύλιση των δειγμάτων, αποφεύγοντας έτσι την μεταφορά, την αποθήκευση και την συντήρηση μεγάλου όγκου δειγμάτων.

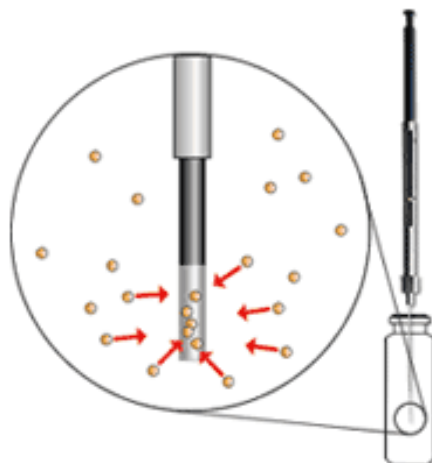
### 3.2.3 Μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro-Extraction, SPME)

Η μέθοδος μικρο-εκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) αποτελεί μία σύγχρονη τεχνική διαχωρισμού που συνδυάζει την ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των οργανικών ενώσεων (πολικών και μη), με άμεση ανάλυσή τους σε ένα σύστημα χρωματογραφίας (αέριας ή υγρής). Κατά τον διαχωρισμό με υγρή χρωματογραφία, η ίνα συνδέεται με κατάλληλη βαλβίδα δύο θέσεων, στην οποία οι ενώσεις παραλαμβάνονται με την βοήθεια της κινητής φάσης. Η SPME μειώνει το χρόνο, το κόστος εργασίας και την επίδραση της μήτρας, αλλά από την άλλη μεριά και την ευαισθησία. Συγκριτικά με την SPE, παρουσιάζει μικρότερη ακρίβεια (Bonansea et al., 2013 και Domínguez et al., 2016). Προϋπόθεση εφαρμογής, αποτελεί το γεγονός ότι το διάλυμα θα πρέπει να είναι ομογενές να μην υπάρχει διαφυγή αναλυτών στην αέρια φάση.

Στο πρώτο στάδιο, μια ίνα λίγων εκατοστών και μικρής διαμέτρου από τετηγμένο διοξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) επικαλυμμένη με μια στατική φάση (coating) από πολυμερές υλικό (πολύδιμεθυλοσιλοξάνιο, PDMS), εκτίθεται στο δείγμα και οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ υποστρώματος και πολυμερούς υλικού (στατική φάση) (Llompart et al., 2019). Σε δεύτερο στάδιο, η ίνα μεταφέρεται στον εισαγωγέα του χρωματογράφου για εκρόφηση. Λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας του πολυμερούς υλικού, δεν απαιτείται ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού.

Η προσρόφηση δεν πραγματοποιείται ποσοτικά, αλλά αποκαθίσταται μια ισορροπία κατανομής των συστατικών μεταξύ δείγματος και στατικής φάσης ίνας. Τυπικά, η εκχύλιση με την τεχνική SPME θεωρείται ότι ολοκληρώνεται, όταν επέρχεται ισορροπία μεταξύ υποστρώματος και πολυμερούς. Αυτό πραγματικά σημαίνει ότι το ποσό του επιθυμητού συστατικού που εκχυλίζεται είναι σταθερό μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και ανεξάρτητο του χρόνου εκχύλισης.

Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της SPME αποτελεί το υλικό επίστρωσης της ίνας, η ιοντική ισχύς του διαλύματος (αναλόγως της προσδιοριζόμενης ένωσης), ο χρόνος εκχύλισης και εκρόφησης, η ρύθμιση του pH (συγκριτικά με το  $pK_a$  των προσδιοριζόμενων ενώσεων), ο ρυθμός ανάδευσης καθώς και η θερμοκρασία συγκριτικά με την πτητικότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης (Llompart et al., 2019).



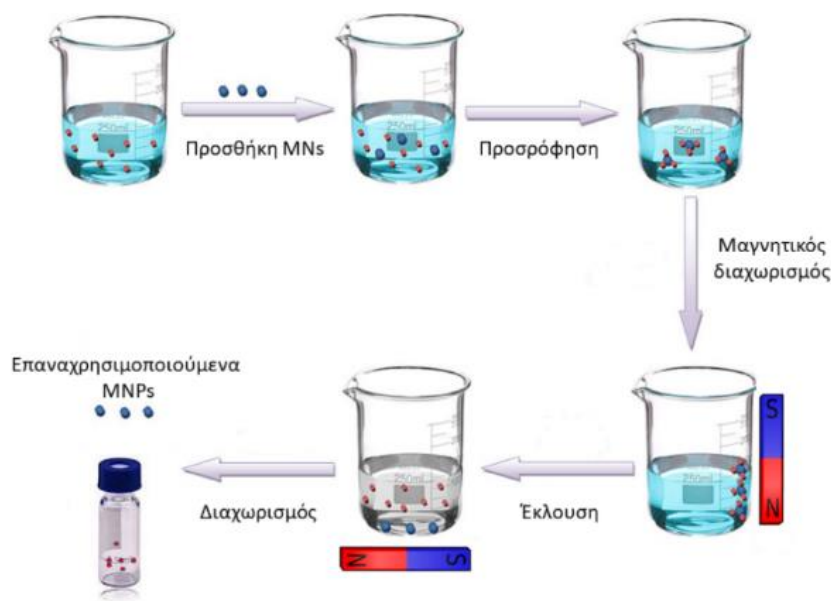
**Σχήμα 3.4:** Τεχνική μικρο-εκχύλισης στερεάς φάσης (Schmidt and Podmore, 2015)

### 3.2.4 Μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης (Magnetic Solid Phase extraction, MSPE)

Στη μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης (MSPE), τα μαγνητικά σωματίδια (Magnetic Particles, MPs) προστίθενται στο δείγμα και οι προσδιοριζόμενες ενώσεις προσροφώνται στην επιφάνεια των σφαιριδίων (Rodríguez-González et al., 2016). Στην συνέχεια, το σωματίδια απομονώνονται από το δείγμα μέσω εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και ακολουθεί εκρόφηση των αναλυτών με διαλύτη έκλουσης. Η πειραματική πορεία παρουσιάζεται στην Σχήμα 3.5.

Η MSPE «υπερνικά» προβλήματα κλασικών τεχνικών που σχετίζονται με την πλήρωση μίας στήλης και οδηγεί σε ευκολότερο και γρηγορότερο διαχωρισμό της προσδιοριζόμενης ένωσης. Σε σύγκριση με τη συμβατική SPE, η προκατεργασία του δείγματος απλοποιείται εξαιρετικά καθώς δεν απαιτείται επιπλέον στάδιο καθαρισμού και οι χρόνοι εκχύλισης περιορίζονται μόλις σε μερικά λεπτά (González-Fuenzalida et al., 2019). Η μεγάλη ειδική επιφάνεια των μαγνητικών υλικών, έχει σαν αποτέλεσμα γρήγορη μεταφορά μάζας μεταξύ δείγματος και του προσροφητικού μέσου (Wang P. et al., 2018). Ο διαχωρισμός φάσης επιτυγχάνεται εύκολα και γρήγορα εφαρμόζοντας απλά ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (Aguilar-Arteaga et al., 2010). Αποτελεί μια τεχνική χαμηλού κόστους, καθώς δεν απαιτούνται μεγάλοι όγκοι οργανικών διαλυτών και τα σωματίδια που λειτουργούν ως προσροφητικά υλικά μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν.

Από την άλλη μεριά, βασικό μειονέκτημα της μεθόδου MSPE αποτελεί το γεγονός ότι δεν είναι πάντα εμπορικά διαθέσιμα μαγνητικά προσροφητικά υλικά με συγκεκριμένες ιδιότητες, επομένως είναι υποχρεωτική η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός τους.



**Σχήμα 3.5:** Πειραματική πορεία μαγνητικής εκχύλισης στερεάς φάσης- MSPE

Η MSPE, παρουσιάζει μεγάλο πεδίο εφαρμογών στη βιοτεχνολογία και στην ιατρική για το διαχωρισμό κυττάρων και την απομόνωση πρωτεϊνών, ενζύμων, ή πεπτιδίων. Τα τελευταία χρόνια όμως τα μαγνητικά σωματίδια χρησιμοποιούνται προσδιορισμό μεγάλου φάσματος αναλυτών (φυτοπροστατευτικών ενώσεων, φαρμακευτικών ουσιών, φθαλικών εστέρων, PCBs, UV φίλτρων κλπ.) (Giakisikli and Anthemidis, 2013; González-Fuenzalida et al., 2019 και Morrison et al., 2016).

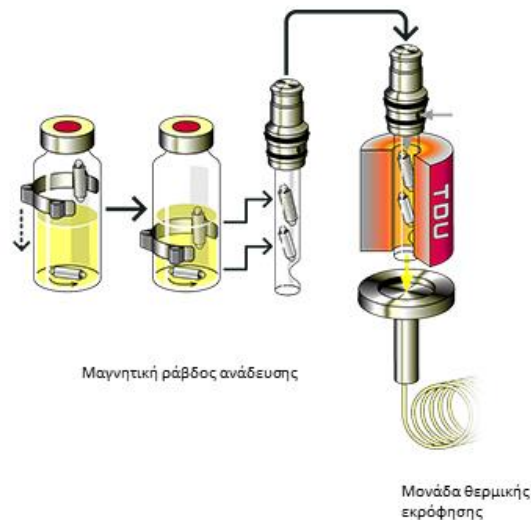
Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της MSPE αποτελεί η φύση του μαγνητικού υλικού που χρησιμοποιείται ως προσροφητικό, η ιοντική ισχύς του διαλύματος (ανάλογα με την προσδιοριζόμενη ένωση), ο χρόνος εκχύλισης και έκλουσης, η ρύθμιση του pH (ανάλογα με το pKa των προσδιοριζόμενων ενώσεων) και ο ρυθμός ανάδευσης.

### 3.2.5 Εκχύλιση με προσρόφηση σε μαγνήτη ανάδευσης (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE)

Αν και η SBSE βασίζεται στις ίδιες αρχές με την SPME, παρουσιάζει πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (έως και 1000 φορές χαμηλότερα της SPME). Η συσκευή SBSE αποτελείται από έναν μαγνήτη ανάδευσης (stir bar), ενσωματωμένο σε ένα γυάλινο περίβλημα επικαλυμμένο με πολυμερή φάση polydimethylsiloxane (PDMS). Η PDMS λειτουργεί ως το προσροφητικό υλικό πυριτίας στην εκχύλιση (Gilart et al., 2014 και Pastor-Belda et al., 2020).

Ο μαγνήτης ανάδευσης εισέρχεται στο δείγμα το οποίο αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα, επιτυγχάνοντας έτσι την εκχύλιση των αναλυτών (Σχήμα 3.6). Αυτή η μη-πολική

πολυμερής φάση προωθεί υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων και η συγκράτηση ουσιαστικά επιτυγχάνεται με δυνάμεις Van-Der-Waals. Ανάλογα με την δομή των αναλυτών, μπορούν να δημιουργηθούν και δεσμοί υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου του πολυμερούς. Τέλος, η θερμική εκρόφηση λαμβάνει χώρα μέσα στην μονάδα θερμικής εκρόφησης (TDU), όπου τοποθετείται ο γυάλινος σωλήνας.



**Σχήμα 3.6:** Πειραματική πορεία SBSE συζευγμένη με αέριο χρωματογράφο (Marsili and Laskonis, 2019)

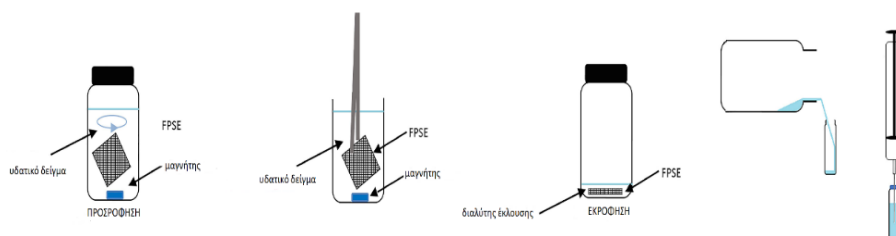
Το PDMS παρουσιάζει ενδιαφέρουσες θερμο-σταθερές ιδιότητες επιτρέποντάς του να λειτουργεί σε υψηλές θερμοκρασίες. Γι' αυτό τον λόγο η MSPE, η οποία είναι απαλλαγμένη από την χρήση οργανικών διαλυτών, αρχικά είχε συνδεθεί με θερμική εκρόφηση σε αέριο χρωματογράφο. Η SBSE βρίσκει εφαρμογή στον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε υδατικά δείγματα (Huang et al., 2018 και Madej et al., 2019).

### 3.2.6 Εκχύλιση με προσρόφηση σε ύφασμα (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE)

Το 2014 οι Kabir και Furton, ανέπτυξαν μία νέα τεχνική προκατεργασίας δείγματος αυτήν της εκχύλισης με προσρόφηση σε ύφασμα (FPSE) (Kabir and Furton, 2014). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ως προσροφητικό υλικό ένα υφασμάτινο μέσο (φυσικό ή συνθετικό), επικαλυμμένο χημικά με μία λεπτή στοιβάδα οργανικού-ανόργανου υβριδικού προσροφητικού, το οποίο μπορεί να εμβαπτίζεται στο δείγμα, με σκοπό την προσρόφηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων (Montesdeoca-Esponda et al., 2018).

Η πειραματική πορεία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του μέσου με χρήση κατάλληλου διαλύτη. Στην συνέχεια, το προσροφητικό υλικό εισέρχεται με βοήθεια λαβίδας

σε φιαλίδιο που περιέχει το δείγμα υπό ανάδευση. Το προσροφητικό υλικό παραλαμβάνεται με τη βοήθεια λαβίδας, και εμβαπτίζεται σε φιαλίδιο που περιέχει τον διαλύτη έκλουσης. Ακολουθεί έγχυση σε σύστημα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας. Η πειραματική πορεία, περιγράφεται στο Σχήμα 3.7.



**Σχήμα 3.7:** Πειραματική πορεία τεχνικής Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE)

(Πηγή: (Montesdeoca-Esponda et al., 2018).

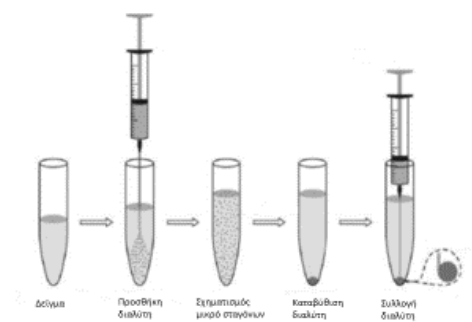
Η FSPE είναι μία γρήγορη και ευαίσθητη τεχνική, που πλεονεκτεί έναντι άλλων μεθόδων, καθώς δεν απαιτείται καμία τροποποίηση των δειγμάτων και επιτρέπεται η άμεση εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Τα επικαλυμμένα με sol-gel προσροφητικά, παρουσιάζουν υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα, λόγω της ισχυρής ομοιοπολικής σύνδεσης μεταξύ υποστρώματος και προσροφητικού. Επίσης, διευκολύνουν την προσρόφηση και την εκρόφηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων λόγω μεγάλης επιφάνειας. Η FSPE, είναι συμβατή με μεγάλο εύρος διαλυτών, επιτυγχάνοντας υψηλό παράγοντα προσυγκέντρωσης με μικρό όγκο διαλύτη. Συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της κλασικής εκχύλισης στερεάς φάσης, που πραγματοποιείται με εκχύλιση, και της μικρο-εκχύλισης στερεάς φάσης που πραγματοποιείται με την επίτευξη ισορροπίας. Η ελαχιστοποίηση των βημάτων προκατεργασίας δείγματος, οδηγεί στην εξάλειψη σφαλμάτων που εμφανίζονται στις κλασικές προκατεργασίες δειγμάτων.

Τα τελευταία χρόνια, η FPSE έχει εφαρμοστεί επιτυχώς στην εκχύλιση και τον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά, βιολογικά υποστρώματα και σε δείγματα τροφίμων (Liouri et al., 2019; Pérez-Fernández et al., 2017 και Yang et al., 2018).

### 3.2.7 Υγρή-υγρή μικρο-εκχύλιση διασποράς (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME)

Η τεχνική της υγρής-υγρής μικρο-εκχύλισης διασποράς, αναπτύχθηκε το 2006 και αφορά σε ένα τριαδικό σύστημα διαλυτών (Mansour and Danielson, 2018). Βασίζεται στην

σχετική διαλυτότητα των αναλυτών σε δύο μη αναμίξιμα υγρά. Η αποτελεσματικότητά της στηρίζεται στην επιλογή κατάλληλων διαλυτών εκχύλισης και διασποράς. Απαραίτητη προϋπόθεση στην επιλογή του διαλύτη εκχύλισης είναι να έχει πυκνότητα μεγαλύτερη από αυτή του νερού ενώ ο διαλύτης διασποράς να είναι αναμειξίμος με τον διαλύτη εκχύλισης και το υδατικό διάλυμα. Στη συνέχεια οι διαλύτες εκχύλισης και διασποράς αναμειγνύονται και εμβολιάζονται απευθείας εντός του υδατικού διαλύματος με τη βοήθεια σύριγγας. Το μείγμα αναδεύεται, σχηματίζοντας πλήθος μικρών σταγόνων (θόλωμα) οι οποίες διασπείρονται σε όλη την επιφάνεια του υδατικού διαλύματος, αυξάνοντας έτσι την διεπιφάνεια του δείγματος με τον διαλύτη εκχύλισης (Σχήμα 3.8). Κατά την διάρκεια της διασποράς, πραγματοποιείται η εκχύλιση των αναλυτών μέσω μηχανισμών διάχυσης και προσρόφησης. Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται και ο διαλύτης εκχύλισης καταβυθίζεται. Συλλέγεται με τη βοήθεια σύριγγας και εγχέεται σε σύστημα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας (Ahmad et al., 2015; Mansour and Danielson, 2018 και Primel et al., 2017).



**Σχήμα 3.8:** Σχηματική αναπαράσταση της υγρης-υγρής μικρο-εκχύλισης διασποράς

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την DLLME είναι οι διαλύτες εκχύλισης και διασποράς, ο όγκος των διαλυτών, ο χρόνος της εκχύλισης καθώς επίσης και η ιοντική ισχύς.

Συγκριτικά με την LLE, παρουσιάζει μεγαλύτερη προσυγκέντρωση, υψηλότερες ανακτήσεις και χαμηλότερο κόστος (Rezaee et al., 2006). Η κατανάλωση μικρών όγκων διαλυτών την καθιστούν φιλική προς το περιβάλλον και σύμφωνη με τις απαιτήσεις της πράσινης χημείας. Δύναται να εφαρμοστεί σε πολύπλοκα υποστρώματα όπως τρόφιμα, βιολογικά και περιβαλλοντικά υποστρώματα.

### 3.3. Τεχνικές εκχύλισης οργανικών μικρορύπων από στερεά υποστρώματα

Αρκετές νέες τεχνικές αναπτύσσονται με σκοπό την εκχύλιση ενώσεων από στερεά, ημιστερεά και δείγματα υψηλού ιξώδους. Η πολύπλοκη φύση αυτών των υποστρωμάτων



όπως π.χ. των ιζημάτων και των θαλάσσιων οργανισμών, δυσχεραίνουν την επεξεργασία και την ανάλυσή τους. Παρά το συνεχές ενδιαφέρον για την εκτίμηση της ρύπανσης στερεών υποστρωμάτων, οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την εκχύλιση των οργανικών ρύπων παραμένουν πολύπλοκες, χρονοβόρες, με υψηλά ποσοστά σφάλματος και υψηλό κόστος.

Προκειμένου να απομονωθούν οι επιλεγμένες ενώσεις από τα πολύπλοκα υποστρώματα πραγματοποιείται ξήρανση (όπου είναι απαραίτητη ανάλογα με το υπόστρωμα), τεμαχισμός και ομογενοποίηση. Το στάδιο αυτό, είναι και το πιο σημαντικό για την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης καθώς επιτρέπει ευκολότερα στην αναλυόμενη ένωση να εκροφηθεί από την μήτρα και να διαλυθεί στον οργανικό διαλύτη. Στην συνέχεια, ακολουθεί διάχυση στο υπόστρωμα και διαλυτοποίηση των αναλυτών στον διαλύτη έκλουσης και έγχυση του διαλύτη στην ενόργανη διάταξη για περαιτέρω ανάλυση. Η επιλογή του διαλύτη επηρεάζει σημαντικά την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων καθώς επηρεάζει την διαλυτότητα των υπό μελέτη ενώσεων και την διεισδυτικότητά του με το δείγμα.

Οι κλασικές τεχνικές προκατεργασίας στερεών δειγμάτων, περιορίζονται στην εκχύλιση οργανικών ενώσεων με συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Αποτελούνται από πολλά στάδια, αυξάνοντας έτσι τον χρόνο ανάλυσης, το κόστος και τα συστηματικά σφάλματα. Για όλα τα παραπάνω, κατ' ομολογία με τα υδατικά υποστρώματα, υπάρχει τάση αντικατάστασης των κλασικών τεχνικών με βελτιωμένες παραλλαγές τους. Ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης ενώσεων από στερεά και ημι στερεά υποστρώματα αποτελεί η QuEChERS. Η τεχνική αυτή καλύπτει ευρύ φάσμα αναλυτών με επαναλήψιμα αποτελέσματα και αποτελεί αντικείμενο μελέτης της Διατριβής.

### 3.3.1 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe)

Η μέθοδος QuEChERS αναπτύχθηκε από τον Αναστασιάδη το 2003 στις (ΗΠΑ) στην ερευνητική ομάδα του Steven Lehotay (Anastassiades et al., 2003). Αποτελεί ακρωνύμιο των λέξεων *“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”* δηλαδή «Γρήγορα, εύκολα, φθηνά, αποτελεσματικά, τραχύ και ασφαλής». Αρχικά αναπτύχθηκε για προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά, δηλαδή υποστρώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (>75). Λόγω των τροποποιήσεων που επιδέχεται στην ποσότητα και στην φύση των αλάτων (εκχύλισης και καθαρισμού) και στην επιλογή του οργανικού διαλύτη, μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία σε υποστρώματα με ποσοστό υγρασίας μικρότερο από 20%, σε υποστρώματα με μεγάλο ιξώδες και σε ημι-στερεά (Anastassiades et al., 2003; Rejczak and Tuzimski, 2015 και Santana-Mayor et al., 2019).



Σήμερα παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών για τον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων (φυτοπροστατευτικές ενώσεις, φαρμακευτικές ουσίες, UV filters, δισφαινόλη Α και Β, μυκοτοξίνες, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες κ.α) σε υποστρώματα όπως τρόφιμα, θαλάσσιους και φυτικούς οργανισμούς, ιζήματα και βιολογικά δείγματα (νεφροί, ούρα, αίμα, μητρικό γάλα, ζωικοί ιστοί) (Barbieri et al., 2019; Ferronato et al., 2018; Kim et al., 2019; Musarurwa et al., 2019 και Santana-Mayor et al., 2019).

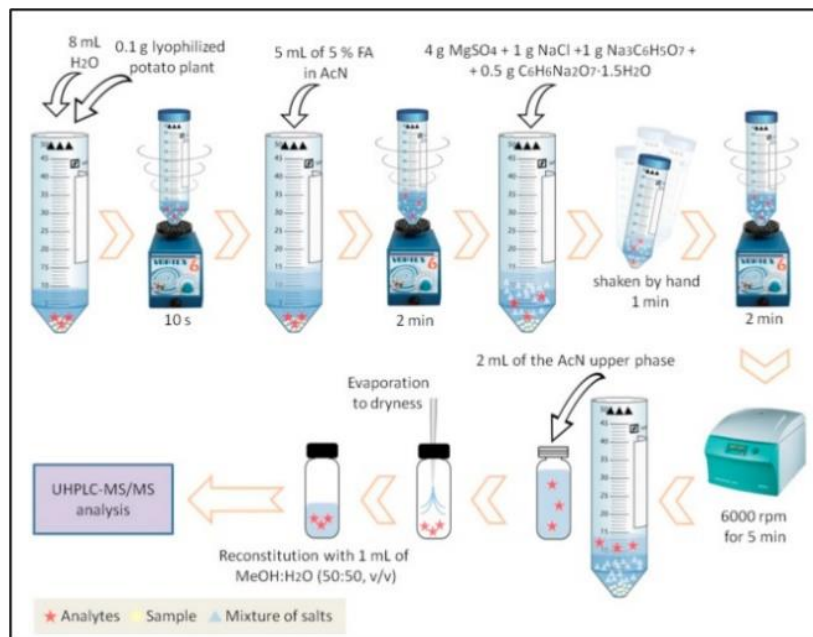
Πολλές παραλλαγές έχουν πραγματοποιηθεί στη μέθοδο με σκοπό την απομόνωση των επιθυμητών ενώσεων από το εκάστοτε υπόστρωμα. Δύο είναι οι βασικές παραλλαγές της πρωτότυπης μεθόδου (original), η European Standard Method EN 15662 και η AOAC Official Method 2007.01 (Kim et al., 2019 και Perestrelo et al., 2019). Στην EN 15662, όπως και στην original, το ακενοτρίλιο χρησιμοποιείται ως διαλύτης εκχύλισης. Εκτός από την προσθήκη NaCl για την απομάκρυνση των πολικών παρεμποδίσεων, περιλαμβάνει και ρυθμιστικά άλατα κιτρικού οξέος για τις ασταθείς σε βασικές τιμές pH ενώσεις. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο AOAC 2007.01, ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται το ακενοτρίλιο με προσθήκη 0.1% οξικού οξέος και ως ρυθμιστικά άλατα άνυδρο οξικό νάτριο προκειμένου να προστατευτούν ενώσεις που είναι ασταθείς σε ακραίες μεταβολές τιμών pH (Bruzzoniti et al., 2014; González-Curbelo et al., 2015 και Kim et al., 2019).

Ανεξάρτητα από την προσέγγιση που χρησιμοποιείται κάθε φορά, η βασική ιδέα της μεθόδου στηρίζεται σε ένα απλό στάδιο υγρής-υγρής/ στερεής εκχύλισης. Το τεμαχισμένο και ομογενοποιημένο δείγμα ζυγίζεται σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες από πολυαιθυλένιο και ακολουθεί εκχύλιση με το οργανικό διαλύτη παρουσία προσροφητικών και ρυθμιστικών αλάτων ανάλογα με την μέθοδο. Ύστερα από ισχυρή ανάδευση, το μείγμα φυγοκεντρείται για το διαχωρισμό των φάσεων.

Ακολούθως, η υπερκείμενη φάση υποβάλλεται σε περαιτέρω καθαρισμό (clean-up) με υγρή-στερεή εκχύλιση σε διασπορά (dispersive SPE). Μέρος του ακετονιτριλίου μεταφέρεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυαιθυλενίου που περιέχει προζυγισμένο συνδυασμό προσροφητικών αλάτων (González-Curbelo et al., 2015; Perestrelo et al., 2019 και Tripathy et al., 2019). Ύστερα από περιδίνηση και φυγοκέντρωση, το τελικό διάλυμα συλλέγεται και αναλύεται είτε απευθείας σε ενόργανη διάταξη υγρής ή αέριας χρωματογραφίας μετά από συμπύκνωση και επαναδιάλυση σε συμβατό διαλύτη (Σχήμα 3.9).

Το στάδιο του καθαρισμού, είναι απαραίτητο για επιβαρυμένα υποστρώματα και αποσκοπεί στην απομάκρυνση των παρεμποδίζουσών ενώσεων και του νερού. Για επιβαρυμένα υποστρώματα όπως λίπη, κηροί και σάκχαρα, συνίσταται η κατάψυξη των δειγμάτων αμέσως μετά την ομογενοποίηση, ως επιπλέον βήμα καθαρισμού. Με αυτόν τον

τρόπο, καθιζάνουν επιπλέον και συστατικά του υποστρώματος με μικρή διαλυτότητα στον οργανικό διαλύτη (Barbieri et al., 2019; Musarurwa et al., 2019 και Tripathy et al., 2019).



Σχήμα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση εκχύλιση QuEChERS

Η προσθήκη προσροφητικών κατά το στάδιο της εκχύλισης αποσκοπεί στον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων και τη σταθεροποίηση των δραστικών φυτοφαρμάκων, επομένως υψηλότερη ανάκτηση και εκλεκτικότητα για ευρύ φάσμα αναλυτών. Το θειικό μαγνήσιο (MgSO<sub>4</sub>) μειώνει τον όγκο της υδατικής φάσης βοηθώντας την κατανομή των πολικών αναλυτών στην οργανική φάση. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) βελτιώνει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης καθώς με μεταβολή της ποσότητας αυτού δύναται να ελεγχθεί η πολικότητα της μεθόδου και επομένως η ποσότητα των συνελκόμενων ουσιών στο εκχύλισμα. Τέλος, το οξικό νάτριο βοηθά στη διάλυση σφαιριδίων λίπους (Bruzzoniti et al., 2014 και González-Curbelo et al., 2015).

Ως διαλύτης εκχύλισης προτιμάται το ακετονιτρίλιο λόγω του ότι διαχωρίζεται από την υδατική φάση, παρέχοντας εκχυλίσματα απαλλαγμένα από παρεμποδίζουσες ενώσεις (χρωστικές, λίπη, σάκχαρα κ.α.) με υψηλές ανακτήσεις για διαφορετική πολικότητας ενώσεις (Kim et al., 2019). Παραλλαγές της πρωτότυπης μεθόδου (original), χρησιμοποιούν διαλύτες όπως η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας, ωστόσο αποφεύγονται καθώς η ακετόνη αναμειγνύεται με το νερό επομένως δυσκολεύεται ο διαχωρισμός των φάσεων. Ο οξικός αιθυλεστέρας αν και λιγότερο αναμειγνύεται με το νερό δεν παραλαμβάνει ποσοτικά τις πολικές ενώσεις (Arisekar et al., 2018).

Ανάλογα με το ποσοστό υγρασίας που υπάρχει στο υπόστρωμα, η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να διαφοροποιηθεί. Σε δείγματα που περιέχουν υψηλό ποσοστό νερού >60% (ψάρια, λαχανικά, φρούτα) η αναλογία νερού προς δείγματος που χρησιμοποιείται είναι 1:1, σε τελικό όγκο δείγματος 10 mL. Όμως στην περίπτωση δειγμάτων με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό <30% (μέλι, ξηροί καρποί, δημητριακά, ιχθυοτροφές), η ποσότητα του δείγματος μειώνεται και ακολουθεί συμπλήρωση με νερό. Είναι προτιμότερο το νερό να είναι κρύο (<10 °C) καθώς η προσθήκη των αλάτων αποτελεί εξώθερμη αντίδραση.

Η μέθοδος QuEChERS, πλεονεκτεί έναντι των κλασικών μεθόδων καθώς είναι εφικτή η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων (~20) ταυτόχρονα σε λιγότερο από μισή ώρα, χωρίς ιδιαίτερο εργαστηριακό εξοπλισμό και με χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων. Παρέχει υψηλές ανακτήσεις και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η απουσία χλωριωμένων διαλυτών και ο μικρός όγκος οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται, την καθιστούν συμβατή με τις απαιτήσεις της πράσινης χημείας (Santana-Mayor et al., 2019), ενώ η δυνατότητα αυτοματοποίησης, η μη απαίτηση ειδικού εξοπλισμού, η υψηλή εκλεκτικότητα χωρίς ιδιαίτερα σύνθετα στάδια καθαρισμού την πιο διαδεδομένη σύγχρονη τεχνική εκχύλισης (Bruzzoniti et al., 2014 και Rejczak and Tuzimski, 2015).

Σύμφωνα με την μηχανή αναζήτησης PubMed, από το έτος 2003 έως τον Νοέμβριο του 2019, έχουν δημοσιευθεί πάνω από 1562 άρθρα σχετικά με την QuEChERS. Στον Πίνακα 3.1 δίνονται συνοπτικά πληροφορίες βιβλιογραφικής ανασκόπησης σχετικά με την τεχνική εκχύλισης QuEChERS φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε ποικίλα υποστρώματα.

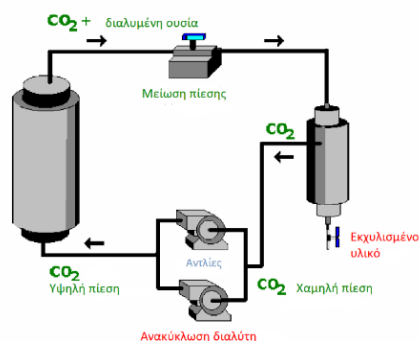
**Πίνακα 3.1:** Βιβλιογραφική ανασκόπηση φυτοπροστατευτικών ενώσεων με την τεχνική εκχύλισης QuEChERS

Τύπος εκχύλιση	Αναλύτης	Υπόστρωμα	Ενόργανη διάταξη	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	Αναφορά
AOAC QuEChERS	φυτοφάρμακα	ΐζημα, λάσπη	LC-MS	0.06 -10	(Masiá et al., 2013)
Modified QuEChERS	16 PAHs, 12 PCBs and 7 OCPs	ΐζημα	GC-MS	0.01- 3.18	(Miossec et al., 2018)
QuEChERS	34 φυτοφάρμακα	Μαύρο πιπέρι	LC-MS/MS	0.5-2.5	(Yao et al., 2019)
Original QuEChERS	52 φυτοφάρμακα	Ιστός ψαριού	LC-MS/MS	0,01-50	(Barbieri et al., 2019)
modified QuEChERS	102 φυτοφάρμακα	Πράσινο τσάι	HPLC-MS/MS	0.03-15	(Huang et al., 2019)
modified QuEChERS	φυτοφάρμακα	Φρούτα και λαχανικά	GC-ECD GC-MS/MS	5.6-15	(Tankiewicz et al., 2010)
modified acetate QuEChERS	170 φυτοφάρμακα	Αχλάδι	UHPLC-MS/MS	2,5-10	(Kemmerich et al., 2018)
QuEChERS citrate	φυτοφάρμακα	Κόκκινες πιπεριές	LC-MS/MS	1-400	(Morais da Costa et al. 2018)
QuEChERS	41 φυτοφάρμακα	Γάλα	GC-ECD GC-MS	0.001-0.02	(Tripathy et al., 2019)
modified QuEChERS	60 φυτοφάρμακα	Μπαχαρικά- κανέλα	LC-MS/MS	5-10	(Yao et al., 2019)
modified QuEChERS	φυτοφάρμακα	Φρούτα και λαχανικά	GC-MS/MS, LC-MS/MS	10-800	(Ferronato et al., 2018)
modified QuEChERS	φυτοφάρμακα (OCPs)	Μητρικό γάλα	GC-NCI-MS	0.75 -7.5	(Ferronato et al., 2018)
modified QuEChERS	φυτοφάρμακα (OCPs)	Ιστός ψαριού	GC-ECD	240-2760	(Stremel et al., 2018)
modified QuEChERS	3 φυτοφάρμακα	Φιστίκια	LC-MS	2-5	(Faraji et al., 2017)

### 3.3.2 Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (Super Critical Fluid Extraction, SFE)

Η SFE είναι μία σύγχρονη τεχνική στην οποία ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται ρευστό σε υπερκρίσιμη κατάσταση. Συνήθως ως διαλύτης χρησιμοποιείται το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ), λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας ( $31^\circ\text{C}$ ) και πίεσης (72,8 Atm) στο κρίσιμο σημείο, τα οποία παρουσιάζουν παρόμοια πυκνότητα με τους υγρούς διαλύτες, αλλά έχουν χαμηλότερο ιξώδες και υψηλότερους συντελεστές διάχυσης. Σε θερμοκρασίες και πιέσεις πάνω από το κρίσιμο σημείο η ουσία ονομάζεται υπερκρίσιμο ρευστό (supercritical fluid) (Haig, 2017), (Nollet and Rathore, 2010). Ο συνδυασμός των προαναφερθέντων ιδιοτήτων οδηγούν στην αποτελεσματικότερη και ταχύτερη εκχύλιση των αναλυτών σε σχέση με την εκχύλιση που γίνεται με τους υγρούς διαλύτες.

Αφού το δείγμα τοποθετηθεί σε δοχείο συνεχούς ροής, το υπερκρίσιμο ρευστό διέρχεται από το δείγμα. Μετά από αποσυμπίεση, η εκχυλιζόμενη ένωση συλλέγεται σε διαλύτη ή παγιδεύεται σε προσροφητικό υλικό. Στη συνέχεια ακολουθεί εκρόφηση και έκπλυση (Σχήμα 3.10). Μερικές από τις εφαρμογές της τεχνικής αυτής είναι στον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων και PAHs, ενώ πρόσφατα εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό κανναβινοειδών (Elkins et al., 2019). Όσον αφορά το περιβάλλον, η SFE έχει εφαρμοσθεί στην εκχύλιση ιζημάτων. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει υψηλές ανακτήσεις, υψηλό παράγοντα προσυγκέντρωσης, δυνατότητα αυτοματοποίησης και υψηλή εκλεκτικότητα.



Σχήμα 3.10: Σχηματική αναπαράσταση εκχύλισης υπερκρίσιμου υγρού SFE

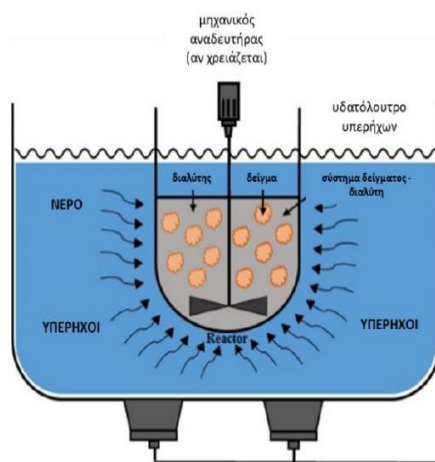
(Mohamed and Mansoori, 2002)

### 3.3.3 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Ultra-sound – assisted extraction, UAE)

Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων, παρέχει την δυνατότητα εκχύλισης ταυτόχρονα πολλών δειγμάτων χωρίς να απαιτείται εξειδικευμένη οργανολογία. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16 kHz και λόγω συμπίεσης και αραιώσης προκαλείται κίνηση του υγρού (Σχήμα 3.11). Με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται

φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης, ενώ με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείδυσης και μεταφοράς (Chen et al., 2015; Ha and Kim, 2016 και Martín-Pozo et al., 2019).

Πρόσφατα εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό φλαβονοειδών σε φρούτα και νεονικοτινοειδών σε μέλι (Ali et al., 2019 και Giroud et al., 2019). Οι συμβατικοί οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση, μπορούν να αντικατασταθούν με την χρήση ιοντικών υγρών ως προσροφητικά υλικά. Η εκχύλιση με υπέρηχους εφαρμόζεται στον προσδιορισμό θερμικά ασταθών ενώσεων, μειονεκτεί όμως στον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων.



**Σχήμα 3.11:** Συσκευή εκχύλισης με χρήση υπέρηχων (UAE) (Πηγή: Ha and Kim, 2016)

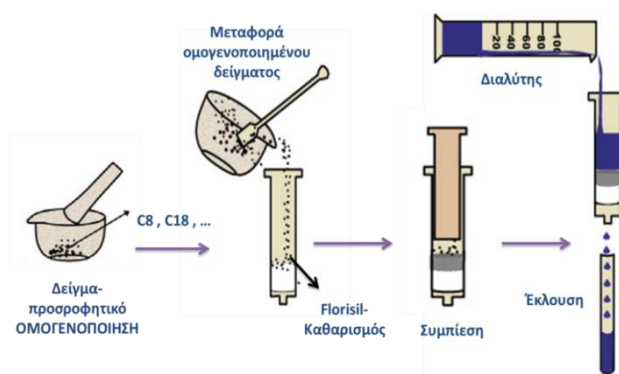
### 3.3.4 Εκχύλιση με διασπορά υποστρώματος σε στερεά φάση (Matrix solid-phase dispersion, MSPD)

Η διασπορά στερεάς φάσης Matrix (MSPD) είναι μία τεχνική προκατεργασίας που έχει εφαρμογές στην εκχύλιση στερεών, ημιστερεών και δειγμάτων υψηλού ιξώδους (Paradopoulos et al., 2011). Αν και σαν τεχνική μοιάζει αρκετά με την SPE, εντοπίζονται πολλές διαφορές. Κατά την MSPD παρέχεται αυξημένη επιφάνεια επαφής (όλη η μάζα προσροφητικού) για την αποτελεσματικότερη εκχύλιση συγκριτικά με την SPE που το δείγμα συνήθως προσροφάται στην επιφάνεια του υλικού πάκτωσης της μικρο-στήλης. Επίσης, στην MSPD οι φυσικές και χημικές αλληλεπιδράσεις των συστατικών του συστήματος είναι πιο έντονες από την SPE.

Κατά την πειραματική πορεία της MSPD, το δείγμα αναμιγνύεται με το προσροφητικό και οι αναλύτες προσροφώνται σε αυτό. Στη συνέχεια το μίγμα αυτό πακτώνεται σε μικρο-στήλη που περιέχει δύο φρίττες από πολυπροπυλένιο. Η στήλη συμπιέζεται με την βοήθεια

σύριγγας για να μην υπάρχουν κενά και στη συνέχεια ακολουθεί η έκλυση των συστατικών. Οι επιλεγμένες ενώσεις εκκλύονται εκλεκτικά με οργανικούς διαλύτες (Capriotti et al., 2015; Hoff and Pizzolato, 2018 και Ramos, 2019). Έτσι επιτυγχάνεται ταυτόχρονα η εκχύλιση του δείγματος και ο καθαρισμός του εκχυλίσματος, με επαναλήψιμα αποτελέσματα και υψηλή ανάκτηση ενώ μειώνεται ο χρόνος ανάλυσης. Το έκλουσμα είτε αναλύεται αμέσως ή προηγούνται κάποια στάδια καθαρισμού. Μια σχηματική παρουσίαση της MSPD παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.12.

Πρόκειται για μία εύχρηστη τεχνική, φιλικής προς το περιβάλλον, λόγω των μικρών ποσοτήτων οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται, με μικρούς χρόνους ανάλυσης. Έχει αποδειχτεί ότι είναι πολύ αποτελεσματική στην εκχύλιση φυτοφαρμάκων, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) και κτηνιατρικών φαρμάκων σε υποστρώματα όπως οικιακή σκόνη, λαχανικά, δημητριακά, τρόφιμα ζωικής προέλευσης, φρούτα, γάλα, αυγά και ψάρια (Balsebre et al., 2018; Freitas et al., 2018; Nardelli et al., 2018; Rodríguez-González et al., 2017; Soares et al., 2017 και Zhao et al., 2018).

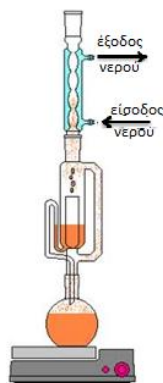


Σχήμα 3.12: Τεχνική εκχύλιση με διασπορά υποστρώματος σε στερεά φάση

### 3.3.5 Εκχύλιση Soxhlet (SOX)

Στην συγκεκριμένη τεχνική, το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται σε ειδικό πορώδη χάρτινο ή γυάλινο υποδοχέα στο επίθεμα της συσκευής. Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό γυάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα και επαναρρέουν στον υποδοχέα του στερεού δείγματος (Σχήμα 3.13). Όταν ο χώρος του επιθέματος πληρωθεί με διαλύτη, γίνεται αυτόματος σιφωνισμός οπότε ο διαλύτης επαναρρέει στη φιάλη και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. Με αυτόν τον τρόπο τα διαλυτά συστατικά του στερεού μείγματος περνούν στο διαλύτη. Οι περισσότερες εφαρμογές της εκχύλισης Soxhlet αναφέρονται σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τα ιζήματα, έχει όμως χρησιμοποιηθεί και για την ανάλυση δειγμάτων τροφίμων με υψηλό

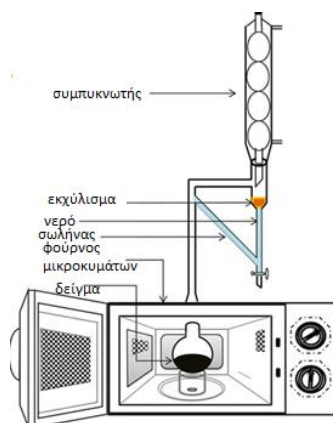
ποσοστό λίπους καθώς επίσης και στην εκχύλιση ελαίων από φυτικούς ιστούς (Akoto et al., 2016; Alara et al., 2018; Kafilzadeh, 2015 και Mohammadpour et al., 2019). Σήμερα η χρήση της συσκευής Soxhlet δεν προτιμάται καθώς χρησιμοποιούνται μεγάλοι όγκοι διαλυτών με το ανάλογο περιβαλλοντικό αλλά και οικονομικό κόστος (Martín-Pozo et al., 2019).



Σχήμα 3.13: Συσκευή εκχύλισης Soxhlet

### 3.3.6 Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (Microwave-Assisted Extraction, MAE)

Η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων αποτελεί εναλλακτική μέθοδος της εκχύλισης Soxhlet. Σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης το προς ανάλυση δείγμα αναμιγνύεται με τον οργανικό διαλύτη και ακτινοβολείται σε συμβατικό φούρνο μικροκυμάτων, χωρίς όμως το αιώρημα να φτάσει στο σημείο βρασμού του (Σχήμα 3.14). Είναι κατάλληλη για στερεά δείγματα και εφαρμόζεται μόνο στην περίπτωση θερμικά σταθερών ενώσεων, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Οι συμβατικοί οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση, μπορούν να αντικατασταθούν με την χρήση ιοντικών υγρών ως προσροφητικά υλικά. Οι κυριότερες εφαρμογές της μεθόδου περιλαμβάνουν περιβαλλοντικά δείγματα αν και υπάρχουν μελέτες ανάπτυξης μεθόδου για ανάλυση φυτοφαρμάκων σε λαχανικά και ελαιόλαδο (Afolabi et al., 2018; Fuentes et al., 2008; Miyawaki et al., 2018; Ramli et al., 2019 και Wang K. et al., 2018).



Σχήμα 3.14: Συσκευή εκχύλισης με μικροκύματα (MAE) (Halfadji et al., 2013)



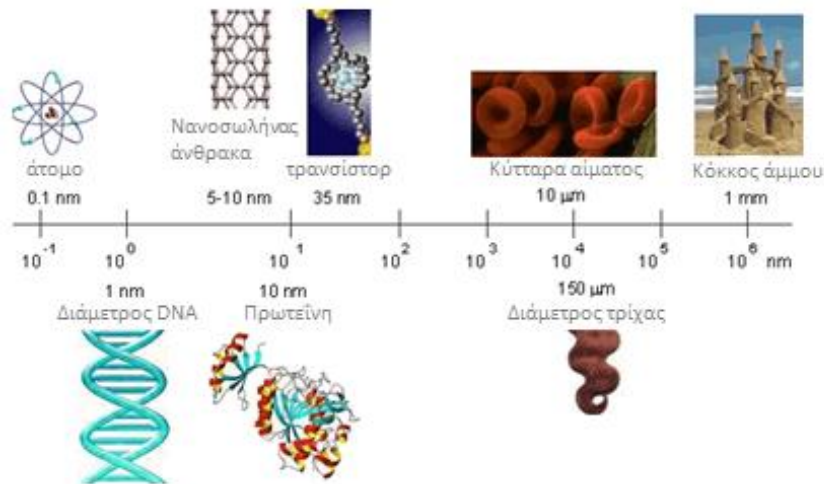
### ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ-ΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

#### A. ΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

##### 4.1 Εισαγωγή

Ως νανοσωματίδιο (nanoparticle, NPs) ορίζεται ένα φυσικό υλικό που έχει μέγεθος από 1 nm έως 100 nm. Τα νανοϋλικά έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τις ιδιότητές τους όπως μαγνητικές, οπτικές, ηλεκτρικές, μηχανικές κτλ, σε σχέση με την μακροσκοπική μορφή τους (bulk), κρατώντας σταθερή την χημική τους σύσταση (González-Fuenzalida et al., 2019; Kouzayha et al., 2012 και Rodríguez-González et al., 2016). Το κύριο πλεονέκτημα που εμφανίζουν τα υλικά αυτής της κλίμακας, είναι ο μεγάλος αριθμός των ατόμων στην επιφάνειά τους και κατ' επέκταση η μεγάλη ενεργή επιφάνεια για κάθε είδους φυσική, χημική, ή βιολογική διεργασία. Στο σχήμα 4.1 παρουσιάζεται η νανοκλίμακα με αντιπροσωπευτικά παραδείγματα.

Θεωρητικά, ως κατώτατο μέγεθος νανοσωματιδίου θεωρείται το 1nm, ενώ για ακόμη μικρότερα συστήματα, είναι ορθότερο να χρησιμοποιείται ο όρος «μοριακό συσσωμάτωμα» (cluster). Στην περίπτωση που τα νανοσωματίδια εμφανίζουν κρυσταλλική δομή, χρησιμοποιείται ο όρος «νανοκρύσταλλοι» (nanocrystals) ενώ για αυτά που δεν παρουσιάζουν ομοιογένεια στο σχήμα και στο μέγεθος «νανοσκόνη» (nanopowder). Η αμέσως μεγαλύτερη κλίμακα είναι η μικροκλίμακα (100nm-1μm) και αφορά μακροσκοπικά υλικά "όγκου" (bulk). Ο όρος κβαντική τελεία (quantum dot) περιγράφει ημιαγώγιμα νανοσωματίδια, συνήθως κάτω από τα 10nm (Azzouz et al., 2018). Βασικό τους γνώρισμα είναι το μεγάλο ενεργειακό χάσμα μεταξύ της ζώνης σθένους και της ζώνης αγωγιμότητας, που οδηγεί σε διαχωρισμένες ενεργειακές καταστάσεις.



**Σχήμα 4.1:** Κλίμακα μήκους στην οποία παρουσιάζεται η τάξη μεγέθους του νανομέτρου

(Πηγή: <http://mepolyblogspot.com/2015/11/ta.htm>)

Λόγω των πολύ μικρών διαστάσεων τους, τα νανοϋλικά παρουσιάζουν εξαιρετικές ιδιότητες όπως αυξημένη αντοχή, μικρό βάρος, βελτιωμένη φυσική και χημική συμπεριφορά καθώς επίσης και αυξημένη ηλεκτρική αγωγιμότητα. Η ηλεκτρονική, η φαρμακευτική, η παραγωγή ενέργειας και η κατάλυση, οι τηλεπικοινωνίες, η βιομηχανία, η προστασία του περιβάλλοντος και η αναλυτική χημεία είναι μερικοί από τους τομείς εφαρμογής των νανοϋλικών (Ahmadi et al., 2017; Alim et al., 2018; Dhara and Debiprosad, 2019; González-Sálamo et al., 2016; Li et al., 2019; López-Sanz et al., 2019 και Murtada et al., 2019). Η χρήση της νανοτεχνολογίας είναι ευρέως διαδεδομένη και στην βιοϊατρική λόγω της δυνατότητας εφαρμογής της σε συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων, στην σύνθεση αντικαρκινικών φαρμάκων και στη χρήση τους ως βιοαισθητήρες (Mulens et al., 2013 και Prijic and Sersa, 2011). Από την άλλη μεριά, όπως σε κάθε νέα τεχνολογία, έτσι και για την νανοτεχνολογία εγείρονται πολλά ερωτήματα σχετικά με την τοξικότητά τους και την επίδραση των νανοϋλικών στο περιβάλλον (Buzea et al., 2007; Kabir et al., 2018 και Zhu et al., 2019).

#### 4.2 Μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου

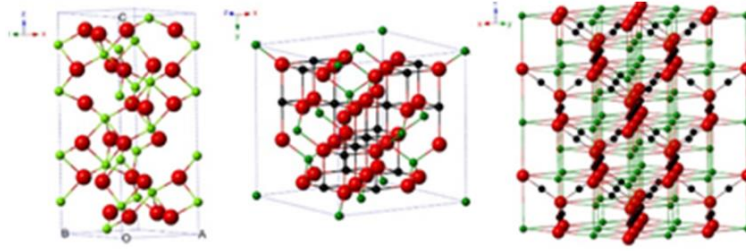
Τα νανοσωματίδια τα οποία περιέχουν τουλάχιστον ένα μέταλλο (όπως Fe, Co και Ni) με μαγνητικές ιδιότητες, καλούνται μαγνητικά και παρουσιάζουν μία μεγάλη ποικιλία οξειδίων και κραμάτων μετάλλων. Η πιο διαδεδομένη κατηγορία μαγνητικών νανοσωματιδίων είναι αυτά του σιδήρου που συνδυάζουν μαγνητικές ιδιότητες, ευκολία σύνθεσης, πολυμορφία σε μεγέθη και διαμορφώσεις με σχετικά χαμηλό κόστος. Παρόλα

αυτά, η οξειδωση του στην ατμόσφαιρα και η χημική δραστικότητα δυσχεραίνουν την χρήση του. Για να υπερκεραστεί αυτό το εμπόδιο, επιλέγονται τα οξείδια με δομή σπινελίου που παρουσιάζουν ελαφρώς χαμηλότερες μαγνητικές ιδιότητες αλλά εξαιρετική σταθερότητα. Μερικά από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα οξείδια του σιδήρου είναι (Aguilar-Arteaga et al., 2010 και Ali et al., 2016):

- Το οξείδιο του τρισθενούς σιδήρου,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ή αιματίτης
- Το οξείδιο του δισθενούς σιδήρου,  $\text{FeO}$  ή βουσίτης
- Το μαγνητικό οξείδιο του σιδήρου  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ή μαγνητίτης
- Το μαγνητικό οξείδιο του σιδήρου  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , ή μαγκεμίτης
- Ο ρευστός σίδηρος και το ρευστό οξείδιο του σιδήρου.

Ο μαγνητίτης ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), είναι ένα από τα τρία σημαντικότερα οξείδια του σιδήρου μαζί με τον αιματίτη ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) και τον βουσίτη ( $\text{FeO}$ ) (Σχήμα 4.2). Ανήκει στην κατηγορία των κεραμικών οξειδίων των φερριτών και εμφανίζει τις εντονότερες μαγνητικές ιδιότητες από οποιοδήποτε άλλο οξείδιο του σιδήρου. Αξιοσημείωτη ιδιότητα του μαγνητίτη είναι ότι μπορεί να λειτουργήσει και ως οξειδωτικό και ως αναγωγικό μέσο καθώς διαθέτει τα ιόντα σιδήρου σε δισθενή και τρισθενή οξειδωτική βαθμίδα. Το ορυκτό αυτό είναι μέλος της ομάδας των σπινελίων  $\text{AB}_2\text{O}_4$  (A= δισθενές άτομο και B= τρισθενές άτομο) και περιέχει περίπου 72,4% σίδηρο (Fe) και 27,6% οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ). Χαρακτηρίζεται από μεταλλική λάμψη, χρώμα σιδηρόμαυρο έως μαύρο, κρυσταλλώνεται σε ολοεδρία κατά το κυβικό σύστημα και συναντάται σε κοκκώδη ή φλοιώδη συσσωματώματα.

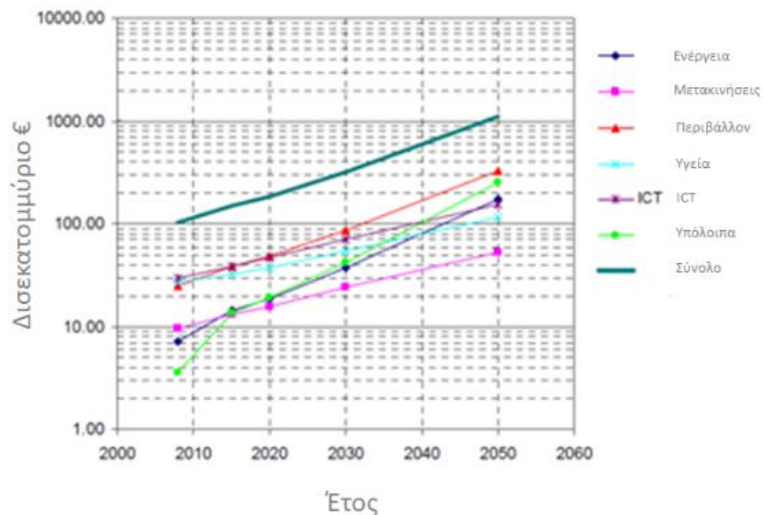
Ο μαγκεμίτης έχει παρόμοια δομή με αυτή του μαγνητίτη αλλά μόνο τα 5/6 των συνολικών τετραεδρικών και οκταεδρικών θέσεων καταλαμβάνονται από άτομα σιδήρου (Wu et al., 2015). Σε θερμοκρασία δωματίου ο μαγνητίτης οξειδώνεται σε μαγκεμίτη με αργό ρυθμό, οδηγώντας σε ασθενέστερο μαγνητισμό. Η βασική διαφορά του με τον μαγνητίτη είναι ότι όλα τα κατιόντα σιδήρου του μαγκεμίτη βρίσκονται στην τρισθενή κατάσταση ( $\text{Fe}^{+3}$ ) (Ali et al., 2016).



**Σχήμα 4.2:** Κρυσταλλική δομή αιματίτη, μαγνητίτη και μαγκεμίτη (οι μαύρες κουκίδες αντιπροσωπεύουν ιόντα  $Fe^{2+}$ , οι πράσινες τα ιόντα  $Fe^{3+}$  και οι κόκκινες κουκίδες τα ιόντα  $O^{2-}$ )  
(*Wu et al., 2015*)

Τα οξείδια του σιδήρου χρησιμοποιούνται ως μαγνήτες ως μέσα εγγραφής, στην κατασκευή αισθητήρων. Τα μαγνητικά νανοϋλικά είναι αποτέλεσμα σύγχρονης έρευνας και τεχνολογίας αιχμής και παρουσιάζουν ιδιαίτερες λειτουργίες, αντιδρούν στα εξωτερικά ερεθίσματα και αποκτούν στοχευμένες ιδιότητες, ανάλογα με την εφαρμογή που προορίζονται. Τέτοια προϊόντα αποτελούν πλέον το ζητούμενο τόσο στον ερευνητικό όσο και στο χώρο της βιομηχανικής παραγωγής σε Ευρωπαϊκό αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο.

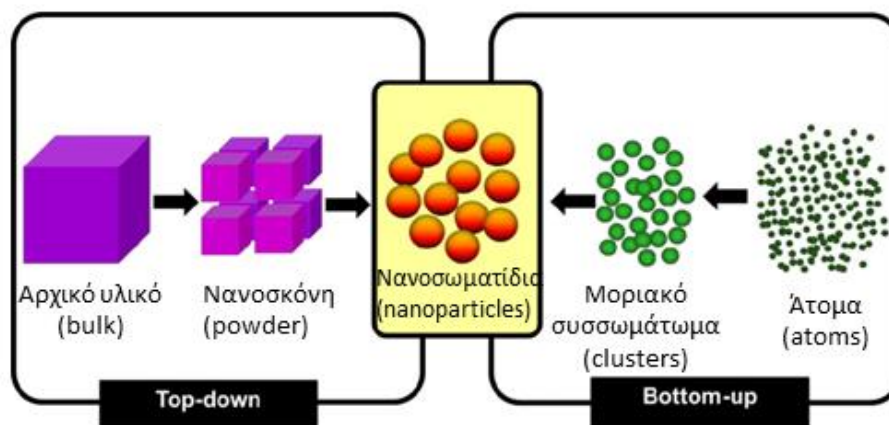
Συνεπώς η παγκόσμια αγορά μαγνητικών νανοϋλικών προβλέπεται να παρουσιάσει μια εκθετική αύξηση μέσα στα επόμενα τριάντα χρόνια σε όλους τους τομείς των εφαρμογών τους (ενέργεια, μεταφορές, περιβάλλον, υγεία κ.α) (Σχήμα 4.3).



**Σχήμα 4.3:** Ευρωπαϊκή αγορά μαγνητικών νανοσωματιδίων ανά τομέα εφαρμογής  
(Πηγή: ISQ, Instituto de Soldadura e Qualidade)

### 4.3 Τεχνικές σύνθεσης νανοσωματιδίων

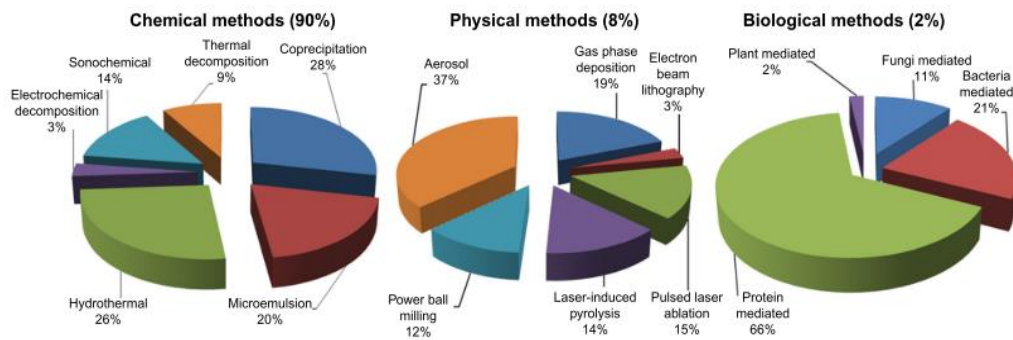
Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τρόποι σύνθεσης και επεξεργασίας νανοϋλικών οι οποίοι κατηγοριοποιούνται στις «top-down» και στις «bottom-up» (Σχήμα 4.4). Χαρακτηριστικό της «top down» σύνθεσης είναι η μείωση του μεγέθους για την δημιουργία νανοϋλικών (Fu et al., 2018; Jamkhande et al., 2019 και Tour, 2014). Μέθοδοι που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι η εγχάραξη εστιασμένης ιοντικής ακτινοβολίας υπέρυθρου, η UV-λιθογραφία, ο βομβαρδισμός με σωματίδια, η λιθογραφία ηλεκτρονικής ακτινοβολίας, η λιθογραφία με X-ray και η λιθογραφία με laser (Qiao et al., 2011).



Σχήμα 4.4: Σχηματική προσέγγιση μεθόδων top-down και bottom-up (Rawat, 2015)

Αντίθετα, με τις μεθόδους bottom-up, επιτυγχάνεται ικανοποιητικός έλεγχος μεγέθους, σύστασης και μορφολογίας. Είναι εφικτή η οικονομική και συνάμα μεγάλη παραγωγή νανοσωματιδίων με διαστάσεις μικρότερες από 10 nm (Jamkhande et al., 2019). Παρέχεται η δυνατότητα δημιουργίας είτε γυμνών είτε επικαλυμμένων, ανάλογα με τις περαιτέρω εφαρμογές τους.

Τις τελευταίες δεκαετίες, πλήθος μεθόδων έχουν αναπτυχθεί για την σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων του σιδήρου και κατηγοριοποιούνται σε φυσικές, χημικές και βιολογικές. Κατά την σύνθεσή τους με τις πολύπλοκες φυσικές μεθόδους, δεν είναι δυνατός ο έλεγχος του μεγέθους των νανοσωματιδίων. Αυτό το εμπόδιο υπερνικάται με τις απλές χημικές μεθόδους, στις οποίες παρατηρείται διαχείριση του μεγέθους και του σχήματος των NPs, με μεγάλες αποδόσεις κατά την σύνθεση. Και τέλος οι βιολογικές μέθοδοι, που αποτελούν μόλις το 2% των συνολικών μεθόδων. Στο Σχήμα 4.5, παρουσιάζονται αναλυτικά οι κατηγορίες σύνθεσης νανοϋλικών μαζί με τις συνηθέστερες χρησιμοποιούμενες μεθόδους.



Σχήμα 4.5: Συνηθέστερες μέθοδοι σύνθεσης νανοϋλικών (Ali et al., 2016)

Μεταξύ των παραπάνω, οι χημικές είναι οι ευρέως χρησιμοποιούμενες λόγω μεγάλων αποδόσεων και χαμηλού κόστους και κατηγοριοποιούνται περαιτέρω, στις υδρολυτικές και στις θερμολυτικές μεθόδους (Ali et al., 2016). Οι υδρολυτικές μέθοδοι βασίζονται κυρίως στην υδρόλυση δισθενών και τρισθενών ιόντων σιδήρου, ενώ οι θερμολυτικές μέθοδοι στηρίζονται στην θερμόλυση οργανομεταλλικών ενώσεων (Ali et al., 2016). Ένα από τα πλεονεκτήματα αποτελεί η ελεγχόμενη κρυστάλλωση των οξειδίων από μοριακές πρόδρομες οργανομεταλλικές ενώσεις ή μεταλλικά άλατα, παρουσία οργανικών επιφανειακών τροποποιητών, οι οποίοι αποσκοπούν στον περιορισμό των διαστάσεων στην νανοκλίμακα, την σταθερότητα των νανοκρυστάλλων και την παρουσία χημικών ομάδων απαραίτητων για την μετέπειτα εφαρμογή τους.

## 4.4 Υδρολυτικές μέθοδοι

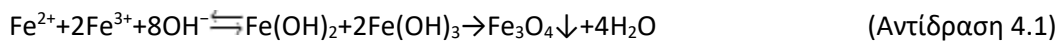
### 4.4.1 Μέθοδος Συγκαταβύθισης

Η μέθοδος της συγκαταβύθισης είναι μία αποτελεσματική μέθοδος παρασκευής μαγνητικών NPs οξειδίου του σιδήρου με μέγεθος σωματιδίων από 2 έως 17 nm (Qiao et al., 2011). Τα οξείδια του σιδήρου, όπως ο μαγνητίτης ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) και ο μαγκεμίτης ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), παρασκευάζονται με συγκαταβύθιση δισθενών  $\text{Fe}^{+2}$  και τρισθενών αλάτων σιδήρου  $\text{Fe}^{+3}$  σε υδατική φάση, υπό αλκαλικές συνθήκες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, παρουσία αδρανούς αερίου (Velásquez et al., 2018 και Zhou et al., 2018). Ο μαγνητίτης παρουσιάζει υψηλότερη μαγνήτιση κορεσμού ενώ ο μαγκεμίτης μεγαλύτερη σταθερότητα σε συνθήκες περιβάλλοντος (Vallabani and Singh, 2018).

Παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος των νανοσωματιδίων κατά τη σύνθεση, αποτελούν ο τύπος των αλάτων (π.χ. χλωριούχα, θειικά, νιτρικά), η αναλογία των ιόντων  $\text{Fe}^{+2}$  και  $\text{Fe}^{+3}$ , η ιοντική ισχύς του μέσου, το pH και η θερμοκρασία της αντίδρασης (Zhou et al.,

2018). Συγκεκριμένα, η αύξηση του pH και της ιοντικής ισχύς οδηγεί στον σχηματισμό σωματιδίων με μικρότερο μέγεθος αλλά και μικρότερη κατανομή μεγέθους (Akbarzadeh et al., 2012; Lu et al., 2007 και Wu et al., 2008). Αυτό συμβαίνει επειδή το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος επηρεάζουν τη χημική σύσταση στην επιφάνεια του σωματιδίου και συνεπώς το ηλεκτροστατικό επιφανειακό φορτίο.

Η σύνθεση του μαγνητίτη περιγράφεται από την χημική αντίδραση 4.1 (Ali et al., 2016 και Wu et al., 2015):



Σύμφωνα με τη θερμοδυναμική της αντίδρασης, όταν λαμβάνει χώρα σε μη οξειδωμένο περιβάλλον ολοκληρώνεται σε τιμές pH που κυμαίνονται από 8 έως 14 για στοιχειομετρική αναλογία αλάτων ( $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ ) 2 προς 1. Παρουσία οξυγόνου ο μαγνητίτης, μετατρέπεται σε μαγκεμίτη λόγω οξείδωσης σύμφωνα με την αντίδραση 4.2:



Πρώτη εφαρμογή της μεθόδου, αποτέλεσε η σύνθεση υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων μαγνητίτη με συγκαταβύθιση αλάτων  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_2$  σε αλκαλικές συνθήκες (Bee et al., 1995). Τα σωματίδια που παρασκευάστηκαν ήταν σχεδόν σφαιρικά με μέση διάμετρο σωματιδίων 8 nm.

Βασικό πλεονεκτήματα της μεθόδου, αποτελεί η δυνατότητα σύνθεσης νανοσωματιδίων σε ένα μόνο στάδιο, διαλυτά σε υδατικά μέσα. Σε γενικές γραμμές, στην συγκαταβύθιση, η θερμοκρασία και ο χρόνος αντίδρασης είναι μικρότερος συγκριτικά με τη θερμόλυση και τις υπόλοιπες υδροθερμικές μεθόδους. Αποτελεί μία απλή μέθοδο με υψηλές και ελεγχόμενες αποδόσεις, επαναλήψιμα αποτελέσματα με χρήση του φιλικού προς το περιβάλλον διαλύτη (νερό) (Cushing et al., 2004 και Zhou et al., 2018). Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου συγκαταβύθισης αποτελεί ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, η σχετικά ευρεία κατανομή μεγέθους και η δυσκολία ελέγχου του σχήματος των σωματιδίων που οφείλεται στον γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

#### 4.4.2 Θερμική διάσπαση

Στηρίζεται στη διάσπαση, σε υψηλή θερμοκρασία πρόδρομων ενώσεων, όπως π.χ. συμπλόκων μετάλλων και οργανομεταλλικών ενώσεων. Οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε οργανικούς διαλύτες παρουσία επιφανειοδραστικών ενώσεων όπως τα λιπαρά οξέα και οι



αμίνες (Zhou et al., 2018). Απαιτείται αδρανής ατμόσφαιρα και πολύπλοκες ενόργανες διατάξεις, γεγονός που έχει αντίκτυπο στο κόστος.

Λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα των νανοσωματιδίων που παράγονται, απαιτείται περαιτέρω τροποποίηση της επιφάνειά τους. Παρόλα αυτά όμως επιτυγχάνεται ομοιομορφία ως προς το σχήμα και το μέγεθος (Wang et al., 2008). Η τελική μορφολογία του υλικού επηρεάζεται από παράγοντες όπως οι συγκεντρώσεις των πρόδρομων ενώσεων, ο όγκος του διαλύτη, η θερμοκρασία και ο χρόνος αντίδρασης. Η αυτοματοποίηση και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων είναι δύσκολη, καθώς υπεισέρχονται πολλές παράμετροι κατά τη σύνθεση.

#### 4.4.3 Σύνθεση νανοσωματιδίων με μικρογαλακτώματα

Η σύνθεση νανοσωματιδίων με μικρογαλακτώματα, είναι μία αρκετά «ευέλικτη» στρατηγική για τη σύνθεση ποικίλων νανοσωματιδίων. Η θερμοδυναμικά σταθερή διασπορά δύο μη αναμειξιμων υγρών, καλείται μικρογαλάκτωμα. Τα μικρογαλακτώματα κατηγοριοποιούνται ως νερού σε λάδι (W/O) όταν το νερό είναι διασκορπισμένο ομοιογενώς σε ένα οργανικό μέσο με τη βοήθεια του επιφανειοδραστικού και ελαίου σε νερό (O/W) όπου το έλαιο διασκορπίζεται στο νερό.

Στα μικρογαλακτώματα (W/O), η υδάτινη φάση είναι διασκορπισμένη σε μικροσταγόνες διαμέτρου 1-50 nm περιβαλλόμενα από ένα στρώμα μορίων επιφανειοδραστικού υλικού που τις διαχωρίζει από την οργανική φάση (Zhou et al., 2018). Έτσι το υδρόφιλο μέρος του επιφανειοδραστικού βρίσκεται στο περιβάλλον του νερού, ενώ το υδρόφοβο στο οργανικό μέρος με αποτέλεσμα των σχηματισμό μικκυλίων. Το μέγεθος του μικκυλίου καθορίζεται από την αναλογία του νερού προς το επιφανειοδραστικό (Xia et al., 2009).

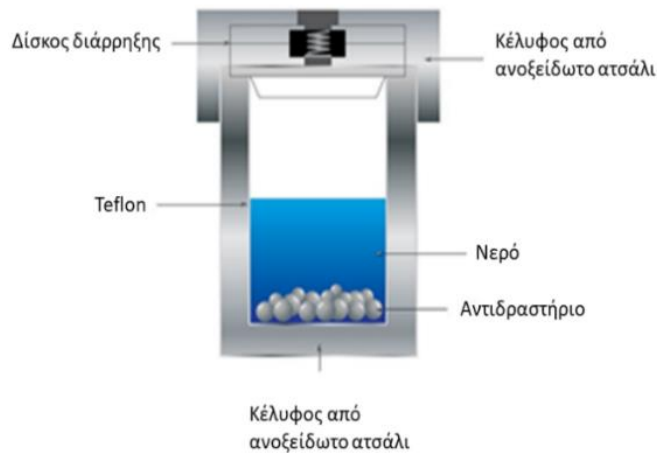
Αποτελούν εξαιρετικά μέσα αντίδρασης, αφού είναι ικανά να αυξήσουν τη διαλυτότητα των αντιδρώντων και να τα οργανώσουν στο εσωτερικό τους. Παρόλο που πολλά είδη νανοσωματιδίων έχουν συντεθεί με αυτήν τη μέθοδο, τα μικρογαλακτώματα παρουσιάζουν εκτός από μικρή απόδοση και ανομοιομορφία στο σχήμα και στο μέγεθος.

#### 4.4.4 Υδροθερμική-Διαλυτοθερμική σύνθεση

Με τον όρο διαλυτοθερμική ή σολβοθερμική σύνθεση, καλείται η ετερογενής αντίδραση παρουσία διαλύτη, σε κλειστό σύστημα (autoclave) (Σχημα 4.6), σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 100°C και πίεση μεγαλύτερη από 1 bar (Brunner, 2009). Η σολβοθερμική



σύνθεση νανοσωματιδίων ανήκει στην κατηγορία των οξειδοαναγωγικών μεθόδων. Στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι το νερό η μέθοδος καλείται υδροθερμική (Ali et al., 2016).



**Σχήμα 4.6:** Αυτόκλειστο δοχείο (autoclave) (Gardecka, A., 2016)

Τα προϊόντα που προκύπτουν με αυτήν τη μέθοδο διακρίνονται για την καθαρότητα, την ομοιόμορφη κατανομή των μεγεθών, τον μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας, την μικρή συσσωμάτωση, την ομοιογένεια, την συμμετρία και τις μοναδικές ιδιότητες που παρουσιάζουν (Cushing et al., 2004). Σε οικονομικό και περιβαλλοντικό επίπεδο, παρουσιάζουν ευκολία σύνθεσης σε λίγα ή σε ένα μόνο στάδιο, χρήση απλού εξοπλισμού, μικρούς χρόνους αντιδράσεων, μικρό όγκο διαλυτών και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας.

Μπορούν να προκύψουν τροποποιήσεις στο προϊόν, μεταβάλλοντας τη διάρκεια της αντίδρασης, τη θερμοκρασία, το pH, την στοιχειομετρία καθώς επίσης και την σειρά προσθήκης των αντιδραστηρίων.

## 4.5. Μη υδρολυτικές τεχνικές

### 4.5.1 Θερμολυτική μέθοδος

Η μέθοδος της θερμόλυσης βασίζεται στη χημική διάσπαση πρόδρομων ενώσεων παρουσία θερμοκρασίας και αποτελεί ενδόθερμη αντίδραση. Λαμβάνει χώρα τόσο σε μη πολικούς, όσο και σε ισχυρά πολικούς διαλύτες. Η θερμολυτική διάσπαση σε μη πολικούς διαλύτες, έχει χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση ομοιόμορφων, μαγνητικών νανοσωματιδίων  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  σε οκτααιθέρα παρουσία ελαϊκού οξέος.

Πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το ελεγχόμενο μέγεθος και σχήμα, η κρυσταλλική δομή και η καλή διασπορά σε οργανικούς διαλύτες (He et al., 2012). Τα NPs οξειδίου του σιδήρου, που παρασκευάζονται μέσω θερμολυτικής διάσπασης πρόδρομων ενώσεων σε υψηλή θερμοκρασία, χαρακτηρίζονται από υψηλή κρυσταλλικότητα και στενή κατανομή

μεγέθους. Βασικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής αποτελεί η δυνατότητα ελέγχου του μεγέθους (3-50 nm) αλλά και του σχήματος (σφαίρες, κύβοι, σύρματα κ.λπ.) των NPs (Wu et al., 2008). Επιπλέον, η παρασκευή NPs με τη μέθοδο της θερμόλυσης μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί παρέχοντας μαζική παραγωγή.

#### 4.5.2 Μέθοδος Πολυόλης

Η μέθοδος πολυόλης, αποτελεί μια ευέλικτη χημική προσέγγιση που αναφέρεται στη χρήση πολυολών (αλκοόλες με πολλαπλά υδροξύλια) για την αναγωγή μεταλλικών αλάτων προς την παρασκευή μεταλλικών σωματιδίων. Κατά τη μέθοδο της πολυόλης, οι πρόδρομες ενώσεις θερμολύονται σε υψηλές θερμοκρασίες έως και τους 290°C που ευνοούν το σχηματισμό νανοσωματιδίων με καλύτερη κρυσταλλικότητα (Hemery et al., 2017).

Παρουσιάζουν πολλαπλές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται ως διαλύτες με υψηλά σημεία ζέσης, ως αναγωγικοί παράγοντες αλλά και ως σταθεροποιητές ελέγχοντας το μέγεθος των σωματιδίων παρεμποδίζοντας την μεταξύ τους συσσώματωση.

Μαγνητικά νανοσωματίδια  $Fe_3O_4$ , παρασκευάζονται σε μη υδατικά ομογενή διαλύματα πολυολών στους 220°C παρουσία ελαϊκού οξέος. Τα μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια παρασκευάζονται σε δι-αιθυλενογλυκόλη χρησιμοποιώντας ως πρόδρομες ενώσεις μείγμα ένυδρων δισθενών και τρισθενών αλάτων ( $FeCl_2 \cdot 4H_2O/FeCl_3 \cdot H_2O$ ) σε αναλογία 1:2, παρουσία αλκαλικών συνθηκών. Αυτά τα σωματίδια παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά και υψηλή μαγνήτιση κορεσμού έως 70.7 emu/g.

Υδρόφιλα νανοσωματίδια μαγνητίτη, τροποποιημένα επιφανειακά με διαφορετικά μόρια μπορούν να παρασκευαστούν σε ένα στάδιο σε διαιθυλενογλυκόλη. Ως επιφανειοδραστικοί παράγοντες επιλέγονται μικρά μόρια που φέρουν οργανικές ομάδες (αμίνες, καρβοξύλια και θειόλες) και εισάγονται στο μέσο ή στο τέλος της αντίδρασης με αποτέλεσμα να προσδένονται στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων.

Συμπερασματικά, με τη μέθοδο της πολυόλης μπορούν να παραχθούν ομοιόμορφα ως προς το μέγεθος και το σχήμα μαγνητικά νανοσωματίδια, ελέγχοντας την κινητική της αντίδρασης (συσσώματωση και συγκαταβύθιση των σχηματιζόμενων σωματιδίων). Συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των υδρολυτικών και θερμολυτικών μεθόδων παρέχοντας τη δυνατότητα ανάπτυξης υδρόφιλων νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου σε ένα στάδιο (όπως και στην περίπτωση της συγκαταβύθισης). Στον Πίνακα 4.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα χαρακτηριστικά των παραπάνω μεθόδων.

**Πίνακας 4.1:** Συγκεντρωτικά χαρακτηριστικά μεθόδων σύνθεσης (Mulens et al., 2013)

Μέθοδος	(°C)	Διάρκεια	Διαλύτης	Κατανομή	Σχήμα	Απόδοση
Συγκαταβύθιση	20-150	Λεπτά	H <sub>2</sub> O	Ευρεία	Ακανόνιστο	Υψηλή
Μικρο-γαλακτώματα	20-80	Ώρες	H <sub>2</sub> O & Οργανικός δ/της	Στενή	Ομοιόμορφα σφαιρικό	Χαμηλή
Πολυόλη	25-200	Λεπτά-ώρες	Οργανικός δ/της	Στενή	Σχεδόν σφαιρικό	Υψηλή
Θερμόλυση	100-350	Ώρες-ημέρες	Οργανικοί δ/της	Πολύ στενή	Ομοιόμορφο: (σφαίρες, κύβοι, εξάγωνα)	Υψηλή

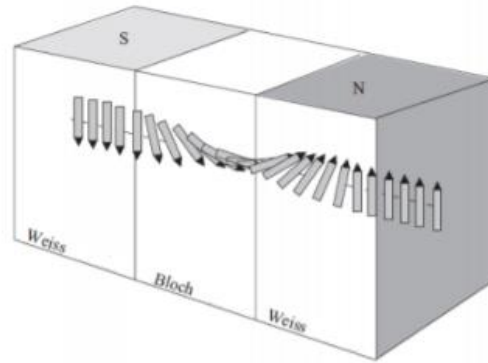
#### 4.6 Βασικές αρχές μαγνητισμού

Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των NPs είναι η δυνατότητα προσανατολισμού παρουσία μαγνητικού πεδίου. Ο μαγνητισμός είναι ένα φυσικό φαινόμενο κατά το οποίο υλικά και φορτισμένα-κινούμενα σωματίδια ασκούν δυνάμεις (έλξεις και άπωσης), καθώς και ροπές σε άλλα υλικά ή φορτισμένα σωματίδια. Σε ένα άτομο η συνισταμένη μαγνητική ροπή των ηλεκτρονίων μπορεί να είναι μηδενική (μη μαγνητικό υλικό) και μη μηδενική (μαγνητικό υλικό). Το μέτρο της ικανότητας ενός διπόλου να ευθυγραμμίζεται παρουσία εξωτερικού πεδίου, καλείται μαγνητική διπολική ροπή.

Στοιχεία με μαγνητικές ιδιότητες που προσελκύουν ενδιαφέρον λόγω των μεταβαλλόμενων μαγνητικών ιδιοτήτων είναι ο σίδηρος (Fe), το νικέλιο (Ni), το κοβάλτιο (Co), το γαδολίνιο (Gd) και τα κράματά τους (Akbarzadeh et al., 2012 και Patsula et al., 2016). Πολλές από τις σύγχρονες συσκευές στηρίζονται στον μαγνητισμό και στα μαγνητικά υλικά (ραδιόφωνο, τηλεόραση, ηλεκτρικές γεννήτριες κ.α).

##### 4.6.1 Μαγνητικές περιοχές Weiss

Ο κρύσταλλος μακροσκοπικά χωρίζεται σε μαγνητικές περιοχές οι οποίες καλούνται περιοχές Weiss. Σε κάθε περιοχή Weiss, όλα τα spins είναι παράλληλα διευθετημένα, δίνοντας ένα συνολικό spin. Όμως τα spins της κάθε περιοχής είναι τυχαία διευθετημένα το ένα σε σχέση με το άλλο. Στα όρια ανάμεσα στις μαγνητικές περιοχές (τοιχώματα Bloch) η διεύθυνση των μαγνητικών ροπών μεταβάλλεται συνεχώς. Στο Σχήμα 4.7 παρουσιάζεται η εναλλαγή της κατεύθυνσης των spins μεταξύ δύο περιοχών Weiss και ενός τοιχώματος Bloch.



**Σχήμα 4.7:** Τοίχωμα Bloch ανάμεσα σε δύο περιοχές Weiss  
(Πηγή: [doitpoms.ac.uk/tlplib/ferromagnetic/walls.php](http://doitpoms.ac.uk/tlplib/ferromagnetic/walls.php))

Οι αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής (επικάλυψη τροχιακών) διευθετούν τα spins εντός μιας περιοχής παράλληλα, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μαγνητικού διπόλου τείνουν να διευθετήσουν τα spins των διαφορετικών περιοχών σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Κατά την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, το υλικό μαγνητίζεται και οι περιοχές τείνουν να γίνουν παράλληλες προς αυτό. Η αύξηση της μαγνητικής ροπής οφείλεται στην αύξηση του όγκου των περιοχών εκείνων όπου η μαγνητική ροπή σχηματίζει μικρότερη γωνία με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου και στην στροφή των ροπών των περιοχών Weiss (Albert et al., 2006).

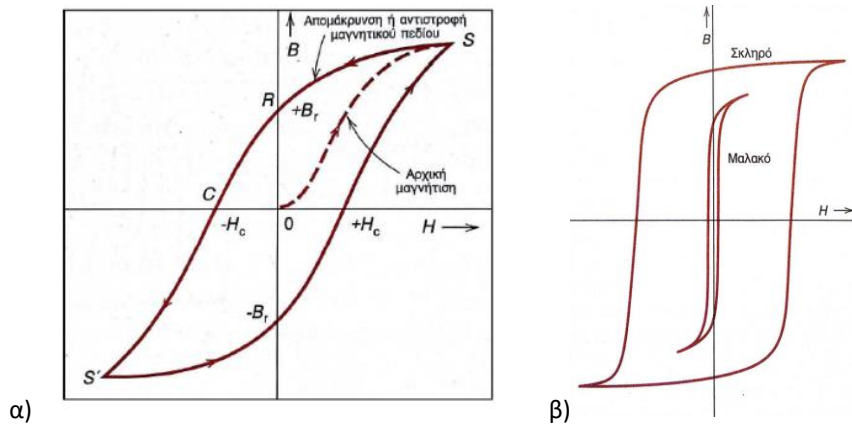
Η θεωρία των περιοχών Weiss διαχωρίζει τον σιδηρομαγνητισμό από τον παραμαγνητισμό. Η εσωτερική δομή ενός μαγνητικού υλικού καθορίζει την μαγνητική του συμπεριφορά. Όταν το μέγεθος ενός σιδηρομαγνητικού υλικού μειώνεται κάτω από μια κρίσιμη τιμή, αυτό γίνεται σωματίδιο μονής περιοχής (single domain). Για τιμές μεγέθους μεγαλύτερες της κρίσιμης, το σωματίδιο αποκτά πολλές διαφορετικές περιοχές Weiss και για τιμές πολύ μικρότερες της κρίσιμης γίνεται υπερπαραμαγνητικό και το συνεκτικό πεδίο μηδενίζεται.

#### 4.6.2 Βρόγχος Υστέρησης

Η μαγνητική συμπεριφορά των σιδηρομαγνητικών υλικών περιγράφεται από το βρόχο υστέρησης, (Σχήμα 4.8). Ένας βρόχος υστέρησης προκύπτει μετρώντας τη μαγνήτιση ενός υλικού που λαμβάνεται παρουσία ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου σε θετικές και αρνητικές κατευθύνσεις. Σε υψηλά μαγνητικά πεδία, η μαγνήτιση προσεγγίζει τη μέγιστη τιμή που ονομάζεται μαγνήτιση κορεσμού ( $M_s$ ). Σε μαγνήτιση κορεσμού, όλες οι μαγνητικές ροπές μέσα στο υλικό είναι προσανατολισμένες παράλληλα προς τη διεύθυνση του μαγνητικού πεδίου ( $H$ ). Ως παραμένουσα μαγνήτιση ( $M_r$ ) ορίζεται ως η τιμή της μαγνήτισης

που παρατηρείται με σταδιακή απομάκρυνση του πεδίου έως και τον μηδενισμό (Mulens et al., 2013).

Ανάλογα με το βρόχο υστέρησης τα μαγνητικά υλικά διακρίνονται σε μαλακά (π.χ. ο σίδηρος, τα κράματα σιδήρου-κοβαλτίου, ο μαγκεμίτης, ο μαγνητίτης) και σκληρά (π.χ. το κοβάλτιο και διμεταλλικά κράματα σιδήρου-λευκοχρύσου). Τα μαλακά, παρουσιάζουν μικρά συνεκτικά πεδία ( $H_c < 500$  Oe), ενώ τα σκληρά μαγνητικά υλικά χαρακτηρίζονται από μεγάλα συνεκτικά πεδία ( $H_c > 500-1000$  Oe).



**Σχήμα 4.8:** α) Η μαγνητική επαγωγή σε συνάρτηση με το μαγνητικό πεδίο, β) Βρόχος υστέρησης μαλακών και σκληρών υλικών

Ως μαγνητική επαγωγή  $B$ , ορίζεται η απόκριση ενός υλικού όταν εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο  $H$ , με μονάδα μέτρησης Tesla ή Weber/m<sup>2</sup> (SI). Η σχέση που συνδέει τα δύο μεγέθη περιγράφεται από την (Εξίσωση 4.1):

$$B = \mu_0 (H + M) \quad (\text{Εξίσωση 4.1})$$

όπου  $\mu_0$  η μαγνητική διαπερατότητα του κενού και  $M$  η μαγνήτιση του μέσου.

Αποτελεί ιδιότητα του υλικού και εξαρτάται από τις επιμέρους μαγνητικές ροπές (π.χ των ατόμων, των μορίων, των ιόντων) όσο και από την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Ως ένα βαθμό, όλα τα υλικά είναι μαγνητικά και η απόκρισή τους εξαρτάται από την δομή τους, την θερμοκρασία και το πεδίο. Ο βαθμός απόκρισης ενός υλικού ( $\chi$ ), με μαγνήτιση ( $M$ ) σε ένα εφαρμοζόμενο πεδίο ( $H$ ) καθορίζεται από τον νόμο Curie-Weiss (Εξίσωση 4.2):

$$\chi = \frac{M}{H} \quad (\text{Εξίσωση 4.2})$$

και με βάση αυτήν διακρίνονται σε παραμαγνητικά, διαμαγνητικά, σιδηρομαγνητικά και υπερμαγνητικά (Akbarzadeh et al., 2012).

#### 4.7 Ταξινόμηση μαγνητικών υλικών

Κατά την τοποθέτηση ενός μαγνητικού υλικού εντός μαγνητικού πεδίου, παρατηρείται αύξηση ή μείωση της πυκνότητας των δυναμικών γραμμών που διέρχονται από αυτό. Η πυκνότητα της ροής στο εσωτερικό ενός υλικού είναι διαφορετική από ότι στο εξωτερικό του.

Ως διαμαγνητικό, ορίζεται ένα υλικό που η πυκνότητα ροής στο εσωτερικό υλικού είναι μικρότερη από ότι στο εξωτερικό. Ο διαμαγνητισμός είναι μια παροδική ασθενής μορφή μαγνητισμού, που διαρκεί μόνο όσο εφαρμόζεται το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Κάθε άτομο έχει μια μαγνητική ροπή και σε μακροσκοπική κλίμακα συνεισφέρει στην ολική μαγνητική ροπή η οποία δίνει μια μικρή μαγνήτιση  $M$  και αρνητικές τιμές επιδεκτικότητας από  $-10$  έως  $-5$ . Χωρίς την παρουσία κάποιου εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, η ολική μαγνητική ροπή είναι μηδενική, καθώς οι ροπές είναι αντίρροπες.

Παραδείγματα διαμαγνητικών υλικών αποτελούν ο χαλκός, ο άργυρος, ο χρυσός, το βισμούθιο, το ορυκτό άλας  $\text{NaCl}$  καθώς επίσης και τα ορυκτά που οι κρύσταλλοί τους σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς ή έχουν ιόντα με διαμόρφωση ευγενών αερίων.

Αντίθετα στα παραμαγνητικά υλικά, η πυκνότητα ροής στο εσωτερικό του υλικού είναι μεγαλύτερη από ότι στο εξωτερικό. Οι μαγνητικές ροπές που σχετίζονται με τα ηλεκτρόνια και τα spins τους μέσα σ' ένα άτομο, δεν αλληλοαναιρούνται απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Παρουσία μαγνητικού πεδίου, τα δίπολα προσανατολίζονται ελαφρώς και δίνουν μια μη μηδενική μαγνήτιση  $M$  και έτσι καθίστανται μαγνητικά. Οι τιμές μαγνητικής επιδεκτικότητας κυμαίνονται από  $10^{-3}$  έως  $10^{-5}$ . Τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα μαγνητικά υλικά είναι παραμαγνητικά τα οποία έχουν υποβληθεί σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο. Με απομάκρυνση του μαγνητικού πεδίου χάνουν τον μαγνητισμό τους. Παραδείγματα παραμαγνητικών υλικών είναι το αλουμίνιο, το μαγγάνιο και ο λευκόχρυσος (Τσόνας Ι., 2017).

Τα σιδηρομαγνητικά υλικά σε αντίθεση με τα παραμαγνητικά, μαγνητίζονται έντονα παρουσία μαγνητικού πεδίου και διατηρούν το μαγνητισμό τους και μετά την απομάκρυνσή του πεδίου. Σε μακροσκοπική κλίμακα και απουσία μαγνητικού πεδίου, η ολική μαγνήτιση  $M$  είναι μηδέν, διότι οι περιοχές είναι τυχαία προσανατολισμένες και οι μαγνητικές ροπές των διαφόρων ατόμων αλληλοαναιρούνται. Η εξάρτηση της μαγνήτισης  $M$  από το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο δεν είναι γραμμική, αλλά σχηματίζει βρόγχο υστέρησης. Επιπλέον, οι τιμές της επιδεκτικότητας και της διαπερατότητας είναι μεταβαλλόμενες. Τα σιδηρομαγνητικά

υλικά μετατρέπονται σε παραμαγνητικά όταν η θερμοκρασία αυξάνεται πέρα τη θερμοκρασία Curie (TC). Παραδείγματα σιδηρομαγνητικών υλικών είναι ο σίδηρος, το κοβάλτιο και το νικέλιο.

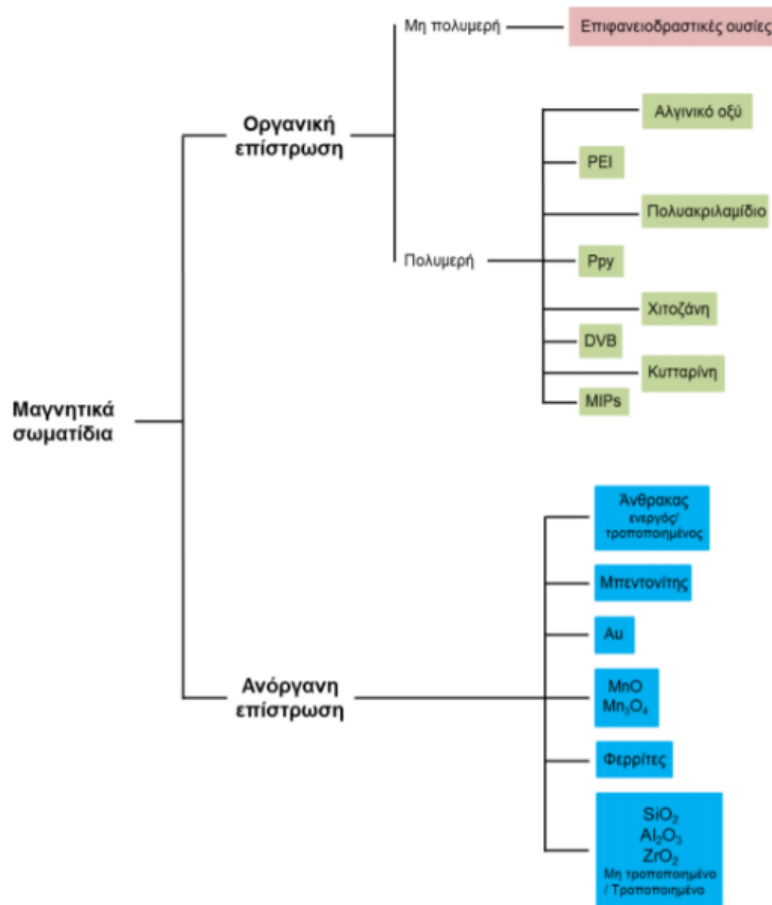
Ο υπερμαγνητισμός είναι ιδιότητα που εμφανίζουν οι νανοδομές που είναι κατασκευασμένες από σιδηρομαγνητικό υλικό και είναι μικρότερες από 15 nm. Η ονομασία οφείλεται στο ότι τα σωματίδια παρουσιάζουν συμπεριφορά παρόμοια με αυτή των παραμαγνητικών υλικών αλλά με πολύ μεγαλύτερες μαγνητικές ροπές. Αυτή η πολλά υποσχόμενη φυσική ιδιότητα των νανοσυστημάτων, βρίσκει εφαρμογή στην βιοϊατρική για την καταπολέμηση του καρκίνου (Mulens et al., 2013).

#### 4.8 Τροποποίηση επιφάνειας μεταλλικών νανοσωματιδίων

Η τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων, έχει σαν σκοπό την σταθεροποίησή τους, καθώς αποφεύγονται οξειδωτικά φαινόμενα και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νανοσωματιδίων που οδηγούν σε συσσωμάτωση. Επιτυγχάνεται με την χρήση, επιφανειοδραστικών ή πολυμερών ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους. Οι ενώσεις αυτές σταθεροποιούνται στην επιφάνεια μέσω ισχυρών ομοιοπολικών δεσμών, δεσμών van der waals και δεσμών υδρογόνου (Jun et al., 2008).

Η έλξη μεταξύ των νανοσωματιδίων λόγω διαμοριακών δυνάμεων, αντισταθμίζεται μέσω ηλεκτροστατικής ή στερεοχημικής άπωσης μεταξύ των μορίων του επιφανειοδραστικού. Επομένως, η απόσταση μεταξύ των νανοσωματιδίων παραμένει ικανή ώστε να αποφευχθεί η συσσωμάτωση. Οι ενώσεις που επιλέγονται συνήθως έχουν κάποια λειτουργική ομάδα η οποία μπορεί να προσδεθεί στην επιφάνεια όπως η καρβοξυλική, η υδροξυλική, η αμινική, η θειϊκή και άλλες. Η ελεγχόμενη οξείδωση της επιφάνειάς τους προσδίδει νέες ιδιότητες και το οξείδιο που αναπτύσσεται προφυλάσσει τον πυρήνα του μετάλλου από περαιτέρω οξείδωση.

Εκτός από οργανικές επιφανειοδραστικές ενώσεις χρησιμοποιούνται συχνά και ανόργανες όπως το διοξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) εξαιτίας της χαμηλής του κυτταροτοξικότητας και της δυνατότητας τροποποίησης της επιφάνειας καθώς και ο άνθρακας που είναι σταθερός. Στο Σχήμα 4.9, περιγράφει τα συνηθέστερα τροποποιητικά υλικά, με σκοπό την σταθεροποίηση νανοσωματιδίων.



**Σχήμα 4.9:** Συνθετέτερα χρησιμοποιούμενα τροποποιητικά νανοσωματιδίων (Ali et al., 2016)

#### 4.9 Νανοσωματίδια πυριτίας

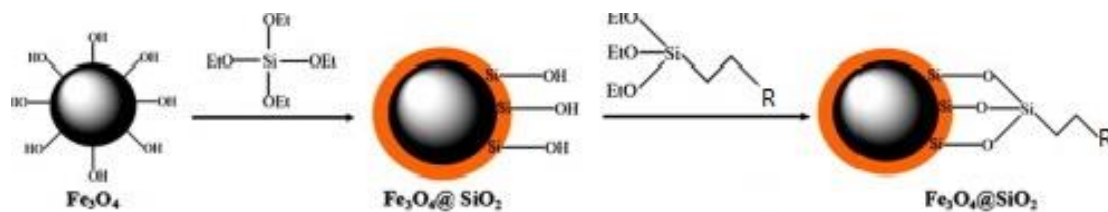
Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τροποποίηση των νανοσωματιδίων είναι με διοξείδιο του πυριτίου (σιλανοποίηση), λόγω της ευκολίας σύνθεσης, ελέγχου του πάχους του κελύφους, ομοιομορφίας ως προς την κατανομή και στο μέγεθος. Τα επικαλυμμένα σωματίδια πυριτίας, χαρακτηρίζονται από εξαιρετική σταθερότητα, χαμηλή υδροφοβικότητα και βιοσυμβατότητα (Wu et al., 2008).

Ο Stöber συνέθεσε για πρώτη φορά μονοδιάσπαρτα σφαιρικά σωματίδια SiO<sub>2</sub> (50 nm – 2 μm) με τη μέθοδο sol-gel (Stöber et al., 1968). Ως Sols ορίζονται οι διασπορές κolloειδών σωματιδίων (μεγέθους από 1 - 100 nm) σε ένα υγρό. Το Gel είναι ένα άκαμπτο δίκτυο που εμπεριέχει πόρους διαστάσεων της τάξεως των μm και πολυμερικές αλυσίδες των οποίων το μέσο μήκος είναι μεγαλύτερο από ένα μικρόμετρο.

Η σύνθεση γίνεται με την υδρόλυση και πολύ-συμπύκνωση ενός αλκοξειδίου του πυριτίου (π.χ. Tetraethyl orthosilicate, TEOS) σε διάλυμα αλκοόλης-νερού παρουσία αμμωνίας ως καταλύτη (Aguilar-Arteaga et al., 2010), (Aguilar-Arteaga et al., 2010 και Wu et al., 2015).



Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση υδρόλυσης (Αντίδραση 4.3), μέσω της προσθήκης H<sub>2</sub>O, αντικαθιστά τις ομάδες αλκοξειδίων (OR) με τις ομάδες υδροξυλίου (OH). Οι επόμενες αντιδράσεις συμπύκνωσης (Αντίδραση 4.4-4.5) παράγουν δεσμούς Si-O-Si, αφήνοντας τις τερματικές δραστικές ομάδες διαθέσιμες για περαιτέρω ακινητοποίηση μορίων. Τα επιφανειακά υδροξύλια των νανοσωματιδίων χρησιμοποιούνται έπειτα για την τροποποίησης της επιφάνειας.



**Σχήμα 4.10:** Μηχανισμός τροποποίησης νανοσωματιδίων σιδήρου με σίλικα

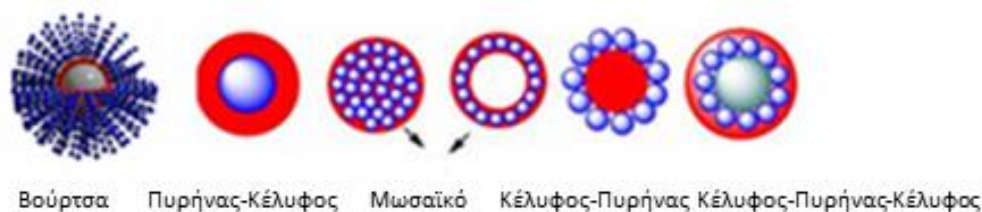
Αξιοσημείωτη είναι η επίδραση του pH στην σύνθεση. Σε όξινες τιμές pH, τα οξείδια του πυριτίου σχηματίζουν γραμμικά μόρια, με χαμηλό βαθμό διασταυρούμενης σύνδεσης μεταξύ των σχηματιζόμενων αλυσίδων, υπό συνθήκες υδρόλυσης. Οι αλυσίδες καθώς σχηματίζονται μπλέκουν μεταξύ τους και δημιουργούν πρόσθετους κλάδους με συνέπεια το σχηματισμό πηκτώματος. Σε βασικές τιμές pH, όπου λαμβάνει χώρα ταχεία υδρόλυση, τα οξείδια του πυριτίου σχηματίζουν διακλαδισμένες μορφές συμπλεγμάτων (Wu et al., 2015).

#### 4.10 Μορφολογία μαγνητικών νανοσωματιδίων

Η μορφολογία των μαγνητικών νανοσωματιδίων είναι μία ελεγχόμενη ιδιότητα η οποία μεταβάλλεται επεμβαίνοντας στην πορεία της σύνθεσης. Στο Σχήμα 4.11, παρατίθενται οι κύριες δομές μαγνητικών νανοσωματιδίων, στις οποίες τον ρόλο του πυρήνα παίζει το οξείδιο του σιδήρου.

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, ο τύπος «κέλυφος-πυρήνα» (core-shell) είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος. Σε αυτόν τον τύπο, ο πυρήνας είναι το μαγνητικό μέρος και η επιστρωση του πολυμερούς το κέλυφος. Κατά τη δομή «μωσαϊκού» (mosaic), τα μαγνητικά νανοσωματίδια εναποτίθενται ως μικρά μαγνητικά σωματίδια (Lyon

et al., 2004 και Wu et al., 2015). Τέλος, η μορφολογία νανοσωματιδίων «βούρτσας» (brush), στην οποία τα μη μεταλλικά μέρη εναποτίθενται κάθετα πάνω στον πυρήνα του μαγνητικού νανοσωματιδίου (Σχήμα 4.11). Εφαρμόζονται συχνά λόγω της ευκολίας ελέγχου του πάχους και της πυκνότητάς τους (Ferhan et al., 2015 και Wu et al., 2015).



**Σχήμα 4.11:** Μορφολογία νανοσωματιδίων (Giakisikli and Anthemidis, 2013)

#### 4.11 Εφαρμογές στην Αναλυτική χημεία

Ο τομέας της αναλυτικής χημείας δεν θα μπορούσε να μείνει ανεπηρέαστος από την ραγδαία ανάπτυξη των νανοϋλικών. Είναι παρών σε πολλούς ορισμούς της νανοτεχνολογίας και της νανοεπιστήμης, μιας και σε αυτόν τον τομέα είναι απαραίτητη η ακρίβεια των αποτελεσμάτων για την σωστή αξιολόγηση των πληροφοριών που προκύπτουν. Παράλληλα με τον προσδιορισμό των φυσικών χαρακτηριστικών των νανοϋλικών όπως τυπικές φυσικές ιδιότητες, διαστάσεις και τοπογραφία, είναι απαραίτητος και ο προσδιορισμός των χημικών τους ιδιοτήτων (σύνθεση, χειρομορφία, χημική συμπεριφορά κ.α.) μιας και οι δύο αυτοί τύποι πληροφοριών είναι αλληλένδετες (φυσικοχημικές ιδιότητες).

Επιπρόσθετα, τα νανοσωματίδια με μαγνητικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως «αναλυτικά εργαλεία» για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων εκμεταλλευόμενοι το μέγεθος τους και τις μοναδικές τους ιδιότητες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επεξεργασία και στον καθαρισμό του δείγματος, ως προσροφητικά υλικά, ως αδρανές υπόστρωμα, ως στατική φάση, ως παράγοντες ιοντισμού για την άμεση ανάλυση δειγμάτων με φασματομετρία μάζας δευτερογενούς ιοντισμού (Ho et al., 2011; Ligler and White, 2013; Lucena et al., 2011 και Trujillo-Rodríguez et al., 2016).

Στην παρούσα Διατριβή, πραγματοποιήθηκε σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων σιδήρου, με τη μέθοδο sol-gel, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως προσροφητικά υλικά στην εκχύλιση φυτοφαρμάκων από επιφανειακά ύδατα.

## B ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ (Ionic Liquids ILs)

### 4.12 Εισαγωγή

Ο όρος «ιοντικά υγρά» (Ionic liquids, ILs) αναφέρεται σε μια ευρεία χημική κατηγορία ημι-οργανικών αλάτων ή μειγμάτων αλάτων, τα οποία αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από ιόντα. Η ανακάλυψη των ιοντικών υγρών (ionic liquids ILs), τοποθετείται χρονολογικά στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Η πρώτη αναφορά σε ιοντικές ενώσεις με σημείο τήξης χαμηλότερο των 100°C έγινε από τον William Ramsay το 1876, σε μια μελέτη της επίδρασης αλλυλικών αλογικών υποκαταστατών σε μέθυλο-πυριδίνες. Σχεδόν μια δεκαετία αργότερα, ο Pull Murill μελέτησε την επίδραση του αριθμού των υποκαταστατών μεθυλίου του ιωδίου σε ιοντικές ενώσεις σε μέθυλο-πυριδίνες απ' όπου και προέκυψαν ενώσεις με σημείο τήξης  $T_m < 100^\circ\text{C}$  (Trujillo-Rodríguez et al., 2016).

Τα ιοντικά υγρά (Ionic liquids ILs) χωρίζονται σε αυτά που έχουν σημείο τήξης  $T_m < 373\text{K}$  και στα RTILs (room-temperature ILs) με σημείο τήξης  $T_m < 298\text{K}$  (Hayes et al., 2015). Στην πραγματικότητα, χιλιάδες από τα ILs που έχουν καταγραφεί παραμένουν σε υγρή κατάσταση ακόμα και σε θερμοκρασίες κάτω των  $-96^\circ\text{C}$ , σε αντίθεση με το χλωριούχο νάτριο που εμφανίζει σημείο τήξης γύρω στους  $800^\circ\text{C}$  (Baker et al., 2005).

### 4.13 Κατηγορίες ιοντικών υγρών

Εξαιτίας της ευκολίας συνδυασμού ανιόντων και κατιόντων για τη σύνθεση ιοντικών υγρών, δύναται να προκύψουν πάνω από  $10^{18}$  διαφορετικά ιοντικά υγρά με τις εκάστοτε επιθυμητές φυσικοχημικές ιδιότητες (Clark et al., 2016 και Sajid, 2019). Είναι αποτελούμενα από ένα άλας, όπου το ένα ή και τα δύο εμπλεκόμενα ιόντα (μονοσθενή ή δισθενή) είναι μεγάλα σε μέγεθος και το κατιόν παρουσιάζει ένα μικρό βαθμό συμμετρίας (Santos et al., 2014). Αυτοί οι παράγοντες μειώνουν την ενέργεια πλέγματος της κρυσταλλικής μορφής του αλατος και ως εκ τούτου μειώνουν το σημείο τήξης (Clark et al., 2016).

Οι πολλά υποσχόμενες-ευμετάβλητες ιδιότητές τους (μη πτητικά, μη εύφλεκτα, ανακυκλώσιμα και ο φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος σύνθεσής τους, τα καθιστά «πράσινους διαλύτες» (Ghandi, 2014). Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

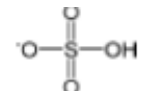
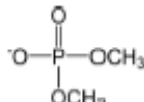
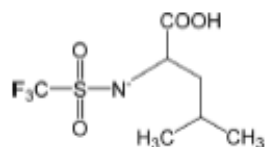
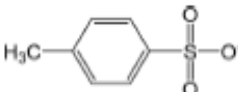
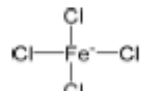
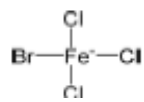


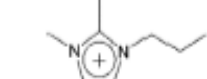

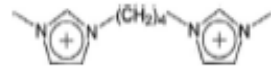



- Στα «απρωτικά» (aprotic – δέκτης πρωτονίων), γνωστά και ως «κλασσικά» ή «συμβατικά» ILs και
- Στα «πρωτικά» (protic – δότης πρωτονίων ή ιοντικά υγρά κατά Brønsted ή Lewis) ILs.

Στα απρωτικά εντοπίζονται ILs με κατιόντα όπως το ιμιδαζόλιο ή το πυριδίνιο και με ανιόντα όπως τα  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$  κ.λπ. (Hayes et al., 2015 και Mai et al., 2014). Τα πρωτικά, λόγω της δυνατότητάς τους να μεταφέρουν πρωτόνια βρίσκουν εφαρμογή σε τεχνολογία

κυψελών καυσίμων, ως όξινοι καταλύτες και ως διαλύτες. Βέβαια, ο διαχωρισμός αυτός δεν μπορεί να είναι απόλυτος καθώς έχουν αναφερθεί IIs με ικανότητα πρόσληψης και απελευθέρωσης πρωτονίου (Hayes et al., 2015).

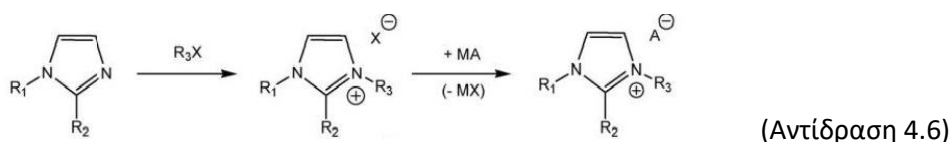
Τα είδη και οι ιδιότητες των ιοντικών υγρών διευρύνονται περισσότερο αναγεννώντας το κατάλογο των πιθανών κατιόντων και ανιόντων, πέρα από τα  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  με ιόντα που έχουν διακριτά δομικά χαρακτηριστικά (π.χ. ύπαρξη παραμαγνητικού ή μαγνητικού ατόμου) (Dong et al., 2014; Hayes et al., 2015; Yan and Wang, 2013 και Zhou et al., 2018). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.2) παρουσιάζονται τα κυριότερα ιόντα και κατιόντα στην σύνθεση ιοντικών υγρών.

**Πίνακας 4.2:** Κύριοι εκπρόσωποι ανιόντων και κατιόντων στην σύνθεση ιοντικών υγρών

$[\text{HSO}_4]^-$	Hydrogen sulfate	
$[\text{DMP}]^-$	Dimethylphosphate	
$[\text{Tf-Leu}]^-$	<i>N</i> -Trifluoromethanesulfonyl leucine	
$[\text{TOS}]^-$	Tosylate	
$[\text{FeCl}_4]^-$	Tetrachloroferrate	
$[\text{FeBrCl}_3]^-$	Bromotrichloroferrate	
$[\text{C}_8\text{mim}]^+$	1-Octyl-3-methylimidazolium	
$[\text{C}_{16}\text{mim}]^+$	1-Hexadecyl-3-methylimidazolium	
$[\text{PDmim}]^+$	1-Propyl-2,3-dimethylimidazolium	
$[(\text{CH}_2)_n\text{COOHmim}]^+$	1-Alkylcarboxylic acid-3-methylimidazolium	
$[\text{C}_4\text{mim}]_2^+$	1,1-Bis(3-dimethylimidazolium-1-yl)butane	
$[\text{C}_4\text{-py}]^+$	1-Butylpyridinium	
$[\text{C}_6\text{-py}]^+$	1-Hexylpyridinium	
$[\text{C}_8\text{-py}]^+$	1-Octylpyridinium	

#### 4.14 Τεχνικές Σύνθεσης ιοντικών υγρών

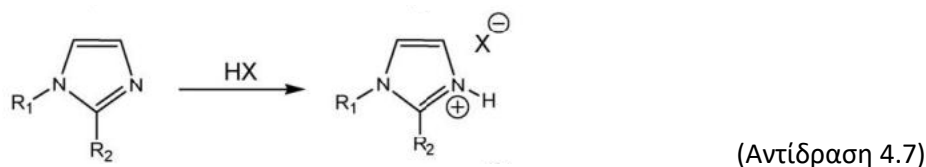
Με την τεχνική της μεταθετικής ανταλλαγής ανιόντος, παράγονται ιοντικά υγρά τόσο διαλυτά όσο και μη στο νερό. Τα αδιάλυτα στο νερό, σχηματίζονται από άλατα αλογονιδίων ή μεταλλικά άλατα αμμωνίου (Αντίδραση 4.6). Τα ιοντικά υγρά μετά τη σύνθεση τους, απομακρύνονται από το υδατικό διάλυμα με χρήση οργανικών διαλυτών διχλωρομεθανίου και προπανόνης. Τα αλογονωμένα παραπροϊόντα είναι δύσκολο να διαχωριστούν με διήθηση ιδιαίτερα από τα υδρόφιλα ιοντικά υγρά (Katritzky et al., 2006).



Όπου  $X^-$ :  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $RSO_4^-$ ,  $CH_3SO_3^-$ ,  $RPO_4^-$

Η μέθοδος εξουδετέρωσης μίας βάσης με ένα οξύ κατά Brønsted (Αντίδραση 4.7), κυριαρχεί σε συνθέσεις ιοντικών υγρών που περιέχουν θειικά, σουλφονικά και φωσφορικά ιόντα (Katritzky et al., 2005). Η ειδοποιός διαφορά μεταξύ μη πρωτονιωμένων και πρωτονιωμένων ιοντικών υγρών είναι η ύπαρξη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ ανιόντος και κατιόντος το οποίο μπορεί και να οδηγήσει στην ανάπτυξη δικτύου δεσμών υδρογόνου.

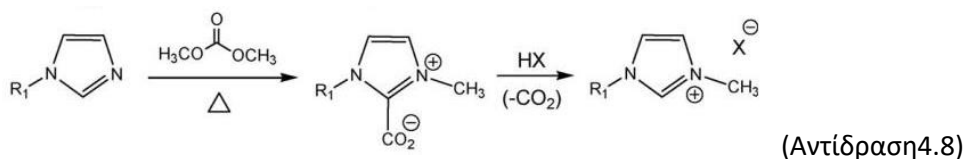
Η σύνθεση των πρωτονιωμένων είναι ταχύτερη σε θερμοκρασία δωματίου έναντι των μη πρωτονιωμένων (Masahiro Yoshizawa et al., 2003). Η μέθοδος αυτή μειονεκτεί ως προς την καθαρότητα του ιοντικού υγρού, διότι ίχνη του αλκυλιμιδαζολίου ή του οξέος μπορούν να παραμείνουν στο τελικό προϊόν. Επίσης, η αντίδραση της αλκυλίωσης υπόκειται σε περιορισμούς ανάλογα με τη δραστηριότητα και τη διαθεσιμότητα των παραγόντων αλκυλίωσης.



Όπου  $X^-$ :  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $RSO_4^-$ ,  $CH_3SO_3^-$ ,  $RPO_4^-$

Η ανθρακική μέθοδος αποτελεί μία εναλλακτική πορεία σύνθεσης ιοντικών υγρών. Η χρήση του διμεθυλοανθρακικού (DMC), ως καθαρού παράγοντα μεθυλίωσης και αντικατάσταση των αλκυλαλογονιδίων, αποφεύγει την παρουσία αλογόνων και άλλων παραπροϊόντων (Αντίδραση 4.8). Ωστόσο, αυτή η μέθοδος παρουσιάζει περιορισμένη

εφαρμογή, καθώς εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του οξέος (HX) ή των αλάτων  $[NH_4]^+$  (Bonhôte et al., 1996).



Όπου  $X^-$ :  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $RSO_4^-$ ,  $CH_3SO_3^-$ ,  $RPO_4^-$

Για τη σύνθεση ιοντικών υγρών χρησιμοποιούνται και μη συμβατικές μέθοδοι όπως η χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων. Πλεονεκτούν έναντι των υπολοίπων μεθόδων, στην ομοιόμορφη ανάμιξη των αντιδρώντων, στην μείωση του χρόνου αντίδρασης καθώς και στον σχηματισμό τοπικών μεγίστων θερμοκρασίας (Varma and Namboodiri, 2001).

#### 4.15 Τεχνικές καθαρισμού- ειδικές διεργασίες

Βήμα καθοριστικό πριν την εφαρμογή των ILs ως προσροφητικό στην εκχύλιση, αποτελεί το στάδιο του καθαρισμού. Οι ιδιότητες των ιοντικών υγρών (φυσικές και χημικές) και η καταλυτική τους δραστηριότητα επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία προσμίξεων, οι οποίες προκύπτουν από την ημιτελή διαδικασία σύνθεσης των ιοντικών υγρών (McIntosh et al., 2016). Ο καθαρισμός εξαρτάται κυρίως από τη φύση και τις ιδιότητες των εκάστοτε προϊόντων, τις προσμίξεις, τους διαλύτες και τις συνθήκες και πραγματοποιείται ποικιλοτρόπως (Zhou et al., 2018). Οι προσμίξεις μπορεί να περιλαμβάνουν πτητικές ενώσεις, υπολείμματα διαλυτών, οργανικές αμίνες, παράγοντες αλκυλίωσης, αλογόνα, καθώς επίσης και νερό. Μπορεί να είναι στερεές ή υγρές, ευδιάλυτες ή δυσδιάλυτες σε οργανικούς διαλύτες.

Για την απομάκρυνση μίας στερεής πρόσμιξης σε υγρό περιβάλλον συνήθως χρησιμοποιείται διήθηση, ή η φυγοκέντρηση. Η διήθηση πραγματοποιείται είτε με πίεση (με απλό ή πτυχωτό ηθμό), είτε υπό ελαττωμένη πίεση (με γυάλινο ηθμό-Buchner). Η φυγοκέντρηση εφαρμόζεται σε περιπτώσεις όπου η διήθηση δεν είναι εφικτή (όταν η ουσία είναι άμορφη ή κολλώδης) και οι ποσότητες πολύ μικρές.

Η ανακρυστάλλωση είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική καθαρισμού ιοντικών υγρών. Συνίσταται στη διαλυτοποίηση του προϊόντος σε ένα θερμό διαλύτη, ή σε μίγμα διαλυτών, και στον σχηματισμό κρυστάλλων καθαρής ένωσης από τον εν συνεχεία ψυχόμενο διαλύτη, ενώ οι προσμίξεις παραμένουν διαλυτές. Η ανακρυστάλλωση στηρίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα του στερεού προϊόντος και των προσμίξεων στον χρησιμοποιούμενο διαλύτη (Clare et al., 2009).

Συμπληρωματικά με την ανακρυστάλλωση, για τον καθαρισμό των ILS, χρησιμοποιείται η χρωματογραφία κατανομής σε στήλη. Η χρωματογραφία στήλης, είναι μια τεχνική διαχωρισμού, που βασίζεται στην προσρόφηση των συστατικών ενός δείγματος πάνω σε μια στατική φάση. Το ιοντικό υγρό αφήνεται να περάσει διαμέσου στερεής στατικής φάση εντός κυλινδρικής στήλης λόγω βαρύτητας ή με εφαρμογή πίεσης υπεράνω της στήλης (Flash chromatography). Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος εξαρτάται από τους διαφορετικούς συντελεστές κατανομής κάθε συστατικού μεταξύ των διαλυτών. Τα πιο συνηθισμένα προσοφητικά για την πλήρωση της στήλης είναι το διοξείδιο του πυριτίου (silica gel), ο σελίτης (celite) και κυτταρίνη (cellulose).

Άλλες μέθοδοι καθαρισμού των ιοντικών υγρών είναι η απόσταξη σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (200-300°C) και χαμηλής πίεσης (0,001-5mbar) και η μέθοδος τήξης κατά ζώνες. Σύμφωνα με την τελευταία, τα ιοντικά υγρά διαχωρίζονται από τις προσμίξεις λόγω της διαφοράς του σχήματος των μορίων τους (Weerachanchai and Lee, 2014). Το ιοντικό υγρό ψύχεται μέσα σε ένα κλειστό δοχείο σχηματίζοντας μία ψυχρή στήλη. Τα μόρια των προσμίξεων, λόγω σχήματος δεν κρυσταλλώνουν στη δομή του ιοντικού υγρού με αποτέλεσμα να παραμένουν στην υγρή φάση. Η υγρή φάση στη συνέχεια απομακρύνεται και ο κρύσταλλος θερμαίνεται, δίνοντας υψηλής καθαρότητας ιοντικά υγρά. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως σε ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά.

Για τον αποχρωματισμό των ιοντικών υγρών, χρησιμοποιούνται προσοφητικά μέσα όπως ο ενεργός άνθρακας, το διοξείδιο του πυριτίου και η αλούμινα, που έχουν την ικανότητα να προσροφούν στην επιφάνειά τους μικρομοριακές οργανικές ουσίες και χρωστικές ενώσεις.

Τέλος, η υγρασία στην επιφάνεια των ιοντικών υγρών απομακρύνεται με εφαρμογή κενού. Εντούτοις, η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται για μεγάλο μέρος πρωτονωμένων ιοντικών υγρών, διότι εμφανίζουν τάση ατμών υπό συνθήκες κενού, λόγω διάσπασης των μορίων στα πρωτογενή συστατικά τους

#### 4.16 Ιδιότητες ιοντικών υγρών

Δεδομένου του μεγάλου εύρους των ιοντικών υγρών, είναι δύσκολο να κατηγοριοποιηθούν οι ιδιότητες τους και τα χαρακτηριστικά τους. Βιβλιογραφικά, συνήθως δίνεται περισσότερη έμφαση στις διαφορές τους παρά στις ομοιότητες. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες των ILS οφείλονται στη δομή τους, ενώ οι μετατροπές που υφίστανται σε μοριακό επίπεδο προκαλούν μεταβολή των ιδιοτήτων τους (Dong et al., 2014). Η παρουσία των ανιόντων ρυθμίζουν την ενεργότητα και τις χημικές



ιδιότητες των ιοντικών υγρών ενώ η παρουσία των κατιόντων τις φυσικές ιδιότητες όπως η πολικότητα, το σημείο τήξης, το ιξώδες, η πυκνότητα κ.α.

Το ιξώδες αποτελεί σημαντική ιδιότητα των ILs καθώς επηρεάζει την κινητική της εκχύλισης και τον εύκολο διαχωρισμό των φάσεων. ILs με χαμηλό ιξώδες βρίσκουν εφαρμογή στην εκχύλιση αναλυτών, ενώ με υψηλό ιξώδες σαν στατική φάση στην αέρια χρωματογραφία (Clark et al., 2016). Με αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας αυξάνεται το ιξώδες (Dzyuba and Bartsch, 2002 και Pierson et al., 2017). Επηρεάζεται επίσης σημαντικά από ενδομοριακές δυνάμεις όπως οι δυνάμεις van der Waals, οι δεσμοί υδρογόνου και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Ho et al., 2011).

Το σημείο τήξης, είναι μία εύκολα προσαρμοζόμενη ιδιότητα των ILs, καθώς με αύξηση του μεγέθους των κατιόντων και με αντικατάσταση των ανόργανων κατιόντων με οργανικά παρατηρείται μείωση του σημείου τήξης. Ένας άλλος παράγοντας που επιδρά στο σημείο τήξης είναι ο βαθμός ασυμμετρίας του κατιόντος. Τα ασύμμετρα κατιόντα επιδρούν σε μεγαλύτερο βαθμό στο σημείο τήξεως μειώνοντάς το, συγκριτικά με τα συμμετρικά κατιόντα. Η παρουσία ή απουσία ισχυρών δεσμών υδρογόνου στο πλέγμα αποτελεί έναν ακόμα παράγοντα επίδρασης στο σημείο τήξης (Venkatraman et al., 2018). Το μήκος της αλκυλομάδας επιδρά στο σημείο τήξης, καθώς για αλκυλικές αλυσίδες με περισσότερα από δώδεκα άτομα άνθρακα παρατηρείται ότι σχηματίζονται υγρές κρυσταλλικές φάσεις (Trohalaki and Pachter, 2005).

Το μήκος της αλκυλομάδας, σχετίζεται εκτός από το σημείο τήξης και με την πολικότητα των ILs. Αυτή η ιδιότητα παίζει πρωταρχικό ρόλο στην εκχύλιση και στον διαχωρισμό προϊόντων, καθώς οι σχετικές διαλυτότητες της ιοντικής και της εκχυλιζόμενης φάσης τροποποιούνται και προσαρμόζονται, ώστε να καταστήσουν το διαχωρισμό όσο το δυνατόν ευκολότερο.

Η χαμηλή έως και μηδενική τάση ατμών που χαρακτηρίζει τα περισσότερα ILs, τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιηθούν σε συστήματα εφαρμογής υψηλής πίεσης κενού (Aschenbrenner et al., 2009). Ιοντικά υγρά με υψηλή τάση ατμών, υπερνικούν τα υπάρχοντα προβλήματα από την χρήση κοινών οργανικών διαλυτών λόγω εξάτμισής τους κατά την διάρκεια της αντίδρασης και του διαχωρισμού τους (Aschenbrenner et al., 2009). Συνεπώς, δύνανται να χαρακτηριστούν ως μη εύφλεκτα (με ελάχιστες εξαιρέσεις), ενώ παράλληλα παρουσιάζουν υψηλή θερμική σταθερότητα.

Η θερμική σταθερότητα είναι μία ιδιότητα που επηρεάζει τις εκχυλίσεις κατά τις οποίες απαιτείται εφαρμογή θερμότητας. Έχουν καταγραφεί εξαιρετικά υψηλές τιμές θερμικής σταθερότητας για μαγνητικά ιοντικά υγρά, της τάξης των 623 K υπό ατμόσφαιρα

αζώτου (Deng et al., 2011). IIs που περιέχουν αμμωνιακά κατιόντα παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή θερμική σταθερότητα που ποικίλει από 203°C έως 258°C. Σε αντίθεση τα δικατιονικά που περιέχουν ιμιδαζόλιο, παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές θερμικής σταθερότητας που κυμαίνονται από 294 °C έως 314 °C (Nacham et al., 2016). Γενικά αυξάνεται με την ακόλουθη σειρά:  $PF_6^- > NTf_2^- > BF_4^- > Br^- > Cl^-$  (Awad et al., 2004).

Η αγωγιμότητα των ιοντικών υγρών, επηρεάζεται από παράγοντες όπως το ιξώδες, η πυκνότητα, το μέγεθος των ιόντων, τα συσσωματώματα και τις ιοντικές κινήσεις (Das and Roy, 2013). Κυμαίνεται από 0,1 έως 20 mS cm<sup>-1</sup>, με μεγαλύτερες τιμές για αυτά που περιέχουν ιμιδαζόλιο συγκριτικά με αυτά που περιέχουν αμμώνια (Zech et al., 2010).

Πρόσφατα, η μαγνητική ιδιότητα που παρουσιάζει μία υποκατηγορία IIs αυτή των μαγνητικών ιοντικών υγρών έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονου ενδιαφέροντος για πολυάριθμες αναλυτικές εφαρμογές. Τα ιοντικά υγρά που προκύπτουν, έχουν ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τα συμβατικά ιοντικά υγρά αλλά παρουσιάζουν ισχυρή απόκριση όταν βρεθούν σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (Clark et al., 2016). Η σύνθεσή τους βασίζεται στην ενσωμάτωση ενός παραμαγνητικού στοιχείου είτε στο ανιόν είτε στο κατιόν. Συνήθως χρησιμοποιούνται μέταλλα μετάπτωσης ή λανθανίδες (Trujillo-Rodríguez et al., 2016). Παρόλο που τα IIs είναι γνωστά την τελευταία δεκαετία με πληθώρα εφαρμογών, δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για τις μαγνητικές ιδιότητες τους.

#### 4.17 Μαγνητικά Ιοντικά Υγρά

Τα μαγνητικά ιοντικά υγρά (Magnetic Ionic Liquid, MILs) διασπείρονται σε ένα δείγμα και μπορούν στη συνέχεια να απομονωθούν εύκολα, αποφεύγοντας το χρονοβόρο στάδιο της φυγοκέντρωσης, παρουσία μαγνητικού πεδίου. Με την εισαγωγή ιόντων μετάλλων στη διάταξη των ιοντικών υγρών παρατηρήθηκαν υψηλότερες ανακτήσεις σε σχέση με συμβατικά IIs που είχαν ακινητοποιηθεί ή προσροφηθεί σε ένα μέταλλο. Μία πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ότι η ανάκτηση του προσροφητικού εξαρτάται από την ποιότητα της ακινητοποίησης, καθώς τα ιοντικά υγρά μπορούν να αποδεσμευτούν από το μαγνητικό υποστήριγμα, με αποτέλεσμα να μη μπορούν να διαχωριστούν παρουσία μαγνητικού πεδίου (Sajid, 2019). Το πρώτο MIL που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση ήταν το 1-butyl-3-methylimidazolium tet-rachloroferrate [bmim]FeCl<sub>4</sub>, το οποίο παρουσίαζε υψηλές τιμές μαγνητικής επιδεκτικότητας, όμως κατά την εκχύλιση των αναλυτών. Η υδρόλυσή του στο δείγμα δυσχέραινε την εφαρμογή του (Sajid, 2019).

Σήμερα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η πληθώρα ιόντων που μπορούν να συνδυαστούν δίνουν μαγνητικά ιοντικά υγρά με τις επιθυμητές, για την κάθε εφαρμογή,

τιμές πολικότητας. Μερικές από τις στρατηγικές που έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την σύνθεση MIL με «στοχευμένες» τιμές πολικότητας είναι οι εξής (Clark et al., 2016):

- Με την προσθήκη μεγάλων αλκυλικών αλυσίδων στα κατιόντα. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η ικανότητα εκχύλισης των φαινολών από υδατικά δείγματα, αυξάνεται με την προσθήκη κατιόντων με μεγάλη αλκυλομάδα λόγω μεγάλης υδροφοβικότητας (Deng et al., 2011)
- Με την ενσωμάτωση μη πολικών ομάδων στην δομή των IL όπως το υδρόφοβο ανιόν bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide ([NTf<sub>2</sub>-]) (Nacham et al., 2016)
- Συνδυάζοντας ένα κατιόν με έναν υποκαταστάτη και ένα άλλο με το παραμαγνητικό ανιόν σε ένα δικατιονικό σύστημα, ή συνδυάζοντας δύο κατιόντα με ένα υδρόφοβο μέταλλο και με ένα παραμαγνητικό ανιόν
- Η χρήση ενός ανιόντος που να ανταποκρίνεται τόσο στον υδρόφοβο όσο και στον μαγνητικό χαρακτήρα. Ένα παράδειγμα τέτοιου ανιόντος είναι το hexafluoroacetylacetonate ([hfac<sup>-</sup>]), ως υποκαταστάτης στα ιμαδοζολικά MIL (Mehdi et al., 2010).

Η ευκολία στη σύνθεση και στην χρήση τους, το χαμηλό κόστος, η χρήση μικρού όγκου διαλυτών και οι υψηλές ανακτήσεις είναι μερικά από τα πλεονεκτήματά των μαγνητικών ιοντικών υγρών (Σχήμα 4.12).



Σχήμα 4.12: Χαρακτηριστικά μαγνητικών ιοντικών υγρών

### 4.18 Εφαρμογές

Η πλειοψηφία των οργανικών διαλυτών, που χρησιμοποιούνται δεν είναι σύμφωνοι με τις αρχές της πράσινης χημείας καθώς μπορούν να προκαλέσουν τοξικά φαινόμενα στο περιβάλλον και στον άνθρωπο. Τα πολύ υποσχόμενα IIs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντικαταστάτες των παραδοσιακών οργανικών διαλυτών.

Λόγω των πλεονεκτημάτων τους έναντι των παραδοσιακών συμβατικών οργανικών διαλυτών τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί ένα μεγάλο δίκτυο εφαρμογών (Σχήμα 4.13) σε σημαντικούς ερευνητικούς και βιομηχανικούς τομείς, όπως η Οργανική Χημεία, η Ηλεκτροχημεία, η Αναλυτική Χημεία, η Βιοχημεία, η Ιατρική και η μηχανική (Das and Roy, 2013; Plechkova and Seddon, 2008; και Rykowska et al., 2018).

Πιο συγκεκριμένα, μερικά από τα πεδία εφαρμογή των IIs είναι ο διαχωρισμός αζεοτροπικών μιγμάτων, ως στατικές φάσεις στην χρωματογραφία, ως υποστρώματα για την σταθεροποίηση ενζύμων, στην επιμετάλλωση του αλουμινίου, ως ηλεκτρολύτες στην ηλεκτροχημεία (φωτοβολταϊκά), στην διαλυτοποίηση της κυτταρίνης, στις αντιδράσεις υδροξυλίωσης του διπλού δεσμού μεταξύ ανθράκων, ως πρόσθετες ενώσεις χρωμάτων καθώς και σε μπαταρίες λιθίου, ως λιπαντικά, ως πρόδρομες ενώσεις για την σύνθεση νανο-υλικών και υλικών με υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, ως διαλύτες (οργανική, οργανομεταλλική, κατάλυση κ.α).



Σχήμα 4.13 Τομείς εφαρμογών των ιοντικών υγρών

Καθώς η λίστα των εφαρμογών IIs ολοένα και διευρύνεται, είναι επιτακτική ανάγκη της διερεύνησης των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που τα συνοδεύουν. Τα ιοντικά υγρά αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια και ως εκ τούτου, δεν έχουν υποβληθεί ακόμα σε εκτεταμένες τοξικολογικές μελέτες.

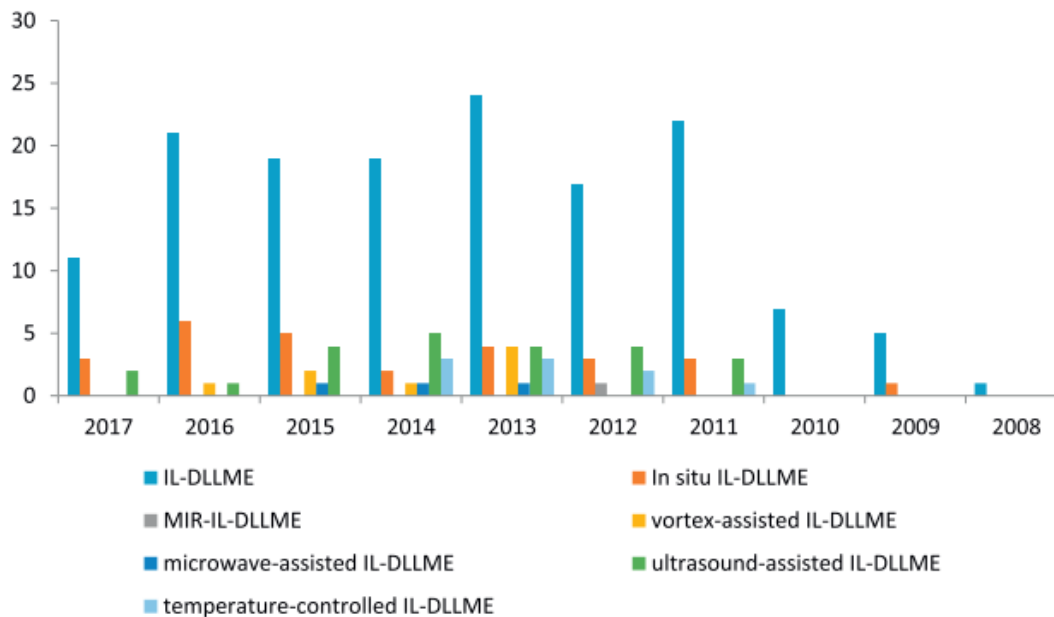
Ωστόσο, έχουν διαπιστωθεί προβλήματα κατά τη χρήση τους ως διαλύτες, γεγονός που συνεπάγεται προβληματισμούς και αμφισβητήσεις ως προς τον «πράσινο» χαρακτήρα που τους αποδίδεται (Amde et al., 2015 και Das and Roy, 2013). Συνεπώς, μια ενδεχόμενη απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον, είτε λόγω ύπαρξης αυτών σε κοινά καταναλωτικά αγαθά (για παράδειγμα μπαταρίες, προϊόντα οικιακής χρήσης ως καλλυντικά, προϊόντα κλωστοϋφαντουργίας) είτε λόγω κάποιας εκούσιας ή ακούσιας δραστηριότητας (πχ. κάποιο ατύχημα) αναπόφευκτα αποτελεί θέμα μεγάλης ανησυχίας.

#### 4.19 Εφαρμογές στην Αναλυτική Χημεία ως προσοφητικά

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον ως προς τη χρήση των IIs αντικατοπτρίζεται στον αυξανόμενο αριθμό των σχετικών δημοσιεύσεων. Συγκεκριμένα, πάνω από 6000 δημοσιεύσεις σχετιζόμενες με τα IIs δημοσιεύτηκαν μετά το 2000.

Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στην σύνθεση ιοντικών υγρών με σκοπό την εφαρμογή τους ως προσοφητικά υλικά για την απομόνωση αναλυτών από διάφορα υποστρώματα, ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπρόσθετα, πρόκληση της σύγχρονης αναλυτικής χημείας αποτελεί η ανάπτυξη μεθόδων που ελαχιστοποιούν ή ακόμα και μηδενίζουν την χρήση τοξικών ουσιών (Rykowska et al., 2018).

Τα μαγνητικά ιοντικά υγρά χρησιμοποιούνται ως προσοφητικά στην εκχύλιση με χρήση υπερήχων (UAE), στην εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (MAE), στην υγρή-υγρή μικρο-εκχύλιση διασποράς (DLLME), και σε παραλλαγές της κλασικής (DLLME) όπως η υγρή-υγρή μικρο-εκχύλισης διασποράς με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία (temperature- controlled IL-DLLME) και στην «απευθείας-επί τόπου» υγρή-υγρή μικρο-εκχύλισης διασποράς (in-situ IL-DLLME). Στο Σχήμα 4.14 που ακολουθεί συνοψίζονται οι δημοσιευμένες εργασίες που εμπλέκουν την χρήση ιοντικών υγρών ως προσοφητικά στην εκχύλιση με την χρήση αναλυτικών τεχνικών που περιεγράφηκαν εκτενώς στο κεφάλαιο 3.



**Σχήμα 4.14:** Χρήση μαγνητικών ιοντικών υγρών ως προσοφητικά στην εκχύλιση

Η εφαρμογή των συμβατικών MIL στην εκχύλιση αναλυτών δεν περιορίζεται μόνο σε υδατικά υποστρώματα αλλά επεκτείνεται και σε στερεά υποστρώματα όπως περιβαλλοντικά δείγματα, τρόφιμα, βιολογικά δείγματα κ.α (Leong et al., 2014; Rykowska et al., 2018; Sajid and Alhooshani, 2018 και Zhu et al., 2017). Στους πίνακες (Πίνακας 4.3 – 4.5) δίνονται συνοπτικά πληροφορίες βιβλιογραφικής ανασκόπησης σχετικά με την εφαρμογή των ιοντικών υγρών ως προσοφητικά μέσα στην εκχύλιση αναλυτών .

**Πίνακας 4.3:** Εφαρμογή ιοντικών υγρών ως προσροφητικά στην εκχύλιση αναλυτών από υδατικά υποστρώματα

Τύπος εκχύλιση	Αναλύτης	Υπόστρωμα	Ενόργανη διάταξη	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	Διαλυτής εκχύλισης	Αναφορά
IL-DLLME	parabens: (MeP), (EtP), (PrP), (i-BuP) (BuP)	Νερό πιασίας	TD-GC-MS	4.3-8.1	[C <sub>6</sub> MIm][NTf <sub>2</sub> ], [C <sub>8</sub> MIm][NTf <sub>2</sub> ], [C <sub>10</sub> MIm][NTf <sub>2</sub> ] [P <sub>44412</sub> ][DDTC], [P <sub>4448</sub> ][N(CN) <sub>2</sub> ] [P44412][N(CN) <sub>2</sub> ] [P44416][N(CN) <sub>2</sub> ]	(Cacho et al., 2016)
in situ IL-MRDLLME	πυρεθροειδή	Υδατικά δείγματα	HPLC	160-210	[HeOHMIm][Cl] [BeEOHIm][Br] [HMIm][NTf <sub>2</sub> ] [C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ] [C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Fan et al., 2017)
in situ IL-DLLME	microcystin-RR (MC-RR) microcystin-LR (MC-LR)	Υδατικά δείγματα	HPLC-UV HPLC-MS	5 και 3	[HeOHMIm][Cl] [BeEOHIm][Br]	(Yu et al., 2015)
META-IL-DLLME	μικητοκτόνα	Υδατικά δείγματα	HPLC	20-100	[HMIm][NTf <sub>2</sub> ]	(Yang et al., 2016)
IL DLLME	πυρεθροειδή	Υδατικά δείγματα	HPLC-DAD	0,53-1,28	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Liu et al., 2009)
IL DLLME	φυτοφάρμακα	Υδατικά δείγματα	HPLC-UV	0,1-5	[C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(He et al., 2009a)
TC-IL DLLME	οργανοφωσφορικά	Υδατικά δείγματα	HPLC-UV	0,32-0,79	[C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Zhou et al., 2008)
TA-IL DLLME	μικητοκτόνα	Υδατικά δείγματα	HPLC-UV	0,23-0,47	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Gao et al., 2012)
IL DLLME	αντιμικροβιακές ενώσεις	Υδατικά δείγματα	HPLC-ESI-MS/MS	0,28-0,83	[C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Zhao R.S. et al., 2011)
IL DLLME	PAHs	Υδατικά δείγματα	HPLC-FD	0,23-0,35	[C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Pena et al., 2009)
IL DLLME	ρύποι προτεραιότητας	Υδατικά δείγματα	HPLC-UV	0,03-0,2	[C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Yao et al., 2011)
MILs DLLME	φυτοφάρμακα, PAHs	Ποτάμιο και λιμναίο	HPLC-UV	250-1000	[N <sub>1888</sub> <sup>+</sup> ][2][MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ], [P <sub>66614</sub> <sup>+</sup> ][2][MnCl <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ]	(Yu et al., 2016)

**Πίνακας 4.3:** (συνέχεια) Εφαρμογή ιοντικών υγρών ως προσροφητικά στην εκχύλιση αναλυτών από υδατικά υποστρώματα

Τύπος εκχύλιση	Αναλύτης	Υπόστρωμα	Ενόργανη διάταξη	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	Διαλύτης εκχύλισης	Αναφορά
in situ IL DLLME	εντομοκτόνα	Υδατικά δείγματα	HPLC-VWD	0,98-2,54	[C <sub>6</sub> MIm][Cl]/[Li][NTf <sub>2</sub> ]	(Li et al., 2011)
in situ IL DLLME	ενδοκρινικοί διαταράκτες, φαινόλες	Θαλασσανό νερό	HPLC-DAD	0,8-4,8	[C <sub>6</sub> MIm][Cl]/[Li][NTf <sub>2</sub> ]	(López-Darias et al., 2011)
VA-IL DLLME	φλουροκινολόνες	Υπόγεια ύδατα	HPLC-FD	0,8-13	[C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Vázquez et al., 2012)
US-IL DLLME	αμίνες	Υδατικά δείγματα	HPLC-UV	0,17-0,29	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Zhou et al., 2009)
TC-IL DLLME	hexabromocyclododecane diastereomers	Υδατικά δείγματα	HPLC-ESIMS/MS	0,17-0,49	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Zhao R.S. et al., 2011)
TC-IL DLLME	φθαλικοί εστέρες και πυρεθροειδή εντομοκτόνα	Υδατικά δείγματα	HPLC-UV	0,38-0,43	[C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Zhou et al., 2011)



**Πίνακας 4.4:** Εφαρμογή ιοντικών υγρών ως προσροφητικά στην εκχύλιση αναλυτών από δείγματα τροφίμων

Τύπος εκχύλιση	Αναλύτης	Υπόστρωμα	Ενόργανη διάταξη	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	Διαλύτης εκχύλισης	Αναφορά
IL-DLLME	ζιζανιοκτόνα	Γάλα σόγιας και soy sauce	HPLC-DAD	120-340000	[P <sub>6614</sub> ][NTf <sub>2</sub> ]	(Lubomirsky et al., 2016)
in situ IL-DLLME	PCBs	Γάλα, καφές, μέλι	HPLC-MS	5-25	[C <sub>4</sub> MIm][NTf <sub>2</sub> ] [C <sub>4</sub> MIm][BF <sub>4</sub> ]	(Zhang et al., 2017)
QuECHERS-IL-DLLME	bisphenol A	Κοσσερβοποιημένα τρόφιμα	HPLC-UV	100	[C <sub>6</sub> MIm][NTf <sub>2</sub> ]	(Faraji et al., 2017)
MIL-based DLLM	ζιζανιοκτόνα (τριαζίνες)	Φυτικά έλαια	LC	1310-1490	[C <sub>6</sub> MIm][FeCl <sub>4</sub> ]	(Zhang et al., 2017)
US-IL DLLME	μυκητοκτόνα	Κόκκινο	HPLC-DAD	2.8-16.8	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Wang et al., 2011)
IL-DLLME	φυτοφάρμακα	Σταφύλια	HPLC-DAD	0.651-5.44	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Ravelo-Pérez et al., 2009)
in situ IL DLLME	Κτηνιατρικά φάρμακα	Βότανα	HPLC-DAD	80.0-97.0	[C <sub>8</sub> MIm][Cl]/[H][PF <sub>6</sub> ]	(Bi et al., 2011)
QuECHERS-IL-DLLME	φυτοφάρμακα	Φρούτα: Αχλάδι, μήλο γκρέιπφρουτ	HPLC-PDA	3.4-26.8	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ] [C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Zhang et al., 2016)
VA-IL DLLME	φυτοφάρμακα & μεταβολίτες	ΐζημα	HPLC-FD	0.02-90.2	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Asensio-Ramos et al., 2011)
VA-IL DLLME	οργανοφωσφορικά	Χυμούς φρούτων	HPLC	800-3200	[C <sub>4</sub> MIm][NTf <sub>2</sub> ] [C <sub>4</sub> MIm][BF <sub>4</sub> ]	(Zhang et al., 2012)

**Πίνακας 4.5:** Εφαρμογή ιοντικών υγρών ως προσροφητικά στην εκχύλιση αναλυτών από βιολογικά δείγματα

Τύπος εκχύλιση	Αναλύτης	Υπόστρωμα	Ενόργανη διάταξη	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	Διαλύτης εκχύλισης	Αναφορά
IL DLLME	Φαρμακευτικές ενώσεις	Ούρα	HPLC-UV	8.3-32	[C <sub>4</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Cruz-Vera et al., 2009)
IL DLLME	Φαρμακευτικές ενώσεις	Ούρα	HPLC-DAD	1500-3300	[C <sub>8</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Li Z. et al., 2013)
IL DLLME	emodin και μεταβολίτες	Ούρα ποντικών	HPLC-UV	500-1000	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Tian et al., 2012)
US-IL DLLME	celestrol	Ούρα	HPLC-DAD	1.6	[C <sub>6</sub> MIm][PF <sub>6</sub> ]	(Sun et al., 2011)
in situ IL DLLME	DNA deoxyribonucleic acid	DNA	HPLC-UV	*	[C <sub>16</sub> C <sub>3</sub> (OH) <sub>2</sub> Im][Br] [Li][NTf <sub>2</sub> ]	(Li T. et al., 2013)
UA-IL-DLLME	Αντικαταθλιπτικά (citalopram hydrobromide, nortriptyline hydrochloride)	Plasma	HPLC	6000-10000	[C <sub>6</sub> MIm][BF <sub>4</sub> ]	(Vaghar-Lahijani et al., 2017)

\* Δεν αναφέρεται

### ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ, ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ-ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ

#### A. Τεχνικές χαρακτηρισμού μαγνητικών νανοσωματιδίων

##### 5.1 Εισαγωγή

Η πιο διαδεδομένη τεχνική για τον χαρακτηρισμό της δομής των νανοσωματιδίων αποτελεί η τεχνική περίθλασης ακτίνων-Χ (XRD), ενώ για τον μορφολογικό έλεγχο οι ηλεκτρονικές μικροσκοπίες διέλευσης (TEM) και σάρωσης (SEM). Ο χαρακτηρισμός της επιφανείας των νανοσωματιδίων επιβεβαιώνεται κυρίως με τη φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR) και τη διαφορική θερμική ή θερμοσταθμική ανάλυση (DTA/TGA), ενώ το επιφανειοδραστικό φορτίο καθορίζεται με τη τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS), είναι μια από τις σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού της δομής αλλά και του ποσοτικού προσδιορισμού οργανικών ενώσεων. Σύμφωνα με αυτήν την τεχνική, μόρια των συστατικών ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων μετρώντας τη μάζα των θραυσμάτων που προκύπτουν από την αποσύνθεση μορίων υψηλής ενέργειας και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί στον λόγο μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ).

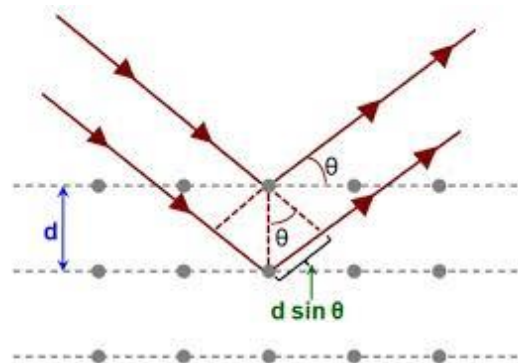
Στην συνέχεια του κεφαλαίου, παρουσιάζονται οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των συντεθειμένων μαγνητικών νανοσωματιδίων και των μαγνητικών ιοντικών υγρών.

##### 5.2 Τεχνική περίθλασης ακτίνων-Χ (XRD)

Η μη καταστρεπτική αναλυτική τεχνική της Περίθλασης Ακτίνων-Χ, παρέχει πληροφορίες ως προς την κρυσταλλογραφική δομή, το μέγεθος των κρυστάλλων, τη χημική σύσταση και τις φυσικές ιδιότητες ενός στερεού δείγματος, σε μορφή σκόνης ή λεπτού φιλμ

(Henning and Adhikari, 2017). Παρέχει επίσης πληροφορίες σχετικά με τη δομή (θέση ατόμων ή μορίων ή ιόντων στο χώρο) ενός κρυστάλλου, για τα κρυσταλλικά επίπεδα και για τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας των κρυσταλλικών υλικών.

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου, όταν μία δέσμη φωτονίων-Χ παράγεται από έναν σωλήνα καθοδικών ακτινών και προσκρούει στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου με κάποια  $\theta$ , ένα τμήμα της σκεδάζεται από την επιφανειακή στοιβάδα (επίπεδο) των ατόμων (Σχήμα 5.1). Το μη σκεδαζόμενο τμήμα της δέσμης προσπίπτει στο δεύτερο επίπεδο ατόμων του κρυστάλλου όπου και πάλι ένα μέρος σκεδάζεται, ενώ το υπόλοιπο προσπίπτει στο τρίτο επίπεδο και ούτω καθεξής.



Σχήμα 5.1: Περίθλαση ακτίνων Χ σε έναν κρύσταλλο

Ικανή και αναγκαία συνθήκη για να ισχύουν όλα τα παραπάνω αποτελεί ο νόμος του Bragg (Εξίσωση 5.1), ο οποίος συνδέει το μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τη γωνία περίθλασης και την απόσταση μεταξύ των χωροθετημένων κέντρων του κρυστάλλου (Bunaciu et al., 2015).

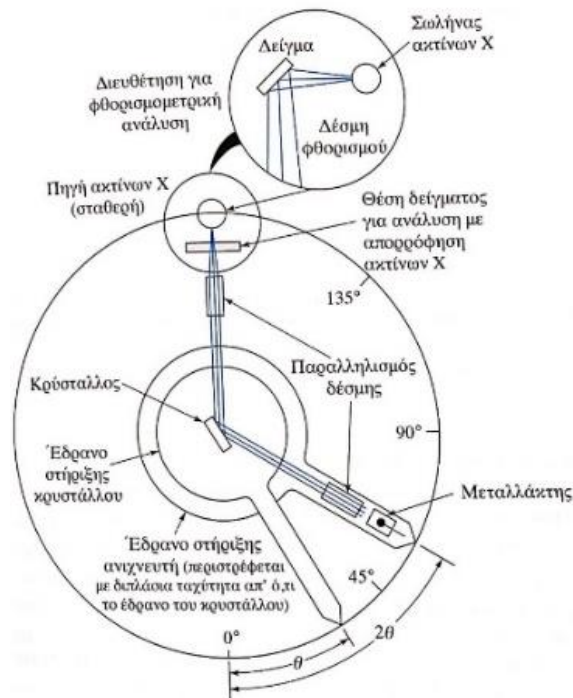
$$2d\sin\theta=n\lambda \quad (\text{Εξίσωση 5.1})$$

Οι ακτίνες-Χ παράγονται σε ένα σωλήνα καθοδικών ακτινών, θερμαίνοντας ένα λεπτό νήμα Βολφραμίου, ώστε να παραχθούν ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται με τη βοήθεια μίας διαφοράς δυναμικού και βομβαρδίζουν το υπό εξέταση υλικό, από το οποίο παράγονται χαρακτηριστικές για κάθε στοιχείο ακτίνες-Χ. Οι ακτίνες φιλτράρονται μέσω μονοχρωμάτορα ώστε να επιλεγθεί το επιθυμητό μήκος κύματος.

Όταν η γεωμετρία των ακτίνων-Χ που προσπίπτουν στο δείγμα ικανοποιεί την εξίσωση του Bragg, λόγω ενισχυτικής συμβολής (constructive interference) εμφανίζεται μία ανάκλαση η οποία είναι χαρακτηριστική του κρυσταλλικού πλέγματος του υπό ανάλυση δείγματος. Μία από τις γεωμετρίες του περιθλασιμέτρου παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.2. Το δείγμα

περιστρέφεται μέχρι να ευθυγραμμιστεί με την ακτίνα-Χ σε μία γωνία  $\theta$ , ενώ ο ανιχνευτής είναι πακτωμένος σε έναν βραχίονα ώστε να συλλέγει τις περιθλώμενες ακτίνες και να περιστρέφεται κατά γωνία  $2\theta$ .

Προϋποθέσεις για την περίθλαση φωτονίων-Χ είναι το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι περίπου ίδιο με τις αποστάσεις μεταξύ των στοιβάδων/επιπέδων των ατόμων καθώς επίσης και τα κέντρα σκέδασης να κατανέμονται περιοδικά στο χώρο με υψηλή κανονικότητα.



Σχήμα 5.2: Περίθλαση ακτίνων-Χ σε κρύσταλλο (Skoog, 2007)

Ο Scherrer, ανέπτυξε μία εξίσωση (Εξίσωση 5.2), μέσω της οποίας υπολογίζεται το μέγεθος κρυστάλλων ( $D$ ) σε nm:

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{B \cdot \cos \theta} \quad (\text{Εξίσωση 5.2})$$

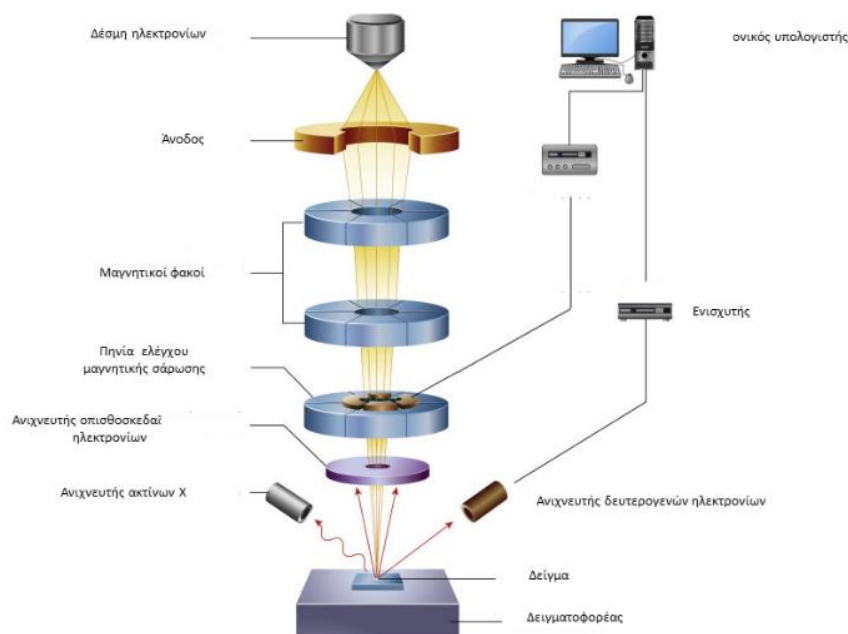
όπου  $K$  η σταθερά μορφολογίας νανοσωματιδίων ίση με 0.9,  $\lambda$  το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και  $B$  το πλάτος της κορυφής στο μισό του ύψους της έντασης.

Η εξίσωση αυτή εφαρμόζεται σε υλικά με μέγεθος κόκκων μικρότερο του 1  $\mu\text{m}$ , καθώς μεγαλύτεροι δεν προκαλούν διαπλάτυνση των XRD κορυφών. Ο υπολογισμός του μεγέθους με την εξίσωση Scherrer, ενέχει σφάλμα αφού η τιμή που λαμβάνεται, αναφέρεται στο μέγιστο μέγεθος και όχι το μέσο (Muniz et al., 2016).

### 5.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, είναι μία αναλυτική τεχνική που παρέχει λεπτομερή σχήμα της επιφανειακής μορφολογίας και σύστασης στερεών δειγμάτων. Κατά τη λειτουργία του SEM, η πηγή ηλεκτρονικής δέσμης, το δείγμα και οι ανιχνευτές βρίσκονται υπό κενό, προς αποφυγή ηλεκτρονιακών συγκρούσεων με τα μόρια του αέρα, που θα είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικού μέρους της ενέργειας.

Η αρχή λειτουργία της μεθόδου βασίζεται στην εξέταση μίας επιφάνειας, με τον σχηματισμό δέσμης ηλεκτρονίων, που επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού. Με την χρήση ηλεκτρομαγνητικών φακών και πηνίων σάρωσης, η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει μία επιφάνεια σε ευθεία γραμμή (διεύθυνση χ), επιστρέφει στην αρχική θέση και μετατοπίζεται κατά ένα σταθερό διάστημα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου σαρωθεί όλη η επιφάνεια του δείγματος (Inkson, 2016). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ δέσμης και δείγματος καταγράφονται από τους ανιχνευτές και μετατρέπονται σε Σχήμα με χρήση υπολογιστή εφοδιασμένου με κατάλληλο λογισμικό. Στο Σχήμα 5.3, παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.



**Σχήμα 5.3:** Σχηματική αναπαράσταση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) (Inkson, 2016)

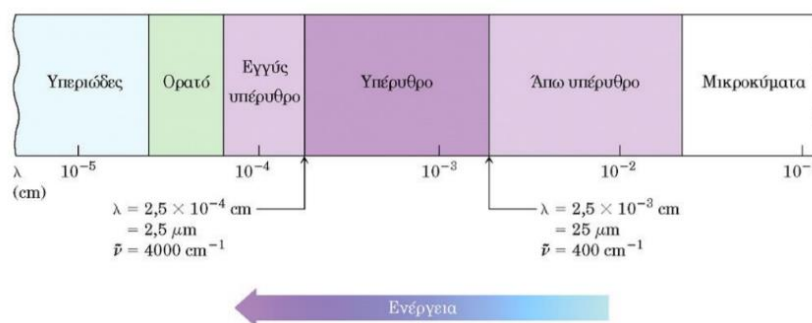
Μερικοί από τους συχνά χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων είναι ο ανιχνευτής ευρέως πεδίου (Large Field Detector, LFD), ο ανιχνευτής Everhart-Thornley

(ETD), ο ανιχνευτής ιονισμού αερίου αλλά και στερεάς κατάστασης (Gaseous Electron Detector GED) και (Solid State Electron Detector, SSED), αντίστοιχα (Ταπεινός Χ., 2013).

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιείται στον χαρακτηρισμό, υλικών όπως μεμβράνες, λεπτά υμένια, φίλτρα, ίνες, ρητίνες, τέφρες, τσιμέντα, χρώματα και μεταλλικές επιφάνειες, κλπ. Πλεονεκτήματα του SEM αποτελούν η μεγάλη διακριτική ικανότητα, η αλλαγή μεγέθυνσης σε ευρύ πεδίο, το μεγάλο βάθος πεδίου καθώς επίσης και το γεγονός ότι δεν απαιτείται προκατεργασία του δείγματος.

#### 5.4 Φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού FOURIER

Η αναλυτική τεχνική της φασματοσκοπίας υπέρυθρου βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού φάσματος έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,7  $\mu\text{m}$  έως 300  $\mu\text{m}$  (Bureau et al., 2019). Οι φασματικές περιοχές υπέρυθρου κατηγοριοποιούνται σε άπω υπέρυθρο, σε μέσο υπέρυθρο, και σε εγγύς υπέρυθρο (Σχήμα 5.4).

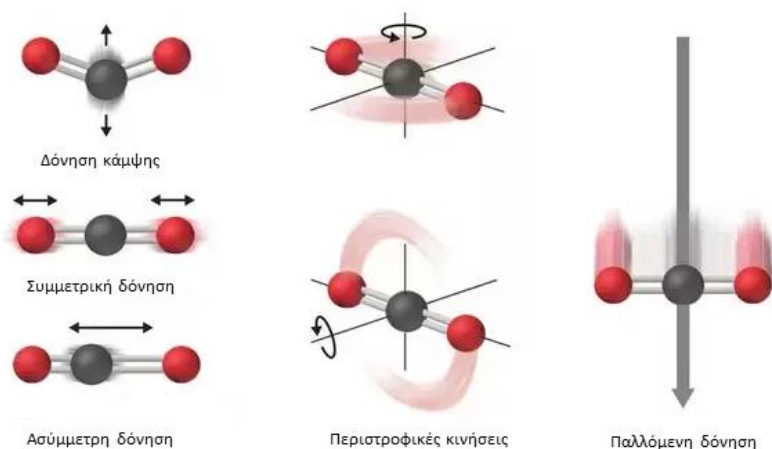


Σχήμα 5.4: Φασματικές περιοχές υπέρυθρου (Skoog, 2007)

Όταν το υπέρυθρο φως αλληλεπιδρά με την ύλη, κάθε λειτουργική ομάδα ή δεσμός απορροφά ακτινοβολία υπέρυθρου σε ένα συγκεκριμένο εύρος κυματάριθμων, ανάλογα με τη δομή του υπόλοιπου μορίου.

Οι δύο βασικοί τρόποι με τους οποίους ένα μόριο ταλαντώνεται όταν προσπίπτει σε αυτή ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, είναι η δόνηση έκτασης (stretching) και η δόνηση κάμψης (bending) (Dendisová et al., 2018 και Gaffney and Marley, 2018). Οι δονήσεις έκτασης, παράγονται όταν δύο συνδεδεμένα άτομα πάλλονται συνεχώς μεταξύ τους και χαρακτηρίζεται από μεταβολή των αποστάσεων των ατόμων κατά μήκος του άξονα του δεσμού. Διακρίνονται σε συμμετρικές (symmetric stretching) και ασύμμετρες (asymmetric stretching). Ο δονήσεις κάμψης χαρακτηρίζονται από αλλαγή στη γωνία μεταξύ δύο δεσμών

και διακρίνονται σε (α) ψαλιδοειδής (scissoring), (β) λικνιζόμενη (rocking), (γ) παλλόμενη (wagging) και (δ) συστρεφόμενη (Σχήμα 5.5).

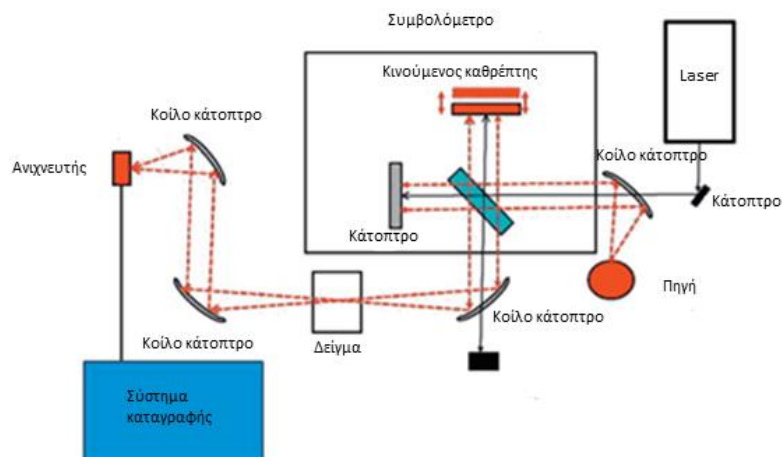


Σχήμα 5.5: Μοριακές δονήσεις έκτασης (Πηγή: quora.com)

Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας, η υπέρυθη ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή διαχωρίζεται αφού υποστεί ανάκλαση από ένα σύστημα επίπεδων κατόπτρων σε δύο δέσμες όπου η μία διέρχεται μέσω του συστήματος αναφοράς (τυφλό) και η άλλη διέρχεται από το δείγμα (Σχήμα 5.6). Οι δύο δέσμες ανακλώνται από ένα σύστημα περιστρεφόμενων κατόπτρων το οποίο εναλλάσσεται προκαλώντας την περιοδική διέλευση της δέσμης μέσω του δείγματος και της δέσμης αναφοράς, με σκοπό την πρόσπτωση στον μονοχρωμάτορα (Dendisová et al., 2018 και Gaffney and Marley, 2018).

Όταν το σήμα εκπέμπεται διαμέσου ή ανακλάται από μία ουσία, οι συγκεκριμένες συχνότητες της ενέργειας απορροφώνται από το δείγμα εξαιτίας της διεγερμένης δόνησης των δραστικών ομάδων των μορίων. Το συμβολόγραμμα που έχει ληφθεί πρέπει να «αποκωδικοποιηθεί» με μετασχηματισμό Fourier, λαμβάνοντας τελικά το φάσμα υπέρυθρου, που αναπαριστά γραφικά την απορρόφηση συναρτήσει του κυματάριθμου (Skoog, 2007).





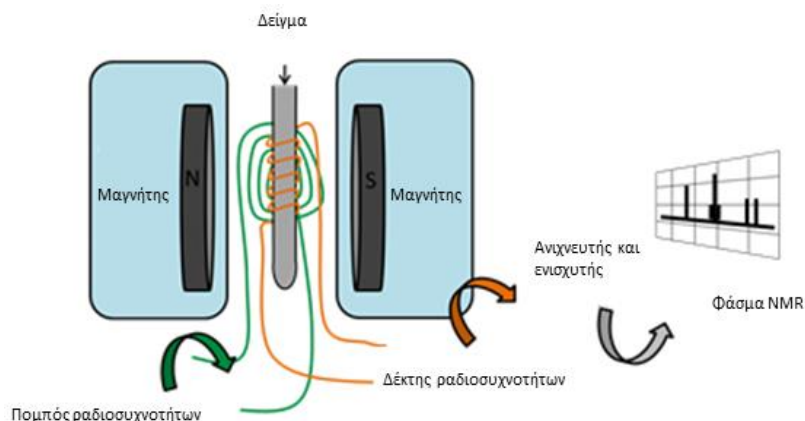
**Σχήμα 5.6:** Σχηματική απεικόνιση φασματοσκοπίας υπεράυθρου (FT-IR) (Gaffney and Marley, 2018)

### 5.5 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance, NMR) είναι μία τεχνική με την οποία αξιοποιούνται οι μαγνητικές ιδιότητες πυρήνων ατόμων για τον προσδιορισμό των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των αντίστοιχων ατόμων ή των μορίων. Μελετάται η μαγνητική ροπή ενός πυρήνα, που προκύπτει από την ιδιοπεριστροφή του, εντός ισχυρού μαγνητικού πεδίου (Akitt et al., 2017; Μιγνάrik, 2017 και Scano et al., 2019).

Οι πυρήνες του δείγματος τοποθετούνται εντός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο, με αποτέλεσμα το δείγμα να απορροφά και να επανεκπέμπει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (Σχήμα 5.7). Ο συντονισμός στον οποίο βασίζεται η μέθοδος NMR, αποτελεί την ταυτόχρονη διέγερση όλων των πυρήνων του δείγματος που μελετάται και επιτυγχάνεται στον αισθητήρα (probe). Η απορρόφηση και η εκπομπή ενέργειας εξαρτάται από τον παρατηρούμενο πυρήνα. Το σήμα NMR που λαμβάνεται βρίσκεται, στο πεδίο του χρόνου αλλά προκειμένου να μελετηθεί μετατρέπεται, με τη χρήση του μετασχηματισμού Fourier, στο πεδίο της συχνότητας. Το φασματόμετρο NMR αποτελείται από:

- Έναν ισχυρό μαγνήτη ο οποίος παράγει το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο
- Πηνία παραγωγής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και συλλογής του σήματος
- Έναν σωλήνα τοποθέτησης του δείγματος
- Συσκευή σταθεροποίησης μαγνητικού πεδίου και της βελτιστοποίησης του σήματος
- Έναν υπολογιστή για τον έλεγχο λειτουργίας και την επεξεργασία των φασμάτων (Karunakaran et al., 2018b).



Σχήμα 5.7: Φασματοόμετρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Βασικοί παράγοντες για την λήψη φασμάτων αποτελούν η ομοιογένεια, η σταθερότητα και η ένταση του πεδίου (όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση, τόσο πιο ευδιάκριτα είναι τα φάσματα).

Οι πυρήνες που μπορούν να μετρηθούν είναι αυτοί με περιττό μαζικό ή ατομικό αριθμό οι οποίοι έχουν μαγνητική ροπή διάφορη του μηδενός όπως  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_7$  και  $^{27}\text{Al}_{13}$  (Karunakaran et al., 2018a). Αντίθετα, πυρήνες με μηδενικές τιμές spin όπως  $^{12}\text{C}_6$ ,  $^{16}\text{O}_8$  και  $^{56}\text{Fe}_{28}$  δεν ανιχνεύονται με τη συγκεκριμένη μέθοδο.

Στην συγκεκριμένη τεχνική, τα δείγματα πρέπει να είναι διαλυμένα σε δευτεριωμένο διαλύτη, έτσι ώστε να αποφεύγονται αλληλεπιδράσεις με τα πρωτόνια του διαλύτη. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενη δευτεριωμένοι διαλύτες είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ), το χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ), η μεθανόλη ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ), η ακετόνη ( $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ), το βενζόλιο ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ) και το νερό ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

## 5.6 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA) αποτελεί τεχνική θερμικής ανάλυσης. Με την τεχνική αυτή καταγράφεται η απώλεια μάζα ενός δείγματος σε μία ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, συναρτήσει της θερμοκρασίας ή του χρόνου, όταν η ουσία υποβάλλεται σε προγραμματισμένη μεταβολή της θερμοκρασίας. Το δείγμα μπορεί να θερμαίνεται είτε με σταθερή θερμοκρασία (ισοθερμική μέτρηση), είτε να θερμαίνεται με ρυθμό θέρμανσης (σταθερό -δυναμική μέτρηση ή μη γραμμικό) (Loganathan et al., 2017).

Αποτελείται από έναν μικροζυγό ακριβείας τοποθετημένο εντός κλιβάνου (Θερμοκρασία  $\approx 1000^\circ\text{C}$ ) και ένα σύστημα καθαρισμού με διαβίβαση αερίου που εξασφαλίζει την επιθυμητή ατμόσφαιρα (αδρανή, οξειδωτική, δραστική-reactive).

Η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αρχική και την τελική θερμοκρασία αντίδρασης καθώς και ποσοτικές πληροφορίες της διαφοράς βάρους. Χρησιμοποιείται για τη μελέτη των ιδιοτήτων πολυμερών, τον προσδιορισμό θερμοκρασιών αποσύνθεσης καθώς και την εύρεση της αναλογίας οργανικών/ανόργανων ενώσεων. Μπορεί να εφαρμοστεί σε αντιδράσεις αφυδρογόνωσης, οξειδωσης, εξάτμισης, καθώς και για τον υπολογισμό των θερμοκρασιών Curie (Skoog, 2007).

Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων, το ποσοστό απώλειας μάζας που ανιχνεύεται συνήθως συνδέεται με την ποσότητα της επιφανειοδραστικής ένωσης. Από τα διαγράμματα TGA, ανιχνεύονται αλλαγές φάσης που συμβαίνουν σε υψηλές θερμοκρασίες. Αποτελεί μία καταστρεπτική τεχνική αφού τα νανοσωματίδια μπορεί να αλλάξουν δομή και κυρίως να συσσωματωθούν χάνοντας την αρχική τους μορφολογία και διασπορά.

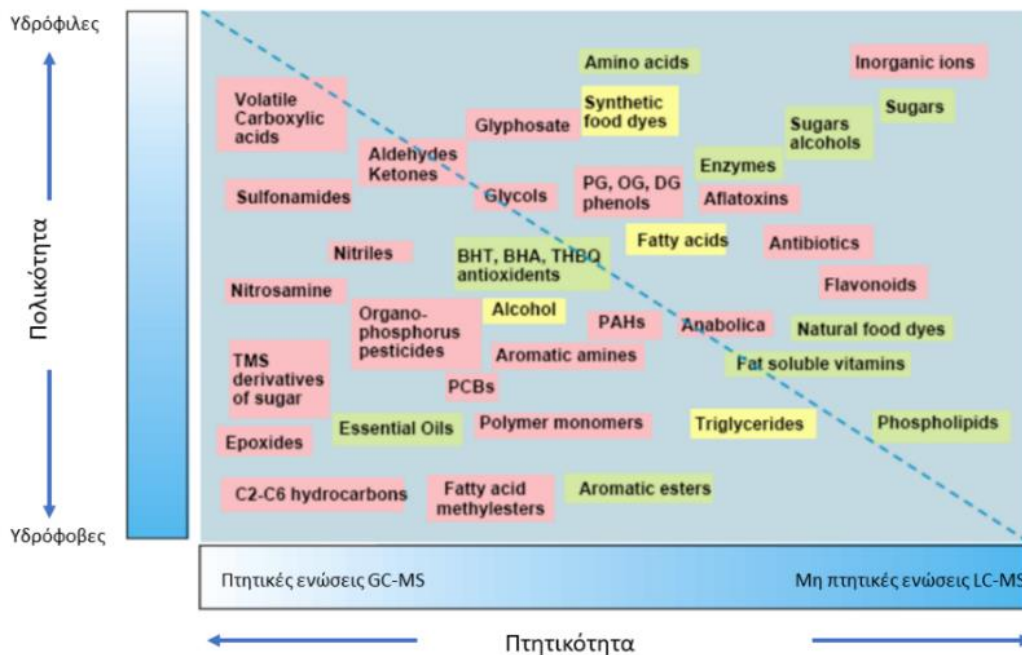
Εναλλακτικά χρησιμοποιείται η διαφορική θερμοσταθμική καμπύλη (Differential Thermo gravimetric curve – DTG), της πρώτης παραγώγου της καμπύλης TGA συναρτήσει της θερμοκρασίας ή του χρόνου που δίνει πληροφορίες για το ρυθμό με τον οποίο η μάζα μεταβάλλεται (Loganathan et al., 2017).

## B. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

### 5.7 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης

Η χρωματογραφία είναι μια τεχνική διαχωρισμού, η οποία εφαρμόζεται σε πολλούς κλάδους της επιστήμης και βασίζεται στην κατανομή των προς διαχωρισμό ενώσεων εντός δύο φάσεων. Η στατική φάση διατηρείται ακίνητη, ενώ η δεύτερη βρίσκεται υπό συνεχή ροή (κινητή φάση). Το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης στη στατική φάση. Η επιλογή των φάσεων έχει σαν σκοπό, την διαφορετική κατανομή των συστατικών. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης ενώ αυτά που κατακρατούνται ασθενέστερα, κινούνται ταχύτερα με αποτέλεσμα να συστατικά του μίγματος διαχωρίζονται.

Η ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών ανάλυσης γίνεται με βάση τον τύπο της κινητής φάσης (καθορίζει αν πρόκειται για αέρια ή υγρή χρωματογραφία), τον τύπο και τη μορφή της στατικής φάσης, το μηχανισμό (που οφείλεται ο διαχωρισμός) και ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στην στατική φάση (Viñas and Campillo, 2019). Ανάλογα με τις τιμές φυσικοχημικές ιδιότητες της ένωσης επιλέγεται η ανάλυση με αέρια ή υγρή χρωματογραφία (Σχήμα 5.8).



**Σχήμα 5.8:** Ανάλυση διαφόρων ενώσεων με υγρή ή αέρια χρωματογραφία (βάσει τιμών πτητικότητας και πολικότητας) (Pa'e et al., 2019)

### 5.7.1 Αέρια Χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία ανήκει στις σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές και εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό πτητικών ενώσεων (θα πρέπει να μεταβαίνουν στην αέρια φάση χωρίς ταυτόχρονη διάσπαση). Παρουσιάζει υψηλή ταχύτητα, υψηλή απόδοση και ευκολία στην χειρισμό. Χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό - ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων αλλά και για την απομόνωση ενός συστατικού σε καθαρή μορφή, από ένα μίγμα (preparative chromatography) (Rockwood et al., 2018).

Μετά την έγχυση του δείγματος στην βαλβίδα εισαγωγής, το δείγμα εξατμίζεται και εισχωρεί εντός της χρωματογραφικής στήλης, όπου τα μόρια των ενώσεων διαχωρίζονται με την βοήθεια του φέροντος αερίου. Στην συνέχεια εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας, το οποίο αποτελείται από την πηγή ιόντων, έναν μαγνήτη και ένα σύστημα συλλογής ιόντων. Στην πηγή ιόντων τα μόρια (που βρίσκονται πλέον στην αέρια κατάσταση) βομβαρδίζονται με ηλεκτρόνια (ion source) παράγοντας θραύσματα ιόντων. Αυτά διερχόμενα από το μαγνητικό πεδίο, εκτρέπονται. Η τροχιά τους εξαρτάται από την ιοντική μάζα, την τάση στην πηγή ιόντων και το ιοντικό φορτίο. Το παραγόμενο φάσμα κάθε ιοντικού θραύσματος είναι χαρακτηριστικό του αρχικού μορίου της ένωσης από όπου προήλθε, επιτρέποντας τον προσδιορισμό του, (Rockwood et al., 2018). Σχηματική αναπαράσταση αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με φασματομετρία μάζας παρουσιάζεται στην Σχήμα 5.9.



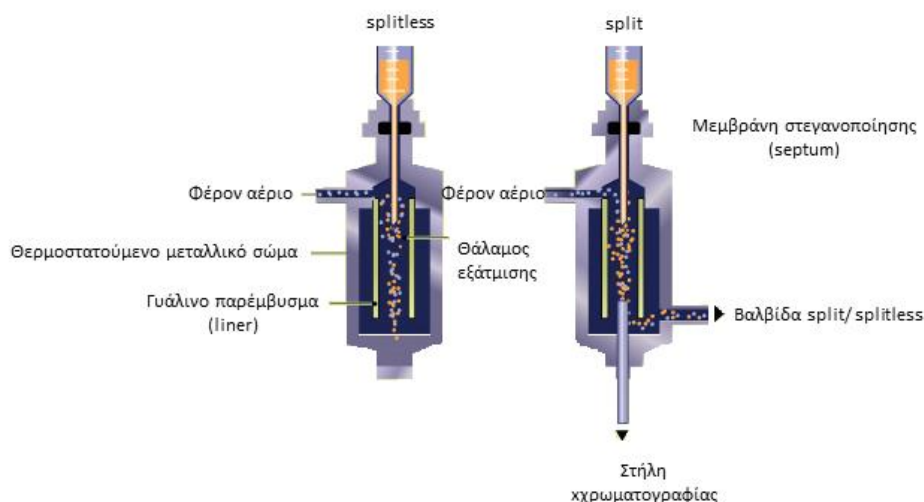
**Σχήμα 5.9:** Σχηματική διάταξη αέριου χρωματογράφου (Πηγή: [www.chromacademy](http://www.chromacademy))

Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από τυχόν προσμίξεις, οξυγόνο και υγρασία, προκειμένου να αποφευχθεί η οξειδωση της στατικής φάσης και η εκρόφηση πληρωτικού υλικού της στήλης. Ανάλογα με τον τύπο ανιχνευτή, ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται υδρογόνο, ήλιο ή άζωτο, η ροή του οποίου επηρεάζει τον αποτελεσματικό διαχωρισμό.

### 5.7.2 Αναλυτικές στήλες

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στήλη είναι η ανοιχτής διατομή (Wall-coated open tubular, WTOC) όπου η στατική φάση είναι επικαλυμμένη με λεπτή επίστρωση πολυμερούς υλικού. Άλλοι τύποι στηλών αποτελούν οι ανοιχτής διατομής με πορώδες στρώμα (Porus layer open tubular, PLOT) όπου τα τοιχώματα, είναι επικαλυμμένα με παχύ στρώμα ενός πορώδους υλικού (αλούμινα), ή ενός πολυμερούς. Λιγότερο συχνά χρησιμοποιούμενες στήλες είναι οι ανοιχτής διατομής με πορώδες υπόστρωμα (Porus layer open tubular, PLOT). Σε αυτές τις στήλες, η στατική φάση είναι υγρή και επικαλύπτει το στερεό υπόστρωμα το οποίο με τη σειρά του επιστρώνεται στο τοίχωμα της στήλης. Τέλος, τις κατηγορίες των στηλών συμπληρώνουν οι τριχοειδείς πληρωμένες (micropacked capillary) οι οποίες είναι πληρωμένες με λεπτόκοκκο πληρωτικό υλικό (Δεληγιαννάκης Ι., 2010).

Οι τριχοειδείς στήλες μπορούν να δεχθούν μικρές ποσότητες δείγματος και για αυτό απαιτείται ένα σύστημα εισαγωγής διαμοιρασμού (split injection). Η βασική διαφορά με τον εισαγωγέα splitless είναι ότι η τριχοειδής στήλη εισέρχεται στο γυάλινο σωλήνα και ένα μέρος του φέροντος αερίου περνά από την κορυφή της στήλης και αποβάλλεται χωρίς να εισέρχεται σε αυτήν (split) (Σχήμα 5.10) (Hajšlová and Čajka, 2007 και Ruiz-Matute et al., 2018). Η αναλογία διαμοιρασμού ρυθμίζεται με ρύθμιση του κλάσματος του φέροντος αερίου, το οποίο αποβάλλεται. Τυπική αναλογία διαμοιρασμού η οποία χρησιμοποιείται είναι η 1:100 με το 99% του δείγματος να αποβάλλεται στην ατμόσφαιρα (Ruiz-Matute et al., 2018).



**Σχήμα 5.10:** Σύστημα εισαγωγής με δυνατότητα ελάττωσης όγκου δείγματος (splitless/split injector)  
(Πηγή: [www.chromacademy.com](http://www.chromacademy.com))

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις είναι οι πυριτίας λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους όπως το μεγάλο εύρος εκλεκτικότητας, η αντοχή στην οξείδωση, η καλή θερμική σταθερότητα, η πολύ μικρή ελάττωση του ιξώδους με αύξηση της

θερμοκρασίας. Με υποκατάσταση των βενζολικών δακτυλίων μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα και έτσι διευκολύνεται η ανάλυση των λιγότερο πτητικών ενώσεων οι οποίες απαιτούν θέρμανση σε υψηλότερες θερμοκρασίες προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός.

Οι τυπικές στήλες έχουν διαστάσεις μήκους από 15 έως 60 μέτρα και εσωτερικής διαμέτρου από 0,20 έως 0,53 mm. Η στατική φάση συνήθως έχει πάχος κυμαινόμενο από 0,1 έως 1 μm. Όταν οι διαστάσεις και ο όγκος της στήλης είναι γνωστά, είναι εφικτό να υπολογιστεί και ο ρυθμός ροής ενός συστήματος (Stauffer et al., 2008).

### 5.7.3 Ανιχνευτές

Μετά το διαχωρισμό των αναλυτών στην στήλη, σειρά έχει η ανίχνευσή τους με την βοήθεια ανιχνευτή τοποθετημένου στο τέλος της στήλης. Ανάλογα με το βαθμό απόκρισης τους στις διάφορες ενώσεις διακρίνονται σε εκλεκτικούς, μη εκλεκτικούς και ειδικούς ανιχνευτές. Ανάλογα με τον τρόπο που αποκρίνονται στις διάφορες ενώσεις, οι ανιχνευτές διακρίνονται σε αυτούς που αποκρίνονται στη συγκέντρωση και σε αυτούς που αποκρίνονται στη μάζα. Στην πρώτη κατηγορία, ανήκουν ανιχνευτές που παράγουν σήμα από την στιγμιαία συγκέντρωση κάθε ένωσης που περιέχεται στο ρεύμα του αερίου που φτάνει στον ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές που αποκρίνονται στη μάζα, παράγουν σήμα το οποίο είναι ανάλογο με την ταχύτητα ροής της μάζας για την ουσία που ανιχνεύουν (Δεληγιαννάκης Ι., 2010).

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές που συνδυάζονται με την αέρια χρωματογραφία είναι ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ο οποίος χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενώσεων που περιέχουν αλογόνα (οργανοχλωριωμένα, τριαζίνες, καρβαμιδικά, φαινυλοϋρίες), ο ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (NPD) ο οποίος χρησιμοποιείται για την ανάλυση οργανοφωσφορικών, τριαζινών, αλλά και άλλων οργανικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο, ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) είναι ευαίσθητος με μεγάλη περιοχή γραμμικής απόκρισης με εφαρμογές στην ανίχνευση οργανοφωσφορικών, πυρεθροειδών και οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων. Τέλος, ο φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής (FPD) αποτελεί έναν εκλεκτικό ανιχνευτή, που αποκρίνεται κυρίως σε θειούχες και φωσφορούχες ενώσεις.

Οι παραπάνω ανιχνευτές είναι αποτελεσματικοί για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων στην περιοχή συγκεντρώσεων ppm-ppb (Ruiz-Matute et al., 2018; Stauffer et al., 2008 και Wong et al., 2013). Στον πίνακα 5.1, δίνονται ορισμένα στοιχεία για τη λειτουργία και τις εφαρμογές των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία (Δεληγιαννάκης Ι., 2010).



Πίνακας 5.1: Τύποι ανιχνευτών αέριας χρωματογραφίας

Ανιχνευτής	Εκλεκτικότητα	Ανιχνευσιμότητα	Τύπος (Απόκριση)
Ιονικής φλόγας (FID)	Οργανικές ενώσεις Υπεροξειδία,	10-100 pg	Ροή μάζας
Σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)	ανυδρίτες, οργανομεταλλικές ενώσεις Αλιφατικές-	50 fg	Συγκέντρωση
Φωτομετρικής φλόγας (FPD)	αρωματικές ενώσεις, αμίνες, κετόνες, S,P,Sn,As, Ge,Se,Cr	100 pg	Συγκέντρωση
Αζώτου φωσφόρου (NPD)	Άζωτο, Φωσφόρος Ετεροκυκλικές ενώσεις,	10 pg	Ροή μάζας
Φωτο-ιονισμού (PID)	οργανομεταλλικές, O <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> S, HI, ICl, Cl <sub>2</sub> , I <sub>2</sub> , PH <sub>3</sub>	2 pg	Συγκέντρωση
Θερμικής αγωγιμότητας (TCD)	Καθολικός	1 ng	Συγκέντρωση

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας που θα πρέπει να πληρούν οι ανιχνευτές είναι η ευαισθησία (αφορά την κλίση της καμπύλης απόκρισης συναρτήσει της μετρούμενης ποσότητας), η γραμμική περιοχή (αφορά τον λόγο του μέγιστου προς το ελάχιστο σήμα για τα οποία η απόκριση είναι ανάλογη του μεγέθους του δείγματος), το όριο ανίχνευσης (η ελάχιστη ποσότητα ουσίας που δίνει ένα ευανάγνωστο σήμα) και τέλος ο χρόνος κατακράτησης.

Η πιο εξελιγμένη τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού ενώσεων αποτελεί ο συνδυασμός της τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) καθώς συνδυάζει τον επιτυχή διαχωρισμό ενώσεων της αέριας χρωματογραφίας και την εγκυρότητα της ταυτοποίησης που προσδίδει η φασματομετρία μάζας.

### 5.8.1 Υγρή Χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) είναι μία διαδεδομένη τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και ο άμεσος προσδιορισμός πολικών, μη πτητικών ή θερμικά ασταθών ενώσεων (δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν) που δεν είναι εφικτό να αναλυθούν απευθείας με την αέρια χρωματογραφία (Viñas and Campillo, 2019).

Η υγρή χρωματογραφία είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μίας στατικής και μίας κινητής φάσης. Οι ενώσεις κατανέμονται μεταξύ στατικής και υγρής κινητής φάσης και



μετακινούνται (κινητή φάση) με διαφορετικές ταχύτητες, με αποτέλεσμα τον διαφορετικό χρόνο έκλουσης κάθε ένωσης από την στήλη. Η αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με την κινητή και τη στατική φάση, σχετίζεται με το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα.

Ανάλογα με την αρχή στην οποία στηρίζεται ο διαχωρισμός και τις ενώσεις που μελετώνται η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως:

- Χρωματογραφία κατανομής, κατά την οποία ο διαχωρισμός στηρίζεται στον διαφορετικό συντελεστή κατανομής των συστατικών ενός μίγματος στο επιλεγμένο σύστημα διαλυτών.
- Χρωματογραφία προσρόφησης, όπου ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των συστατικών του μίγματος πάνω στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος. Βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά με διαφορετική πολικότητα.
- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην διαφορετική ιοντική ισχύ των ουσιών. Οι δυνάμεις συγκράτησης των ενώσεων του μίγματος και της στερεής φάσης είναι ηλεκτροστατικής φύσης.
- Χρωματογραφία πηκτής την στατική φάση αποτελεί πορώδες, το οποίο ανάλογα με το μέγεθος των πόρων του είναι δυνατόν να διαχωρίσει μίγμα ουσιών που διαφέρουν σημαντικά στην τιμή του μοριακού τους βάρους. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στο φαινόμενο της διάχυσης των ουσιών εντός της πηκτής.

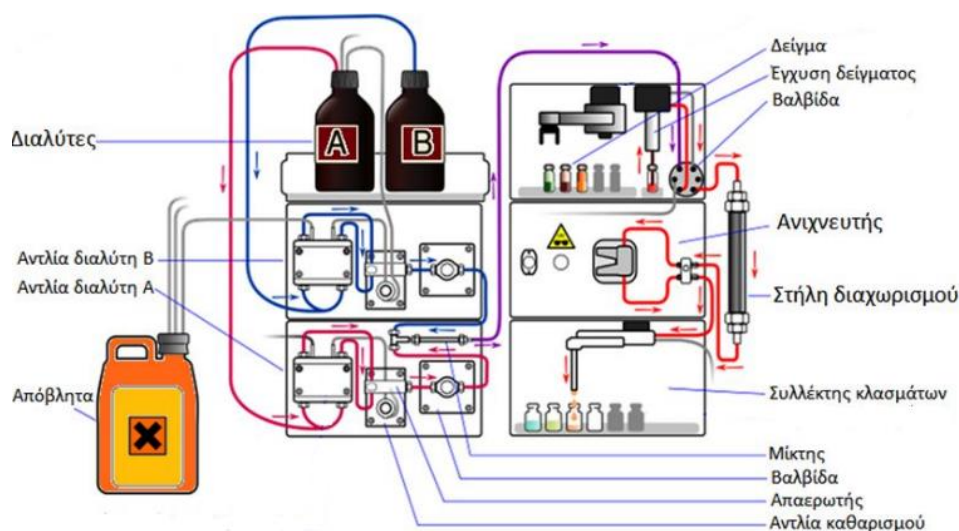
Η έκλουση των αναλυτών γίνεται είτε ισοκρατικά είτε βαθμωτά (gradient). Η ισοκρατική έκλουση, στην οποία η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή, δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για δείγματα με πολλούς αναλύτες. Παρατηρούνται διευρυμένες κορυφές, για τις ενώσεις που παρουσιάζουν ισχυρή αλληλεπίδραση με την στήλη, λόγω αργής έκλουσης.

Με την βαθμιδωτή έκλουση, πραγματοποιείται ανάμειξη ενός ασθενούς διαλύτη με έναν ισχυρό σε αναλογία που αλλάζει με την πάροδο του χρόνου επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό. Αρχικά εκλούνται οι ενώσεις με μικρό χρόνο κατακράτησης στην στήλη και στη συνέχεια οι υπόλοιπες με μεγαλύτερο χρόνο. Για να επιτυγχάνεται διαχωρισμός, η κινητή φάση επιλέγεται έτσι ώστε να διαφέρει η πολικότητά της από αυτή της στατικής φάσης.

Μεγαλύτερες αποδόσεις επιτυγχάνονται με χαμηλές ταχύτητες ροής, επομένως μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού. Αυτό οφείλεται, στις χαμηλές ταχύτητες διάχυσης που είναι χαρακτηριστικό των υγρών φάσεων. Ένας πρακτικός τρόπος για να αυξήσουμε την ταχύτητα

διάχυσης είναι να ελαττώσουμε την απόσταση μεταξύ των μορίων αυξάνοντας την πίεση καθώς επίσης και η χρήση μικρότερων σωματιδίων σαν υλικών πλήρωσης της στήλης.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί τη σημαντικότερη εξέλιξη της χρωματογραφικής ανάλυσης. Είναι αρκετά πρόσφατη και με ιδιαίτερες εφαρμογές στα ιονικά, μη πτητικά και θερμοδιαλυτά φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Βασικά πλεονεκτήματα της HPLC είναι η ταχύτητα, η εξειδίκευση, η υψηλή ευαισθησία και η ικανότητα ανίχνευσης χαμηλών συγκεντρώσεων. Επειδή λειτουργεί σε χαμηλές θερμοκρασίες, εφαρμόζεται για το διαχωρισμό θερμικά ασταθών ουσιών (πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων), καθώς και ουσιών που δεν μπορούν να εξαερωθούν (Rockwood et al., 2018).



Σχήμα 5.11: Σχηματική διάταξη υγρής χρωματογραφίας

### 5.8.2 Αναλυτικές Στήλες

Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας είναι κατασκευασμένες από σωλήνες ανοξείδωτου χάλυβα μικρής διαμέτρου και μήκους μερικών εκατοστών. Οι βασικοί τύποι πληρωτικών υλικών αποτελούν τα σφαιροειδή και τα πορώδη. Τα σφαιροειδή σωματίδια αποτελούνται από ύαλο ή πολυμερές με διάμετρο 30 έως 40  $\mu\text{m}$  ενώ τα πορώδη αποτελούνται από μικροσωματίδια διαμέτρου 3-10  $\mu\text{m}$  (αλούμινα, πυριτία, ιονανταλλακτική ρητίνη, συνθετική ρητίνη πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου).

Η επιλογή της αναλυτικής στήλης είναι καθοριστική για τον διαχωρισμό των ενώσεων και επηρεάζεται από παραμέτρους όπως το μέγεθος των μορίων του υλικού πλήρωσης, τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης, την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης, την φύση του υποστρώματος, τη διάμετρο των πόρων του πληρωτικού υλικού και την περιεκτικότητα της

στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια, (όσο μεγαλύτερη, τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων).

Μία άλλη κατηγοριοποίηση των αναλυτικών στηλών αφορά την εσωτερική διάμετρο σύμφωνα με την οποία κατατάσσονται στις συμβατικές στήλες, τις στήλες στενού διαμετρήματος (narrow bore) και τις τριχοειδείς στήλες. Οι δύο πρώτες κατηγορίες αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στήλες. Τα τελευταία χρόνια, η χρήση τριχοειδών στηλών αυξάνεται λόγω των μικρών ροών που χρησιμοποιούνται στο ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

### 5.8.3 Ανιχνευτές

Μετά το διαχωρισμό των αναλυτών στην στήλη, σειρά έχει η ανίχνευσή τους με την βοήθεια ανιχνευτή τοποθετημένου στο τέλος της στήλης. Οι ανιχνευτές της υγρής χρωματογραφίας χωρίζονται σε αυτούς που αποκρίνονται σε μία βασική ιδιότητα της κινητής φάσης (ο δείκτης διάθλασης, η διηλεκτρική σταθερά, η πυκνότητα) και σε αυτούς που αποκρίνονται σε μία ιδιότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης όπως η απορρόφηση στο υπεριώδες και ο φθορισμός. Πιο συγκεκριμένα, οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συνήθως στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι:

- ο ανιχνευτής υπεριώδους – ορατού (UV-VIS), ο οποίος είναι ευαίσθητος στην περιοχή  $10^{-6}$  έως  $10^{-10}$  g/mL για αρκετές ενώσεις
- ο εκλεκτικός ανιχνευτής φθορισμού (FD) που χρησιμοποιείται μόνο για ενώσεις που φθορίζουν και είναι πιο ευαίσθητος από τους ανιχνευτές UV
- οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, οι οποίοι έχουν εφαρμογή στην χρωματογραφία ιόντων και μετράνε είτε την αγωγιμότητα της κινητής φάσης, είτε το ρεύμα που σχετίζεται με τη οξείδωση ή την αναγωγή του δείγματος (αμπερομετρικοί ή βολταμετρικοί, αγωγιμομετρικοί κ.α.)
- ο ανιχνευτής υπεριώδους με σειρά φωτοδιοδίων (UV-DAD), όπου η ανίχνευση πραγματοποιείται σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα και είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής.

Η πιο εξελιγμένη τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού των υπό μελέτη ενώσεων αποτελεί ο συνδυασμός των τεχνικών της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Συνδυάζοντας την εγκυρότητα της ταυτοποίησης που προσδίδει η φασματομετρία μάζας και τον επιτυχή διαχωρισμό ενώσεων της υγρής χρωματογραφίας.

## Γ. ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

### 5.9 Φασματομετρία μάζας (MS)

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) αποτελεί μία αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό ενώσεων (ταυτοποίηση και προσδιορισμός δομής) σε διάφορα υποστρώματα. Προσφέρει πληροφορίες ως προς την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων δειγμάτων, η οποία βρίσκει εφαρμογή στις τεχνολογίες omics προσδιορίζοντας δομές πεπτιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων.

Σύμφωνα με την αναλυτική τεχνική αυτή, τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος, μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα. Τα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ , *mass to charge ratio*). Η μορφή του φάσματος μάζας που λαμβάνεται, κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της.

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί ίσως την αναλυτική τεχνική με την μεγαλύτερη δυναμική, εξέλιξη και την μεγαλύτερη κλίμακα εφαρμογών λόγω των συνεχώς εξελισσόμενων μεθόδων ιοντισμού, διαχωρισμού μάζας και ανίχνευσης ιόντων ιδίως τα τελευταία 10-15 χρόνια. Παρέχει δυνατότητα προσδιορισμού συγκεντρώσεων σε πολύ χαμηλά επίπεδα της τάξης ppq (pg/L ή pg/Kg ανάλογα με το υπόστρωμα). Χρησιμοποιείται στην βασική και εφαρμοσμένη έρευνα όσο σε αναλύσεις παρακολούθησης και ρουτίνας από χημικά εργαστήρια με ιδιαίτερα σημαντικές εφαρμογές στην περιβαλλοντική ανάλυση.

Πλεονεκτεί έναντι άλλων τεχνικών λόγω υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας. Μπορεί θεωρητικά να δράσει ως καθολικός ανιχνευτής (universal detector) και επομένως, να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε ένωση. Όλα τα παραπάνω, την καθιστούν την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική ανάλυσης.

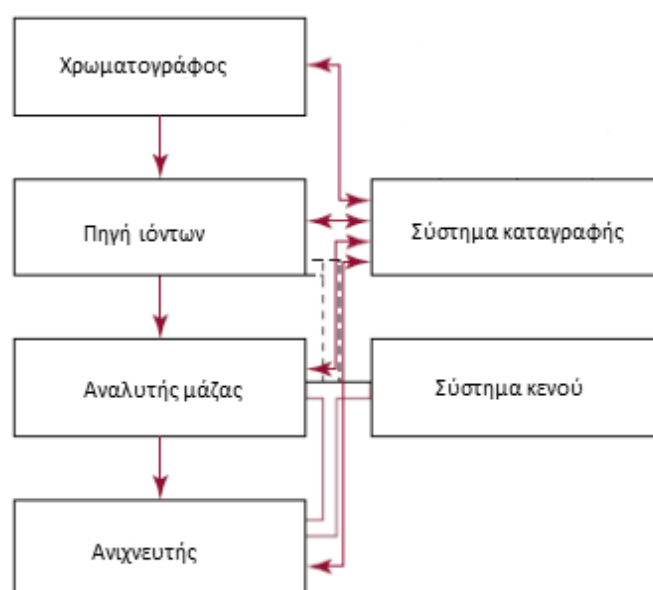
### 5.10 Διάταξη φασματογράφου μάζας

Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από τα ακόλουθα βασικά τμήματα:

- Σύστημα εισαγωγής του δείγματος (injector), τις περισσότερες φορές το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή την υγρή μορφή.
- Πηγή ιόντων (ionization source), τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα, είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα, μόρια ή φωτόνια, είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας.
- Ένας ή και περισσότεροι αναλυτές μάζας (analyzer), όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο  $m/z$ .

- Ανιχνευτής ιόντων (detector), όπου συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
- Σύστημα καταγραφής, ηλεκτρονικός υπολογιστής εφοδιασμένος με κατάλληλο λογισμικό (Σχήμα 5.12).

Την παραπάνω οργανολογία συμπληρώνει μία διάταξη εισαγωγής δείγματος, η οποία μπορεί να είναι ένα άμεσο σύστημα εισαγωγής (probe), ένα μεμονωμένο σύστημα εισαγωγής (batch inlet system), μία σύριγγα αντλίας (syringe pump), μία συσκευή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης ή μία διάταξη διαχωρισμού αέριας ή υγρής χρωματογραφίας (GC-MS, LC-MS).



**Σχήμα 5.12:** Σχηματικό διάγραμμα των τμημάτων ενός φασματογράφου μάζας  
(Rockwood et al., 2018)

Μετά την εισαγωγή του δείγματος, τα μόρια των ενώσεων προωθούνται με την βοήθεια της κινητής φάσης στην πηγή των ιόντων. Η πηγή ιοντισμού, είναι ο χώρος όπου τα μόρια ιονίζονται και τελικά οδηγούνται στον αναλυτή μάζας όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός σύμφωνα με το  $m/z$ . Η ακριβής μάζα (exact mass) εκφράζεται σε μονάδες ατομικής μάζας (Atomic mass unit, amu), ή αλλιώς Dalton (Da) που ορίζονται ως ο λόγος της μάζας του ατόμου σε σχέση με τη μάζα του 1/12 της μάζας του ισότοπου  $^{12}\text{C}$  που θεωρείται 12 amu ( $1 \text{ amu} = 1 \text{ Da} = 1.66054 \times 10^{-27} \text{ Kg/ άτομο C}$ ) (Rockwood et al., 2018). Στην συνέχεια, τα ιόντα συλλαμβάνονται στον ανιχνευτή, το σήμα ενισχύεται και οδηγείται στο σύστημα καταγραφής (Δεληγιαννάκης Ι., 2010).

### 5.11 Τεχνικές Ιονισμού

Το πρώτο βήμα για την καταγραφή ενός φάσματος είναι η μετατροπή των μορίων ή των ατόμων της προς ανάλυση ένωσης σε ιόντα σε αέρια φάση. Οι τεχνικές ιονισμού που χρησιμοποιούνται χωρίζονται (Rockwood et al., 2018) στις εξής κατηγορίες (Πίνακας 5.2).

- Μέθοδοι παραγωγής μοριακών ιόντων από πτητικά δείγματα:  
ιονισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI), χημικός ιονισμός (CI), που συνδυάζονται κυρίως με την αέρια χρωματογραφία, ο φωτοϊονισμός (PI) και ιονισμός πεδίου (FI).
- Μέθοδοι παραγωγής ιόντων από μη-πτητικά δείγματα:  
Α) Τεχνικές ψεκασμού: ηλεκτροψεκασμός (ESI) και χημικός ιονισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI), οι οποίες κυριαρχούν στην υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS)  
Β) Τεχνικές εκρόφησης που επάγονται από πρόσκρουση σωματιδίων: ιονισμός με ροή ατόμων υψηλής ταχύτητας (FAB), ιονισμός μέσω πρόσκρουσης σωματιδίων χαμηλής ενέργειας με υγρές επιφάνειες, εκρόφηση από επιφάνειες, ιονισμός μέσω πρόσκρουσης με σωματίδια υψηλής ενέργειας, ιονισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από πλάσμα (PD), ιονισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και laser (MALDI), ιονισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και laser υπεριώδους (IR MALDI) και ιονισμός με επιβραδυμένη εξαγωγή (Delayed Extraction).
- Μέθοδοι παραγωγής ατομικών ιόντων: θερμικός ιονισμός, ιονισμός μέσω πηγής σπινθήρα, ιονισμός με πηγές πλάσματος, ιονισμός μέσω εκκένωσης υπό πυράκτωση και ιονισμός μέσω επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP).

Κρίνεται σκόπιμο να δοθεί έμφαση στις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Διατριβή. Συγκεκριμένα στις αναλύσεις με αέριο χρωματογράφο, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI), ενώ στις αναλύσεις με υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

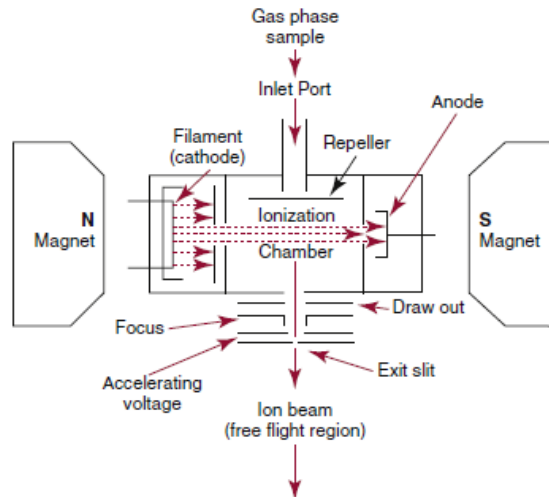
**Πίνακας 5.2:** Τύποι ανιχνευτών αέριας χρωματογραφίας (Δεληγιαννάκης Ι., 2010)

Πηγή ιοντισμού	Εύρος μάζας (Da)	Κύρια ιόντα	Αναλυτής μάζας	Τάξεις ενώσεων	Ευαισθησία
Ιοντισμός πρόσκρ. Ηλεκτρ. (EI)	500	M <sup>+</sup> Θυγατρικά ιόντα	Απλό τετράπολο, Παγίδα ιόντων	Μη πολικές κάποιες πολικές <1000 Da	picomole
Χημικός ιοντισμός (CI)	500	[M+H] <sup>+</sup> [M-H] <sup>-</sup> M <sup>+</sup>	Απλό τετράπολο, Παγίδα ιόντων	Μη πολικές, κάποιες πολικές <1000 Da	picomole
Βομβαρδισμός με άτομα (FAB)	7000	[M+H] <sup>+</sup> [M-H] <sup>-</sup>	Απλό τετράπολο	Πολικές οργανικές πρωτεΐνες οργανομεταλλικές <10000 Da	nanomole
MALDI	300000	[M+H] <sup>+</sup> [M-H] <sup>-</sup>	Χρόνος πτήσης	Πολικές, κάποιες μη πολικές βιοπολυμερή συνθετικά πολυμερή <10 <sup>6</sup> Da	femtomole
Ηλεκτρ/σμός (ESI)	7000	[M+H] <sup>+</sup> [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> [M-H] <sup>-</sup>	Απλό τετράπολο, Παγίδα ιόντων, Χρόνος πτήσης, Υβρ. αναλυτής	Πολικές κάποιες μη πολικές οργανικές πρωτεΐνες <200000 Da	Femtomole-picomole

### 5.11.1. Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Ionization, EI)

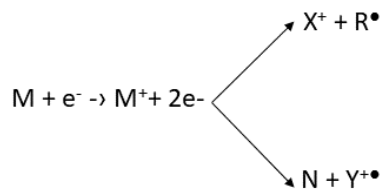
Η τεχνική αυτή είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική ιοντισμού αερίων, υγρών πτητικών δειγμάτων. Στις πηγές αυτές, μια δέσμη ηλεκτρονίων προσκρούει στους μοριακούς ατμούς μιας ουσίας υπό ελαττωμένη πίεση επομένως λαμβάνει χώρα αποβολή ενός ή περισσότερων ηλεκτρονίων. Τελικά παράγονται σχετικά ασταθή θετικά ιόντα μονών ηλεκτρονίων ή πολλαπλά φορτισμένα ιόντα. Στην περίπτωση που τα μόρια έχουν υψηλή ηλεκτρονιακή ενέργεια, μπορούν να παραχθούν αρνητικά φορτισμένα ιόντα.

Η δέσμη ηλεκτρονίων παράγεται από ένα θερμαινόμενο νήμα (filament) κατασκευασμένο από βολφραϊμίο (tungsten) ή ρήνιο (rhenium). Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από μια εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού (70 eV) μεταξύ του νήματος και της πηγής των ιόντων. Περνούν μέσω των οπών εισόδου και εξόδου και συλλέγονται από ένα ηλεκτρόδιο παγίδα. Το δυναμικό εφαρμόζεται σε ένα ηλεκτρόδιο απώθησης που βρίσκεται μέσα στην πηγή και επιταχύνει τα ιόντα προς την έξοδο. Ένα μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται παράλληλα προς τον άξονα της δέσμης των ηλεκτρονίων και η ένταση του πεδίου επιλέγεται έτσι, ώστε να παρέχει μέγιστη μεταφορά και ελάχιστη εκτροπή της δέσμης (Wong et al., 2013).



Σχήμα 5.13: Πηγή ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Rockwood et al., 2018)

Σύμφωνα με τον ιονισμό EI, το μοριακό ιόν ( $M^{+\bullet}$ ) που έχει διεγερθεί υφίσταται θραυσματοποιήσεις. Ως κατιονική ρίζα με περιττό αριθμό ηλεκτρονίων, μπορεί να διασπαστεί είτε προς μια ρίζα ( $R^\bullet$ ) και ένα ιόν με άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων ( $X^+$ ), είτε προς ένα ουδέτερο μόριο ( $N$ ) και μια νέα κατιονική ρίζα ( $Y^{+\bullet}$ ) (Αντίδραση 5.1).



(Αντίδραση 5.1)

Αυτοί οι δυο τύποι ιόντων έχουν διαφορετικές χημικές ιδιότητες. Κάθε ηλεκτρόνιο σχετίζεται με ένα κύμα, του οποίου το μήκος κύματος  $\lambda$  δίνεται από την εξίσωση:

$$\lambda = \frac{h}{mu} \quad (\text{Εξίσωση 5.3})$$

όπου  $m$  είναι η μάζα του,  $u$  η ταχύτητά του και  $h$  η σταθερά του Planck, Το  $\lambda$  ισούται με  $2.7\text{\AA}$  όταν η κινητική ενέργεια είναι  $20\text{eV}$  και  $1.4\text{\AA}$  όταν η κινητική ενέργεια είναι ίση με  $70\text{eV}$ .

Αν κάποια από τις συχνότητες έχει ενέργεια  $h\nu$ , που αντιστοιχεί σε μια μετάπτωση (transition) στο μόριο, τότε συμβαίνει μεταφορά ενέργειας σε αυτό, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το μόριο. Σε χαμηλές τιμές δυναμικού, η κινητική ενέργεια του μορίου είναι χαμηλότερη από την ενέργεια ιονισμού του.

Το φάσμα EI, είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την μοριακή δομή της ένωσης, γι' αυτό συχνά αναφέρεται και ως μοριακό αποτύπωμα. Τα φάσματα, συχνά χρησιμοποιούνται σε



βιβλιοθήκες αναζήτησης προκειμένου να τακτοποιηθούν μέσω του βαθμού ομοιότητας, τα άγνωστα συστατικά του δείγματος.

Πλεονέκτημα του ιοντισμού με ηλεκτρόνια αποτελεί η απλότητα, η υψηλή απόδοση του ιοντισμού, το επαναλήψιμο φάσμα μάζας και η εκτενής θραυσματοποίηση, που οδηγεί σε ένα πλήθος ιόντων με χαρακτηριστικό λόγο  $m/z$  και εντάσεις στο φάσμα, βοηθώντας στον προσδιορισμό δομής περίπλοκων ενώσεων. Το τελευταίο αποτελεί συνάμα και μειονέκτημα όταν παρατηρείται απουσία του μοριακού ιόντος λόγω αδυναμίας προσδιορισμού του μοριακού βάρους της ένωσης.

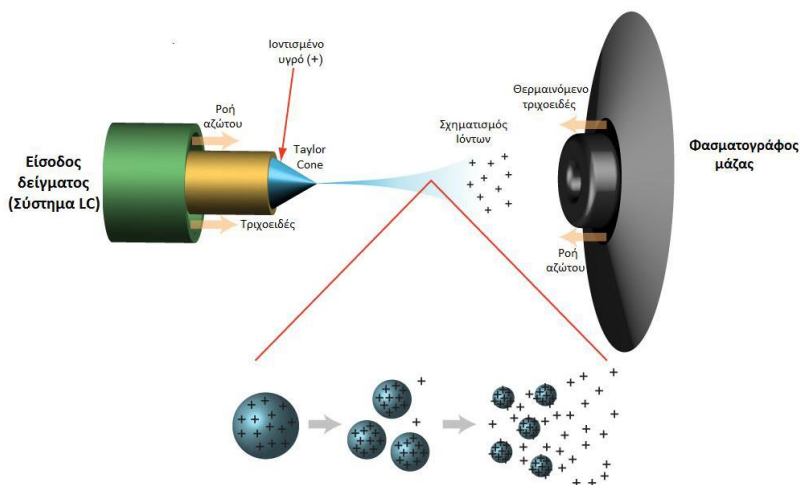
Περιορισμός της τεχνικής αυτής αποτελεί η απαίτηση για πτητικά και σταθερά ουδέτερα μόρια στην αέρια φάση, πριν τον ιονισμό. Είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδος ιοντισμού σε τεχνικές αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας για τον προσδιορισμό μη πολικών μορίων χαμηλής μοριακής μάζας (<1000 Da).

### 5.11.2 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI)

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό εφαρμόζεται σε θερμικά ασταθείς και μεγάλο μοριακού βάρους μόρια (πρωτεΐνες και πεπτιδία) (Rigano et al., 2019). Αποτελεί την κύρια μέθοδο σύζευξης της υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας.

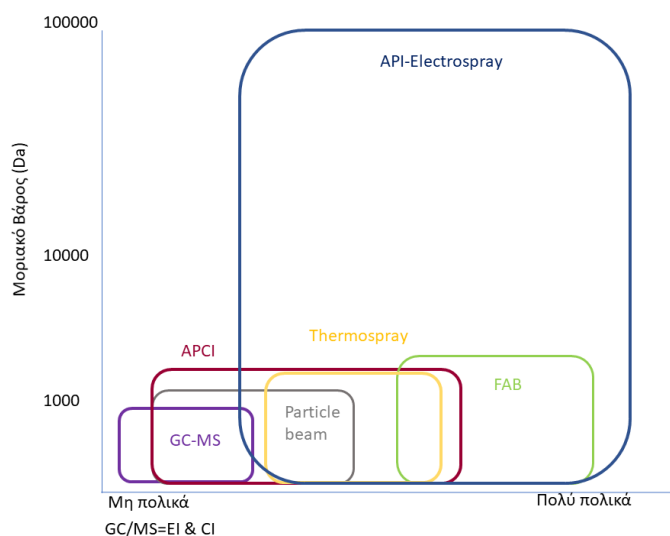
Τα φορτισμένα σταγονίδια παράγονται από μια τριχοειδή ακίδα κάτω από την επίδραση ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Για την παραγωγή του ηλεκτρικού πεδίου απαιτείται εφαρμογή διαφοράς δυναμικού, (3–6 kV), μεταξύ του τριχοειδούς σωλήνα και ενός αντιηλεκτροδίου, που βρίσκεται σε απόσταση 0,3–2 cm.

Το υψηλό δυναμικό προκαλεί στην άκρη του τριχοειδούς ένα αερόλυμα πολλαπλά φορτισμένων σταγόνων (Rockwood et al., 2018 και Wilm, 2011). Οι σταγόνες αυτές, καθώς διασχίζουν την πηγή ιοντισμού και οδηγούνται προς το φασματόμετρο μάζας, μειώνονται σε μέγεθος μέσω σχάσεων Coulomb, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών μικρότερων σταγονιδίων (Σχήμα 5.14). Στην συνέχεια πραγματοποιείται απομάκρυνση του διαλύτη, μέσω εκνέφωσης με τη βοήθεια αερίου αζώτου, το οποίο έρχεται από δύο κατευθύνσεις (κύριο αέριο sheath gas και βοηθητικό αέριο, auxiliary gas). Τέλος, τα αποδιαλυτωμένα πλέον ιόντα, μεταφέρονται προς τον αναλυτή με τη βοήθεια δακτυλιοειδών φακών (Rockwood et al., 2018).



**Σχήμα 5.14:** Σχηματική αναπαράσταση ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) (Rockwood et al., 2018)

Η τεχνική εντάσσεται στις μαλακές τεχνικές ιοντισμού με μικρή θραυσματοποίηση και ικανότητα σχηματισμού ιόντων με πολλαπλό φορτίο τα οποία μειώνουν τον λόγο  $m/z$  και καθιστούν δυνατή την ανάλυση ενώσεων με μεγάλα μοριακά βάρη. Παρουσιάζει καλή ευαισθησία, εύκολη ποσοτικοποίηση και εφαρμόζεται για μετρίως έως πολικά μόρια. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου, αποτελεί η μείωση του σήματος σε διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύς και ανταγωνιστικό υπόστρωμα, ο σχηματισμός ιόντων προσθήκης και η χρήση χαμηλής ροής (<0.4 ml/min) της κινητής φάσης όταν εφαρμόζεται σε σύζευξη με υγρή χρωματογραφία και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Δεληγιαννάκης Ι., 2010). Στο Σχήμα 5.15, παρουσιάζεται η σύγκριση των τεχνικών ιοντισμού ανάλογα με την πολικότητα και το μοριακό βάρος των μορίων που αναλύονται.



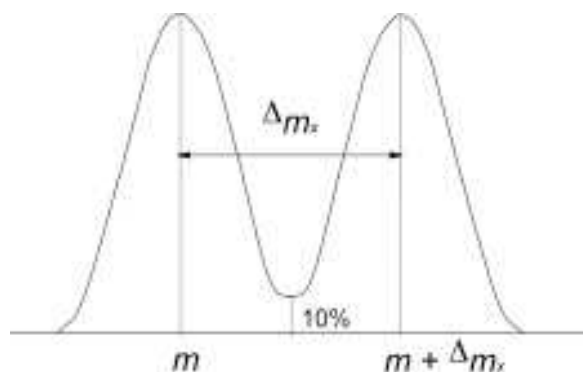
**Σχήμα 5.15:** Σύγκριση τεχνικών ιοντισμού

## 5.12 Χαρακτηριστικά Αναλυτών μάζας

Όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες παραγράφους, η βασική λειτουργία του φασματομέτρου μάζας είναι να διαχωρίζει τα ιόντα βάσει του λόγου  $m/z$ . Η διαχωριστική ικανότητα (resolution) του οργάνου, εξαρτάται από τον αναλυτή μάζας και ορίζεται ως το πηλίκο της μάζας της πρώτης κορυφής ως προς τη διαφορά μάζας δύο διαδοχικών κορυφών (Εξίσωση 5.4). Ικανοποιητικός διαχωρισμός επιτυγχάνεται όταν δύο κορυφές με ίσο ύψος, επικαλύπτονται σε ύψος σε ποσοστό μικρότερο του 10% (Σχήμα 5.16).

$$R = \frac{M}{\Delta M} \quad (\text{Εξίσωση 5.4})$$

Διακρίνονται σε χαμηλής και υψηλής διακριτικής ικανότητας. Στα χαμηλής ( $100 < R < 1000$ ), τα ιόντα διακρίνονται με βάση την ονομαστική τιμή που αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ακέραιη τιμή προς την μοριακή. Στα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας ( $10^4 < R < 10^6$ ) μπορούν να διαχωριστούν ιόντα με ίδια ονομαστική μάζα αλλά διαφορετικές ακριβείς μάζας, στο τρίτο ή και στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο.



**Σχήμα 5.16:** Διαχωριστική ικανότητα στην φασματομετρία μάζας (Rockwood et al., 2018)

Εκτός από την διακριτική ικανότητα, άλλα κύρια χαρακτηριστικά των αναλυτών μάζας αποτελούν:

- η ακρίβεια μάζας (Mass Accuracy), αποτελεί το λόγο σφάλματος της μέτρησης  $m/z$  προς το πραγματικό  $m/z$  και εκφράζεται σε μονάδες χιλιοστομάζας (ppm) ή συχνότερα σε μέρη στο εκατομμύριο (parts per million, ppm)
- η γραμμική περιοχή, η περιοχή όπου το σήμα των ιόντων μεταβάλλεται γραμμικά με την συγκέντρωση του αναλύτη
- το εύρος μάζας, αφορά το εύρος όπου ο αναλυτής μπορεί να μετρήσει ιόντα
- η ταχύτητα σάρωση (Speed), ο ρυθμός με το οποίο ο αναλυτής μετράει τα ιόντα

- η διαπερατότητα (Transmission), ο λόγος του αριθμού των ιόντων που φτάνουν στον ανιχνευτή προς τον αριθμό των ιόντων που εισέρχονται στον αναλυτή
- η αποδοτικότητα, ορίζεται ως το γινόμενο της διαπερατότητας του αναλυτή και του κύκλου σάρωσης (Duty Cycle) και αφορά το ποσοστό των υπό μελέτη ιόντων που σχηματίζονται κατά τον ιονισμό και τελικά αναλύονται
- η επαναληψιμότητα (Precision), πόσο επαναλήψιμα προσδιορίζονται οι αφθονίες των ιόντων

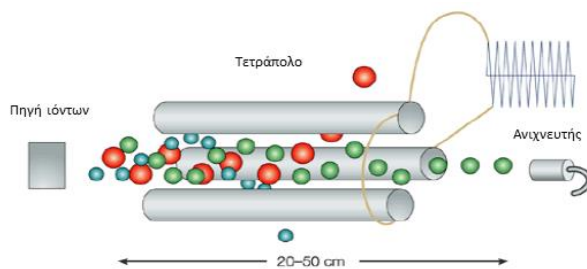
Υπάρχουν διάφοροι τύποι αναλυτών μάζας και διακρίνονται στους αναλυτές σάρωσης (τετραπολικός αναλυτής μάζας, Q), στους μαγνητικού ή ηλεκτρικού πεδίου (B ή E) και στους παλμικούς αναλυτές μάζας (τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT), στους αναλυτές χρόνου πτήσης (time of flight, TOF) και στους αναλυτές κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων μετασχηματισμού Fourier, (FT-ICR). Η φύση του δείγματος μαζί με τις απαιτήσεις της ανάλυσης καταδεικνύουν τον καταλληλότερο αναλυτή μάζας για κάθε ανάλυση.

#### 5.12.1 Τετραπολικός Αναλυτής (Quadrupole, Q)

Οι τετραπολικοί αναλυτές είναι οι πιο διαδεδομένοι αναλυτές, καθώς παρουσιάζουν χαμηλό κόστος, συμπαγή κατασκευή, μεγάλες αντοχές και ταχύτατη σάρωση (<100 ms). Το τετραπολικό φίλτρο μάζας ή γραμμικό τετράπολο αποτελείται από μια γραμμική διάταξη τεσσάρων συμμετρικά παρατεταμένων ράβδων στις οποίες εφαρμόζονται δυναμικά rf (radio frequency) και dc (direct current). Τα δύο δυναμικά έχουν την ίδια απόλυτη τιμή, αλλά αντίθετη πολικότητα.

Οι δυνάμεις ασκούνται στο επίπεδο όπου κινείται ο άξονας z, κατά μήκος του οποίου κινούνται τα ιόντα κατά την διαδρομή τους από την πηγή ιόντων ως τον ανιχνευτή. Τα ιόντα, κατά την διαδρομή τους αυτή, ταλαντώνονται στα επίπεδα των αξόνων x και y με συχνότητες εξαρτώμενες από τον λόγο τους  $m/z$  και με διαδρομές που εξαρτώνται από το πλάτος του εφαρμοζόμενου δυναμικού και τις αρχικές θέσεις των ίδιων των ιόντων (Stauffer et al., 2008).

Μόνο ένα συγκεκριμένο ιόν με λόγο  $m/z$  μπορεί να περάσει τον αναλυτή και να φτάσει στον ανιχνευτή. Τα ιόντα διαγράφουν ελικοειδείς πορείες μέσα στο τετράπολο, και περιγράφονται μαθηματικά από την επίλυση μιας γραμμικής διαφορικής εξίσωσης δευτέρου βαθμού. Τα ιόντα που δεν έχουν το κατάλληλο  $m/z$ , προσκρούουν πάνω στις ράβδους έως ότου αποφορτιστούν και έτσι δεν ανιχνεύονται (Rockwood et al., 2018 και Wong et al., 2013).



**Σχήμα 5.17:** Σχηματική αναπαράσταση αναλυτή απλού τετράπολου (Rockwood et al., 2018)

Μερικά από τα πλεονεκτήματα των απλών τετράπολων αποτελούν

- το σχετικά μικρό δυναμικό επιτάχυνσης
- η εξαιρετική ευαισθησία, λόγω καλής μετάδοσης σήματος
- επιτρέπουν υψηλές ταχύτητες σάρωσης (η σάρωση εξαρτάται μόνο από την εναλλαγή του δυναμικού)
- παρουσιάζουν επαναλήψιμα αποτελέσματα
- μπορούν να συνδεθούν εύκολα σε σειρά με διατάξεις αέριας/υγρής χρωματογραφίας και με άλλους αναλυτές (tandem MS)
- μικροί σε μέγεθος και σε βάρος και σχετικά οικονομικοί

### 5.12.2 Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of flight, TOF)

Στους αναλυτές χρόνου πτήσης, ο λόγος  $m/z$  ενός ιόντος προσδιορίζεται με μέτρηση του χρόνου πτήσης. Οι γραμμικοί αναλυτές TOF τροφοδοτούνται από ιόντα τα οποία σχηματίζονται σε ακροσωλήνα με υψηλό δυναμικό ή από λεπτό στρώμα δείγματος το οποίο βομβαρδίζεται από ένα παλμικό laser (τεχνική MALDI) (Elbashir and Aboul-Enein, 2018). Τα ιόντα επιταχύνονται με την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού  $V$  προς το μεταλλικό πλέγμα, διασκορπίζονται με τη πάροδο του χρόνου κατά μήκος διαδρομής γνωστού μήκους και τελικά εισέρχονται σε ευθύγραμμο σωλήνα (Σχήμα 5.18).

Τα ιόντα διαχωρίζονται στο χώρο σε ομάδες που κινούνται με διαφορετική ταχύτητα χαρακτηριστική του  $m/z$  και τελικά ανιχνεύονται στο τέλος της διαδρομής. Η διαφορά του χρόνου από τη στιγμή του ιοντισμού έως την ανίχνευση ενός ιόντος δίνει το χρόνο πτήσης.



**Σχήμα 5.18:** Αρχή λειτουργίας ανιχνευτή χρόνου πτήσης (TOF) (Stauffer et al., 2008)

Ο αναλυτής TOF, είναι κατάλληλος για την ανάλυση ασταθών και μεγάλα σε μέγεθος μόρια. Μερικά από τα πλεονεκτήματα των αναλυτών TOF αποτελούν:

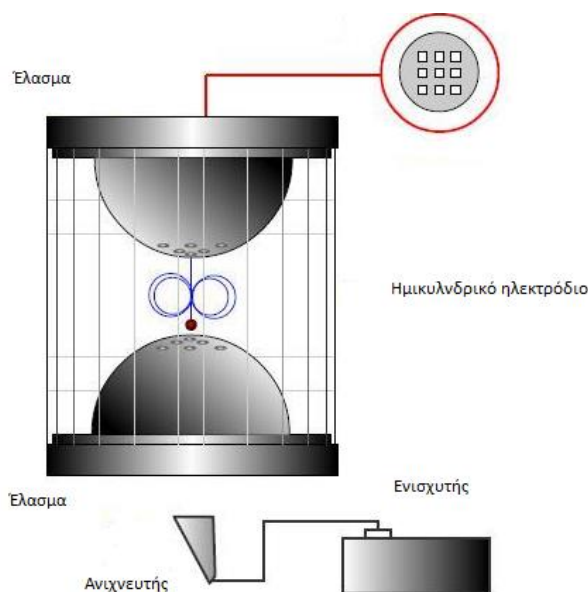
- απεριόριστο εύρος  $m/z$  των διαχωριζομένων ιόντων
- μεγάλη ταχύτητα (ένα πλήρες φάσμα μάζας λαμβάνεται εντός δεκάτων του δευτερολέπτου)
- εξαιρετική ευαισθησία λόγω υψηλής απόδοσης μετάδοσης σήματος
- χαμηλό κόστος
- δυνατότητα σύζευξης με άλλους αναλυτές (tandem MS)

### 5.12.3 Αναλυτής Παγίδας Ιόντων (Quadrupole Ion Trap, QIT)

Ο αναλυτής μάζας παγίδας ιόντων, βασίζεται στην δημιουργία ενός τρισδιάστατου πεδίου όπου παγιδεύονται τα ιόντα. Οι παγίδες ιόντων αποτελούνται από δυο υπερβολικά ηλεκτρόδια που χρησιμεύουν ως καλύμματα και ένα δακτυλιοειδές ηλεκτρόδιο, μεταξύ των οποίων εφαρμόζονται δυναμικά (DC και RF), αυξάνοντας έτσι την κινητική τους ενέργεια.

Τα ιόντα κυκλοφορούν στον τρισδιάστατο χώρο μεταξύ των ηλεκτροδίων και εστιάζονται στο επίπεδο που ορίζεται από τον ανιχνευτή και το πλέγμα ιοντισμού (Σχήμα 5.19). Η αρχή λειτουργίας, βασίζεται στη δημιουργία σταθερών τροχιών για τα ιόντα με ίδιο  $m/z$ . Τα «ανεπιθύμητα» ιόντα απομακρύνονται, μέσω πρόσκρουσης στα τοιχώματα ή με την αξονική αποβολή τους από την παγίδα λόγω των ασταθών τροχιών τους. Τα ιόντα με το ίδιο φορτίο λαμβάνουν την ίδια ενέργεια, επομένως τα ιόντα με μικρό  $m/z$  επιταχύνονται περισσότερο σε σχέση με τα ιόντα με μεγάλο  $m/z$ , ξεφεύγουν από την παγίδα και οδηγούνται πρώτα στον ανιχνευτή (Κακλαμάνου Γ., 2009).

Οι παγίδες ιόντων, παρουσιάζουν ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα για μάζες έως 1000 Da. Είναι οικονομικοί και αξιόπιστοι αναλυτές και λειτουργούν ικανοποιητικά ως ανιχνευτές στην αέρια και στην υγρή χρωματογραφία. Παράλληλα προσφέρεται η δυνατότητα σύζευξης με άλλους αναλυτές.



Σχήμα 5.19: Σχηματική αναπαράσταση παγίδας ιόντων

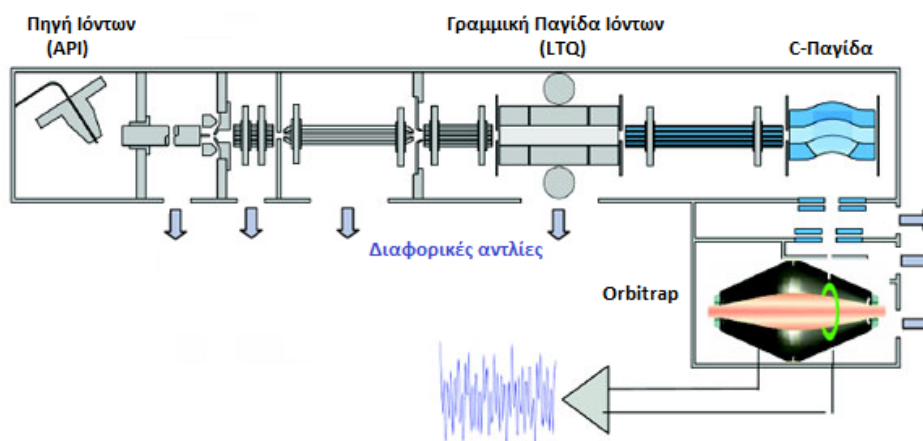
#### 5.12.4 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτική ικανότητας, έχει αποδειχθεί ένας αποτελεσματικός και αξιόπιστος τρόπος για τον προσδιορισμό πολλών οργανικών ρύπων στο περιβάλλον. Ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap αποτελεί έναν νέο τύπο αναλυτή, που επιτρέπει την ανίχνευση μεγάλου εύρους μάζας (έως 2000 Da), με υψηλή διακριτική ικανότητα (έως και 150.000 FWHM), ακρίβεια μάζας (τέσσερα δεκαδικά ψηφία) και δυναμική περιοχή (> 4.000 σε μία σάρωση). Αποτελεί συνδυασμό γραμμικής και ηλεκτροστατικής παγίδας ιόντων. Η ακρίβεια μάζας φτάνει τα 3 ppm, εξασφαλίζοντας έτσι υψηλή αξιοπιστία στην ταυτοποίηση (Σχήμα 5.20) (Κοσμά Χ., 2013).

Τα παραγόμενα ιόντα στην πηγή ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API) παγιδεύονται στο LTQ και μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση μεθόδων σαρώσεως MS και MS<sup>n</sup> (n=1-10). Στη συνέχεια, τα ιόντα επιταχύνονται ευθύγραμμα και συλλέγονται στην παγίδα ιόντων σχήματος C (C-Trap), από την οποία στη συνέχεια εισάγονται στο Orbitrap και αιχμαλωτίζονται με απότομη άνοδο του δυναμικού στο κεντρικό ηλεκτρόδιο του Orbitrap. Τα παγιδευμένα ιόντα κινούνται σε κυκλική τροχιά γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και ανιχνεύονται οι αξονικές ταλαντώσεις τους κατά μήκος του κεντρικού ηλεκτροδίου (Κακλαμάνου Γ., 2009).

Τα αξονικά ταλαντευόμενα ιόντα παράγουν ένα περιοδικό σήμα στα εξωτερικά ηλεκτρόδια, το οποίο ανιχνεύεται ως αποτυπωμένο ρεύμα (image current). Μετά από την

ενίσχυσή του, τα σήματα του αποτυπωμένου ρεύματος μετατρέπονται σε φάσμα συχνοτήτων με χρήση του αλγορίθμου μετατροπής Fourier (Fourier Transformation, FT algorithm). Επειδή η συχνότητα ταλάντωσης σχετίζεται ευθέως με το λόγο  $m/z$ , το φάσμα συχνοτήτων μετατρέπεται εύκολα σε φάσμα μάζας (Κοσμά Χ., 2013).



Σχήμα 5.20: Σχηματική απεικόνιση υβριδικού αναλυτή LTQ Orbitrap (Κοσμά, 2013)

### 5.13 Συζευγμένη φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης. Μεταξύ των επιπέδων MS τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες, όπως σύγκρουση με αδρανή ή δραστικά αέρια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση, επιβράδυνση, σταθεροποίηση κτλ. Σε τριπλά τετράπολα (QQQ) ή υβριδικούς αναλυτές (π.χ. Q-TOF, IT-TOF, IT-Orbitrap), τα επιμέρους τμήματα μπορούν να επιλέξουν να περάσει μόνο ένα ιόν ή όλα τα ιόντα. Η επιλογή ανάμεσα στους διάφορους αναλυτές MS σάρωσης ή μη σάρωσης και ανάμεσα στις διάφορες διαδικασίες στις οποίες υποβάλλονται τα ιόντα μεταξύ των αναλυτών, παρέχει τη δυνατότητα πραγματοποίησης πολυάριθμων πειραμάτων MS/MS, τα οποία μπορούν να προσφέρουν πολύτιμη πληροφορία για τη δομή της αναλυόμενης ένωσης και να αυξήσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα της μέτρησης (Hajšlová and Čajka, 2007 και Hoffmann and Stroobant, 2007).

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά μπορεί να πραγματοποιηθεί στο χώρο (Tandem Mass Spectrometry in Space) ή στο χρόνο (Tandem Mass Spectrometry in Time) (Hajšlová and Čajka, 2007). Για πειράματα φασματομετρίας μάζας σε σειρά στο χώρο, απαιτούνται τουλάχιστον δύο αναλυτές μάζας. Η πιο κοινή διαμόρφωση είναι το τριπλό τετράπολο. Όταν το τριπλό τετράπολο λειτουργεί ως απλός αναλυτής ρυθμίζεται ώστε δύο τετράπολα να συνεισφέρουν μόνο στον εστιασμό της δέσμης των ιόντων (Q2 και Q3 ή Q1 και Q2 αντίστοιχα) και ο

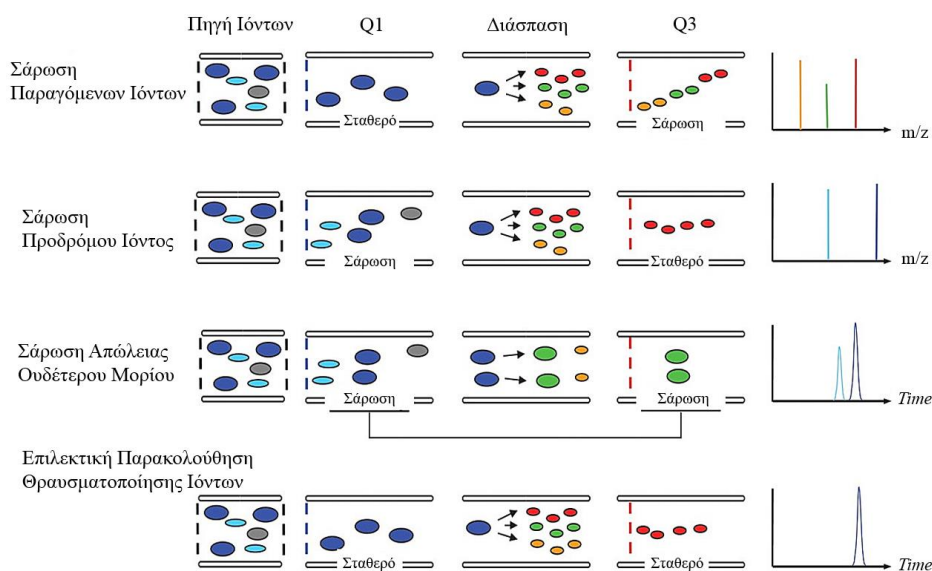


διαχωρισμός να γίνεται στο τρίτο τετράπολο. Ο συνδυασμός τετραπόλου με παγίδες ιόντων ή αναλυτή χρόνου πτήσης στη θέση του τελικού αναλυτή (Q3) επιτρέπει τη λήψη φασμάτων υψηλής διαχωριστικής ικανότητας καθώς και πειράματα  $MS^n$  (Rockwood et al., 2018). Πρόκειται για οργανολογία που χρησιμοποιείται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς ή για την ανάπτυξη νέων μεθόδων και είναι αρκετά απαιτητική τόσο σε κόστος αγοράς όσο και στη λειτουργία της.

Για τη φασματομετρία μάζας σε σειρά στον χρόνο, χρησιμοποιούνται οι παγίδες ιόντων και οι αναλυτές FT-MS (αναλυτής μάζας κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων ή Orbitrap με μετασχηματισμό Fourier). Πλεονέκτημα αποτελεί η δυνατότητα πραγματοποίησης πειραμάτων  $MS^n$ . Ωστόσο, μειονέκτημα της χρήσης των παγίδων αποτελεί η αδυναμία συλλογής ιόντων θραυσματοποίησης με  $m/z$  μικρότερο του 1/3 σε σχέση με το πρόδρομο ιόν.

Στην φασματομετρία MS/MS υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής διάφορων πειραμάτων σάρωσης όπως:

- πλήρη σάρωση (full scan)
- την παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring, SIM)
- την παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Multiple Reaction Monitoring, MRM)
- τη σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning)
- και τη σάρωση μητρικού ιόντος (Parent Ion Scanning).



Σχήμα 5.21: Τρόποι λειτουργίας φασματομετρίας μάζας MS/MS

## **Δ. Επεξεργασία δεδομένων με χρήση στατιστικής ανάλυσης**

### **5.14 Εισαγωγή στην Χημειομετρία**

Η ανάπτυξη των στατιστικών πειραματικών σχεδιασμών έχει τις ρίζες της στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, όταν ο πρώτος τέθηκαν οι βάσεις της πρωτοποριακής αυτής θεωρίας από τον Ronald A. Fisher. Από τα μέσα της δεκαετίας του 1970 αναγνωρίστηκε ως κλάδος της αναλυτικής χημείας. Ως χημειομετρία ορίζεται η επιστήμη που συνδέει τις μετρήσεις που πραγματοποιούνται σε μία ανάλυση ή διεργασία με τις μετρήσεις μέσω εφαρμογής μαθηματικών ή στατιστικών μεθόδων. Σήμερα παρουσιάζει ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως ο περιβαλλοντικός έλεγχος (monitoring), η χρωματογραφία, η φασματοσκοπία, η φυσικοχημεία (μελέτη κινητικής), η οργανική χημεία (βελτιστοποίηση αντιδράσεων), η βιολογία και η ιατροδικαστική (Luciano et al, 2010). Σε αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν αποτελεί αυτόνομο εργαλείο, όμως περιλαμβάνει πολλές μεθόδους όπως η βελτιστοποίηση, ο πειραματικός σχεδιασμός, η βασική στατιστική, η επεξεργασία σήματος, η παραγοντική ανάλυση, η μοντελοποίηση με επιφάνειες απόκρισης, η βαθμονόμηση, η ανίχνευση, τα νευρωνικά δίκτυα κ.α.

Στην παρούσα Διατριβή, οι χημειομετρικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση της μαγνητικής εκχύλισης στερεάς φάσης και την εκτίμηση της επίδρασης των επιμέρους παραμέτρων στην εκχύλιση επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων από επιφανειακά ύδατα.

### **5.15 Βελτιστοποίηση μεθόδων**

Η διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών και επιπέδων των πειραματικών παραγόντων στην απόδοση μία ανάλυσης έτσι ώστε να παράγεται η μέγιστη δυνατή απόκριση ονομάζεται βελτιστοποίηση της μεθόδου (optimization). Ο κλασικός τρόπος βελτιστοποίησης, περιλαμβάνει τη διερεύνηση σε διάφορα επίπεδα της βέλτιστης τιμής ενός παράγοντα τη φορά, διατηρώντας τις υπόλοιπες σταθερές (One-variable/factor at a time).

Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής, αποτελεί το γεγονός ότι δεν περιλαμβάνονται οι διαδραστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων που μελετώνται, με αποτέλεσμα τη μειωμένη αποτελεσματικότητα πρόβλεψης των πραγματικών βέλτιστων τιμών. Επιπρόσθετα, αποτελεί μία χρονοβόρα μέθοδο καθώς απαιτεί μεγάλο αριθμό πειραμάτων και χρήση μεγάλων ποσοτήτων αναλωσίμων και αντιδραστηρίων (Antonopoulou and Konstantinou, 2013). Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω μειονεκτήματα χρησιμοποιούνται οι πολυπαραγοντικές στατιστικές τεχνικές, στις οποίες ανήκει και ο στατιστικός πειραματικός σχεδιασμός. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι οι μελέτες που

κάνουν χρήση πειραματικού σχεδιασμού υπερτερούν έναντι των συμβατικών μεθόδων καθώς είναι πιο αποτελεσματικές (effective), πιο αποδοτικές (efficient) και πιο οικονομικές (economical) από τις παραδοσιακές μεθόδους (Montgomery D.C., 2005).

Σε αυτές τις μεθόδους, συνδυάζονται η στατιστική ανάλυση και οι πιθανότητες με την λογική του πειραματισμού, για να εξαχθεί μία αποδεκτή συσχέτισης της αιτίας με του αποτελέσματος. Για την εύρεση της βέλτιστης τιμής, πραγματοποιείται ταυτόχρονη εναλλαγή όλων των επιλεγμένων, προς βελτιστοποίηση παραγόντων, σύμφωνα με ένα προκαθορισμένο πειραματικό σχέδιο (Montgomery D.C., 2009). Για να εφαρμοστεί μια συστηματική μέθοδο βελτιστοποίησης θα πρέπει να καθοριστούν (Montgomery D.C., 2005):

- Το προς διερεύνηση «πρόβλημα»
- Επιλογή των παραγόντων βελτιστοποίησης
- Επιλογή των επιπέδων εξέτασης
- Επιλογή των αποκρίσεων
- Επιλογή του κατάλληλου τύπου πειραματικού σχεδιασμού
- Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του σχεδιασμού

### **5.16 Πειραματικός σχεδιασμός (Experimental Design ή Design of Experiments - DOE)**

Βασικό σκέλος του πειραματικού σχεδιασμού είναι ο προσδιορισμός των παραγόντων (*factors*) ή μεταβλητών (*variables*) του πειράματος που μπορούν να μεταβληθούν σε κάθε πείραμα και έχουν σημαντικές επιδράσεις στο αποτέλεσμα μια πειραματικής διαδικασίας. Το αποτέλεσμα μιας πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή η τιμή που εξάγεται ονομάζεται απόκριση (Montgomery D.C., 2005).

Οι τέσσερις βασικές αρχές ενός ορθού πειραματικού σχεδιασμού συνοψίζονται:

#### **Επανάληψη (Replication)**

Η επανάληψη των συνδυασμών των παραγόντων αποτελεί μία εκτίμηση του τυχαίου πειραματικού σφάλματος. Η επίδραση του σφάλματος στην επίδραση ενός παράγοντα εκτιμάται με τον υπολογισμό του τυπικού σφάλματος το οποίο μειώνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των παρατηρήσεων και επαναλήψεων.

#### **Λήψη πλήρως τυχαιοποιημένων δεδομένων (Randomization)**

Πρόκειται για τον τυχαίο προσδιορισμό πειραματικών συνδυασμών των επιπέδων των παραγόντων πριν την έναρξη του πειράματος, έτσι ώστε να αποφευχθούν τα συστηματικά σφάλματα και να επιτευχθεί η έγκυρη ερμηνεία της απόκρισης, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για στατιστικές δοκιμές σημαντικότητας.

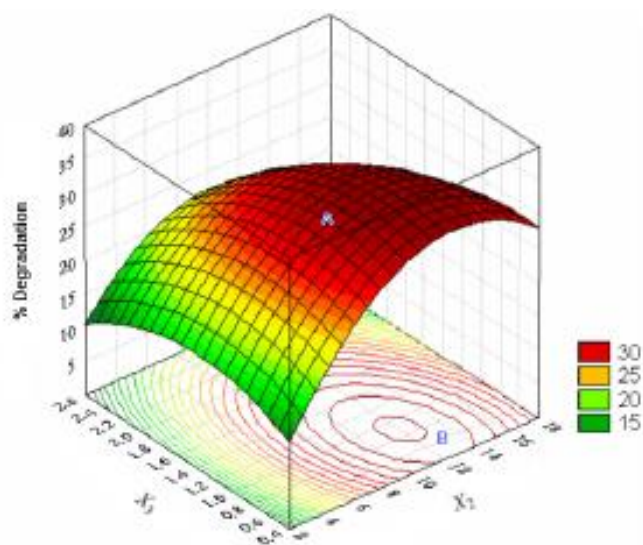
**Πειράματα σε μπλοκ (Blocking)**

Με την ομαδοποίηση του πειραματικού υλικού, που είναι περισσότερο ομοιογενής από το σύνολο, αυξάνεται η ακρίβεια των πειραμάτων. Ομάδες με ομοειδή δεδομένα (blocks), δημιουργούνται όταν οι επαναλήψεις των μετρήσεων δεν μπορούν να διεξαχθούν κάτω από τις ίδιες συνθήκες (όπως διαφορετικές ημέρες) ή το υλικό δεν επαρκεί για όλες τις επαναλήψεις. Έτσι αναπτύσσεται το πλήρες τυχαίοποιημένο σχέδιο σε μπλοκ.

**5.17 Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM)**

Η μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM) βασίζεται στην εφαρμογή της πολυωνυμικής εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα. Ο όρος επιφάνεια απόκρισης (response surface) αποδίδεται στην τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση βελτιστοποίησης ενός συστήματος όπου διερευνάται η επίδραση δύο ή περισσότερων παραγόντων στη μεταβλητή απόκρισης (Hibbert, 2012).

Η τρισδιάστατη γραφική απεικόνιση των αποκρίσεων (συναρτήσει δύο ανεξάρτητων παραγόντων) μπορεί επίσης να περιγραφεί με τη χρήση ισομετρικών διαγραμμάτων (contour plot) που ορίζεται ως η γεωμετρική απεικόνιση μιας απόκρισης, της μεταβολής δύο μόνο παραγόντων, διατηρώντας σταθερές το μέγεθος της απόκρισης και τις μεταβολές των υπόλοιπων παραγόντων. Τα ισομετρικά διαγράμματα αποτελούν τομές δυο διαστάσεων των αντιστοιχών επιφανειών απόκρισης. Στο Σχήμα 5.22 δίνεται ένα τυπικό διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης και ισομετρικών καμπυλών.



**Σχήμα 5.22** Επιφάνεια απόκρισης και ισομετρικές καμπύλες

Τα συνήθη βήματα που ακολουθούνται κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφανειακής απόκρισης ως τεχνική βελτιστοποίησης είναι τα εξής (Bezerra et al., 2008):

- Επιλογή των ανεξάρτητων παραμέτρων (μεταβλητών), οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την υπό μελέτη απόκριση του συστήματος (screening studies), καθώς και την πειραματική περιοχή, με βάση το σκοπό της έρευνας και την εμπειρία του ερευνητή.
- Επιλογή του μοντέλου του πειραματικού σχεδιασμού, και την διεξαγωγή των πειραμάτων σύμφωνα με την πειραματική μήτρα.
- Μαθηματική-στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων που προκύπτουν από τη χρήση της πολυωνυμικής εξίσωσης.
- Εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου.
- Εκτίμηση της αναγκαιότητας ή/και της δυνατότητας πραγματοποίησης αντικατάστασης στην κατεύθυνση της βέλτιστης περιοχής.
- Ορισμός των βέλτιστων τιμών για κάθε μελετώμενη μεταβλητή.

#### **5.17.1 Διαλογή των παραμέτρων (Screening of variables)**

Η απόκριση ενός συστήματος, επηρεάζεται από πληθώρα παραμέτρων, από τις οποίες κάθε μία επιδρά σε διαφορετικό βαθμό το μελετώμενο σύστημα. Επομένως κρίνεται απαραίτητος ο προσδιορισμός των παραμέτρων που επιδρούν σημαντικά στην απόκριση του συστήματος μέσα από πειράματα διαλογής-αξιολόγησης (screening experiments). Με αυτό τον τρόπο παράγοντες με μικρή (ή και μηδενική) επίδραση εξαιρούνται από τον μετέπειτα πειραματικό σχεδιασμό ενώ οι σημαντικοί μελετώνται εκτενώς.

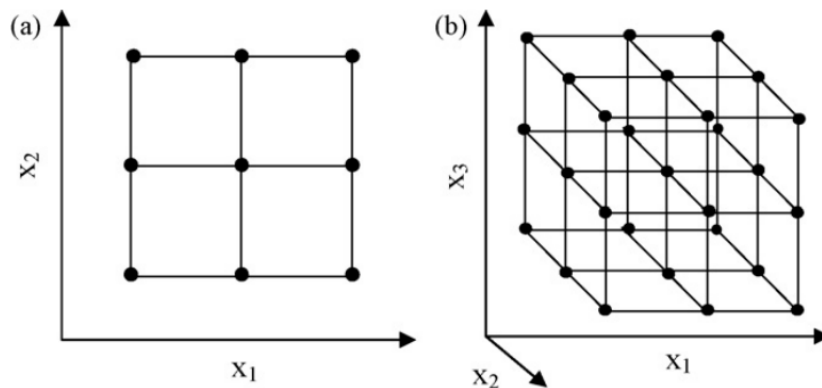
#### **5.17.2 Επιλογή πειραματικού σχεδιασμού**

Η επιλογή του κατάλληλου πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί καθοριστικό βήμα πριν την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφανειακής απόκρισης καθώς επηρεάζει την ακρίβεια της πρόβλεψης. Οι κύριοι χρησιμοποιούμενοι πειραματικοί σχεδιασμοί είναι ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα Διατριβή και ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (Central Composite design).

##### **5.17.2.1 Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design)**

Ένας CCD σχεδιασμός αποτελείται από ένα πλήρη ή κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό δύο επιπέδων με την προσθήκη αξονικών (axial) ή ακτινωτών (star) σημείων που απέχουν απόσταση  $\alpha$  από το κέντρο και τουλάχιστον ένα κεντρικό σημείο στο κέντρο της

πειραματικής περιοχής. Στο Σχήμα 5.23 απεικονίζεται ένα CCD για τη βελτιστοποίηση δυο και τριών παραμέτρων αντίστοιχα (Κοσμά Χ., 2013).



**Σχήμα 5.23:** Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός για τη βελτιστοποίηση (α) δύο παραγόντων και (β) τριών παραγόντων (Bezerra et al., 2008)

Ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται δίνεται από τη σχέση:  $N=2k+2K+C_0$ , όπου  $K$  είναι ο αριθμός των παραμέτρων και  $(C_0)$  ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κεντρικού σημείου. Όλες οι παράμετροι μελετώνται σε 5 επίπεδα  $(-α, -1, 0, +1, +α)$ . Στον Πίνακα 5.3 που ακολουθεί παρουσιάζεται ένας τυπικός κεντρικός σύνθετος πειραματικός σχεδιασμός δύο και τριών παραμέτρων. Τα πειράματα στον CCD κατανέμονται ως εξής:

- Πλήρως (κλασματικά)  $2^k$  παραγοντικά πειράματα, όπου τα επίπεδα των παραμέτρων έχουν κωδικοποιηθεί στις τιμές  $-1, +1$ . Τα πειραματικά σημεία αυτά συνεισφέρουν στην εκτίμηση των ορίων αλληλεπίδρασης.
- Τα αξονικά σημεία (axial ή star points) ισαπέχουν σε απόσταση  $\pm \alpha$  από το κέντρο του σχεδιασμού (με  $|\alpha| \geq 1$ ) καθιστώντας έτσι τους σχεδιασμούς αυτού του είδους περιστροφικούς. Τα αξονικά σημεία δεν συνεισφέρουν στην εκτίμηση των όρων αλληλεπίδρασης.
- Τα κεντρικά σημεία ( $C_0$ ), παρέχουν τη δυνατότητα εκτίμησης καθαρού σφάλματος και συνεισφέρουν στην εκτίμηση δευτεροβάθμιων όρων.

**Πίνακας 5.3:** Τυπικός κεντρικός σύνθετος πειραματικός σχεδιασμός Α) δύο και Β) τριών παραμέτρων με κωδικοποιημένες τιμές (Bezerra et al., 2008)

Α) Δύο παράμετροι			Β) Τρεις παράμετροι			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
Παραγοντικός Σχεδιασμός	-1	-1	Παραγοντικός Σχεδιασμός	-1	-1	-1
	1	-1		1	-1	-1
	-1	1		-1	1	-1
	1	1		1	1	-1
Αξονικά σημεία	-α	0	Αξονικά σημεία	-1	-1	1
	α	0		1	-1	1
	0	-α		-1	1	1
	0	α		1	1	1
Κεντρικό σημείο	0	0		-α	0	0
				α	0	0
				0	-α	0
				0	α	0
			0	0	-α	
			0	0	α	
		Κεντρικό σημείο	0	0	0	

### 5.17.2.2 Πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken (BBD)

Ένα τέτοιο πειραματικό σχέδιο μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταβλητών οι οποίες μπορεί να είναι γραμμικές (linear) ή τετραγωνικές (quadratic). Ο πειραματικός σχεδιασμός Box- Behnken (three level factor-quadratic design), χρησιμοποιεί τρία ή περισσότερα επίπεδα (levels) και εφαρμόζεται σε περιπτώσεις που μελετώνται τρεις ή περισσότεροι παράγοντες.

Δεν λαμβάνει υπόψη ακραία σημεία (extreme points) όπως συμβαίνει στον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (Central Composite Design, CCD). Η ειδική διάταξη των επιπέδων του BBD δίνει τη δυνατότητα αύξησης των σημείων του σχεδίου αναλογικά με τον αριθμό των πολυωνυμικών συντελεστών και απαιτεί  $2k(k-1) + C_0$  σημεία, όπου  $C_0$  ο αριθμός των κεντρικών σημείων.

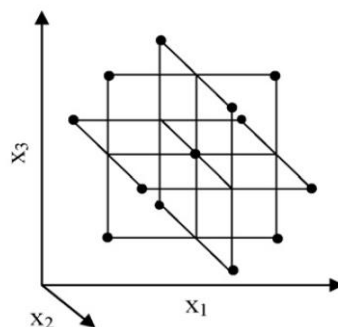
Ο πειραματικός σχεδιασμός BBD, στον χώρο αναπαρίσταται ως κύβος χωρίς να περιέχει στις κορυφές του σημεία με τις μέγιστες και ελάχιστες τιμές των παραμέτρων. Για παράδειγμα ένας πειραματικός σχεδιασμός BBD για τη βελτιστοποίηση τριών παραμέτρων

με τις κωδικοποιημένες τιμές  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  και τα 13 πειραματικά σημεία απεικονίζεται στο Σχήμα 5.24.

**Πίνακας 5.4:** Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken για Α) δύο και Β) τρεις παραμέτρους με κωδικοποιημένες τιμές (Bezerra et al., 2008)

Α) Δύο παράμετροι		Β) Τρεις παράμετροι		
$x_1$	$x_2$	$x_1$	$x_2$	$x_3$
-1	-1	-1	-1	0
-1	0	1	-1	0
-1	1	-1	1	0
0	-1	1	1	0
0	0	-1	0	-1
0	1	1	0	-1
1	-1	-1	0	1
1	0	1	0	1
1	1	0	-1	-1
		0	1	-1
		0	-1	1
		0	1	1
		0	0	0

Ο πειραματικός σχεδιασμός BBD σε σύγκριση με των 3 επιπέδων παραγοντικό σχεδιασμό (27 πειράματα) πλεονεκτεί καθώς είναι πιο οικονομικός και αποτελεσματικός. Ο πειραματικός σχεδιασμός BBD παρέχει αρκετά σημεία εντός του πεδίου τιμών των παραμέτρων, δεν παρέχει τιμές για τις ακραίες περιπτώσεις συνδυασμών αυτών. Είναι όμως εξαιρετικά αποτελεσματικός στις περιπτώσεις όπου η μη διεξαγωγή πειραμάτων στους ακραίους συνδυασμούς είναι επιθυμητή, λόγω ικανοποιητικής πρόβλεψης της τιμής της μεταβλητής απόκρισης στις τιμές αυτές. (Αντωνοπούλου Μ., 2013).



**Σχήμα 5.24:** Πειραματικός σχεδιασμός BBD για τρεις παράγοντες (Bezerra et al., 2008)



### 5.18 Προσαρμογή μαθηματικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα- Εκτίμηση μοντέλου

Το απλούστερο μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης, βασίζεται στην σχέση πρώτου βαθμού. Η εφαρμογή του προϋποθέτει την (Εξίσωση 5.5):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (\text{Εξίσωση 5.5})$$

Όπου,  $y$  είναι η απόκριση,  $k$  ο αριθμός των παραγόντων, μια σταθερά, οι συντελεστές των γραμμικών παραγόντων, οι ανεξάρτητες μεταβλητές και  $\varepsilon$  το σφάλμα των πειραμάτων.

Το μοντέλο πρώτου βαθμού συμπεριλαμβάνει μόνο τις κύριες επιδράσεις των μεταβλητών. Σε περίπτωση που κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών και της εκτίμησης της καμπυλότητας, η παραπάνω εξίσωση παίρνει τη μορφή:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 < i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Εξίσωση 5.6})$$

Όπου,  $\beta_{ij}$  οι συντελεστές των αλληλεπιδράσεων των μεταβλητών.

Για να προσδιοριστεί το κρίσιμο σημείο (critical point) (μέγιστο, ελάχιστο, σαγματικό), είναι απαραίτητο να περιλαμβάνονται δευτεροβάθμιοι όροι σύμφωνα με την εξίσωση:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i^2 + \sum_{1 < i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Εξίσωση 5.7})$$

Όπου  $\beta_{ij}$  οι συντελεστές των δευτεροβάθμιων όρων  $x_i^2$  (Bezerra et al., 2008; Sakkas et al., 2010 και Stalikas et al., 2009).

### 5.19 Μαθηματική - στατιστική επεξεργασία δεδομένων

Προκειμένου να περιγραφεί η συμπεριφορά της απόκρισης με βάση τα επίπεδα των μεταβλητών που μελετήθηκαν, είναι απαραίτητη η προσαρμογή μιας μαθηματικής εξίσωσης. Θα πρέπει δηλαδή, να γίνει εκτίμηση των συντελεστών των (Εξισώσεων 5.1-5.3), οι οποίες αναπαρίσταται ως εξής:

$$y_m X_i = X_m X_n b_{nX1} + e_{mX1} \quad (\text{Εξίσωση 5.8})$$

Όπου,  $y$  η διανυσματική απόκριση,  $X$  ο πίνακας του πειραματικού σχεδιασμού,  $b$  το διάνυσμα των παραμέτρων της εξίσωσης,  $e$  το σφάλμα και  $m$  και  $n$  ο αριθμός των γραμμών και των στηλών του πίνακα, αντίστοιχα (Bezerra et al., 2008).

Η εφαρμογή της Ανάλυσης Διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA), αποτελεί έναν αξιόπιστο τρόπο για την εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου (Karsi et al., 2019).

Για την εκτίμηση της καταλληλότητας του μοντέλου, χρησιμοποιούνται ο συντελεστής συσχέτισης ( $R^2$ ), ο διορθωμένος συντελεστής (adjusted  $R^2$ ), η έλλειψη προσαρμογής (lack of fit test) και η δοκιμή F και t μεταξύ άλλων (Karsi et al., 2019). Η συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των προβλεπόμενων αποκρίσεων μετρείται ποιοτικά με το τετράγωνο του συντελεστή προσδιορισμού ( $R^2$ ). Όταν η γραμμή παλινδρόμησης αντιστοιχεί τέλεια με τα δεδομένα τότε η τιμή του  $R^2$  ισούται με τη μονάδα. Ο προσαρμοσμένος συντελεστής προσδιορισμού (adjusted  $R^2$ ) αποτελεί τροποποίηση του  $R^2$  και είναι πάντα  $\leq R^2$ . Στην περίπτωση που στο μοντέλο έχουν συμπεριληφθεί μη σημαντικές παράμετροι, οι τιμές των δύο συντελεστών διαφέρουν σημαντικά.

Ο έλεγχος της έλλειψης προσαρμογής (lack of fit test) χρησιμοποιείται επίσης για την εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου. Όταν το μαθηματικό μοντέλο προσαρμόζεται στα πειραματικά δεδομένα, τότε ο μέσος όρος των τετραγώνων της έλλειψης προσαρμογής (MSlof) πρέπει να εκφράζει μόνο τα τυχαία σφάλματα. Επίσης, ο μέσος όρος των τετραγώνων του καθαρού σφάλματος (MSpe) αποτελεί εκτίμηση των τυχαίων σφαλμάτων και θεωρείται ότι οι δύο αυτές τιμές δε διαφέρουν στατιστικά.

Τέλος, η επεξεργασία των γραφικών παραστάσεων των υπολοίπων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την καταλληλότητα του μοντέλου. Έτσι, όταν το μαθηματικό μοντέλο είναι καλά προσαρμοσμένο τότε η γραφική παράσταση των υπολοίπων παρουσιάζει συμπεριφορά κανονικής κατανομής. Σε περίπτωση μεγάλου υπολείμματος, δεν μπορούν να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα για τα δεδομένα της πειραματικής περιοχής (Sakkas et al., 2010).

## 5.20 Προσδιορισμός βέλτιστων συνθηκών

Η συνάρτηση επιθυμίας (Desirability function) είναι μία τεχνική για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τιμών των μεταβλητών για τη βελτιστοποίηση μίας ή και περισσότερων αποκρίσεων).

Στην περίπτωση της ανάλυσης επιφανειών απόκρισης (response surface analysis) ή ανάλυσης ισομετρικών καμπύλων (contour curves analysis), τα πειραματικά σημεία είναι καταναμημένα έτσι ώστε να καλύπτουν την ευρύτερη δυνατή περιοχή μεταβολών των

ανεξάρτητων παραγόντων, προκειμένου: α) να δώσουν πληροφορίες σχετικά με το βέλτιστο προσαρμογής της επιφάνειας και β) να καθορίσουν τα επίπεδα των μελετώμενων παραγόντων που δίνουν το βέλτιστο εύρος απόκρισης.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, σε κάθε απόκριση ορίζεται μια μερική συνάρτηση επιθυμίας (partial desirability function), βάσει της οποίας υπολογίζεται η τιμή της ολικής συνάρτησης επιθυμίας. Εάν οι τιμές των αποκρίσεων είναι οι βέλτιστες, η τιμή της ολικής συνάρτησης επιθυμίας είναι ίση με 1 ενώ αν οι αποκρίσεις λαμβάνουν τιμές εκτός στόχου η συνάρτηση γίνεται μηδέν. Η ελαχιστοποίηση της Ευκλείδειας απόστασης μεταξύ των πειραματικά μετρούμενων και των θεωρητικά υπολογισμένων τιμών των αποκρίσεων, αποτελεί μια εναλλακτική μαθηματική μέθοδος βελτιστοποίησης (Αντωνοπούλου Μ., 2013).

### 5.21 Μελέτη επιβεβαίωσης (Confirmation study)

Το τελευταίο κύριο στάδιο της εφαρμογής της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης, αποτελεί η μελέτη επιβεβαίωσης. Διεξάγεται στις βέλτιστες συνθήκες και περιλαμβάνει σύγκριση των εξαγόμενων αποτελεσμάτων της μελέτης με τα προβλεπόμενα του μοντέλου. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων, υποδηλώνει αφενός την επάρκεια του μοντέλου να περιγράψει ικανοποιητικά το μελετώμενο σύστημα και αφετέρου, υποδεικνύεται η ανοχή του μοντέλου σε εξωτερικούς θορύβους και μεταβολές στα επίπεδα των παραμέτρων (Sakkas et al., 2010).



---

## ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

---



## B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις αποτελούν το σημαντικότερο εργαλείο για την αύξηση της αγροτικής παραγωγής, παρά τις ανησυχίες αναφορικά με την χρήση τους. Η ανάγκη ανάπτυξης ευαίσθητων, αξιόπιστων, οικονομικών και φιλικών προς το περιβάλλον αναλυτικών μεθόδων, για τον έλεγχο της υπολειμματικότητάς τους σε διάφορα περιβαλλοντικά υποστρώματα έχει γίνει ευρέως αντιληπτή διεθνώς.

Σε εθνικό επίπεδο, οι έρευνες που αφορούν τις επιπτώσεις σε παράκτιες περιοχές είναι περιορισμένες. Ακόμα λιγότερες είναι οι έρευνες που αφορούν περιοχές με έντονη δραστηριότητα υδατοκαλλιεργειών, που αποτελούν σημαντική εν δυνάμει πηγή θαλάσσιας ρύπανσης. Οι υπάρχουσες μελέτες στην πλειονότητά τους, πραγματεύονται κυρίως τα επιφανειακά και υπόγεια νερά.

Επιπρόσθετα, προκειμένου να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα για την ρύπανση ενός οικοσυστήματος είναι επιτακτική η ανάγκη ανάλυσης εκτός του νερού και άλλων υποστρωμάτων όπως τα ιζήματα και οι φυτικοί- ζωικοί οργανισμοί.

Τα τελευταία χρόνια γενικά παρατηρείται μία τάση αντικατάστασης των κλασικών μεθόδων όπως η υγρή- υγρή εκχύλιση και η υγρή-στερεή εκχύλιση με πιο σύγχρονες, στις οποίες το προσροφητικό υλικό είναι ένα ειδικά συντεθειμένο και καλά χαρακτηρισμένο μαγνητικό νανοσωματίδιο με ιδιαίτερα επιθυμητές ιδιότητες.

Αντικείμενο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αποτέλεσε η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση, η επικύρωση και η εφαρμογή αναλυτικών μεθοδολογιών με στόχο τον προσδιορισμό σύγχρονων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε νερά, ιζήματα, μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια-γοβιοί (*gobio-gobio*), αχινούς (*Paracentrotus lividus*) και στο υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna minor*.

Για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας συντέθηκαν νέα μαγνητικά υλικά σιδήρου ως προσροφητικά υλικά στην μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης. Αυτά χαρακτηρίστηκαν ως προς την δομή- μορφολογία και τις ιδιότητες, με τεχνικές NMR, FT- IR, TGA, SEM, DSC, XRD, ESI-MS και BET.

Επίσης η προτεινόμενη μέθοδος υδατικών δειγμάτων συγκρίθηκε με την κλασική υγρή στερεή εκχύλιση (SPE). Όσον αφορά τα δείγματα στερεών υποστρωμάτων εφαρμόστηκε η εκχύλιση QuEChERS αφού προηγουμένως βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε για κάθε ένα από αυτά.

Ταυτόχρονα, στην παρούσα Διατριβή εφαρμόστηκαν χημειομετρικές μέθοδοι ανάλυσης, κάνοντας χρήση πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken design, σε μια προσπάθεια βελτιστοποίηση των αναλυτικών παραμέτρων πριν από την εφαρμογής τους.

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των δύο μειγμάτων φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I & II), χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας Trace GC Ultra (Thermo Scientific, Austin, Texas, USA) συζευγμένο με ανιχνευτή μάζας ISQ και αυτόματο δειγματολήπτη AI/AS 3000 και σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής πίεσης (ultra-high pressure liquid chromatography, UHPLC) συζευγμένο με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (high-resolution-accurate-mass spectrometry, HRMS) και συγκεκριμένα με τον υβριδικό αναλυτή LTQ/Orbitrap MS. Η επικύρωση των μεθόδων πραγματοποιήθηκε βάσει της ισχύουσα νομοθεσία της ΕΕ, όπως αυτή ορίζεται στις οδηγίες 2002/657/ΕΚ.

Επιλέχθηκαν 12 φυτοπροστατευτικές ενώσεις με βάση τη συχνότητα χρήσης, την αποδεδειγμένη παρουσία τους στο περιβάλλον σύμφωνα με την πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία και την εν δυνάμει επικινδυνότητά τους για την τροφική αλυσίδα και τον άνθρωπο. Οι ενώσεις ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες και διαφοροποιούνται ως προς τη δομή, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και την περιβαλλοντική τους συμπεριφορά.

Βάσει των παραπάνω μεθοδολογιών, ερευνήθηκε η παρουσία των επιλεγμένων φυτοφαρμάκων στα υποστρώματα που προαναφέρθηκαν, στον υγρότοπο του Δέλτα των ποταμών Αξιού, Λουδία, Αλιάκμονα, έναν υδροβιότοπο μεγάλης έκτασης και εθνικής σημασίας, ο οποίος προστατεύεται από τις συνθήκες Ramsar και Βέρνης. Στόχο αποτέλεσε η καταγραφή σε τρεις χρονικές περιόδους της χωρικής κατανομής των συγκεντρώσεων κάθε ένωσης και των ποσοστών συμμετοχής των κατηγοριών αυτών ανά σημείο δειγματοληψίας.

Επιπλέον, στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού ερευνητικού έργου *“Real-time monitoring of sea contaminants by an autonomous Lab-on-a-chip biosensor”*, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των επιπέδων συγκέντρωσης για τις επιλεγμένες ενώσεις σε δείγματα νερού ιζημάτων και αχινών καλύπτοντας μεγάλο γεωγραφικό εύρος κοντά σε μονάδες υδατοκαλλιέργειών στην Ελλάδα, Αλβανία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, στην Νορβηγία και το Ηνωμένο Βασίλειο.

Τέλος έγινε εκτίμηση της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας (Environmental Risk Assessment) των ουσιών αυτών σε όλο το οικοσύστημα, για τρεις βιοκοινότητες (φυτοπλαγκτόν, ζωοπλαγκτόν και ψάρια) με τη χρήση του πηλίκου επικινδυνότητας (Risk Quotient).



---

## Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---



#### Α Επιλογή φυτοπροστατευτικών ενώσεων

##### 6.1 Εισαγωγή

Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν να μελετηθούν στα πλαίσια της παρούσας Διατριβής περιλαμβάνονται σε διεθνείς λίστες προτεραιότητας όπως π.χ. η λίστα ρύπων προτεραιότητας της ΕΕ (Sousa et al., 2018), η λίστα παρακολούθησης “watch list” (EU) 2015/495 της ΕΕ (European Commission, 2015) και η λίστα του οργανισμού προστασίας περιβάλλοντος των ΗΠΑ (US Environmental Protection Agency). Οι ενώσεις ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες και είναι οι: atrazine, ethoxyquine, chlorothalonil, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, methyl-parathion, resmethrin, λ-cyhalothrin, permethrin, irgarol, deltamethrin και azamethiphos.

Η επιλογή των φυτοπροστατευτικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε το έτος 2015 βάσει της συχνότητας χρήσης τους στις υδατοκαλλιέργειες όσο και της δυνατότητάς τους να καταλήξουν στο θαλάσσιο οικοσύστημα λόγω της έντονης χρήσης τους στην γεωργία. Οι ενώσεις αυτές καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δράσης σε όλη την Ελλάδα και στην Ευρώπη. Από τις επιλεγμένες ενώσεις οχτώ δρουν ως εντομοκτόνα, δύο ως ζιζανιοκτόνα και δύο ως μυκητοκτόνα. Δύο από τις ενώσεις το irgarol και το chlorothalonil δρουν ταυτόχρονα και σαν βιοκτόνα.

Η εκτεταμένη ανίχνευσή τους σε υδατικά συστήματα, η υπολειμματικότητά τους, η έλλειψη δεδομένων για την ανάλυση των συγκεκριμένων ενώσεων με σύγχρονες μεθόδους εκχύλισης και χρωματογραφικής ανάλυσης, οι τοξικές επιδράσεις της πλειονότητας των επιλεγμένων ρύπων στο οικοσύστημα και στην ανθρώπινη υγεία αποτέλεσαν έναυσμα για την μελέτη τους. Στοιχεία σχετικά με τις ιδιότητές τους, την τύχη τους στο περιβάλλον και την τοξικότητά τους παρουσιάζονται στη συνέχεια της Διατριβής. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των επιλεγμένων ρύπων συνοψίζονται στο Παράρτημα Ι.

### 6.1.1 Επιλεγμένα εντομοκτόνα

Το ευρείας χρήσης οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο *chlorpyrifos* είναι ένα από τα πλέον μελετημένα φυτοφάρμακα ως προς τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις του στο περιβάλλον και είναι από τις πρώτες ενώσεις που συμπεριλήφθηκαν στη λίστα με τους ρύπους προτεραιότητας της ΕΕ. Εντομοκτόνο, μη διασυστηματικό, επαφής και στομάχου, με δράση από το αναπνευστικό. Καταπολεμά μασητικά και μυζητικά έντομα αναστέλλοντας τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (acetylcholinesterase). Απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες. Εμφανίζει κάποια μετακίνηση μέσα στα φυτά. Καταπολεμά ευρύ φάσμα εντόμων, όπως μύγες, κουνούπια και άλλα έντομα χώρου κατοικίας, και έντομα φυλλώματος και εδάφους. Χρησιμοποιείται σε θερμοκήπια, καλλωπιστικά στο ύπαιθρο, φράουλες, σταυρανθή, λαχανικά, σιτηρά, οπωροφόρα, βαμβάκι και φυτά βόσκησης. Η χρήση του την Ευρωπαϊκή Ένωση υπόκειται σε περιορισμούς μέχρι τις 31 Ιανουαρίου του 2020. Πιθανότατα δεν θα ανανεωθεί έγκριση χρήσης, λόγω σοβαρών δυνητικών γονιδιακών επιδράσεων στα κύτταρα (DNA) και λόγω των βλαβών που μπορεί να προκαλέσει στην ανάπτυξη του εγκεφάλου στα έμβρυα και στα νήπια (EFSA, 2019).

Το *chlorpyrifos-methyl*, είναι εντομοκτόνο- ακαρεοκτόνο με ευρύ φάσμα χρήσεων. Δρα μέσω στομάχου και επαφής. Καταπολεμά έντομα και ακάρεα σε αποθηκευμένα σιτηρά, έντομα υγειονομικής σημασίας, έντομα φυλλώματος όπως αφίδες, κολεόπτερα, καρπόκαψα, φυλλοδέτες, οπλοκάμπες, ψύλλες, καθώς και τετράνυχους σε μηλιές αχλαδιές και δαμασκηνιές. Επίσης ακάρεα και έντομα σε φράουλες, κοκκοειδή στα εσπεριδοειδή, ευδαιμίδα στο αμπέλι και έντομα σταυρανθών. Η χρήση του στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπόκειται σε περιορισμούς όπως για το *chlorpyrifos* μέχρι τις 31 Ιανουαρίου του 2020 και πιθανότατα δεν θα ανανεωθεί έγκριση χρήσης λόγω σοβαρών δυνητικών γονιδιακών μεταλλάξεων και προβλημάτων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του εγκεφάλου στα άτομα νεαρής ηλικίας. (EFSA, 2019).

Το *azamethiphos* είναι ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο που δρα μπλοκάροντας το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, η οποία καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοχολίνης, ενός νευρομυϊκού μεταβιβαστή στα σπονδυλωτά και τα αρθρόποδα. Χρησιμοποιείται σαν παρασιτοκτόνο οικιακής χρήσης για τον έλεγχο μυγών και εντόμων. Επίσης χορηγείται μέσω της τροφής, στις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας για την καταπολέμηση του *chalinus*, της θαλάσσιας ψείρας του Ατλαντικού σολομού, καθώς και για τον έλεγχο εξωπαρασίτων.

Το *parathion-methyl* ανήκει στην κατηγορία των φαινυλο-παραγώγων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων, με ευρύτατη δράση. Χρησιμοποιήθηκε στη γεωργία ως αντικαταστάτης των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων και κυρίως του

DDT. Εμφανίζει μεγαλύτερη τοξική δράση στα σπονδυλωτά. Δρα μέσω επαφής, στομάχου καθώς και μέσω ατμών, αναστέλλοντας τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης, καταπολεμώντας μασητικά και μυζητικά έντομα. Εφαρμόζεται σε περισσότερα από 50 είδη καρπών, κυρίως σε βαμβακοκαλλιέργειες, καλλιέργειες σιτηρών, καλαμποκιού, ρυζιού, σπυροφόρων, καπνού, διακοσμητικών φυτών, φρούτων και λαχανικών. Από το 1978 χαρακτηρίζεται ως «περιορισμένης χρήσης παρασιτοκτόνο» “*Restricted Use Pesticide*” ακριβώς λόγω της υψηλής άμεσης τοξικότητας που εμφανίζει σε ανθρώπους και πουλιά. Στο έδαφος ή σε υδάτινους αποδέκτες διασπάται εντός λίγων μηνών, μέσω των διεργασιών φωτόλυσης και βιοαποικοδόμησης. Συνέπεια όλων των παραπάνω, ήταν η απαγόρευση χρήσης του στην Ευρωπαϊκή Ένωση σύμφωνα με την Οδηγία 2003/166/EK (European Commission, 2003).

Το εντομοκτόνο *resmethrin*, ανήκει στην κατηγορία των συνθετικών πυρεθροειδών. Παρουσιάζει μεγάλη χημική αστάθεια ως προς το φως και ως προς την παρουσία οξυγόνου, όπως και οι περισσότερες ενώσεις της κατηγορίας αυτής. Δρα ως εντομοκτόνο επαφής και στομάχου και χαρακτηρίζεται από ευρύ φάσμα χρήσης. Εφαρμόζεται σε υπαίθριες καλλιέργειες για την αντιμετώπιση φυλλοφάγων προνυμφών λεπιδόπτερων, υμενόπτερων και ορισμένων κολεόπτερων. Καταπολεμά δίπτερα, όπως μύγες, κουνούπια και άλλα έντομα υγειονομικής σημασίας (χώρου κατοικίας). Επίσης, χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον σε πληθυσμούς βλαβερών εντόμων, που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε ορανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα. Οι πυρεθρίνες και τα πυρεθροειδή είναι ενώσεις μέτριας τοξικότητας και κατατάσσονται στην κατηγορία τοξικότητας II, σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (Rehman et al., 2014 και WHO, 1989).

Παρόλο που η χρήση του είναι εγκεκριμένη, βρίσκεται σε λίστα παρακολούθησης καθώς μπορεί να προκαλέσει δυνητικώς σοβαρό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα στις μέλισσες (Utz pesticides watchlist, 2015).

Το εντομοκτόνο επαφής και στομάχου *deltamethrin*, ανήκει στην κατηγορία των συνθετικών πυρεθροειδών. Καταπολεμά ευρύ φάσμα εντόμων, όπως τον δάκο της ελιάς, ψύλλες σε μηλιά και αχλαδιά, αφίδες σε μηλιά και δαμασκηνιά, καρπόκαψα και φυλλοδέτες στη μηλιά, κάμπιες στα σταυρανθή. Επίσης καταπολεμά αφίδες, κοκκοειδή και αλευρώδη σε θερμοκήπια με αγγουριές, τομάτες, πιπεριές και καλλωπιστικά. Δρα στο νευρικό σύστημα των εντόμων και συγκεκριμένα στις διαύλους των ιόντων νατρίου στις προσυναπτικές μεμβράνες των νευρικών κυττάρων. Η εκτεταμένη χρήση του στις καλλιέργειες, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στο γεγονός ότι τα συνθετικά πυρεθροειδή παρουσιάζουν σχετικά χαμηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και στα θηλαστικά. Η χρήση του έχει απαγορευτεί στην Ευρωπαϊκή

ένωση σύμφωνα με την Οδηγία 2018/1262/ΕΚ, ενώ είχε έγκριση χρήσης μέχρι τον Οκτώβριο του 2018 (European Commission, 2018).

Το εντομοκτόνο *lamda-cyhalothrin*, αποτελεί έναν άλλον εκπρόσωπος της κατηγορίας των πυρεθροειδών. Είναι μη διασυστηματικό και δρα μέσω επαφής και στομάχου με προληπτική και κατασταλτική δράση, για την αντιμετώπιση μυζητικών καθώς και μασητικών εντόμων. Επηρεάζει το νευρικό σύστημα των εντόμων, παρεμποδίζοντας το κλείσιμο των διοδίων  $\text{Na}^+$  στους νευράξονες των νευρικών κυττάρων γεγονός που οδηγεί σε υπερδιέγερση, παράλυση και θάνατο των εντόμων. Εφαρμόζεται σε καλλιέργειας μηλιάς, αχλαδιάς, αμπελιού, ροδακινιάς, ελιάς και καλλιέργειες υπαίθρου και θερμοκηπίου (πατάτες, πιπεριά, μελιτζάνα κ.α). Καταπολεμά έντομα φυλλώματος όπως αφίδες, κολεόπτερα, καρπόκαψα, φυλλοδέτες, σπλοκάμπες, ψύλλες, καθώς και τετράνυχους φυλλορίκτες σε μηλιές αχλαδιές και δαμασκηνιές. Παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και στα θηλαστικά.

Ένα ακόμα εντομοκτόνο που ανήκει στην ευρεία κατηγορία των πυρεθροειδών είναι το *permethrin*. Δρα επηρεάζοντας το νευρικό σύστημα των εντόμων, οδηγώντας τα έντομα σε υπερδιέγερση, παράλυση και θάνατο. Εφαρμόζεται σε στάβλους, καλλωπιστικά φυτά, σε αποθηκευμένα τρόφιμα, ζωοτροφές καθώς επίσης και σε οικιακή χρήση. Σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις της κατηγορίας αυτής, παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερότητα στο φως και εντονότερη εντομοκτόνα δράση. Είναι πολύ αποτελεσματικό σε έντομα στόχους (όπως λεπιδόπτερα, δίπτερα και κολεόπτερα) και έχει ευρύ φάσμα δράσης. Όπως όλοι οι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας, έτσι και το *permethrin* παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και στα θηλαστικά και σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας κατατάσσεται στην κατηγορία μέτριας τοξικότητας II (WHO, 1989 και WHO, 1996). Η χρήση του έχει απαγορευτεί στην Ευρωπαϊκή ένωση από το 2000 σύμφωνα με την Οδηγία 2000/817/ΕΚ (European Commission, 2000b).

### 6.1.2 Επιλεγμένα ζιζανιοκτόνα

Το ζιζανιοκτόνο *atrazine*, ανήκει στην κατηγορία των τριαζινών. Εφαρμόζεται στις καλλιέργειες πριν τη σπορά ή μετά τη συγκομιδή είτε σε χώρους που δεν υπάρχουν καλλιέργειες για την καταστροφή των ζιζανίων. Είναι προφυτρωτικό και μεταφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο εδάφους με μεγάλη υπολειμματική διάρκεια στο έδαφος. Δρα ως ισχυρός παρεμποδιστής της φωτοσύνθεσης. Η ζιζανιοκτόνος δράση οφείλεται στο γεγονός ότι παρεμποδίζουν τη ροή των ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II των χλωροπλαστών με αποτέλεσμα να σταματά η φωτοσύνθεση του φυτού. Σε υδατικά διαλύματα, η ατραζίνη συμπεριφέρεται ως βάση και θεωρείται από τις πιο ανθεκτικές δραστικές ουσίες

φυτοφαρμάκων σε διεργασίες διάσπασης, όπως υδρόλυση, φωτόλυση και βιοδιάσπαση, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται στα εδάφη και στα επιφανειακά και υπόγεια νερά. Οι ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των τριαζινών είναι μέτριας τοξικότητας. Λειτουργεί σαν ενδοκρινικός διαταράκτης και ευθύνεται για καρκινογενέσεις. Στην Ευρώπη έχει απαγορευτεί η χρήση από το 2003 (Sass and Colangelo, 2006).

Το *irgarol*, εφαρμόζεται στις γεωργικές δραστηριότητες από το 1956 ως ζιζανιοκτόνο καθολικής δράσης (Κοτρίκλα, 2015). Ανήκει στη χημική κατηγορία των συμμετρικών τριαζινών που είναι γνωστές ως αναστολείς της φωτοσύνθεσης, όπως και το atrazine. Είναι η πλέον υδρόφοβη ένωση της οικογένειας των τριαζινών λόγω της tert-βουτυλομάδας και της κυκλο-προπυλομάδας (Konstantinou and Albanis, 2004). Επιπρόσθετα, το *irgarol* χρησιμοποιείται ως βιοκτόνο στα υφαλοχρώματα, για την καταπολέμηση επικαθίσεων των θαλάσσιων οργανισμών στις επιφάνειες των θαλάσσιων εγκαταστάσεων και πλοίων (Konstantinou and Albanis, 2004).

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι βρίσκεται συνήθως συχνότερα στην υδατική φάση παρά στο ίζημα (Sakkas et al., 2002 και Konstantinou and Albanis, 2004). Εμφανίζει μεγαλύτερη τοξικότητα στα φυτά από ότι στα ζώα.

### 6.1.3 Μυκητοκτόνα

Το *chlorothalonil* είναι μη συστηματικό μυκητοκτόνο ευρέως φάσματος και ανήκει στην κατηγορία των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων. Εκτός από τις καλλιέργειες, το *chlorothalonil* χρησιμοποιείται ως βιοκτόνο στα υφαλοχρώματα, τα οποία χρησιμοποιούνται στα πλοία, στις θαλάσσιες δεξαμενές πετρελαίου και στους κλωβούς των ιχθυοκαλλιεργειών για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων οργανισμών (Konstantinou and Albanis, 2004). Στις καλλιέργειες χρησιμοποιείται για την πρόληψη και την καταπολέμηση ασθενειών, που προέρχονται από μύκητες των ειδών *Alternaria*, *Septoria*, *Botrytis*, *Rhizosphaera* και *Cercospora*. Στην Ελλάδα χρησιμοποιείται ευρέως σε καλλιέργειες καπνού, αμπέλου, πατάτας, λαχανικών, ζαχαρότευτλων, εσπεριδοειδών, πυρηνόκαρπων σπυροφόρων δένδρων (ροδακινιά, βερικοκιά, δαμασκηνιά, κερασιά) και καλλωπιστικών φυτών. Παρουσιάζει χαμηλή οξεία τοξικότητα σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO, 1996). Η χρήση του έχει απαγορευτεί στην Ευρωπαϊκή ένωση σύμφωνα με την Οδηγία 2018/1262/ΕΚ, ενώ είχε έγκριση χρήσης μέχρι τον Οκτώβριο του 2018 (European Commission, 2018).

Το μυκητοκτόνο-ζιζανιοκτόνο *ethoxyquine* ανήκει στις κινολόνες. Η λειτουργία του βασίζεται στην ικανότητά του να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται κατά την

οξειδωση των λιπιδίων. Καταχωρήθηκε το 1965 ως γεωργικό φάρμακο με αντιοξειδωτική δράση για την αντιμετώπιση επιφανειακών κηλίδων-εγκαυμάτων κυρίως στα αχλάδια, κατά το μετασυλλεκτικό στάδιο και την αποθήκευσή τους. Σύμφωνα με την αμερικάνικη Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων FDA η χρήση του ethoxyquine είναι εγκεκριμένη στις ιχθυοκαλλιέργειες και σε κτηνοτροφικές μονάδες πουλερικών ως σταθεροποιητής ζωοτροφών. Παρουσιάζει χαμηλή έως μέτρια τοξικότητα με εξαίρεση τους υδρόβιους οργανισμούς όπου εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή οξεία τοξικότητα (EFSA, 2015) και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αποφεύγεται η έκθεση των υδροφόρων συστημάτων στο ethoxyquine και στους μεταβολίτες του. Η χρήση του ethoxyquine υπόκειται υπό περιορισμούς και πρόκειται να καταργηθεί στην Ευρώπη στις 31 Δεκεμβρίου του 2020 σύμφωνα με την Οδηγία 2017/962/EK (European Commission, 2017).



## Β. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΜΕΛΕΤΗΣ

### 6.2 Σημεία Δειγματοληψίας Ελλάδα

Η υπό μελέτη περιοχή, αναπτύσσεται κατά μήκος του δυτικού τμήματος του Θερμαϊκού Κόλπου. Διοικητικά υπάγεται στην Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας, στους Νομούς Θεσσαλονίκης, Ημαθίας και Πιερίας. Οι τρεις ποταμοί που διατρέχουν τη Μακεδονία και εκβάλλουν στον Θερμαϊκό Κόλπο είναι ο Αξιός, ο Λουδίας και ο Αλιάκμονας.

Η κύρια δραστηριότητα των κατοίκων της περιοχής είναι η γεωργία. Η ύπαρξη των ποταμών εξασφαλίζει την ευφορία σε μία από τις πιο μεγάλες και παραγωγικές πεδιάδες της χώρας, την πεδιάδα της Θεσσαλονίκης.

Τα είδη που καλλιεργούνται στην περιοχή είναι το βαμβάκι, το καλαμπόκι και η μηδική (τριφύλλι), ενώ το βασικό αγροτικό προϊόν είναι το ρύζι (παράγεται το 70-80% της συνολικής παραγωγής στην Ελλάδα). Η ρυζοκαλλιέργεια απαιτεί μια σημαντική ποσότητα αρδευτικού νερού με αποτέλεσμα υψηλά ποσά επιφανειακής απορροής, ειδικά κατά την άνοιξη που τα χωράφια του κάμπου της Θεσσαλονίκης μετατρέπονται σε απέραντους οριζώνες. Οι οριζώνες είναι σημαντικοί για την διατήρηση της πανίδας της περιοχής, καθώς λειτουργούν ως τεχνητοί εποχιακοί υγρότοποι. Σε πολλά σημεία της διαδρομής των ποταμών υπάρχουν μεγάλες κτηνοτροφικές μονάδες όπου τα ζώα διατρέφονται στις πλημμυρικές κοίτες και το Δέλτα των ποταμών.

#### 6.2.1 Αλιάκμων ποταμός

Ο ποταμός Αλιάκμων είναι ο μεγαλύτερος σε μήκος ποταμός της Ελλάδας. Πηγάζει από τα όρη Γράμμο και Βόιο και έπειτα από διαδρομή περίπου 350 χιλιομέτρων εκβάλλει στον Θερμαϊκό κόλπο, ΝΔ του ποταμού Λουδία. Διαρρέει τους νομούς Καστοριάς, Γρεβενών, Κοζάνης, Ημαθίας και Πιερίας και η λεκάνη απορροής ανέρχεται σε 8677 km<sup>2</sup>, με μέσο ρυθμό ροής 97m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> (Karanis et al., 2005). Στην πορεία του προς κατάντη δέχεται τα πλεονάσματα της λίμνης Καστοριάς και τα ύδατα των γύρω ποταμών που πηγάζουν από την οροσειρά της Πίνδου, από τους οποίους ο μεγαλύτερος είναι ο Βενέτικος. Στην λεκάνη της Κοζάνης σχηματίζει την τεχνητή λίμνη του φράγματος του Πολυφύτου.

Η περιοχή της Θεσσαλονίκης, υδρεύεται κυρίως από τον ποταμό Αλιάκμονα. Τα υδροηλεκτρικά φράγματα και οι τεχνητές λίμνες που έχουν δημιουργηθεί κατά μήκος του, έχουν μειώσει έντονα τόσο την ποσότητα των υδάτων όσο και των φερτών υλικών που καταλήγουν στη δελταϊκή περιοχή. Στον ποταμό Αλιάκμονα, εκβάλλει και η τάφρος 66 μήκους 35 km, η οποία σχεδιάστηκε για να δέχεται μέρος των νερών που προέρχονται από το αποστραγγιστικό δίκτυο της πρώην λίμνης Γιαννιτσών (Karanis et al., 2005).

Η παροχή του Αλιάκμονα εξαρτάται από τις ανάγκες της Δ.Ε.Η. που ελέγχει τα ανάντη φράγματα αλλά και από τις ανάγκες άρδευσης. Το καλοκαίρι η παροχή του ποταμού είναι σχεδόν μηδενική (εκτός αν εμφανιστούν έντονες βροχοπτώσεις), αφού το νερό που αποδεσμεύεται από το φράγμα των Ασωμάτων καλύπτει οριακά τις ανάγκες άρδευσης.

Τα κυριότερα καλλιεργούμενα είναι το βαμβάκι, καλαμπόκι, ρύζι, φρούτα (ροδάκινα, μήλα και αχλάδια), λαχανικά, ζαχαρότευτλα και τριφύλλι (Lambropoulou et al., 2015).

Όσον αφορά τον δευτερογενή τομέα, εμφανίζει ιδιαίτερη ανάπτυξη στη ΒΙΠΕΘ, βόρεια του Καλοχωρίου και στην περιοχή Ιωνίας, στις περιοχές των νομών Πέλλας και Ημαθίας (κονσερβοποιία φρούτων και βιομηχανία ζάχαρης).

Η ακριβής γεωγραφική θέση των σημείων δειγματοληψίας επί του Αλιάκμονα ποταμού, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1 και στο Σχήμα 6.1.

### 6.2.2 Λουδίας ποταμός

Ο Λουδίας με μήκος περίπου 35 km, είναι ο τρίτος μεγαλύτερος σε μήκος ποταμός που διασχίζει τη Μακεδονία. Ο μέσος ρυθμός ροής ανέρχεται σε  $20 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  (Karanis et al., 2005). Πηγάζει από τα όρη Βέρμιο και Πάικο και εκβάλλει στο Θερμαϊκό κόλπο, μεταξύ των εκβολών του Αξιού και του Αλιάκμονα χωρίς να σχηματίζει Δέλτα (Πίνακας 12.1 και Σχήμα 12.2). Χρησιμοποιείται για αρδευτικούς σκοπούς γεγονός που δικαιολογεί τα πολλά αρδευτικά κανάλια (Karanis et al., 2005). Η καλλιέργεια ρυζιού είναι η κύρια παραγωγή στην περιοχή και αγγίζει το 60 % της συνολικής εγχώριας παραγωγής με έκταση πάνω από 175.000 στρέμματα.

Στη λεκάνη Αξιού-Λουδία περίπου 300.000 στρέμ. καταλαμβάνουν σιτηρά, 223.000 στρέμ. βαμβάκι, 103.000 στρέμ. αραβόσιτος, 110.000 στρέμ. κτηνοτροφικά φυτά, 30.500 στρέμ. τεύτλα, 13.000 στρέμ. όσπρια, 38.000 στρέμ. λαχανικά, 12.000 στρέμ. αμπέλια και 70.000 στρέμ. δενδρώδεις καλλιέργειες (μήλα, ροδάκινα, αχλάδια κ.α.) (Lambropoulou et al., 2015).

Ο Λουδίας λειτουργεί κυρίως ως στραγγιστική τάφρος, στην οποία απορρέουν τα ύδατα τμήματος της πεδιάδας Θεσσαλονίκης και ειδικότερα του Ν.Δ τμήματος της λεκάνης Αξιού και τμήματος της λεκάνης του Αλιάκμονα.

Δέχεται τα νερά των πηγών Αραβησσού, Ελευθεροχωρίου και των υπολοίπων χειμάρρων της Ν.Α περιοχής του Πάικου όρους. Επίσης ενισχύεται μέσω των αρδευτικών έργων με τα νερά του Μογλενίτσα, του Εδεσσαίου και γενικά είναι αποδέκτης των στραγγιστικών καναλιών της αποξηραμένης λίμνης Γιαννιτσών. Εμφανίζει τη μέγιστη παροχή

του κατά τη θερινή περίοδο και συχνά παρατηρείται το φαινόμενο της διείσδυσης αλμυρού νερού στις εκβολές του.

Η ακριβής γεωγραφική θέση των σημείων δειγματοληψίας επί του Λουδία ποταμού, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1 και στο Σχήμα 6.2

### 6.2.3 Αξιός ποταμός

Ο Αξιός είναι ο μεγαλύτερος ποταμός που διασχίζει τη Μακεδονία και ο δεύτερος μεγαλύτερος ποταμός των Βαλκανίων (μετά τον Έβρο). Πηγάζει από το όρος Σαρ (αρχαίος Σκάρδος) μεταξύ Αλβανίας και Β. Μακεδονίας και αφού διασχίσει την κοιλάδα των Σκοπίων εκβάλλει στον Θερμαϊκό Κόλπο. Το μήκος του Αξιού ανέρχεται σε 380 km από τα οποία μόνο τα 76 km βρίσκονται σε Ελληνικό έδαφος.

Η λεκάνη απορροής του Αξιού, έχει συνολική έκταση 2515 km<sup>2</sup>, το πλάτος κυμαίνεται μεταξύ 50 και 600 m, ενώ το μέγιστο βάθος φτάνει τα 4 m. Ο μέσος ρυθμός ροής ανέρχεται σε 65m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup> (Karanis et al., 2005). Δέχεται τα ύδατα των ρεμάτων που πηγάζουν από το όρος Πάικο, τα ύδατα από αποστραγγιστικές τάφρους της ομώνυμης κοιλάδας του ποταμού και πλεονάσματα της λίμνης Δοϊράνης.

Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, η κοίτη του ποταμού μετατοπίστηκε με εγχειοβελτιωτικά έργα στη θέση που εκβάλλει σήμερα (δυτικά του Δήμου Χαλάστρας). Περιλαμβάνει συνολικά 13 φράγματα, εκ των οποίων μόνο το φράγμα της Ελεούσας βρίσκεται στην ελληνική επικράτεια.

Το δελταϊκό σύστημα, καταλαμβάνει μία έκταση 220.000 στρεμμάτων, σχηματίζοντας ένα μωσαϊκό από υφάλμυρες λιμνοθάλασσες, εκτεταμένους λασπότοπους, έλη αλμυρού και γλυκού νερού, αμμόλοφους, πλούσια βλάστηση και εκτεταμένες καλλιέργειες (βαμβάκι, καλαμπόκι, ρύζι, φρούτα) (Lambropoulou et al., 2015).

Η ευρύτερη περιοχή από το 1974 προστατεύεται από τη συνθήκη Ramsar και τη συνθήκη της Βέρνης, ενώ μία μεγάλη περιοχή του έχει ενταχθεί στο ευρωπαϊκό δίκτυο Natura 2000. Σύμφωνα με το άρθρο 4 της οδηγίας 79/409/ΕΟΚ χαρακτηρίστηκε ως περιοχή ειδικής προστασίας και εντάχθηκε στο κοινοτικό δίκτυο περιοχών οι οποίες προβλέπονται από τη οδηγία 92/43/ΕΟΚ για τη Διατήρηση των Φυσικών Οικοτόπων και της Άγριας Πανίδας και Χλωρίδας (European Commission, 1979 και European Commission, 1992). Αποτελεί καταφύγιο άγριας ζωής, σπανίων ειδών ορνιθοπανίδας και προστατεύεται ως Μεσογειακή Περιοχή με τη σύμβαση της Βαρκελώνης.

Όσον αφορά την εδαφική σύσταση, στην περιοχή του Άσπρου (Β.Α τεταρτημόριο της λεκάνης Αξιού) είναι αμμοπηλώδη, στην περιοχή Κουφαλίων (Β.Δ τεταρτημόριο της λεκάνης

Αξιού) είναι πηλώδη και αμμοπηλώδη, ενώ στις περιοχές Βραχιάς (Ανατολικού), Κυμίνων και Χαλάστρας (Ν. Μαλγάρων) που βρίσκονται στο Ν.Δ και Ν.Α τεταρτημόριο, αντίστοιχα τα εδάφη είναι πηλώδη. Η οργανική ουσία στα επιφανειακά 0-40 cm, βάθους δεν υπερέβαινε τα 4 % και στα βαθύτερα στρώματα ήταν μικρότερη από 1 %.

Πηγές ρύπανσης των υδάτων του ποταμού αποτελούν τα αστικά και βιομηχανικά λύματα (αν και επεξεργασμένα), τα στερεά απόβλητα, η γεωργική δραστηριότητα που αποτελεί μη σημειακή πηγή ρύπανσης καθώς και η κτηνοτροφία (αγελάδες, πρόβατα, χοίροι, βουβάλια).

Η ρύπανση του Αξιού προέρχεται κυρίως από υπολείμματα φυτοφαρμάκων, βιομηχανικών αποβλήτων και μικρές ποσότητες αστικών λυμάτων. Ο Αξιός είναι ένας διασυννοριακός ποταμός, του οποίου η σοβαρότερη πηγή ρύπανσης βρίσκεται εκτός συνόρων. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με μελέτες που έχουν λάβει χώρα στην περιοχή, στο Δέλτα καταλήγουν ανεξέλεγκτα τα αστικά λύματα της πόλης των Σκοπίων και άλλων περίπου 12 μικρότερων πόλεων.

Παραπόταμοι του Αξιού, εφοδιάζονται με υδάτινα σώματα από το Priler και τη Bitola (Μοναστήρι), τα οποία περιέχουν οξέα, ενώσεις χρωμίου και απόβλητα εγκαταστάσεων όπως βυρσοδεψεία, σφαγεία και χοιροστάσια (Tsavdaridis, 2013). Στο Veles υπάρχουν εργοστάσια μολύβδου, ψευδαργύρου και εργοστάσιο φωσφορικών λιπασμάτων για το οποίο έχουν καταγραφεί επανειλημμένες διαρροές υδροφθορικού οξέος, που φτάνει μέχρι και τον Θερμαϊκό Κόλπο (European Council, 2006).

Επιπρόσθετα, λόγω έντονης εκμετάλλευσης στα ανάντη με πλήθος φραγμάτων στη Β. Μακεδονία, παρατηρείται μία συνεχής μείωση των παροχών υδάτων. Αποκορύφωμα της μείωσης, με ουσιαστικά τον μηδενισμό, παρατηρείται την καλοκαιρινή περίοδο, γεγονός που προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στον υγρότοπο και φαινόμενα υφαλμύρωσης (Milovanovic, 2007).

Η ακριβής γεωγραφική θέση των σημείων δειγματοληψίας επί του Αξιού ποταμού, παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1 και στο Σχήμα 6.3.

#### 6.2.4 Θερμαϊκός κόλπος

Ο Θερμαϊκός κόλπος, ως περιοχή μεγάλης περιβαλλοντικής σημασίας προστατεύεται από τη Συνθήκη Ramsar και εντάσσεται στις περιοχές Ειδική Ζώνη Προστασίας (Special Protection Area, SPA) (Alexandridis και Zalidis; 2006). Χαρακτηρίστηκε «περιοχή ειδικής προστασίας» σύμφωνα με το άρθρο 4 της οδηγίας 79/409/ΕΟΚ και εντάχθηκε στο κοινοτικό δίκτυο περιοχών σύμφωνα με την οδηγία 92/43/ΕΟΚ για τη Διατήρηση των Φυσικών

Οικοτόπων καθώς και της Άγριας Πανίδας και Χλωρίδας (European Commission, 1979 και European Commission, 1992).

Στην περιοχή δραστηριοποιούνται οστρακοκαλλιέργειες τόσο μυδιών όσο και άλλων ειδών όπως κυδώνια, χάβαρα και γυαλιστερές, με ετήσια παραγωγή περίπου 30.000 τόνους (το 80 - 85% της ελληνικής παραγωγής) (ΣΕΘ, 2018). Το πιο ανεπτυγμένο είδος αλιείας είναι η παράκτια, η οποία ασκείται στη ζώνη περίπου 2 km από την ακτή. Οι ιδανικές συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή (μεγάλο μήκος ακτών και αβαθή νερά), ευνοούν την αλιεία και την εγκατάσταση υδατοκαλλιεργειών εκτατικού τύπου (350 πλωτές και 80 πασσαλωτές).

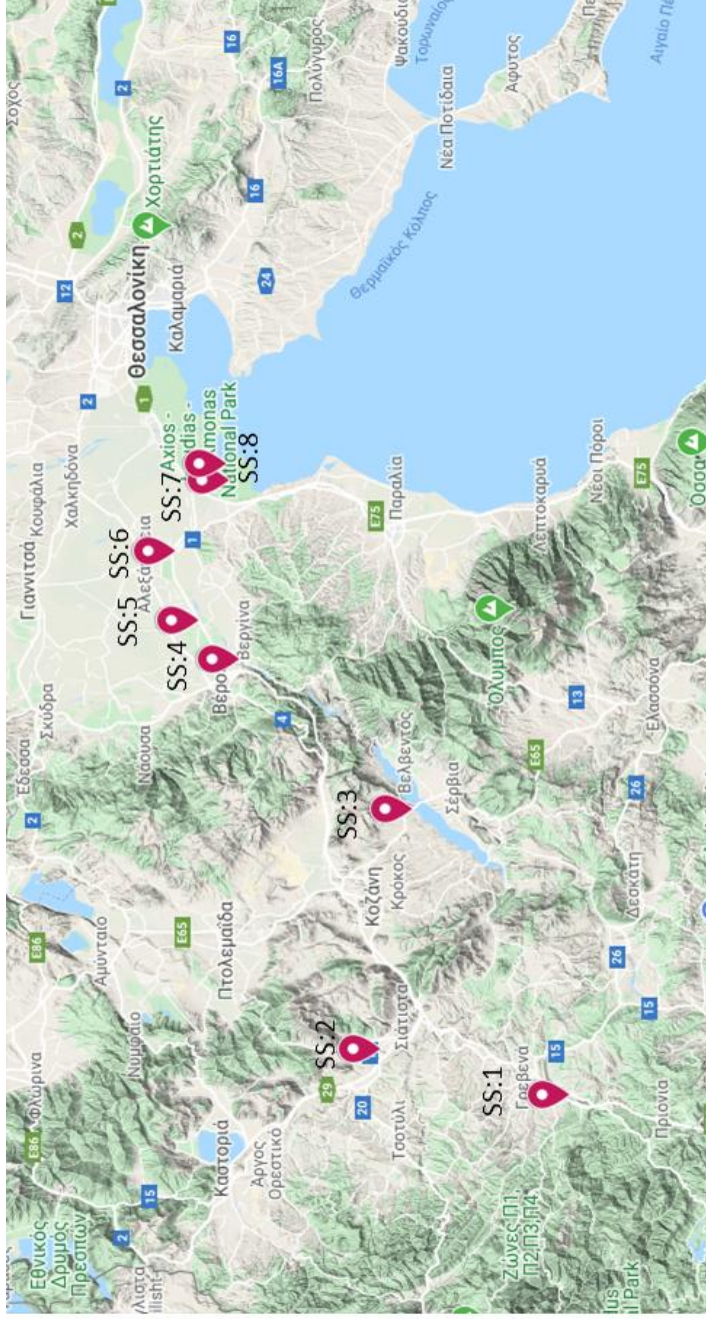
Η μυδοπαραγωγή είναι ομαδοποιημένη χωρικά σε τρία τμήματα: εκβολή Αξιού στα όρια του Δήμου Χαλάστρας, εκβολή Λουδία στα όρια του Δήμου Αξιού και δυτικά της εκβολής του Αλιάκμονα στις ακτές της Πιερίας. Η μυδοκαλλιέργεια έχει μεγάλη εξάρτηση από την παροχή γλυκού νερού των ποταμών Αξιού και Αλιάκμονα, που καθορίζουν το μέγεθος των μυδιών και τον ρυθμό αυτοκαθαρισμού της θαλάσσιας περιοχής όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.2.5.

Η συνολική ποσότητα γλυκού νερού που καταλήγει στον Θερμαϊκό κόλπο έχει μειωθεί κατά 50% των αυξημένων αναγκών για άρδευσης και των υδροηλεκτρικών φραγμάτων του Αλιάκμονα. Η παροχή του ποταμού είναι μεταβλητή και εξαρτάται από τη λειτουργία των Υδροηλεκτρικών Σταθμών Πολυφύτου, Ασωμάτων και Σφηκιάς. Η μέση παροχή του είναι 100 m<sup>3</sup>/s και η ελάχιστη 10m<sup>3</sup>/s. Επιπλέον στην πεδιάδα του Αξιού, ιδιαίτερα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της υφαλμύρωσης επηρεάζοντας την σύνθεση της χλωρίδας.

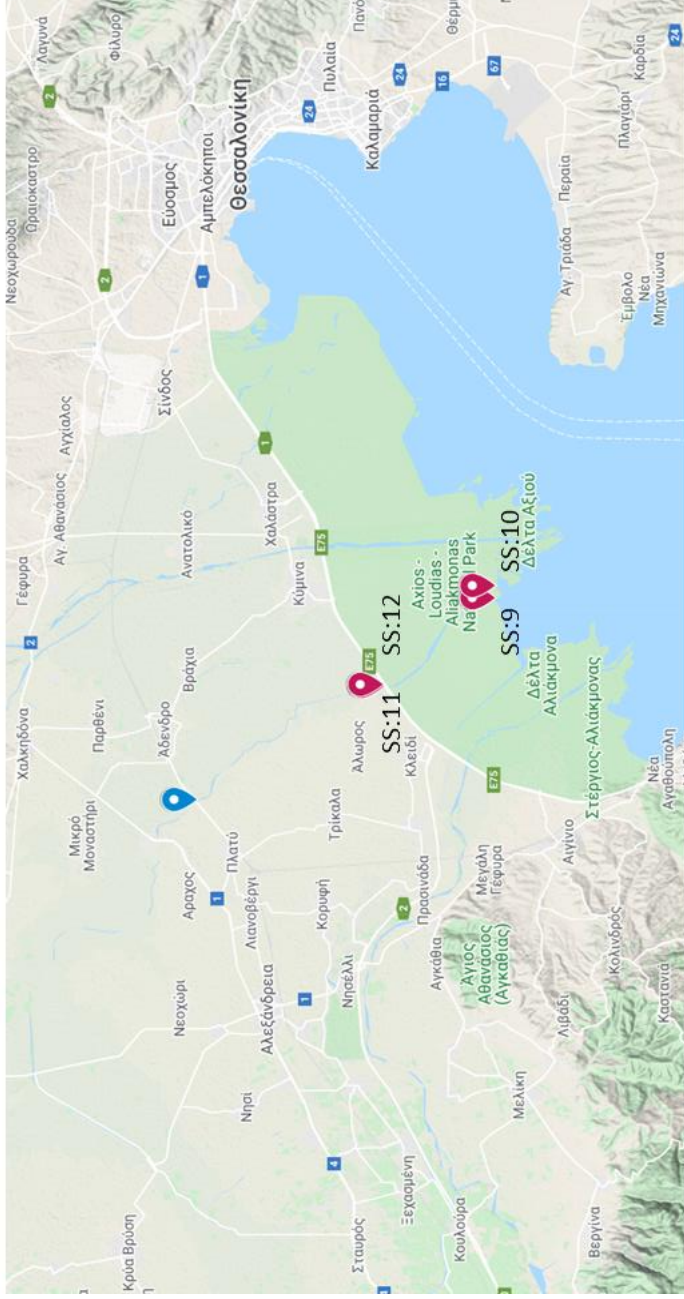
Πίνακας 6.1: Γεωγραφική θέση σημείων δειγματοληψίας

Κωδικός	Σημείο Δειγματοληψίας	Συντεταγμένες
<b>Αλιάκμονας</b>		
SS:1	Γέφυρα Κηπουρείου	40.01459, 21.39389
SS:2	Γέφυρα Καλονερίου	40.28835, 21.48365
SS:3	Φράγμα Πολυφύτου	40.24183, 21.96006
SS:4	Φράγμα Αγίας Βαρβάρας	40.49023, 22.25639
SS:5	Τάφος 66 (Κουλούρα)	40.54853, 22.33156
SS:6	Γέφυρα Αλεξάνδρειας-Αιγινίου	40.58276, 22.47077
SS:7	Εκβολές Αλιάκμονα	40.51129, 22.61509
SS:8	Τάφος Ευγενίδη-Στεργίου	40.50512, 22.60942
<b>Λουδίας</b>		
SS:9	Εκβολές Λουδία	40.52981, 22.68229
SS:10	Αντλιοστάσιο Ν.Μαλγάρων (Θεσ/κη)	40.52976, 22.68866
SS:11	Γέφυρα Λουδία (Κλειδί- Ν.Μαλγάρων)	40.57765, 22.63061
SS:12	Τάφος Αχλαδιάς (Ν.Μαλγάρων)	40.57778, 22.63172
<b>Αξιός</b>		
SS:13	Γέφυρα Πλατέος-Άδενδρο	40.65789, 22.56492
SS:14	Εκβολές Αξιού	40.52949, 22.69929
SS:15	Γέφυρα Βαλμάδας (Ανατολικό)- Βραχιάς	40.67531, 22.69364



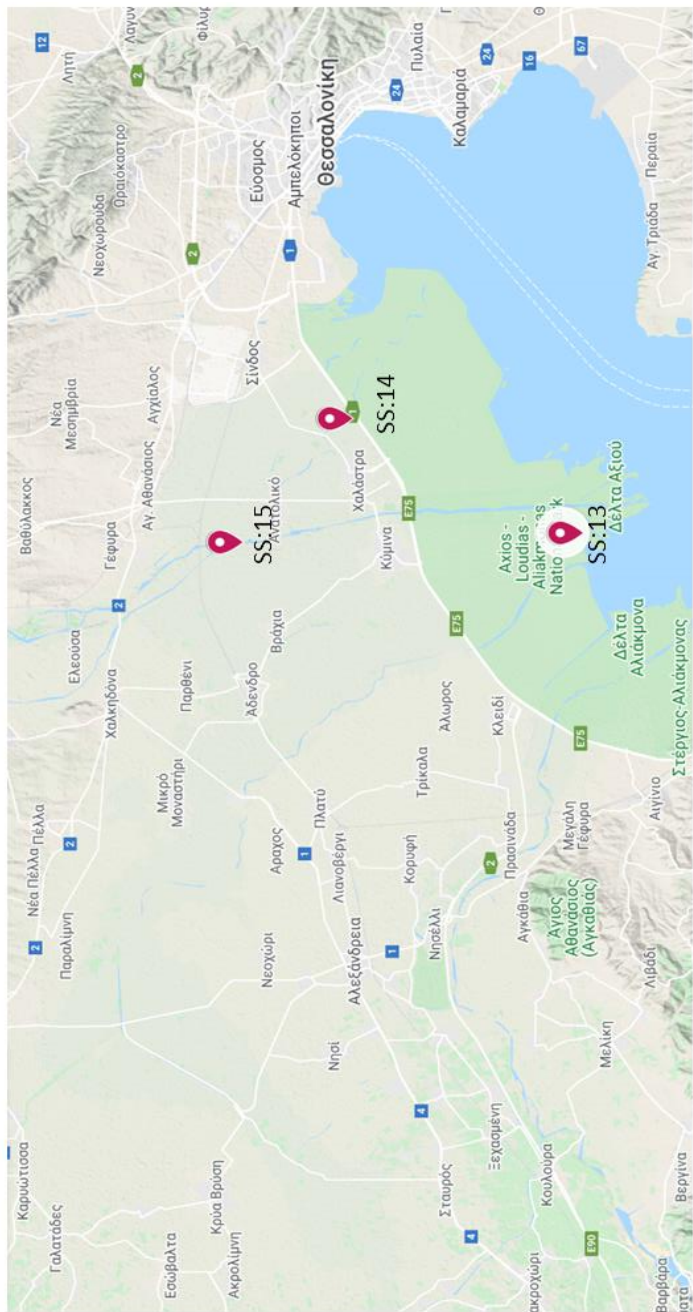


**Σχήμα 6.1.** Σημεία δειγματοληψίας κατά μήκος του ποταμού Αλιάκμονα



**Σχήμα 6.2:** Σημεία δειγματοληψίας κατά μήκος του ποταμού Λουδία





**Σχήμα 6.3:** Σημεία δειγματοληψίας κατά μήκος του ποταμού Αξιού

### 6.3 Μετεωρολογικά και Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά περιοχής

Το κλίμα της περιοχής χαρακτηρίζεται ως ηπειρωτικό μεσογειακό, λόγω του μεγάλου εύρους της ετήσιας διακύμανσης της θερμοκρασίας και των βροχοπτώσεων. Η μέση ελάχιστη θερμοκρασία (5° C), παρατηρείται τον Φεβρουάριο, ενώ η μέση μέγιστη τον Ιούλιο (25° C). Οι μέγιστες βροχοπτώσεις παρατηρούνται τον Ιανουάριο και τον Απρίλιο, ενώ οι ελάχιστες τον Ιούλιο και τον Αύγουστο, με μέσο ύψος έτους τα 400 mm. Οι άνεμοι που επικρατούν στην περιοχή είναι Β/ΒΔ καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου και κυρίως την χειμερινή περίοδο (Βαρδάρης) με ποσοστό εμφάνισης 35 %.

Στον Πίνακα 6.2 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα κλιματικά δεδομένα στην υπό μελέτη περιοχή (Κεντρική και Δυτική Μακεδονία) σύμφωνα με την Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία για το έτος 2018.

**Πίνακας 6.2:** Μηνιαία κλιματολογικά δεδομένα στην περιοχή μελέτης για το έτος 2018 (Πηγή:Ε.Μ.Υ)

Κεντρική Μακεδονία	Βροχόπτωση (mm)			Θερμοκρασία (°C)		
	Ημέρες βροχής	Μέση βροχόπτωση	Υγρασία %	Μέση θερμοκρασία	Ελάχιστη θερμοκρασία	Μέγιστη θερμοκρασία
Ιαν-18	11,8	36,8	76,1	5,2	1,3	9,3
Απρ-18	11,2	37,5	67,8	19,6	7,5	24,5
Σεπτ-18	5,9	27,4	62	21,8	14,9	27,2
Δυτική Μακεδονία	Βροχόπτωση (mm)			Θερμοκρασία (°C)		
	Ημέρες βροχής	Μέση βροχόπτωση	Υγρασία %	Μέση θερμοκρασία	Ελάχιστη θερμοκρασία	Μέγιστη θερμοκρασία
Ιαν-18	10,8	36,2	74,2	2,3	-1,2	6,1
Απρ-18	10,4	43,3	63,0	11,6	5,2	16
Σεπτ-18	6,2	31,7	57,0	19,3	12,5	25

Στον Πίνακα 6.3 δίνονται τα κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για κάθε δείγμα, ανά σημείο και ανά δειγματοληψία (θερμοκρασία, ολικά αιωρούμενα, αγωγιμότητα, αλατότητα). Για τα δείγματα νερού, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τη δειγματοληψία, στο πεδίο (on site).

**Πίνακας 6.3:** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για κάθε δείγμα, ανά σημείο και ανά δειγματοληψία

Σημείο Δειγματοληψίας	Ιανουάριος 2018						Απρίλιος 2018						Σεπτέμβριος 2018					
	Θερμ/σία		TDS	Αγωγιμότητα	Αλατότητα	Θερ/σία	Θερμ/σία		TDS	Αγωγιμότητα	Αλατότητα	Θερ/σία	Θερμ/σία		TDS	Αγωγιμότητα	Αλατότητα	
	(°C)	(μS/cm)	(%)	(°C)	(mg/L)	(%)	(°C)	(mg/L)	(%)	(°C)	(mg/L)	(%)	(°C)	(mg/L)	(%)	(°C)	(μS/cm)	(%)
<b>Αλιάκιμονας</b>																		
SS1: Γέφυρα Κηπουρείου	6,8	332	217	0,0	21,4	72	66,8	0,0	22,1	74	75,8	0,0	22,1	74	75,8	0,0	22,1	74
SS2: Γέφυρα Καλονερίου	7,5	3,68	242	0,0	20,0	63	56,9	0,0	20,0	99	100,5	0,0	20,0	99	100,5	0,0	20,0	99
SS3: Φράγμα Πολυφύτου	17,6	413	304	0,0	26,8	71	76,5	0,0	25,9	74	75,6	0,0	25,9	74	75,6	0,0	25,9	74
SS4: Φράγμα Αγ. Βαρβάρας	12,0	410	316	0,0	21,3	80	72,5	0,0	22,0	88	89,9	0,0	22,0	88	89,9	0,0	22,0	88
SS5: Τάφος 66 (Κουλούρα)	11,3	1168	895	0,4	21,7	97	91,7	0,0	23,6	106	108,1	0,0	23,6	106	108,1	0,0	23,6	106
SS6: Γέφυρα Αλεξάνδρειας-Αιγινίου	11,1	377	333	0,0	20,0	91	84,8	0,0	20,4	97	98,9	0,0	20,4	97	98,9	0,0	20,4	97
SS7: Εκβολές Αλιάκιμονα	11,3	1103	1663	1,0	29,1	1791	2150	0,8	28,3	1023	8800	4,9	28,3	1023	8800	4,9	28,3	1023
SS8: Τάφος Ευγενίδη-Στεργίου	14,1	1728	1403	0,7	26,4	85	84,5	0,0	26,3	96	98,2	0,0	26,3	96	98,2	0,0	26,3	96
<b>Λουδίας</b>																		
SS9: Εκβολές Λουδία	12	540	5080	3,6	27,5	899	966	0,2	28,6	460	3900	2,0	28,6	460	3900	2,0	28,6	460
SS10: Αντλιοστάσιο Ν. Μαλγάρων (Θεσσαλονική)	10,8	895	3930	2,8	27,7	285	309	0,0	28,1	241	245	0,0	28,1	241	245	0,0	28,1	241
SS11: Γέφυρα Λουδία (Κλειδί- Ν. Μαλγάρων)	12,1	152	458	0,0	28,0	100	171,4	0,0	28,1	123	126,3	0,0	28,1	123	126,3	0,0	28,1	123
SS12: Τάφος Αχλαδιάς Ν. Μαλγάρων	11,9	1148	895	0,0	28,2	237	251	0,0	28,8	225	231	0,0	28,8	225	231	0,0	28,8	225
<b>Αξίος</b>																		
SS13: Γέφυρα Πλατέος-Αδενδρο	12,1	150	1485	0,0	26,7	139	140	0,0	27,4	124	126,6	0,0	27,4	124	126,6	0,0	27,4	124
SS14: Εκβολές Αξίου	10,3	452	3,35	0,0	31,0	863	2760	1,1	30,0	956	6680	3,6	30,0	956	6680	3,6	30,0	956
SS15: Γέφυρα Βαλιμάδας-Βραχιάς (Ανατολικό)	8,6	313	228	0,0	25,0	78	78,6	0,0	26,0	96	97,1	0,0	26,0	96	97,1	0,0	26,0	96

TDS (total dissolved solids): Ολικά διαλυμένα στερεάς

#### 6.4 Σημεία δειγματοληψίας σε Ευρωπαϊκές μονάδες υδατοκαλλιέργειας

Στην παρούσα Διατριβή, πέραν των καλλιεργειών που αφορούν τον Θερμαϊκό κόλπο, μελετήθηκε και η ευρύτερη περιοχή της Θεσπρωτίας όπου δραστηριοποιούνται πολυάριθμες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας. Η Επομένως, προκειμένου να εκτιμηθούν οι πιέσεις που δέχεται η περιοχή, επιλέχθηκαν τρία αντιπροσωπευτικά σημεία δειγματοληψίας στην παράκτια ζώνη της (Ιόνιο Πέλαγος), εντός περιοχής που δραστηριοποιούνται οι μεγαλύτερες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας.

Επιπρόσθετα, στο πλαίσιο του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος “*Sea-on-a-chip*”, ορίστηκαν σημεία δειγματοληψίας σε περιοχές με έντονη ιχθυοκαλλιεργητική δραστηριότητα, για επτά ευρωπαϊκές. Βασικά κριτήρια για την επιλογή τους αποτέλεσαν η γεωγραφική θέση, τα εκτρεφόμενα είδη, το μέγεθος της μονάδας και κατ’ επέκταση η έκταση της πιθανής ρύπανσης.

Στη συνέχεια της Διατριβής γίνεται εκτενής περιγραφή των σημείων δειγματοληψίας (Πίνακας 6.4) και δίνονται οι συντεταγμένες τους, με εξαίρεση τις μονάδες που υπόκεινται σε συμφωνία τήρησης απορρήτου των σημείων (Πίνακας 6.5).

### 6.4.1 Λωρίδα Σαγιάδας

Προκειμένου να εκτιμηθούν οι περιβαλλοντικές πιέσεις που δέχεται η περιοχή της Σαγιάδας (Θεσπρωτία- Ιόνιο Πέλαγος), επιλέχθηκαν τρία σημεία δειγματοληψίας στην παράκτια ζώνη, εντός περιοχής όπου δραστηριοποιούνται οι μεγαλύτερες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας.

Η παράκτια ζώνη της Θεσπρωτίας συνεισφέρει αρκετά στην ετήσια ελληνική παραγωγή (18 %), ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό εξάγεται ετησίως στο εξωτερικό (Παράγραφος 1.9). Στο νομό Θεσπρωτίας δραστηριοποιούνται συνολικά 28 μονάδες παραγωγής και ένας ιχθυογεννητικός σταθμός, από τις οποίες οι 22 βρίσκονται στην περιοχή Λωρίδα Σαγιάδας και τις υπόλοιπες στα όρια του Δήμου Ηγουμενίτσας (ΣΕΘ, 2018).

Η σχετικά υψηλή θερμοκρασία του νερού και η απουσία έντονων καιρικών φαινομένων καθιστούν την περιοχή ιδανική για την εγκατάσταση υδατοκαλλιεργειών. Η ετήσια ιχθυοπαραγωγή αγγίζει τους 12.000 τόνους με κύρια εκτρεφόμενα είδη την τσιπούρα (*Sparus aurata*), το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), το φαγκρί (*Pagrus pagrus*), το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*) και τη συναγρίδα (*Dentex dentex*).

Η μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας και η γύρω περιοχή προστατεύεται από συμφωνία τήρησης απορρήτου, επομένως δεν παρέχονται συντεταγμένες ούτε περιγραφή της περιοχής.



Σχήμα 6.4: Παράκτια ζώνη Θεσπρωτίας-Λωρίδα Σαγιάδας

### 6.4.2 Αλβανία: Λιμνοθάλασσα Βουθρωτού

Η λιμνοθάλασσα Βουθρωτού (Butint) τοποθετείται γεωγραφικά στο νοτιοδυτικό άκρο της Αλβανίας, 8 km νότια των Αγίων Σαράντα (πληθ. 20.000). Ανήκει στην ευρύτερη περιοχή Vloja και συνδέεται με το Ιόνιο Πέλαγος μέσω του φυσικού καναλιού Βιβάρι. Το μέγιστο βάθος της αλμυρής λιμνοθάλασσας είναι 21,5 m ενώ η επιφάνεια της έχει έκταση 16 km<sup>2</sup>.

Το Βουθρωτό είναι ιδιαίτερα γνωστό για την ποικιλομορφία της χλωρίδας και της πανίδας. Το νότιο τμήμα της λίμνης βρίσκεται εντός των ορίων του Εθνικού Πάρκου Βουθρωτού που προστατεύεται από τη Σύμβαση Ramsar. Αποτελεί τον πυρήνα της περιοχής, με έκταση 1.600 εκτάρια και οριοθετείται γεωγραφικά μεταξύ του ποταμού Bistricta στα βόρεια, του όρους Μίλι στα δυτικά και του ποταμού Ravllo στα νότια (Unesdoc, 1997).

Η αλιεία και οι μυδοκαλλιέργειες αποτελούν σημαντική οικονομική δραστηριότητα για τον τοπικό πληθυσμό. Στο κανάλι Vinarçi είναι μόνιμα τοποθετημένη παγίδα ιχθύων που καλύπτει το 60 % των ετησίων αλιευμάτων στη λιμνοθάλασσα (570-1100 kg/έτος). Τα μύδια *Mytillus galloprovincialis* καλλιεργούνται επίσημα από το 1970 με ετήσια παραγωγή που φτάνει σήμερα τους 5000 τόνους/έτος. Όμως το 1990 επήλθε γενική πτώση της παραγωγής καθώς η Ευρωπαϊκή Ένωση επέβαλε γενική απαγόρευση εξαγωγών (Reja et al., 1996).



Σχήμα 6.5: Σημεία δειγματοληψίας στη λιμνοθάλασσα Βουθρωτό



### 6.4.3 Ισπανία: Ποταμός Ebro

Ο Ποταμός Ebro της Ισπανίας, είναι ο σημαντικότερος ποταμός της βορειοανατολικής Ιβηρικής χερσονήσου. Πηγάζει από την ορεινή περιοχή της Κανταβρίας και εκβάλλει στη Μεσόγειο, μετά από διαδρομή 928 km, με μέσο ρυθμό 426 m<sup>3</sup>/s. Σχηματίζει ένα δέλτα 300 km μέσα στη θάλασσα, εξασφαλίζοντας ένα πλούσιο υδροφόρο ορίζοντα στις περιοχές που διαρρέει αλλά και ένα υψηλό υδάτινο δυναμικό σε μια λεκάνη απορροής που η επιφάνειά της αγγίζει τα 85.550 km<sup>2</sup> (Csanccsara et al., 2016 και Roig et al., 2015).

Οι κύριες οικονομικές δραστηριότητες της περιοχής και κατ' επέκταση οι κύριες πηγές ρύπανσης είναι η γεωργία, οι υδατοκαλλιέργειες και πρόσφατα η βιομηχανία (Claver et al., 2006 και Csanccsara et al., 2016). Οι υδατοκαλλιέργειες που δραστηριοποιούνται στην περιοχή, θεωρούνται οι σημαντικότερες σε όλη την Ισπανική Μεσόγειο. Έχουν καταγραφεί 166 μονάδες εκτροφής μυδιών οι οποίες εκτείνονται σε σχεδίες στη διαπαλιρροιακή ζώνη και καλύπτουν συνολικά το 6,5 % της συνολικής επιφάνειας της παράκτιας ζώνης (Álvarez-Muñoz et al., 2015).

Αποτελεί μία αρκετά αρδευομένη περιοχή της Ισπανίας με έκταση πάνω από 90.6000 εκτάρια (Herrero-Hernández et al., 2013). Οι σημαντικότερες καλλιέργειες στην περιοχή αφορούν την καλλιέργεια ρυζιού (περίπου το 80% της καλλιεργήσιμης περιοχής), τα σπυροφόρα δέντρα και τα σταφύλια για την παραγωγή της ποικιλίας κρασιού La Rioja (Csanccsara et al., 2016). Εκτιμάται ότι η χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην περιοχή το 2010 ανήλθε σε 14.000 τόνους ενώ το 2011 σε 13.500 τόνους (Csanccsara et al., 2016).



Σχήμα 6.6: Σημεία δειγματοληψίας στις όχθες του ποταμού Ebro (Sant Carles de la Rápita)

#### 6.4.4 Πορτογαλία: Λιμνοθάλασσα Aveiro

Η λιμνοθάλασσα Aveiro, διαθέτει ένα μεγάλο εσωτερικό κόλπο (κόλπος Laranjo) και έχει έκταση περίπου 75 km<sup>2</sup> κατά την εαρινή παλίρροια και 66 km<sup>2</sup> κατά την άμπωτη. Οριοθετείται στην ακτή του Ατλαντικού νότια από το Espinho και βόρεια από τη Mira. Ο πληθυσμός του μεγαλύτερου ομώνυμου αστικού κέντρου ανέρχεται σε 25.0000 κατοίκους. Ανήκει στο δίκτυο Natura 2000 καθώς αποτελεί ένα σημαντικό βιότοπο για μεγάλο αριθμό πτηνών, ψαριών, καρκινοειδών και δίθυρων.

Η λιμνοθάλασσα συνδέεται με τον Ατλαντικό Ωκεανό μέσω ενός μικρού τεχνητού καναλιού μήκους περίπου 1,5 m και αποτελεί τον τελικό αποδέκτη γλυκών νερών καθώς αρκετοί ποταμοί και παραπόταμοι καταλήγουν σε αυτήν. Οι μεγαλύτεροι είναι οι ποταμοί Vouga και Antuã, με μέση ροή 50 και 5 m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>, αντίστοιχα (Martins et al., 2015). Λόγω του αβαθούς χαρακτήρα και τον κλιματικών συνθηκών στην περιοχή, τα τελευταία 20 χρόνια παρατηρείται έντονη ανάπτυξη υδατοκαλλιεργειών εντατικού, ημι-εντατικού και εκτατικού τύπου. Εκτός από τα μύδια, παράγονται και άλλα είδη όπως η σαρδέλα (*Sardina pilchardus*), ο τόνος (*Thunnus*), ο βακαλάος (*Gadus*) και το σκουμπρί (*Scomber scombrus*).

Η περιοχή γύρω από τη λιμνοθάλασσα είναι πυκνοκατοικημένη και η ταχύτατη ανάπτυξη τομέων όπως η γεωργία, η αλιεία και η βιομηχανία κατά τη διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα έχει επιφέρει μεγάλες περιβαλλοντικές πιέσεις στο παράκτιο περιβάλλον (Martins et al., 2015). Επιπρόσθετα, η λιμνοθάλασσα εφοδιάζεται μέσω των ρευμάτων που καταλήγουν σε αυτή, με βαρέα μέταλλα, βιομηχανικά απόβλητα και απορρίμματα από την περιοχή Estarreja.



Σχήμα 6.7: Σημεία δειγματοληψίας στη λιμνοθάλασσα Aveiro

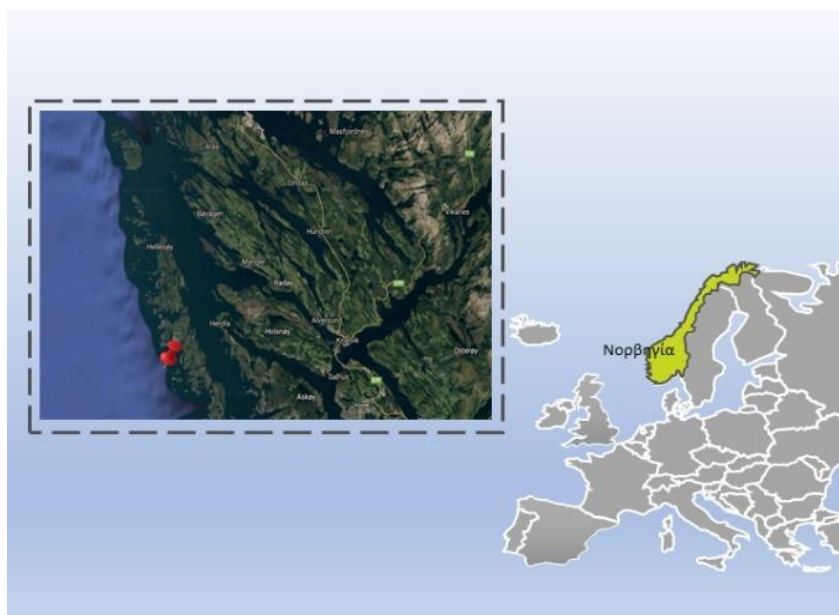


#### 6.4.5 Νορβηγία: Θαλάσσια περιοχή Rong

Τα επιλεγμένα σημεία δειγματοληψίας στη Νορβηγία, βρίσκονται στην περιοχή Rong, που καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του φιόρδ Rongøyna και αφορούν ιχθυοκαλλιέργειες και μονάδες εκτροφής οστρακοειδών.

Η ανάπτυξη της εμπορικής υδατοκαλλιέργειας στη Νορβηγία ξεκίνησε το 1970 και από τότε έχει εξελιχθεί στον σημαντικότερο οικονομικό κλάδο της παράκτιας περιοχής την Νορβηγίας. Η εντατική καλλιέργεια σολομού του Ατλαντικού αποτελεί την σημαντικότερη δραστηριότητα καθώς αντιπροσωπεύει το 80 % της συνολικής νορβηγικής παραγωγής (FAO, 2005). Ο σολομός εκτροφής αποτελεί σήμερα ένα από τα κύρια προϊόντα εξαγωγής. Περίπου το 95 % της νορβηγικής παραγωγής εξάγεται κυρίως στην ΕΕ αλλά και σε όλον τον κόσμο (FAO, 2005). Η παραγωγή το 2003 υπερέβη τους 600.000 τόνους αξίας 1.350.000.000 Δολαρίων. Επίσης εκτρέφονται και άλλα εμπορεύσιμα είδη ψαριών όπως η ιριδίζουσα πέστροφα, ο βακαλάος και η ιππόγλωσσα.

Ο σολομός και η ιριδίζουσα πέστροφα είναι αναδρομικά είδη, και έχουν δύο φάσεις στον κύκλο της ζωής (γλυκού και θαλασσινού νερού). Η εκκόλαψη και η παραγωγή πραγματοποιούνται σε χερσαίες δεξαμενές γλυκού νερού, ενώ η παραγωγή μέχρι το εμπορικά διαθέσιμο μέγεθος της πραγματοποιείται παράκτια σε θαλάσσιους κλωβούς (FAO, 2005). Εκτός από τα ψάρια, η περιοχή είναι αρκετά γνωστή για τις οστρακοκαλλιέργειες με κύριους εκπροσώπους το κυδώνι Ιαπωνίας (*T. semidecussata*), το χτένι Ατλαντικού (*Pecten maximus*), η μαρμαροαχιβάδα (*Tapes decussata*), το στρείδι Πορτογαλίας (*Crassostrea gigas*) και τέλος το κοινό στρείδι (*Ostrea edulis*) (FAO, 2005). Τις μονάδες της περιοχής συμπληρώνει η μονάδα παραγωγής και εμπορίας φυκιών.



Σχήμα 6.8: Σημεία δειγματοληψίας στη θαλάσσια περιοχή Rong-Νορβηγία

#### 6.4.6 Ηνωμένο Βασίλειο: Εκβολές ποταμού Exe

Το Ηνωμένο Βασίλειο αποτελεί τον τρίτο μεγαλύτερο παραγωγό ειδών υδατοκαλλιέργειας (μύδια, χτένια, καβούρια, θαλάσσιους κοχλίες και στρείδια) στην Ευρώπη, αρκετές από τις οποίες βρίσκονται στις εκβολές του ποταμού Exe (EMFF, 2016 και Exe-Plan, 2016).

Ο ποταμός Exe έχει συνολικό μήκος 97 km, βρίσκεται στο νότιο τμήμα του Ηνωμένου Βασιλείου και εκβάλλει στη νότια Αγγλική Μάγχη (ακτή του Devon), σε απόσταση 8,4 km από την ακτή του καναλιού του Bristol. Η ευρύτερη περιοχή προστατεύεται από τη συνθήκη Ramsar και θεωρείται Ειδική Ζώνη Προστασίας (Special Protection Area, SPA) καθώς φιλοξενεί μεγάλο αριθμό αποδημητικών υδροβίων πτηνών (Exe-Plan, 2016).

Η ρύπανση στις εκβολές του ποταμού Exe, σχετίζεται εκτός από την εντατική λειτουργία των υδατοκαλλιεργειών με τις αγροτικές δραστηριότητες, την αλιεία και την παράκτια δραστηριότητα. Στην περιοχή επίσης, έχουν λάβει χώρα έργα εκβάθυνσης με σκοπό την διατήρηση των επιθυμητών βαθών στις λιμενολεκάνες και τους υποβρύχιους διαύλους. Η διεργασία αυτή έχει σημαντικές περιβαλλοντικές επιδράσεις, καθώς διαταράσσει το θαλάσσιο και το παράκτιο περιβάλλον (EMFF, 2016).



**Σχήμα 6.9:** Σημεία δειγματοληψίας στη στις εκβολές του ποταμού Exe

#### 6.4.7 Ιταλία: Περιοχή Λιγυρίας και Sacca di Goro

Στην Ιταλία ορίστηκαν δύο σταθμοί δειγματοληψίας προκειμένου να διερευνηθούν οι περιβαλλοντικές πιέσεις σε περιοχές με έντονη ιχθυοκαλλιεργητική δραστηριότητα όπως η θάλασσα της Λιγυρίας (Βόρεια Τυρρηνική θάλασσα), αλλά και με οστρακοκαλλιεργητική δραστηριότητα όπως η λιμνοθάλασσα Sacca di Goro (Βόρεια Αδριατική Θάλασσα).

Πιο συγκεκριμένα, η Λιγυρία είναι μια βαθιά λεκάνη που τοποθετείται γεωγραφικά μεταξύ της Ιταλική Ριβιέρα (ακτές Τοσκάνης) και των νήσων Κορσικής και Έλβας (Β.Δ Μεσογείου). Η μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας και η γύρω περιοχή προστατεύεται από συμφωνία τήρησης απορρήτου, επομένως δεν παρέχονται συντεταγμένες ούτε περιγραφή της γεωγραφικής περιοχής. Η μέση θερμοκρασίας ποικίλει από 12 °C το χειμώνα και 25 °C το καλοκαίρι.

Η μονάδα μελέτης, αποτελείται από κλωβούς συνολικής επιφάνειας 26.000 m<sup>2</sup> και βάθους 40 m σε απόσταση 2 km περίπου από την ακτογραμμή. Τα κύρια εκτρεφόμενα είδη είναι το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus).

Οι ακτές της Λιγυρίας χαρακτηρίζονται από έντονη αστική και βιομηχανική ανάπτυξη, γεγονός που τις τροφοδοτεί με απόβλητα και απορρίμματα. Πρόκειται για μία περιοχή με έντονη λιμενική δραστηριότητα καθώς εκτός από τουριστικό θέρετρο με πολλές μαρίνες για σκάφη αναψυχής, αποτελεί και σημαντικό εμπορικό κέντρο.

Η τριγωνική λιμνοθάλασσα Sacca di Goro, βρίσκεται στην Βόρεια Ιταλία έχει επιφάνεια 26 Km<sup>2</sup> και μέσο βάθος 1,5 m (Viarelli et al., 2005). Συνδέεται με την Αδριατική θάλασσα μέσω δύο αμμωδών εκβολών μήκους 1 km. Την κύρια εισροή γλυκού νερού αποτελεί ο ποταμός Po (Πάδος) με ροή περίπου 350.106 m<sup>3</sup>/έτος. Θεωρείται Ειδική Ζώνη Προστασίας (Special Protection Area, SPA) και προστατεύεται από κοινοτικές οδηγίες της ΕΕ (Viarelli et al., 2005).

Η κύρια οικονομική δραστηριότητα των κατοίκων της περιοχής αποτελεί η υδατοκαλλιέργεια η οποία ευνοείται από την μορφολογία της περιοχής (προστατευμένη και ρηχή) και από την υψηλή θερμοκρασία, χαμηλή αλατότητα, τον επίπεδο πυθμένα και την χαμηλή ανανέωση του νερού (2-4 ημέρες) (Viarelli et al., 2005, και Vincenzi et al., 2006). Κύρια εκτρεφόμενα είδη αποτελούν το μεσογειακό μύδι (*Mytilus galloprovincialis*), το στρείδι Πορτογαλίας (*Crassostrea gigas*) και το κυδώνι της Ιαπωνίας (*Venerupis philippinarum*) με ετήσια παραγωγή που ξεπερνάει τους 15.000 τόνους (Viarelli et al., 2005).

Το μεγαλύτερο μέρος της χερσαίας περιοχής χρησιμοποιείται για γεωργικούς σκοπούς και συγκεκριμένα καλλιέργειες όπως οπωροφόρων δέντρων, ζαχαρότευτλων, αραβόσιτων, ρυζιού και λαχανικών. Άλλες εν δυνάμει πηγές ρύπανσης της περιοχής αποτελούν η οικιστική

ανάπτυξη της περιοχής, η κτηνοτροφία, η βιομηχανία, η αλιεία και η λιμενική δραστηριότητα.



**Σχήμα 6.10:** Σημεία δειγματοληψίας στη λιμνοθάλασσα Sacca di Goro

**Πίνακας 6.4:** Γεωγραφική θέση σημείων δειγματοληψίας υδατοκαλλιέργειών σε Ελλάδα, Αλβανία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Ην. Βασίλειο και Νορβηγία

Κωδικός	Σημείο Δειγματοληψίας	Συντεταγμένες
GR 1	Ελλάδα, Λωρίδα Σαγιάδας, εκτός ιχθυοκαλλιέργειας	απόρρητο*
GR 2	Ελλάδα, Λωρίδα Σαγιάδας, εντός ιχθυοκαλλιέργειας	απόρρητο*
GR 3	Ελλάδα, Λωρίδα Σαγιάδας, όρια ιχθυοκαλλιέργειας	απόρρητο*
AL 4	Αλβανία, Butrint, εκτός υδατοκαλλιέργειας	39°45'18.71"N, 20°02'27.72"E
AL 5	Αλβανία, Butrint, εντός υδατοκαλλιέργειας	39°45'17.26"N, 20°02'08.59"E
AL 6	Αλβανία, Butrint, όρια υδατοκαλλιέργειας	39°45'22.74"N, 20°02'02.08"E
IT 7	Ιταλία, Sacca di Goro, εκτός υδατοκαλλιέργειας	44°47'43.25"N, 12°17'40.72"E
IT 8	Ιταλία, Sacca di Goro, εντός υδατοκαλλιέργειας	44°47'47.99"N, 12°19'22.32"E
IT 9	Ιταλία, Sacca di Goro, όρια υδατοκαλλιέργειας	44°48'45.64"N, 12°18'40.08"E
IT 10	Ιταλία, θάλασσα Λιγυρίας, εκτός υδατοκαλλιέργειας	απόρρητο*
IT 11	Ιταλία, θάλασσα Λιγυρίας, εντός υδατοκαλλιέργειας	απόρρητο*
IT 12	Ιταλία, θάλασσα Λιγυρίας, όρια υδατοκαλλιέργειας	απόρρητο*
SP 13	Ισπανία, εκβολές Ebgo, εκτός υδατοκαλλιέργειας	40°37'18.5"N, 0°36'32.8"E
SP 14	Ισπανία, εκβολές Ebgo, εντός υδατοκαλλιέργειας	40°37'16.4"N, 0°37'18.6"E
SP 15	Ισπανία, εκβολές Ebgo, όρια υδατοκαλλιέργειας	40°37'31.8"N, 0°39'26.9"E
P 16	Πορτογαλία, λιμνοθάλασσα Aveiro, εκτός υδατ/ας.	40°38'40.5"N, 8°43'59.3"W
P 17	Πορτογαλία, Aveiro λιμνοθάλασσα, εντός υδατ/ας.	40°38'37.0"N, 8°43'55.8"W
P 18	Πορτογαλία, Aveiro λιμνοθάλασσα, όρια υδατ/ας.	40°38'22.1"N, 8°43'46.0"W
UK 19	Ην. Βασίλειο, εκβολές Exe, εκτός υδατοκαλλιέργειας	50°36'45.29"N, 3°25'45.39"W
UK 20	Ην. Βασίλειο, εκβολές Exe, εντός υδατοκαλλιέργειας	50°36'38.63"N, 3°25'57.85"W
UK 21	Ην. Βασίλειο, εκβολές Exe, όρια υδατοκαλλιέργειας	50°37'46.74"N, 3°26'52.19"W
NO 22	Νορβηγία, περιοχή Rong, εκτός ιχθυοκαλλιέργειας	60°30'43.9"N, 4°55'48.4"E
NO 23	Νορβηγία, περιοχή Rong, εντός ιχθυοκαλλιέργειας	60°30'58.9"N, 4°55'30.0"E
NO 24	Νορβηγία, περιοχή Rong, όρια ιχθυοκαλλιέργειας	60°31'15.5"N, 4°55'08.0"E
NO 25	Νορβηγία, περιοχή Rong, εκτός υδατοκαλλιέργειας	60°31'03.7"N, 4°54'15.7"E
NO 26	Νορβηγία, περιοχή Rong, εντός υδατοκαλλιέργειας	60°31'02.8"N, 4°53'59.5"E
NO 27	Νορβηγία, περιοχή Rong, όρια υδατοκαλλιέργειας	60°30'59.0"N, 4°53'31.0"E

Πίνακας 6.5: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά δειγμάτων υδατοκαλλιέργειας (Απρίλιος 2016)

Κωδικός	Θερμοκρασία (°C)	Αγωγιμότητα (mS/cm)	Αλατότητα (‰)	pH
GR 1	23,5	30150	38,3	8,21
GR 2	22,3	31000	37,2	8,29
GR 3	22,8	30100	38,1	8,19
AL 4	24,5	31200	27,0	8,13
AL 5	23,8	31800	26,2	8,28
AL 6	23,6	31650	25,4	8,27
IT 7	19,9	38800	22,0	8,03
IT 8	20,9	33100	23,2	8,08
IT 9	21,7	29000	20,4	8,07
IT 10	22,5	55700	39,3	7,86
IT 11	22,3	53700	38,2	7,94
IT 12	21,7	53000	39,1	7,91
SP 13	26,9	48890	29,2	8,19
SP 14	25,8	32805	30,2	8,21
SP 15	27,7	48108	30,0	8,29
P 16	17,1	52815	32,5	8,19
P 17	17,8	48304	29,8	8,21
P 18	18,2	48272	28,9	8,29
UK 19	16,1	35006	27,2	8,19
UK 20	16,3	34477	26,6	8,21
UK 21	18,2	36289	26,8	8,29
NO 22	9,4	32300	31,0	*
NO 23	9,4	32180	31,0	*
NO 24	9,4	32100	31,0	*
NO 25	9,0	32200	32,0	*
NO 26	9,0	32000	32,0	*
NO 27	9,0	32150	32,0	*

\*Μη διαθέσιμη πληροφορία

## **A Υλικά και Ενόργανες διατάξεις**

### **7.1. Πρότυπες Ενώσεις- διαλύματα αυτών**

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που μελετώνται στην παρούσα Διατριβή είναι οι atrazine, ethoxyquine, chlorothalonil, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, parathion-methyl, resmethrin, λ-cyhalothrin, permethrin, irgarol, deltamethrin και azamethiphos. Οι πρότυπες ουσίες των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ήταν υψηλής καθαρότητας (>98%) και προμηθεύτηκαν σε στερεά μορφή από την εταιρία Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany).

Για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση, παρασκευάστηκαν μεμονωμένα πρότυπα διαλύματα, συγκέντρωσης 2000 mg/L (διαλύματα παρακαταθήκης, stock solutions). Η παρασκευή τους πραγματοποιήθηκε σε γυάλινη ογκομετρική φιάλη των 10 mL και στην περίπτωση των πυρεθροειδών χρησιμοποιήθηκαν σκουρόχρωμες ογκομετρικές φιάλες λόγω της έλλειψης σταθερότητας στο φως. Με την χρήση αναλυτικού ζυγού ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων KERN ACS 80-4N (Balingen, Germany), ζυγίστηκαν 20 mg από την κάθε ένωση (σε θερμοκρασία 20°C). Προστέθηκε εξάνιο για τις ενώσεις που αναλύθηκαν στο σύστημα GC-MS (μείγμα I) και μεθανόλη καθαρότητας LC-MS για τις ενώσεις που αναλύθηκαν στο σύστημα LC-LTQ/Orbitrap MS (μείγμα II) μέχρι τη χαραγή.

Για τους προσδιορισμούς με αέρια χρωματογραφία ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε η ένωση trifluralin Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), CAS Number 1582-09-8. Για τις αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας το metobromuron λαμβανόμενο από τη Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 1g, CAS Number 3060-89-7, αποτέλεσε το εσωτερικό πρότυπο για τις ενώσεις deltamethrin και azamethiphos, ενώ για το Irgarol ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο Irgarol-d9 της εταιρείας Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany), 1g, CAS Number 28159-98-0.



Η ομογενοποίηση όλων των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε συσκευές περιδίνησης και υπερήχων και τα διαλύματα ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητά τους με την καταγραφή του φάσματος μάζας.

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων εργασίας (working solutions) και των μειγμάτων I και II, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινες μικροσύριγγες όγκου 5  $\mu\text{L}$  έως 1000  $\mu\text{L}$ , της εταιρίας Innovative Labor Systeme (Stützerbach, Germany). Αντίθετα, τα διαλύματα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν με αραιώσεις του κάθε υποστρώματος και όχι με οργανικό διαλύτη (matrix-matched standards). Τέλος, όλα τα πρότυπα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα αεροστεγώς κλεισμένα και σκουρόχρωμα φιαλίδια των 8 mL και αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 7.2 Διαλύτες

Το τολουόλιο (toluene) και η αιθανόλη (Ethanol) υψηλής καθαρότητας καθώς επίσης και το εξάνιο (*n*-hexane), προμηθεύτηκαν από την Lab-Scan (Dublin, Ireland). Οι διαλύτες: μεθανόλη (methanol, MeOH), οξείκος αιθυλεστέρας (ethyl acetate) και ακετονιτρίλιο (acetonitrile, ACN) αναλυτικού βαθμού και το διχλωρομεθάνιο (methyl chloride, DCM) καθαρότητας  $>99,5\%$  προμηθεύτηκαν από τη Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Η ακετόνη (acetone) καθαρότητας  $>99,5\%$  και ο διαιθυλεθαίρας (diethyl ether) ήταν του οίκου Honeywell (Morris Plains, NJ, USA). Το διμέθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide) καθαρότητας  $>99,9\%$  προμηθεύτηκε από την Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), ενώ το χλωροφόρμιο (chloroform) από τον οίκο Merck (Darmstadt, Germany). Για την λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκαν οι διευτεριωμένοι διαλύτες χλωροφόρμιο (chloroform) και διμέθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide) (Andover, MA, USA).

Η παροχή του νερού καθαρότητας LC-MS που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του εκλουστικού συστήματος της χρωματογραφικής διάταξης, προμηθεύτηκε από τον οίκο Fisher Scientific. Σε όλα τα υπόλοιπα στάδια, χρησιμοποιήθηκε υπερ-κάθαρο νερό (ultra-pure water) αγωγιμότητας  $<0,055\ \mu\text{S}/\text{cm}$ , παραγόμενο από την συσκευή Evoqua Ultrapure Water System Ultra Clear 20 TWF EDI (Evoqua Water Technologies, Pittsburgh, USA).

## 7.3 Αντιδραστήρια και προσροφητικά

Για την σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων χρησιμοποιήθηκε χλωριούχος σίδηρος ( $\text{FeCl}_3$ ) της εταιρίας Fluka (Milwaukee, WI, USA) και ο τετραένυδρος-χλωριούχος σίδηρος ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) από την εταιρία Ferak (Berlin, Germany). Το τετρα(αιθυλ)-ορθο-πυριτικό (TEOS) και το τριμεθοξυ(οκταδεκυλ)σιλάνιο (99 %) της εταιρίας Sigma-Aldrich



Chemie (Steinheim, Germany). Το διάλυμα αμμωνίας 25 % προμηθεύτηκε από την εταιρία Merck. Από τον ίδιο οίκο αγοράστηκε επίσης και το άνυδρο θειικό νάτριο (*Sodium Sulfate, anhydrous*), για την απομάκρυνση της υγρασίας.

Αντίστοιχα, για την σύνθεση των μαγνητικών ιοντικών υγρών, το βενζιμιδαζόλιο ( $C_7H_6N_2$ ) καθαρότητας >98 %, προμηθεύτηκε από τον οίκο Fluka (Milwaukee, WI, USA). Το βενζύλο-βρωμίδιο ( $C_7H_7Br$ ), ο νιτρικός άργυρος ( $AgNO_3$ ) και το υδροξείδιο του καλίου (KOH) εφοδιάστηκαν από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany). Ο εξα-ύδατος τριχλωριούχος σίδηρος ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) καθαρότητας >97 %, το 1,12-διβρωμο δωδεκάνιο ( $C_{12}H_{24}Br_2$ ) καθαρότητας >98 % και το (lithium bis(trifluoromethyl)sulfonylimide) ( $C_2F_6LiNO_4S_2$ ) καθαρότητας >99 % αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Germany).

Για τη βελτιστοποίηση και εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS προμηθεύτηκαν από τον οίκο Merck τα προσροφητικά άνυδρο θειικό μαγνήσιο ( $MgSO_4$ ) καθαρότητας 99,5 %, οξικό νάτριο (sodium acetate, NaOAc), κιτρικό νάτριο 99 % (tri-sodium citrate dehydrate). Από τον οίκο Riedel de Haën (Hannover, Germany) αγοράστηκε το χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, NaCl) ενώ ο σεσκιωδρίτης διβασικού κιτρικού νατρίου 99 % (sodium citrate dibasic sesquihydrate) από τον οίκο Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προσροφητικά πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (Primary Secondary Amine, PSA, 40  $\mu m$ ), και γραφίτοποιημένος ενεργός άνθρακας (graphitized Carbon Black, GCB) του οίκου Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) και C18, LiChroprep RP-18, (40–64 $\mu m$ ), του οίκου Merck.

Για τη ρύθμιση του pH των δειγμάτων, των διαλυτών έκλουσης ή των εκλουστικών συστημάτων χρησιμοποιήθηκε μυρμηκικό οξύ (formic acid, FA) καθαρότητας 99 %, μυρμηκικό αμμώνιο ( $FNH_4$ ) καθαρότητας 98 % και καυστικό νάτριο (NaOH) καθαρότητας 98 % του οίκου Merck.

Για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα υδατικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (divinylbenzene/N-vinylpyrrolidone copolymer cartridges, 200 mg, 6 mL) του οίκου Waters Corporation (Milford, USA), και οι μικροστήλες Bond Elut C18 (200 mg, 6 mL) Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).

Πριν από την έγχυση στα συστήματα χρωματογραφίας, όλα τα δείγματα διηθήθηκαν σε φίλτρα σύριγγας με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), με διάμετρο πόρων 0,22  $\mu m$  και 0,45  $\mu m$ , του οίκου Millipore (Cork, Ireland) με τη βοήθεια αποστειρωμένων συρίγγων μιας χρήσης όγκου 1 mL ή 2,5 mL.

## 7.4 Υαλικά και σκεύη

Κατά την συνθετική πορεία των μαγνητικών υλικών, χρησιμοποιήθηκαν σφαιρικές φιάλες όγκου 50, 100 και 250 mL, διαχωριστική χοάνη για την συλλογή της επιθυμητής φάσης όγκου 1000 και 500 mL, ύαλος ωρολογίου για την ξήρανση των συντεθειμένων υλικών, γυάλινος ψυκτήρας τύπου Liebig για την συμπύκνωση των ατμών στη συσκευή reflux, ελαιόλουτρο για την διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας στους 200 °C ενώ για την διήθηση υπό κενό χρησιμοποιήθηκε ηθμός τύπου Hirsch (διαμέτρου πόρων 90-150 μm).

Για την προσθήκη επιθυμητών όγκων χρησιμοποιήθηκαν αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (2-20 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL και 1000-5000 μL) της εταιρίας Eppendorf (Vienna, Austria).

Άλλα γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος τόσο κατά τις συνθέσεις όσο κατά τις εκχυλίσεις των δειγμάτων περιλάμβαναν ογκομετρικούς κυλίνδρους 10, 100 και 250 mL, σιφώνια πληρώσεως των 1 έως 10 mL, ογκομετρικές φιάλες των 10 και 100 mL, κωνικές φιάλες 250 και 500 mL, φιάλες κενού του 1 L, ποτήρια ζέσης των 100, 250, 500 και 1000 mL, δοκιμαστικοί σωλήνες των 5 και 15 mL και φιαλίδια των 8 mL με βιδωτό πώμα. Για την έγχυση και ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα φιαλίδια δειγμάτων (2 mL) με βιδωτό πώμα septa και micro-inserts (200 μL), κατάλληλα για χρωματογραφία.

Για τη συλλογή των δειγμάτων νερού χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης τύπου Niskin ενώ για τη συλλογή δειγμάτων ιζήματος δειγματολήπτης βυθού τύπου Van Veen Grab. Τα δείγματα νερού διηθήθηκαν με φίλτρα από ίνες υαλοβάμβακα (glass fiber filters) GF/B 0,7 mm του οίκου Whatman (Maidstone, UK) πριν την ανάλυση, ενώ για το κοσκίνισμα των ιζημάτων χρησιμοποιήθηκαν κόσκινα 2 mm της εταιρίας Retsch (Haan, Germany). Για την εκχύλιση και τον καθαρισμό στερεών δειγμάτων όπως ιζήματα, αχινοί, μύδια, ψάρια και *Lemna Minor*, χρησιμοποιήθηκαν φυγοκεντρικοί σωλήνες από πολυπροπυλένιο τύπου falcon της Sarstedt (Nümbrecht, Germany), χωρητικότητας 50 και 15 mL αντίστοιχα.

## 7.5 Συσκευές

Για την εξάτμιση διαλυτών κατά την διάρκεια της σύνθεσης, χρησιμοποιήθηκαν: περιστροφικός εξατμιστήρας κενού της εταιρίας Tefic biotech co (Weiyang, China), κλίβανοι εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση της εταιρίας Nüve (Ankara, Turkey) μοντέλο EV 018 και Vacucell 111 Vacuum Oven της εταιρίας MMM Medcenter Einrichtungen GmbH (Planegg-Munich, Germany). Για την ξήρανση των υλικών, χρησιμοποιήθηκε κλίβανος αποξήρανσης της εταιρίας JP Selecta, μοντέλο theroven.

Για την εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) χρησιμοποιήθηκε συσκευή εκχύλισης Hyper-Sep Glass Block 60104-243 της Thermo Fisher Scientific (Rockwood, USA) συνδεδεμένη με αντλία κενού της Rocker Scientific (New Taipei City, Taiwan), ενώ για την συμπύκνωση των εκλουσμάτων χρησιμοποιήθηκε θερμαινόμενη συσκευή συμπύκνωσης αζώτου Techne Dri-Block DB-3D (Staffordshire, UK), υπό ήπιο ρεύμα αζώτου με τη χρήση γεννήτριας αζώτου μοντέλο NG10LA της Peak Scientific (Illinois, United States).

Για την εκχύλιση των υδατικών δειγμάτων πριν την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε συσκευή Millipore (Darmstadt, Germany). Για τη λυοφιλίωση και την φυγοκέντρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε συσκευή λυοφιλίωσης του οίκου Jouan, μοντέλο LP3 και συσκευή φυγοκέντρησης μέγιστης ταχύτητας περιστροφής 4000 rpm μοντέλο B4i του οίκου Jouan (Saint-Herblain, France).

Για την ανάδευση των στερεών δειγμάτων (μύδια, ψάρια, αχινοί, ιζήματα και *L. Minor*) χρησιμοποιήθηκε η συσκευή περιδίνησης Vortex IR της STARLAB (Hamburg, Germany), ενώ για την ανακίνηση τους η επιδαπέδια συσκευή του οίκου Edmund Buhler, μοντέλο P1 (Tubigen, Germany).

Η συσκευή υπερήχων Elmasonic P του οίκου Elma Schmidbauer (Singen, Germany), χρησιμοποιήθηκε για τις εκπλύσεις των υλικών μετά την σύνθεση τους καθώς επίσης και για την ομογενοποίηση των διαλυμάτων.

Η μέτρηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των υδατικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με συσκευή μέτρησης pH μοντέλο C932 του οίκου Consort (Turnhout, Belgium) και αγωγιμόμετρο μοντέλο WTW LF 325-B με ηλεκτρόδιο CC9 (Weilheim, Germany).

Για την θέρμανση και την ανάδευση, μαγνητικός αναδευτήρας Daihan Labtech (Wilmington, USA) και για την απομόνωση των μαγνητικών υλικών κοινός μαγνήτης (1T).

Για την ξήρανση των υλικών και την φύλαξή τους χρησιμοποιήθηκε γυάλινος ξηραντήρας κενού (Glass Desiccator for vacuum) της εταιρίας Isolab Laborgerate GmBH (Wertheim, Germany) πληρωμένος με άνυδρο πήκτωμα πυριτίου (Silica gel) μπλε χρωματικού δείκτη. Τέλος, για τη φύλαξη και συντήρηση των αντιδραστηρίων, των προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ψυγεία με θερμοκρασία λειτουργίας 4–8°C και καταψύκτες ελάχιστης θερμοκρασίας -30°C.

## 7.6 Ενόργανες διατάξεις

Για τον χαρακτηρισμό των μαγνητικών ιοντικών υγρών χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Avance AV-400 (συχνότητα

συντονισμού  $^1\text{H}$  400 MHz) του οίκου Brüker (Billerica, Massachusetts, USA), TGA thermogravimetric analysis STA 449C Netzsch (Selb, Germany) υπό ατμόσφαιρα αζώτου ( $50\text{ mL min}^{-1}$ ) με ρυθμό θέρμανσης  $5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  από τους  $25\text{ }^\circ\text{C}$  στους  $800\text{ }^\circ\text{C}$ , στοιχειακός αναλυτής Vario Macro CNS (Elemental Analyzensysteme GmbH, Germany), πορωσίμετρο Autosorb-1 (QUANDACHROM, Bouton Beach, FL, USA), διαθλασίμετρο (D8 Advance Brüker) που λειτουργεί με ακτινοβολία  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.5406\text{ \AA}$ ) και δευτερογενή μονοχρωμάτορα γραφίτη, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) με επικάλυψη χρυσού (JSM-5600, JEOL), φασματοφωτόμετρο υπερύθρου (FT-IR, Perkin Elmer, spectrum 100) και μαγνητόμετρο (LakeShore 7300, Westerville, OH, USA).

## 7.7 Συστήματα χρωματογραφίας

### 7.7.1 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

Για την ταυτοποίηση των ενώσεων του μείγματος  $\text{I}$  χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας Trace GC Ultra συζευγμένο με ανιχνευτή μάζας ISQ mass spectrometer της Thermo και αυτόματο δειγματολήπτη AI/AS 3000. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τριχοειδή στήλη DB-5-MS η οποία περιέχει πολυσιλοξάνιο ως πληρωτικό υλικό με πάχος φιλμ  $0,25\text{ }\mu\text{m}$  και διαστάσεις  $30\text{m} \times 0,25\text{mm}$  (Thermo Scientific, Austin, Texas, USA). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (καθαρότητας  $> 99,999\%$ , Air Liquide, Ελλάδα) με ρυθμό ροής  $1\text{ mL min}^{-1}$ . Με σκοπό την αποφυγή καταγραφής του σήματος του διαλύτη η έναρξη του χρωματογραφήματος πραγματοποιήθηκε με χρόνο καθυστέρησης πέντε λεπτών (solvent delay time).

Η έγχυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία splitless με όγκο έγχυσης  $1\mu\text{L}$ . Ο έλεγχος του οργάνου και η περαιτέρω επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Xcalibur v. 2.2 της εταιρίας Thermo Electron (San Jose, CA, USA).

Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ορίστηκε στους  $250\text{ }^\circ\text{C}$ , οι θερμοκρασίες της πηγής ιόντων και του interface ορίστηκαν στους  $230\text{ }^\circ\text{C}$  και  $280\text{ }^\circ\text{C}$  αντίστοιχα. Τα φάσματα μάζας ελήφθησαν στα  $70\text{ eV}$ . Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου του αέριου χρωματογράφου παρουσιάζεται στον ακόλουθο (Πίνακα 7.1).

Πίνακας 7.1: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα έκλουσης

Ρυθμός αύξησης (°C min <sup>-1</sup> )	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος παραμονής (min)
	60	1
10	130	0
4	230	0
8	250	10

Για τον προσδιορισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των επιλεγμένων ιόντων (*Selected Ion Monitoring, SIM*). Τρία ιόντα ( $m/z$ ) για κάθε αναλύτη επιλέχθηκαν σύμφωνα με τα φάσματα μάζας τους, τα οποία και λήφθηκαν σε λειτουργία full-scan και σε σύγκριση με τη βιβλιοθήκη NIST. Τα ποιοτικά κριτήρια που υιοθετήθηκαν για τους χρόνους κατακράτησης των αναλυτών, καθώς και οι σχετικές εντάσεις των επιλεγμένων ιόντων ήταν εντός ορίων ανοχής που καθορίζονται από την οδηγία 2002/657/ΕΚ της Ευρωπαϊκής Επιτροπής.

Συγκεκριμένα, οι σχετικές εντάσεις των ανιχνευθέντων ιόντων, εκφραζόμενες ως ποσοστό της έντασης των ιόντων ή των προϊόντων της μετάπτωσης με τη μεγαλύτερη ένταση, πρέπει να αντιστοιχούν σε εκείνες του προτύπου βαθμονόμησης, είτε από διαλύματα του προτύπου βαθμονόμησης είτε από εμβολιασμένα δείγματα, σε συγκρίσιμες συγκεντρώσεις, μετρούμενες υπό τις ίδιες συνθήκες (European Commission, 2002). Όσον αφορά τους χρόνους κατακράτησης, θα πρέπει να παρουσιάζουν απόκλιση μικρότερη από  $\pm 5\%$ .

Τα ιόντα ταυτοποίησης και ποσοτικοποίηση καθώς επίσης και οι χρόνοι κατακράτησης που επιλέχθηκαν για κάθε μία από τις ενώσεις, παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 7.2.

**Πίνακας 7.2:** Χρόνοι κατακράτησης και ιόντα για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό

Ένωση	Χρονικό παράθυρο (min)	Χρόνος κατακράτησης (min)	Ιόντα
			ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης ( $m/z$ )
Ethoxyquine	19.65	20.71	<b>202</b> , 174, 145
Atrazine		21.43	<b>200</b> , 202, 215
Chlorothalonil		22.73	<b>266</b> , 264, 268
Chlorpyrifos-Methyl	24.10	24.29	<b>286</b> , 125, 288
Parathion-Methyl		24.88	<b>109</b> , 125, 263
Chlorpyrifos	26.10	26.45	<b>197</b> , 258, 314
Irgarol		28.38	<b>182</b> , 253, 238
Resmethrin		35.50-35.75	<b>123</b> , 128, 143
λ- Cyhalothrin	31.00	38.60-39.12	<b>208</b> , 181, 197
Permethrin	41.00	42.00-42.55	<b>163</b> , 183, 184

### 7.7.2 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας

Για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των ενώσεων του μείγματος II χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC συζευγμένο με ανιχνευτή μαζών LTQ/Orbitrap FT. Το σύστημα περιλαμβάνει αυτόματο δειγματολήπτη (Accela AS autosampler model 2.1.1), αντλία (Accela Pump Ser. No 750157) και φασματόμετρο μάζας, LTQ Orbitrap XL 2.5.5 SP1 της εταιρίας Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany).

Το τμήμα της γραμμικής παγίδας ιόντων (LTQ) του υβριδικού αναλυτή μαζών είναι εξοπλισμένο με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού, Ion Max Electrospray Ionization (ESI) στη μέθοδο θετικών ιόντων. Η αντλία παραγωγής αζώτου προμηθεύτηκε από την εταιρεία Brezza-Claind (NiGen LCMS 40-1). Ο έλεγχος του οργάνου και η περαιτέρω επεξεργασία του φάσματος μάζας πραγματοποιήθηκε, όπως και στη περίπτωση του αέριου χρωματογράφου, με το λογισμικό πρόγραμμα Xcalibur.

Οι επιλεγμένοι αναλύτες διαχωρίστηκαν σε αναλυτική στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil GOLD (50 mm x 2,1 mm, 1,9 μm) της Thermo (Bremen, Germany). Για τον διαχωρισμό των ενώσεων του μείγματος II, χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης συνολικής διάρκειας 10 λεπτών (Πίνακα 7.3). Η αρχική σύσταση διαλυτών ήταν 90% (H<sub>2</sub>O, 0,1% FA, 5 mM FNH<sub>4</sub>) και 10% (MeOH, 0,1% FA, 5 mM FNH<sub>4</sub>). Η σύσταση παρέμεινε σταθερή για 0,6 min

και στη συνέχεια το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε έως ότου έφτασε στο πέμπτο λεπτό το 100 %, οπότε και διατηρήθηκε σταθερή για 1,2 λεπτά. Τελικά το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Η ταχύτητα ροής (flow rate) ήταν σταθερή στα 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  και ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) ήταν 5  $\mu\text{L}$ . Η θερμοκρασία του φούρνου (oven temperature) ήταν σταθερή στους 20  $^{\circ}\text{C}$ .

**Πίνακας 7.3:** Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	A % ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% FA, 5mM FNH <sub>4</sub> )	% B (MeOH, 0,1% FA, 5mM FNH <sub>4</sub> )	Ταχύτητα ροής ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )
	90	10	300
0.6	90	10	300
5.1	0	100	300
6.3	0	100	300
8	90	10	300
10	90	10	300

Για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring, SIM). Η επιλογή των ιόντων ( $m/z$ ) βασίστηκε στα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης (full-scan mode) στη μέθοδο θετικού ιοντισμού (positive ion mode) και για εύρος μαζών από 240 έως 600. Για την ταυτοποίηση επιλέχθηκαν τα ψευδο-μοριακά ιόντα  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για το irgarol και το azamethiphos, ενώ για το deltamethrin το ψευδο-μοριακό ιόν  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ . Οι βασικές παράμετροι της φασματομετρίας μάζας μετά τη βελτιστοποίηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.4.

**Πίνακας 7.4:** Παράμετροι λειτουργίας LTQ/Orbitrap MS/MS

Παράμετροι (full scan)	Τιμές
Δυναμικό ψεκασμού (spray voltage)	3,7 kV
Διακριτική ικανότητα (resolution)	60000 FWHM
Δυναμικό μεταλλικού τριχοειδούς (capillary voltage)	40 V
Δυναμικό δακτυλιοειδούς φακού (tube lens)	110 V
Ροή αερίου περιβάλλουσας ροής (sheath gas)	38 au
Ροή αερίου αποδιαλύτωσης (auxiliary gas flow)	8 au
Θερμοκρασία τριχοειδούς (capillary temperature)	320 $^{\circ}\text{C}$
Σχετικό σφάλμα μάζας $m/z$ (mass tolerance)	<2 ppm
Automatic gain control (AGC) target	$10^6$

## Β Δείγματα

### 7.8 Υποστρώματα για την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων

Η μελέτη των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε υδατικά δείγματα (ποτάμια και θαλασσινά), ιζήματα, μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια (*Gobio-gobio*) και το υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna Minor* που συλλέχθηκαν από την περιοχή της Δυτικής και κεντρικής Μακεδονίας και συγκεκριμένα από τους ποταμούς Αλιάκμονα, Λουδία και Αξιό. Επίσης αναλύθηκαν δείγματα όπως θαλασσινά νερά, ιζήματα και αχινοί (*Paracentrotus lividus*) από περιοχές της Ηγουμενίτσας πλησίον υδατοκαλλιεργειών.

Όσον αφορά τα τυφλά υδατικά δείγματα (ποτάμιου νερού) συλλέχθηκαν από τον Βενέτικο ποταμό, ένα από τους μεγαλύτερους παραπόταμους του Αλιάκμονα, κοντά στις πηγές του έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ότι τα δείγματα δεν είναι επιβαρυμένα με οργανικές ενώσεις.

Τα τυφλά δείγματα θαλασσινού νερού συλλέχθηκαν από την περιοχή της Ηγουμενίτσας (Ιόνιο Πέλαγος), μακριά από τις υδατοκαλλιέργειες της περιοχής καθώς επίσης και σε απόσταση από την ξηρά (για να αποφευχθεί η ανίχνευση φυτοφαρμάκων από τυχόν έκπλυση εδάφους). Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε γυάλινες σκουρόχρωμες φιάλες χωρητικότητας 2,5 L. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό ψύξη, διηθήθηκαν με φίλτρα από ίνες υαλοβάμβακα διαμέτρου 0,7 mm και αποθηκεύτηκαν στους 4°C μέχρι την εκχύλισή τους.

Η συλλογή των ιζημάτων πραγματοποιήθηκε με δειγματολήπτη βυθού τύπου Van Veen Grab και αποθηκεύτηκαν σε αλουμινένια δοχεία που προηγουμένως είχαν ξεπλυθεί με ακετόνη. Μετά την άφιξη των δειγμάτων στο εργαστήριο υπό ψύξη, ποσότητά τους μεταφέρθηκε σε falcon, αφού πρώτα απομακρύνθηκαν οι μη προσδιοριζόμενες ουσίες (πέτρες, κοχύλια, φύκια, κλαδιά). Οι σωλίνες καταψύχθηκαν στους -20 °C με σκοπό να πραγματοποιηθεί η λυοφιλίωσή τους σε θερμοκρασία -40 °C, υπό κενό ( $10^{-2}$  bar) για 48 ώρες. Τέλος τα απαλλαγμένα από υγρασία δείγματα ιζήματος, ομογενοποιήθηκαν, κοσκινίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

Σχετικά με τους υδρόβιους οργανισμούς, τα δείγματα αχινών (είδος *Paracentrotus lividus*) συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θεσπρωτίας (Ιόνιο Πέλαγος) και μεταφέρθηκαν ζωντανοί στο εργαστήριο. Οι αχινοί καθαρίστηκαν εξωτερικά απομακρύνοντας από το πάνω μέρος των άκανθων φύκια και στερεά σώματα (πέτρες, κελύφη) που ήταν προσκολλημένα. Στη συνέχεια με την χρήση χειρουργικού ψαλιδιού πραγματοποιήθηκε τρύπα στην στοματική περιοχή έτσι ώστε να σπάσει το κέλυφος και να παραληφθεί ο νωπός αχινός. Τα δείγματα



ζυγίστηκαν απευθείας σε falcon και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

Τα δείγματα ψαριών είδος *Gobio gobio* της οικογένειας *Gobiidae*, καθώς επίσης και τα μύδια είδους *Mytilus galloprovincialis* της οικογένειας *Mytiloidea* προμηθεύτηκαν από ιχθυοπώλες στην περιοχή Χαλάστρα Θεσσαλονίκης αυθημερόν αλιευμένα από τις υδατοκαλλιέργειες που δραστηριοποιούνται στον Θερμαϊκό κόλπο.

Τα φυτά γλυκών υδάτων θεωρούνται λιγότερο ευαίσθητα στις χημικές ενώσεις από ότι οι βιολογικοί οργανισμοί. Όμως τα υδρόβια μακροφύκη σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι πιο ευαίσθητα στην έκθεση φυτοφαρμάκων από ότι τα ψάρια (Fekete-Kertész et al., 2015 και Carvalho et al., 2007).

Το υδρόβιο φυτό που συχνά αναφέρεται ως duckweed *Lemna Minor*, ανήκει στην οικογένεια *Lemnaceae* και χρησιμοποιείται σε πειράματα τοξικότητας (Mitsou et al., 2006 και Bouriou et al., 2018). Η συμβολή της οικογένειας των duckweeds (*Lemnaceae*) είναι παγκοσμίως γνωστή για την ανεκτικότητα τους σε περιβαλλοντικούς παράγοντες πίεσης και τη συσσώρευση ξενοβιοτικών οργανισμών (Mitsou et al., 2006). Η *L.minor* είναι μονοκοτυλήδονο, αγγειόσπερμο φυτό το οποίο αποτελείται από έναν δισκοειδή μίσχο και μία πολύ λεπτή ρίζα που προέρχεται από το κέντρο της χαμηλότερης επιφάνειας προς κάθε φύλλωμα (Böttcher and Schroll., 2007). Συνήθως συναντώνται στα επιφανειακά νερά και υφάλμυρα οικοσυστήματα. Αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για πουλιά και ψάρια και παρέχουν κατοικία σε ασπόνδυλα (Drost et al., 2007). Το υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna minor* συλλέχθηκε από την περιοχή Χαλάστρα κοντά στην επιφάνεια του ποταμού Αξιού.

Όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη και επικύρωση των μεθόδων, αναλύθηκαν προηγουμένως για να διασφαλιστεί η απουσία των προς μελέτη ενώσεων.

## 7.9 Συλλογή πραγματικών δειγμάτων

Όσον αφορά τα δείγματα από τις υδατοκαλλιέργειες, εκτός από την περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου, της Ηγουμενίτσας και της Αλβανίας, στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος “Real-time monitoring of sea contaminants using a lab-on-a-chip biosensor”, με διάρκεια τρία έτη, αναλύθηκαν δείγματα από χώρες με έντονη δραστηριότητα η Ιταλία, η Ισπανία, η Πορτογαλία, το Ηνωμένο Βασίλειο και η Νορβηγία. Για κάθε υδατοκαλλιέργεια, ορίστηκαν σημεία δειγματοληψίας καθώς επίσης και σημεία αναφοράς. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τα αντίστοιχα εργαστήρια και διακινήθηκαν στα υπόλοιπα στα πλαίσια του προγράμματος.

Για τη συλλογή δειγμάτων νερού χρησιμοποιήθηκαν σκουρόχρωμες γυάλινες φιάλες και πλαστικές φιάλες PET, ενώ για τα δείγματα των ιζημάτων αποστειρωμένοι δίσκοι αλουμινίου και σακούλες από πολυαιθυλένιο. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν αυθημερόν από το σημείο δειγματοληψίας στο εργαστήριο υπό ψύξη. Όλα τα δείγματα απεστάλησαν και διανεμήθηκαν με τη χρήση ξηρού πάγου, προς αποφυγή απόψυξής τους. Πριν την ανάλυσή τους, αξιολογήθηκε η κατάστασή τους όσον αφορά τυχόν αλλοιώσεις. Στην περίπτωση που τα δείγματα δεν αναλύθηκαν αμέσως μετά την παραλαβή, αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη (-20°C) μέχρι την ανάλυσή τους.

### 7.10 Εμβολιασμός δειγμάτων

Για τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου, δείγματα νερού ποτάμια και θαλάσσια με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εμβολιάστηκαν χωριστά με τα μείγματα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Κατάλληλος όγκος διαλύματος των επιλεγμένων ενώσεων και του εσωτερικού προτύπου προστέθηκε σε 250 mL νερού ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση από 3 ng L<sup>-1</sup> έως 500 ng L<sup>-1</sup> και στη συνέχεια τα δείγματα εκχυλίστηκαν με SPE.

Αντίστοιχα για τα ιζήματα, τα δείγματα εμβολιάστηκαν χωριστά κάθε φορά με το μείγμα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών (μείγμα I και μείγμα II) και το εσωτερικό πρότυπο. Για τον εμβολιασμό, 20 mL πρότυπου μείγματος των επιλεγμένων ενώσεων προστέθηκαν σε 20 g ξηρού ιζήματος μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρου από πολυαιθυλένιο ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις στο ίζημα να κυμαίνονται από 5 έως 100 μg/kg. Τα εμβολιασμένα δείγματα ιζήματος, αναδεύτηκαν ισχυρά στη συσκευή περιδίνησης, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανακίνησης, σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες, ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής αλληλεπίδραση των αναλυτών με το υπόστρωμα. Για την εκχύλιση των δειγμάτων επιλέχθηκε και βελτιστοποιήθηκε η μέθοδος QuEChERS.

Ο χρόνος παραμονής (residence time) ελέγχθηκε σε προκαταρκτικό πείραμα και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των αναλυτών για χρόνους παραμονής από 30 min, 3 ώρες, 5 ώρες, 7 ώρες έως και 12 ώρες μετά τον εμβολιασμό.

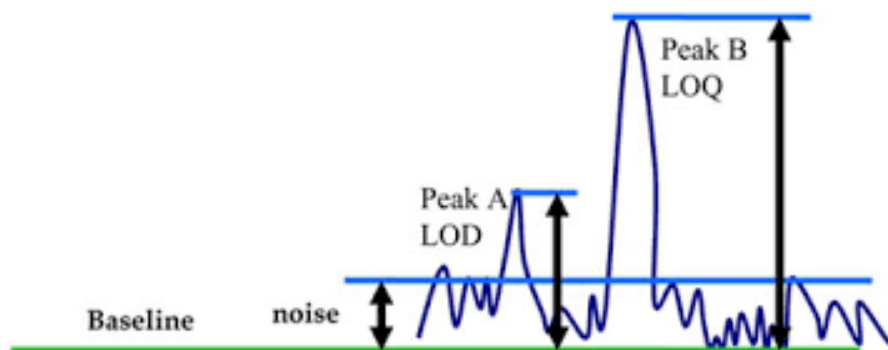
Για τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου, τα απαλλαγμένα από φυτοπροστατευτικές ενώσεις δείγματα νωπών ιστών μυδιού, αχινού, ψαριού και *Lemnas Minor* εμβολιάστηκαν με τα μείγματα των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I, II) και του προτύπου διαλύματος, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να βρίσκεται μεταξύ 10- 500 μg/kg.

Τα εμβολιασμένα δείγματα, αναδεύτηκαν ισχυρά στη συσκευή περιδίνησης (vortex), στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τράπεζα ανακίνησης, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, για να επιτευχθεί επαρκής αλληλεπίδραση των αναλυτών με το υπόστρωμα. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με την μέθοδο QuEChERS.

### 7.11 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας

Με σκοπό την επαλήθευση της καταλληλότητας και της απόδοσης των αναλυτικών μεθόδων πραγματοποιήθηκε επικύρωση αυτών με γνώμονα την ισχύουσα Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657/ΕΚ. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (*limits of detection, LODs*) και ποσοτικοποίησης (*limits of quantification, LOQs*), η πιστότητα της μεθόδου μέσω του υπολογισμού της επαναληψιμότητας (*repeatability, RSDr*) και της αναπαραγωγιμότητας (*reproducibility, RSDR*), η ακρίβεια της μεθόδου εκφραζόμενη ως εκατοστιαία ανάκτηση (*recovery, R%*) και τέλος γραμμική περιοχή (*linear range*).

Η ανιχνευσιμότητα υποδηλώνει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει ή να ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών. Μέτρο της ικανότητας αυτή αποτελεί το όριο ανίχνευσης (*Limit of Detection, LOD*) και ποσοτικοποίησης (*Limits of Quantification, LOQ*) και βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου (Κουμπάρης, 2015). Τα όρια ανίχνευσης (LOD) προσδιορίστηκαν ως η συγκέντρωση του εμβολιασμένου δείγματος για την οποία η αναλογία του σήματος της φυτοπροστατευτική ουσίας προς το θόρυβο του οργάνου είναι ίση με 3 ( $S/N=3$ ), ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) ως η αντίστοιχη συγκέντρωση του δείγματος που αντιστοιχεί σε σήμα ίσο με 10 φορές το θόρυβο του οργάνου (Σχήμα 7.1).



Σχήμα 7.1: Σχηματική απεικόνιση LOQ και LOD

Μέτρο της ακρίβειας αποτελεί η ανάκτηση (*Recovery, R%*) που υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\%R = \frac{C_{\text{πειραματική}} - C_{\text{τυφλού}}}{C_{\text{θεωρητική}}} \times 100 \quad (\text{Εξίσωση 7.1})$$

Όπου  $C_{\text{πειραματική}}$  η συγκέντρωση του αναλύτη που τελικά ανιχνεύθηκε στο εμβολιασμένο υπόστρωμα,  $C_{\text{θεωρητική}}$  η συγκέντρωση εμβολιασμού και  $C_{\text{τυφλού}}$  η συγκέντρωση αναλυτών που μπορεί να υπάρχει στο δείγμα. Η αξιολόγηση της ακρίβειας πραγματοποιήθηκε με πέντε δείγματα ελέγχου ποιότητας, σε αντίστοιχα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλό, μεσαίο και υψηλό).

Η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου, μέτρο της οποίας αποτελούν η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα (Κουμπάρης, 2015).

Η επαναληψιμότητα (*Intra-day Precision*) προσδιορίστηκε ως η σχετική τυπική απόκλιση (*Relative Standard Deviation – RSD%*) πέντε επαναλήψεων εντός της ίδιας ημέρας ( $RSD_r\%$ ,  $n=5$ ) ενώ η αναπαραγωγιμότητα (*Inter-day Precision*) ως η % σχετική τυπική απόκλιση πέντε επαναλήψεων σε 3 διαφορετικές ημέρες ( $RSD_R\%$ ,  $n=5 \times 3$  ημέρες). Σε κάθε μέθοδο, η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα εκτιμήθηκαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων αναλυτών και συγκεκριμένα στις συγκεντρώσεις της τάξης του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ), δέκα φορές του ορίου ποσοτικοποίησης ( $10 \times \text{LOQ}$ ) και εκατό φορές του ορίου ποσοτικοποίησης ( $100 \times \text{LOQ}$ ) για κάθε αναλύτη.

Η γραμμικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με τη βοήθεια καμπύλης εννέα σημείων η οποία κάλυπτε εύρος συγκεντρώσεων από το όριο ποσοτικοποίησης (*Method Quantification Limit, MQL*) της κάθε ένωσης έως συγκέντρωση περίπου 500 φορές την τιμή αυτή για κάθε αναλύτη. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με στατιστικές μεθόδους (ανάλυση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων), υπολογίζοντας για κάθε αναλύτη την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης και τον συντελεστή προσδιορισμού (*Coefficient of determination, R<sup>2</sup>*) (Κουμπάρης, 2015).

Πειράματα πραγματοποιήθηκαν, προκειμένου να εξεταστεί η σταθερότητα των προτύπων διαλυμάτων και των δειγμάτων. Συγκεκριμένα αναφορικά με το πρότυπα διαλύματα, μελετήθηκε η βραχυπρόθεσμη (*short-term stability*) και η μακροπρόθεσμη (*long-term stability*) σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου για 8 ώρες και σε θερμοκρασία συντήρησης (4°C). Η σταθερότητα κύκλων κατάψυξης-απόψυξης (*freeze-thaw stability*) και συγκεκριμένα για τρεις κύκλους με μέτρηση φρέσκου παρασκευασμένου προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 100 ng/L και διαλύματος το οποίο είχε αποθηκευτεί σε

θερμοκρασία κατάψυξης (-20°C). Τέλος, η σταθερότητα του εκχυλίσματος μετά την επεξεργασία του δείγματος (post-preparation stability), με τοποθέτησή του στον αυτόματο δειγματολήπτη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για διάστημα 8 ωρών.

### 7.12 Επίδραση υποστρώματος (Matrix effect)

Η απόκριση του σήματος μπορεί να επηρεαστεί από την παρουσία συν-εκχυλιζόμενων ενώσεων στο δείγμα. Οι αποκρίσεις καλούνται «επιδράσεις υποστρώματος» (*Matrix effect*) και μπορούν να εμφανιστούν ως αυξημένες (signal enhancement) ή μειωμένες αποκρίσεις (signal suppression) σε σύγκριση με εκείνες των προτύπων διαλυμάτων.

Η επίδραση υποστρώματος εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος του δείγματος, η τεχνική εκχύλισης, η προκατεργασία και ο καθαρισμός. Η επίδραση του υποστρώματος μπορεί να διαφέρει σημαντικά ακόμα και μεταξύ δειγμάτων που ανήκουν στο ίδιο είδος, ωστόσο τις περισσότερες φορές η επίδραση στο αναλυτικό σήμα μεταξύ δειγμάτων που ανήκουν στην ίδια κατηγορία είναι παρόμοια. Ανάλογα με τον τύπο του υποστρώματος, η μείωση του σήματος παρατηρείται σε διαφορετικά τμήματα του χρωματογράφου, για αυτό και δεν είναι πάντα ίδια για όλα τα υποστρώματα που ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία (πχ ποτάμια και θαλάσσια ύδατα). Στην χρωματογραφία ανάστροφης φάσης, η ισχυρότερη μείωση του σήματος εμφανίζεται συνήθως στην αρχή του χρωματογραφήματος και οφείλεται κυρίως στις πολικότερες ουσίες του υποστρώματος που έχουν χαμηλό χρόνο κατακράτησης (low retained matrix compounds).

Κατά τις αναλύσεις με τη χρήση του LC-MS η επίδραση του υποστρώματος αποτελεί σημαντικό φαινόμενο, κυρίως κατά τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό μιας και η πηγή ESI θεωρείται ιδιαίτερα επιρρεπής στο να ιονίζει παρεμποδίζουσες και συν-εκχυλιζόμενες ενώσεις (Nödler et al., 2010). Τα συστατικά του υποστρώματος μπορεί επίσης να μεταβάλλουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση του εκλούσματος της στήλης, να επηρεάζουν τον σχηματισμό σταγονιδίων και συνεπώς τη διαδικασία εξάτμισης, επηρεάζοντας έτσι τον αριθμό των φορτισμένων ιόντων (Nödler et al., 2010). Έτσι, η επίδραση υποστρώματος μπορεί να επηρεάσει αισθητά την ικανότητα ιοντισμού των αναλυτών.

Όσον αφορά τις αναλύσεις με την αέρια χρωματογραφία, η επίδραση υποστρώματος σχετίζεται περισσότερο με φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα στον εισαγωγέα και στην αρχή της χρωματογραφικής στήλης λόγω συσσώρευσης της μήτρας παρά στον ανιχνευτή (Pano-Farias et al., 2017 και Tsiipi D., et al., 2015). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η επίδραση του υποστρώματος μπορεί να μειωθεί χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές έγχυσης του

δείγματος στον εισαγωγέα (pulsed pressure splitless, programmable temperature vaporization PTV) (Rutkowska et al., 2018 και Tsiipi et al., 2015).

Ένας άλλος παράγοντας που μειώνει την επίδραση υποστρώματος, αποτελεί η μέθοδος των επιλεγμένων ιόντων (*Selected Ion Monitoring, SIM*), καθώς τα ιόντα ποσοτικοποίησης αναζητούνται σε συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο (Pano-Farias et al., 2017). Έτσι, παρόλο που μπορεί να υπάρχουν συνεκχυλιζόμενες ενώσεις, το σήμα τους ελαχιστοποιείται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο επιλεγμένων ιόντων (Pano-Farias et al., 2017).

Ο πιο διαδεδομένος τρόπος για να μειωθεί η επίδραση υποστρώματος ειδικά στις πολύ υπολειμματικές μεθόδους, είναι η προσθήκη εσωτερικών προτύπων (Pano-Farias et al., 2017; Rutkowska et al., 2018 και Stachniuk, 2016).

Σύμφωνα με την Οδηγία SANTE 11813/2017 προκειμένου να μειωθεί η επίδραση υποστρώματος κατά την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και ζωοτροφές, προτείνεται η χρήση καμπύλης αναφοράς παρασκευασμένη σε εκχύλισμα υποστρώματος, τυφλού δείγματος και όχι σε καθαρό οργανικό διαλύτη (SANTE, 2017).

Τα φυτοφάρμακα που είναι πιο επιρρεπή και ευαίσθητα στην επίδραση της μήτρας, είναι οι ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους αμινική-, καρβοξυλική, ιμιδαζολική, βενζιμιδαζολική και αζολική ομάδα (Anastassiades et al., 2003; Pano-Farias et al., 2017 και Rutkowska et al., 2018).

Άλλοι τρόποι για να μειωθεί η επίδραση μήτρας, αποτελούν ο καθαρισμός και η προκατεργασία των δειγμάτων. Ένας απλός τρόπος για την εξάλειψη του φαινομένου στα υδατικά δείγματα είναι η έκπλυση των μικροστηλών εκχύλισης με νερό ή με ασθενή οργανικά οξέα που περιέχουν μικρή αναλογία οργανικού διαλύτη, μετά την εκχύλιση των δειγμάτων, ώστε να απομακρυνθούν άλατα και άλλες παρεμποδίζουσες ενώσεις (Stachniuk et al., 2016). Στα στερεά υποστρώματα και συγκεκριμένα στα ιζήματα, παράγοντας που επιδρά στη μείωση του matrix effect, με τη μέθοδο QuEChERS, αποτελεί το στάδιο του clean-up με την χρήση αλάτων καθαρισμού (Azis et al., 2018).

Επιπρόσθετα, παράγοντας που επιδρά στην μείωση της επίδρασης του υποστρώματος, αποτελεί η ρύθμιση του pH. Ουδέτερες τιμές pH, μειώνουν την συνεκχύλιση των ανεπιθύμητων ενώσεων (χουμικά και φλουβικά οξέα) από τα περιβαλλοντικά υποστρώματα (Nödler et al., 2010). Σημαντική μείωση παρουσιάζεται, όπως είναι αναμενόμενο, με την αραιώση ως και δέκα φορές του τελικού εκχυλίσματος πριν την έγχυση στον χρωματογράφο.

Η επίδραση υποστρώματος υπολογίζεται από την σύγκριση των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σε διαλύτη σε σχέση με τις καμπύλες αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σε δείγματα υποστρώματος (Pano-Farias et al., 2017) (Εξίσωση 7.2):

$$ME (\%) = ((S_m/S_s) - 1) \times 100$$

(Εξίσωση 7.2)

Όπου  $S_m$  η κλίση της ευθείας στο εκχύλισμα και  $S_s$  η κλίση της ευθείας σε καθαρό διαλύτη.

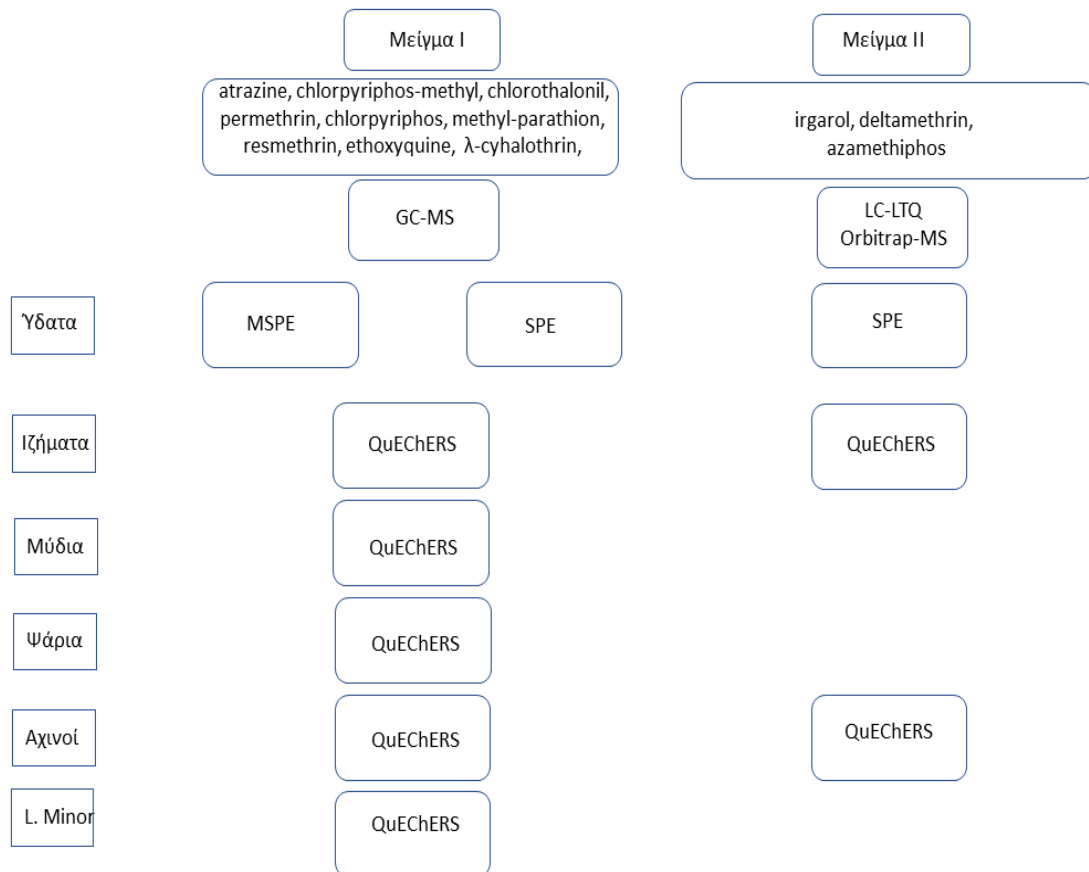
Για τιμές ποσοστών 0 %, δεν παρουσιάζεται καμία αλληλεπίδραση μεταξύ υποστρώματος και αναλύτη. Για τιμές μικρότερες του 0 % η επίδραση του υποστρώματος μειώνει την απόκριση σήματος, ενώ για μεγαλύτερες προκαλεί ενίσχυση σήματος. Για ενδιάμεσες τιμές έως και 20% (ή -20%), το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος ενώ θεωρείται μη σημαντική, για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή (Rutkowska et al., 2018).

## Γ. Μέθοδοι

### 7.13 Επιφανειακά νερά

Για την προσδιορισμό των ενώσεων που ανήκουν στο μείγμα I σε επιφανειακά νερά με σύστημα αέριας χρωματογραφίας, αναπτύχθηκαν δύο πρωτοκόλλα. Το πρώτο πρωτόκολλο βασίστηκε στην μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης (MSPE), ενώ το δεύτερο στην υγρή-στερεή εκχύλιση (SPE). Και για τα δύο πρωτόκολλα πραγματοποιήθηκε έγχυση σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Όσον αφορά το μείγμα II, αναπτύχθηκε ένα τρίτο πρωτόκολλο βασισμένο στην εκχύλιση στερεάς φάσης και η έγχυσή του πραγματοποιήθηκε σε LC-LTQ/Orbitrap-MS. Στο Σχήμα 7.2 που ακολουθεί περιγράφονται οι τεχνικές εκχύλισης και προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων.



**Σχήμα 7.2:** Σχηματική απεικόνιση πρωτοκόλλων που βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις (μείγμα I & II)

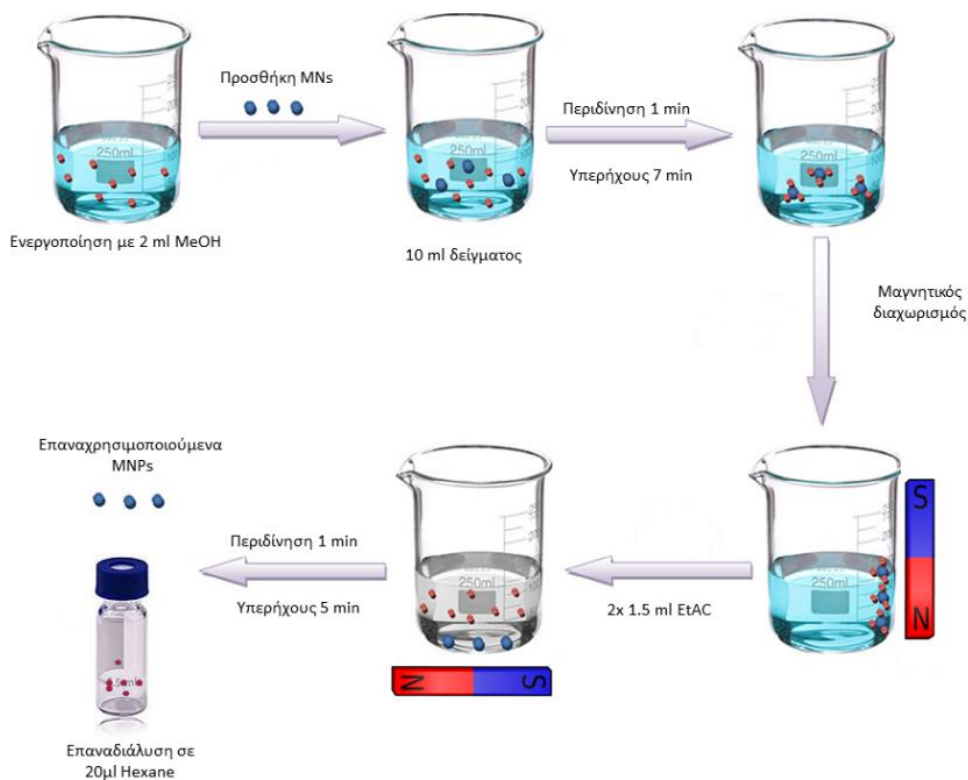


## Πρωτόκολλο 1

### Μαγνητική Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (MSPE) (μείγμα I)

Ποσότητα 54 mg προσροφητικού υλικού προηγουμένως ενεργοποιημένα με 2 mL μεθανόλης διασπείρονται σε 10 mL δείγματος νερού. Το μείγμα ανακινείται σε συσκευή περιδίνησης για ένα λεπτό και στη συνέχεια μεταφέρεται σε λουτρό υπερήχων για επτά λεπτά. Τα μαγνητικά νανοϋλικά διαχωρίζονται από το διάλυμα με την χρήση μαγνήτη στα εξωτερικά τοιχώματα και το υπερκείμενο αποχύνεται. Οι προσροφημένοι στην επιφάνεια του προσροφητικού  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  αναλυτές, εκλούονται με δύο φορές από 1,5 ml οξεϊκού αιθυλεστέρα. Το μείγμα ανακινείται για 1 min και ακολούθως τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων για πέντε λεπτά. Μετά την παραμονή τους σε ηρεμία για 5 min, παρουσία μαγνητικού πεδίου απομονώνονται τα μαγνητικά υλικά (Σχήμα 7.3).

Το συνολικό έκλουσμα, συλλέγεται και ξηραίνεται παρουσία άνυδρου θειικού νατρίου (για την απομάκρυνση τυχόν υγρασίας), συμπυκνώνεται υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύεται σε 20  $\mu\text{L}$  εξαního. Τα τελικά εκχυλίσματα λαμβάνονται και διηθούνται μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  για να μεταφερθούν τελικά σε γυάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτά πώματα με septa teflon εφοδιασμένα με micro-insert 100  $\mu\text{L}$ . Ακολουθεί έγχυση σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (GC- MS).



Σχήμα 7.3: Σχηματική αναπαράσταση μαγνητικής εκχύλισης στερεάς φάσης

## Πρωτόκολλο 2

### Υγρή-στερεή εκχύλιση (SPE) (μείγμα I)

Οι μικροστήλες εκχύλισης Bond Elut-C18 (200 mg, 6 mL) τοποθετούνται σε συσκευή εκχύλισης συνδεδεμένη με αντλία κενού. Οι μικροστήλες καθαρίζονται με 2 x 6 mL οξικού αιθυλεστέρα και η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού πραγματοποιείται με διαδοχική προσθήκη 2 x 6 mL μεθανόλης και 6 mL δις-απεσταγμένου νερού. Ακολούθως, μετά την ενεργοποίηση και πριν στεγνώσει το προσροφητικό υλικό, εκχυλίζονται 250 mL του υδατικού δείγματος (που περιέχει 2% μεθανόλη) με ρυθμό ροής  $\approx 2 \text{ mL min}^{-1}$ . Μετά το πέρας της εκχύλισης, οι μικροστήλες εκπλαίνονται με 6 mL υπερ-κάθαρου νερού.

Μετά την απομάκρυνση υγρασίας παρουσία κενού για 30 min, ακολουθεί έκλουση των προσροφημένων ενώσεων με 2 x 6 mL οξικού αιθυλεστέρα σε δοκιμαστικό σωλήνα, με ταχύτητα ροής  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Το συνολικό έκλουσμα, ξηραίνεται παρουσία άνυδρου θειικού νατρίου για την απομάκρυνση τυχόν υγρασίας, συμπυκνώνεται υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύεται σε 100  $\mu\text{L}$  εξανίου. Τα τελικά δείγματα, διηθούνται μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,45  $\mu\text{m}$ , μεταφέρονται σε γυάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτά πώματα εφοδιασμένα με micro-insert 250  $\mu\text{L}$  για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

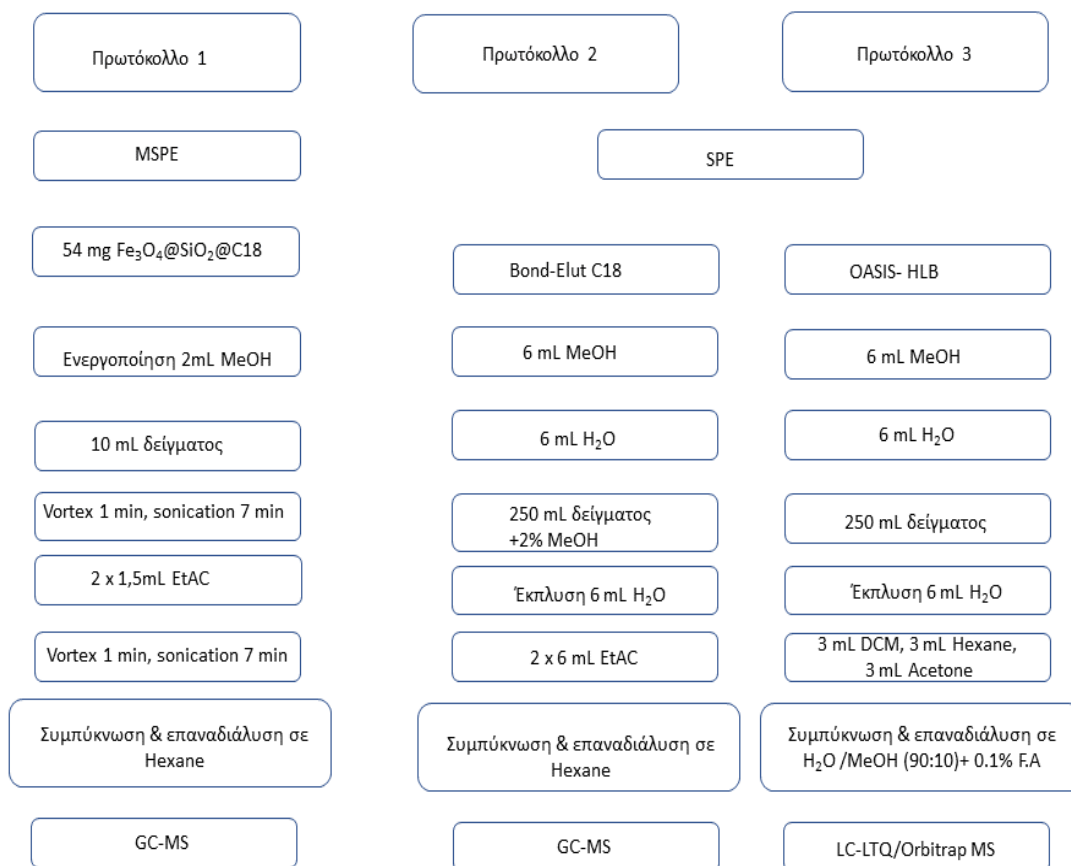
Καθώς το πρωτόκολλο αυτό αφορά το μείγμα I, που περιέχει μη σταθερές στο φως πυρεθρίνες, οι μικροστήλες και τα ποτήρια ζέσεως που περιείχαν τα δείγματα καλύπτονται με αλουμινόχαρτο.

## Πρωτόκολλο 3

### Υγρή-στερεή εκχύλιση (SPE) (μείγμα II)

Οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (200 mg, 6 mL) τοποθετούνται σε συσκευή εκχύλισης συνδεδεμένη με αντλία κενού και ενεργοποιούνται με διαδοχική προσθήκη δύο φορές από 6 mL μεθανόλης και 6 mL δις-απεσταγμένου νερού. Ακολούθως, μετά την ενεργοποίηση και πριν στεγνώσει το προσροφητικό υλικό, εκχυλίζονται 250 mL του υδατικού δείγματος με ρυθμό ροής  $2 \text{ mL min}^{-1}$ . Μετά το πέρας της εκχύλισης, οι μικροστήλες εκπλαίνονται με 6 mL υπερ-κάθαρου νερού και η υγρασία απομακρύνεται για 30 min παρουσία κενού. Στην συνέχεια ακολουθεί έκλουση με 3 mL διχλωρομεθανίου, 3 mL εξανίου και 3 mL ακετόνης. Το συνολικό έκλουσμα όγκου 9 mL, συλλέγεται σε δοκιμαστικό σωλήνα, συμπυκνώνεται υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύεται σε 200  $\mu\text{L}$  0,1 % μυρμηκικό οξύ σε νερό/μεθανόλη 90/10 (v/v). Τα τελικά εκχυλίσματα διηθούνται μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  μέσα σε γυάλινα φιαλίδια των 2 mL και εγχέονται στην ενόργανη

διάταξη LC-LTQ/Orbitrap-MS. Στο Σχήμα 7.4 παρουσιάζονται επιγραμματικά τα τρία πρωτόκολλα για την προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε επιφανειακά νερά.



**Σχήμα 7.4:** Σχηματική απεικόνιση πρωτοκόλλων για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα επιφανειακά νερά

## 7.14 Στερεά υποστρώματα

### 7.14.1 Ιζήματα

Για την προσδιορισμό των υπό μελέτη ενώσεων στα ιζήματα αναπτύχθηκαν δύο πρωτόκολλα εκχύλισης, ένα για κάθε μείγμα αναλυτών, βασισμένα στην Εκχύλιση QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).

#### Πρωτόκολλο 4 (μείγμα I)

Σε σωλήνες πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL, ζυγίζονται 5 g λυοφιλωμένου, κοσκινισμένου και ομογενοποιημένου δείγματος ιζήματος. Κατά το στάδιο της εκχύλισης, προστίθενται 10 mL δις απεσταγμένου νερού και το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 min. Ακολούθως, προστίθενται 10 mL ACN και οι σωλήνες ανακινούνται για 1 min σε vortex (4000 rpm) και έπειτα χειροκίνητα για 1 min. Στην συνέχεια προστίθενται 6 g προσροφητικού

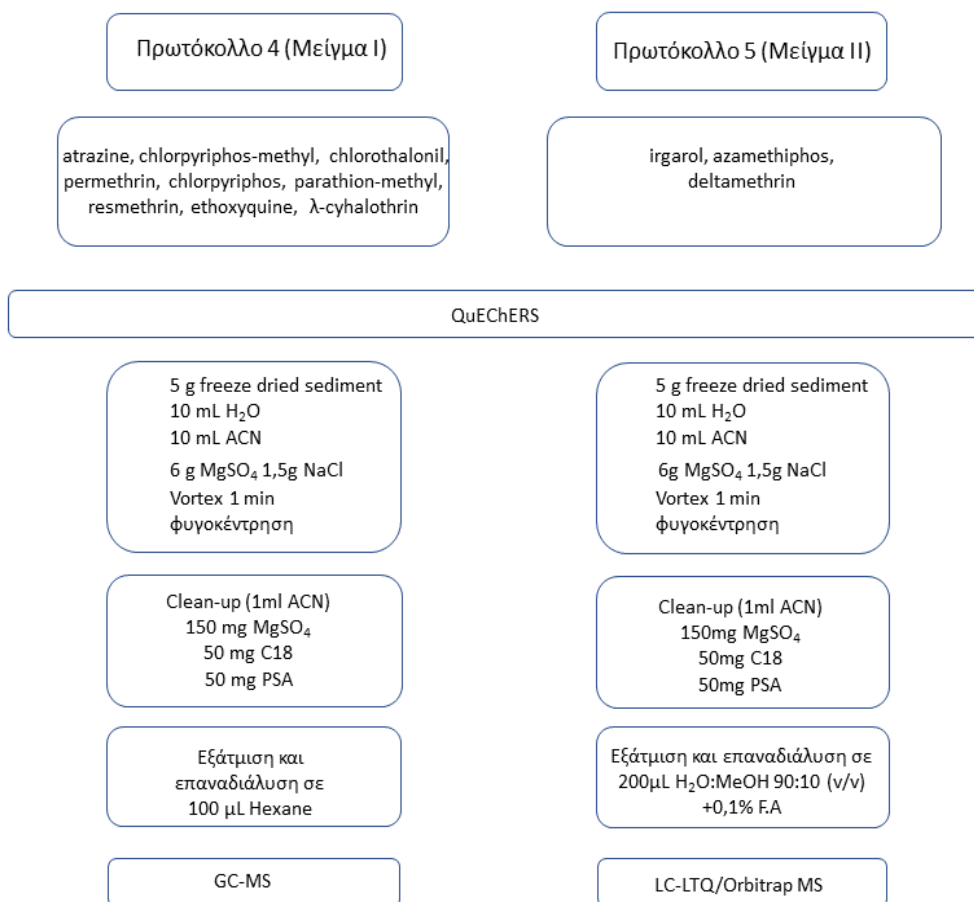
MgSO<sub>4</sub> και 1,5 g NaCl και ο σωλήνας ανακινείται έντονα αμέσως μετά την προσθήκη για 1 min χειροκίνητα, για να αποφευχθεί ο σχηματισμός συσσωματωμάτων και 1 min σε συσκευή περιδίνησης. Μετά την φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min στις 4000 rpm, ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού (clean-up), διεξάγοντας υγρή-στερεή εκχύλιση σε διασπορά (dispersive SPE).

Μέρος του υπερκείμενης στιβάδας (1 mL ακετονιτρίλιο) μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL ο οποίος είναι πληρωμένος με 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg C18 και 50 mg PSA. Έπειτα από ισχυρή ανάδευση, ανακίνηση στο vortex για 1 min και φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm, συλλέγεται ο οργανικός διαλύτης. Ακολουθεί συμπύκνωση, επαναδιάλυση σε 100 μL εξανίου, διήθηση μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,22 μm. Τέλος το δείγμα εγχέεται σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

### Πρωτόκολλο 5 (μείγμα II)

Αντίστοιχα για το μείγμα II, σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυπροπυλενίου των 50 mL, ζυγίζονται 5 g λυοφιλωμένου, κοσκινισμένου και ομογενοποιημένου δείγματος ιζήματος. Ακολούθως, προστίθενται 10 mL δις απεσταγμένου νερού και το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 min. Στην συνέχεια, προστίθενται 10 mL ACN και οι σωλήνες ανακινούνται για 1 min σε vortex (4000 rpm) και έπειτα χειροκίνητα για 1 min. Αμέσως μετά προστίθενται 6 g προσροφητικού MgSO<sub>4</sub> και 1,5 g NaCl και ο σωλήνας ανακινείται έντονα 1 min χειροκίνητα, για να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυσταλλικών συσσωματωμάτων και 1 min στο vortex. Μετά την φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min στις 4000 rpm, ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού (clean-up).

Μέρος του υπερκείμενης στιβάδας (οργανικός διαλύτης- 1 mL ακετονιτρίλιο) μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL ο οποίος περιέχει προ ζυγισμένες ποσότητες των προσροφητικών 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg C18 και 50 mg PSA. Έπειτα από ισχυρή ανάδευση, ανακίνηση στο vortex για 1 min και φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm, πραγματοποιείται συλλογή του διαλύτη με πιπέτες pasteur (Σχήμα 7.5). Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού, και επαναδιάλυση σε 200 μL 0,1% μυρμηκικό οξύ σε νερό:μεθανόλη 90:10 (v/v). Τέλος τα δείγματα διηθούνται μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,22 μm, και ακολουθεί ανάλυση σε διάταξη LC-LTQ/Orbitrap-MS.



**Σχήμα7.5:** Σχηματική απεικόνιση πειραματικής πορείας ιζημάτων (μείγμα I & II)

### 7.14.2 Θαλάσσιοι οργανισμοί

Για την προσδιορισμό των υπό μελέτη ενώσεων του μείγματος I (GC-MS) και του μείγματος II (LC-LTQ/Orbitrap-MS) για τα υποστρώματα: αχινοί (*Paracentrotus lividus*), ψάρια (*Gobio-gobio*), μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) και υδρόβιο μακρόφυτο (*Lemna Minor*) αναπτύχθηκαν τα αντίστοιχα πρωτόκολλα εκχύλισης, βασισμένα στη μέθοδο QuEChERS.

### Ψάρια και Μύδια

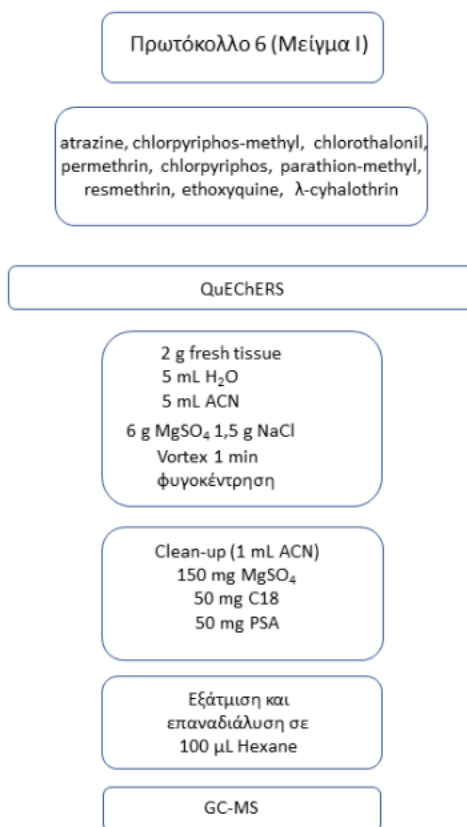
#### Πρωτόκολλο 6 (μείγμα I)

Σε σωλήνες πολυπροπυλενίου των 50 mL, ζυγίζονται 2 g νωπού, τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου δείγματος. Κατά το στάδιο της εκχύλισης, προστίθενται 5 mL κρύου απεσταγμένου νερού. Τα δείγματα παραμένουν σε κατάσταση ηρεμίας για 10 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητική ενυδάτωση. Στην συνέχεια προστίθενται 5 mL ACN και οι σωλήνες ανακινούνται για 1 min σε συσκευή vortex (4000 rpm), έπειτα χειροκίνητα για 1 min και το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 min. Ακολούθως, προστίθενται 6 g προσροφητικού MgSO<sub>4</sub> και 1,5 g NaCl, ο φυγοκεντρικός σωλήνας κλείνεται ερμητικά ανακινείται έντονα

αμέσως μετά την προσθήκη των αλάτων για 1 min χειροκίνητα και 1 min στο vortex. Μετά την φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min (στις 4000 rpm), σε αντίθεση με το υπόστρωμα των ιζημάτων, τα δείγματα παραμένουν στην κατάψυξη για 1 ώρα.

Στη συνέχεια ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού (clean-up). Μέρος της οργανικής στοιβάδας και συγκεκριμένα 1 mL ακετονιτριλίου μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL ο οποίος περιέχει με 150 mg  $MgSO_4$ , 100 mg C18 και 50 mg PSA. Έπειτα από ισχυρή ανάδευση, ανακίνηση σε συσκευή vortex για 1 min και φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm, η οργανική στοιβάδα συλλέγεται, συμπυκνώνεται και επαναδιαλύεται σε 100  $\mu$ L εξανίου. Το δείγμα φιλτράρεται με μεμβράνη PTFE 0,22  $\mu$ m και εγχέεται σε αέριο χρωματογράφο.

Το ίδιο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε με επιτυχία και για τα δείγματα μυδιών, αφού πρώτα εξετάστηκαν όλα τα αναλυτικά χαρακτηριστικά για το υπόστρωμα των μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*).



**Σχήμα 7.6:** Σχηματική απεικόνιση πειραματικής πορείας για τα υποστρώματα ψαριών και μυδιών

## Αχινοί

### Πρωτόκολλο 7 (μείγμα I)

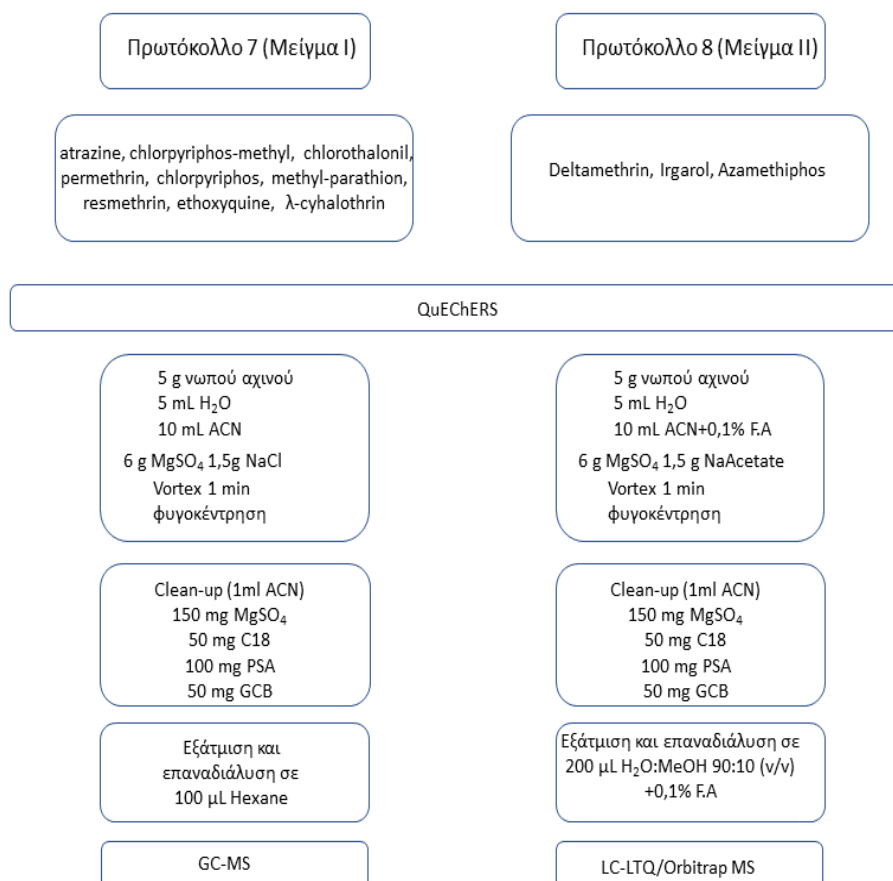
Σε σωλήνες πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL ζυγίζονται 5 g νωπού, τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου δείγματος αχινού (*Paracentrotus lividus*). Προστίθενται 5 mL κρύου δις απεσταγμένου νερού και το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία για 10 min. Ακολούθως, προστίθενται 10 mL ACN και οι σωλήνες ανακινούνται για 1 min σε vortex (4000 rpm) και έπειτα χειροκίνητα για 1 min. Στην συνέχεια προστίθενται 6 g προσροφητικού  $MgSO_4$  και 1,5 g NaCl και ο σωλήνας ανακινείται έντονα για 1 min, για να αποφευχθεί ο σχηματισμός συσσωματωμάτων και 1 min σε συσκευή περιδίνησης. Μετά την φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min στις 4000 rpm, ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού (clean-up), διεξάγοντας υγρή-στερεή εκχύλιση σε διασπορά (dispersive SPE).

Όπως και στο υπόστρωμα των ψαριών και των μυδιών, για τα υποστρώματα των αχινών, πριν το (clean-up), πραγματοποιήθηκε παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη για 1 ώρα. Μέρος του υπερκείμενης στιβάδας (1 mL ακετονιτρίλιο) μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL ο οποίος περιέχει προζυγισμένα προσροφητικά 150 mg  $MgSO_4$ , 50 mg C18, 100 mg PSA και 50 mg GCB. Έπειτα από ισχυρή ανάδευση, ανακίνηση στο vortex για 1 min και φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm, συλλέγεται ο οργανικός διαλύτης. Όμοια με τα προηγούμενα πρωτόκολλα, ακολουθεί συμπύκνωση, επαναδιάλυση σε 100  $\mu$ L εξανίου, διήθηση μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,22  $\mu$ m. Ακολουθεί ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

### Πρωτόκολλο 8 (μείγμαII)

Ζυγίζονται 5 g νωπού, τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου δείγματος αχινού (*Paracentrotus lividus*) σε σωλήνα falcon των 50 mL και προστίθενται 5 mL δις απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια προστίθενται 10 mL ACN με 0,1% μυρμηκικό οξύ. Ο σωλήνας αναδεύεται έντονα και στην συνέχεια παραμένει κατάσταση ηρεμίας για 10 min. Μετά την προσθήκη 6 g  $MgSO_4$  και 1,5 g  $CH_3COONa$  ο σωλήνας ανακινείται έτσι ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής αλληλεπίδραση του οργανικού διαλύτη με όλο το δείγμα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm.

Κατά το στάδιο του καθαρισμού, 1 mL ακετονιτρίλιου μεταφέρεται σε falcon των 15mL ο οποίος περιέχει 150 mg  $MgSO_4$ , 100 mg PSA, 50 mg C18 και 50 mg GCB. Έπειτα από έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm συλλέγεται ο οργανικός διαλύτης, συμπυκνώνεται, επαναδιαλύεται σε 200  $\mu$ L 0,1% μυρμηκικό οξύ σε νερό:μεθανόλη 90:10 (v/v) και ακολουθεί φιλτράρισμα και ανάλυση σε διάταξη LC-LTQ/Orbitrap-MS.



**Σχήμα 7.7:** Σχηματική απεικόνιση πρωτοκόλλων για τα δείγματα αχινών (μείγμα I & II)

### 7.14.3 Υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna Minor*

#### Πρωτόκολλο 9 (μείγμα I)

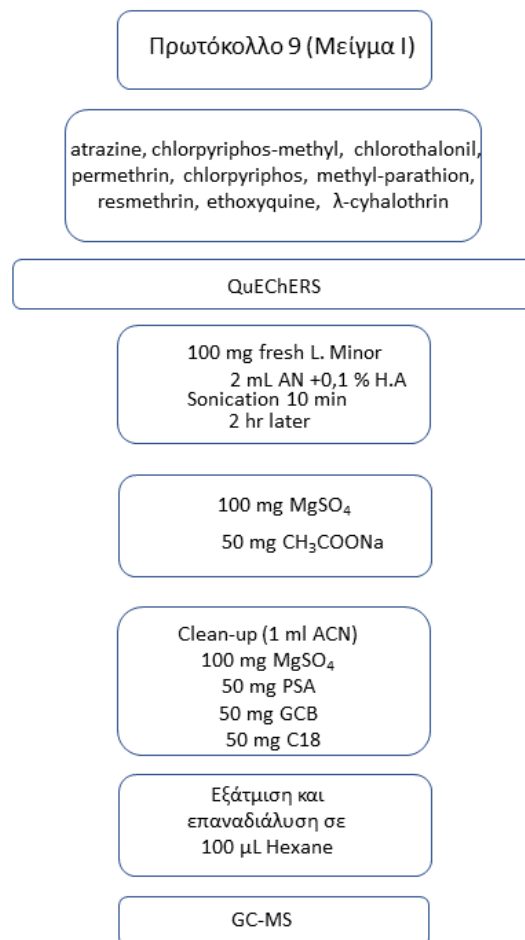
Ζυγίζονται 100 mg τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου υδρόβιου μακρόφυτου *Lemna Minor* σε falcon και προστίθενται 2 mL ακετονιτρίλιου. Το μείγμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 10 ml και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες (απουσία φωτός) έτσι ώστε να εξασφαλιστεί πλήρης αλληλεπίδραση του δείγματος με τον οργανικό διαλύτη.

Στη συνέχεια προστίθενται 100 mg MgSO<sub>4</sub> και 50 mg NaCl. Ακολουθεί έντονη χειροκίνητη ανακίνηση για 1 min και 1 min σε συσκευή περιδίνησης και έπειτα χειροκίνητα για 1 min. Μετά την φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min στις 4000 rpm, ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού (clean- up).

Μέρος του υπερκείμενης στιβάδας (1 mL ακετονιτρίλιο) μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL ο οποίος είναι πληρωμένος με 100 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg ουδέτερης Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 50 mg GCB (αναλογία 1:1 με αλούμινα) και 50 mg PSA. Έπειτα από ισχυρή ανάδευση, ανακίνηση στο vortex για 1 min και φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm. Το τελικό



έκλουσμα, συλλέγεται, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού, διηθείται με μεμβράνη PTFE, 0,22 μm, επαναδιαλύεται σε 100 μL εξανίου και ακολουθεί έγχυση σε GC-MS.



**Σχήμα 7.8:** Σχηματική απεικόνιση πρωτοκόλλου για δείγματα υδρόβιου μακρόφυτου *Lemna Minor* (μείγμα I)



---

## Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---



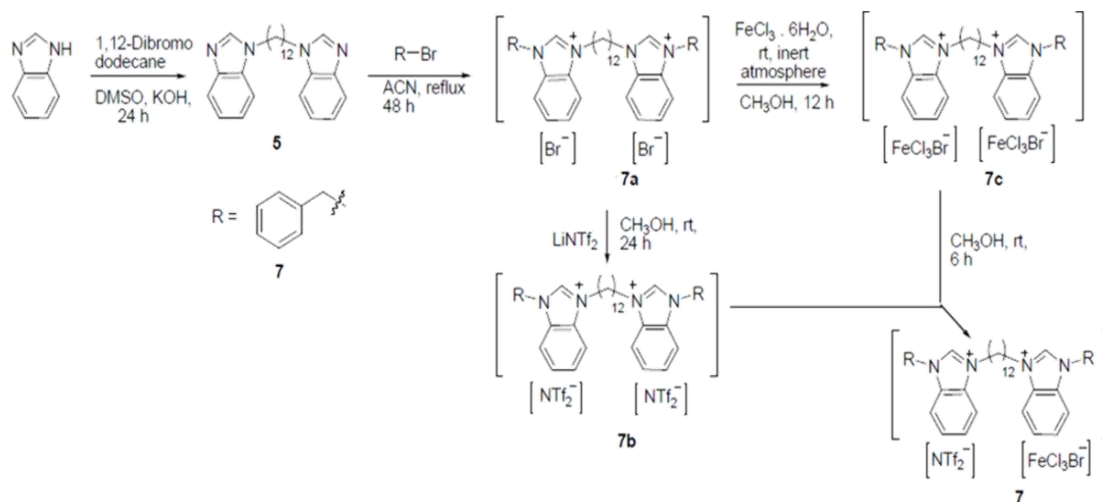
## ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

## A. ΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

**8.1 Σύνθεση μαγνητικών ιοντικών υγρών 1,12 di(3-benzylbenzimidazolium) dodecane-bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]- imide bromo- trichloroferate [(BBnIM)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>][NTf<sub>2</sub>][FeCl<sub>3</sub>Br]**

Η συνθετική πορεία του συμμετρικού διακατιόντος 1,12 di(3-benzylbenzimidazolium) dodecane-bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]- imide bromo- trichloroferate [(BBnIM)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>][NTf<sub>2</sub>][FeCl<sub>3</sub>Br], περιλαμβάνει 4 ενδιάμεσα προϊόντα και ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.1. Η στρατηγική σύνθεσης του μαγνητικού ιοντικού υγρού βασίστηκε στη σύνθεση του πρόδρομου άλατος βρωμίου και στην επακόλουθη αντίδρασή του με FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, το οποίο προσδίδει παραμαγνητικές ιδιότητες στο μόριο.

Ο χαρακτηρισμός της σύστασης και της δομής των ενδιάμεσων προϊόντων που προέκυψαν επιτεύχθηκε όπου αυτό ήταν εφικτό, με τεχνικές όπως η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υδρογόνου (<sup>1</sup>H NMR), η φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS), η φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR), και τεχνικές θερμικής ανάλυσης όπως η θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) και η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC).



**Σχήμα 8.1:** Συνθετική πορεία συμμετρικού διακατιόντος και ενδιάμεσα στάδια σύνθεσης (Nacham et al., 2015)

## 8.2 Σύνθεση ενδιάμεσου 1

Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με τροποποίηση της βιβλιογραφικής μεθόδου (Nacham et al., 2015) ως προς τις ποσότητες διαλυτών, ουσιών και τους χρόνους βελτιώνοντας την απόδοση της προτεινόμενης μεθοδολογίας.

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL, προστίθενται 2 g (17 mmol) βενζιμιδαζολίου και 2,01 g (35 mmol) υδροξείδιο του καλίου σε 30 mL διμεθυλοσουλφοξείδιο. Το προκύπτον μίγμα αναδεύεται για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 2,8 g (8,53 mmol) 1,12 διβρωμο δωδεκάνιο και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, 30 mL υπερ καθαρού νερού προστίθενται στην σφαιρική φιάλη και όλο το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη με στρόφιγγα από teflon των 500 mL (Σχήμα 8.2).

Το προϊόν της αντίδρασης, εκχυλίζεται 4 φορές με 40 mL χλωροφορμίου. Λόγω διαφοράς στην πυκνότητα, το χλωροφόρμιο μαζί με το προϊόν της αντίδρασης κατανέμεται στην κάτω στοιβάδα. Όλος ο όγκος χλωροφορμίου συλλέγεται και μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη ενός λίτρου όπου ακολουθούν πλύσεις με 50 mL υπερ-κάθαρου νερού μέχρι το pH της υδατικής φάσης να γίνει ουδέτερο.



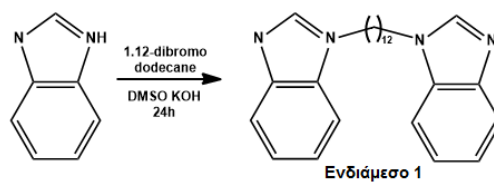
**Σχήμα 8.2:** Συλλογή προϊόντος της αντίδρασης με την χρήση διαχωριστικής χοάνης

Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται παρουσία άνυδρου θειικού νατρίου και παραλαμβάνεται παχύρευστο διάφανο υγρό. Ο οργανικός διαλύτης (χλωροφορμίου) απομακρύνεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το πρώτο ενδιάμεσο της αντίδρασης, *ένωση 1*, προκύπτει μετά από ξήρανση στους 70 °C, εντός ειδικού κλιβάνου ξήρανσης, υπό ελαττωμένη πίεση, συνδεδεμένο με αντλία κενού για 12 ώρες (Σχήμα 8.3).



**Σχήμα 8.3:** Ενδιάμεσο προϊόν 1, πριν και μετά την εξάτμιση χλωροφορμίου

Το τελικό προϊόν της αντίδρασης ζυγίζεται και υπολογίζεται η απόδοση της αντίδρασης. Ακολουθεί ο καθαρισμός της ένωσης με την χρήση χρωματογραφίας στήλης και ο χαρακτηρισμός του προϊόντος. Η πειραματική πορεία σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.4 ενώ τα στοιχεία της αντίδρασης στον Πίνακα 8.1.



**Σχήμα 8.4:** Πειραματική πορεία σύνθεσης Ενδιάμεσης ένωσης 1

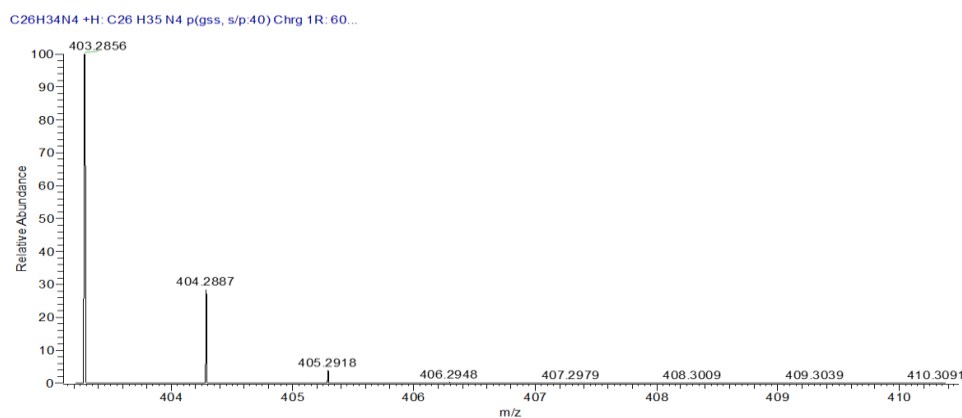
**Πίνακας 8.1:** Στοιχεία αντίδρασης Ενδιάμεσης ένωσης 1

<b>ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ 1</b>	
Διάρκεια σύνθεσης ενδιάμεσου	42 ώρες
Μορφή	Λευκή κρυσταλλική σκόνη
Απόδοση αντίδρασης	89 %

### 8.3 Χαρακτηρισμός Ενδιάμεσου 1

#### 8.3.1 Φασματομετρία με ιοντισμό Electrospray (ESI-MS)

Το φάσμα ESI(+)-MS της ενδιάμεσης ένωσης 1 που ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο θετικού ιοντισμού παρουσιάζει μια κορυφή με λόγο  $m/z = 403,2846$  που αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό ιόν  $[M+H]^+$ , το οποίο ταυτίζεται με τη θεωρητική τιμή του μοριακού ιόντος  $C_{26}H_{35}N_4^+$  (403,2856) (Σχήμα 8.5).



**Elemental composition search on mass 403.2846**  
(Isotopes C-12, H-1, N-14)

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
403.2846	403.2856	-2.51	11.5	C <sub>26</sub> H <sub>35</sub> N <sub>4</sub>

**Σχήμα 8.5:** Φάσμα ESI-MS της ενδιάμεσης ένωσης 1



### 8.3.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υδρογόνου ( $^1\text{H}$ NMR)

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης 1, παρατηρούνται έξι σήματα συντονισμού (Σχήμα 8.6). Η ακριβής απόδοση των κορυφών πραγματοποιήθηκε με βάση το φάσμα δύο διαστάσεων COSY. Τα τρία από αυτά στην αλειφατική περιοχή του φάσματος, μέχρι τα 5 ppm και τα άλλα τρία στην αρωματική περιοχή. Η απλή κορυφή στα 8,22 ppm αποδόθηκε στα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια H<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>'.

Στην αρωματική περιοχή επίσης παρουσιάζονται δύο πολλαπλές κορυφές στα 7,21 και 7,62 ppm. Οι κορυφές αυτές οφείλονται στα πρωτόνια H<sub>5</sub>-H<sub>5</sub>', H<sub>6</sub>-H<sub>6</sub>' και H<sub>4</sub>-H<sub>4</sub>', H<sub>7</sub>-H<sub>7</sub>' αντίστοιχα. Τα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια στην αλειφατική περιοχή είναι τα 4 πρωτόνια των δύο -CH<sub>2</sub> ομάδων, που συνδέονται με τα άτομα αζώτου των βενζιμιδαζολικών δακτυλίων.

Τέλος η κορυφή στα 1,14 ppm είναι αποτέλεσμα συντονισμού 16 υδρογόνων του δωδεκανίου. Όλα τα παραπάνω μας υποδεικνύουν τη σύζευξη του δωδεκανίου στους βενζιμιδαζολικούς δακτυλίους. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 8.2.

**Πίνακας 8.2:** Τιμές των κορυφών  $^1\text{H}$  NMR, σε ppm, των πρωτονίων της ενδιάμεσης ένωσης 1

H <sub>2</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>6</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>2</sub> '	H <sub>4</sub> '
8,22(s)	7,62(mt)	7,21(mt)	7,21(mt)	7,62(mt)	8,22(s)	7,62(mt)
H <sub>5</sub> '	H <sub>6</sub> '	H <sub>7</sub> '	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>	H <sub>a</sub> '
7,21(mt)	7,21(mt)	7,62(mt)	4,21(t)	1,75(mt)	1,14(mt)	4,21(t)
H <sub>b</sub> '						
1,75(mt)						



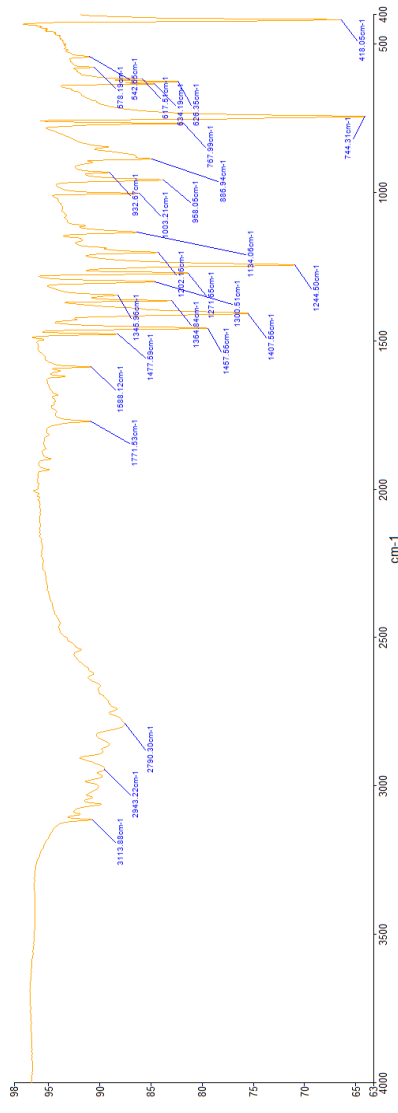
δαχτυλίου. Οι απορροφήσεις αυτές βρίσκονται εντός εύρους  $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  που συμφωνά με τα βιβλιογραφικά δεδομένα εντοπίζεται ο αρωματικός διπλός δεσμός άνθρακα με άνθρακα (Hastak et al., 2012).

Η θεωρητική τιμή δόνηση τάσης διπλού δεσμού άνθρακα αζώτου (**C=N**) εντοπίζεται στα  $1496\text{ cm}^{-1}$  που συμπίπτει με την απορρόφηση στα  $1495\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα της ενδιάμεσης ένωσης και στα  $1497\text{ cm}^{-1}$  στο βενζιμιδαζόλιο (Yankova and Radev, 2016; Kadhim and Kazim, 2018 και Skieneh et al., 2016).

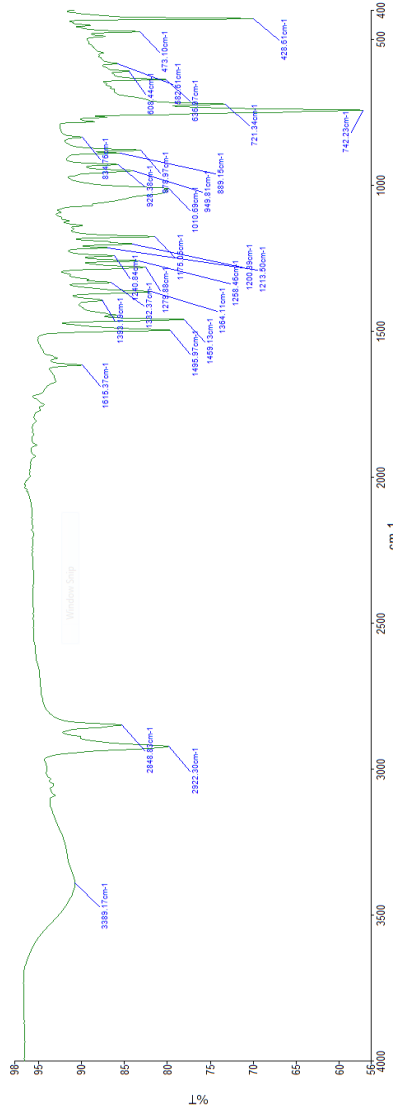
Η θεωρητική τιμή της δόνησης τάσης του δεσμού (**C-N**) στον αρωματικό δαχτύλιο, απαντάται στα  $1280\text{ cm}^{-1}$ , γεγονός που εξηγεί τις απορροφήσεις στα  $1271\text{ cm}^{-1}$  και  $1278\text{ cm}^{-1}$  αντίστοιχα για τα φάσματα της αρχικής ένωσης και της ενδιάμεσης 1 (Kadhim and Kazim, 2018).

Στα  $744\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα βενζιμιδαζολίου και  $742\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα της ενδιάμεσης ένωσης 1, παρουσιάζεται η δόνηση κάμψης του δεσμού (**C-H**), σε πλήρη συμφωνία με την θεωρητική τιμή  $738\text{ cm}^{-1}$ , ενώ η δόνηση κάμψης στο επίπεδο (in plane-C-H bending) (**C-H**) στα  $1010\text{ cm}^{-1}$  και  $1003\text{ cm}^{-1}$  αντίστοιχα με θεωρητική τιμή  $1035\text{ cm}^{-1}$  (Socratic aromatic ring).

Η δόνηση στα  $428\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στον δεσμό (**C-C**) σε απόλυτη συμφωνία με την θεωρητική τιμή  $430\text{ cm}^{-1}$  (Σχήμα 8.7). Από όλα τα παραπάνω γίνεται αντιληπτή η επιτυχής σύνθεση της ενδιάμεσης ένωσης 1.



(α)



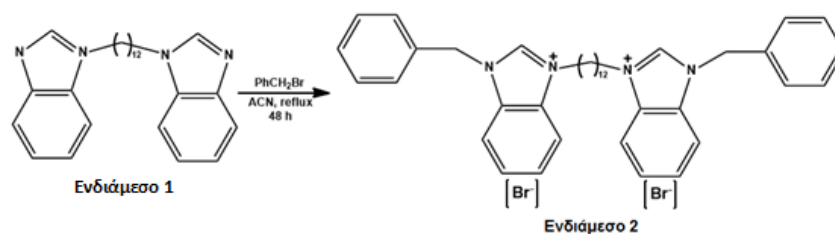
(β)

Σχήμα 8.7: Φάσματα FT-IR: (α) Βενζιμιδαζολίου, (β) Ενδιάμεσης ένωσης 1

#### 8.4 Σύνθεση ενδιάμεσου 2 (dicationic bromide salt)

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL που περιέχει 15 mL ακετονιτριλίου, διαλύονται 0,499 g (1,24 mmol) της ενδιάμεσης ένωσης 1, και το μίγμα αναδεύεται για 5 min. Στην συνέχεια προστίθενται 0,444 g (2,6 mmol) benzyl bromide και ακολουθεί ανάδευση με διάταξη επαναρροής (reflux) εφοδιασμένη με κάθετο ψυκτήρα, στους 82 °C για 48 ώρες.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, το ακετονιτρίλιο απομακρύνεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν εκπλένεται με 4 x 20 mL διαιθυλαιθέρα, σε λουτρό υπερήχων για 15 min. Ακολουθεί ξήρανση της ένωσης 2 στους 80 °C σε ειδικό κλίβανο ξήρανσης υπό ελαττωμένη πίεση συνδεδεμένο με αντλία κενού για 6 ώρες μέχρι πλήρους ξήρανσης, προκειμένου να απομακρυνθούν υπολειμμάτων διαλυτών. Τέλος παραλαμβάνεται το επιθυμητό υποκίτρινο στερεό. Η πειραματική πορεία σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.8.



Σχήμα 8.8: Πειραματική πορεία σύνθεσης Ενδιάμεσου 2

Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ανακρυστάλλωσης. Μέρος της ένωσης διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο. Στην συνέχεια προστίθεται στάγδην εξάνιο μέχρις ότου σχηματιστεί θόλωμα και καταβυθιστεί το προϊόν. Η σφαιρική φιάλη αποθηκεύεται στους -20 °C για μία ώρα. Εν συνεχεία το διάλυμα διηθείται με ηθμό Hirsch υπό κενό και το κρυσταλλικό προϊόν συλλέγεται. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό. Ο αποχρωματισμός του στερεού (από κίτρινο σε λευκό) οφείλεται στην απομάκρυνση των βρωμιών. Ακολουθεί ξήρανση και αποθήκευση σε ξηραντήρα κενού. Τα στοιχεία της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.3.

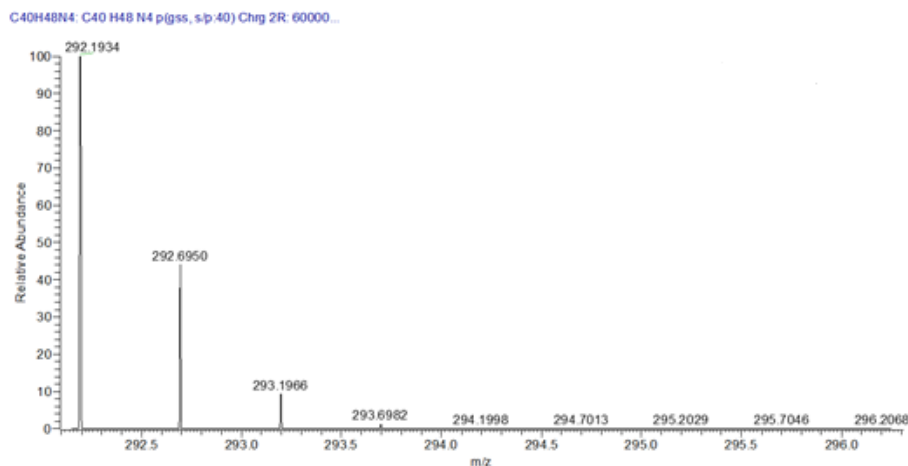
Πίνακας 8.3: Στοιχεία αντίδρασης ενδιάμεσης ένωσης 2

ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ 2	
Διάρκεια σύνθεσης ενδιάμεσου	54 ώρες
Μορφή	Υποκίτρινο στερεό
Απόδοση αντίδρασης	73 %

## 8.5 Χαρακτηρισμός ενδιάμεσου 2

### 8.5.1 Φασματομετρία με ιονισμό Electrospray (ESI-MS)

Στο φάσμα ESI+MS της ενδιάμεσης ένωσης 2 που ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο του θευτικού ιονισμού κυριαρχεί η κορυφή με λόγο  $m/z = 292,1927$ . Η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στο ψευδομοριακό  $\{M+2H\}^{2+}$ , το οποίο ταυτίζεται με τη θεωρητική τιμή του μοριακού ιόντος  $[C_{40}H_{50}N_4]^{2+}$  (292,1934) (Σχήμα 8.9).



#### Elemental composition search on mass 292.1927 (Isotopes C-12, H-1, N-14)

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
292.1927	292.1934	-2.23	19.0	C40 H48 N4

Σχήμα 8.9: Φάσμα ESI+MS της ενδιάμεσης ένωσης 2

### 8.5.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υδρογόνου ( $^1H$ NMR)

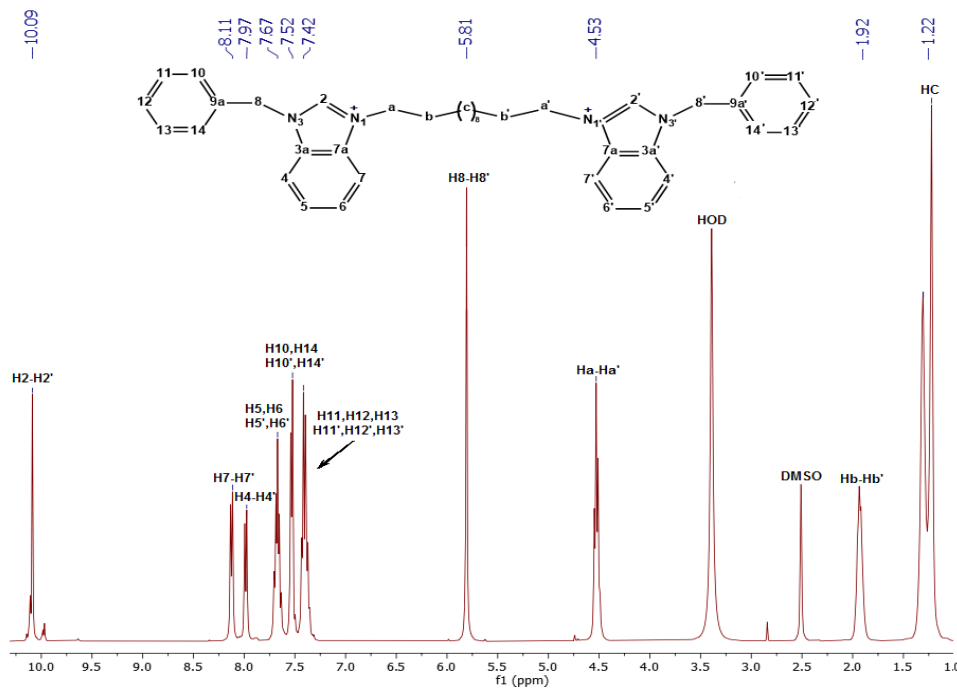
Στην παρακάτω εικόνα (Σχήμα 8.10) απεικονίζεται το φάσμα  $^1H$  NMR της ενδιάμεσης ένωσης 2. Η απόδοση των κορυφών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και NOESY. Η απλή κορυφή στα 10,09 ppm αποδίδεται στα πρωτόνια H2-H2'.

Συγκριτικά με το ενδιάμεσο 1, τα πρωτόνια αυτά μετατοπίστηκαν κατά +1,87 ppm, μετατόπιση που οφείλεται στην εμφάνιση θετικού φορτίου στα άζωτα N1 και N1'. Τα άζωτα αυτά για να σταθεροποιήσουν το θετικό φορτίο τους έλκουν ηλεκτρονιακή πυκνότητα από τα γειτονικά τους υδρογόνα (H2-H2'). Για τον ίδιο ακριβώς λόγο έχουμε και την μετακίνηση σε χαμηλότερα πεδία συντονισμού των πρωτονίων α των  $-CH_2$  ομάδων (+0,3 ppm).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν τη σύζευξη της βενζυλομάδας στα άτομα αζώτου (N3, N3') των βενζιμιδαζολικών δακτυλίων. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.4.

**Πίνακας 8.4:** Τιμές των κορυφών  $^1\text{H}$  NMR, σε ppm, των πρωτονίων της ενδιάμεσης ένωσης 2

H <sub>2</sub>	H <sub>4</sub>	H <sub>5</sub>	H <sub>6</sub>	H <sub>7</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>2'</sub>
10,09(s)	7,97(d)	7,67(mt)	7,67(mt)	8,11(d)	5,81(s)	10,09(s)
H <sub>4'</sub>	H <sub>5'</sub>	H <sub>6'</sub>	H <sub>7'</sub>	H <sub>8'</sub>	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>
7,97(d)	7,67(mt)	7,67(mt)	8,11(d)	5,81(s)	4,53(t)	1,92(mt)
H <sub>c</sub>	H <sub>a'</sub>	H <sub>b'</sub>	H <sub>10</sub>	H <sub>11</sub>	H <sub>12</sub>	H <sub>13</sub>
1,22(mt)	4,53(t)	1,92(mt)	7,52(d)	7,42(mt)	7,42(mt)	7,42(mt)
H <sub>14</sub>	H <sub>10'</sub>	H <sub>11'</sub>	H <sub>12'</sub>	H <sub>13'</sub>	H <sub>14'</sub>	
7,52(d)	7,52(d)	7,42(mt)	7,42(mt)	7,42(mt)	7,52(d)	



**Σχήμα 8.10.** Απεικόνιση του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της ενδιάμεσης ένωση 2, με απόδοση των κορυφών, σε διαλύτη DMSO- $d_6$  στους 298 K

### 8.5.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR

Συγκρίνοντας το φάσμα της ένωσης 2 σε σχέση με το φάσμα της αρχικής ένωσης βένζιμιδαζολίου, παρατηρείται η απουσία δόνησης στα  $3113\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού (**N-H**), γεγονός που αποτελεί έμμεση ένδειξη της επιτυχούς σύνθεσης της *ενδιάμεσης ένωσης 2*.

Παραβάλλοντας το φάσμα την *ενδιάμεσης ένωσης 2* (Σχήμα 8.11), τόσο με το φάσμα της *ενδιάμεσης ένωσης 1* όσο και με της αρχικής ένωσης του βενζιμιδαζολίου, παρατηρείται η δόνηση τάσης του δεσμού αλειφατικών υδρογόνων (**C-H**) στα  $2922\text{ cm}^{-1}$  σε πλήρη ταύτιση με την απορρόφηση στην ενδιάμεση ένωση 1 στα  $2922\text{ cm}^{-1}$  αλλά και με την θεωρητική τιμή στα  $2925\text{ cm}^{-1}$ , υποδηλώνοντας την σύνδεση της αλκυλομάδας στο βένζιμιδαζόλιο (Kadhim and Kazim, 2018 και Zhu et al., 2013).

Στα  $1615\text{ cm}^{-1}$ , σε πλήρη συμφωνία με την απορρόφηση στα  $1615$  στο φάσμα της ενδιάμεσης ένωσης 1 και με την θεωρητική τιμή στα  $1617\text{ cm}^{-1}$ , παρατηρείται απορρόφηση που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού αλειφατικού άνθρακα με άζωτο (**C-N**) (Skieneh et al., 2016). Το γεγονός ότι η απορρόφηση αυτή απουσιάζει από το φάσμα της αρχικής ένωσης του βενζιμιδαζολίου υποδηλώνει την επιτυχή πρόσδεση της αλκυλομάδας στο αρχικό μόριο.

Από την άλλη μεριά, η δόνηση τάσης του δεσμού (**C-H**) στον αρωματικό δαχτύλιο, εντοπίζεται στο μεν φάσμα της *ενδιάμεσης ένωσης 1* στα  $2848\text{ cm}^{-1}$  ενώ στο φάσμα της *ενδιάμεσης ένωσης 2* στα  $2852\text{ cm}^{-1}$  (Spectroscopy IR). Η θεωρητική τιμή του δεσμού (**C-N**) στον αρωματικό δαχτύλιο, απαντάται στα  $1280\text{ cm}^{-1}$ , γεγονός που εξηγεί την απορρόφηση στα  $1265\text{ cm}^{-1}$  (Kadhim and Kazim, 2018). Στα  $748\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα της *ενδιάμεσης ένωσης 2* εντοπίζεται η δόνηση κάμψης του δεσμού (**C-H**), σε πλήρη συμφωνία με την θεωρητική τιμή  $738\text{ cm}^{-1}$  καθώς και με την απορρόφηση στο φάσμα της *ενδιάμεσης ένωσης 1* στα  $742\text{ cm}^{-1}$ .

Η δόνηση κάμψης στο επίπεδο in plane-C-H bending (**C-H**) απαντάται στα  $1012\text{ cm}^{-1}$  σε αντιστοιχία με την θεωρητική τιμή και με την απορρόφηση στο φάσμα της *ενδιάμεσης ένωσης 1* στα  $1010\text{ cm}^{-1}$  (Socratic aromatic ring, orgchemboulder Spectroscopy).

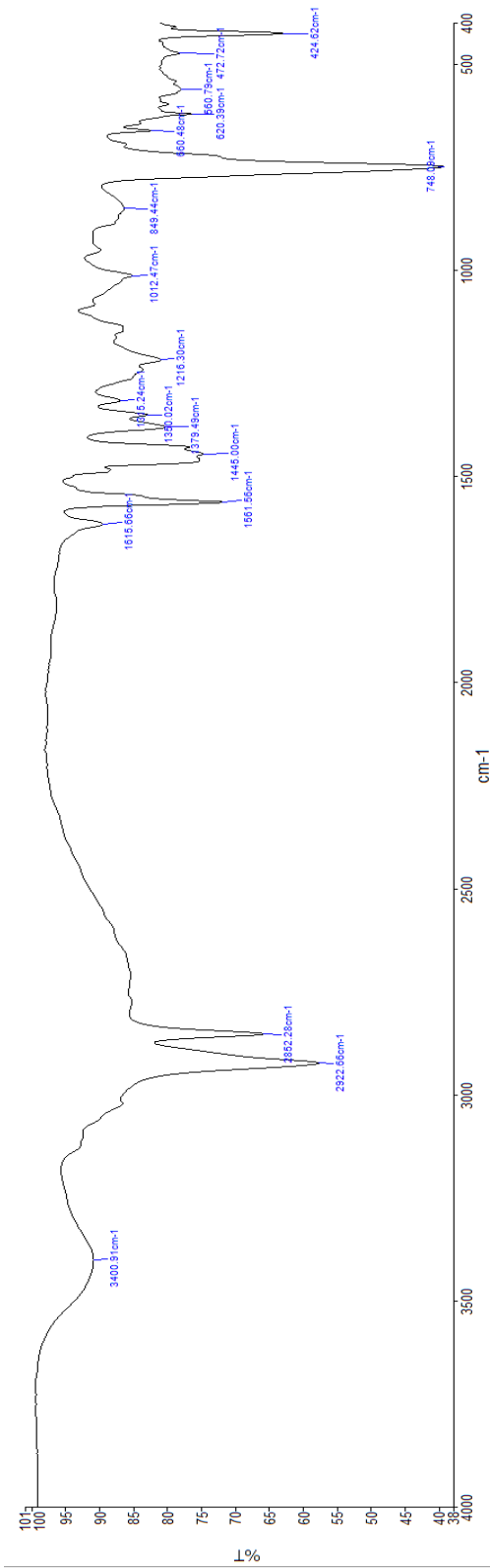
Η δόνηση στα  $424\text{ cm}^{-1}$ , αποδίδεται στην δόνηση τάσης του δεσμού (**C-C**) σε απόλυτη συμφωνία με την θεωρητική τιμή  $430\text{ cm}^{-1}$  και με το φάσμα της *ενδιάμεσης ένωσης 1* ( $428\text{ cm}^{-1}$ ).

Οι απορροφήσεις βρίσκονται εντός εύρους  $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  που συμφωνά με τα βιβλιογραφικά δεδομένα εντοπίζεται ο αρωματικός διπλός δεσμός άνθρακα με άνθρακα (Hastak et al., 2012). Η απορρόφηση που παρατηρείται στα  $1445\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην δόνηση τάσης (**C=C**) του αρωματικού δαχτυλίου σε συμφωνία τόσο με την θεωρητική τιμή



όσο και με την απορρόφηση στα δύο άλλα φάσματα (στα  $1457\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα του βένζιμιδαζολίου και στα  $1459\text{ cm}^{-1}$  για το *ενδιάμεσο 1*).

Στα  $1561\text{ cm}^{-1}$  εντοπίζεται η δόνηση τάσης διπλού δεσμού άνθρακα (**C=N**) με θεωρητική τιμή  $1564\text{ cm}^{-1}$  (Kadhim and Kazim, 2018; Skieneh et al., 2016 και Yankova and Radev, 2016). Τέλος η χαρακτηριστική απορρόφηση στα  $849\text{ cm}^{-1}$ , οποία απουσιάζει από τα δύο άλλα φάσματα, υποδηλώνει σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, την δόνηση τάσης του δεσμού (**C-C**) μεταξύ ενός αλειφατικού και ενός αρωματικού άνθρακα και επιβεβαιώνει την επιτυχή σύνδεση της βενζιλομάδας στο *ενδιάμεση ένωση 1* (Kadhim and Kazim, 2018).



Σχήμα 8.11: Φάσματα FT-IR ενδιάμεσης ένωσης 2

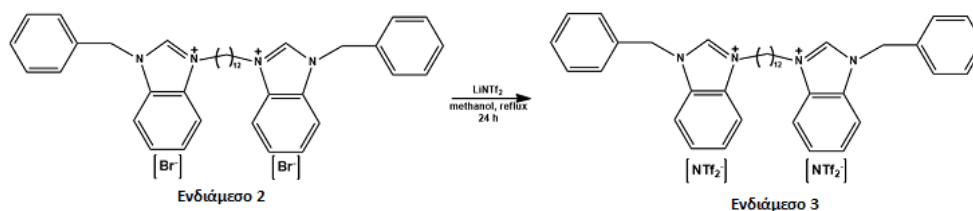
### 8.6 Σύνθεση ενδιάμεσου 3

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL που περιέχει 30 mL μεθανόλης, προστίθενται 0,744 g (1 mmol) της ενδιάμεσης ένωσης 2, και το διάλυμα αναδεύεται για 5 min. Στο προκύπτον διάλυμα προστίθενται 0,632 g lithium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide (2.2 mmol) και ακολουθεί ανάδευση με διάταξη επαναροής (reflux) εφοδιασμένη με κάθετο ψυκτήρα, στους 64 °C για 24 ώρες.

Μετά την εξάτμιση του διαλύτη σε περιστροφικό εξατμιστήρα, παραλαμβάνεται διαυγές, άχρωμο, με μεγάλο ιξώδες υγρό. Το προϊόν εκπλένεται με περίσσεια υπερ καθαρού νερού σε λουτρό υπερήχων. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσης των 200 mL και ελέγχεται η παρουσία αλογονιδίων ( $\text{Br}^-$ ) με προσθήκη νιτρικού αργύρου ( $\text{AgNO}_3$ ) και καταβύθιση ιζήματος  $\text{AgBr}$ , σύμφωνα με την αντίδραση 8.1:



Για την απομάκρυνση της υγρασίας χρησιμοποιείται διάταξη ελαίου με χρήση υγρού αζώτου (θερμοκρασία βρασμού -195,8 °C) και τελικά παραλαμβάνεται κρυσταλλικό λευκό στερεό. Η πειραματική πορεία σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.12 ενώ τα στοιχεία της αντίδρασης στον Πίνακα 8.5.



**Σχήμα 8.12:** Πειραματική πορεία σύνθεσης Ενδιάμεσης Ένωσης 3

Για τον καθαρισμό του προϊόντος χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανακρυστάλλωσης. Η ένωση διαλυτοποιείται σε διχλωρομεθάνιο. Στην συνέχεια προστίθεται στάγδην εξάνιο μέχρις ότου σχηματιστεί θόλωμα και καταβυθιστεί το προϊόν. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται στους -20 °C για μία ώρα. Εν συνεχεία το διάλυμα διηθείται με ηθμό Hirsch υπό κενό και το κρυσταλλικό προϊόν συλλέγεται. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό. Επομένως η διαδικασία καθαρισμού επαναλαμβάνεται μέχρι τελικά τον αποχρωματισμό του στερεού. Τέλος παραλαμβάνεται λευκό στερεό. Ακολουθεί ξήρανση και αποθήκευση σε ξηραντήρα κενού.

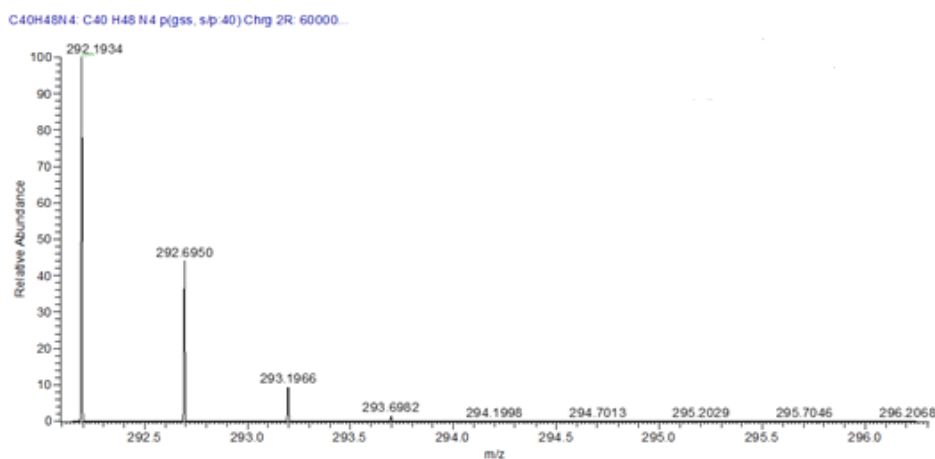
**Πίνακας 8.5:** Στοιχεία αντίδρασης ενδιάμεσης ένωσης 3

ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ 3	
Διάρκεια σύνθεσης ενδιάμεσου	24 ώρες
Μορφή	Υποκίτρινο στερεό
Απόδοση αντίδρασης	84 %

## 8.7 Χαρακτηρισμός ενδιάμεσου 3

### 8.7.1 Φασματομετρία με ιονισμό Electrospray (ESI-MS)

Όπως ήταν αναμενόμενο το φάσμα ESI-MS της ενδιάμεσης ένωσης 3 είναι ίδιο με εκείνο της ενδιάμεσης ένωσης 2, καθώς αλλάζει μόνο το αντισταθμιστικό ανιόν. Στην θετική περιοχή του φάσματος παρουσιάζεται μια κορυφή σε λόγο  $m/z = 292,1922$  που αντιστοιχεί στο διφορτιακό κατιόν  $\{3\}^{+2}$ , καθώς ταυτίζεται με τη θεωρητική τιμή του μοριακού ιόντος  $[C_{40}H_{48}N_4]^{2+}$  (292,1934) (Σχήμα 8.13).



#### Elemental composition search on mass 292.1922

(Isotopes C-12, H-1, N-14)

m/z	Theo. Mass	Delta (ppm)	RDB equiv.	Composition
292.1922	292.1934	-4.21	19.0	C40 H48 N4

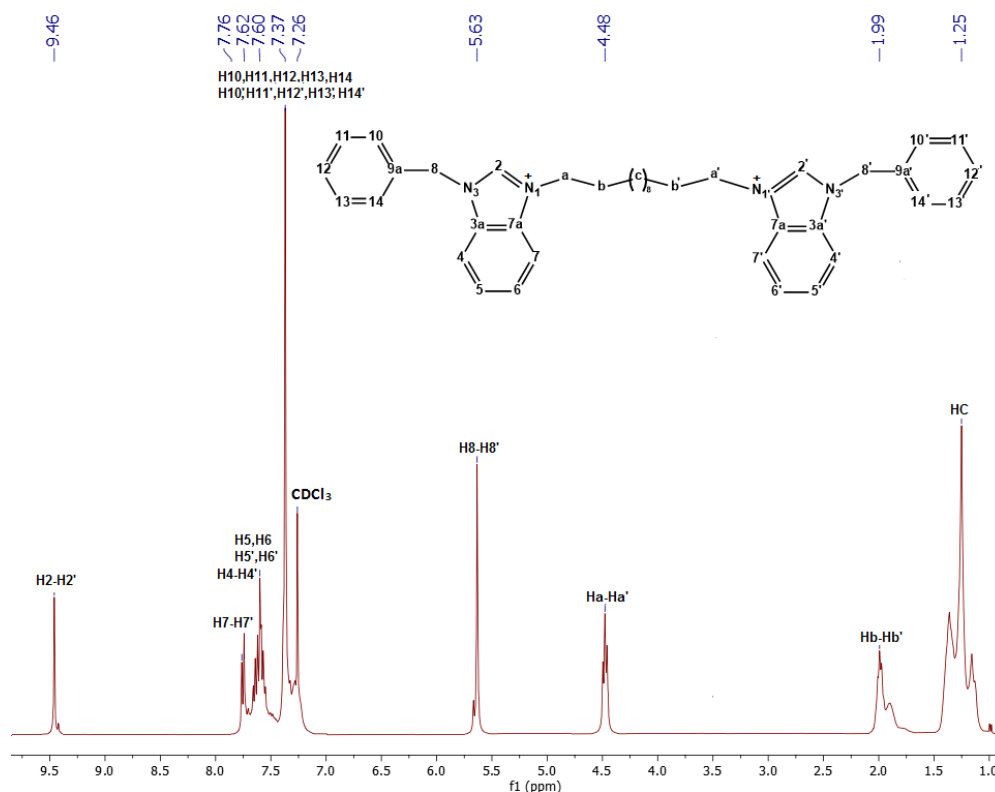
**Σχήμα 8.13:** Φάσμα ESI-MS της ενδιάμεσης ένωσης 3

### 8.7.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υδρογόνου ( $^1H$ NMR)

Όπως και στην περίπτωση του φάσματος ESI MS, έτσι και φάσμα NMR, η χημική μετατόπιση των πρωτονίων της ενδιάμεσης ένωσης 3 είναι αντίστοιχη με αυτή της ενδιάμεσης ένωσης 2 (Σχήμα 8.14). Οι διαφορές στις τιμές των ppm οφείλονται στη χρήση διαφορετικού δευτεριωμένου διαλύτη και παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.6.

**Πίνακας 8.6:** Τιμές των κορυφών  $^1\text{H}$  NMR, σε ppm, των πρωτονίων της ενδιάμεσης ένωσης 3

$\text{H}_2$	$\text{H}_4$	$\text{H}_5$	$\text{H}_6$	$\text{H}_7$	$\text{H}_8$	$\text{H}_{2'}$
9,46(s)	7,62(d)	7,60(mt)	7,60(mt)	7,76(d)	5,63(s)	9,46(s)
$\text{H}_{4'}$	$\text{H}_{5'}$	$\text{H}_{6'}$	$\text{H}_{7'}$	$\text{H}_{8'}$	$\text{H}_a$	$\text{H}_b$
7,62(d)	7,60(mt)	7,60(mt)	7,76(d)	5,63(s)	4,48(t)	1,99(mt)
$\text{H}_c$	$\text{H}_{a'}$	$\text{H}_{b'}$	$\text{H}_{10}$	$\text{H}_{11}$	$\text{H}_{12}$	$\text{H}_{13}$
1,25(mt)	4,48(t)	1,99(mt)	7,37(s)	7,37(s)	7,37(s)	7,37(s)
$\text{H}_{14}$	$\text{H}_{10'}$	$\text{H}_{11'}$	$\text{H}_{12'}$	$\text{H}_{13'}$	$\text{H}_{14'}$	
7,37(s)	7,37(s)	7,37(s)	7,37(s)	7,37(s)	7,37(s)	



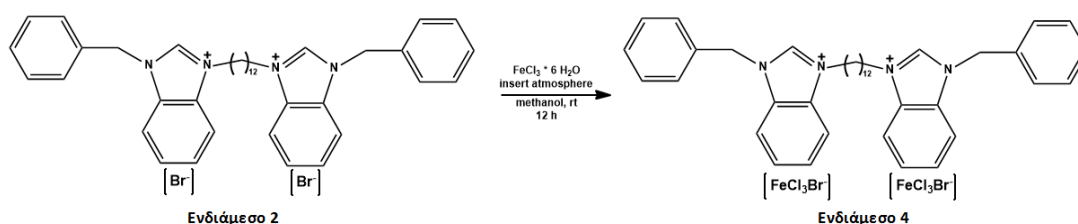
**Σχήμα 8.14:** Απεικόνιση του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της ενδιάμεσης ένωση 3, με απόδοση των κορυφών, σε διαλύτη  $\text{CDCl}_3$  στους 298 K

Λόγω της ομοιότητας της δομής του ενδιάμεσου 2 με 3 δεν λήφθηκε φάσμα υπερύθρου για το ενδιάμεσο 3. Η δύο δομές έχουν τις ίδιες απορροφήσεις, αφού το κατιόν είναι ίδιο και η μόνη διαφοροποίηση αφορά τον ανιονικό υποκατάσταση. Το ίδιο παρατηρείται και στην δομή του ενδιάμεσου 4.

### 8.8 Σύνθεση ενδιάμεσου 4

Αρχικά 50 mL μεθανόλης αφυδατώνονται παρουσία άνυδρου θειικού νατρίου για να αποφευχθεί ο σχηματισμός εποξειδίων του σιδήρου και απαερώνονται υπό ρεύμα αζώτου (bubbling). Σε ποτήρι ζέσης των 100 mL που περιέχει 30 mL μεθανόλης, προστίθενται 0,334 g (1,2 mmol)  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  και τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Στην συνέχεια, σε σφαιρική φιάλη των 100 mL που περιέχει 20 mL μεθανόλης, διαλυτοποιούνται 0,744 g (1 mmol) της ενδιάμεσης ένωσης 2, και το διάλυμα αναδεύεται για 5 min.

Έπειτα τα δύο διαλύματα ενώνονται στην σφαιρική φιάλη υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 12 ώρες. Στην συνέχεια, η μεθανόλη εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Το προϊόν με μεγάλο ιώδες και σκούρο καφέ χρώμα, χαρακτηριστικό της παρουσίας ιόντων σιδήρου, εκπλένεται με περίσσεια υπερ καθαρού νερού σε λουτρό υπερήχων και η διαδικασία επαναλαμβάνεται 4 φορές, για να απομακρυνθούν τα ιόντα χλωριούχου σιδήρου που δεν έχουν αντιδράσει. Ακολουθεί ξήρανση της ένωσης 4 στους 80 °C σε ειδικό κλίβανο ξήρανσης υπό ελαττωμένη πίεση συνδεδεμένο με αντλία κενού για 16 ώρες μέχρι πλήρους ξήρανσης, για την απομάκρυνση υγρασίας. Η πειραματική πορεία σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.15 ενώ τα στοιχεία της αντίδρασης στον Πίνακα 8.7.



**Σχήμα 8.15:** Πειραματική πορεία σύνθεσης Ενδιάμεσης Ένωσης 4

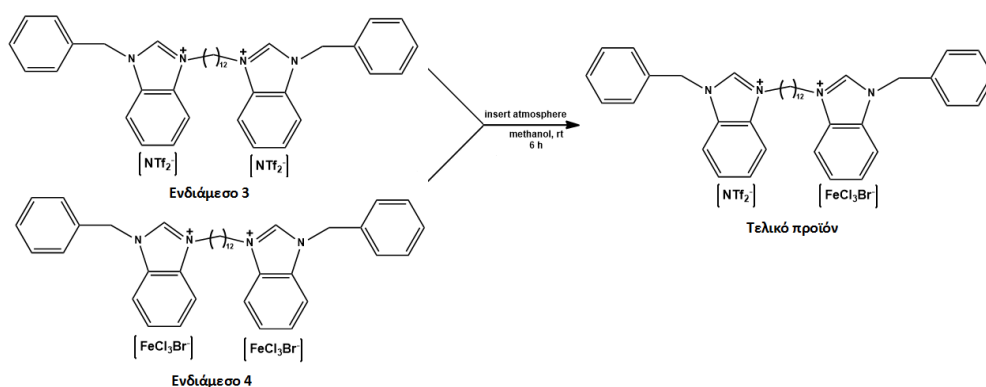
**Πίνακας 8.7:** Στοιχεία αντίδρασης ενδιάμεσης ένωσης 4

ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ 4	
Διάρκεια σύνθεσης ενδιάμεσου	28 ώρες
Μορφή	Σκούρο καφέ παχύρευστο υγρό
Απόδοση αντίδρασης	72 %

### 8.9 Σύνθεση τελικού προϊόντος 5

Το τελικό προϊόν συντίθεται από την ισομοριακή ανάμειξη των ενδιάμεσων ενώσεων 3 και 4. Σε δύο ποτήρια ζέσης προστίθενται 20 ml μεθανόλης, που πριν είχε αφυδατωθεί παρουσία άνυδρου θειικού νατρίου και απαερωθεί υπό ρεύμα αζώτου (bubbling), και διαλυτοποιούνται αντίστοιχα 1,069g ένωσης 4 (1 mmol) και 1,121 g ένωσης 3 (1 mmol).

Τα δύο διαλύματα αναμειγνύονται σε σφαιρική φιάλη των 100 mL και αναδεύονται υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 6 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί ξήρανση του μαγνητικού ιοντικού υγρού στους 80 °C, σε ειδικό κλίβανο ξήρανσης υπό ελαττωμένη πίεση συνδεδεμένο με αντλία κενού για 6 ώρες μέχρι πλήρους ξήρανσης. Η πειραματική πορεία σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.16 ενώ τα στοιχεία της αντίδρασης στον Πίνακα 8.8.



Σχήμα 8.16: Πειραματική πορεία σύνθεσης τελικού προϊόντος 5

Πίνακας 8.8: Στοιχεία αντίδρασης τελικού προϊόντος 5

Τελικό προϊόν	
Διάρκεια σύνθεσης ενδιάμεσου	12 ώρες
Μορφή	Σκούρο καφέ παχύρρευστο υγρό
Απόδοση αντίδρασης	69 %

## 8.10 Χαρακτηρισμός ενδιάμεσης ένωσης 4 και τελικού προϊόντος

### 8.10.1 Θερμοσταθμική ανάλυση και διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης

Προκειμένου να διερευνηθεί η συμπεριφορά του συντεθειμένου συμμετρικού δικατιόντος MIL, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές θερμικής ανάλυσης συναρτήσει της θερμοκρασίας. Από τα διαγράμματα διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (*Differential Scanning Calorimetry, DSC*), υπολογίζεται η μεταβολή της διαφοράς του ποσού της θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται μεταξύ του δείγματος και ενός υλικού αναφοράς όταν και τα δύο θερμαίνονται με ελεγχόμενο ρυθμό.

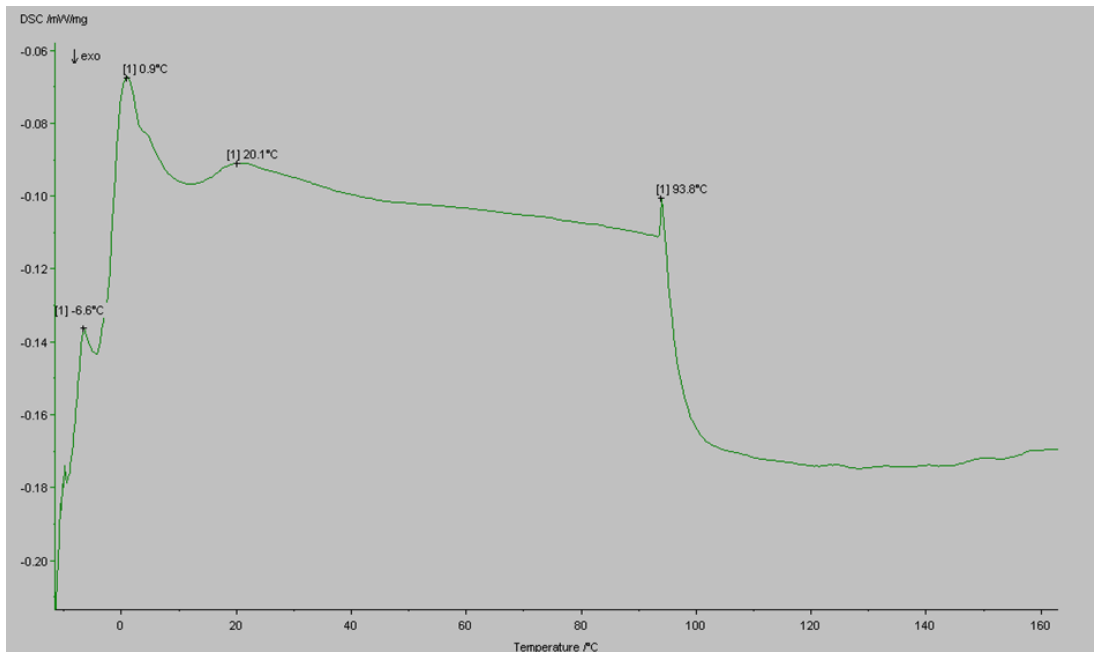
Στο Σχήμα 8.17, παρουσιάζονται το σημείο τήξης της *ενδιάμεσης ένωσης 4* και του τελικού προϊόντος. Όσον αφορά το σημείο τήξης του τελικού προϊόντος για το οποίο υπάρχουν διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα, η θεωρητική τιμή  $-6,7$  βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με την πειραματική τιμή  $-6.6$  (Nacham et al., 2015).

Από τη θερμοσταθμική ανάλυση (*thermogravimetric analysis TGA*) (Σχήμα 8.18), στην οποία καταγράφεται η μεταβολή μάζας συναρτήσει της θερμοκρασίας  $m=f(T)$ , παρέχονται πληροφορίες για τη θερμική διάσπαση ή σταθερότητα των ενώσεων.

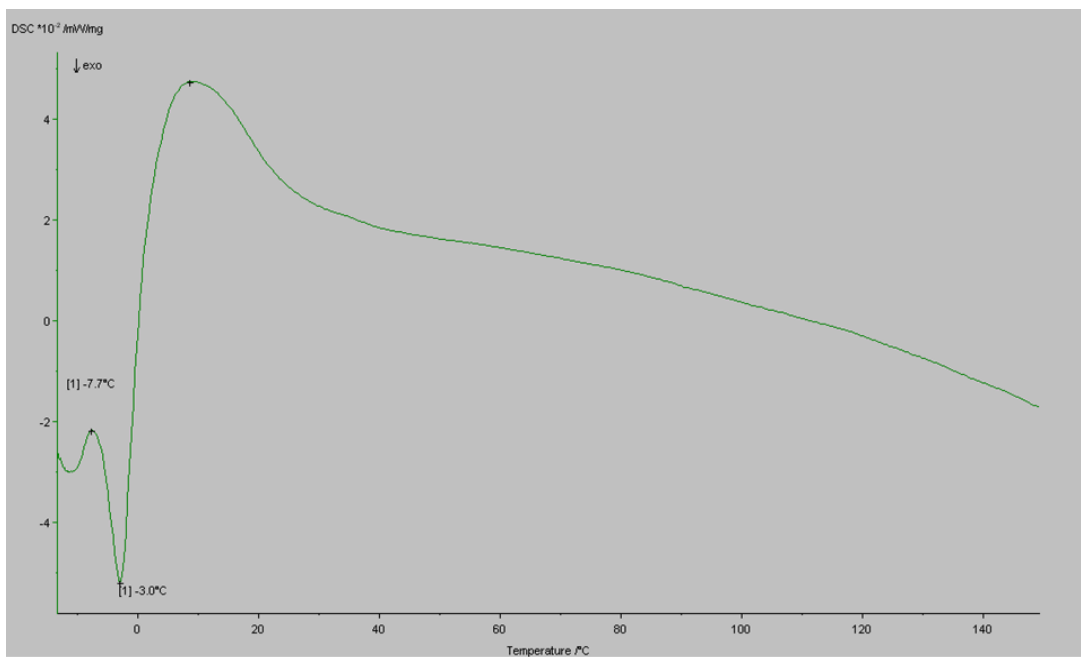
Αντίστοιχα για την *ενδιάμεση ένωση 4* και για το μαγνητικό ιοντικό υγρό (τελικό προϊόν), υπολογίζεται η θερμική σταθερότητα σε θερμοκρασία που αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους περίπου 5 %, όπου και παρατηρείται η έντονη κλήση. Η πειραματική τιμή για το τελικό προϊόν είναι  $311,2$  °C, και βρίσκεται σε απόλυτη αντιστοιχία με την θεωρητική  $311$  °C (Nacham et al., 2015).

Η υψηλή τιμή  $T_g$  που χαρακτηρίζει το τελικό προϊόν, μπορεί να αποδοθεί σε αυξημένες αλληλεπιδράσεις π-π ηλεκτρονίων στο κατιόν του βενζιμιδαζολίου. Η αρχική θερμοκρασία από την οποία αρχίζει η απώλεια μάζας (on set temperature) για την ενδιάμεση ένωση 4 και το τελικό προϊόν, είναι αντίστοιχα οι θερμοκρασίες  $216$  °C και  $282,3$  °C.



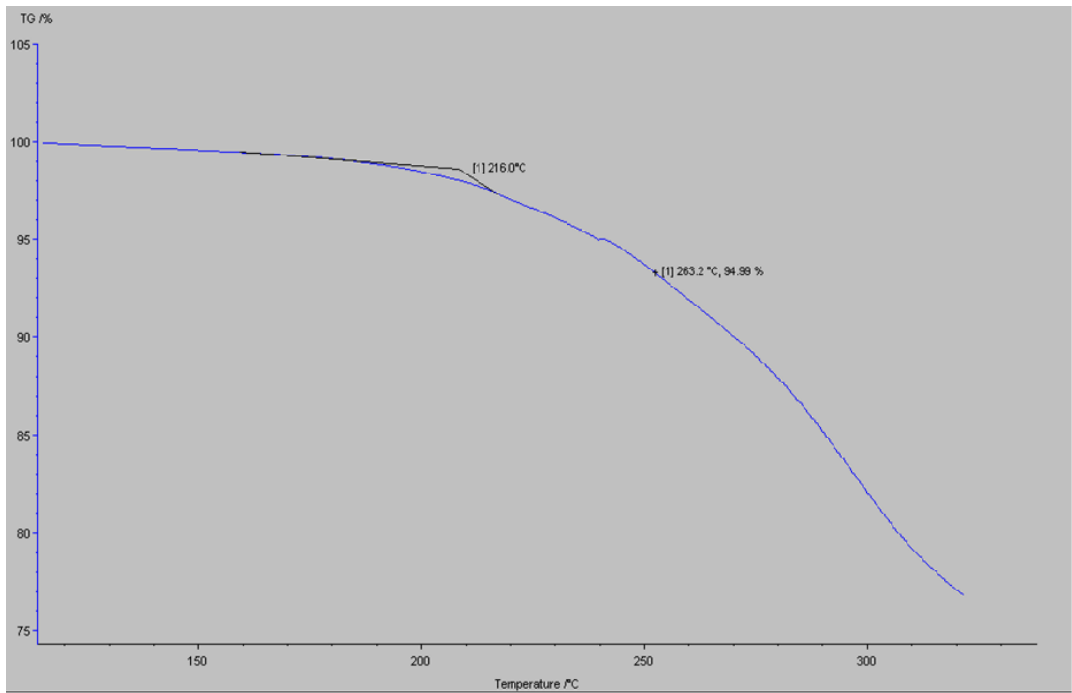


(α)

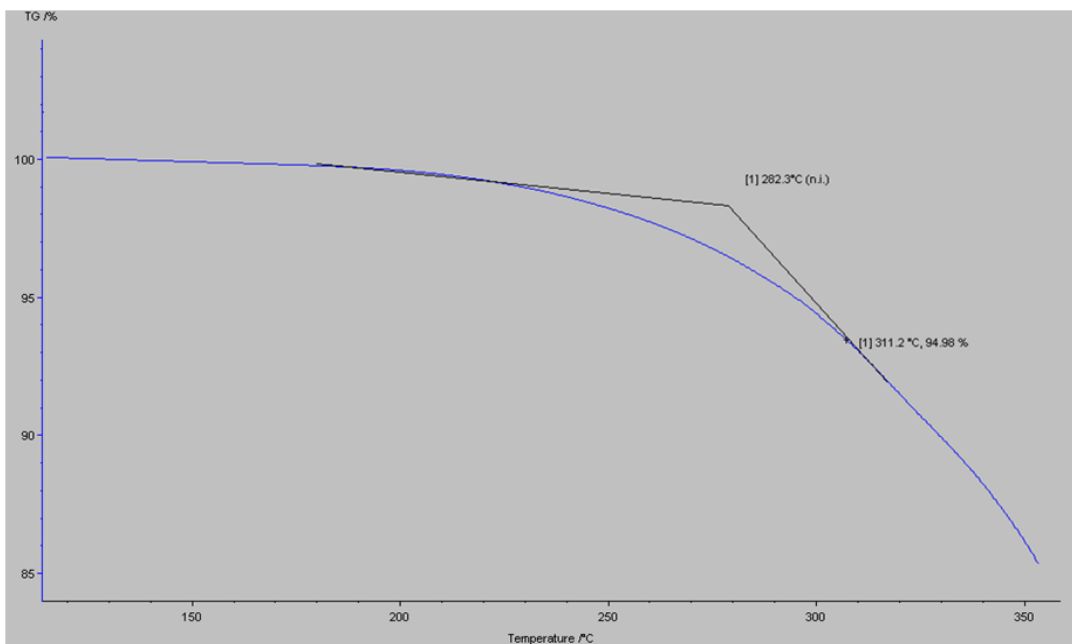


(β)

**Σχήμα 8.17:** Διαγράμματα DSC για το (α) ενδιάμεσο 4 και την (β) μαγνητικό ιοντικό υγρό (τελικό προϊόν)



(α)



(β)

**Σχήμα 8.18:** Διαγράμματα TGA για το (α) ενδιάμεσο 4 και την (β) μαγνητικό ιοντικό υγρό (τελικό προϊόν)

### 8.10.2 Ιδιότητες μαγνητικού ιοντικού υγρού

Μαγνητικά ιοντικά υγρά που περιέχουν υψηλού spin  $d^5$  ιόντα σιδήρου, είναι ευρέως χαρακτηρισμένα λόγω του παραμαγνητικού χαρακτήρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μοριακή μαγνητική ευαισθησία  $\chi_M$ , υπολογίζεται μέσω της Εξίσωσης 8.1:

$$\chi_M = C_{bal} L M (R - R_0) / 10^9 \text{ m} \quad (\text{Εξίσωση 8.1})$$

Όπου  $C_{bal}$  η σταθερά βαθμονόμησης ζυγού,  $L$  το μήκος του δείγματος μέσα στον σωλήνα,  $M$  το μοριακό βάρος της ένωσης,  $R$  η μέτρηση οργάνου για το δείγμα στον σωλήνα,  $R_0$  η μέτρηση αναφοράς σε άδειο σωλήνα μέτρησης και τέλος  $m$  η μάζα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.

Γνωρίζοντας την τιμή μοριακής μαγνητικής ευαισθησίας είναι δυνατός ο υπολογισμός της μαγνητικής ροπής, σε θερμοκρασία 29,5 K μέσω της Εξίσωσης 8.2:

$$\mu_{eff} = 2.83 \sqrt{\chi_M T} \quad (\text{Εξίσωση 8.2})$$

Τέλος η μαγνητική ροπή σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα έχει τιμή 5,45 (Nacham et al., 2015). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του συντεθειμένου τελικού προϊόντος συνοψίζονται στον Πίνακα 8.9.

**Πίνακας 8.9:** Ιδιότητες μαγνητικού ιοντικού υγρού

Μαγνητικό ιοντικό υγρό	
Μοριακός τύπος	$[(BBnIM)_2C_{12}] [NTf_2] [FeCl_3Br]$
Μοριακό βάρος (g/mol) <sup>[1],[4]</sup>	1107.1
$\mu_{eff}$ (μB)	5.36
Σημείο τήξης (°C)	-6.6
Θερμική σταθερότητα (°C)	311
Διαλυτότητα στο νερό	0.1 % w/v

### 8.11 Εφαρμογή του MIL σε υδατικά δείγματα

Η επιλογή της μελέτης του συμμετρικού δικατιόντος με ετεροάτομο MIL 1,12di(3benzylbenzimidazolium)dodecane-bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]-imide bromo-trichloroferate [(BBnIM)<sub>2</sub>C<sub>12</sub>][NTf<sub>2</sub>][FeCl<sub>3</sub>Br], έναντι των υπολοίπων εμπορικά διαθέσιμων, πραγματοποιήθηκε βάσει των επιθυμητών ιδιοτήτων του (πολικότητα και μαγνητική ροπή).

Το μαγνητικό ιοντικό υγρό, συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε με επιτυχία και σε πλήρη συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Κατά την εφαρμογή του ως προσροφητικό υλικό στην μαγνητική εκχύλιση φυτοπροστατευτικών ενώσεων παρουσίασε αστάθεια, λόγω των ανεπιθύμητων μικροσταγόνων νερού που εναποτίθενται γύρω από τα μόρια του μαγνητικού υγρού (Clark et al., 2015).

Ως προσροφητικά υλικά, χρησιμοποιούνται ενώσεις με χαμηλό ιξώδες καθώς διασπείρονται εύκολα επηρεάζοντας τον ρυθμό μεταφοράς μάζας. Κατά την διασπορά του μαγνητικού ιοντικού υγρού σε δείγμα νερού, δεν δημιουργήθηκαν τα επιθυμητά μαγνητικά μικροσταγονίδια (microdroplets) με την χαρακτηριστική μεγάλη επιφάνεια επαφής. Για τα MIL που είναι αναμίξιμα με πολικούς διαλύτες και το νερό (κυρίως τα πρωτονιομένα) ο μαγνητικός διαχωρισμός των φάσεων είναι ανέφικτος (Clark et al., 2016).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, επιλέχθηκε το συγκεκριμένο ιοντικό υγρό, καθώς στην ολική τιμή πολικότητας συνεισφέρουν, εκτός από το μόριο του βενζιμιδαζολίου, οι βένζυλ ομάδες, ο υποκαταστάτης NTf<sub>2</sub><sup>-</sup> και η μεγάλη ανθρακική αλυσίδα των 12 ατόμων άνθρακα (Clark et al., 2016 και Nacham et al., 2015).

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα διασποράς και με σκοπό να σχηματιστούν micro droplets, προστέθηκε NaOH σε εύρος συγκεντρώσεων 2-5% v/v, χωρίς όμως να σχηματίζονται μικροσταγονίδια (Chatzimitakos et al., 2016 και Clark et al., 2016). Εναλλακτικά, δοκιμάστηκε η αύξηση της ιοντικής ισχύς με σκοπό την μείωση της διαλυτότητας, με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου NaCl 1-10% w/v (Chatzimitakos et al., 2016). Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα αφενός καλύτερη διασπορά του προσροφητικού στο υδατικό δείγμα, όμως αφετέρου μειωμένη απόκριση παρουσία μαγνητικού πεδίου.

Επιπρόσθετα, δοκιμάστηκε η χρήση διαλύτη διασποράς και συγκεκριμένα της ακετόνης. Για όγκους μεγαλύτερους από 1 mL, παρατηρήθηκε διαλυτοποίηση του MIL στην υδατική φάση, ενώ για μικρότερους όγκους δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή (Trujillo-Rodríguez et al., 2016).

Ως γνωστόν, με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται αύξηση του μαγνητισμού των μορίων (Chatzimitakos et al., 2016; Clark et al., 2015; Trujillo-Rodríguez et al., 2017 και Yan and Wang, 2013). Επομένως, προκειμένου να αυξηθεί η  $\mu_{\text{eff}}$ , τα μικροσταγονίδια του MIL

θερμάνθηκαν ήπια (25-40 °C), πριν την εισαγωγή τους στο δείγμα. Όμως η θέρμανση δεν βοήθησε αισθητά στην απόκριση των MIL παρουσία μαγνητικού πεδίου.

Τέλος μελετήθηκε η επίδραση του υλικού στο οποίο λαμβάνει χώρα η διασπορά του MIL. Παρατηρήθηκε ότι επιτυγχάνεται καλύτερος σχηματισμός μικροσταγόνων και καλύτερη διασπορά σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα σε σχέση με την χρήση φυγοκεντρικού σωλήνα πολυπροπυλαϊνίου τύπου falcon (Σχήμα 8.19).



**Σχήμα 8.19:** Σχηματισμός μικροσταγόνων σε δοκιμαστικό σωλήνα και σε σωλήνα falcon

Από όλα τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η δυσκολία χρήσης του MIL στην εκχύλιση φυτοπροστατευτικών ενώσεων από υδατικά δείγματα. Συνάμα, η χαμηλή απόδοση της αντίδρασης, κατά τα ενδιάμεσα στάδια, έχει σαν αποτέλεσμα την παραλαβή μικρής ποσότητας προϊόντος. Η σύνθεση αποδείχθηκε αρκετά χρονοβόρα (12 ημέρες σε ιδανικές συνεχόμενες συνθήκες) με πολύωρες αναμονές έως και 24 ώρες για κάθε ενδιάμεσο στάδιο. Επιπρόσθετα κατά τη σύνθεση έγινε χρήση μη σταθερών, υψηλού σε κόστος υποκαταστατών όπως το Bis-(trifluoromethylsulfonyl)imide, το οποίο υδρολύεται αρκετά εύκολα σχηματίζοντας hydrofluoric acid (Chatzimitakos et al., 2016).

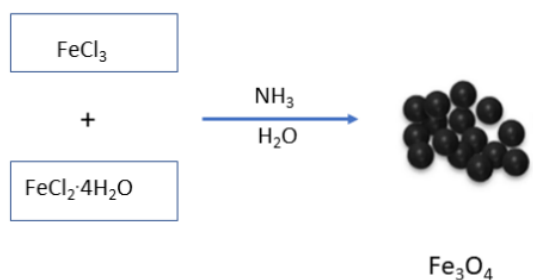
Για όλα τα παραπάνω, ως εναλλακτικό προσροφητικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ , αφού πρώτα συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε ως προς την δομή και τις ιδιότητές του.

## B. ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ )

### 8.12 Σύνθεση μαγνητίτη ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

Για την σύνθεση των σωματιδίων μαγνητίτη εφαρμόστηκε η μέθοδο της θερμικής συγκαταβύθισης ιόντων δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$  και  $\text{Fe}^{3+}$ ) σε αλκαλικές συνθήκες, με υδροθερμική επεξεργασία.

Σε ποτήρι ζέσης των 200 mL, ζυγίζονται 0,7 g  $\text{FeCl}_3$  και 0,42 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  και προστίθενται 100 mL δις απεσταγμένου νερού, το οποίο προηγουμένως έχει απαερωθεί σε ήπιο ρεύμα αζώτου ( $\text{N}_2$ ) για να αποφευχθεί η οξειδωση των ιόντων του δισθενούς σιδήρου. Μετά από 10 λεπτά ανάδευσης υπό ρεύμα  $\text{N}_2$  προστίθενται 5 mL αμμωνίας ( $\text{NH}_3$  25% v/v). Με την προσθήκη του καταλύτη της αμμωνίας, παρατηρείται απότομη αλλαγή στο χρώμα του μίγματος από καφέ σε μαύρο. Η ανάδευση του μίγματος συνεχίζεται για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο στους  $80^\circ\text{C}$ . Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα σωματίδια αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Η πειραματική πορεία σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.20 ενώ τα στοιχεία της αντίδρασης στον Πίνακα 8.10.



**Σχήμα 8.20:** Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

**Πίνακας 8.10:** Στοιχεία σύνθεσης  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

	$\text{Fe}_3\text{O}_4$
Διάρκεια σύνθεσης	50 min
Μορφή	Μαύρο στερεό
Απόδοση αντίδρασης	90%

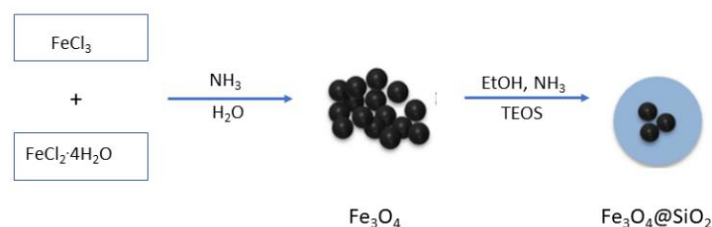
Όσον αφορά τον καθαρισμό των νανოსωματιδίων, εκπλύνονται με δις απεσταγμένο νερό παρουσία μαγνητικού πεδίου μέχρις ότου σταματήσει ο αποχρωματισμός του υπερκείμενου. Τέλος, τα υλικά εκπλύνονται με αιθανόλη ( $\text{EtOH}$ ), τοποθετούνται σε ύαλο ωρολογίου και ξηραίνονται σε ξηραντήρα κενού για 12 ώρες. Τα υλικά αποθηκεύονται σε αεροστεγώς κλεισμένα φιαλίδια με βιδωτό πώμα.

### 8.13 Τροποποίηση του μαγνητίτη με διοξείδιο του πυριτίου ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ )

Η επικάλυψη του συντεθειμένου μαγνητίτη με στρώμα διοξειδίου του πυριτίου (silica- $\text{SiO}_2$ ), πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή παραλλαγών της μεθόδου sol-gel ως πηγή πυριτίου το αλκοξείδιο TEOS (Ali et al., 2016 και Synaridou et al., 2014). Το στάδιο αυτό πριν την προσθήκη της οκταδεκυλ- ομάδας είναι καθοριστικό, καθώς σταθεροποιούνται τα οξείδια του σιδήρου και προστατεύονται από περαιτέρω οξείδωση.

Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL, που περιέχει 12,5 mL EtOH και 4 mL δις απεσταγμένου νερού, ζυγίζονται 0,5 g  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  και η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων, για 5 λεπτά για να διαλυτοποιηθούν τα οξείδια σιδήρου. Στη συνέχεια, υπό έντονη ανάδευση προστίθενται στάγδην 500  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_3$  (25% w/w) και 250  $\mu\text{L}$  TEOS και το μίγμα αναδεύεται για 10 λεπτά σε έντονο ρεύμα  $\text{N}_2$  (bubbling). Η προσθήκη του TEOS στο διάλυμα που περιέχει τον καταλύτη  $\text{NH}_3$ , πραγματοποιήθηκε με ρυθμό 1mL/min προκειμένου να επιτευχθεί ομοιομορφία στη διάμετρο των νανοσφαιρών.

Η σφαιρική φιάλη καλύπτεται με ταινία parafilm και το μίγμα αναδεύεται για 12 ώρες προκειμένου να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Τα νανοσωματίδια απομονώνονται παρουσία μαγνητικού πεδίου, εκπλύνονται και το στάδιο της σιλιανοποίησης επαναλαμβάνεται με σκοπό την πλήρη επικάλυψη του πυρήνα του μαγνητίτη με διοξείδιο του πυριτίου. Η πειραματική πορεία σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.21 ενώ τα στοιχεία της αντίδρασης στον Πίνακα 8.11.



**Σχήμα 8.21:** Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

Τα νανοσωματίδια  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  εκπλύνονται με δις απεσταγμένο νερό και αιθανόλη παρουσία μαγνητικού πεδίου μέχρι να σταματήσει ο αποχρωματισμός του υπερκείμενου. Τοποθετούνται σε ύαλο ωρολογίου, ξηραίνονται σε ξηραντήρα κενού για 12 ώρες και αποθηκεύονται σε αεροστεγώς κλεισμένα φιαλίδια με βιδωτό πώμα.

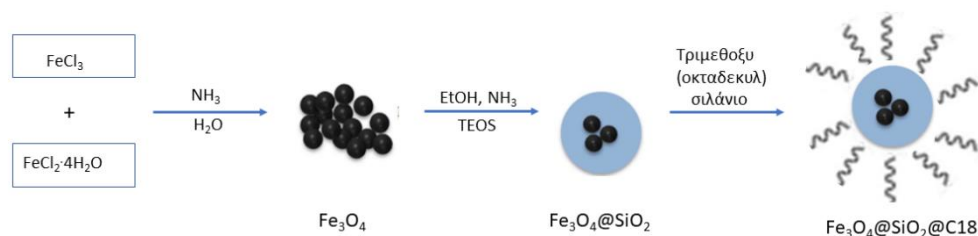
**Πίνακας 8.11:** Στοιχεία σύνθεσης  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	
Διάρκεια σύνθεσης	13 ώρες
Μορφή	Γκρί- μαύρο στερεό
Απόδοση αντίδρασης	90 %

### 8.14 Τροποποίηση σιλανοποιημένου μαγνητίτη με αλκυλομάδα C18 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ )

Ως ομάδα επικάλυψης- σιλανοποίησης, επιλέχθηκε η αλκυλ-ομάδα C18 εξαιτίας του υδρόφοβου χαρακτήρα της που επιτρέπει την προσρόφηση υδρόφοβων ενώσεων όπως τα υπό μελέτη φυτοφάρμακα. Η πρόσδεση της ανθρακικής αλυσίδας, επιτεύχθηκε μέσω των ενεργών θέσεων Si-OH.

Ποσότητα  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  ίση με 0,2 g, διαλυτοποιείται σε 70 mL άνυδρο τολουόλιο και το μείγμα τοποθετείται σε συσκευή υπερήχων για 5 min. Στην συνέχεια προστίθενται 200 μL τριμεθοξυ(οκταδεκυλ)σιλανίου και ακολουθεί ανάδευση με διάταξη επαναροής (reflux) εφοδιασμένη με κάθετο ψυκτήρα, για 12 ώρες στους 80 °C (με την χρήση ελαιόλουτρου). Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να επέλθει θερμοκρασία δωματίου. Η πειραματική πορεία σύνθεσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.22 ενώ τα στοιχεία της αντίδρασης στον Πίνακα 8.12.



**Σχήμα 8.22:** Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$

**Πίνακας 8.12:** Στοιχεία σύνθεσης  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	
Διάρκεια σύνθεσης	13 ώρες
Μορφή	Μαύρο στερεό
Απόδοση αντίδρασης	90%

Προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν ανεπιθύμητες προσμίξεις, τα νανοσωματίδια εκκλύνονται με τολουόλιο παρουσία μαγνητικού πεδίου μέχρι να σταματήσει ο



αποχρωματισμός του υπερκείμενου. Αποφεύγονται οι πλύσεις με απεσταγμένο νερό όπως στα προηγούμενα στάδια, λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα των συντεθειμένων υλικών. Τέλος, τα υλικά εκπλύνονται με αιθανόλη (EtOH), τοποθετούνται σε ύαλο ωρολογίου, και ξηραίνονται σε ξηραντήρα κενού για 12 ώρες.

### 8.15 Χαρακτηρισμός συντιθέμενων μαγνητικών υλικών ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ και $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ )

Τα συντιθέμενα μαγνητικά υλικά ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  και  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ ) χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή και τη μορφολογία. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της εξωτερικής μορφολογίας των συντιθέμενων υλικών, ενώ η στοιχειακή ανάλυση (Elemental Analysis, EA) για τον προσδιορισμό του ποσοστού του άνθρακα στο τελικό προϊόν ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ ). Με τη φασματοσκοπία υπερύθρου (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) μελετήθηκε η παρουσία λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των συντιθέμενων υλικών γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή τροποποίησή τους. Η κρυσταλλική φάση των υλικών μελετήθηκε με τη κρυσταλλογραφία περίθλασης κόνεως (X-Ray diffraction, XRD), ενώ η ειδική τους επιφάνεια υπολογίστηκε από τις καμπύλες προσρόφησης-εκρόφησης  $\text{N}_2$  βάση της μεθόδου BET (Brunauer–Emmett–Teller). Τέλος, οι μαγνητικές ιδιότητες των συντιθέμενων υλικών μελετήθηκαν με τις καμπύλες μαγνητισμού σε θερμοκρασία δωματίου (magnetization curves).

#### 8.15.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ )

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη μορφολογία και το μέγεθος των συντεθειμένων νανοσωματιδίων. Συγκρίνοντας τις φωτογραφίες γίνεται αντιληπτό ότι ο μαγνητίτης ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) έχει ακανόνιστο σχήμα, ενώ ο τροποποιημένος με διοξείδιο του πυριτίου μαγνητίτης ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) και ο τροποποιημένος με διοξείδιο του πυριτίου και C18 μαγνητίτης ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ ) έχουν σχεδόν σφαιρικό σχήμα, δεν παρουσιάζει κάποια τραχύτητα και είναι εμφανής η απουσία των συσσωματωμάτων (Σχήμα 8.23). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Yu et al., 2010 και Zhang and Kong, 2011).

Παράμετροι που μπορεί να επηρεάσουν τη διάμετρο των νανοσωματιδίων, αποτελούν ο ρυθμός προσθήκης του TEOS στο διάλυμα που περιέχει τον καταλύτη αμμωνία και ο λόγος νερό/TEOS (Παππάς Γ., 2012). Συγκεκριμένα, ρυθμός προσθήκης μικρότερος από 0,5 mL/min δημιουργούν πληθυσμούς νανοσφαιρών με ανομοιομορφία ως προς τη διάμετρο. Ο λόγος

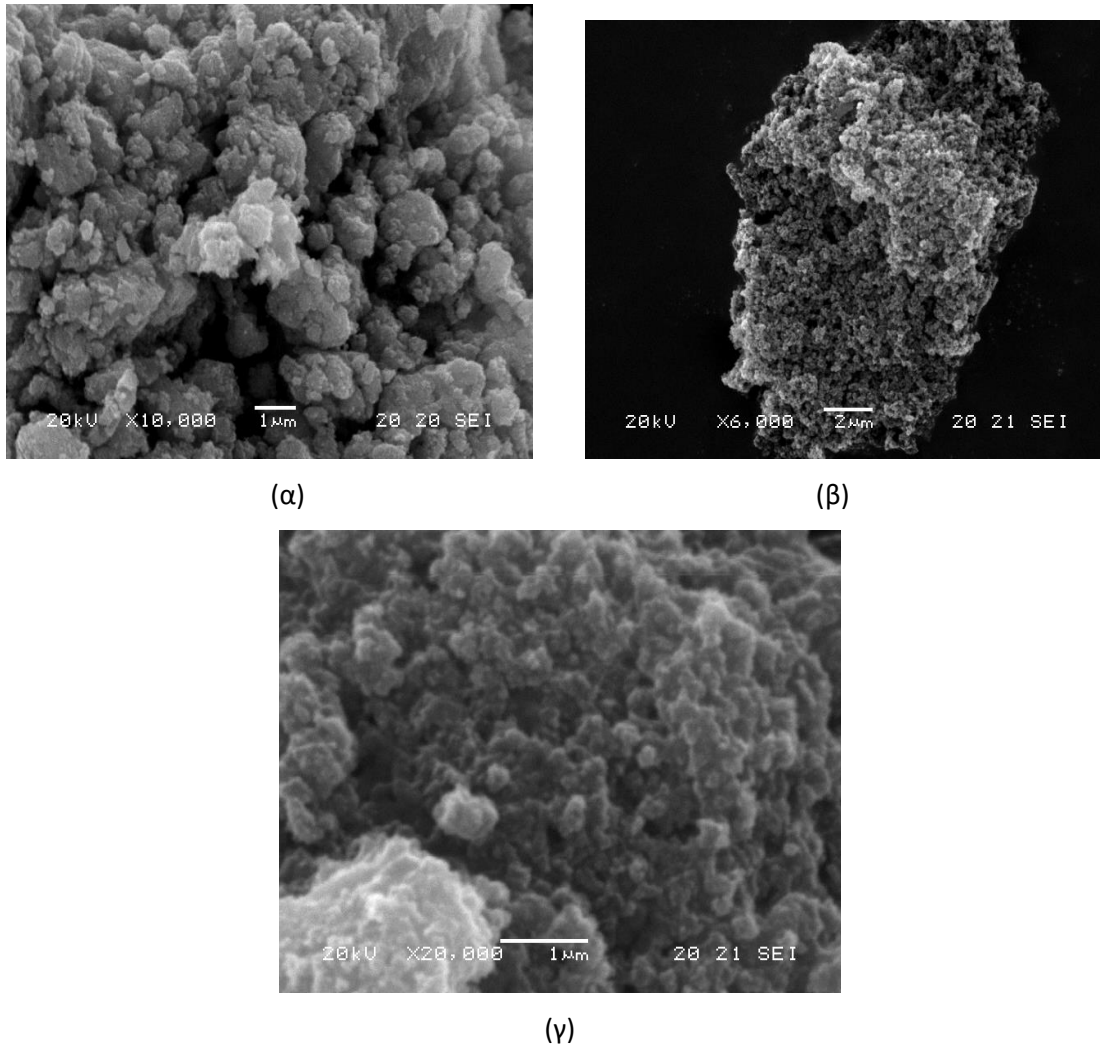
είναι ότι η τοπική περίσσεια αλκοξειδίου στο διάλυμα, οδηγεί σε εκκίνηση νέων νανοσφαιρών και το αλκοξείδιο δεν «καταναλώνεται» στις ήδη υπάρχουσες νανοσφαίρες που υπάρχουν στο διάλυμα.

Παρουσία νερού σε αναλογία μεγαλύτερη από την στοιχειομετρική (4:1) επιταχύνει την υδρόλυση και την πολυσυμπύκνωση του TEOS με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεγαλύτερες δομές (συσσωματώματα) (Παππάς Γ., 2012).

**Πίνακας 8.13:** Στοιχεία σύνθεσης  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$

Δείγμα	Ρυθμός προσθήκης TEOS (mL/min)	Νερό/ TEOS	Αμμωνία mL (25% w/w)	Μέση διάμετρος (nm)
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-70}$	1	1,5	500	70
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-150}$	1,2	1,8	500	150
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-400}$	2,65	3,1	500	500

Σύμφωνα με την στοιχειακή ανάλυση, το ποσοστό του άνθρακα στα συντιθέμενα  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  υλικά είναι 7%.



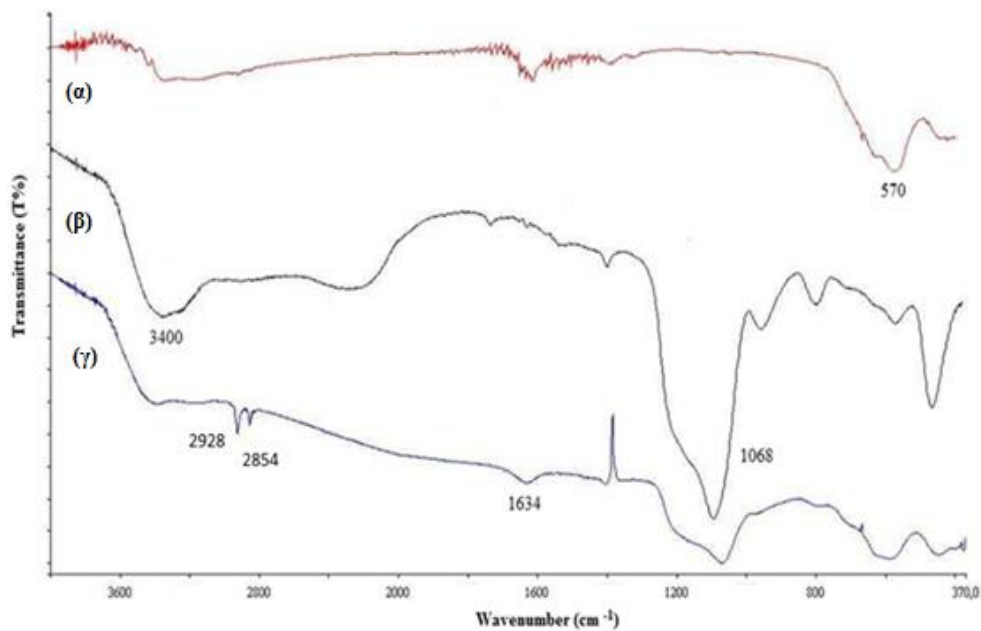
**Σχήμα 8.23:** Φωτογραφίες SEM (α)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (β)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  και (γ)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$

### 8.15.2 Φασματοσκοπία υπεράυθρου (FT-IR) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$

Προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθή τροποποίηση των μαγνητικών υλικών, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπεράυθρου. Τα φάσματα FT-IR των συντιθέμενων υλικών, βρίσκονται σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.24.

Η κορυφή απορρόφησης στα  $570\text{ cm}^{-1}$  (Σχήμα 8.24 α) αναπαριστά τη δόνηση τάσης του δεσμού σιδήρου-οξυγόνου-σιδήρου (**Fe-O-Fe**) του μαγνητίτη. Η κορυφή στα  $1068\text{ cm}^{-1}$  (Σχήμα 8.24 β και γ) αναπαριστά την ασύμμετρη δόνηση τάσης του δεσμού (**Si-O-Si**), ενώ οι κορυφές στα  $1634\text{ cm}^{-1}$  και  $3400\text{ cm}^{-1}$  μπορούν να αποδοθούν στην απορρόφηση νερού ή ομάδων σιλανόλης (**Si-OH**) του διοξειδίου του πυριτίου. Αυτές οι κορυφές επιβεβαιώνουν τον επιτυχή σχηματισμό στοιβάδας οξειδίου του πυριτίου στην επιφάνεια του μαγνητίτη.

Τέλος, οι χαρακτηριστικές κορυφές στα  $2928\text{ cm}^{-1}$  και  $2854\text{ cm}^{-1}$  (Σχήμα 8.24 γ) διαφοροποιούν το φάσμα του  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  από το φάσμα του  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@C18$ . Ειδικότερα, οι κορυφές αυτές αντιπροσωπεύουν την ασύμμετρη και συμμετρική δόνηση τάσης της ομάδας του μεθυλενίου ( $-\text{CH}_2$ ) στην αλυσίδα  $-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ , αντίστοιχα, και αποδεικνύουν την πρόσδεση των ομάδων C18 στην επιφάνεια του  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ .

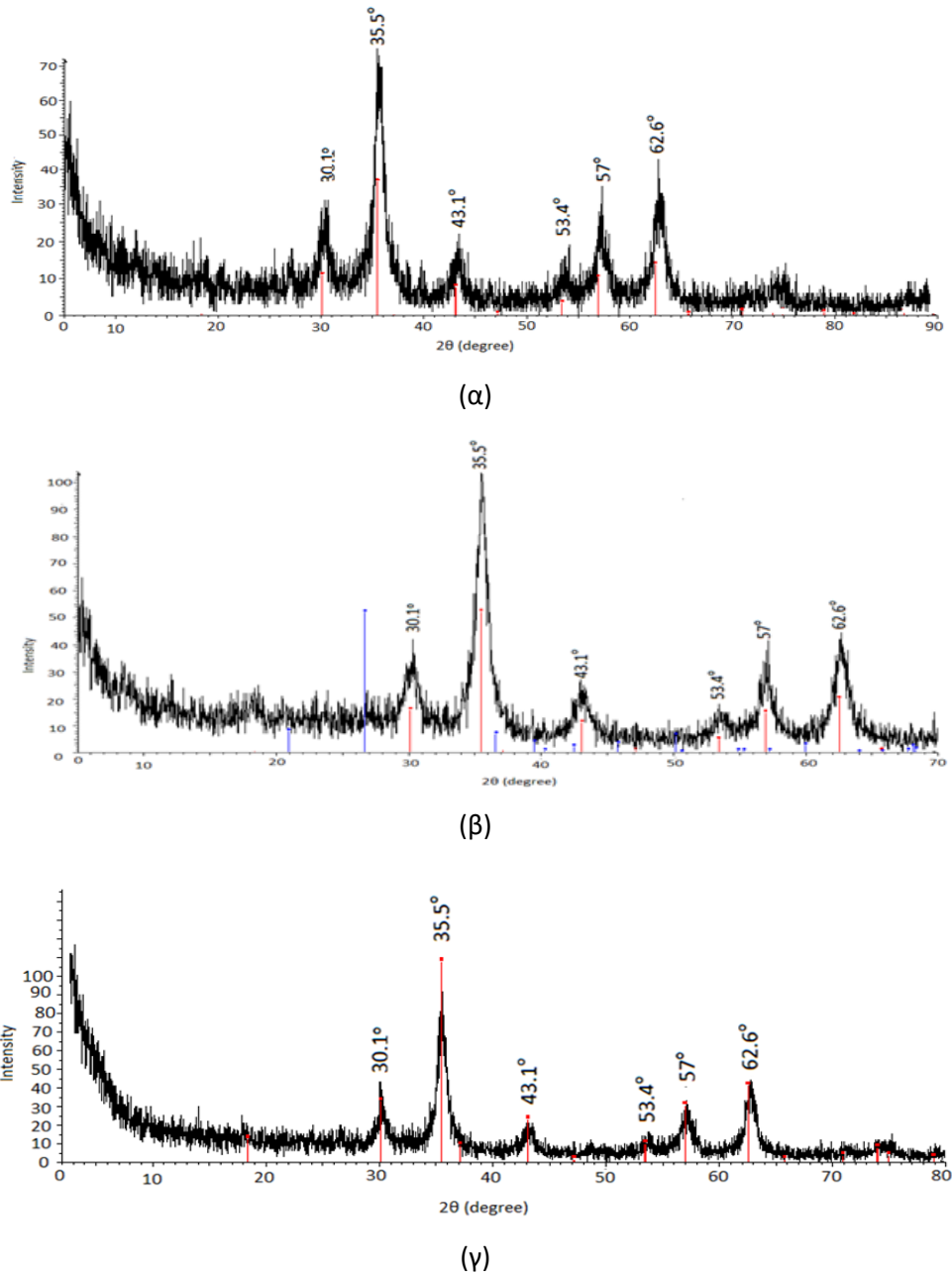


Σχήμα 8.24: Φάσματα FT-IR: (α)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (β)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  και (γ)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@C18$

### 8.15.3 Περίθλαση Ακτινών Χ (X-Ray Diffraction, XRD)

Η τεχνική της περίθλασης ακτινών Χ χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των κρυσταλλικών φάσεων καθώς και για τον υπολογισμό του μέσου μεγέθους των νανοσωματιδίων.

Στο Σχήμα 8.25 συγκεντρώνονται τα διαγράμματα XRD των συντιθέμενων υλικών ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  και  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@C18$ ). Στο διάγραμμα XRD του  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  εμφανίζονται έξι χαρακτηριστικές κορυφές σε  $2\theta$  των  $30.01^\circ$ ,  $35.5^\circ$ ,  $43.1^\circ$ ,  $53.4^\circ$ ,  $57^\circ$  και  $62.6^\circ$ . Παρατηρούμε ότι και στα διαγράμματα XRD των  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  και  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@C18$  εμφανίζονται οι ίδιες κορυφές γεγονός που αποδεικνύει ότι η τροποποίηση του  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  για το σχηματισμό  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  και  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2@C18$  δεν προκαλεί καμία αλλαγή φάσης στον κυβικό κρύσταλλο των σωματιδίων του μαγνητίτη.



**Σχήμα 8.25:** Διάγραμμα περίθλασης XRD ακτίνων-Χ για τα δείγματα: (α)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (β)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  και (γ)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$

Το μέσο μέγεθος του  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση Scherrer (Muniz et al., 2016), η οποία είναι μία εμπειρική εξίσωση που προκύπτει με μαθηματική επεξεργασία του φάσματος XRD (Εξίσωση 8.3).

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (\text{Εξίσωση 8.3})$$

Όπου:  $\theta$  είναι η γωνία Bragg πρόσπτωσης των ακτίνων Χ,  $\lambda$  το μήκος κύματος της προσπίπτουσας στο δείγμα ακτινοβολίας. Το μήκος κύματος της προσπίπτουσας

ακτινοβολίας Cu-K $\alpha$  που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις είναι 1.5406 Å, Β το εύρος (πλάτος) της κορυφής στο ήμισυ του μεγίστου (FWHM-σε μονάδες rad) της κύριας κορυφής του φάσματος περίθλασης, Κ είναι μια σταθερά που εξαρτάται από το σχήμα του κρυστάλλου. Η πιο συνηθισμένη τιμή του Κ είναι 0.94 για σφαιρικούς κρυστάλλους με κυβική συμμετρία.

Πιο συγκεκριμένα στη μέθοδο κόνεως (Debye- Scherrer) ο κρύσταλλος αλέθεται σε σκόνη, έτσι ώστε να αποτελείται από μικρούς (της τάξεως μερικών μm), κόκκους με τυχαίους προσανατολισμούς. Αυτό σημαίνει ότι για μονοχρωματική ακτινοβολία, κάθε κόκκος θα δώσει σύμφωνη σκέδαση για συγκεκριμένες γωνίες, συμπεριφέρεται δηλαδή σαν ανεξάρτητος κρύσταλλος.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία των φασμάτων XRD του Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@C18, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.14 σύμφωνα με τα οποία, το μέσο μέγεθος των Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@C18 είναι περίπου 7 nm, επομένως χαρακτηρίζονται ως νανοϋλικά.

**Πίνακας 8.14:** Αποτελέσματα μετά από επεξεργασία φασμάτων XRD

Ισχυρότερη Ανάκλαση 2θ (μοίρες)	Full Width at Half Maximum (μοίρες)	Cos θ	Full Width at Half Maximum (rad)	Μέγεθος κατά Scherrer (nm)
35,4952	0.68425	0.952409	0.023885	6.4
62,8058	0.6555	0.853524	0.022881	7.4
30,173	0.7414	0.965534	0.025880	5.8
57,1344	0.693	0.878257	0.024190	6.8
			Μέση τιμή μεγέθους D (nm)	6.6
			Τυπική απόκλιση (nm)	0.7

#### 8.15.4 Ειδική επιφάνεια

Για τον υπολογισμό της ειδικής επιφάνειας των υλικών εφαρμόστηκε η τεχνική της ισόθερμης προσρόφησης – εκρόφησης αζώτου  $N_2$  στους 77K. Η ειδική επιφάνεια των συντιθέμενων νανοϋλικών ( $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4@SiO_2$  και  $Fe_3O_4@SiO_2@C18$ ) υπολογίστηκε από τις καμπύλες βάσει της μεθόδου BET (Brunauer–Emmett–Teller). Η ειδική επιφάνεια των  $Fe_3O_4@SiO_2@C18$  προσδιορίστηκε σε  $151 \text{ m}^2/\text{g}$  (Πίνακας 8.15).

**Πίνακας 8.15:** Ειδική επιφάνεια συντιθέμενων νανοϋλικών

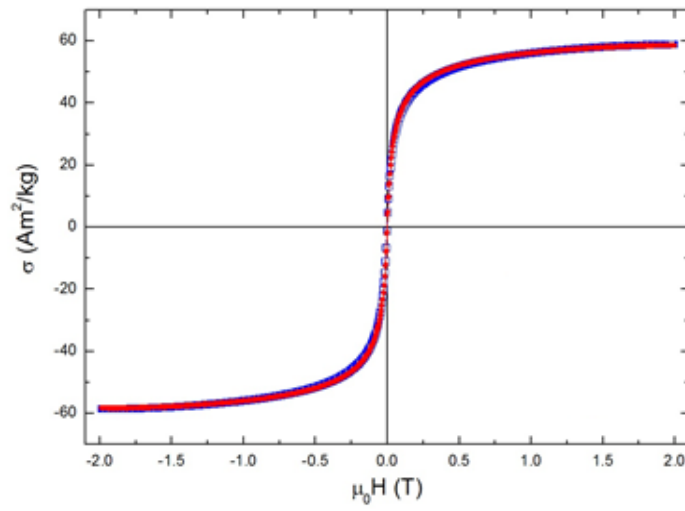
Μαγνητικά Υλικά	Ειδική Επιφάνεια ( $\text{m}^2/\text{g}$ )
$Fe_3O_4$	11
$Fe_3O_4@SiO_2$	134
$Fe_3O_4@SiO_2@C18$	151

#### 8.15.5 Μαγνητικές Ιδιότητες

Σημαντική επιθυμητή ιδιότητα των μαγνητικών υλικών, προκειμένου να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μαγνητικό διαχωρισμό αποτελεί ο μαγνητισμός. Οι μαγνητικές ιδιότητες των συντιθέμενων νανοϋλικών μελετήθηκαν με τη βοήθεια καμπυλών μαγνητισμού σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο Σχήμα 8.27 παρουσιάζονται οι μαγνητικοί βρόγχοι υστέρησης του  $Fe_3O_4$  και του επικαλυμμένου με πυριτία  $Fe_3O_4@SiO_2@C18$  σε θερμοκρασία δωματίου. Αρχικά, η έλλειψη υστέρησης αποδεικνύει την ύπαρξη παραμαγνητικών ιδιοτήτων. Οι τιμές μαγνητικού κορεσμού είναι σχεδόν  $60 \text{ Am}^2/\text{kg}$  και  $52 \text{ Am}^2/\text{kg}$  αντίστοιχα. Με αύξηση της επικάλυψης, παρατηρείται μείωση του μαγνητικού κορεσμού των μαγνητικών νανοϋλικών.

Επίσης ο παραμένων μαγνητισμός και η απομαγνήτιση (remanence and coercivity) είναι σχεδόν μηδέν, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα συντιθέμενα υλικά ανταποκρίνονται μαγνητικά στην εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και επαναδιασπείρονται γρήγορα στο διάλυμα απουσία μαγνητικού πεδίου.



Σχήμα 8.26: Καμπύλες μαγνητισμού  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  και  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

### ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ

### ΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (MSPE)

#### 9.1 Εισαγωγή

Για την εκχύλιση των υδατικών δειγμάτων, βελτιστοποιήθηκε, επικυρώθηκε και εφαρμόστηκε η μέθοδος της μαγνητικής εκχύλισης στερεάς φάσης (MSPE), η οποία στοχεύει στην απλή και γρήγορη εκχύλιση φυτοπροστατευτικών ενώσεων. Η τεχνική MSPE, «υπερνικά» προβλήματα κλασικών μεθόδων εκχύλισης που σχετίζονται με την πλήρωση μίας στήλης και οδηγεί σε ευκολότερο και γρηγορότερο διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ενώσεων εφαρμόζοντας απλώς ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (Wang et al., 2013).

Συγκριτικά με την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), η προκατεργασία του δείγματος απλοποιείται εξαιρετικά καθώς παραλείπεται το στάδιο καθαρισμού και οι χρόνοι εκχύλισης περιορίζονται μόλις σε μερικά λεπτά. Επιπρόσθετα, επιτυγχάνεται γρήγορη μεταφορά μάζας μεταξύ δείγματος και του προσροφητικού μέσου λόγω της ειδικής επιφάνειας των μαγνητικών υλικών (Wang et al., 2013).

Προκειμένου να εκτιμηθούν και να αξιολογηθούν οι παράμετροι που θα χρησιμοποιηθούν στον πειραματικό σχεδιασμό για την βελτιστοποίηση της μεθόδου MSPE, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν η επίδραση και ο όγκος του διαλύτη έκλουσης, το pH και η ταχύτητα ανάδευσης.

#### 9.2 Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης και του όγκου αυτού

Η επιλογή του διαλύτη έκλουσης είναι καθοριστική για την αποτελεσματική έκλουση των επιθυμητών ενώσεων από το προσροφητικό υλικό. Προκειμένου να προσδιοριστεί ο βέλτιστος διαλύτης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαλύτες έκλουσης όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, το εξάνιο, η μεθανόλη και η ακετόνη. Το εξάνιο παρουσίασε δυσκολία κατά τον χειρισμό, καθώς αλληλεπιδρά με το προσροφητικό υλικό με αποτέλεσμα να χρωματίζεται έντονα από τον σίδηρο. Η ακετόνη λόγω αναμειξιμότητας με τον νερό, παρουσίασε

προβλήματα κατά τον χειρισμό και την απομόνωση των ενώσεων κατά το στάδιο της έκλουσης. Επομένως το εξάνιο και η ακετόνη δεν μελετήθηκαν περαιτέρω.

Μεταξύ του οξικού αιθυλεστέρα και της μεθανόλης, επιλέχθηκε ο πρώτος διαλύτης καθώς παρουσίασε την υψηλότερη απόδοση εκχύλισης (εκφραζόμενη ως εκατοστιαία ανάκτηση %) (Σχήμα 9.1), και επομένως επιλέχθηκε για περαιτέρω εξέταση στο πειραματικό σχεδιασμό.

Προκειμένου να επιλεγεί ο βέλτιστος όγκος του διαλύτη έκλουσης, εξετάστηκαν οι όγκοι των 5 mL, 2 x 2,5 mL, 2 x 1,5 mL και 1,5 mL. Υψηλότερες ανακτήσεις παρουσιάζονται όταν η έκλουση των προσροφημένων -στην επιφάνεια νανοσωματιδίων- αναλυτών, πραγματοποιείται με 2 x 1,5 mL. Μικρότεροι όγκοι παρουσίασαν χαμηλότερες ανακτήσεις, ενώ για μεγαλύτερους όγκους διαλύτη (2 x 2,5mL), οι ανακτήσεις παρέμειναν σταθερές για όλους τους αναλύτες.



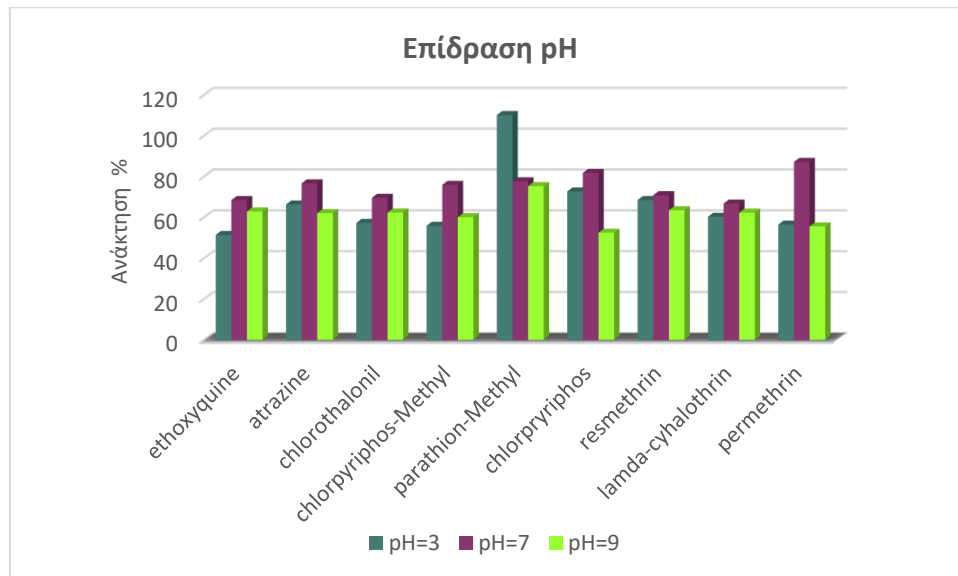
**Σχήμα 9.1:** Επίδραση του διαλύτη στην MSPE

### 9.3 Επίδραση του pH

Η ρύθμιση του pH, είναι μία σημαντική παράμετρος η οποία μπορεί να επηρεάσει την απόδοση της εκχύλισης, αφού οι αναλύτες βρίσκονται σε διαφορετικές μορφές ανάλογα με το pH του μέσου. Η ρύθμιση του pH, μπορεί να βελτιώσει την απόδοση εκχύλισης για τις ενώσεις που μπορούν να πρωτονιωθούν. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το pH ρυθμίζεται προκειμένου να ληφθεί η ουδέτερη μορφή των αναλυτών. Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση αυτής της μεταβλητής στην αποδοτικότητα της εκχύλισης, μελετήθηκαν τιμές pH

μεταξύ 3 και 9 (Σχήμα 9.2). Η ρύθμιση πραγματοποιήθηκε με διάλυμα θειικού οξέος 1M και υδροξειδίου του νατρίου 1M.

Οι περισσότερες αλκαλικές συνθήκες δεν μελετήθηκαν, λόγω της υδρόλυσης ορισμένων εντομοκτόνων που ανήκουν στο μείγμα, όπως πχ οργανοφωσφορικών (Jabbari et al., 2016 και Wang P. et al., 2018).



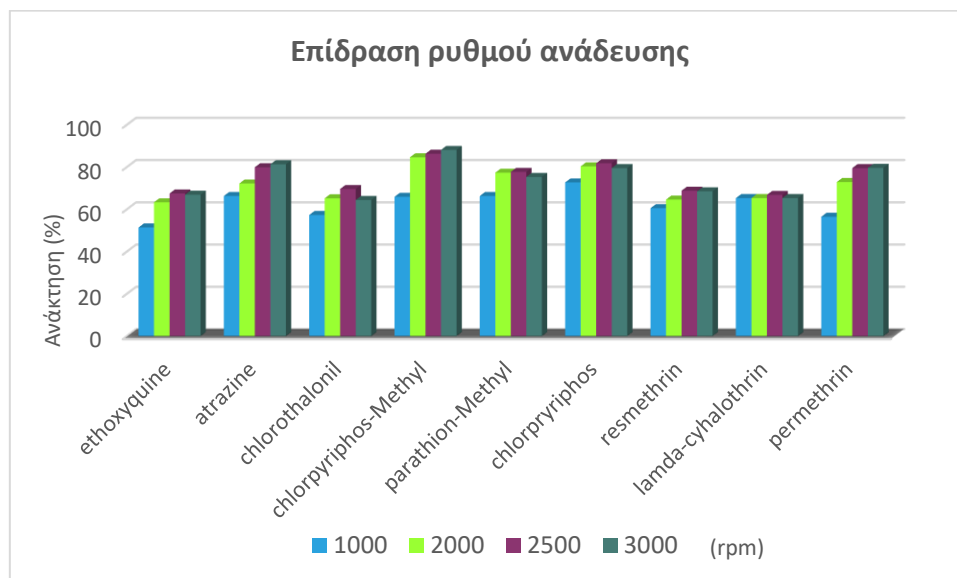
Σχήμα 9.2: Επίδραση του pH στην MSPE

Από τα αποτελέσματα έγινε αντιληπτό, ότι οι ανακτήσεις όλων των ενώσεων παρέμεναν σχεδόν ανεπηρέαστες, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στο ότι αρκετοί από τους αναλύτες δεν περιέχουν άτομα που μπορούν να ιοντιστούν σε υδατικά διαλύματα.

Βάσει αυτών των ευρημάτων, το pH δεν ρυθμίστηκε και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα θαλασσινού νερού που έχει pH περίπου 7.7.

#### 9.4 Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης

Η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης του υδατικού δείγματος στην ικανότητα εκχύλισης των αναλυτών μελετήθηκε μέσω συσκευή περιδίνησης για εύρος τιμών από 1000 rpm έως 3000 rpm. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του ρυθμού ανάδευσης, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ανάκτησης των αναλυτών μέχρι τις 2500 rpm (Σχήμα 9.3). Περαιτέρω αύξηση του ρυθμού ανάδευσης, δεν παρουσίασε μεταβολή στην ανάκτηση των αναλυτών. Επομένως, ως βέλτιστος ρυθμός ανάδευσης επιλέχθηκαν οι 2500 rpm.



**Σχήμα 9.3:** Επίδραση ρυθμού ανάδευσης στην MSPE

### 9.5 Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken design (BBD)

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι κύριες επιδράσεις και τυχόν αλληλεπιδράσεις των σημαντικότερων παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση της MSPE, όπως (α) η ποσότητα προσροφητικού  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C}18$  (β) ο χρόνος εκχύλισης και (γ) ο χρόνος έκλυσης, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη πειραματικού σχεδιασμού βασισμένη στο σχέδιο Box-Behnken Design (BBD). Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό BBD, πραγματοποιήθηκαν 15 πειράματα με τα πειραματικά σημεία να βρίσκονται στα μεσοδιαστήματα των ακμών του κύβου και στο κέντρο (κεντρικά σημεία) (Stalikas et al., 2009). Κάθε παράγοντας εξετάστηκε σε τρία επίπεδα, -1 για το χαμηλό, 0 για το μηδενικό και +1 για το υψηλό επίπεδο.

Τα κωδικοποιημένα και τα πραγματικά επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών στην πειραματική μήτρα σχεδιασμού BBD παρατίθενται στον Πίνακα 9 1.

**Πίνακας 9.1:** Παράγοντες που εξετάστηκαν μέσω του πειραματικού σχεδιασμού BBD και η μέση απόκριση

Παράμετροι	Επίπεδα			Μέση ανάκτηση (R%)
	Χαμηλό (-1)	Μηδενικό (0)	Υψηλό (+1)	
(X <sub>1</sub> ) Προσοφητικό (mg)	20	40	60	
(X <sub>2</sub> ) Χρόνος εκχύλισης (min)	3	5	7	
(X <sub>3</sub> ) Χρόνος έκλουσης (min)	2.5	5	7.5	
Πείραμα	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Μέση ανάκτηση (R%)
1	-1	-1	0	35.0
2	1	-1	0	61.0
3	-1	1	0	44.0
4	1	1	0	85.0
5	-1	0	-1	37.0
6	1	0	-1	67.0
7	-1	0	1	40.0
8	1	0	1	74.0
9	0	-1	-1	48.0
10	0	1	-1	68.0
11	0	-1	1	54.0
12	0	1	1	80.0
13	0	0	0	59.0
14	0	0	0	58.5
15	0	0	0	59.5

Για την παραγωγή της πειραματικής μήτρας και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης (εκφρασμένη ως ανακτήσεις Y, R%), με εφαρμογή του σύνθετου πειραματικού σχεδιασμού Box- Behnken, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

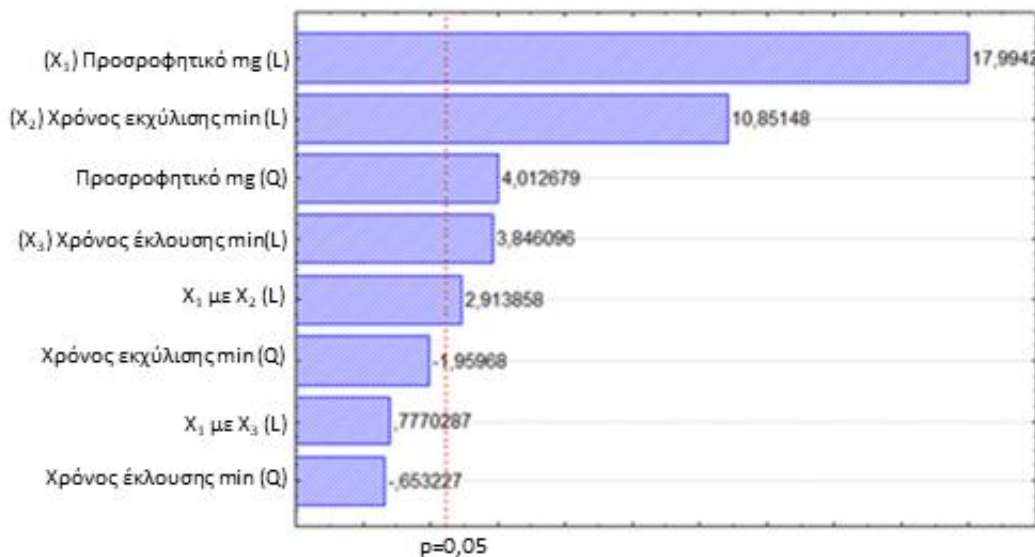
Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, για να εξεταστεί κατά πόσο οι υπό μελέτη παράγοντες ήταν στατιστικά σημαντικοί στην απόδοση της προτεινόμενης μεθόδου. Οι γραμμικές επιδράσεις, οι τετραγωνικές επιδράσεις καθώς και οι αλληλεπιδράσεις τους αξιολογήθηκαν μέσω της ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) σε εμβολιασμένα δείγματα συγκέντρωσης 30 μg L<sup>-1</sup> (Πίνακας 9.2).

**Πίνακας 9.2:** Ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) για το μαθηματικό μοντέλο Box- Behnken

Παράμετρος	Άθροισμα τετραγώνων (SS)	Βαθμοί ελευθερίας (df)	Μέσα τετραγώνων (MS)	Δοκιμασία F	Τιμή P
(X <sub>1</sub> ) Προσοφθητικό mg (L)	2145.125	1	2145.125	323.7925	0.000002
Προσοφθητικό mg (Q)	106.673	1	106.673	16.1016	0.007017
(X <sub>2</sub> ) Χρόνος εκχύλισης min (L)	780.125	1	780.125	117.7547	0.000036
Χρόνος εκχύλισης min (Q)	25.442	1	25.442	3.8403	0.097738
(X <sub>3</sub> ) Χρόνος έκλουσης min (L)	98.000	1	98.000	14.7925	0.008498
Χρόνος έκλουσης min (Q)	2.827	1	2.827	0.4267	0.537822
X <sub>1</sub> με X <sub>2</sub> (L)	56.250	1	56.25	8.4906	0.026845
X <sub>1</sub> με X <sub>3</sub> (L)	4.000	1	4.000	0.6038	0.466662
Καθαρό σφάλμα Pure Error	39.750	6	6.625		
Συνολικό (Sum of Squares)	3268.500	14			

Μια επίδραση θεωρείται σημαντική όταν είναι πάνω από το τυπικό σφάλμα σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ( $p < 0,05$ ) (Karsi et al., 2019). Από το διάγραμμα Pareto (Σχήμα 9.4), παρατηρείται ότι όλες οι γραμμικές αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές για τις παραμέτρους ( $X_1$ ) ποσότητα προσροφητικού, ( $X_2$ ) χρόνος εκχύλισης και ( $X_3$ ) χρόνος έκλουσης. Από τις τετραγωνικές επιδράσεις, σημαντική είναι η ποσότητα του υλικού ( $X_1^2$ ), ενώ σημαντική αποδεικνύεται η αλληλεπίδραση της ποσότητας του υλικού με τον χρόνο εκχύλισης ( $X_1$  με  $X_2$ ). Η ανάλυση των δεδομένων σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ( $p < 0,05$ ) οδήγησε στην δημιουργία της εξίσωσης 9.1:

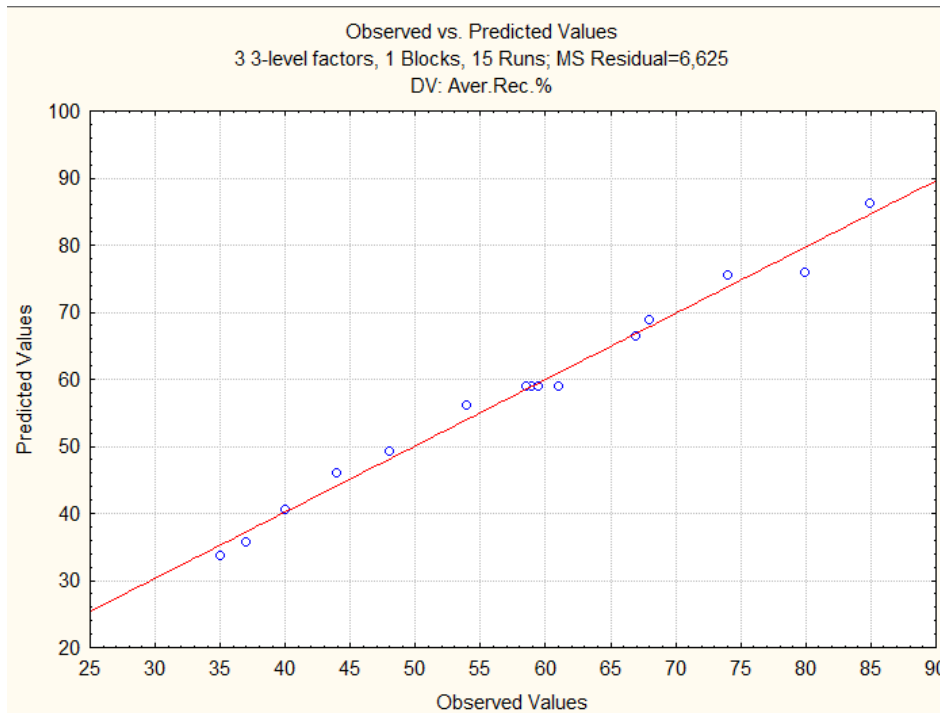
$$Y (R\%) = 57.75 + 16.375 X_1 + 2.6875 X_1^2 + 9.87500 X_2 + 3.5 X_3 + 3.75 X_1 X_2 \quad (\text{Εξίσωση 9.1})$$



Σχήμα 9.4: Διάγραμμα Pareto για τον πειραματικό σχεδιασμό BBD

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για πιθανή έλλειψη προσαρμογής των δεδομένων (*Lack of Fit*) που εκτιμά την επιτυχία ή όχι του μοντέλου να αναπαραστήσει τα δεδομένα στην πειραματική περιοχή, σε σημεία που δεν περιλαμβάνονται στην απόκριση. Ο έλεγχος έδειξε ότι η έλλειψη προσαρμογής δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p \text{ value} = 0,057$ ) σε σχέση με το καθαρό σφάλμα (*pure error*), υποδεικνύοντας την επάρκεια του μαθηματικού μοντέλου (Πίνακας 9.2).

Η καλή συσχέτιση των πραγματικών και προβλεπόμενων τιμών, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα του Σχήματος 9.5 αποδεικνύει την καταλληλότητα του μοντέλου για την πρόβλεψη.



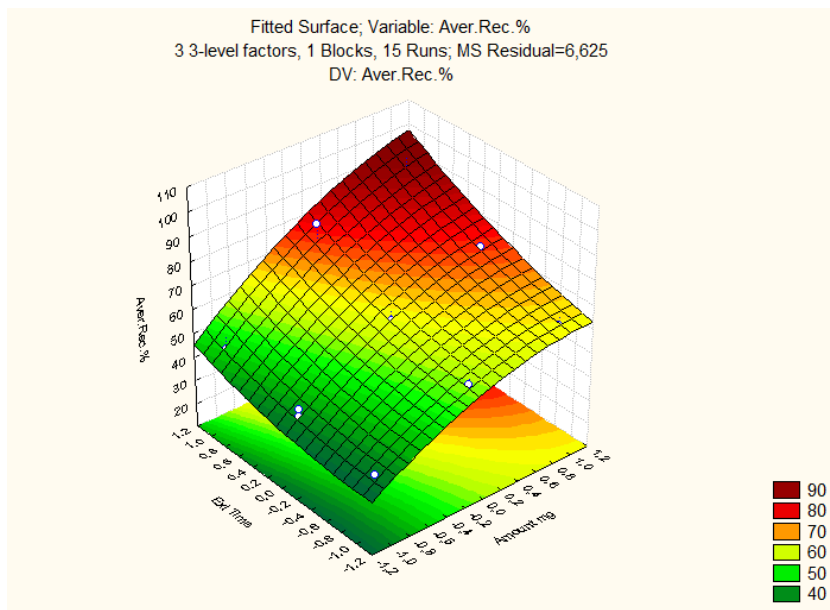
**Σχήμα 9.5:** Συσχέτιση μεταξύ πραγματικών τιμών και προβλεπόμενων

Επίσης, ο συντελεστής παλινδρόμησης του μοντέλου (*regression coefficient,  $R^2$* ), 0.98784 βρίσκεται σε λογική συμφωνία με τα πειραματικά αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι 98,78 % της μεταβλητότητας μπορεί να εκφραστεί από το μοντέλο και 1,22 % αποτελεί το υπόλοιπο μεταβλητότητας (*residual variability*). Ο προσαρμοσμένος συντελεστής συσχέτισης (*adjusted correlation coefficient*) ήταν επίσης υψηλός 0,97162 και υποστηρίζει την υψηλή προσαρμογή του μοντέλου.

Βάσει των αποτελεσμάτων του πειραματικού σχεδιασμού, η αλληλεπίδραση μεταξύ των εξεταζόμενων μεταβλητών της ποσότητας του υλικού και του χρόνου εκχύλισης αναπαρίσταται στο διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης (Σχήμα 9.6).

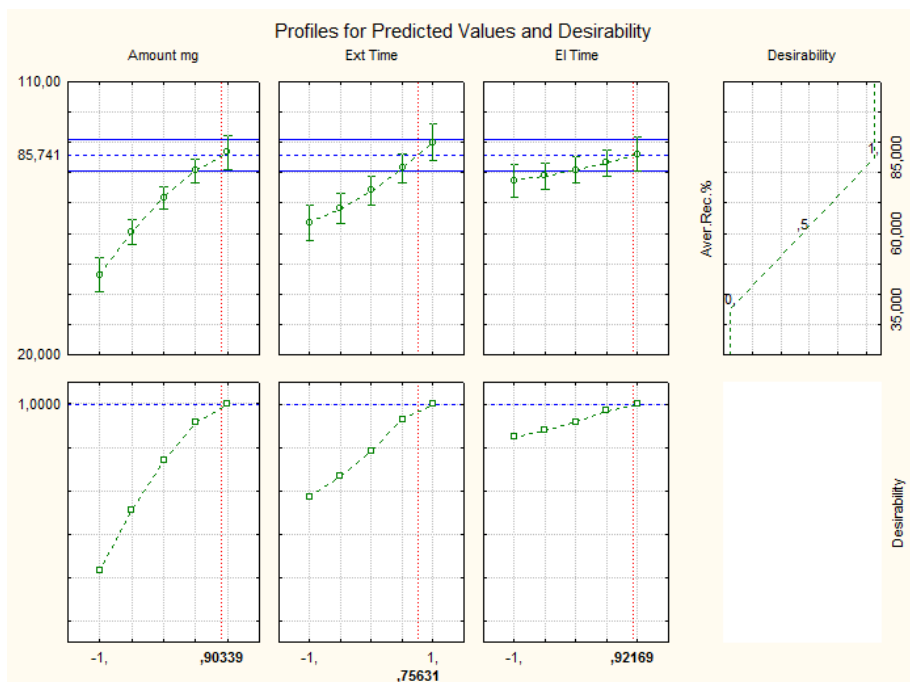
Υψηλότερες ανακτήσεις παρατηρούνται για τις υψηλότερες ποσότητες προσροφητικού υλικού  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ . Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό, παρατηρείται ότι η μέγιστη απόδοση της μεθόδου επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιούνται οι υψηλότερες τιμές και των δύο παραμέτρων (ποσότητα  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  και χρόνος εκχύλισης).





**Σχήμα 9.6:** Διάγραμμα επιφάνειας απόκρισης μεταξύ χρόνου εκχύλισης και ποσότητα προσροφητικού

Τέλος, οι βέλτιστες συνθήκες της προτεινόμενης μεθοδολογίας εκχύλισης, υπολογίστηκαν μέσω της συνάρτησης επιθυμητότητας (97% μέση ανάκτηση αναλυτών) (Σχήμα 9.7) (Montgomery D.C., 2005).



**Σχήμα 9.7:** Διάγραμμα βέλτιστων τιμών των συγκεκριμένων παραμέτρων

Εν κατακλείδι, οι βέλτιστες τιμές των πειραματικών παραμέτρων για την εκχύλιση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων από υδατικά δείγματα συνοψίζονται στον πίνακα 9.3.

**Πίνακας 9.3:** Βέλτιστες τιμές πειραματικών παραμέτρων

Παράγοντας	Τιμή
Όγκος δείγματος	10 mL
pH	6-8
Προσθήκη άλατος NaCl	0 %
Ποσότητα προσροφητικού Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @C18	54 mg
Χρόνος εκχύλισης	7 min
Διαλύτης έκλουσης	Οξικός αιθυλεστέρας
Όγκος διαλύτη έκλουσης	2 x 1,5ml
Χρόνος έκλουσης	5 min

Για λόγους επαλήθευσης εκτελέστηκαν τρεις πειραματικές δοκιμές βάση των προτεινόμενων από το μοντέλο βελτιστοποίησης συνθηκών. Τα πειραματικά αποτελέσματα (97 % μέση ανάκτηση αναλυτών) αποδεικνύουν υψηλή συσχέτιση με τα δεδομένα που ελήφθησαν από το μοντέλο βελτιστοποίησης, υποδεικνύοντας τόσο την αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου στην εκχύλιση των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων, όσο και την ικανότητα του μοντέλου να προβλέψει με επιτυχία την απόδοση της εκχύλισης.

### 9.6 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης μεθόδου MSPE

Η αξιολόγηση της αναλυτικής μεθοδολογίας MSPE/GC-MS, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την (2002/657/EC) απόφαση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για εφαρμογή της οδηγίας σχετικά με την επίδραση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (European Commission, 2002b). Τα υδατικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου δεν περιείχαν ίχνη των υπό μελέτη ενώσεων πάνω από το όριο ανίχνευσης.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμάνθηκαν 1.9 έως 62 ng L<sup>-1</sup>, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν μεταξύ 6.4 και 206 ng L<sup>-1</sup> (Πίνακας 9.4).

Η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας κυμάνθηκε μεταξύ 6,1 και 9,6 % για το μεσαίο επίπεδο συγκεντρώσεων, ενώ η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των ημερών κυμάνθηκε από 8,8 έως 17 % (Πίνακας 9.4).

Για να διερευνηθεί η γραμμικότητα της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα εμβολιασμένων δειγμάτων σε εννιά επίπεδα συγκεντρώσεων. Κάθε μια από τις εκχυλίσματα εγχύθηκε εις τριπλούν στον αέριο χρωματογράφο (GC-MS). Οι γραμμικότητα κυμάνθηκε μεταξύ 0,9901 και 0,9999 ενώ η γραμμική περιοχή για κάθε ένωση παρουσιάζεται στον Πίνακα 9.4.

Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό των ανακτήσεων των ενώσεων σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (LOQ,  $10 \times$  LOQ και  $100 \times$  LOQ) και κυμάνθηκαν από 60-99 % για κάθε ένωση (Πίνακας 9.4).

Πίνακας 9.4: Αποτελέσματα επικύρωσης μεθόδου

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng L <sup>-1</sup> )	LOD (ng L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ(ng L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης LOQ		Επίπεδο Συγκέντρωσης 10 LOQ		Επίπεδο Συγκέντρωσης 100 LOQ	
						R%	RSD <sub>r</sub> %-Intra <sup>d</sup>	R%	RSD <sub>r</sub> %-Intra	R%	RSD <sub>r</sub> %-Intra
Ethoxyquine	0.9993	30-500	9.0	30	17	63	15	65	9.6	63	3.3
Atrazine	0.9995	27-500	8.1	27	12	85	11	83	8.2	88	3.9
Chlorothalonil	0.9901	87-500	26	87	14	62	14	63	9.0	60	3.6
Chlorpyrifos-methyl	0.9999	6.4-500	1.9	6.4	9.6	91	8.3	90	6.1	92	2.4
Methyl-parathion	0.9978	52-500	16	52	8.8	98	8.4	99	6.3	99	2.9
Chlorpyrifos	0.9901	69-500	21	69	9.9	96	8.2	95	6.6	97	2.3
Resmethrin	0.9909	31-500	9.5	31	17	67	15	67	8.9	64	4.1
Lamda-cyhalothrin	0.9931	90-500	27	90	17	60	15	60	9.1	61	4.0
Permethrin	0.9916	206-500	62	206	14	75	12	76	8.4	83	3.1

(α) LOD: Όριο ανίχνευσης

(β) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(γ) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(δ) RSD<sub>r</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα

### 9.7 Επαναχρησιμοποίηση υλικών

Η επαναληψιμότητα, είναι βασικός παράγοντας για την αξιολόγηση της απόδοσης του προσροφητικού. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μαγνητικών προσροφητικών υλικών για την εκχύλιση των επιλεγμένων αναλυτών. Τα προσροφητικά υλικά  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C}$  18 μετά την χρησιμοποίησή τους εκπλύνονται δύο φορές με 5 mL δις απεσταγμένου νερού και 5mL ακετόνης και ξηραίνονται σε ήπιο ρεύμα αζώτου. Ακολούθως, 54 mg επαναχρησιμοποιημένου μαγνητικού υλικού προστίθενται σε ποτήρι ζέσης που περιέχει 10 mL απεσταγμένου νερού. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 7 κύκλοι προσρόφησης- έκλουσης, σύμφωνα με την πειραματική πορεία που περιεγράφηκε στην παράγραφο 7.13 (πρωτόκολλο 1), με συγκέντρωση εμβολιασμού  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  για κάθε αναλύτη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι ανακτήσεις για το chlorothalonil και το l-cyhalothrin ήταν μικρότερες από 60 % κατά την διάρκεια του τέταρτου κύκλου, ενώ για τις υπόλοιπες ενώσεις οι ανακτήσεις ήταν μεγαλύτερες από 60 %. Τα RSDs των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 8- έως 19 %.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι, τα μαγνητικά υλικά παρουσιάζουν σταθερότητα και δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, αφού η ικανότητα εκχύλισής τους παρέμεινε σταθερή και δύναται να χρησιμοποιηθούν για τρεις κύκλους, χωρίς να παρατηρείται μεταφορά των αναλυτών από το προσροφητικό (carry-over effect).

### 9.8 Σύγκριση MSPE ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$ ) σε σχέση με συμβατικές μεθόδους

Η εκχύλιση των αναλυτών με την μέθοδο  $\text{MSPE}@\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  παρέχει δυνατότητα αυτοματοποίησης, ευκολία στην εφαρμογή λόγω μικρού αριθμού σταδίων και μικρότερους χρόνους ανάλυσης σε σχέση με την SPE, καθώς μία παρτίδα 25-30 δειγμάτων μπορούν να εκχυλιστούν σε μόλις 90 min, χωρίς να υπολογίζεται ο χρόνος εξάτμισης του διαλύτη, ενώ με την SPE απαιτείται περίπου τριπλάσιος χρόνος (280 min).

Επιπρόσθετα, η μέθοδος είναι εξαιρετικά οικονομική καθώς αφενός δεν απαιτείται συσκευή εκχύλισης και αφετέρου η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μαγνητικών υλικών κάνει την μέθοδο την πλέον οικονομική καθώς αποφεύγεται η αγορά πολυδάπανων μικροστηλών εκχύλισης που δεν επιτρέπουν την επαναχρησιμοποίηση του προσροφητικού υλικού.

Οι μικροί όγκοι οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται (μόλις 5 mL), την καθιστούν φιλική προς τον χρήστη αλλά και το περιβάλλον.

Όσον αφορά τα αναλυτικά χαρακτηριστικά, η  $\text{MSPE}@\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  παρουσιάζει συγκρίσιμα έως και χαμηλότερα σε μερικές περιπτώσεις όρια ανίχνευσης από σύγχρονες

αναλυτικές τεχνικές όπως η QuEChERS, η DLLME, η UAEME και η MSPE με διαφορετικά τροποποιημένα νανοσωματίδια. Η πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση των μεθόδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 9.5.

**Πίνακας 9.5:** Βιβλιογραφική ανασκόπηση αναλυτικών χαρακτηριστικών μεθόδων για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων

Μέθοδος	Προσροφητικό υλικό	Χρόνος εκχύλισης (min)	Διαλύτης (mL)	Επαναχρησιμοποίηση (times)	Ανάκτηση %	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Αναφορά
MSPE-GC-MS	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> @C18	7	3	5	60-98	0,0019-0,0625	(Kapsi et al., 2020)
SPE-GC-MS	poly(EGDMA-MATrp)	90	*	*	39-99	3-10	(Ye et al., 2014)
SPE-GC-MS	PEDOT-TiO <sub>2</sub>	75	*	*	86-107	0,05-0,12	(Ye et al., 2014)
QwEChERS-GC-ECD	QwEChERS salts	20	>200	*	*	1,4-3,5	(Bai et al., 2013)
QwEChERS-GC-MS	QwEChERS salts	22	11,5	0	78-118	10-18	(Wang P. et al., 2018)
MSPE-UFLC-UV	polystyrene-coated MNPs	20	3	30	79-94	2,03-5,52	(Yu X. et al., 2012)
MSPE	Magnetic graphene	15	*	*	*	0,1-200	(Ye Q. et al., 2014)
DLLE-LC-UV	[C8MIM][PF <sub>6</sub> ] (43,6 mg)	*	*	*	101-113,4	5	(He L. et al., 2009)
SPE-LC-MS-MS	C18 (500mg)	*	*	0	37-51	8,6	(Messegue-Lloret et al., 2017)
SPE-HPLC-UV	*	85	>100	*	*	0,034	(Zhao G. et al., 2011)
MSPE-GC-MS	C18-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @mSiO <sub>2</sub>	*	0,8	*	no data	3	(Xie J. et al., 2013)
MSPE-GC-FPD	G@SiO <sub>2</sub> @Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	7	6	10	79-118	10-18	(Wang P. et al., 2018)
USAEME-LC-DAD	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl (150 $\mu\text{L}$ )	*	*	*	87-102	0,1	(Wu C. et al., 2010)





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

### ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ SPE ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΦΥΣΙΚΑ ΝΕΡΑ

#### A. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ

##### 10.1 Εισαγωγή

Η υγρή στερεή εκχύλιση είναι μια σύγχρονη αναλυτική τεχνική, τα στάδια της οποίας καθώς επίσης οι παράμετροι που την επηρεάζουν, έχουν μελετηθεί εκτενώς τόσο από την βιβλιογραφία καθώς επίσης και από την ερευνητική εργασία της συγγραφέως (Karsi et al., 2019). Στόχος της παρούσας Διατριβής αποτέλεσε η ανάπτυξη δύο πρωτοκόλλων βασισμένα στην υγρή-στερεή εκχύλιση (Solid Phase Extraction, SPE). Η επιλογή πραγματοποιήθηκε βάσει των ιδιοτήτων των ενώσεων και της ενόργανης διάταξης στην οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση. Το πρώτο, αφορά το μείγμα I και η έγχυση πραγματοποιήθηκε σε GC-MS, ενώ το δεύτερο αφορά το μείγμα II και η έγχυσή του πραγματοποιήθηκε σε LC-LTQ/Orbitrap-MS.

Για τη βελτιστοποίηση και επικύρωση των πρωτοκόλλων χρησιμοποιήθηκαν τυφλά υδατικά δείγματα ποτάμιου και θαλασσινού νερού. Τα ποτάμια συλλέχθηκαν από τον Βενέτικο ποταμό, ένα από τους μεγαλύτερους παραπόταμους του Αλιάκμονα, κοντά στις πηγές του έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ότι τα δείγματα δεν είναι επιβαρυμένα με οργανικές ενώσεις. Τα δείγματα θαλάσσιου νερού συλλέχθηκαν από την περιοχή της Ηγουμενίτσας (Ιόνιο Πέλαγος), μακριά από τις υδατοκαλλιέργειες της περιοχής καθώς επίσης και σε απόσταση από την ξηρά (για να αποφευχθεί η ανίχνευση φυτοπροστατευτικών ενώσεων από τυχόν έκπλυση εδάφους). Πριν τον εμβολιασμό των δειγμάτων, τα δείγματα αναλύθηκαν για να διασφαλιστεί ότι δεν περιέχουν ίχνη των υπό μελέτη φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Παράμετροι βελτιστοποίησης των πρωτοκόλλων αποτέλεσαν ο διαλύτης ενεργοποίησης και έκλουσης, το προσροφητικό υλικό, η ιοντική ισχύς και το pH του δείγματος. Κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης αποτέλεσε η ανάκτηση (% R) των ενώσεων, μετά από εμβολιασμό δείγματος νερού (250 mL) σε τρία

επίπεδα συγκεντρώσεων (LOQ, 10 LOQ και 100 LOQ) και ο μικρότερος αριθμός συνεκχυλιζόμενων ενώσεων με χαμηλότερα όρια θορύβου κατά τον χρωματογραφικό προσδιορισμό.

## 10.2 Προκαταρκτικά πειράματα SPE

### 10.2.1 Επίδραση προσροφητικού υλικού

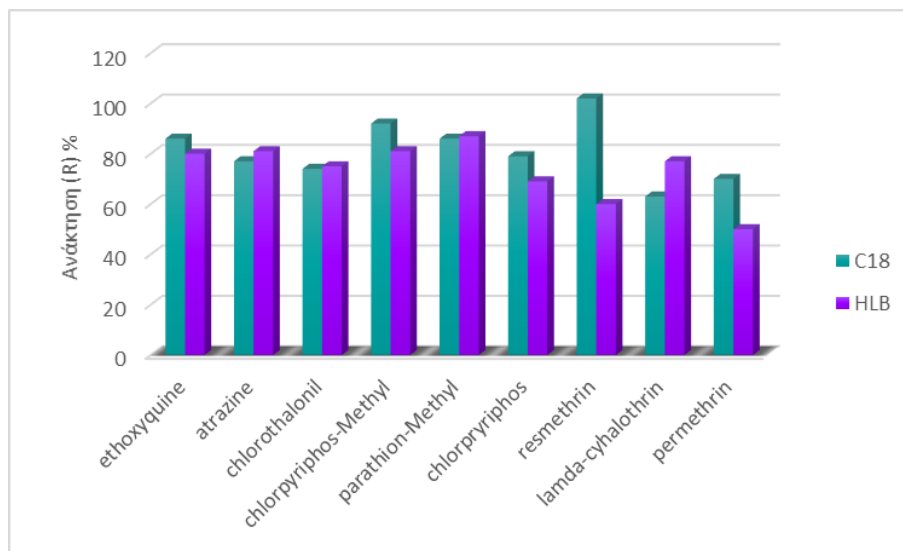
Η επιλογή του προσροφητικού είναι ένα καθοριστικό βήμα για να ελαχιστοποιηθούν τυχόν απώλειες των αναλυτών, κατά την εκχύλιση της στερεάς φάσης. Προκειμένου να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης, μελετήθηκαν δύο είδη προσροφητικών υλικών οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (hydrophilic lipophilic balance, 200 mg, 6 mL) και οι μικροστήλες εκχύλισης Bond Elut C18 (200mg, 6mL). Για κάθε ένα προσροφητικό πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις (n=3).

Η επιλογή τους για περαιτέρω δοκιμές και για τα δύο μείγματα ενώσεων βασίστηκε στο υλικό πλήρωσης που περιέχουν. Οι μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB περιέχουν ένα πολυμερές προσροφητικό ανάστροφης φάσης (reserved phase sorbents), αποτελούμενο από δύο μονομερή, την υδρόφιλη N-βινυλοπυρολιδόνη (N-vinylpyrrolidone) και το λιπόφιλο διβινυλοβενζόλιο (divinylbenzene) σε τέτοια αναλογία μεταξύ τους ώστε να επιτυγχάνεται υδρόφιλη-λιπόφιλη ισορροπία. Αντίστοιχα, τα C18 προσροφητικά είναι επίσης ανάστροφης φάσης κατάλληλα για μη πολικές έως μετρίως πολικές ενώσεις. Αποτελούν τα πιο διαδεδομένα υλικά λόγω της υψηλής προσροφητικής ικανότητας ευρέως φάσματος αναλυτών (Δεληγιαννάκης Ι., 2010).

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, και τα δύο προσροφητικά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στα επιφανειακά ύδατα και έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων μεγάλου εύρους πολικότητας (Gil-García et al., 2006 και Kouzayha et al., 2012). Οι μελετώμενες ενώσεις παρουσιάζουν εύρος πολικότητας από μη πολικές έως μετρίως πολικές σύμφωνα του συντελεστή κατανομής οκτανόλης νερού ( $\log K_{ow}$ ) που κυμαίνεται μεταξύ 2,6 και 7.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, και τα δύο προσροφητικά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω βελτιστοποίηση καθώς παρουσιάζουν ικανοποιητικές ανακτήσεις (υψηλότερες από 65 %) για τους περισσότερους αναλύτες (Σχήμα 10.1). Ωστόσο το πρωτόκολλο με τις μικροστήλες C18 παρουσιάζει υψηλότερες ανακτήσεις για τα πυρεθροειδή (μείγμα I), σε σχέση με τα HLB, τα οποία εκτός των άλλων, στερούνται εκλεκτικότητας, καθώς μεγάλος αριθμός μη προσδιοριζόμενων ενώσεων συγκρατούνται και τελικά εκροφώνται. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς τα

μη πολικά φυτοφάρμακα όπως τα πυρεθροειδή ανακτώνται δύσκολα όταν χρησιμοποιούνται μικροστήλες HLB (Ruiz-Gil et al., 2008). Επιπρόσθετα, οι μικροστήλες C18 παρουσιάζουν υψηλότερες ανακτήσεις για τις ενώσεις που περιέχουν αλογόνα στο μόριό τους όπως το chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, chlorothalonil, permethrin, λ-cyhalothrin, atrazine (Andrade-Eiroa et al., 2016b).



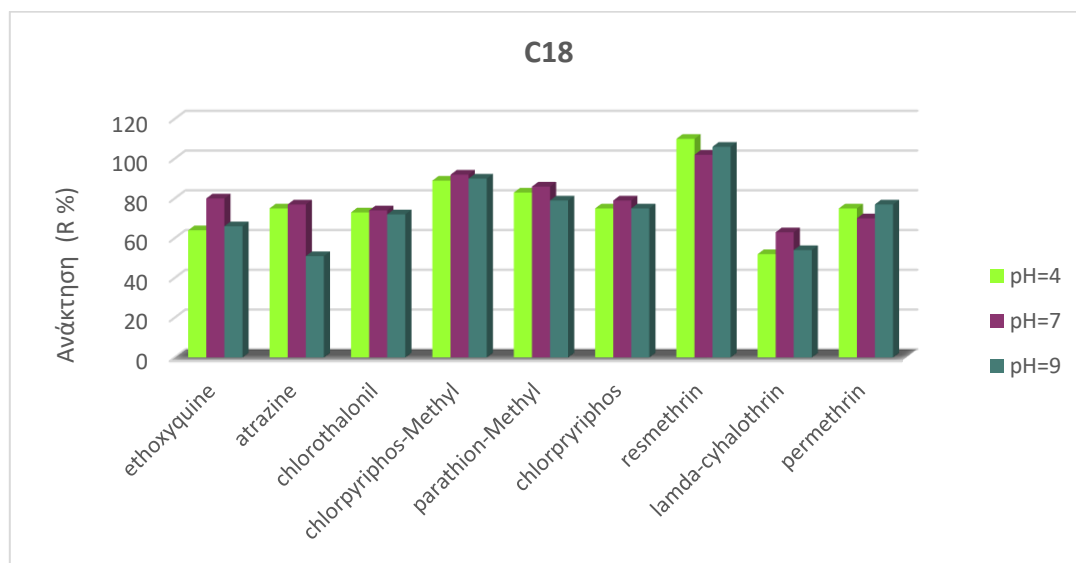
**Σχήμα 10.1:** Ανακτήσεις (%) φυτοπροστατευτικών ενώσεων με χρήση προσροφητικών υλικών C18 και HLB

### 10.2.2 Επίδραση του pH

Οι αλληλεπιδράσεις των αναλυτών με το προσροφητικό εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό με τη μορφή στην οποία βρίσκεται ο αναλύτης κατά την εκχύλιση. Στην εκχύλιση που πραγματοποιείται μέσω ανάστροφης φάσης είναι απαραίτητη η ρύθμιση του pH του δείγματος ώστε να εξασφαλιστεί η μοριακή μορφή των ενώσεων που εκχυλίζονται και έτσι να επιτευχθεί αποτελεσματική συγκράτηση από το προσροφητικό (Caldas et al., 2016).

Η επίδραση του pH στην ανάκτηση των επιλεγμένων ενώσεων μελετήθηκε σε εύρος τιμών 4-9 (Σχήμα 10.2). Ελαφρώς υψηλότερες ανακτήσεις, προέκυψαν για τις μικροστήλες C18 με pH=7, για τις περισσότερες από τις εξεταζόμενες ουσίες. Τα αποτελέσματα είναι εύλογα καθώς μεγάλο μέρος των υπό ανάλυση ενώσεων δεν έχουν άτομα που μπορούν να ιονιστούν στο μόριό τους, ενώ οι υπόλοιπες κυμαίνονται σε τιμές pKa από 4,2 έως 7,15 με εξαίρεση το λ-cyhalothrin (pKa 10.65). Ακραίες τιμές pH δεν εξετάστηκαν καθώς οδηγεί σε αποσταθεροποίηση των C18 (Andrade-Eiroa et al., 2016b).

Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι πραγματοποιήθηκαν και αναλύσεις στις οποίες δεν έγινε ρύθμιση του pH στα δείγματα. Από τα αποτελέσματα προέκυψαν ανακτήσεις, όπως ήταν αναμενόμενο, παρόμοιες με την περίπτωση των C18 στο pH=7, για όλες τις ενώσεις. Επομένως, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι ο στόχος της παρούσας Διατριβής είναι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός φυτοφαρμάκων που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες, με ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες και ότι το εύρος τιμών pH των πραγματικών δειγμάτων κυμαίνεται από 7,2-7,9 (μέση 7,5) τελικά επιλέχθηκε η χρήση των μικροστηλών C18 χωρίς ρύθμιση του pH.



Σχήμα 10.2: Επίδραση pH στις ανακτήσεις φυτοπροστατευτικών ενώσεων

### 10.3 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης φυτοπροστατευτικών ενώσεων από τα επιφανειακά νερά (μείγμα I)

Μετά την επιλογή του βέλτιστου προσροφητικού και της βέλτιστης τιμής pH, μελετήθηκαν 4 πρωτόκολλα με σκοπό την επίτευξη υψηλών τιμών ευαισθησίας κατά την ανάλυση (Πίνακας 10.1). Έτσι μέσω αυτών των πρωτοκόλλων, διερευνήθηκε η επίδραση των διαλυτών ενεργοποίησης και έκλουσης καθώς επίσης και η προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο δείγμα για την αύξηση της ιοντικής ισχύς. Για κάθε ένα από αυτά πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις (n=3).

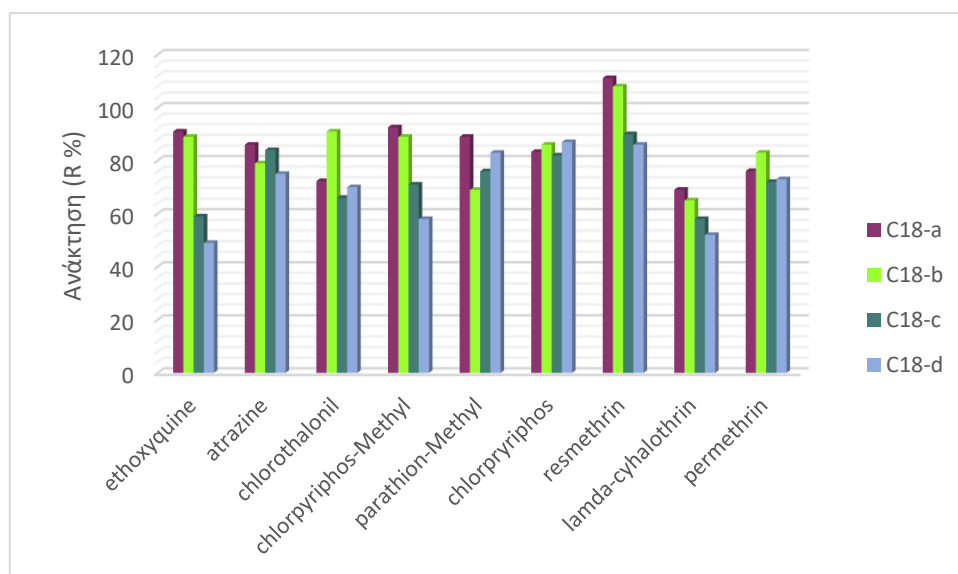
Πίνακας 10.1: Πρωτόκολλα εκχύλισης φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I)

Πρωτόκολλο	C18-a	C18-b	C18-c	C18-d
Μικροστήλες εκχύλισης			C18	
Όγκος δείγματος			250 mL	
Ρύθμιση pH			Χωρίς ρύθμιση	
NaCl %	0 %	5 %	0 %	5 %
MeOH %	2 %	2 %	2 %	2 %
Ενεργοποίηση	2x 6 mL EtAc	2x 6 mL EtAc	6 mL MeOH	6 mL MeOH
	2x 6 mL MeOH	2x 6 mL MeOH	6 mL H <sub>2</sub> O	6 mL H <sub>2</sub> O
	6 mL H <sub>2</sub> O	6 mL H <sub>2</sub> O		
Έκπλυση	6 mL H <sub>2</sub> O LC-MS	6 mL H <sub>2</sub> O LC-MS	6 mL H <sub>2</sub> O LC-MS	6 mL H <sub>2</sub> O LC-MS
Έκλουση	2 x 6 mL EtAc	2 x 6 mL EtAc	2 x 6 mL MeOH	2 x 6 mL MeOH

Πιο αναλυτικά, στο δεύτερο και τέταρτο πρωτόκολλο, προστέθηκε 5 % NaCl στο δείγμα με σκοπό την αύξηση της ιοντικής ισχύς, ενώ στο πρώτο και στο τρίτο δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη. Σε όλα τα πρωτόκολλα προστέθηκε 2 % οργανικός διαλύτης στο δείγμα (μεθανόλη). Στα πρωτόκολλα C18-a και C18-b η ενεργοποίηση και εξισορρόπηση του προσροφητικού υλικού πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη 2 x 6 mL οξικού αιθυλεστέρα, 6 mL μεθανόλης ακολουθούμενη από 6 mL νερό (καθαρότητας LC-MS), ενώ στα C18-c και d η ενεργοποίηση επιτεύχθηκε με 6 mL μεθανόλης ακολουθούμενη από 5 mL νερό (καθαρότητας LC-MS).

Και στα 4 πρωτόκολλα εκχυλίστηκαν 250 mL δείγματος νερού με σταθερή ροή ρυθμισμένη περίπου σε 1-2 mL min<sup>-1</sup>. Η έκπλυση των μικροστηλών μετά τη φόρτωση του συνόλου του δείγματος και πριν από την έκλουση, σε όλα τα πρωτόκολλα πραγματοποιήθηκε με 6 mL νερού καθαρότητας LC-MS. Τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο διαλύτης έκλουσης. Στο πρωτόκολλο C18-a και b, χρησιμοποιήθηκαν δύο φορές από 6 mL οξικού αιθυλεστέρα, ενώ στα C18-c και d, 2 x 6 mL μεθανόλης. Το συνολικό έκλουσμα για το κάθε πρωτόκολλο συλλέχθηκε στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολούθως, το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε 100 μL εξανίου.

Στο Σχήμα 10.3 αποτυπώνονται οι ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων μετά την εφαρμογή των τεσσάρων διαφορετικών πρωτοκόλλων εκχύλισης.



**Σχήμα 10.3:** Ανακτήσεις (%) φυτοπροστατευτικών ενώσεων για τα προτεινόμενα πρωτόκολλα εκχύλισης

#### 10.4 Άλλοι παράγοντες επίδρασης

Όσον αφορά τον όγκο δείγματος, σε όλα τα πρωτόκολλα παρέμεινε σταθερός στα 250 mL, γιατί μικροί όγκοι οδηγούν σε μικρή προσυγκέντρωση ενώ για μεγάλους όγκους έχει παρατηρηθεί αδυναμία συγκράτησης των αναλυτών όταν χρησιμοποιούνται μικροστήλες σε συνδυασμό με επιβαρυμένα δείγματα. Για τα προσροφητικά υλικά ανάστροφης φάσης, ο μέγιστος όγκος (όγκος διακοπής- breakthrough volume) εξαρτάται επιπλέον από τη λιποφιλία της ένωσης και τη μάζα του προσροφητικού που χρησιμοποιείται. Σύμφωνα με τις προδιαγραφές της κατασκευαστικής εταιρίας, οι προτεινόμενοι όγκοι αναλυόμενων υδατικών δειγμάτων κυμαίνονται από 50 έως 250 mL.

Προκαταρκτικά πειράματα μεταξύ των δύο προσροφητικών υλικών για τον ίδιο όγκο (250 mL) δεν παρουσίασε διαφορές στην ικανότητα εκχύλισης ανάμεσα στις δύο μικροστήλες. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση των μικροστηλών C18, οι μεγάλοι όγκοι δείγματος δύναται να αφαιρέσουν τον διαλύτη ενεργοποίησης από το προσροφητικό υλικό με αποτέλεσμα να εμποδιστεί η πρόσδεση των ενώσεων μεταξύ των ανθρακικών αλυσίδων (Feo et al., 2010). Επομένως, για όλα τα παραπάνω ο όγκος δείγματος ορίστηκε στα 250 mL.

Η επιλογή του οξικού αιθυλεστέρα ως διαλύτη έκλουσης, βασίστηκε τόσο στη βιβλιογραφία όσο και με τις πληροφορίες του κατασκευαστή (Andrade-Eiroa et al., 2016b και Jordan et al., 2009). Ως υποψήφιος διαλύτης έκλουσης, αξιολογήθηκε και η μεθανόλη καθώς είναι ένας αποτελεσματικός για την έκλουση μέτριας πολικότητας ενώσεων, και συμβατή με τα περισσότερα προσροφητικά υλικά.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι αμφότεροι οι διαλύτες είχαν τη δυνατότητα να εκλούσουν τις ενώσεις παρουσιάζοντας ικανοποιητικές ανακτήσεις. Στην περίπτωση των μη πολικών ενώσεων το μετρούμενο αναλυτικό σήμα ήταν υψηλότερο για τον διαλύτη έκλυσης οξικό αιθυλεστέρα (2 x 6 mL) σε σχέση με τη μεθανόλη (2 x 6 mL).

Σε όλα τα πρωτόκολλα προστέθηκε *οργανικός διαλύτης στο δείγμα* πριν την ανάλυση καθώς έτσι αυξάνεται η διαλυτότητα των υπό μελέτη ενώσεων από τα γυάλινα σκεύη στην υδατική φάση με αποτέλεσμα υψηλότερες ανακτήσεις (Kouzayha et al., 2012 και Feo et al., 2010). Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν διαφορετικοί όγκοι μεθανόλης σε εύρος 0-5% v/v και σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όγκοι μικρότεροι από 2% δεν παρουσίασαν αύξηση στις ανακτήσεις, ενώ για μεγαλύτερους από 2%, οι ανακτήσεις παρέμειναν αμετάβλητες.

### 10.5 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης φυτοπροστατευτικών ενώσεων από τα επιφανειακά νερά (μείγμα II)

Προκειμένου να διερευνηθούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης των φυτοπροστατευτικών ενώσεων του μείγματος II από τα θαλασσινά νερά, ελέγχθηκαν ως προς τις ανακτήσεις τους δύο πρωτόκολλα εκχύλισης (Πίνακας 10.2), εκτελώντας τρεις επαναλήψεις για το κάθε ένα (n=3).

**Πίνακας 10.2:** Πρωτόκολλα εκχύλισης φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα II)

Πρωτόκολλο	HLB-a	HLB-b
Μικροστήλες εκχύλισης		HLB
Όγκος δείγματος	250 mL	250 mL
Ρύθμιση pH		
Ενεργοποίηση	6 mL MeOH	6 mL MeOH
	6 mL H <sub>2</sub> O	6 mL H <sub>2</sub> O
Έκπλυση	6 mL H <sub>2</sub> O LC-MS	6 mL H <sub>2</sub> O LC-MS
		3 mL DCM
Έκλυση	2 x 5 mL MeOH	3 mL Hexane
		3 mL Acetone

Πιο αναλυτικά, και στα δύο πρωτόκολλα, έγινε χρήση και των γενικών στηλών εκχύλισης Oasis HLB (hydrophilic lipophilic balance, 200 mg, 6 mL) καθώς είναι αποτελεσματικές και συμβατές με μεγάλο εύρος πολικότητας προσδιοριζόμενων ενώσεων.

Όσον αφορά τον όγκο του δείγματος, χρησιμοποιήθηκαν 250 mL δείγματος για τους ίδιους λόγους που περιεγραφήκαν και στην παράγραφο 10.4.

Σε όλα τα πρωτόκολλα η ενεργοποίηση και εξισορρόπηση του προσροφητικού υλικού πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη 5 mL μεθανόλης ακολουθούμενης από 5 mL νερό (καθαρότητας LC-MS). Ακολούθησε η εκχύλιση του δείγματος νερού με σταθερή ροή 1-2 mL min<sup>-1</sup>. Η έκπλυση των μικροστηλών μετά τη φόρτωση του συνόλου του δείγματος και πριν από την έκλουση, σε όλα τα πρωτόκολλα πραγματοποιήθηκε με 6 mL νερού καθαρότητας LC-MS.

Τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο διαλύτης έκλουσης. Στο πρωτόκολλο HLB-a, η έκλουση πραγματοποιήθηκε με δύο φορές από 5 mL μεθανόλης, ενώ στο πρωτόκολλο HLB-b, με 3 mL διχλωρομεθάνιο, 3 mL εξάνιο και 3 mL ακετόνη, διαδοχικά και με αυτή σειρά. Το έκλουσμα συγκεντρώθηκε στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα, εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε 200 μL διαλύτη νερό:μεθανόλη σε αναλογία 90:10 με (0,1 % μυρμηκικό οξύ v/v).

Στον Πίνακα 10.3 αποτυπώνονται οι ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων μετά την εφαρμογή των τριών πρωτοκόλλων εκχύλισης.

**Πίνακας 10.3:** Ανάκτηση (%) και RSD (intra και inter-day) για κάθε αναλύτη

HLB-a Ανάκτηση %				
	LOQ ng/L	100 LOQ ng/L	RSD <sub>f</sub>	RSD <sub>R</sub>
Irgarol	86,5 %	90,2 %	3,4	5,1
Azamethiphos	77,0 %	81,0 %	5,7	6,2
Deltamethrin	67,0 %	63,0 %	6,6	7,3
HLB-b Ανάκτηση %				
	LOQ ng/L	100 LOQ ng/L	RSD <sub>f</sub>	RSD <sub>R</sub>
Irgarol	93,0 %	97,0 %	7,8	9,1
Azamethiphos	88,0 %	92,0 %	8,6	8,7
Deltamethrin	90,0 %	83,0 %	7,0	11

### 10.6 Επίδραση προσροφητικού υλικού, διαλύτη εκχύλισης, pH και ταχύτητας ροής

Αναφορικά με το μείγμα II, χρησιμοποιήθηκαν οι μικροστήλες HLB για περαιτέρω βελτιστοποίηση. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 10.2.1 αλλά και στην εισαγωγή της παρούσας Διατριβής, πρόκειται για ένα πολυμερές πληρωτικό υλικό που παραμένει σταθερό τόσο σε ακραίες τιμές pH (0-14) όσο και σε επαφή με μεγάλου εύρους πολικότητας διαλύτες.



Έτσι η έκλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαλυτών μέτριας πολικότητας ή ακόμα και πολικών. Το γεγονός ότι το πληρωτικό υλικό είναι υδατικά διαβρέξιμο, έχει σαν αποτέλεσμα αφενός υψηλές ανακτήσεις ακόμα και αν στεγνώσει, αφετέρου παρέχει απλοποίηση του πρωτοκόλλου καθώς παραλείπεται το βήμα της ενεργοποίησης. Είναι προσροφητικό που χαρακτηρίζεται από μεγάλη ικανότητα κατακράτησης, παρέχει υψηλές ανακτήσεις και είναι συμβατό με απλά και γενικά πρωτόκολλα. Έχει μέγεθος πόρων 80 Å και μέγεθος σωματιδίων 30 μm με ειδική επιφάνεια περίπου 800 m<sup>2</sup>/g (Andrade-Eiroa et al., 2016b).

Η πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ορθή έκλυση των αναλυτών από το προσροφητικό υλικό. Στην περίπτωση του πρωτόκολλου HLB-a, ως διαλύτης έκλυσης χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη ενώ στο πρωτόκολλο εκχύλισης HLB-b διαδοχική έκλυση με διαλύτες διχλωρομεθάνιο, εξάνιο και ακετόνη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.3, γίνεται αντιληπτό ότι η μεθανόλη είναι ικανή να ανακτήσει το Irgarol όχι όμως τους υπόλοιπες αναλύτες. Το πρωτόκολλο HLB-b παρουσίασε τις υψηλότερες ανακτήσεις για όλους τους αναλύτες.

Παράγοντας που επιδρά σημαντικά στις ανακτήσεις αποτελεί η ταχύτητα ροής του δείγματος και του διαλύτη έκλυσης (Andrade-Eiroa et al., 2016b). Στην εκχύλιση στερεάς φάσης με μικροστήλες χρησιμοποιούνται ροές δείγματος περίπου 3-10 mL min<sup>-1</sup>. Ροή δείγματος μεγαλύτερη των 10 mL min<sup>-1</sup> είναι απαγορευτική καθώς δεν επιτρέπεται η πρόσδεση των αναλυτών στο προσροφητικό.

Ως γνωστόν, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανιοντικών ενώσεων και του προσροφητικού HLB μειώνονται με την αύξηση του pH, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατιονικών ενώσεων και του ίδιου προσροφητικού εμφανίζονται αυξημένες (Δεληγιαννάκης Ι., 2010). Στην περίπτωση του μείγματος II, το pH δεν αποτέλεσε παράγοντα μελέτης καθώς 2 από τις 3 ενώσεις του μείγματος δεν έχουν άτομα που μπορούν να ιονιστούν στο μόριό τους. Από την άλλη μεριά έχοντας σαν σκοπό, την ανάπτυξη ενός γρήγορου και εύχρηστου πρωτοκόλλου για την ανάλυση δειγμάτων θαλασσινού νερού (pH περίπου 7,7) δεν ρυθμίστηκε το pH όπως στο πρωτόκολλο του μείγματος I.

## B. Επικύρωση

### 10.7 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης της μεθόδου (Μείγμα I) και (Μείγμα II)

Η αξιολόγηση της αναλυτικής μεθοδολογίας SPE/GC-MS που αφορά το μείγμα I και της SPE/UHPLC–LTQ/Orbitrap MS που αφορά το μείγμα II, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την 2002/657/EC απόφαση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την εφαρμογή της Οδηγίας σχετικά με την επίδραση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για το μείγμα I, κυμάνθηκαν από 1 έως 12 ng L<sup>-1</sup> για το ποτάμιο και από 1 έως 10 ng L<sup>-1</sup> για το θαλασσινό αντίστοιχα, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης για το μείγμα II κυμάνθηκαν μεταξύ 0.3 και 12.5 ng L<sup>-1</sup> (Πίνακας 10.4-10.6).

Η επαναληψιμότητα των αναλυτών του μείγματος I, εντός της ίδιας ημέρας κυμάνθηκε μεταξύ 5,3-10,5% για το για το θαλασσινό νερό, μεταξύ 8,4 έως 10,9% για το ποτάμιο νερό, ενώ η επαναληψιμότητα μεταξύ των ημερών για το μείγμα II ήταν μικρότερη από 8,9 % για όλους τους αναλύτες (Πίνακας 10.4-10.6).

Για να διερευνηθεί η γραμμικότητα της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις εμβολιασμένων δειγμάτων σε εννιά επίπεδα συγκεντρώσεων. Κάθε μια από τις εκχυλίσεις εγχύθηκε εις τριπλούν στον αέριο χρωματογράφο (GC-MS). Η γραμμικότητα των αναλυτών του μείγματος I, κυμάνθηκε μεταξύ 0.9911 και 0.9992 για το ποτάμιο, 0.9931-0.9997 για το θαλασσινό, ενώ η γραμμική περιοχή για τους αναλύτες του μείγματος II από 0.9997 έως 0.9999 (Πίνακας 10.4-10.6).

Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό των ανακτήσεων των ενώσεων σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (LOQ, 10 LOQ και 100 LOQ) και κυμάνθηκαν μεταξύ 69 % και 111 % για όλους τους αναλύτες των δύο μειγμάτων στο ποτάμιο και στο θαλασσινό νερό (Πίνακας 10.4-10.6).

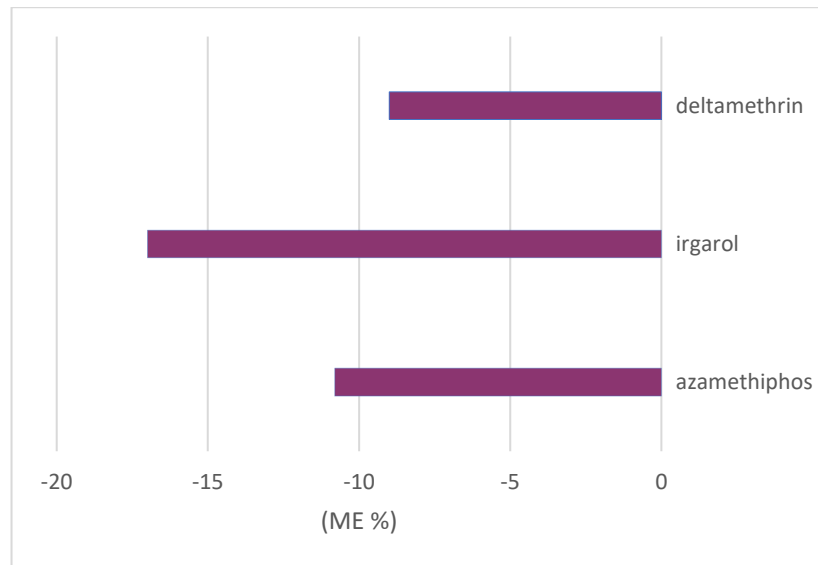
Η χρήση καμπυλών βαθμονόμησης με προσομοίωση υποστρώματος συνέβαλλε σημαντικά στην ελαχιστοποίηση σφαλμάτων, κυρίως κατά τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό μιας και η πηγή ESI θεωρείται ιδιαίτερα επιρρεπής στο να ιονίζει παρεμποδίζουσες και συνεκχυλιζόμενες ενώσεις.

Η επίδραση υποστρώματος μελετήθηκε σε θαλασσινό νερό καθώς θεωρείται πιο επιβαρυνμένο υπόστρωμα λόγω του υψηλότερου ποσοστού αλατότητας που περιέχει (Σχήμα 10.4).

Ως γνωστόν, για τιμές μικρότερες του 0 % η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ για μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ME μεταξύ –20 % και 20 % θεωρείται ότι το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος. Οι τιμές

της (%) επίδρασης του υποστρώματος υποδηλώνουν ελαφριά μείωση του αναλυτικού σήματος και για τις τρεις μελετώμενες ενώσεις (<20 %).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη του υποστρώματος τονίζουν τη σημασία της χρήσης καμπυλών προσομοιωμένες στο υπόστρωμα καθώς επίσης και την χρήση εσωτερικών προτύπων, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση συγκέντρωσης αναλυτών κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.



**Σχήμα 10.4:** Επίδραση υποστρώματος φυτοπροστατευτικών ενώσεων

**Πίνακας 10.4:** Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για το θαλασσινό νερό (μείγμα Ι)

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng L <sup>-1</sup> )	LOD (ng L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		
						LOQ	RSD%-Intra <sup>d</sup>	R %	RSD%-Intra	R %	RSD%-Intra	R %
ethoxyquine	0,9992	16-500	5,0	16	9,1	8,2	86,0	8,2	89,0	8,2	84,0	6,1
atrazine	0,9980	3,3-500	1,0	3,3	7,7	6,5	83,0	6,5	100,3	5,3	86,0	6,9
chlorothalonil	0,9981	3,3-500	1,0	3,3	9,1	7,5	72,0	7,5	85,3	7,3	84,3	9,3
chlorpyrifos-Methyl	0,9997	3,3-500	1,0	3,3	9,5	8,3	92,9	8,3	92,3	6,4	90,6	5,7
parathion-Methyl	0,9931	33-750	10	33	9,5	8,1	70,0	8,1	73,2	6,4	89,0	8,0
chlorpyrifos	0,9973	18-500	5,5	18	5,0	10	83,3	10	84,6	6,6	80,6	43
irgarol	0,9992	3,3-500	1,0	3,3	6,5	7,1	94,3	7,1	94,9	5,9	96,9	5,4
resmethrin	0,9966	7,9-500	2,4	7,9	13	12	91,3	12	95,1	8,9	111	7,9
lamda-cyhalothrin	0,9969	23-750	7,0	23	10	11	69,0	11	76,9	10	87,3	9,1
permethrin	0,9989	23-750	7,0	23	9,3	8,6	83,5	8,6	76,1	8,1	101	2,5

(a) LOD: Όριο ανίχνευσης

(b) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(c) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(d) RSD%-Intra: Επαναληψιμότητα

**Πίνακας 10.5:** Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για το ποτάμιο νερό (μείγμα I)

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng L <sup>-1</sup> )	LOD (ng L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης	
						LOQ	RSD <sub>R</sub> %-Intra <sup>d</sup>	R %	10 LOQ	RSD <sub>R</sub> %-Intra	R %
ethoxyquine	0,9982	16-500	5,0	16	12,3	81,0	10	88,0	9,2	84,0	7,1
atrazine	0,9980	3,3-500	1,0	3,3	8,10	79,0	9,4	99,1	7,3	85,0	6,9
chlorothalonil	0,9971	3,3-500	1,0	3,3	10,0	73,1	9,0	85,3	7,5	81,2	9,3
chlorpyrifos-Methyl	0,9992	3,3-500	1,0	3,3	10,3	92,6	8,5	90,1	6,4	89,5	4,8
parathion-Methyl	0,9991	40-750	12	40	11,7	69,3	7,1	72,2	6,9	83,0	8,0
chlorpyrifos	0,9943	23-750	7,0	23	5,15	80,3	9,3	82,6	7,3	81,6	6,7
irgarol	0,9982	3,3-500	1	3,3	6,80	92,3	8,1	93,2	6,9	97,2	4,4
resmethrin	0,9971	8,2-500	2,5	8,2	12,7	86,2	10,3	90,1	9,0	99,1	6,9
lamda-cyhalothrin	0,9963	26-750	8,0	26	14,3	69,0	12,9	75,4	11	84,3	9,1
permethrin	0,9911	23-750	7,0	23	10,2	80,5	9,6	71,3	7,9	103	4,6

- (a) LOD: Όριο ανίχνευσης  
 (b) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης  
 (c) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα  
 (d) RSD<sub>R</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα

**Πίνακας 10.6:** Αποτελέσματα επικύρωσης της μεθόδου για το θαλασσινό νερό (μείγμα II)

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng L <sup>-1</sup> )	LOD (ng L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %- Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης LOQ (ng L <sup>-1</sup> )		Επίπεδο Συγκέντρωσης 10 LOQ (ng L <sup>-1</sup> )		Επίπεδο Συγκέντρωσης 100 LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	
						R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra <sup>d</sup>	R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra	R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra
Irgarol	0,9998	0,3-500	0,1	0,30	9,10	93,1	8,1	97,5	7,8	97,4	6,6
azamethiphos	0,9999	3,9-500	1,2	3,90	8,70	88,0	8,9	92,2	8,6	93,9	8,9
deltamethrin	0,9997	12,5-500	3,8	12,5	11,2	83,2	8,3	90,1	7,0	92,6	5,6

(a) LOD: Όριο ανίχνευσης

(b) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(c) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(d) RSD<sub>R</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα

# ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ QuEChERS ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟ ΣΤΕΡΕΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

## A. Βελτιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοφάρμακων στα ιζήματα

### 11.1 Εισαγωγή

Προκειμένου να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με την ποιότητα ενός υδάτινου οικοσυστήματος, εκτός από την ανάλυση υδάτων, είναι αναγκαία η μελέτη τόσο δειγμάτων ιζήματος όσο και των θαλάσσιων και φυτικών οργανισμών όπου αυτοί είναι διαθέσιμοι.

Στην παρούσα Διατριβή, η εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα στερεά υποστρώματα όπως αχινοί (*Paracentrotus lividus*), μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια-γοβιοί (*Gobio-gobio*) καθώς και από το υδρόβιο μακρόφυτο (*Lemna Minor*) πραγματοποιήθηκε με την εύχρηστη, απλή και σύγχρονη μέθοδο QuEChERS. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από δύο στάδια: (α) αυτό της εκχύλισης-κατανομής των ενώσεων (extraction-partitioning) σε έναν οργανικό διαλύτη και (β) από το στάδιο καθαρισμού της εκχύλισης στερεής φάσης με διασπορά (dispersive SPE, d-SPE) (Perestrelo et al., 2019).

Η επιλογή του βέλτιστου πρωτοκόλλου, πραγματοποιήθηκε βάσει των ιδιοτήτων των ενώσεων που περιλαμβάνονται σε κάθε ένα από τα δύο μείγματα και της ενόργανης διάταξης GC-MS ή LC-LTQ/Orbitrap-MS στην οποία πραγματοποιήθηκε η έγχυση.

Κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης QuEChERS αποτέλεσε η απόδοση της εκχύλισης εκφραζόμενη ως εκατοστιαία ανάκτηση (Recovery, R %) των ενώσεων, μετά από εμβολιασμό δείγματος σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (LOQ, 10 LOQ και 100 LOQ) για κάθε αναλύτη.

### 11.2 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης για τα ιζήματα (Μείγμα I & II)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μέθοδος QuEChERS, παρέχει τη δυνατότητα προσαρμογής στις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος. Έτσι, όσον αφορά τα ιζήματα και για

τα δύο μείγματα αναλυτών (μείγμα I & II) ως πρώτο βήμα για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, εξετάστηκαν δύο προτεινόμενα διεθνή πρότυπα. Το πρώτο αφορά την κλασική QuEChERS (original) και το δεύτερο ένα τροποποιημένο με υψηλότερο pH βασισμένο στο πρότυπο European Standard (EN 15662) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Τυποποίησης Comité Européen de Normalisation (Masiá et al., 2015a).

Για τη βελτιστοποίηση και επικύρωση των πρωτοκόλλων χρησιμοποιήθηκαν τυφλά, λυοφιλιωμένα δείγματα ιζήματος με διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Τα ποτάμια ιζήματα συλλέχθηκαν από την περιοχή του ποταμού Βενέτικου, Γέφυρα Κηπουρείου (pH 8, οργανική ουσία 2,1 %). Τα θαλάσσια ιζήματα συλλέχθηκαν από την περιοχή της Ηγουμενίτσας, Ιόνιο Πέλαγος (pH 8,3, οργανική ουσία 1,6%).

Ποσότητα των δειγμάτων μεταφέρθηκε σε falcon, αφού πρώτα απομακρύνθηκαν οι μη προσδιοριζόμενες ουσίες (πέτρες, κοχύλια, φύκια, κλαδιά). Οι σωλήνες καταψύχθηκαν στους -20 °C με σκοπό να πραγματοποιηθεί η λυοφιλίωσή τους σε θερμοκρασία -40 °C, υπό κενό ( $10^{-2}$  bar) για 48 ώρες. Τα δείγματα αναμείχθηκαν για την εξασφάλιση της ομοιογένειας και της αντιπροσωπευτικότητας και κοσκινίστηκαν (διάμετρος πόρων κόσκινου 2 mm). Τέλος εμβολιάστηκαν, αφού πρώτα αναλύθηκαν για να διασφαλιστεί ότι δεν περιέχουν ίχνη των υπό μελέτη φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Κριτήριο επιλογής του βέλτιστου πρωτοκόλλου αποτέλεσε η απόδοση της εκχύλισης (εκφραζόμενη ως εκατοστιαία ανάκτηση %), μετά από εμβολιασμό δείγματος με συγκέντρωση 30 ng/g. Για κάθε ένα πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις (n=3). Οι συνθήκες καθώς επίσης και οι ποσότητες των προσροφητικών που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.1.



**Πίνακας 11.1:** Εξεταζόμενες πειραματικές πορείες εκχύλισης ιζημάτων

	<b>Original</b>	<b>EN 15662</b>
Ποσότητα δείγματος	5 g	5 g
Εξασφάλιση ενυδάτωσης	10 mL H <sub>2</sub> O	10 mL H <sub>2</sub> O
Διαλύτης εκχύλισης	10 mL ACN	10 mL ACN
Ανακίνηση	1 min	1 min
Προσροφητικά εκχύλισης	MgSO <sub>4</sub> 6 g NaCl 1,5g	MgSO <sub>4</sub> 6 g
		NaCl 1,5g
		Trisodium citrate dihydrate 1,5 g Disodium Hydrogen citrate sesquihydrate 0,75 g
Χειροκίνητη ανακίνηση	1 min	1 min
Περιδίνηση	1 min	1 min
Φυγοκέντρηση	5 min (4000 rpm)	5 min (4000 rpm)
Καθαρισμός (Clean-up)	1 mL	1 mL
Προσροφητικά καθαρισμού	PSA 50 mg	PSA 50 mg
	MgSO <sub>4</sub> 150 mg	MgSO <sub>4</sub> 150 mg
	C18 50 mg	C18 50 mg
Χειροκίνητη ανακίνηση	1 min	1 min
Περιδίνηση	2 min	2 min
Φυγοκέντρηση	5 min (4000 rpm)	5 min (4000 rpm)
Διαλύτης επαναδιάλυσης	Εξάνιο	Εξάνιο

Πιο αναλυτικά, 5 g λυοφιλιωμένου, κοσκινισμένου και ομογενοποιημένου ιζήματος ζυγίζονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL και προστίθενται 10 mL κρύου απεσταγμένου νερού για την εξασφάλιση της επιθυμητής υγρασίας. Μετά την παραμονή του δείγματος σε κατάσταση ηρεμίας για 10 λεπτά, έτσι ώστε να ενυδατωθεί επαρκώς, οι φυγοκεντρικοί σωλήνες ανακινούνται έντονα χειροκίνητα και στη συνέχεια σε συσκευή περιδίνησης (vortex) για 1 min και προστίθενται 10 mL ACN. Ακολούθως, για το πρωτόκολλο original ζυγίζονται 6 g άνυδρου MgSO<sub>4</sub> και 1,5 g NaCl ενώ για το EN 15662 6 g MgSO<sub>4</sub>, 1,5 g NaCl, 1,5 g Trisodium citrate dihydrate και 0,75 g Disodium Hydrogen citrate sesquihydrate.

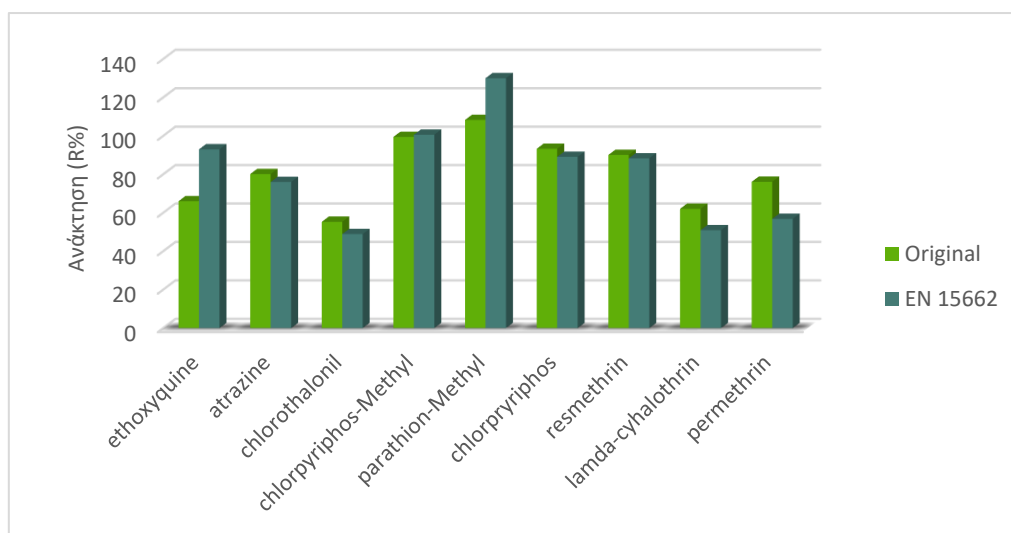
Αμέσως μετά την προσθήκη των προσροφητικών ακολουθεί ανακίνηση για 1 min χειροκίνητα και 1 min σε συσκευή περιδίνησης έτσι ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής αλληλεπίδραση του ακετονιτριλίου με όλο το δείγμα και αποφυγή του σχηματισμού

κρυσταλλικών συσσωματωμάτων. Οι σωλήνες φυγοκεντρώνται για 5 min στις 4000 rpm και ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού (clean-up). Σύμφωνα με αυτό, κλάσμα όγκου ενός mL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης των 15 mL ο οποίος περιέχει τα προζυγισμένα προσροφητικά 150 mg άνυδρου  $MgSO_4$ , 50 mg PSA, 50 mg C18. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με συσκευή vortex για 1 min και φυγοκέντρωση για 5 min στις 4000 rpm. Ο οργανικός διαλύτης, συλλέγεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου, επαναδιαλύεται σε 100  $\mu$ L εξανίου και διηθείται μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,22  $\mu$ m.

### 11.3 Επιλογή προσροφητικών εκχύλισης

Η Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων για τα δύο μείγματα (μείγμα I & II) παρουσιάζονται στα Σχήματα 11.1- 11.2. Για το μείγμα I, οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές και συγκρίσιμες για όλες σχεδόν τις ενώσεις και με τα δύο πρωτόκολλα.

Πιο αναλυτικά, η χρήση της πρωτότυπης μεθόδου παρουσίασε ελαφρώς υψηλότερες ανακτήσεις για όλες τις ενώσεις με εξαίρεση το parathion-methyl, που παρουσίασε υψηλότερη ανάκτηση για το πρωτόκολλο EN 15662.



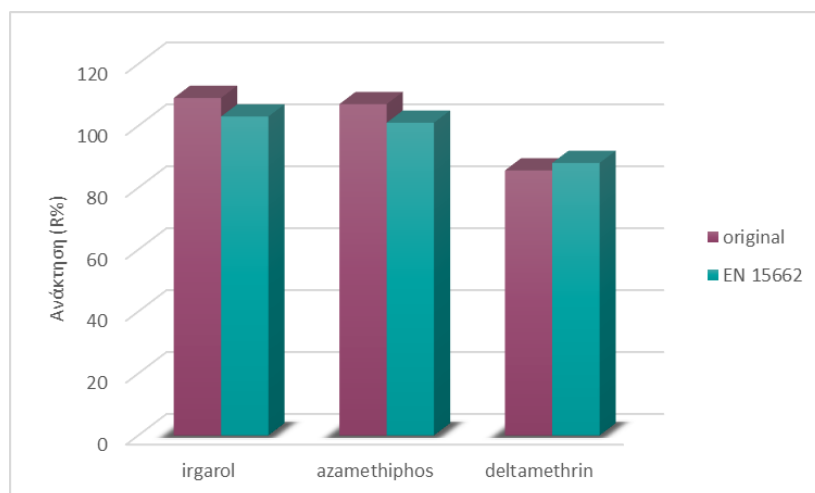
**Σχήμα 11.1:** Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I)

Το ευρέως χρησιμοποιούμενο μυκητοκτόνο chlorothalonil, ήταν η μόνη ένωση που παρουσίασε τιμές ανακτήσεων εκτός αποδεκτών ορίων της τάξης του 49 %. Η δυσκολία απομόνωσής του, εξαρτάται από την τιμή του pH καθώς επίσης και από το υπόστρωμα. Μετά

τον καθαρισμό (clean up), το pH του τελικού εκχυλίσματος κυμαίνεται μεταξύ 8 με 9, τιμή που είναι αποτρεπτική για την σταθερότητα ενώσεων όπως το chlorothalonil (Rejczak and Tuzimski, 2015). Μία άλλη εξήγηση στην απώλεια του μπορεί να θεωρηθεί η αλληλεπίδρασή του με το PSA. Είναι προτιμότερο, να πραγματοποιείται ανάλυση της ένωσης chlorothalonil απευθείας στο εκχύλισμα παραλείποντας το στάδιο του clean up.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, προκειμένου να βελτιωθούν οι ανακτήσεις του συγκεκριμένου μυκητοκτόνου με την μέθοδο EN 15662 προτείνεται η αντικατάσταση των προσροφητικών 1,5 g Trisodium citrate dihydrate και 0,75 g Disodium Hydrogen citrate sesquihydrate με 1,5 g Trisodium citrate. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί φορμικό οξύ 5% στο ακετονιτρίλιο, έτσι ώστε το pH να έχει τιμή 5,5, τιμή όμως που είναι απαγορευτική για την ανάλυση του ethoxyguanine καθώς διασπάται (Rejczak and Tuzimski, 2015).

Αντίθετα με το μείγμα I, όσον αφορά το μείγμα II και τα δύο πρωτόκολλα παρουσίασαν υψηλές ανακτήσεις εντός αποδεκτών ορίων για όλους τους αναλύτες (Σχήμα 11.2).



**Σχήμα 11.2:** Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα II)

Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι ο στόχος της παρούσας Διατριβής είναι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες, με ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες, στον μικρότερο δυνατό χρόνο με το μικρότερο κόστος επιλέχθηκε το κλασικό πρωτόκολλο που παρουσίασε υψηλότερες ανακτήσεις για τους περισσότερους αναλύτες του μείγματος I και για όλους τους αναλύτες του μείγματος II.

Τέλος, όσον αφορά τον χρωματογραφικό προσδιορισμό, παρατηρήθηκε ότι η χρήση του πρωτότυπου πρωτοκόλλου συγκριτικά με τη μέθοδο EN 15662, είχε σαν αποτέλεσμα

αφενός λιγότερα σφάλματα και αφετέρου καθαρότερα εκχυλίσματα καθώς συν-εκχυλίζονται λιγότερες ενώσεις.

#### 11.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS

Κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου, μελετήθηκαν οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης όπως η αναλογία δείγματος/διαλύτη, η ποσότητα δείγματος, η επίδραση του pH και τέλος η ποσότητα και η φύση των προσροφητικών για τον διαχωρισμό των φάσεων.

##### 11.4.1 Επίδραση προσροφητικών εκχύλισης

Ως γνωστόν η συγκέντρωση των προσροφητικών, μπορεί να επηρεάσει το ποσοστό του νερού στην οργανική στοιβάδα, ρυθμίζοντας έτσι την πολικότητά του (Rejczak and Tuzimski, 2015). Η προσθήκη του άνυδρου  $MgSO_4$  αποσκοπεί στην απομάκρυνση του νερού και την αύξηση της ιοντικής ισχύς του υδατικού μείγματος που προκύπτει, επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων (Rizzetti et al., 2016 και González-Curbelo et al., 2015).

Ο συνδυασμός του  $MgSO_4$  με το ακετονιτρίλιο επιτρέπει υψηλότερες ανακτήσεις για τις πολικές ενώσεις λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης (salting out). Η ποσότητά του, πρέπει να υπερβαίνει τον κορεσμό, έτσι ώστε να δεσμευτεί το περιεχόμενο νερό. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά την εξώθερμη αντίδραση που λαμβάνει χώρα με την προσθήκη του άνυδρου  $MgSO_4$ , απαιτείται έντονη χειροκίνητη ανάδευση για την αποφυγή σχηματισμού κρυσταλλικών συσσωματωμάτων. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται καλύτερη επιφάνεια επαφής ανάμεσα στο δείγμα και στον διαλύτη εκχύλισης (González-Curbelo et al., 2015 και Rejczak and Tuzimski, 2015a).

Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου  $NaCl$  αποτρέπει τον σχηματισμό γαλακτωμάτων και βοηθά στην άρση των πολικών παρεμποδίσεων, αυξάνοντας την εκλεκτικότητα της εκχύλισης (González-Curbelo et al., 2015 και Rejczak and Tuzimski, 2015). Όμως μία μεγάλη ποσότητα  $NaCl$ , θα έχει σαν αποτέλεσμα την μικρότερη εκχύλιση πολικών ενώσεων στο ακετονιτρίλιο (Rejczak and Tuzimski, 2015). Επομένως η βέλτιστη αναλογία αυτών των προσροφητικών στη μέθοδο QuEChERS είναι 4:1.

Η προσθήκη τροποποιητών (buffers) όπως των κιτρικών αλάτων (Trisodium citrate dihydrate και Disodium Hydrogen citrate sesquihydrate) που χρησιμοποιούνται στο στάδιο της εκχύλισης, αποσκοπεί τη ρύθμιση και διατήρηση του  $pH=5$ , προστατεύοντας έτσι τις ενώσεις που είναι ευαίσθητες σε μεταβολές του pH (González-Curbelo et al., 2015 και Santana-Mayor et al., 2019).

#### 11.4.2 Ποσότητα δείγματος

Προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τη διερεύνηση της βέλτιστης ποσότητας δείγματος για την αύξηση του παράγοντα προσυγκέντρωσης (Preconcentration Factor, PF). Μελετήθηκαν ποσότητες ιζήματος 2 g, 5 g και 10 g και με γνώμονα την ανάκτηση, την εκλεκτικότητα, την ευκολία και την ταχύτητα της μεθόδου, ως βέλτιστη ποσότητα επιλέχθηκαν τα 5 g.

Από τον χρωματογραφικό προσδιορισμό των εμβολιασμένων δειγμάτων, παρατηρήθηκαν αυξημένα όρια θορύβου συνεκχυλιζόμενων ενώσεων και διευρυμένες κορυφές για τις ποσότητες δείγματος 10 g. Η αύξηση της ποσότητας του δείγματος, εκτός από το προφανές αυξημένο κόστος λόγω κατανάλωσης μεγαλύτερων ποσοτήτων προσροφητικών, παρουσίασε δυσκολία στον χειρισμό των δειγμάτων κατά τον εμβολιασμό και κατά την ομογενοποίηση μέσα στον φυγοκεντρικό σωλήνα μετά την προσθήκη των προσροφητικών εκχύλισης.

#### 11.4.3 Διαλύτης εκχύλισης

Διαλύτες συμβατοί με την εκχύλιση QuEChERS, είναι η ακετόνη, οξικός αιθυλεστέρας, η μεθανόλη, η αιθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Λόγω εκλεκτικής και ποσοτικής εκχύλισης αναλυτών, μικρής συν-εκχύλιση ανεπιθύμητων ενώσεων από το υπόστρωμα και μεγάλου εύρους αναλυτών επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο (Kim et al., 2019).

Για όλα τα παραπάνω, ο διαλύτης εκχύλισης δεν αποτέλεσε παράγοντα περαιτέρω διερεύνησης και χρησιμοποιήθηκε η αναλογία οργανικού διαλύτη δείγματος ως 1:2 (w/vol), καθώς επιτρέπει ικανοποιητικές ανακτήσεις των μελετώμενων ενώσεων (Bruzzoniti et al., 2014 και Rejczak and Tuzimski, 2015).

#### 11.4.4 Ενυδάτωση ιζήματος

Η επαρκής υγρασία πριν την προσθήκη του οργανικού διαλύτη στο δείγμα επιτρέπει την καλύτερη κατανομή των αναλυτών μεταξύ νερού και ακετονιτριλίου (Łozowicka et al., 2017). Μη επαρκής ενυδάτωση του δείγματος, μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλές ανακτήσεις για τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα του μείγματος I (parathion-methyl, chlorpyrifos και chlorpyrifos-methyl) (Bruzzoniti et al., 2014).

Για δείγματα χωρίς υγρασία ή δείγματα που έχουν υποστεί λυοφιλίωση, η αναλογία νερού προς τον οργανικό διαλύτη συνήθως ορίζεται ως 1:1. Όπως περιγράφεται στις επόμενες παραγράφους της παρούσας Διατριβής, σε δείγματα με υψηλότερα ποσοστά

υγρασίας, ο όγκος νερού που προστίθεται πριν την εκχύλιση στο δείγμα, είναι αρκετά μικρότερος έως και μηδενικός.

Παρόλα αυτά, για την αξιολόγηση της σημασίας της παραμέτρου αυτής, εξετάστηκαν αναλογίες οργανικού διαλύτη προς νερό 1:1, 1:1,5 και 1:2. Συγκριτικά οι αναλογίες 1:1 (10 mL ACN και 10 mL νερού) και 1:1.5 (10 mL ACN και 15 mL νερού) αντίστοιχα, δεν παρουσίασαν ιδιαίτερες διαφορές στις ανακτήσεις. Μεγαλύτεροι όγκοι νερού, απορρίφθηκαν λόγω δυσκολίας χειρισμού στον φυγοκεντρικό σωλήνα, ιδιαίτερα κατά το στάδιο της περιδίνησης μετά και την προσθήκη των προσροφητικών εκχύλισης.

#### 11.4.5 Προσροφητικά καθαρισμού (clean-up)

Λόγω της πολυπλοκότητας και της επιβαρυνμένης φύσης του ιζήματος, είναι επιτακτική ανάγκη η χρήση προσροφητικών με σκοπό την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ενώσεων του υποστρώματος. Πάνω από 50 προσροφητικά έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό να εξεταστεί η εκλεκτικότητά τους, στην απομόνωση ανεπιθύμητων ενώσεων στην μέθοδο QuEChERS (Łozowicka et al., 2017).

Το άνυδρο  $MgSO_4$ , προστίθεται για να μειώσει την ανεπιθύμητη υγρασία στον τελικό έκλουσμα ενώ το PSA (Primary and secondary amine) είναι ασθενής ανιονανταλλάκτης και απομακρύνει οργανικά οξέα, λιπίδια, σάκχαρα, χρωστικές, ανθοκυανίνες κατά την ανάλυση κυρίως φρούτων και λαχανικών (Rizzetti et al., 2016 και Barbieri et al., 2019).

Το υδρόφοβο, ανάστροφης φάσης προσροφητικό C18, απομακρύνει τις λιπαρές ενώσεις καθώς επίσης και μη πολικές προσμίξεις (Barbieri et al., 2019). Ο συνδυασμός του C18 με PSA, απομακρύνει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, οργανικά οξέα, στερόλες, και μη πολικές ενώσεις (Rizzetti et al., 2016; Bruzzoniti et al., 2014 και Miossec et al., 2018).

Προκειμένου να αξιολογηθεί το στάδιο του καθαρισμού, διερευνήθηκαν τόσο οι διάφοροι συνδυασμοί προσροφητικών όσο και η αποδοτικότητα της μεθόδου παραλείποντας το στάδιο του καθαρισμού.

Η ανάλυση εμβολιασμών δειγμάτων, απευθείας μετά το στάδιο της εκχύλισης χωρίς clean up, είχε ως αποτέλεσμα τις χαμηλότερες ανακτήσεις για τις 7 από τις 9 μελετώμενες στο μείγμα I ενώσεις, με εξαίρεση το ethoxyquinone και το chlorothalonil, τονίζοντας την σπουδαιότητα της χρήσης των προσροφητικών καθαρισμού. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στο μείγμα II αφού οι ανακτήσεις μειώθηκαν και για τους τρεις αναλύτες.

Η ανάκτηση των ενώσεων ethoxyquinone και chlorothalonil μειώθηκε με την χρήση PSA/ $MgSO_4$ , καθώς αλληλεπιδρούν με το PSA όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 11.4.1, όμως αυξήθηκε ελαφρώς γενικά για το σύνολο των ενώσεων. Λόγω της μικρής μόνο αύξησης,

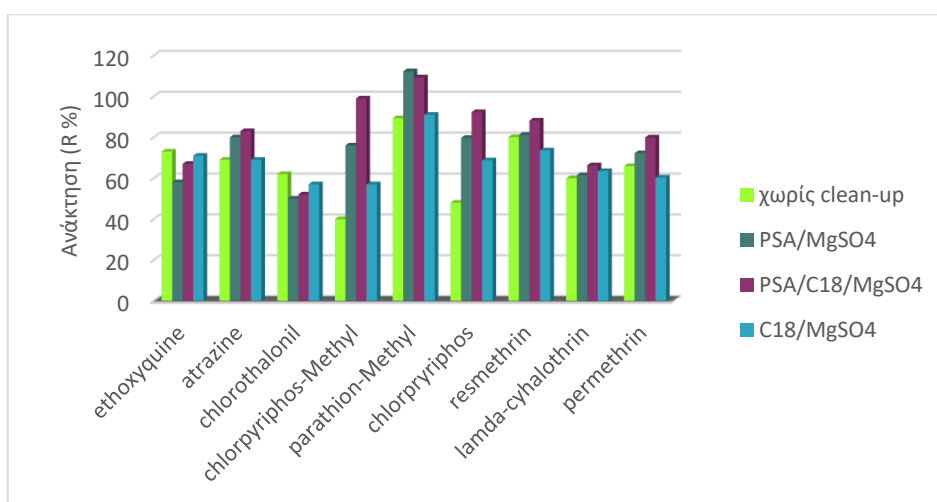
κρίθηκε αναγκαίος ο συνδυασμός του PSA με άλλα προσροφητικά όπως το C18. Κατά την χρήση των προσροφητικών PSA/C18/MgSO<sub>4</sub>, τα τελικά εκλούσματα ήταν καθαρότερα από τα δύο προηγούμενα, οδηγώντας σε καθαρότερα χρωματογραφήματα με χαμηλότερα όρια ανίχνευσης.

Υψηλές ανακτήσεις παρουσιάζονται όταν η χηλική δράση του PSA που κατακρατά πολικές ενώσεις συνδυάζεται με το προσροφητικό C18 που συγκρατεί μη πολικές ενώσεις (Rizzetti et al., 2016). Για τις βάσεις parathion-methyl, λ-cyhalothrin, irgarol, deltamethrin, azamethiphos και atrazine συγκρίνοντας τον συνδυασμό προσροφητικών PSA/C18/MgSO<sub>4</sub> και C18/MgSO<sub>4</sub>, αποδεικνύεται ότι το PSA δεν έχει επίδραση στην εκχύλισή τους. Επίσης, το προσροφητικό ανάστροφης φάσης C18, παρόλο που παρουσίασε ικανοποιητικές ανακτήσεις εντός αποδεκτών ορίων, δεν είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα απουσία PSA.

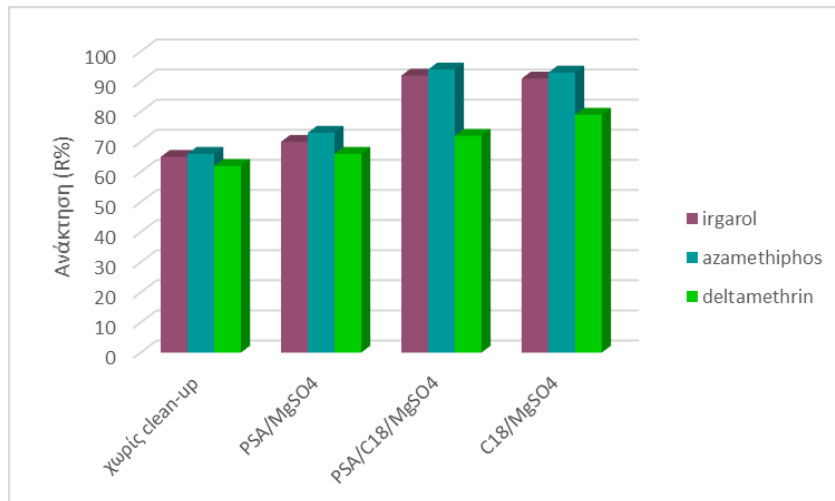
Για το ethoxyquaine, ο συνδυασμός C18/MgSO<sub>4</sub> είχε σαν αποτέλεσμα υψηλότερες ανακτήσεις σε σχέση με το PSA, πιθανότατα λόγω της ιδιότητάς του να αλληλεπιδρά μέρος των ενώσεων που δρουν ως οξέα.

Όσον αφορά τις ουδέτερες ενώσεις, η χρήση PSA και C18 στο clean up, δεν βελτίωσε τις ανακτήσεις. Επομένως, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, το στάδιο μπορεί να παραληφθεί και είναι προτιμότερο να αναλύεται απευθείας ο διαλύτης μετά την εκχύλιση για αυτού του τύπου ενώσεις (Łozowicka et al., 2017).

Η χρήση του άνυδρου MgSO<sub>4</sub>, για την απομάκρυνση υγρασίας, κρίθηκε απαραίτητη και δεν αποτέλεσε παράγοντας περαιτέρω βελτιστοποίησης. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των παραπάνω, παρουσιάζονται στο Σχήμα 11.3 και 11.4.



**Σχήμα 11.3:** Επίδραση προσροφητικών καθαρισμού στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I)



**Σχήμα 11.4:** Επίδραση προσροφητικών καθαρισμού στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα II)



## B. Επικύρωση

### 11.5 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης μεθόδου (μείγμα I & II)

Η αξιολόγηση της αναλυτικής επίδοσης της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την Οδηγία 2002/657/ΕΚ. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμάνθηκαν 1 έως 9 ng/g για τις ενώσεις στο μείγμα I και από 0,1 έως 8,9 ng/g για τις ενώσεις του μείγματος II. Τα χαμηλά όρια της μεθόδου, αποδεικνύουν ότι ο παράγοντας προσυγκέντρωσης (Preconcentration Factor, PF) είναι ικανοποιητικός για την ποσοτικοποίηση προσδιοριζόμενων ενώσεων ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

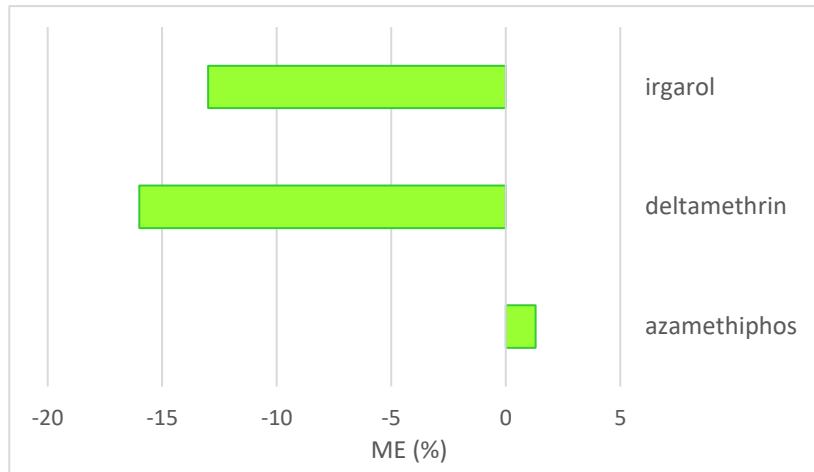
Η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας για το υψηλό επίπεδο εμβολιασμού κυμάνθηκε μεταξύ 3,2 και 8,5% (μείγμα I) και 4,9 και 7,7 % (μείγμα II). Καμία φυτοπροστατευτική ένωση δεν υπερέβη το ανώτατο αποδεκτό όριο της αναπαραγωγιμότητας (20%).

Για να διερευνηθεί η γραμμικότητα της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα εμβολιασμένων δειγμάτων σε εννιά επίπεδα συγκεντρώσεων και για εύρος συγκεντρώσεων από το LOQ έως 1000 ng/g. Κάθε μια από τις εκχυλίσματα εγχύθηκε εις τριπλούν στην ενόργανη διάταξη. Οι γραμμικότητα ήταν μεγαλύτερη από 0,9819 (μείγμα I) και 0,9987 (μείγμα II) για όλες τις ενώσεις ενώ η γραμμική περιοχή για κάθε ένωση παρουσιάζεται στους Πίνακες 11.2 και 11.3.

Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό των ανακτήσεων σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (LOQ, 10 LOQ και 100 LOQ) για κάθε ένωση, και για το υψηλό κυμάνθηκαν από 69,5 έως 94,9 % για το μείγμα I και από 98,9 έως 101 % για το μείγμα II.

Το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος και οι πιθανοί παράγοντες στους οποίους οφείλεται έχουν ήδη περιγραφεί στο θεωρητικό μέρος. Η χρήση καμπυλών βαθμονόμησης με προσομοίωση υποστρώματος συνέβαλλε σημαντικά στην ελαχιστοποίηση σφαλμάτων, κυρίως κατά τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό καθώς η πηγή ESI θεωρείται ιδιαίτερα επιρρεπής στο να ιονίζει παρεμποδίζουσες και συν-εκχυλιζόμενες ενώσεις. Οι τιμές της (%) επίδρασης του υποστρώματος υποδηλώνουν ελαφριά μείωση του αναλυτικού σήματος για τις ενώσεις irgarol και deltamethrin (<20 %, αμελητέα) και ελαφριά ενίσχυση (1,3 %) για την ένωση azamethiphos.

Τα αποτελέσματα τονίζουν τη σημασία της χρήσης καμπυλών προσομοιωμένες στο υπόστρωμα καθώς επίσης και την χρήση εσωτερικών προτύπων, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση συγκέντρωσης αναλυτών κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.



**Σχήμα 11.5:** Επίδραση υποστρώματος για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

**Πίνακας 11.2:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QMERS για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων (Μείγμα I) σε ζήματα

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng g <sup>-1</sup> )	LOD (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης			Επίπεδο Συγκέντρωσης					
						LOQ			10 LOQ			100 LOQ		
						R %	RSD <sub>R</sub> %-Intra <sup>d</sup>	R %	RSD <sub>R</sub> %-Intra	R %	RSD <sub>R</sub> %-Intra	R %	RSD <sub>R</sub> %-Intra	
ethoxyquine	0,9819	29-1000	9	29	14	96,9	11	92,0	9,1	91,0	8,5			
atrazine	0,9910	3,3-500	1	3,3	12	80,6	8,1	80,1	7,6	94,9	3,2			
chlorothalonil	0,9840	16-1000	5	16	16	51,2	14	57,4	9,1	69,5	4,6			
chlorpyrifos-methyl	0,9861	9,9-750	3	9,9	13	67,1	9,3	99,4	5,3	83,4	6,3			
parathion-methyl	0,9895	16-1000	5	16	8,7	86,5	7,8	118	5,2	80,9	4,6			
chlorpyrifos	0,9970	6,6-750	2	6,6	12	64,1	9,8	93,2	8,3	79,7	6,9			
irgarol	0,9989	3,3-500	1	3,3	11	89,9	9,5	95,6	8,1	93,5	5,5			
resmethrin	0,9906	6,6-750	2	6,6	11	85,1	7,0	90,1	6,1	91,2	4,2			
lambda-cyhalothrin	0,9865	6,6-750	2	6,6	13	56,9	13	62,0	10	87,3	8,2			
permethrin	0,9940	16-1000	5	16	11	73,5	9,5	76,1	8,8	92,7	4,6			

(α) LOD: Όριο ανίχνευσης

(β) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(γ) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(δ) RSD<sub>R</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα

**Πίνακας 11.3:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QMChERS για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων (μείγμα II) σε ζήματα

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng g <sup>-1</sup> )	LOD (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης	
						LOQ		10 LOQ		100 LOQ	
						R%	RSD%-Intra <sup>d</sup>	R%	RSD%-Intra	R%	RSD%-Intra
irgarol	0,9991	0,3-500	0,1	0,3	8,2	100	7,9	99,0	6,3	101	5,1
azamethiPphos	0,9994	8,9-500	2,7	8,9	8,9	97,8	7,7	106	5,9	99,4	4,9
deltamethrin	0,9987	29-500	8,9	29	10	84,3	8,0	91,2	8,1	98,9	7,7

(α) LOD: Όριο ανίχνευσης

(β) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(γ) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(δ) RSD<sub>R</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα

## Β. Βελτιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε δείγματα θαλάσσιων οργανισμών

### 11.6 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή του κεφαλαίου, η ευκολία προσαρμογής της μεθόδου QuEChERS στις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος, την καθιστά την πιο διαδεδομένη μέθοδο εκχύλισης στερεών υποστρωμάτων.

Προκειμένου να εκτιμηθεί η υπολειμματικότητα των φυτοφαρμάκων σε δείγματα θαλάσσιων οργανισμών ιχθυοκαλλιέργειας όπως αχινοί (*Paracentrotus lividus*), μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια-γοβιοί (*Gobio-gobio*) συγκρίθηκαν τρία πρωτόκολλα από διεθνή πρότυπα. Το πρώτο αφορά την κλασική QuEChERS (original), το δεύτερο το πρότυπο EN 15662 και τέλος το AOAC 2007.01 με την χρήση άνυδρου οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa), για την σταθεροποίηση ασταθών ενώσεων σε βασικό περιβάλλον (Kim et al., 2019 και Masiá et al., 2015).

Τα τυφλά δείγματα αχινών (*Paracentrotus lividus*) συλλέχθηκαν από την περιοχή της Θεσπρωτίας (Ιόνιο Πέλαγος) και μεταφέρθηκαν ζωντανοί εντός μερικών ωρών στο εργαστήριο. Καθαρίστηκαν εξωτερικά απομακρύνοντας από το πάνω μέρος των άκανθων φύκια και στερεά σώματα (πέτρες, κελύφη) που ήταν προσκολλημένα. Τα δείγματα νωπών αχινών ζυγίστηκαν απευθείας σε falcon και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20 °C μέχρι την ανάλυσή τους. Τα τυφλά δείγματα ψαριών (γοβιοί της οικογένειας *Gobiidae*), καθώς επίσης και τα μύδια (*Mytilus galloprovincialis* της οικογένειας *Mytiloidea*) προμηθεύτηκαν από ιχθυοπώλες στην περιοχή Χαλάστρα Θεσσαλονίκης αυθημερόν αλιευμένα από τις υδατοκαλλιέργειες που δραστηριοποιούνται στον Θερμαϊκό κόλπο. Τα δείγματα ψαριών φιλεταρίστηκαν, απομακρύνθηκε το κεφάλι και τα εντόσθια και απομονώθηκε ο καθαρός ιστός. Για τα δίθυρα, ο ιστός απομονώθηκε μετά από άνοιγμα του κελύφους. Το υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna minor* της οικογένειας *Lemnaceae*, συλλέχθηκε από την περιοχή Χαλάστρα κοντά στην επιφάνεια του ποταμού Αξιού.

Το κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης αποτέλεσε η απόδοση της εκχύλισης εκφραζόμενη ως εκατοστιαία ανάκτηση (% R) των ενώσεων, μετά από εμβολιασμό δείγματος με συγκέντρωση 30 ng/g. Αξίζει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, ότι σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε δείγματα με μεγάλο ποσοστό λίπους (μεγαλύτερο από 0,3 g λίπους ανά 10 mL ακετονιτριλίου), ο εμβολιασμός με εσωτερικό πρότυπο, είναι προτιμότερο να πραγματοποιηθεί στο τελικό στάδιο της διαδικασίας. Η περίσσεια λίπους, μπορεί να σχηματίσει μία επιπλέον στοιβάδα, στην οποία κατανέμονται οι αναλύτες με αποτέλεσμα την απώλειά τους (Rejczak and Tuzimski, 2015).

Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο. Για κάθε ένα πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις ( $n=3$ ) και ακολούθησε έγχυση σε GC-MS όσον αφορά το μείγμα I και σε LC-LTQ/Orbitrap-MS το μείγμα II.

### 11.7 Προκαταρκτικά πειράματα

Πριν την επιλογή του βέλτιστου πρωτοκόλλου εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα προκειμένου να αξιολογηθεί αν τα δείγματα ήταν προτιμότερο να αναλυθούν μαζί με την υπάρχουσα υγρασία ή μετά από λυοφιλίωση όπως και στην περίπτωση των ιζημάτων.

Ύστερα από τον τεμαχισμό και την ομογενοποίηση, ποσότητας 2 g δείγματος ψαριού, μυδιού και αχινού (λυοφιλιωμένου και μη), ζυγίστηκε και εμβολιάστηκε με κατάλληλη συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος. Για την εκτέλεση αυτών των προκαταρκτικών πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της κλασικής QuEChERS.

Όσον αφορά τον χρωματογραφικό προσδιορισμό στην περίπτωση των λυοφιλιωμένων δειγμάτων, παρατηρήθηκαν επιβαρυμένα χρωματογραφήματα με αυξημένα όρια θορύβου συνεχκυλιζόμενων ενώσεων και για τα τρία υποστρώματα. Επομένως τα δείγματα αναλύθηκαν νωπά παραλείποντας το στάδιο της λυοφιλίωσης, αποφεύγοντας έτσι την πολύωρη έκθεση των δειγμάτων στο φως, γεγονός που δύναται να επηρεάσει την ανίχνευση των φωτοευαίσθητων πυρεθροειδών (Barbieri et al., 2019; Rawn et al., 2010; Molina-Ruiz et al., 2015 και Masiá et al., 2013).

### 11.8 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης για το υπόστρωμα θαλάσσιων οργανισμών

Κατάλληλη ποσότητα νωπού, τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου δείγματος ζυγίζεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL και προστίθεται 5 mL κρύου δις απεσταγμένου νερού. Τα δείγματα παραμένουν σε κατάσταση ηρεμίας για 10 λεπτά προκειμένου να ενυδατωθεί επαρκώς το δείγμα. Στη συνέχεια οι φυγοκεντρικοί σωλήνες ανακινούνται έντονα χειροκίνητα και ακολούθως με συσκευή περιδίνησης (vortex) για 1 min. Προστίθεται κατάλληλος όγκος ακετονιτρίλιου (5 mL ή 10 mL) ανάλογα με το υπόστρωμα και τα αντιπροσωπευτικά προσροφητικά καθαρισμού για το κάθε πρωτόκολλο. Στην περίπτωση του AOAC 2007.01, το ακετονιτρίλιο περιέχει και 0,1 % οξικό οξύ. Για το πρωτόκολλο original, προστίθενται 6 g άνυδρου  $MgSO_4$  και 1,5 g NaCl, για το EN 15662 6 g  $MgSO_4$ , 1,5 g NaCl, 1 g Trisodium citrate dihydrate και 0,75 g Disodium Hydrogen citrate sesquihydrate, ενώ για το AOAC 2007.01 6 g  $MgSO_4$  και 1,5 g  $CH_3COONa$ .

Αμέσως μετά την προσθήκη των προσροφητικών, ακολουθεί έντονη ανακίνηση (1 min χειροκίνητα και 1 min στο vortex) και οι σωλήνες φυγοκεντρώνται για 5 min στις 4000 rpm. Σε αντίθεση με τα ιζήματα, για τα υποστρώματα των θαλάσσιων οργανισμών, πριν το (clean-up), πραγματοποιείται παραμονή των δειγμάτων στην κατάψυξη για 1 ώρα.

Κατά το στάδιο του καθαρισμού (clean-up), κλάσμα ενός mL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης των 15 mL ο οποίος περιέχει προζυγισμένο συνδυασμό προσροφητικών, ανάλογα με το υπόστρωμα. Ακολουθεί έντονη ανάδευση στο vortex για 1 min και φυγοκέντρωση για 5 min στις 4000 rpm. Ο οργανικός διαλύτης, συλλέγεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου, επαναδιαλύεται σε 100  $\mu$ L εξανίου (GC-MS) ή σε 200  $\mu$ L 90:10 H<sub>2</sub>O:MeOH (0,1 % μυρμηκικό οξύ v/v) (LC-LTQ/Orbitrap-MS) και διηθείται μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,22  $\mu$ m.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων αχινού τα πρωτόκολλα διαφοροποιήθηκαν καθώς ζυγίστηκαν 5 g τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου δείγματος, επομένως διπλάσιος όγκος ACN (10 mL). Όσον αφορά το στάδιο του καθαρισμού, ερευνήθηκε η επίδραση του προσροφητικού GCB, στις ανακτήσεις των υπό μελέτη ενώσεων. Τα πρωτόκολλα τα οποία ερευνήθηκαν και για τα 3 υποστρώματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.4.

**Πίνακας 11.4:** Εξεταζόμενες πειραματικές πορείες εκχύλισης θαλάσσιων οργανισμών (μείγμα I & II)

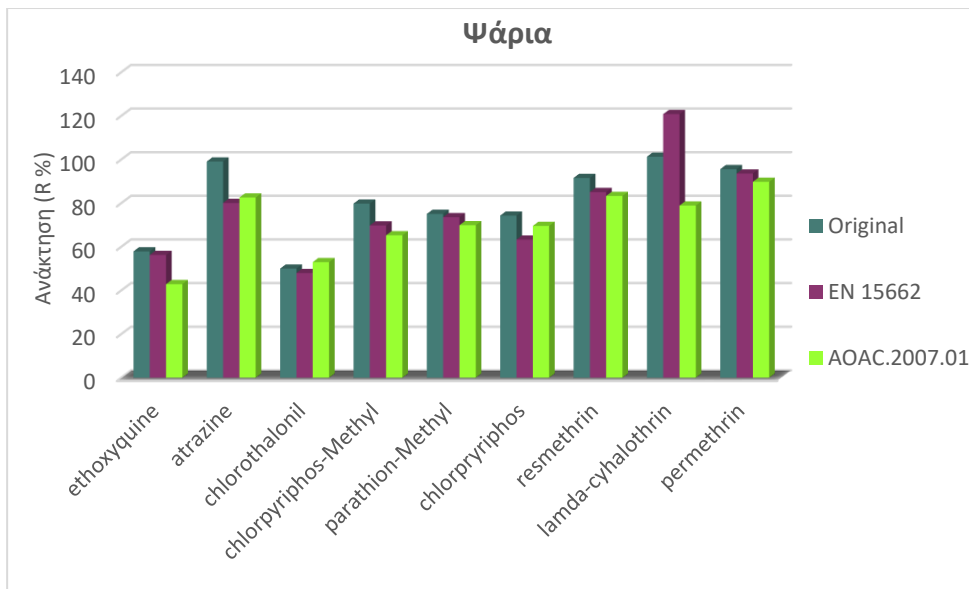
	Original	EN 15662	AOAC 2007.01
Ποσότητα δείγματος	2 g νωπού δ.τος (μύδια & ψάρια) *5 g νωπού δ.τος αχινού	2 g νωπού δ.τος (μύδια ψάρια) *5 g νωπού δ.τος αχινού	*5 g νωπού δ.τος αχινού
Εξασφάλιση ενυδάτωσης	5 mL H <sub>2</sub> O (μύδια & ψάρια) *5 mL H <sub>2</sub> O (δείγματα αχινού)	5 mL H <sub>2</sub> O (μύδια & ψάρια) *5 mL H <sub>2</sub> O (δείγματα αχινού)	*5 mL H <sub>2</sub> O (δείγματα αχινού)
Διαλύτης εκχύλισης	5 mL ACN (μύδια & ψάρια) *10 mL ACN (δείγματα αχινού)	5 mL ACN (μύδια & ψάρια) *10 mL ACN (δείγματα αχινού)	*10 mL ACN (+0.1% H.A) (δείγματα αχινού)
Χειροκίνητη ανακίνηση	1 min	1 min	1 min
Προσροφητικά εκχύλισης	MgSO <sub>4</sub> 6 g NaCl 1,5 g	MgSO <sub>4</sub> 6g NaCl 1,5g Trisodium citrate dihydrate 1,5g Disodium Hydrogen citrate sesquihydrate 0,75g	MgSO <sub>4</sub> 6 g CH <sub>3</sub> COONa 1,5 g
Χειροκίνητη ανακίνηση	1 min	1 min	1 min
Περιδίνηση	1 min	1 min	1 min
Φυγοκέντρηση	5 min (4000 rpm)	5 min (4000 rpm)	5 min (4000 rpm)
Καθαρισμός (Clean-up)	1 mL	1 mL	1 mL
Παραμονή στην κατάψυξη	1 ώρα	1 ώρα	1 ώρα
Προσροφητικά καθαρισμού	PSA 50 mg MgSO <sub>4</sub> 150 mg C18 50 mg *GCB 50 mg (αχινοί) * PSA 100 mg (αχινοί)	PSA 50 mg MgSO <sub>4</sub> 150 mg C18 50 mg *GCB 50 mg(αχινοί) * PSA 100 mg (αχινοί)	PSA 100 mg MgSO <sub>4</sub> 150 mg C18 50 mg * PSA 100 mg (αχινοί)
Χειροκίνητη ανακίνηση	1 min	1 min	1 min
Περιδίνηση	1 min	1 min	1 min
Φυγοκέντρηση	5 min (4000 rpm)	5 min (4000 rpm)	5 min (4000 rpm)
Διαλύτης επαναδιάλυσης	Εξάνιο ή 90:10 H <sub>2</sub> O: MeOH (0,1 % μυρμηκικό οξύ v/v).		

### 11.9 Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης

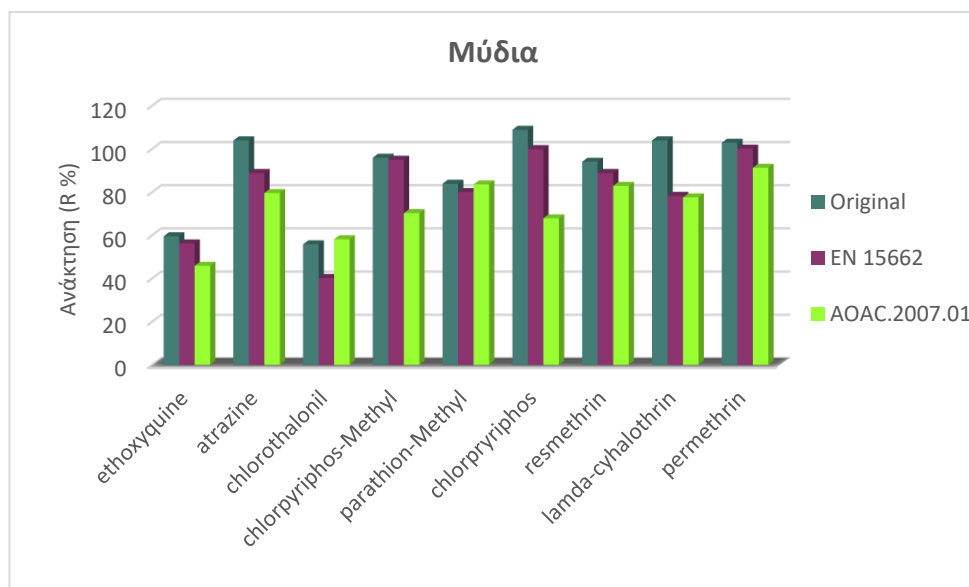
Η Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων για κάθε ένα από τα τρία υποστρώματα, για τα τρία πρωτόκολλα παρουσιάζονται στα σχήματα 11.6-11.9. Το πρωτόκολλο “original”, παρουσίασε τις υψηλότερες ανακτήσεις για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις του μείγματος I σε σχέση με το AOAC 2007.01 και το EN 15662 και στα τρία υποστρώματα (μύδια, ψάρια, αχινοί).



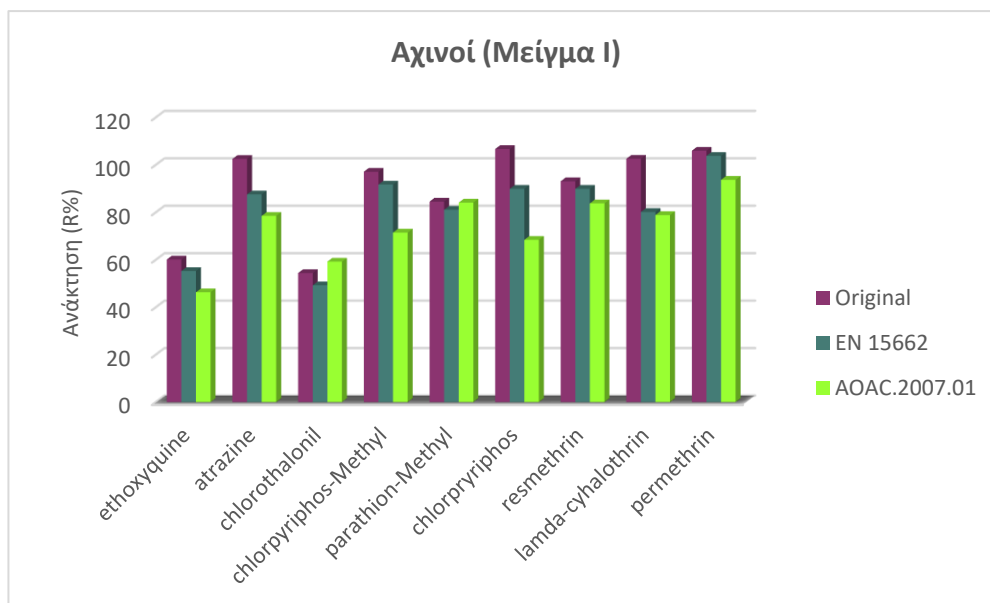
Όσον αφορά τα δείγματα του αχινού, μελετήθηκε η επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης για τους αναλύτες του μείγματος II. Οι ανακτήσεις και με τα τρία πρωτόκολλα, ήταν εντός αποδεκτών ορίων, όμως για το AOAC.2007.01 ελαφρώς υψηλότερες.



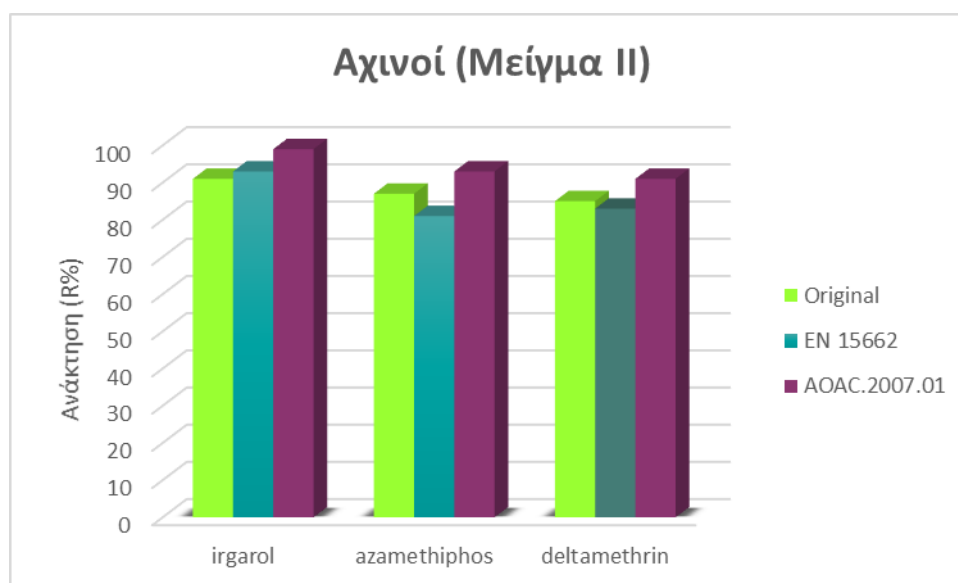
**Σχήμα 11.6:** Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I), για το υπόστρωμα των ψαριών



**Σχήμα 11.7:** Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I), για το υπόστρωμα των μυδιών



**Σχήμα 11.8:** Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I), για το υπόστρωμα των αχινών



**Σχήμα 11.9:** Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα II), για το υπόστρωμα των αχινών

Πιο αναλυτικά, το chlorothalonil, παρουσίασε υψηλότερες ανακτήσεις και για τα τρία υποστρώματα με την μέθοδο AOAC. 2007.01, καθώς η τιμή pH του εκχυλίσματος μετά την προσθήκη του οξικού νατρίου και του οξικού οξέος (H.A), είναι περίπου 5 (Carmona et al., 2017). Για το πρωτόκολλο EN 15662, η τιμή pH μετά την προσθήκη των κιτρικών αλάτων κυμαίνεται μεταξύ 8-9, με αποτέλεσμα να μην ευνοεί την εκχύλισή του, γεγονός που

δικαιολογεί τις χαμηλότερες ανακτήσεις λόγω διάσπασης σε βασικό περιβάλλον, (DisQue, 2011 και Rizzetti et al., 2016).

Το μυκητοκτόνο ethoxyquine, είναι μία ένωση που διασπάται σε όξινες τιμές pH, με αποτέλεσμα το πρωτόκολλο AOAC.2007.01 να παρουσιάζει τις χαμηλότερες ανακτήσεις σε σχέση με το original και το EN 15662. Η ιδιαιτερότητα των δύο αυτών αναλυτών σύμφωνα με την βιβλιογραφία, περιγράφεται παράγραφο 11.3.

Οι ενώσεις parathion-methyl και atrazine, λόγω της τάσης τους να κατανέμονται στο λίπος ( $\log K_{ow}$  2.8 και 2,6 αντίστοιχα), παρουσίασαν χαμηλότερες ανακτήσεις (εντός αποδεκτών ορίων) στα υποστρώματα των θαλάσσιων οργανισμών συγκριτικά με τα ιζήματα.

Οι σχετικά ισχυρές συνθήκες που επικρατούν με την προσθήκη οξικού νατρίου AOAC. 2007.01, σε σχέση με την κλασική και με την μέθοδο προσθήκης κιτρικών αλάτων EN 15662, οδηγεί σε οπτικά επιβαρυμένη οργανική φάση καθώς η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων στον οργανικό διαλύτη αυξάνεται καθώς το pH μειώνεται (González-Curbelo et al., 2015). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με την σύγκριση των χρωματογραφημάτων καθώς επίσης και με βιβλιογραφικά δεδομένα (Rejczak and Tuzimski, 2015).

Και τα τρία υποστρώματα (αχινοί, μύδια, ψάρια) παρουσίασαν την ίδια τάση ως προς την καταλληλότητα των τριών μεθόδων, με μικρές εξαιρέσεις. Επιπρόσθετα, παρόλο που η διαλυτότητα των λιπιδίων στο ακετονιτρίλιο είναι περιορισμένη, σε δείγματα με υψηλά ποσοστά λίπους, είναι πιθανόν να δεσμευτούν λιπόφιλες ενώσεις, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στις ελάχιστα χαμηλότερες ανακτήσεις για τα ψάρια αναλογικά με τα άλλα δύο υποστρώματα και κατ' επέκταση ανάμεσα στα ιζήματα και στου θαλάσσιους οργανισμούς.

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η προσθήκη προσροφητικών δεν προτείνεται για υποστρώματα με υψηλό ποσοστό λίπους, καθώς η συγκέντρωση των συν εκχυλιζόμενων ενώσεων αυξάνεται καθώς μειώνεται η δυνατότητα του PSA να τις δεσμεύσει σε αυτές τιμές pH που επικρατούν (González-Curbelo et al., 2015 και Mastovska et al., 2010). Λαμβάνοντας υπ' όψη ότι ο στόχος της παρούσας διατριβής είναι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός φυτοφαρμάκων που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες, με ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες και στον μικρότερο δυνατό χρόνο με το μικρότερο κόστος, επιλέχθηκε το original πρωτόκολλο, για περαιτέρω βελτιστοποίηση όσον αφορά το μείγμα I στα μύδια, ψάρια και αχινοί και το AOAC. 2007.01 για το μείγμα II στο υπόστρωμα των αχινών

## 11.10 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, μελετήθηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης όπως η επίδραση των προσροφητικών για τον καθαρισμό, η αναλογία δείγματος/διαλύτη, η ποσότητα δείγματος, η επίδραση του pH, η ποσότητα και η φύση των προσροφητικών για τον διαχωρισμό των φάσεων, η επαρκής ενυδάτωση, ο χρόνος περιδίνησης καθώς επίσης και η προσθήκη εσωτερικών προτύπων.

### 11.10.1 Επιλογή προσροφητικών στο clean up

Οι ιδιότητες των προσροφητικών τόσο στο στάδιο της εκχύλισης όσο και του καθαρισμού περιεγράφηκαν εκτενώς στις παραγράφους 11.3 και 11.4 της παρούσας Διατριβής. Κατά την ανάλυση επιβαρυσμένων-λιπαρών υποστρωμάτων, είναι πιθανό να συνεκχυλιστούν ανεπιθύμητες οργανικές ενώσεις, επηρεάζοντας έτσι την χρωματογραφικό προσδιορισμό.

Όπως αναφέρθηκε κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου εκχύλισης φυτοφαρμάκων από ιζήματα, η χρήση του άνυδρου  $MgSO_4$  αποσκοπεί στην απομάκρυνση της υγρασίας από τον οργανικό διαλύτη, της πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνης PSA για την απομάκρυνση οργανικών οξέων, λιπιδίων, σακχάρων, χρωστικών και του C18 για την απομάκρυνση μεγάλων ανθρακικών αλυσίδων λιπαρών ενώσεων καθώς επίσης και μη πολικών προσμίξεων (Rizzetti et al., 2016).

Στα προκαταρκτικά πειράματα στα δείγματα αχινού, παρατηρήθηκε έντονος χρωματισμός του διαλύτη έκλουσης μετά το στάδιο του καθαρισμού. Πιθανότητα γιατί τα προσροφητικά δεν κατάφεραν να δεσμεύσουν τα καροτενοειδή, τις χρωστικές στις οποίες οφείλεται το χαρακτηριστικό πορτοκαλοκόκκινο χρώμα του αχινού (Kelly and Symonds, 2013). Επομένως η προσθήκη του γραφίτιοποιημένου άνθρακα (graphitized carbon black, GCB) κρίθηκε απαραίτητη. Το GCB αποτελεί ένα ισχυρό προσροφητικό ανάστροφης φάσης, πολύ αποτελεσματικό στην απομάκρυνση χρωστικών, πολυφαινολών και άλλων πολικών ενώσεων. Η χρήση του βοηθά τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων και στην λήψη καθαρών εκχυλισμάτων, άρα και χρωματογραφήματων με μικρότερο θόρυβο. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να κατακρατήσει και πολικά αρωματικά μόρια μαζί με τις παρεμποδίζουσες ενώσεις, με αποτέλεσμα τη μείωση των ανακτήσεων. Από την άλλη μεριά, η ένωση chlorogryirhos δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη του GCB λόγω των μη επίπεδων πλευρικών αλυσίδων στη δομή του μορίου.

Η επίδραση των προσροφητικών στο στάδιο του καθαρισμού, μελετήθηκε και συγκρίθηκε και για τα τρία λιπαρά υποστρώματα. Τα μυκητοκτόνα chlorothalonil και

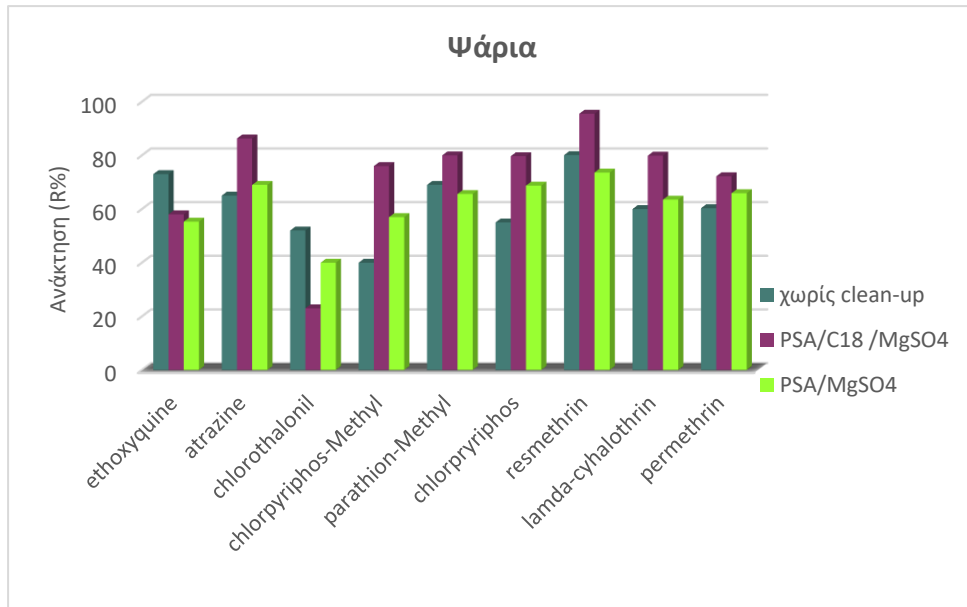
ethoxyguanine, παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με τα ιζήματα καθώς οι ανακτήσεις είναι χαμηλότερες με την προσθήκη των προσροφητικών, ενώ αυξάνονται με την απευθείας ανάλυση εκχυλίσματος χωρίς clean-up. Τα αποτελέσματα για το atrazine, lambda-cyhalothrin και parathion-methyl που παρουσιάζονται στα σχήματα 11.10-11.13, αποδεικνύουν ότι το clean-up, που πραγματοποιείται μόνο με συνδυασμό προσροφητικών PSA και  $MgSO_4$ , δεν οδηγεί σε επαρκή καθαρισμό, παρουσιάζοντας παρόμοιες ανακτήσεις με το πρωτόκολλο χωρίς clean-up. Αντίθετα, με την προσθήκη C18, η ανάκτησή του αυξάνεται, πιθανότητα λόγω κατακράτησης του λίπους.

Μετά την επιβεβαίωση της αναγκαιότητας της χρήσης του GCB στο clean-up των δειγμάτων αχινού, σειρά είχε η εύρεση της βέλτιστης ποσότητας. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με το πρωτότυπο πρωτόκολλο, με ποσότητα δείγματος 2 g και καθαρισμό 2 mL ακετονιτριλίου. Ανάμεσα στις ποσότητες 25, 50 και 100 mg, τα 25 mg δεν ήταν αρκετά για να δεσμεύσουν τις χρωστικές από τα δείγματα αχινών. Τα 50 mg GCB, κατάφεραν να αποχρωματίσουν το ακετονιτρίλιο δεσμεύοντας τις χρωστικές και ύστερα από χρωματογραφική ανάλυση παρατηρήθηκαν υψηλότερες ανακτήσεις για τους περισσότερους αναλύτες σε σχέση με τα 25 mg GCB. Αντίθετα, για ποσότητα 100 mg, αφενός δεν ήταν εφικτός διαχωρισμός των δύο φάσεων και αφετέρου, οι ανακτήσεις σε αρκετούς από τους αναλύτες ήταν χαμηλές λόγω κατακράτησης μέρους αυτών. Η αναλογία 2:1 ως προς το PSA, (100 mg PSA και 50 mg GCB), αποδείχθηκε καταλυτική για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο υπόστρωμα των θαλάσσιων οργανισμών.

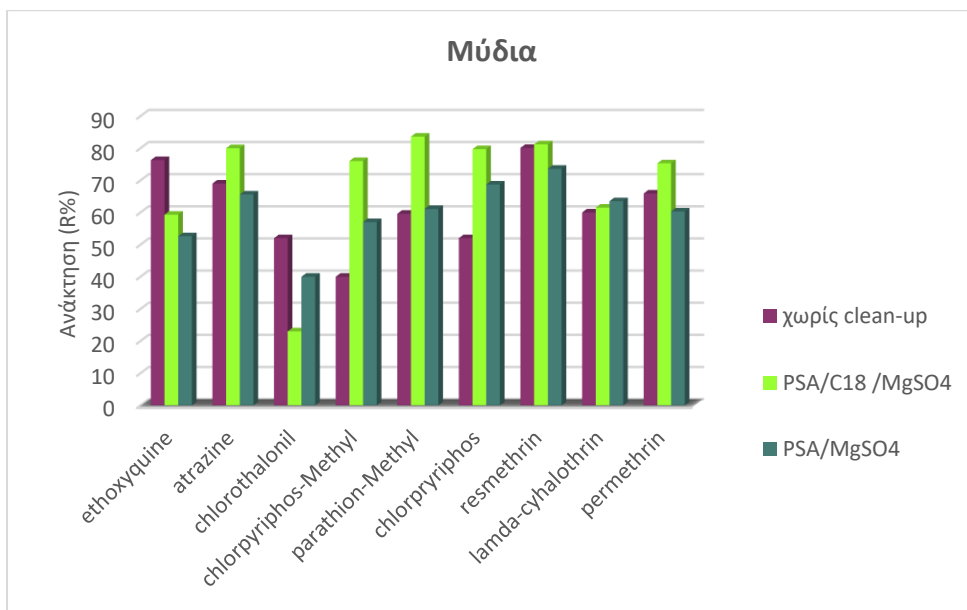
Οι αυξημένες ανακτήσεις που παρουσιάζονται με την χρήση προσροφητικών, έναντι των δειγμάτων που δεν πραγματοποιήθηκε καθαρισμός, αντικατοπτρίζουν την χρησιμότητα του σταδίου αυτού. Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου PSA/C18/ $MgSO_4$  είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των ανακτήσεων συγκριτικά με το PSA/ $MgSO_4$ , σε ικανοποιητικό βαθμό. Το γεγονός αυτό, καταδεικνύει αφενός την χρησιμότητα του C18 στην κατακράτηση ενώσεων που παρεμποδίζουν την εκχύλιση και αφετέρου την ανάγκη του για συνδυασμό με άλλα προσροφητικά εκχύλισης για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα.

Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στα δείγματα των αχινών για το μείγμα II, παρουσιάζοντας ανακτήσεις εντός αποδεκτών ορίων για όλους τους αναλύτες, με υψηλότερες τιμές για τα προσροφητικά PSA/ $MgSO_4$ /C18/GCB.

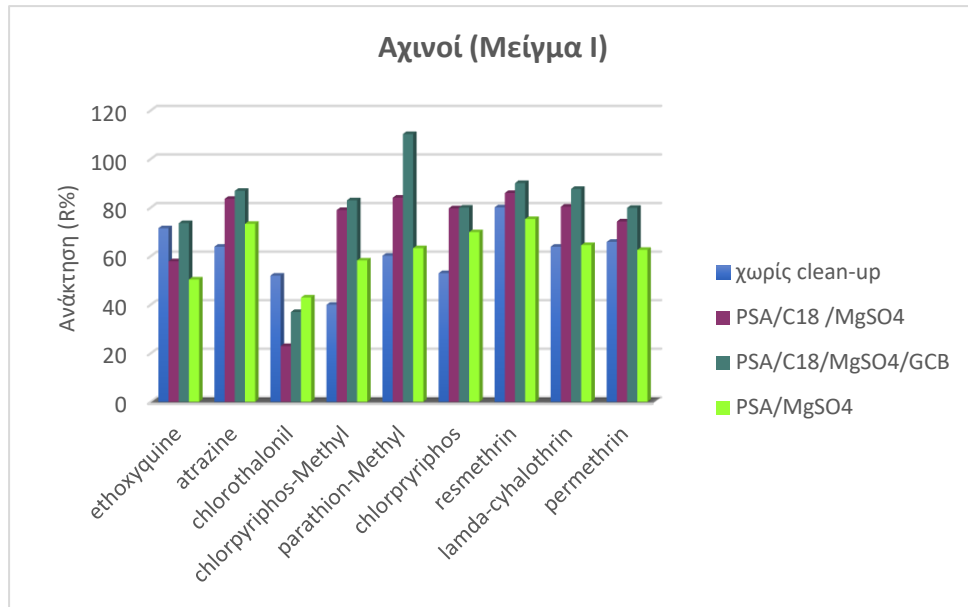
Όσον αφορά τα χρωματογραφήματα, η προσθήκη C18 οδήγησε σε καθαρότερα χρωματογραφήματα, καθώς εξαλείφθηκαν κορυφές με ενδιάμεσους χρόνους κατακράτησης 25-35 min, που οφείλονται κυρίως στα λιπαρά οξέα, γεγονός που συνάδει με βιβλιογραφικά δεδομένα (Rejczak and Tuzimski, 2015).



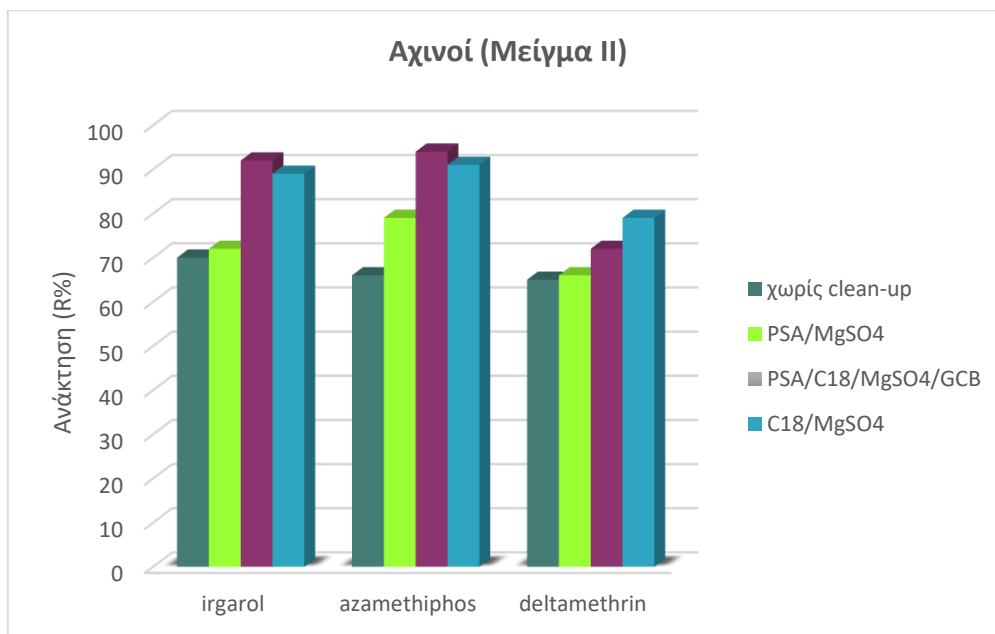
**Σχήμα 11.10:** Επίδραση προσροφητικών clean up του υποστρώματος των ψαριών για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις (μείγμα I)



**Σχήμα 11.11:** Επίδραση προσροφητικών clean up του υποστρώματος των μυδιών για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις (μείγμα I)



**Σχήμα 11.12:** Επίδραση προσροφητικών clean up του υποστρώματος των αχινών για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις (μείγμα I)



**Σχήμα 11.13:** Επίδραση προσροφητικών clean up του υποστρώματος των αχινών για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις (μείγμα II)

### 11.10.2 Διαλύτης εκχύλισης

Ο διαλύτης εκχύλισης, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την αποτελεσματική εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 11.6, η μέθοδος είναι συμβατή με αρκετούς μη αναμειξιμούς με το νερό διαλύτες. Η επιλογή του ακετονιτρίλιου έγινε με γνώμονα την εκλεκτικότητά του, καθώς μόνο μερικές παρεμποδίζουσες ενώσεις από το υπόστρωμα συνεκχυλίζονται, αλλά συνάμα καλύπτεται μεγάλο εύρος ενώσεων.

Η διαλυτότητα των λιπιδίων στο ακετονιτρίλιο είναι περιορισμένη, επομένως η συνεκχύλισή τους σε αυτόν τον διαλύτη είναι μικρή. Η απομόνωση των φυτοφαρμάκων από τα λιπίδια δεν είναι πάντα εφικτή (González-Curbelo et al., 2015). Οι μη πολικές, λιποδιαλυτές ενώσεις, παρουσιάζουν χαμηλές ανακτήσεις και η απώλειά τους είναι ανάλογη με τον συντελεστή κατανομής τους ανάμεσα στο λίπος και στον οργανικό διαλύτη (Rejczak and Tuzimski, 2015).

Όμως το ακετονιτρίλιο προτείνεται, καθώς με την προσθήκη των προσροφητικών, απομονώνεται ευκολότερα σε σχέση με την ακετόνη από το νερό. Παρουσιάζει υψηλότερη πολικότητα από τον οξικό αιθυλεστέρα και την ακετόνη, επομένως καλύτερη διαλυτότητα για τις μετρίως έως πολικές ενώσεις, άρα και υψηλότερες ανακτήσεις (Rejczak and Tuzimski, 2015). Η αναλογία οργανικού διαλύτη δείγματος ορίστηκε ως 1:2 (w/vol), καθώς επιτρέπει ικανοποιητικές ανακτήσεις των μελετώμενων ενώσεων (Rejczak and Tuzimski, 2015).

### 11.10.3 Ποσότητα δείγματος

Με σκοπό την αύξηση της προσυγκέντρωσης, μελετήθηκαν οι ποσότητες 2, 5 και 10 g και για τα τρία υποστρώματα των θαλάσσιων οργανισμών.

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα εμβολιασμένων δειγμάτων με την ίδια συγκέντρωση αλλά διαφορετική ποσότητα δείγματος για το υπόστρωμα των μυδιών και των ψαριών, η βέλτιστη ποσότητα ορίστηκε στα 2 g. Τα 5 g καθώς επίσης και τα 10 g, εκτός από το προφανές αυξημένο κόστος λόγω κατανάλωσης μεγαλύτερων ποσοτήτων προσροφητικών, είχε σαν αποτέλεσμα δυσκολία εφαρμογή του πρωτοκόλλου κατά τον εμβολιασμό, στην ομογενοποίηση αλλά και στην ποσότητα του δείγματος μέσα στον φυγοκεντρικό σωλήνα. Όσον αφορά των χρωματογραφικό προσδιορισμό, παρατηρήθηκαν επιβαρυμένα χρωματογραφήματα, με αυξημένα όρια θορύβου συνεκχυλιζόμενων ενώσεων, καθώς επίσης και διευρυμένες κορυφές.

Για τα δείγματα των αχινών, η βέλτιστη ποσότητα ορίστηκε στα 5g καθώς παρουσιάστηκαν υψηλότερες ανακτήσεις. Συγκριτικά με τα 10 g, παρατηρήθηκαν πιο



καθαρά εκλούσματα, ενώ με τα 2 g παρατηρήθηκαν ελαφρώς χαμηλότερες ανακτήσεις και υποδιπλάσια προσυγκέντρωση.

#### 11.10.4 Χρόνος περιδίνησης

Για την επιλογή του βέλτιστου χρόνου περιδίνησης, ελέγχθηκαν οι χρόνοι 1, 2 και 5 min. Δεν παρατηρήθηκε ουσιαστική διαφοροποίηση ως προς τις ανακτήσεις αναλογικά με τον χρόνο. Επομένως χάριν συντομίας ως βέλτιστος χρόνος ορίστηκαν τα 1 min. Οι ενώσεις ethoxyquine και chlorothalonil δεν παρουσίασαν υψηλότερες ανακτήσεις όταν εξετάστηκαν μεγαλύτεροι χρόνοι περιδίνησης, πιθανότητα διότι η απώλειά τους οφείλεται στην αλληλεπίδρασή τους με κάποιο από τα προσροφητικά.

#### 11.10.5 Επαρκής ενυδάτωση δείγματος

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η επαρκής ενυδάτωση του δείγματος πριν την προσθήκη του οργανικού διαλύτη στο δείγμα επιτρέπει την καλύτερη κατανομή των αναλυτών μεταξύ νερού και ακετονιτριλίου (Kim et al., 2019 και Łozowicka et al., 2017). Υποστρώματα με περιεκτικότητα νερού μικρότερη από 80 % απαιτούν προσθήκη νερού έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναλύτη και υποστρώματος και να εξασφαλιστεί επαρκής κατανομή. Ιδανικά, ο όγκος του νερού μαζί με το υπόστρωμα δεν πρέπει να ξεπερνάει τα 10 mL για το πρωτόκολλο EN15662 και τα 15 mL για το AOAC 2007.01 (Rejczak and Tuzimski, 2015).

Καθώς δεν χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της λυοφιλίωσης και δεδομένου του ποσοστού υγρασίας που περιέχουν αυτά τα υποστρώματα, η βέλτιστη αναλογία νερού ως προς την ποσότητα δείγματος ήταν 1:2. Παρόλα αυτά, για την εκτίμηση της σημασίας της παραμέτρου αυτής, εξετάστηκαν επίσης οι αναλογίες 1:1, 1:1,5 και 1:3. Συγκριτικά οι αναλογίες 1:1, 1:1,5 δηλαδή (2 g δείγματος/ 2 mL νερού) και (2 g δείγματος/ 3 mL νερού) δεν παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές στις ανακτήσεις. Από την άλλη μεριά, η αναλογία 1:3 απορρίφθηκε λόγω δυσκολίας χειρισμού στον φυγοκεντρικό σωλήνα, ιδιαίτερα κατά το στάδιο της περιδίνησης μετά και την προσθήκη των προσροφητικών εκχύλισης. Η αναλογία 1:3 για τα δείγματα αχινού, δεδομένου των 5 g δείγματος που αναλύονται, μεταφράζεται σε 15 mL νερού που ξεπερνάει κατά πολύ τους μέγιστους επιτρεπόμενους όγκους για τα τροποποιημένα πρωτόκολλα.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι το νερό που χρησιμοποιείται, είναι προτιμότερο να έχει προηγουμένως ψυχθεί, έτσι ώστε να προστατευτούν οι πτητικές ενώσεις

από την εκλυόμενη θερμότητα λόγω προσθήκης άνυδρου  $MgSO_4$  (εξώθερμη αντίδραση) (González-Curbelo et al., 2015; Łozowicka et al., 2017 και Rejczak and Tuzimski, 2015).

#### 11.10.6 Ψύξη δειγμάτων πριν από το clean-up

Ένας ακόμα παράγοντας που μελετήθηκε σε σχέση με τα μη λιπαρά ιζήματα είναι η ψύξη των δειγμάτων μετά την εκχύλιση και πριν από τον καθαρισμό. Μετά την ψύξη των δειγμάτων για μία ώρα παρατηρήθηκε καταβύθιση του λίπους. Αυτό το βήμα, δρα συνδυαστικά με το στάδιο του καθαρισμού, με αποτέλεσμα χαμηλότερα όρια θορύβου των συνεκχιζόμενων ενώσεων.

Επιπρόσθετα, η ψύξη των δειγμάτων είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των ανακτήσεων ενώσεων όπως του ethoxyquine, που λόγω της εξώθερμης αντίδρασης που λαμβάνει χώρα με την προσθήκη των προσροφητικών διασπάται.

## B. Επικύρωση

### 11.11 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης QuEChERS για του θαλάσσιους οργανισμούς

Σύμφωνα με την Οδηγία 2002/657/ΕΚ τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (LOD) και για τα τρία υποστρώματα (μείγμα I) κυμάνθηκαν από 1 έως 10 ng/g, ενώ για το μείγμα II για το υπόστρωμα των αχινών από 0,9 έως 9,5 ng/g (Πίνακας 11.5-11.8).

Η επαναληψιμότητα (% RSDr) εντός της ημέρας στο μεσαίο επίπεδο (μείγμα I), κυμάνθηκε μεταξύ 8,9% και 12 % για τα ψάρια, 2,9 και 12 % για τα μύδια, 4,3 έως 9,9 % για τους αχινούς. Για το μείγμα II η επαναληψιμότητα στο μεσαίο επίπεδο συγκέντρωσης, κυμάνθηκε μεταξύ 5,6 και 6,9 %. Αντίστοιχα, η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ των ημερών για το μείγμα I ήταν μικρότερη από 16 % για τα ψάρια-γοβιοί (*gobio-gobio*), μικρότερη από 17% για τα μύδια (*Mytilus gallprovincialis*) και μικρότερη από 14 % για τους αχινούς (*Paracentrotus lividus*) (Πίνακας 11.5-11.8). Για το μείγμα II στο υπόστρωμα των αχινών, η αναπαραγωγιμότητα ήταν μικρότερη από 12 % για όλους τους αναλύτες. Καμία φυτοπροστατευτική ένωση, δεν υπερέβη το ανώτατο αποδεκτό όριο της αναπαραγωγιμότητας που έχει οριστεί ως το 20%.

Για να διερευνηθεί η γραμμικότητα της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσαις εμβολιασμένων δειγμάτων σε εννιά επίπεδα συγκεντρώσεων και για εύρος συγκεντρώσεων από το LOQ έως 1000 ng/g. Κάθε μια από τις εκχυλίσαις εγχύθηκε εις τριπλούν στην ενόργανη διάταξη (GC-MS ή LC-LTQ/Orbitrap-MS). Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με την κατασκευή καμπύλης εννιά σημείων, σε εμβολιασμένα δείγματα για εύρος συγκεντρώσεων από το μεταξύ LOQ έως 100 LOQ.

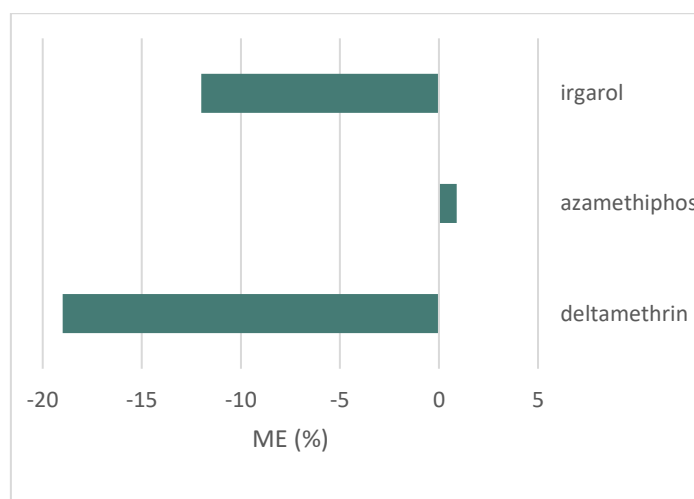
Ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) για το μείγμα I στο υπόστρωμα των ψαριών-γοβιών υπολογίστηκε μεγαλύτερος από 0,9968 για όλες τις ενώσεις, στα μύδια μεγαλύτερες από 0,9942 και τους αχινούς μεγαλύτερες από 0,9935 για όλες τις ενώσεις, γεγονός που υποδεικνύει την γραμμικότητα των μεθόδων. Ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) για το μείγμα II στο υπόστρωμα των αχινών ήταν μεγαλύτερος από 0,9984 για όλες τις ενώσεις.

Οι ανακτήσεις ( $n=5$ ) στο υψηλό επίπεδο εμβολιασμού για το μείγμα I κυμάνθηκαν από 62,4 % (chlorothalonil) έως 119 % (resmethrin) για τους γοβιούς, 62,2 % (chlorothalonil) έως 108 % (permethrin) για τα μύδια και 64,4 % (ethoxyquine) έως 103 % (permethrin) για τους αχινούς. Αντίστοιχα για το μείγμα II στο υψηλό επίπεδο εμβολιασμού για το υπόστρωμα των αχινών κυμάνθηκε μεταξύ 95,8 % για το azamethiphos και 103 % για το irgarol.

Το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος και οι πιθανοί παράγοντες στους οποίους οφείλεται έχουν ήδη περιγραφεί στο θεωρητικό μέρος. Η χρήση καμπυλών

βαθμονόμησης με προσομοίωση υποστρώματος συνέβαλλε σημαντικά στην ελαχιστοποίηση σφαλμάτων, κυρίως κατά τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό καθώς η πηγή ESI θεωρείται ιδιαίτερα επιρρεπής στο να ιονίζει παρεμποδίζουσες και συν-εκχυλιζόμενες ενώσεις. Οι τιμές της (%) επίδρασης του υποστρώματος υποδηλώνουν ελαφριά μείωση (του αναλυτικού σήματος για τις ενώσεις irgarol και deltamethrin (<20 %, αμελητέα) και ελαφριά ενίσχυση (0,9 %) για την ένωση azamethiphos.

Τα αποτελέσματα τονίζουν τη σημασία της χρήσης καμπυλών προσομοιωμένες στο υπόστρωμα καθώς επίσης και την χρήση εσωτερικών προτύπων, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση συγκέντρωσης αναλυτών κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.



**Σχήμα 11.14:** Επίδραση υποστρώματος για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

**Πίνακας 11.5:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QmEChERS για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενόσεων στο υπόστρωμα των ψαριών

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng g <sup>-1</sup> )	LOD (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης	
						LOQ		10 LOQ		100 LOQ	
						R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra <sup>d</sup>	R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra	R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra
ethoxyquine	0,9984	26-750	8	26	16	53,6	14	61,2	10	64,2	9,3
atrazine	0,9982	3,3-500	1	3,3	15	59,7	13	72,0	8,9	102	6,8
chlorothalonil	0,9968	16-750	5	16	15	53,1	12	57,3	11	62,4	9,0
chlorpyrifos-Methyl	0,9977	3,3-500	1	3,3	11	79,8	9,9	72,4	9,6	68,8	8,1
parathion-Methyl	0,9987	33-500	10	33	10	80,9	8,9	84,5	11	109	7,2
chlorpyrifos	0,9990	8,25-500	2,5	8,2	15	74,3	11	82,9	10	98,8	8,4
resmethrin	0,9991	8,25-500	2,5	8,2	11	91,8	10	97,3	9,5	119	10
lamda-cyhalothrin	0,9993	16-750	5	16	13	80,2	14	82,3	12	87,8	7,6
permethrin	0,9991	16-750	5	16	13	76,7	12	87,9	12	89,9	8,7

(a) LOD: Όριο ανίχνευσης

(b) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(c) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(d) RSD<sub>R</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα

**Πίνακας 11.6:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QMChERS για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο υπόστρωμα των μυδιών

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng g <sup>-1</sup> )	LOD (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης	
						LOQ		10 LOQ		100 LOQ	
						R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra <sup>d</sup>	R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra	R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra
ethoxyquine	0,9943	9-500	2,7	9,0	17	55,6	15	63,3	12	67,8	9,6
atrazine	0,9956	3,3-500	1,0	3,3	9,2	104,4	8,9	89,4	2,9	88,8	1,4
chlorothalonil	0,9942	8,3-750	2,5	8,3	14	51,6	14	59,3	11	62,2	8,6
chlorpyrifos-Methyl	0,9981	3,3-500	1,0	3,3	13	79,9	6,9	88,5	4,5	93,2	2,7
parathion-Methyl	0,9948	3,3-500	1,0	3,3	10	81,0	7,7	109	5,6	88,3	4,3
chlorpyrifos	0,9992	8,3-750	2,5	8,3	7,6	99,9	7,3	104	4,1	101	5,3
irgarol	0,9979	3,3-500	1,0	3,3	8,2	95,1	6,9	95,3	4,9	98,3	4,2
resmethrin	0,9969	16-500	5,0	16	10	90,7	8,9	98,9	6,1	98,8	5,2
lamda-cyhalothrin	0,9984	33-1000	10	33	12	72,2	10	96,6	7,0	103	6,3
permethrin	0,9973	8,3-750	2,5	8,3	11	89,6	8,2	92,3	5,6	108	5,9

(a) LOD: Όριο ανίχνευσης

(b) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(c) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(d) RSD<sub>R</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα

**Πίνακας 11.7:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QmEChERS για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο υπόστρωμα των αχινών (μείγμα I)

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng g <sup>-1</sup> )	LOD (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης	
						LOQ		10 LOQ		100 LOQ	
						R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra <sup>d</sup>	R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra	R%	RSD <sub>R</sub> %-Intra
ethoxyquine	0,9956	9,0-750	2,7	9,0	13	52,2	12	63,3	9,8	64,4	5,3
atrazine	0,9957	3,3-500	1,0	3,3	9,2	64,7	112	78,9	8,9	84,9	4,2
chlorothalonil	0,9935	33-1000	10	33	14	51,9	12	58,4	9,9	68,3	7,5
chlorpyrifos-Methyl	0,9948	3,3-500	1,0	3,3	7,9	72,3	11	70,1	5,2	79,8	3,7
parathion-Methyl	0,9959	3,3-500	1,0	3,3	10	83,5	7,9	87,9	8,0	98,6	5,3
chlorpyrifos	0,9992	8,3-750	2,5	8,3	7,6	79,5	6,1	83,4	4,3	102	2,2
irgarol	0,9969	3,3-500	1,0	3,3	9,2	92,1	7,2	95,8	5,3	97,6	5,2
resmethrin	0,9969	16-500	5,0	16	10	88,6	8,9	94,2	6,5	95,6	5,9
lamda-cyhalothrin	0,9989	33-1000	10	33	12	76,6	9,3	83,3	7,6	96,7	6,5
permethrin	0,9979	8,3-750	2,5	8,3	11	88,6	8,5	91,3	6,4	103	5,5

(a) LOD: Όριο ανίχνευσης

(b) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(c) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(d) RSD<sub>R</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα

**Πίνακας 11.8:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QmEChERS για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο υπόστρωμα των αχινών (μείγμα II)

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng g <sup>-1</sup> )	LOD (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης	
						LOQ		10LOQ		100LOQ	
						R%	RSD,%-Intra <sup>d</sup>	R%	RSD,%-Intra	R%	RSD,%-Intra
Irgarol	0,9993	2,9-500	0,9	2,9	8,5	89,6	8,9	99,2	6,9	103	4,8
azamethiphos	0,9989	11-750	3,3	11	9,6	85,9	8,2	103	5,6	95,8	4,3
deltamethrin	0,9984	31-750	9,5	31	12	79,8	9,5	92,9	6,3	99,8	5,8

(a) LOD: Όριο ανίχνευσης

(b) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(c) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(d) RSD,%-Intra: Επαναληψιμότητα



## Γ. Βελτιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna Minor*

### 11.12 Επιλογή πρωτοκόλλου εκχύλισης

Πρώτο βήμα για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου αποτέλεσε η μελέτη δύο προτεινόμενων πρωτοκόλλων από διεθνή πρότυπα με διαλύτη εκχύλισης το ακετονιτρίλιο, αυτό της κλασικής QuEChERS (original) και το AOAC 2007.01 με την χρήση άνυδρου οξικού νατρίου ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) Πίνακα 11.9.

Συγκεκριμένα, 100 mg τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου φυτικού ιστού *L.Minor* (φύλλα, στέλεχος και ρίζα), ζυγίζονται σε falcon και προστίθενται 2 mL ακετονιτρίλιου στην περίπτωση της κλασικής QuEChERS και 2 mL ακετονιτρίλιου +0.1 % (v/v) οξικό οξύ για το AOAC 2007.01. Το μείγμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 10 min και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες (απουσία φωτός) έτσι ώστε να εξασφαλιστεί πλήρης αλληλεπίδραση του δείγματος με τον οργανικό διαλύτη. Στη συνέχεια προστίθενται τα προσροφητικά 100 mg  $\text{MgSO}_4$  και 50 mg NaCl για το κλασικό πρωτόκολλο και 100 mg  $\text{MgSO}_4$  και 50 mg  $\text{CH}_3\text{COONa}$  το AOAC 2007.01. Ακολουθεί έντονη χειροκίνητη ανακίνηση για 1 min και 1 min σε συσκευή περιδίνησης και έπειτα χειροκίνητα για 1 min. Μετά την φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 min στις 4000 rpm, ακολουθεί το στάδιο του καθαρισμού (clean-up).

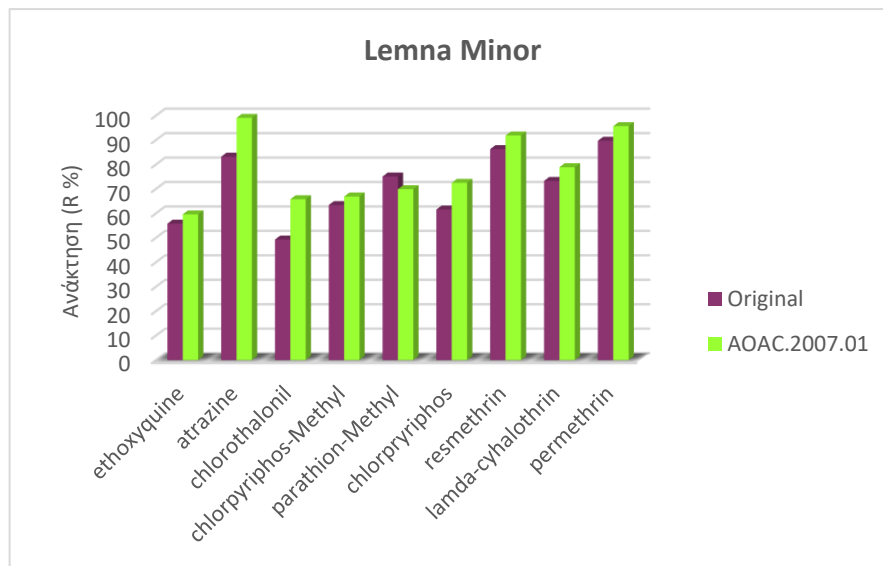
Σύμφωνα με αυτό, κλάσμα όγκου ενός mL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL ο οποίος περιείχε τα προζυγισμένα προσροφητικά 100 mg άνυδρου  $\text{MgSO}_4$ , 50 mg PSA, 50 mg GCB και 50 mg  $\text{Al}_2\text{O}_3$  για το κλασικό πρωτόκολλο και 100 mg άνυδρου  $\text{MgSO}_4$ , 50 mg PSA, 50 mg C18 και 50 mg GCB για το AOAC 2007.01. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με συσκευή vortex για 1 min και φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm (Πίνακας 11.9). Ο οργανικός διαλύτης συλλέγεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου, επαναδιαλύεται σε 100  $\mu\text{L}$  εξανίου και τέλος διηθείται με μεμβράνη PTFE 0,22  $\mu\text{m}$ .

Το κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης αποτέλεσε η απόδοση της εκχύλισης (εκφραζόμενη ως εκατοστιαία ανάκτηση %) των ενώσεων, και τα όρια θορύβου των συνεχυλιζόμενων ενώσεων κατά την χρωματογραφική ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων με συγκέντρωση 30 ng/g. Για κάθε ένα πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις ( $n=3$ ) και ακολούθησε έγχυση σε σύστημα GC-MS.

**Πίνακας 11.9:** Εξεταζόμενες πειραματικές πορείες εκχύλισης για το υπόστρωμα *L.Minor*

	<b>Original</b>	<b>AOAC 2007.01</b>
Ποσότητα δείγματος		100 mg δείγματος
Διαλύτης εκχύλισης	2 mL ACN	2 mL ACN (+0.1% H.A)
Υπερήχους	10 min	10 min
Προσροφητικά εκχύλισης	MgSO <sub>4</sub> 100 mg	MgSO <sub>4</sub> 100 mg
	NaCl 50 mg	CH <sub>3</sub> COONa 50 mg
Χειροκίνητη ανακίνηση	1 min	1 min
Περιδίνηση	1 min	1 min
Φυγοκέντρηση	5 min (4000rpm)	5 min (4000rpm)
Καθαρισμός (Clean-up)	1 mL	1 mL
	PSA 50 mg	PSA 50 mg
Προσροφητικά καθαρισμού	MgSO <sub>4</sub> 100 mg	MgSO <sub>4</sub> 100mg
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 50 mg	C18 50 mg
	GCB 50 mg	GCB 50 mg
Χειροκίνητη ανακίνηση	1 min	1min
Περιδίνηση	2 min	2 min
Φυγοκέντρηση	5 min (4000 rpm)	5 min (4000 rpm)
Διαλύτης επαναδιάλυσης	Εξάνιο	Εξάνιο

Η Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων (Μείγμα Ι) παρουσιάζονται στο Σχήμα 11.15 σύμφωνα με το οποίο οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές για όλες σχεδόν τις ενώσεις και με τα δύο πρωτόκολλα. Ελαφρώς υψηλότερες ανακτήσεις παρουσιάστηκαν για το πρωτόκολλο AOAC 2007.01 ίσως λόγω του όξινου χαρακτήρα του υποστρώματος της *L.Minor* (pH ≈5,2 -6). Για τις ενώσεις ethoxyguanine και chlorothalonil παρατηρήθηκε η ίδια τάση με τους θαλάσσιους οργανισμούς και τα ιζήματα υποδηλώνοντας την σημαντική επίδραση του pH στην ανάλυσή τους.



**Σχήμα 11.15:** Επίδραση των προσροφητικών εκχύλισης στις ανακτήσεις φυτοπροστατευτικών ενώσεων (μείγμα I)

Λόγω της πολυπλοκότητας του υποστρώματος, είναι απαραίτητο να διερευνηθεί το στάδιο του clean-up με διαφορετικό συνδυασμό προσροφητικών. Προκειμένου να προστατευτεί η στήλη του αέριου χρωματογράφου δεν πραγματοποιήθηκε απευθείας ανάλυση (χωρίς clean-up) λόγω έντονου χρωματισμού και των αιωρούμενων του διαλύτη έκλουσης.

### 11.13 Παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης όπως η ποσότητα δείγματος, η επίδραση του pH, η ποσότητα και η φύση των προσροφητικών για τον διαχωρισμό των φάσεων καθώς επίσης και ο χρόνος υπερήχων.

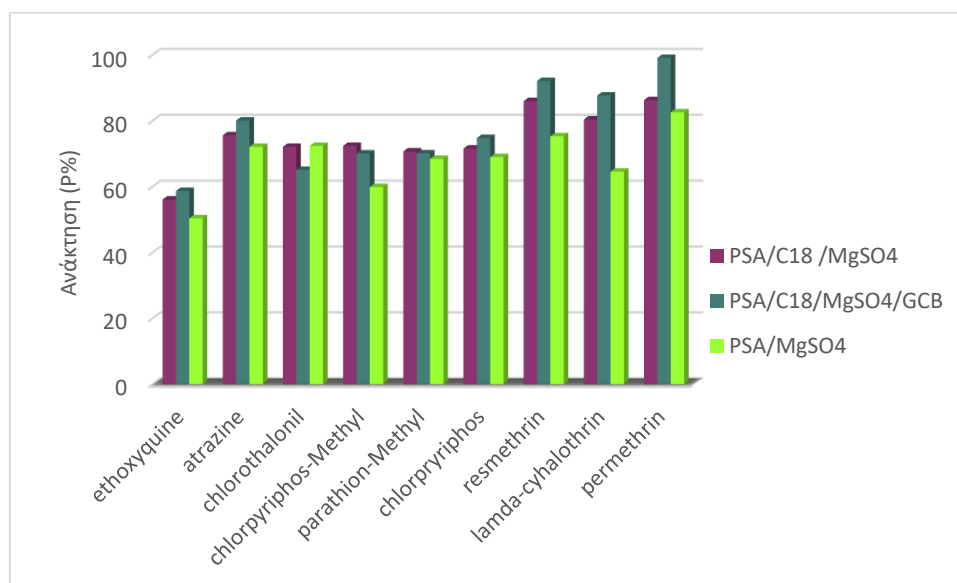
#### 11.13.1 Επιλογή προσροφητικών clean up

Μεγάλη πρόκληση κατά την ανάλυση υποστρωμάτων όπως η *L. Minor* αποτελεί η απομάκρυνση της χλωροφύλλης λόγω των μη πτητικών χαρακτηριστικών της (Rejczak and Tuzimski., 2015 και Sadowska-Rociek et al., 2013). Η χρήση του προσροφητικού GCB κρίθηκε αναγκαία καθώς στα προκαταρκτικά πειράματα παρατηρήθηκε έντονος χρωματισμός του οργανικού διαλύτη από την παραπάνω χρωστική (Heinzen et al., 2017). Παρόλο που το GCB χρησιμοποιείται ευρέως για την απομάκρυνση της χλωροφύλλης από δείγματα φυτικών

οργανισμών, μπορεί να παρουσιάσει και η ισχυρή προσρόφηση αναλυτών που οδηγούν σε χαμηλές ανακτήσεις (Rejczak and Tuzimski., 2015 και Sadowska-Rociek et al., 2013).

Επιπρόσθετα, η χλωροφύλλη κατακρατείται ισχυρά από τα προσροφητικά που περιέχουν αμίνες όπως το PSA, προκαλώντας απώλειες όμως όξινων αναλυτών (González-Curbelo et al., 2015; Rutkowska et al., 2018 και Rejczak and Tuzimski., 2015). Μικρές ποσότητες GCB σε συνδυασμό με PSA αποδείχθηκαν η καλύτερη λύση για το χειρισμό αυτού του υποστρώματος, όμως λόγω της υψηλής συγγένειας των επίπεδων παρασιτοκτόνων όπως το chlorothalonil ως προς το GCB παρουσιάζει σημαντικούς περιορισμούς (Σχήμα 11.16).

Η χρήση της αλούμινας  $Al_2O_3$ , στην μέθοδο QuEChERS για την ανάλυση δειγμάτων L.Minor και δειγμάτων που περιέχουν χλωροφύλλη είναι αρκετά διαδεδομένη (Geng et al., 2018 και Volpatto et al., 2016). Αποτελεί ένα κατάλληλο προσροφητικό για το clean-up μη πολικών αναλυτών όπως τα πυρεθροειδή, μειώνοντας ή αποφεύγοντας την ποσότητα του PSA (Heinzen et al., 2017). Συνήθως συνδυάζεται μαζί με το GCB καθώς το τελευταίο δεν μπορεί να απομακρύνει πολικές ενώσεις και λιπαρά οξέα (Heinzen et al., 2017). Η χρήση της ουδέτερης αλούμινας στην μέθοδο QuEChERS είναι πιθανόν να μειώσει τις ανακτήσεις των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (Heinzen et al., 2017).



**Σχήμα 11.16:** Επίδραση των προσροφητικών καθαρισμού στις ανακτήσεις φυτοπροστατευτικών ενώσεων (Μείγμα I)

### 11.13.2 Ποσότητα δείγματος

Με σκοπό την αύξηση της προσυγκέντρωσης, μελετήθηκαν οι ποσότητες 100, 200 και 250 mg. Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα εμβολιασμένων δειγμάτων με την ίδια συγκέντρωση αλλά διαφορετική ποσότητα δείγματος, η βέλτιστη ποσότητα ορίστηκε στα 100 mg. Τα 200 mg καθώς επίσης και τα 250 mg, κρίθηκαν ακατάλληλα λόγω έντονου χρωματισμού του ακετονιτριλίου, της μεγαλύτερης ποσότητας προσροφητικών που έπρεπε να προστεθεί για τον αποχρωματισμό ενός mL οργανικού διαλύτη και τέλος στην στα αυξημένα όρια θορύβου συνεκχυλιζόμενων ενώσεων.

Τα δείγματα των 200 mg και των 250 mg, αραιώθηκαν πριν την έγχυση σε σύστημα αέριου χρωματογράφου με εξάνιο (αναλογία 1:1). Κατά τον χρωματογραφικό προσδιορισμό, παρατηρήθηκαν αυξημένα όρια θορύβου συνεκχυλιζόμενων ενώσεων.

### 11.13.3 Διαλύτης εκχύλισης

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης, βασίστηκε αφενός στις υψηλότερες ανακτήσεις. Όσον αφορά την οπτική αξιολόγηση ανάμεσα στον οξικό αιθυλεστέρα, στην ακετόνη και στο ακετονιτρίλιο, τα εκχυλίσματα της L. Minor, είχαν μεγαλύτερο ποσοστό χρωστικών και αιωρούμενων ενώ ήταν δυσκολότερος ο διαχωρισμός των φάσεων (Sadowska-Rociek et al., 2013).

Με την χρήση του ακετονιτριλίου ως διαλύτη εκχύλισης το εκχύλισμα ήταν καθαρότερο και κατά τον χρωματογραφικό προσδιορισμό παρουσιάστηκαν κορυφές με υψηλότερο σήμα για όλους σχεδόν τους αναλύτες. Το ακετονιτρίλιο παρέχει δυνατότητα εκχύλισης μεγάλου εύρους πολικότητας αναλυτών και είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος διαλύτης στις πολύ υπολειμματικές μεθόδους ανάλυσης φυτοφαρμάκων (González-Curbelo et al., 2015 και Rizzetti et al., 2016).

Για όλα τα παραπάνω και παρόλα τα έμφυτα μειονεκτήματα του ακετονιτριλίου, όπως η τοξικότητα η χαμηλή πτητικότητα και το αυξημένο κόστος, επιλέχθηκε ως ο διαλύτης εκχύλισης.

### 11.13.4 Χρόνος υπερήχων

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του χρόνου υπερήχων των δειγμάτων σε εύρος 5- 20 min. Υψηλότερες ανακτήσεις παρατηρήθηκαν για την παραμονή των δειγμάτων στους υπερήχους για 10 min. Οι ανακτήσεις στην χαμηλότερη τιμή της μελετώμενης παραμέτρου καθώς επίσης και στην υψηλότερη ήταν αρκετά μειωμένες. Το γεγονός αυτό πιθανότητα οφείλεται στο ότι στην πρώτη περίπτωση ο χρόνος δεν ήταν αρκετός για την πλήρη εκχύλιση

των αναλυτών ενώ στην δεύτερη παρατηρείται διάσπαση των μη σταθερών ενώσεων. Επομένως ως βέλτιστος χρόνος ορίστηκαν τα 10 min.

## **B. Επικύρωση**

### **11.14 Χαρακτηριστικά αναλυτικής επίδοσης της μεθόδου για το υπόστρωμα *Lemna Minor* (Μείγμα I)**

Τα όρια ανίχνευσης (LODs) κυμάνθηκαν 1 έως 10 ng/g, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQs) κυμάνθηκαν μεταξύ 3,3 και 33 ng/g, αποδεικνύοντας τον ικανοποιητικό παράγοντα προσυγκέντρωσης (Preconcentration Factor- PF).

Η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας για το υψηλό επίπεδο εμβολιασμού κυμάνθηκε μεταξύ 3,4 και 8,1 %, ενώ η αναπαραγωγικότητα μεταξύ των ημερών ήταν μικρότερη από 11 % για όλους τους αναλύτες.

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με την κατασκευή καμπύλης επτά σημείων, σε εμβολιασμένα δείγματα για εύρος συγκεντρώσεων από το μεταξύ LOQ έως 100 LOQ. Κάθε μια από τις εκχυλίσεις εγχύθηκε εις τριπλούν στον αέριο χρωματογράφο (GC-MS). Ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) υπολογίστηκε να έχει τιμές μεγαλύτερες από 0,9911 για όλες τις ενώσεις, γεγονός που υποδεικνύει την καλή γραμμικότητα της μεθόδου (Πίνακα 11.10).

Η μέση τιμή των ανακτήσεων ( $n=5$ ) στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού κυμάνθηκαν από 59,1 % (chlorothalonil) έως 110 % (ethoxyquine), στο μεσαίο από 60,9% (chlorothalonil) έως 110 % (permethrin) και στο υψηλό από 78,3 % (chlorothalonil) έως 116 % (permethrin).

**Πίνακας 11.10:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά μεθόδου QmEChERS για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο υπόστρωμα L.Minor (μείγμα I)

Ένωση	R <sup>2</sup>	Γραμμικότητα (ng g <sup>-1</sup> )	LOD (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	LOQ (ng g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	RSD <sub>R</sub> %-Inter <sup>c</sup>	Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης		Επίπεδο Συγκέντρωσης	
						LOQ		10 LOQ		100 LOQ	
						R%	RSD <sub>r</sub> %-Intra <sup>d</sup>	R%	RSD <sub>r</sub> %-Intra	R%	RSD <sub>r</sub> %-Intra
ethoxyquine	0,9919	16-750	5,0	16	5,8	110	4,53	79,3	3,5	90,8	3,4
atrazine	0,9965	3,3-500	1,0	3,3	9,8	79,9	8,4	88,6	5,9	100	4,8
chlorothalonil	0,9979	33-1000	10	33	15	59,1	11	60,9	9,1	78,3	8,1
chlorpyrifos-Methyl	0,9998	3,3-500	1,0	3,3	9,8	85,9	7,8	94,9	5,9	105	5,2
parathion-Methyl	0,9934	8,2-750	2,5	8,2	5,7	103	6,4	110	4,6	97,5	3,6
chlorpyrifos	0,9912	8,2-750	2,5	8,2	9,6	85,7	7,8	104	6,0	108	4,7
resmethrin	0,9911	16-750	5,0	16	6,4	99,6	4,8	109	5,9	111	3,4
lamda-cyhalothrin	0,9923	16-750	5,0	16	15	61,6	9,3	81,5	5,0	91,4	3,2
permethrin	0,9961	8,2-750	2,5	8,2	3,6	101	4,5	109	3,9	116	2,9

(a) LOD: Όριο ανίχνευσης

(b) LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης

(c) RSD<sub>R</sub>%-Inter: Αναπαραγωγιμότητα

(d) RSD<sub>r</sub>%-Intra: Επαναληψιμότητα





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

### ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΣΕ ΑΛΛΕΣ ΧΩΡΕΣ

#### Α. Επίπεδα συγκεντρώσεων των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην περιοχή μελέτης Αξιός- Λουδίας-Αλιάκμονας

##### 12.1 Εισαγωγή

Μετά την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση των μεθόδων για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων, ακολούθησε η εφαρμογή τους σε περιβαλλοντικά υποστρώματα. Η επιλογή των σημείων δειγματοληψίας, πραγματοποιήθηκε με σκοπό να καλύψει όλες τις πιθανές πηγές ρύπανσης των οικοσυστημάτων από τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις τόσο από την αγροτική δραστηριότητα όσο και από την εγκατάσταση μονάδων υδατοκαλλιέργειας.

Στην Ελλάδα, ως περιοχή μελέτης επιλέχθηκε η ευρύτερη περιοχή των ποταμών Αξιού, Λουδία και Αλιάκμονα. Συνολικά ορίστηκαν 15 σημεία δειγματοληψίας επί των ποταμών, από τις πηγές μέχρι και τις εκβολές στον Θερμαϊκό κόλπο. Κατά την περίοδο Ιανουάριος 2018 έως Σεπτέμβριος 2018 πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες και συλλέχθηκαν πάνω από 80 δείγματα μεταξύ των οποίων επιφανειακά ύδατα, ιζήματα, μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια-γοβιοί (*gobio-gobio*) και το υδρόβιο μακρόφυτο (*Lemna Minor*), όπου αυτό ήταν εφικτό.

Επίσης όσον αφορά τη ρύπανση από την υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα, εκτός από τις μονάδες που είναι εγκατεστημένες στον Θερμαϊκό κόλπο, συλλέχθηκαν δείγματα από τη Λωρίδα Σαγιάδας-Θεσπρωτία. Για τις υπόλοιπες χώρες, όπως η Αλβανία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Ηνωμένο Βασίλειο και Νορβηγία ορίστηκαν 33 σταθμοί δειγματοληψίας και συνολικά και συλλέχθηκαν 58 δείγματα (υδατικά, ιζήματα και αχινοί).

Επιπρόσθετα στη συνέχεια του κεφαλαίου, πραγματοποιείται εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου (Environmental Risk Assessment, ERA) χρησιμοποιώντας την μέθοδο του πηλίκου επικινδυνότητας (Risk Quotient, RQ).

## 12.2 Επίπεδα συγκεντρώσεων στα υδατικά δείγματα

Κατά τη διάρκεια της μελέτης παρακολούθησης (monitoring study), ανιχνεύθηκαν συνολικά 7 φυτοπροστατευτικές ενώσεις εκ των οποίων δύο ανήκουν στην κατηγορία των ζιζανιοκτόνων (atrazine, irgarol) και πέντε στην κατηγορία των εντομοκτόνων (parathion-methyl, chlorpyrifos, resmethrin, λ-cyhalothrin και permethrin).

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν ποικίλλουν, με μέγιστες συγκεντρώσεις για τις ενώσεις chlorpyrifos ( $472,4 \text{ ng L}^{-1}$ ), methyl-parathion ( $296 \text{ ng L}^{-1}$ ), atrazine ( $250 \text{ ng L}^{-1}$ ) και Irgarol ( $108,0 \text{ ng L}^{-1}$ ).

Οι ενώσεις ethoxyquine, chlorpyrifos-methyl και chlorothalonil, δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα υδατικό δείγμα πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης πιθανότατα λόγω περιορισμένης χρήσης τους στην περιοχή και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών ( $\text{Log } K_{ow}$ ).

**Πίνακας 12.1:** Συγκεντρώσεις (ng/ L) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά ύδατα στην περιοχή μελέτης Αξίος-Λουδίας-Αλιάκιμονας

Ένωση	SS1: Γέφυρα Κηπουρείου			SS2: Γέφυρα Καλονερίου			SS3: Φράγμα Πολυφύτου			SS4: Φράγμα Αγίας Βαρβάρας			SS5: Τάφρος 66 (Κουλούρα)		
	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18
Ethoxyquine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Atrazine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	18,9	<MDL
Chlorothalonil	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorpyrifos-Methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Parathion-methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	162,4	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorpyrifos	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	472,4	26,4
Irgarol	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	42,0	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	52,0	<MDL	<MDL
Resmethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	47,7
λ-cyhalothrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Permethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL

Ένωση	SS6: Γέφυρα Αλεξάνδρειας-Αιγυίου			SS7: Εκβολές Αλιάκιμονα			SS8: Τάφρος Ευγενίδη-Στεργίου			SS9: Εκβολές Λουδία			SS10: Αντλιοστάσιο Ν. Μαλαγάρων (Θεσ/κή)		
	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18
Ethoxyquine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Atrazine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	23,3	<MDL	<MDL	18,1	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorothalonil	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorpyrifos-Methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Parathion-methyl	54,6	176,0	58,1	<MDL	210,0	<MDL	<MDL	280,7	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	230,0	<MDL	<MDL
Chlorpyrifos	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	78,4	<MDL	<MDL
Irgarol	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	57,4	<MDL
Resmethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
λ-cyhalothrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Permethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	25,5	<MDL

**Πίνακας 12.1:** (συνέχεια) Συγκεντρώσεις (ng L<sup>-1</sup>) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά ύδατα στην περιοχή Αξίος-Λουδίας-Αλιτάκιμονας

Ένωση	SS11: Γέφυρα Λουδία (Κλειδί- N.Μαλαγάρων)			SS12: Τάφος Αχλαδιάς N. Μαλαγάρων			SS13: Γέφυρα Πλατέος-Αδενόρο			SS14: Εκβολές Αξίου			SS15: Γέφυρα Βαλιμάδας (Ανατολικό) Βραχιάς		
	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18
Ethoxyquine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Atrazine	250,0	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	8,2	<MDL	<MDL	12,6	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorothalonil	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorpyrifos-Methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Parathion-methyl	296,0	<MDL	<MDL	174,0	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	121,9	<MDL	76,3	<MDL	<MDL	<MDL	78,9
Chlorpyrifos	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	41,4	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Irgarol	<MDL	42,2	<MDL	<MDL	92,0	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	25,8	<MDL	53,3	<MDL	<MDL	<MDL
Resmethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	21,1	<MDL	<MDL
λ-cyhalothrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	41,1	<MDL
Permethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	42,4	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL

Στον Πίνακα 12.2 παρουσιάζεται ο τρόπος δράσης κάθε ένωσης, η ελάχιστη, η μέγιστη, η μέση τιμή των συγκεντρώσεων, το εκατοστιαίο ποσοστό των θετικών ανιχνεύσεων για κάθε δείγμα νερού (n=45) και το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου. Τα όρια ποσοτικοποίησης υπολογίστηκαν ως η μέση τιμή των εμβολιασμένων δειγμάτων ποτάμιων και θαλάσσιων νερών για κάθε ένωση.

**Πίνακας 12.2:** Εύρος συγκεντρώσεων (μέγιστη, ελάχιστη, μέση), θετικές ανιχνεύσεις (%), των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν στα επιφανειακά ύδατα

Ένωση	Επιφανειακά ύδατα (ng/L)						
	Δράση	Min <sup>a</sup>	Max	Mean <sup>b</sup>	Mean <sup>c</sup>	Συχνότητα ανίχνευσης (n=45)	LOQ (ng/L)
Ethoxyquine	M	*	*	*	*	0 % (0)	16
Atrazine	Z	8,2	250,0	10,8	54,4	20 % (9)	3,3
Chlorothalonil	M	*	*	*	*	0 % (0)	3,3
Chlorpyrifos-Methyl	E	*	*	*	*	0 % (0)	3,3
Parathion-Methyl	E	45,6	296,0	53,4	150,3	35,5 % (16)	36
Chlorpyrifos	E	26,4	472,4	22,1	166,3	15,5 % (7)	20
Irgarol	Z	25,8	108,0	13,4	55,1	24,4 % (11)	3,3
Rresmethrin	E	21,1	47,7	3,4	30,9	11,1 % (5)	8,0
λ-cyhalothrin	E	25,5	41,1	2,3	34,7	6,7 % (3)	24
Permethrin	E	42,4	42,4	0,9	42,4	2,2 % (1)	23

(όπου M: μυκητοκτόνο, Z: ζιζανιοκτόνο, E: εντομοκτόνο)

<sup>a</sup> Ελάχιστη συγκέντρωση

<sup>b</sup> Μέση συγκέντρωση (θεωρώντας τη μη ανίχνευση ως μηδέν) not detected as zero

<sup>c</sup> Μέση συγκέντρωση των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκαν φυτοφάρμακα

<sup>d</sup> Θετικές ανιχνεύσεις (%)

\* Δεν ανιχνεύθηκε

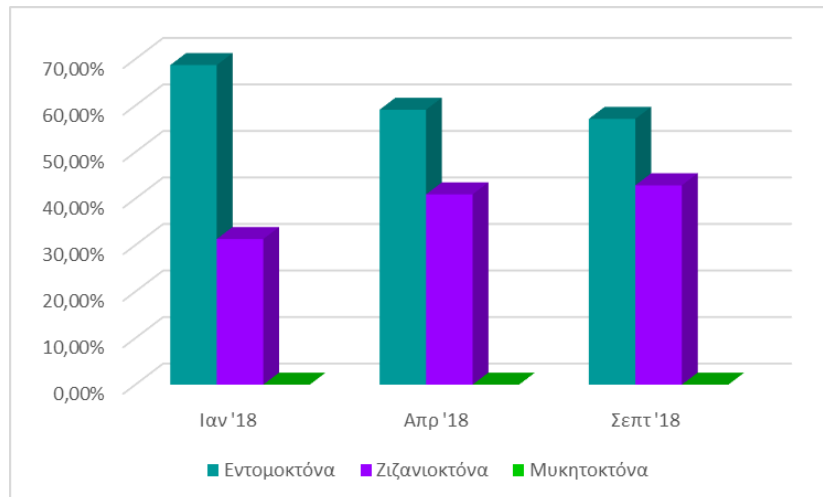
Σύμφωνα με τους παραπάνω πίνακες (Πίνακας 12.1 & 12.2), κατά την πρώτη περίοδο δειγματοληψίας Ιανουάριος 2018, συνολικά ανιχνεύθηκαν 6 ενώσεις από τις οποίες δύο δρουν ως ζιζανιοκτόνα (atrazine, irgarol) και 4 ως εντομοκτόνα (parathion-methyl, chlorpyrifos, resmethrin και permethrin). Το 68,7 % των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν ανήκουν στην κατηγορία των εντομοκτόνων και το 31,3 % στην κατηγορία των ζιζανιοκτόνων (Σχήμα 12.1).

Κατά τη δεύτερη περίοδο δειγματοληψίας Απρίλιος 2018, ανιχνεύθηκαν 6 ενώσεις (59,1 %) από τις οποίες δύο ανήκουν στην κατηγορία των ζιζανιοκτόνων (atrazine, irgarol) και οι υπόλοιπες ενώσεις στην κατηγορία των εντομοκτόνων (parathion-methyl, λ-cyhalothrin, chlorpyrifos και resmethrin).

Στην τελευταία περίοδο Σεπτέμβριος 2018 ανιχνεύθηκαν συνολικά 5 φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Ίδια τάση ανίχνευσης, συγκριτικά με τις δύο πρώτες περιόδους, παρατηρείται ως προς τα ζιζανιοκτόνα atrazine και irgarol σε ποσοστό που

ανέρχεται στο 42,8 %. Στην κατηγορία των εντομοκτόνων ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις parathion-methyl, chlorpyrifos και resmethrin σε ποσοστό 57,2 % (Σχήμα 12.1).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε καμία από τις τρεις δειγματοληψίες δεν ανιχνεύθηκε κάποια φυτοπροστατευτική ένωση με μυκητοκτόνο δράση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης.



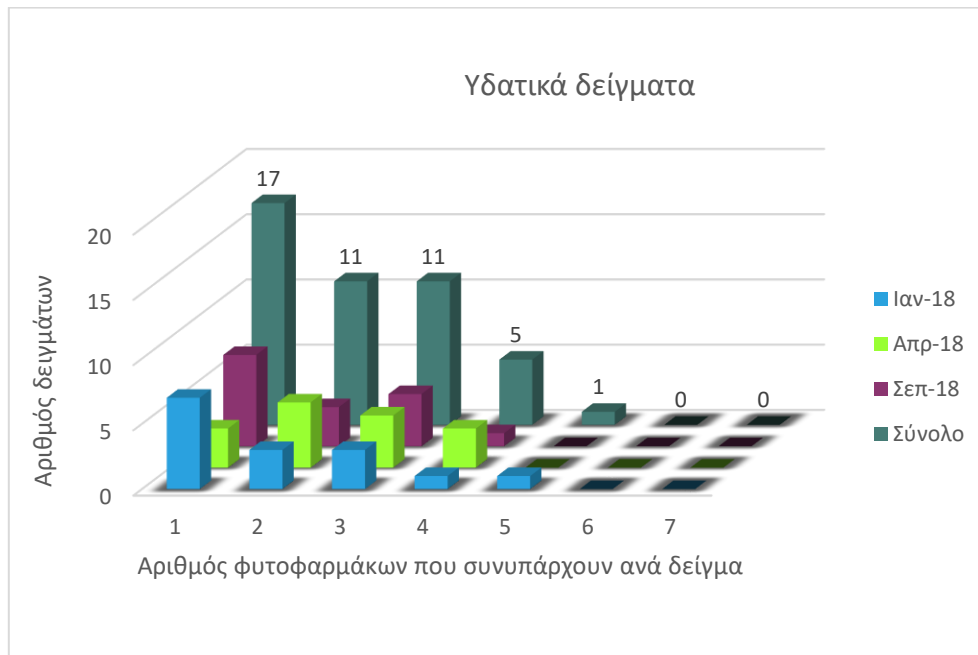
**Σχήμα 12.1:** Συχνότητα ανίχνευσης φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα επιφανειακά ύδατα ανά κατηγορία και ανά δειγματοληψία

Στο Σχήμα 12.2, αποτυπώνεται γραφικά η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ανά περίοδο δειγματοληψίας βάσει του αριθμού των φυτοφαρμάκων που περιέχουν. Έτσι κατά την πρώτη δειγματοληψία σε 7 δείγματα (46,6 %) δεν ανιχνεύθηκε καμία υπό μελέτη ένωση, σε 3 δείγματα (20 %) ανιχνεύθηκε μία ένωση, σε 3 δείγματα (20 %) ανιχνεύθηκαν δύο ενώσεις, σε ένα δείγμα (6,6 %) ανιχνεύθηκαν τρεις ενώσεις ενώ σε ένα μόνο δείγμα (6,6 %) ανιχνεύθηκαν 4 ενώσεις. Το τελευταίο αποτέλεσε και το δείγμα με τον μέγιστο αριθμό φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν σε όλες τις περιόδους δειγματοληψίας.

Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία τρία δείγματα (20 %) ήταν απαλλαγμένα από φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Το 33,3 % των δειγμάτων (5 δείγματα) περιείχαν μόνο μία ένωση, 4 δείγματα (26,6 %) περιείχαν δύο ενώσεις, ενώ σε 3 δείγματα συνυπήρχαν τρεις αναλύτες (20 %).

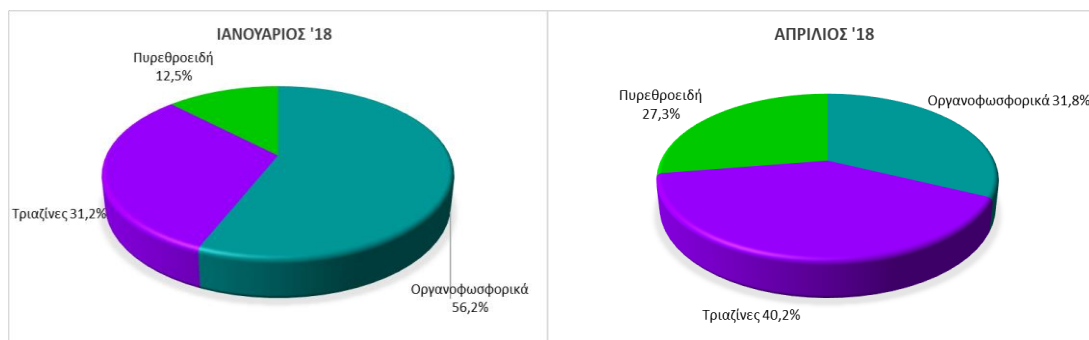
Στην τρίτη δειγματοληψία, στο 46,6 % των δειγμάτων (7 δείγματα) δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση, σε 3 δείγματα ανιχνεύθηκε μόνο μία ένωση (20 %), σε 4 δείγματα που αντιστοιχούν στο 26,6 % των συνολικών δειγμάτων ανιχνεύθηκαν δύο αναλύτες, ενώ σε ένα μόνο δείγμα (6,6 %) συνυπήρχαν 3 φυτοφάρμακα.

Από τη συγκεντρωτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων, παρατηρούμε ότι το 37,8 % των δειγμάτων (n=17) ήταν απαλλαγμένο από φυτοπροστατευτικές ενώσεις, το 24,4 % των δειγμάτων (n=11) περιείχαν μόλις έναν αναλύτη, το 24,4 % των δειγμάτων (n=11) περιείχαν δύο φυτοπροστατευτικές ενώσεις, το 11,1 % των δειγμάτων (n=5) περιείχαν τρεις αναλύτες, ενώ στο 2,2 % των δειγμάτων (n=1) συνυπήρχαν 4 αναλύτες.



**Σχήμα 12.2:** Κατηγοριοποίηση δειγμάτων ανά δειγματοληψία βάσει του αριθμού φυτοπροστατευτικών ενώσεων που περιέχουν

Στο Σχήμα 12.3 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η συνεισφορά κάθε κατηγορίας φυτοφαρμάκων ανά δειγματοληψία. Στην πρώτη και στην τρίτη δειγματοληψία, τα οργανοφωσφορικά αποτελούν την πιο συχνή κατηγορία, με ποσοστό 56,2 % και 50 % αντίστοιχα. Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία, το μεγαλύτερο ποσοστό των φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν ανήκουν στην κατηγορία των τριαζινών (40 %).





**Σχήμα 12.3:** Συνεισφορά κάθε κατηγορίας φυτοφάρμακων στο σύνολο των θετικών ανιχνεύσεων για τις τρεις δειγματοληψίες

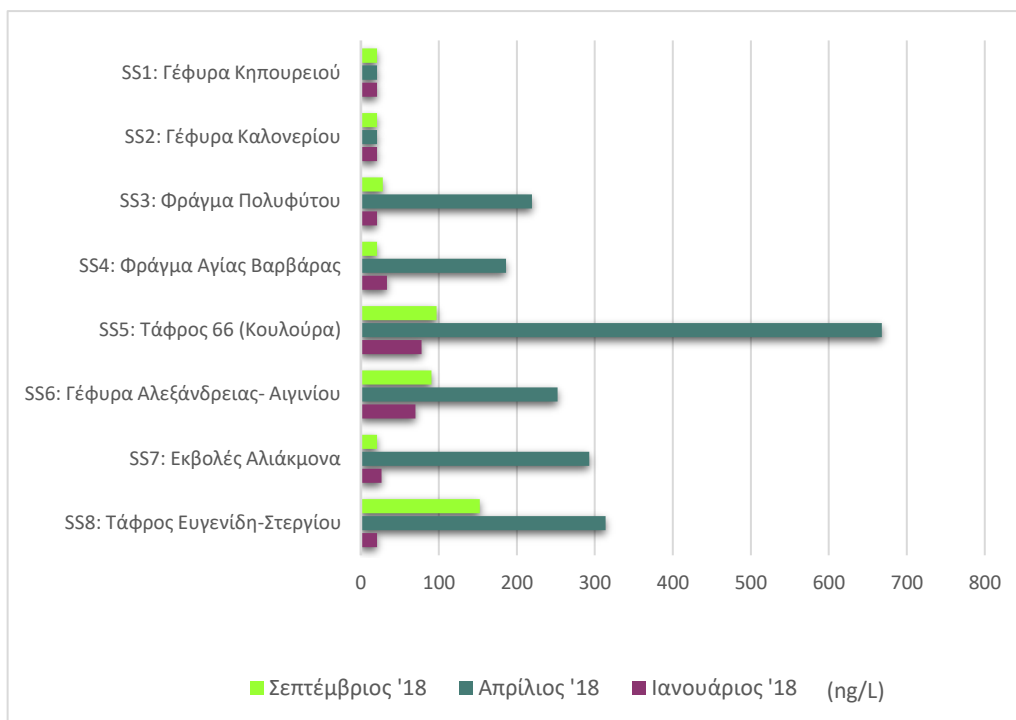
### 12.3 Εναρμόνιση με τα Περιβαλλοντικά Πρότυπα Ποιότητας

Σύμφωνα με την Οδηγία 2000/60/ΕΚ (98/83/ΕΚ) για το πόσιμο νερό, ως μέγιστη συγκέντρωση για κάθε μεμονωμένο φυτοφάρμακο ορίζονται τα 0,10 µg/L ενώ για το άθροισμα των ανιχνευθέντων φυτοφαρμάκων τα 0,50 µg/L (European Commission, 1998).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα 12.1 για τον ποταμό Αλιάκμονα (SS:1-SS:8), το 75 % των δειγμάτων (n=18) συμμορφώνονται με τα πρότυπα ποιότητας για το πόσιμο νερό “*Drinking Water Quality Standard- DWQs*” καθώς η μέγιστη συγκέντρωση για κάθε φυτοφάρμακο είναι μικρότερη από 0,1 µg/L.

Το άθροισμα των φυτοφαρμάκων ανά σημείο δειγματοληψίας για τον ποταμό Αλιάκμονα (SS:1-SS:8), παρουσιάζονται στο Σχήμα 12.4. Βάσει των αποτελεσμάτων, το 95,8 % των δειγμάτων (n=24) συμμορφώνονται με τις απαιτήσεις του προτύπου. Εξαιρέση αποτελεί σημείο δειγματοληψίας SS5: Τάφρος 66 (Κουλούρα) για τον μήνα Απρίλιο, καθώς παρουσίασε συγκέντρωση υψηλότερη από το DWQS (0,5 µg L<sup>-1</sup>) με συνολική τιμή 0,66 µg/L.





**Σχήμα 12.4:** Άθροισμα συγκεντρώσεων φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν ανά σημείο δειγματοληψίας και ανά μήνα δειγματοληψίας

Η οδηγία 2013/39/ΕΕ που αποτελεί τροποποίηση της 2008/105/ΕΚ σχετικά με τα πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος (ΠΠΠ) (Environmental Quality Standard- EQs) στον τομέα των επιφανειακών, παράκτιων και μεταβατικών υδάτων θεσπίζει ανώτατα επιτρεπτά όρια συγκεντρώσεων για 45 ουσίες προτεραιότητας και ρύπους (Παράρτημα-Πίνακας 1). Για την ένωση atrazine, η ανώτατη ετήσια μέση τιμή μετρούμενων συγκεντρώσεων (ΕΜΣ) είναι 0,6 μg/L και η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση (ΜΕΣ) 2 μg/L. Για την ένωση chlorpyrifos η ΕΜΣ είναι 0,03 μg/L και η ΜΕΣ 0,1 μg/L (European Commission, 2008a και European Commission, 2013).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ένωση atrazine βρίσκεται εντός αποδεκτών ορίων συγκέντρωσης σε όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας κατά μήκος των ποταμών Αλιάκμονα, Λουδία και Αξιού. Αντίθετα το chlorpyrifos παρουσίασε στις εκβολές Λουδία (SS:9), υψηλότερη τιμή από τα ανώτατα επιτρεπτά όρια για ΜΕΣ με τιμή 0,234 μg/L και στον Αλιάκμονα στο σημείο δειγματοληψίας Φράγμα Αγίας Βαρβάρας(SS:4) και Τάφος 66 (Κουλούρα- SS:5) με ΜΕΣ 147,2 μg/L και 472,4 μg/L αντίστοιχα (EQs=0,1 μg/L) (Πίνακας 12.1).

Σε εθνικό επίπεδο, η εναρμόνιση με την Οδηγία 2008/105/ΕΚ πραγματοποιείται με την κοινή υπουργική απόφαση ΚΥΑ 20488/19 (ΦΕΚ 749Β) για τη λεκάνη του Ασωπού ποταμού

και ορίζει τα ΠΠΠ υδάτων ώστε η χρήση να είναι κατάλληλη για κάθε χρήση πλην της παραγωγής νερού για πόση και κολύμβηση (Κ.Υ.Α. 2048/19/5/2010).

Σύμφωνα με την ΚΥΑ, τα σημεία δειγματοληψίας που υπερβαίνουν τη μέση ετήσια συγκέντρωση για την ένωση parathion-methyl (0,01 μg/L) είναι το σημείο δειγματοληψίας SS:9 Εκβολές Λουδία με ΕΜΣ 0,09 μg/L, το SS:10 Αντλιοστάσιο Ν. Μαλγάρων με ετήσια μέση συγκέντρωση 0,07 μg/L, το SS:11 Γέφυρα Λουδία (κλειδί-Ν. Μαλγάρων) με συγκέντρωση 0,09 μg/L, το SS:12 Τάφρος Αχλαδιάς- Ν. Μαλγάρων με συγκέντρωση 0,05 μg/L, το σημείο δειγματοληψίας SS:13 Γέφυρα Πλατέος-Άδενδρο με ΕΜΣ 0,04 μg/L και τέλος τα σημεία SS:14 Εκβολές Αξιού και SS:15 Γέφυρα Βαλμάδας-Βραχιάς με ΕΜΣ 0,02 μg/L αντίστοιχα. Η ΚΥΑ 2048/19/5/2010 δεν ορίζει μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση για την ένωση Parathion-Methyl.

#### 12.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, παρατηρείται μία εποχιακή διακύμανση με υψηλότερες συγκεντρώσεις τον Απρίλιο 2018 συγκριτικά με τον Ιανουάριο και τον Σεπτέμβριο του ίδιου έτους.

Οι θετικές ανιχνεύσεις κατά την πρώτη δειγματοληψία (Ιανουάριος 2018), πιθανότατα οφείλονται στα υψηλά επίπεδα βροχοπτώσεων και στα πλημμυρικά φαινόμενα στις γύρω καλλιεργήσιμες περιοχές που οδήγησαν σε επιφανειακές απορροές από παλαιότερες χρήσεις (Konstatninou et al., 2004a).

Η περίοδος εφαρμογής των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην περιοχή αρχίζει τέλος άνοιξης (μέσα Μαρτίου) και ολοκληρώνεται αρχές καλοκαιριού (αρχές Ιουλίου) γεγονός που δικαιολογεί τις υψηλές συγκεντρώσεις (μέση τιμή ανά δειγματοληψία) για τις ενώσεις parathion-methyl, chlorpyrifos και λ-cyhalothrin (Kalogridi et al., 2014.; Lambropoulou et al., 2015 και Stamatis et al., 2013).

Η μέση μέγιστη τιμή των συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν για τις ενώσεις parathion-methyl ( $121,9 \text{ ng L}^{-1}$ ) και atrazine ( $89,1 \text{ ng L}^{-1}$ ) κατά την τρίτη δειγματοληψία (Σεπτέμβριος '18), σχετίζονται με τις πρώτες βροχοπτώσεις μετά το ξηρό καλοκαίρι (Lambropoulou et al., 2015).

Ο Λουδίας αποτελεί αποδέκτη του μεγαλύτερου μέρους των αποστραγγιστικών υδάτων του δυτικού τμήματος της λεκάνης απορροής του Αξιού, επομένως είναι αναμενόμενες οι θετικές ανιχνεύσεις στους σταθμούς δειγματοληψίας SS:9-SS:13 (Papadakis et al., 2015b).

Ο Αλιάκμονας, ρέει κυρίως μέσω μία ορεινής περιοχής όπου η καλλιέργεια δεν είναι εντατική, όμως το τελευταίο τμήμα του ποταμού, ρέει μέσω του νομού Ημαθίας όπου υπάρχει μεγάλη παραγωγή ροδάκινων, μήλων και άλλων (Paradakis et al., 2015b). Το ευρύ φάσμα φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν στην περιοχή, μπορεί να αποδοθεί στις εκτεταμένες καλλιέργειες της γύρω περιοχής (βαμβάκι, καλαμπόκι, ρύζι, ζαχαρότευτλα, τριφύλλι) (Lambropoulou et al., 2015 και Paradakis et al., 2015a).

Το σημείο δειγματοληψίας SS:15 Τάφρος 66 (Κουλούρα), αποτελεί ενδιάμεσο αποδέκτη αστικών λυμάτων των πόλεων Βέροιας και Νάουσας, καθώς και των ακατέργαστων λυμάτων από μονάδες επεξεργασίας τροφίμων της περιοχής (Europe.eu). Στην περιοχή υπάρχει έντονη καλλιεργητική δραστηριότητα γεγονός που δικαιολογεί το υψηλό ρυπαντικό φορτίο και τις υψηλές συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν.

Η ένωση chlorpyrifos χρησιμοποιείται, για τον έλεγχο εντόμων και στις καλλιέργειες φρούτων και βαμβακιού. Σύμφωνα με τον EPA (Environmental Protection Agency) είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα με γενικευμένη χρήση που αντικατέστησε απαγορευμένες ενώσεις στην ΕΕ (Παράγραφος 6.2) (European Commission, 2009 και Masiá et al., 2015). Στην παρούσα μελέτη, ανιχνεύθηκε σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις και τα ευρήματα συνάδουν με βιβλιογραφικά δεδομένα σε εθνικό και παγκόσμιο επίπεδο. Συγκεκριμένα, υψηλές συγκεντρώσεις για την ένωση chlorpyrifos αναφέρονται στον ποταμό Αχελώο ( $101,2 \text{ ng L}^{-1}$ ), στη λίμνη Βιστωνίδα ( $112 \text{ ng L}^{-1}$ ) αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο σε ποταμούς της Αργεντινής ( $10,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), στο Bangladesh ( $9,27 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Bonansea et al., 2013; Paradakis et al., 2015b; Hossain et al., 2015 και Stamatis et al., 2013). Σύμφωνα με την έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού υγείας, σχετικά με το chlorpyrifos, αναφέρονται συγκεντρώσεις στα επιφανειακά ύδατα της τάξης  $0,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (WHO, 2004).

Την κατηγορία των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων συμπληρώνει το parathion-methyl. Πρόκειται για μία από τις πιο μελετημένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, και η χρήση της έχει απαγορευτεί στην ΕΕ σύμφωνα με την κοινοτική οδηγία 2003/166/ΕΚ (European Commission, 2003). Ωστόσο εξακολουθεί να ανιχνεύεται στο περιβάλλον είτε λόγω παράνομης χρήσης, είτε λόγω έκλυσης των εδαφών στα οποία έγινε εκτεταμένη χρήση τα προηγούμενα χρόνια.

Σε παλαιότερες μελέτες που έχουν λάβει χώρα στον Αξιό έχουν καταγραφεί συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ  $14$  και  $362 \text{ ng L}^{-1}$ , ενώ στον Αλιάκμονα  $30$  και  $210 \text{ ng L}^{-1}$  (Albanis et al., 1995; Albanis et al., 2009 και Lambropoulou et al., 2015). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, υψηλές συγκεντρώσεις της ένωσης αυτής ανιχνεύονται συστηματικά σε αρκετά ποτάμια και λίμνες της χώρας. Πιο συγκεκριμένα στη λίμνη

Βιστωνίδα ( $66,2 \text{ ng L}^{-1}$ ), στον Έβρο ( $120 \text{ ng L}^{-1}$ ), στον Καλαμά ( $250 \text{ ng L}^{-1}$ ) και στον Αχελώο ( $66,2 \text{ ng L}^{-1}$ ) (Lambropoulou et al., 2015 και Stamatis et al., 2013).

Οι ενώσεις atrazine και irgarol, ήταν τα προηγούμενα χρόνια, ανάμεσα στα ευρέως χρησιμοποιούμενα ζιζανιοκτόνα, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στη μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στα επιφανειακά ύδατα (Voulvoulis, 2006). Η ανίχνευσή τους στην περιοχή μελέτης σχετίζονται με παράνομη χρήση στην καλλιέργεια ρυζιού ως εκπρόσωποι των τριαζινών (Mou et al., 2011). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους τα καθιστούν ύποπτα για επιφανειακή απορροή και έκπλυση ειδικά την περίοδο έντονων βροχοπτώσεων (Kalogridi et al., 2014 και Stamatis et al., 2013).

Το Irgarol χρησιμοποιείται ως βιοκτόνο στα υφαλοχρώματα προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι επικαθίσεις στα σκάφη και στα μέρη των εγκαταστάσεων που έρχονται σε επαφή με το νερό (Konstantinou and Albanis, 2004a). Όπως είναι αναμενόμενο, ανιχνεύθηκε στα σημεία δειγματοληψίας στον Θερμαϊκό κόλπο, ειδικά σε περιόδους με έντονη κινητικότητα σκαφών. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις που ανιχνεύονται τον Ιανουάριο, σχετίζονται με την συντήρηση των σκαφών και την εφαρμογή των βιοκτόνων στα πλοία (Konstantinou and Albanis, 2004a).

Το ζιζανιοκτόνο atrazine, έχει απαγορευτεί από το 2004 στην ΕΕ, όμως τα στοιχεία της διεθνούς βιβλιογραφίας αποδεικνύουν την εκτεταμένη γεωργική του χρήση (Herrero-Hernández et al., 2017 και Kalogridi et al., 2014). Αποτελεί ένα ευρείας χρήσης ισχυρό ζιζανιοκτόνο. Τα τελευταία τριάντα χρόνια έχουν καταγραφεί αυξημένες συγκεντρώσεις του atrazine, στην υπό μελέτη περιοχή και στην ευρύτερη περιοχή της βόρειας Ελλάδας, της τάξης  $0,2-2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , ενώ στην περιοχή της Θεσσαλίας έχουν αναφερθεί συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ  $2$  και  $5,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Lambropoulou et al., 2015 και Tsaboula et al., 2016).

Σε μελέτη ανασκόπησης για τα έτη 1985-2005 από τους Lambropoulou et al., σε όλα τα κύρια ποτάμια της χώρας (Έβρος, Άρδρας, Άραχθος, Ευρώτας, Αχελώος, Λούρος και Καλαμάς) ανιχνεύθηκε η ένωση atrazine σε συγκεντρώσεις μεταξύ των τιμών 500 και 5000  $\text{ng L}^{-1}$  (Lambropoulou et al., 2015; Papadakis et al., 2015a και Stamatis et al., 2013).

Τα πυρεθροειδή (resmethrin, permethrin και λ-cyhalothrin) ανιχνεύθηκαν κυρίως τον Απρίλιο (2<sup>η</sup> δειγματοληψία). Μεμονωμένες ανιχνεύσεις παρατηρήθηκαν στην αρχή της 3<sup>ης</sup> δειγματοληψίας (Σεπτέμβριος 18), μετά την ξηρή περίοδο του Καλοκαιριού, που σύμφωνα με τους Bonasea et al., σχετίζονται με την επιφανειακή έκπλυση του εδάφους κατά τις πρώτες βροχοπτώσεις (Bonasea et al., 2013).

Η παρουσία των ενώσεων αυτών στην περιοχή, είναι εύλογη αναλογίζοντας τη συστηματική εφαρμογή τους στην περιοχή σε καλλιέργειες βαμβακιού, καλαμποκιού,

ρυζιού, φρούτων κ.α τις τελευταίες δεκαετίες. Μελέτες αναφέρουν την παρουσία του permethrin ( $5,9 \text{ ng L}^{-1}$ ) στον Αξιό, του λ-cyhalothrin στη λίμνη Βιστωνίδα, ενώ έχουν καταγραφεί υψηλές συγκεντρώσεις ( $346 \text{ ng L}^{-1}$ ) τόσο σε ποτάμια της Ελλάδας, όσο και στις Ηνωμένες Πολιτείες ( $797 \text{ ng L}^{-1}$ ) (Lambropoulou et al., 2015; Papadakis et al., 2015a και Vieira and dos Reis Martinez, 2018).

### 12.5 Επίπεδα συγκεντρώσεων στα ιζήματα

Κατά τη διάρκεια της μελέτης παρακολούθησης (monitoring study) για το υπόστρωμα των ιζημάτων, ανιχνεύθηκαν συνολικά επτά φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Τα εντομοκτόνα parathion-methyl, permethrin, chlorpyrifos και λ-cyhalothrin, τα ζιζανιοκτόνα atrazine και irgarol και το μυκητοκτόνο chlorothalonil. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν κυμαίνονται από  $12,3 \text{ ng g}^{-1}$  για το atrazine έως  $78,2 \text{ ng g}^{-1}$  για το permethrin (Πίνακας 12.3).

Από τις υπό μελέτη ενώσεις τρεις δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα σημείο δειγματοληψίας κυρίως λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών ( $\text{Log } K_{ow}$ ,  $K_{oc}$ ), του χρόνου ημίσειας ζωής και της μη εκτεταμένης χρήσης τους στην περιοχή.

**Πίνακας 12.3:** Συγκεντρώσεις (ng g<sup>-1</sup>) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα τζήματα στην περιοχή μελέτης Αξιός-Λουδίας-Αλιάκμονας

Ένωση	SS1: Γέφυρα Κηπουρείου				SS2: Γέφυρα Καλονερίου				SS5: Τάφρος 66 (Κουλούρα)				SS7: Εκβολές Αλιάκμονα				SS8: Τάφρος Ευγενίδη-Στεργίου			
	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	
Ethoxyquine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Atrazine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Chlorothalonil	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	29,5	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Chlorpyrifos-Methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Parathion-methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	74,4	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Chlorpyrifos	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	48,3	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Irgarol	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Resmethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
λ-cyhalothrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Permethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	78,2	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	

Ένωση	SS9: Εκβολές Λουδία (Κλειδί- Ν.Μαλαγάρων)				SS11: Γέφυρα Λουδία (Κλειδί- Ν.Μαλαγάρων)				SS13: Γέφυρα Πλατείας Αδενόρο				SS14: Εκβολές Αξίου				SS15: Γέφυρα Βαλιμάδας(Ανατολικό)-Βραχιάς			
	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	
Ethoxyquine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Atrazine	<MDL	<MDL	<MDL	28,6	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	12,3	
Chlorothalonil	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Chlorpyrifos-Methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Parathion-methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Chlorpyrifos	<MDL	<MDL	<MDL	51,2	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Irgarol	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	26,6	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Resmethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
λ-cyhalothrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	
Permethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	60,3	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	

Στον Πίνακα 12.4 παρουσιάζεται ο τρόπος δράσης κάθε ένωσης, η ελάχιστη, μέγιστη, η μέση τιμή των συγκεντρώσεων, το ποσοστό των θετικών ανιχνεύσεων για κάθε δείγμα ιζήματος (n=30) και το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

**Πίνακας 12.4:** Εύρος συγκεντρώσεων (μέγιστη, ελάχιστη, μέση), θετικές ανιχνεύσεις (%), των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν στα ιζήματα

Ένωση	Δράση	Ιζήματα (ng/g)				Συχνότητα ανίχνευσης <sup>d</sup> (n=30)	LOQ (ng/g)
		Min <sup>a</sup>	Max	Mean <sup>b</sup>	Mean <sup>c</sup>		
Ethoxyquine	M	*	*	*	*	0% (0)	29,7
Atrazine	Z	12,3	28,6	1,3	20,4	6,7% (2)	3,3
Chlorothalonil	M	29,5	29,5	0,98	29,5	3,3% (1)	16,5
Chlorpyrifos-methyl	E	*	*	*	*	0% (0)	9,9
Parathion- methyl	E	62,4	74,4	4,5	68,4	6,7% (2)	16,5
Chlorpyrifos	E	48,3	69,2	5,6	56,2	10% (3)	6,6
Irgarol	Z	26,6	26,6	0,8	26,6	3,3% (1)	3,3
Resmethrin	E	*	*	*	*	0% (0)	6,6
λ-cyhalothrin	E	57,7	60,3	8,6	129,1	6,7% (2)	6,6
Permethrin	E	78,2	78,2	3,9	59	3,3% (1)	16,5

(όπου M: μυκητοκτόνο, Z: ζιζανιοκτόνο, E: εντομοκτόνο)

<sup>a</sup> Ελάχιστη συγκέντρωση

<sup>b</sup> Μέση συγκέντρωση (θεωρώντας τη μη ανίχνευση ως μηδέν) not detected as zero

<sup>c</sup> Μέση συγκέντρωση των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκαν φυτοφάρμακα

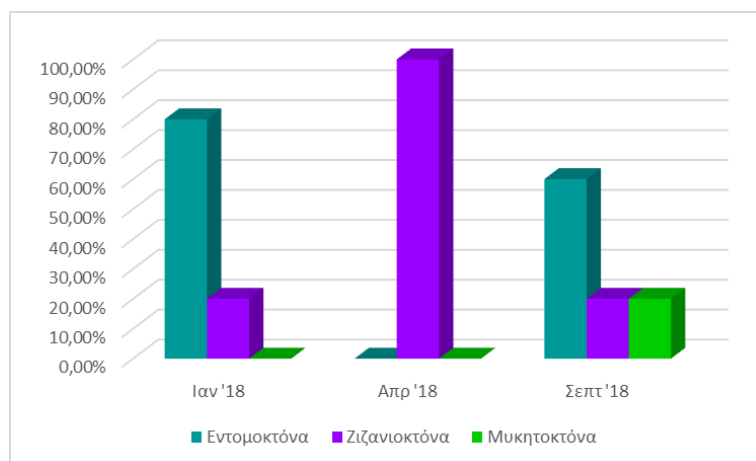
<sup>d</sup> Θετικές ανιχνεύσεις (%)

\* Δεν ανιχνεύθηκε

Σύμφωνα με τους Πίνακες 12.3 & 12.4, κατά την πρώτη περίοδο δειγματοληψίας Ιανουάριος 2018, στο 70,0 % των δειγμάτων δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση. Συνολικά ανιχνεύθηκαν τρεις ενώσεις από τις οποίες δύο δρουν ως εντομοκτόνα (parathion-methyl και chlorpyrifos) και μία ως ζιζανιοκτόνο (atrazine). Το 80 % των θετικών ανιχνεύσεων ανήκει στην κατηγορία των εντομοκτόνων, ποσοστό που ήταν το μεγαλύτερο ανάμεσα στις τρεις δειγματοληψίες για αυτήν την κατηγορία (Σχήμα 12.5).

Κατά τη δεύτερη περίοδο δειγματοληψίας Απρίλιος 2018, στο σύνολο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν, ανιχνεύθηκε μόνο το βιοκτόνο-ζιζανιοκτόνο irgarol.

Στην τελευταία περίοδο Σεπτέμβριος 2018 ανιχνεύθηκαν 4 φυτοπροστατευτικές ενώσεις, ένα ζιζανιοκτόνο (atrazine), δύο εντομοκτόνα (chlorpyrifos και λ-cyhalothrin) και ένα μυκητοκτόνο (chlorothalonil). Το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών ανιχνεύσεων αφορά ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των εντομοκτόνων (60 %), ενώ το chlorothalonil καταλαμβάνει μόλις στο 20 %.



**Σχήμα 12.5:** Συχνότητα ανίχνευσης φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα ιζήματα ανά κατηγορία και ανά δειγματοληψία

Πιο αναλυτικά, στο Σχήμα 12.6, αποτυπώνεται γραφικά η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων ανά περίοδο δειγματοληψίας βάσει του αριθμού των φυτοφαρμάκων που περιέχουν. Κατά την πρώτη δειγματοληψία το 70 % των δειγμάτων (n=7) ήταν απαλλαγμένο από φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Ο μέγιστος αριθμός ενώσεων που συνυπήρχαν σε ένα δείγμα ήταν τρεις και αποτέλεσε μόλις το 10 % των συνολικών δειγμάτων την δειγματοληψίας.

Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία, εννέα δείγματα ήταν απαλλαγμένα από φυτοφάρμακα, ποσοστό που ανέρχεται στο 90% του συνόλου. Μόνο σε ένα δείγμα ανιχνεύθηκε η ένωση irgarol.

Στην τρίτη δειγματοληψία, το 50 % των δειγμάτων (5 δείγματα) ήταν απαλλαγμένα από φυτοπροστατευτικές ενώσεις ενώ στα υπόλοιπα 5 δείγματα ανιχνεύθηκε μόνο μία ένωση ανά δείγμα.

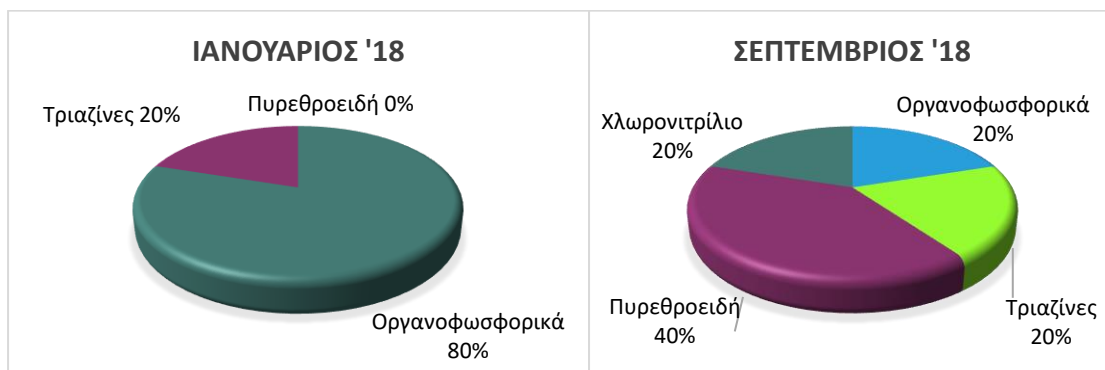
Από τη συγκεντρωτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων, παρατηρούμε ότι το 70 % των δειγμάτων ήταν απαλλαγμένα από φυτοπροστατευτικές ενώσεις, το 23,3 % των δειγμάτων (n=7) περιείχαν μία ένωση, το 3,3% (n=1) περιείχε δύο φυτοπροστατευτικές ενώσεις, το 3,3% (n=1) περιείχε τρία φυτοφάρμακα, ενώ σε κανένα δείγμα δεν συνυπάρχουν παραπάνω από τρεις ενώσεις.





**Σχήμα 12.6:** Κατηγοριοποίηση δειγμάτων ανά δειγματοληψία βάσει του αριθμού φυτοφαρμάκων που περιέχουν

Στο Σχήμα 12.7 που ακολουθεί, παρουσιάζεται η συνεισφορά κάθε κατηγορίας φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν στο υπόστρωμα των ιζημάτων ανά περίοδο δειγματοληψίας. Στην πρώτη δειγματοληψία, το 80 % των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών. Κατά τη δεύτερη δειγματοληψία, ανιχνεύθηκε μόνο η τριαζίνη irgarol σε ένα σημείο δειγματοληψίας. Τέλος, στην τρίτη δειγματοληψία, το μεγαλύτερο ποσοστό των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν ανήκουν στην κατηγορία των πυρεθροειδών (40 %), ενώ οι τριαζίνες, τα χλωρονιτρίλια και τα οργανοφωσφορικά, μοιράζονται ισόποσα το υπόλοιπο ποσοστό (60 %).



**Σχήμα 12.7:** Συνεισφορά κάθε κατηγορίας φυτοφάρμακων στο σύνολο των θετικών ανιχνεύσεων για τις τρεις δειγματοληψίες

## 12.6 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα (λ-cyhalothrin και permethrin), λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους (Log K<sub>ow</sub> 7 και 6,5 αντίστοιχα) έχουν την τάση να προσροφώνται στην επιφάνεια των ιζημάτων. Παρουσιάζουν μικρή διαλυτότητα στο νερό με τιμές 0,005 και 0,2 mg L<sup>-1</sup> και υψηλές τιμές K<sub>oc</sub> (K<sub>oc</sub>>4000) (Vieira and dos Reis Martinez, 2018 και Woudneh and Oros, 2006). Σε μελέτη των Woudneh et al., αναφέρονται υψηλές συγκεντρώσεις για τις ενώσεις λ-cyhalothrin (1,71 ng g<sup>-1</sup>) και permethrin (9,12 ng g<sup>-1</sup>) (Woudneh and Oros, 2006). Σε πρόσφατη εργασία στην Βραζιλία, το εύρος συγκεντρώσεων για την ένωση λ-cyhalothrin κυμαίνεται μεταξύ 19,7 και 60,0 ng g<sup>-1</sup> (Vieira and dos Reis Martinez, 2018).

Το chlorothalonil χρησιμοποιείται στην περιοχή μελέτης για τον έλεγχο μυκητιάσεων στις γεωργικές καλλιέργειες και ως βιοκτόνο σε υφαλοχρώματα όμοια με το igrarol (Konstantinou and Albanis, 2004a). Παρόλα αυτά, δεν ανιχνεύθηκε στα υδατικά δείγματα πιθανότατα λόγω μη εκτεταμένης χρήσης και μικρής διαλυτότητας στο νερό (0,81 mg/L). Η ανίχνευσή του στα ιζήματα στις αρχές του Σεπτεμβρίου, σχετίζεται με την βιοκτόνο δράση του και όχι με την χρήση του στη γεωργία, καθώς εφαρμόζεται στους αργούς στην αρχή της άνοιξης (Konstantinou and Albanis, 2004a). Παλαιότερες μελέτες, αναφέρουν συγκέντρωση chlorothalonil σε μαρίνα στην Θεσσαλονίκη εντός εύρους 20 και 165 ng g<sup>-1</sup> και στην Ελευσίνα εντός 10 και 126 ng g<sup>-1</sup> (Albanis et al., 2002 και Konstantinou and Albanis, 2004a). Στην Αγγλία έχουν καταγραφεί υψηλές συγκεντρώσεις σε δείγματα ιζήματος για την εν λόγω ένωση (34,3 ng g<sup>-1</sup>) (Albanis et al., 2002).

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα chlorpyrifos και parathion-methyl είναι τα ευρύτερα και συχνότερα χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα στη γεωργία παγκοσμίως, και τα πιο κοινά εντομοκτόνα οικιακής χρήσης (WHO, 2009). Τα δεδομένα αυτά θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν τις θετικές ανιχνεύσεις στα σημεία δειγματοληψίας, που βρίσκονται πιο κοντά σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις και σε αστικά κέντρα.

Το chlorpyrifos παρουσιάζει σχετικά μικρή διαλυτότητα στο νερό, είναι υδρόφοβη ένωση (Log K<sub>ow</sub> 4.96) και τείνει να προσροφάται στο ίζημα (Ccanccapa et al., 2016). Υψηλές συγκεντρώσεις αναφέρονται στην Ισπανία από τους González et al., για το chlorpyrifos (102,8 ng g<sup>-1</sup>) και το parathion-methyl (79,6 ng g<sup>-1</sup>) και από τους Ccanccapa et al., για την ένωση chlorpyrifos (36,2 ng g<sup>-1</sup>) (Ccanccapa et al., 2016 και Moreno-González and León, 2017). Οι Masia et al, αναφέρουν συγκέντρωση 130,9 ng g<sup>-1</sup> για την ένωση chlorpyrifos σε δείγματα ιζήματος από τον ποταμό Llobregat (Ισπανία) για το έτος 2015 (Masiá et al., 2015a). Εκτός Ευρώπης, το chlorpyrifos ανιχνεύτηκε στην Κίνα, συγκεκριμένα στο Πεκίνο, σε συγκεντρώσεις από 0,072–0,237 ng g<sup>-1</sup> (Xue et al., 2008).

Αναφορικά με τις τριαζίνες, το atrazine είναι ένα ζιζανιοκτόνο με σχετικά υψηλή διαλυτότητα στο νερό ( $35 \text{ mg L}^{-1}$ ) σε σχέση με τις υπόλοιπες υπό μελέτη ενώσεις. Έχει χρόνο ημίσειας ζωής μεγαλύτερο από 200 ημέρες. Αν και έχει μελετηθεί επαρκώς σε υδατικά δείγματα, πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν την παρουσία του και στο ίζημα σε περιοχές όπως το Τέξας, ο Καναδάς, το Μεξικό, η Αγγλία, η Ιταλία και η Κίνα ( $0,09\text{-}0,67 \text{ ng g}^{-1}$ ) (Guo et al., 2016).

Το βιοκτόνο irgarol χρησιμοποιείται στα υφαλοχρώματα, για την καταπολέμηση επικαθίσεων των θαλάσσιων οργανισμών στις επιφάνειες των θαλάσσιων εγκαταστάσεων και πλοίων. Επομένως είναι αναμενόμενη η ανίχνευση του στις παράκτιες περιοχές, σε αλιευτική λιμάνια με και σε μαρίνες (Sakkas et al., 2002). Έχει διαλυτότητα στο νερό  $7 \text{ mg/L}$ , υποδηλώνοντας μεγαλύτερη συγγένεια με το ίζημα σε σχέση με το atrazine. Αποτελεί την πιο υδρόφοβη ένωση της ομάδας των τριαζινών ( $\text{Log } K_{ow} 3,95$ ) και ο χρόνος ημίσειας ζωής ανέρχεται σε 100-200 ημέρες (Konstantinou and Albanis, 2004).

Αποτελεί το πιο συχνά ανιχνεύσιμο βιοκτόνο σε σχέση με τα άλλα υφαλοχρώματα (Konstantinou and Albanis, 2004). Έρευνες, αναφέρουν υψηλές συγκεντρώσεις στη Θεσσαλονίκη  $75\text{-}350 \text{ ng g}^{-1}$ , στην Ελευσίνα  $86\text{-}690 \text{ ng g}^{-1}$ , στην Αγγλία  $2\text{-}71 \text{ ng g}^{-1}$  και στην Αυστραλία  $118 \text{ ng g}^{-1}$  (Albanis et al., 2002; Konstantinou and Albanis, 2004 και Nyström et al., 2002).

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα, παρατηρούνται σαφώς λιγότερες θετικές ανιχνεύσεις στο υπόστρωμα των ιζημάτων συγκριτικά με τα υδατικά δείγματα. Αυτό αφενός σχετίζεται με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη ενώσεων και αφετέρου με την υφή του εδάφους (περιεχόμενα ποσοστά άμμου, ιλύος και αργίλου) όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.4 (Palma et al., 2014).

Το γεγονός ότι τα επίπεδα συγκεντρώσεων των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν είναι μεγαλύτερα κατά μία τάξη μεγέθους στα ιζήματα ( $\text{ng/g}$ ) έναντι εκείνων στα νερά ( $\text{ng/L}$ ), εξηγεί την συνεχή παρουσία τους στο περιβάλλον, ενώσεων η χρήση των οποίων έχει απαγορευτεί.

### 12.7 Επίπεδα συγκεντρώσεων στους θαλάσσιους και φυτικούς οργανισμούς

Όσον αφορά τα δείγματα των θαλάσσιων οργανισμών, συλλέχθηκαν τρία δείγματα μυδιών (*Mytilus galloprovincialis* της οικογένειας *mytiloidea*) και ψαριών-γοβιών (είδος *gobio gobio* της οικογένειας *gobiidae*) από την περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου. Για το υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna Minor*, η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε στην

αποστραγγιστική τάφρο του βιολογικού καθαρισμού της Χαλάστρας, κοντά στο σημείο δειγματοληψίας SS15: Γέφυρα Βαλμάδας (Ανατολικό)-Βραχιάς.

Δυστυχώς αποτέλεσε το μοναδικό διαθέσιμο δείγμα σε όλη τη δειγματοληψία και επομένως δεν μπορεί να εξαχθεί μία ασφαλείς συσχέτιση φυτοφαρμάκων-είδους. Όμως κρίθηκε ενδιαφέρουσα η ανάλυσή του, καθώς τα υδρόβια μακροφύκη γλυκών υδάτων θεωρούνται λιγότερο ευαίσθητα στις χημικές ουσίες από ότι τα ψάρια.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την ανάλυση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων για τα τρία υποστρώματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.5.

**Πίνακας 12.5:** Συγκεντρώσεις (ng/g) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα θαλάσσιων και φυτικών οργανισμών στην περιοχή μελέτης Αξιός-Λουδίας-Αλιάκμονας

Ένωση	Ψάρια ( <i>gobio gobio</i> ) (ng/g)			Μύδια ( <i>mytilus galloprovincialis</i> ) (n/g)			Υδ.μακρόφυτο <i>L. Minor</i> (ng/g)
	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Jan-18	Apr-18	Sep-18	Sep-18
	Ethoxyquine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Atrazine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorothalonil	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorpyrifos-methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Parathion-methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Chlorpyrifos	<MDL	<MDL	9,3	<MDL	10,1	14,1	<MDL
Irgarol	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Resmethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
λ-cyhalothrin	<MQL	<MDL	18,1	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
Permethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL

Κατά τη διάρκεια της μελέτης παρακολούθησης στα δείγματα των γοβιών ανιχνεύθηκαν συνολικά 2 φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα εντομοκτόνα chlorpyrifos (9,3 ng/g) και λ-cyhalothrin (18,1 ng/g) κατά την 3<sup>η</sup> δειγματοληψία (Πίνακας 12.5-12.6). Το chlorpyrifos ανήκει στις οργανοφωσφορικές ενώσεις, ενώ το λ-cyhalothrin στα πυρεθροειδή. Στα δείγματα μυδιών ανιχνεύθηκε μόνο το εντομοκτόνο chlorpyrifos στις δειγματοληψίες του Απριλίου και του Σεπτεμβρίου σε συγκεντρώσεις 10,1 και 14,1 ng/g αντίστοιχα (Πίνακας 12.5 & 12.7). Στο υπόστρωμα *L.Minor*, δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης.

**Πίνακας 12.6:** Εύρος συγκεντρώσεων (μέγιστη, ελάχιστη, μέση), θετικές ανιχνεύσεις (%), των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν στα δείγματα ψαριών

Ένωση	Δράση	Ψάρια ( <i>gobio gobio</i> ) (ng/g)				Συχνότητα ανίχνευσης <sup>d</sup> (n=30)	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )
		Min <sup>a</sup>	Max	Mean <sup>b</sup>	Lean <sup>c</sup>		
Ethoxyquine	M	*	*	*	*	0% (0)	26
Atrazine	Z	*	*	*	*	0% (0)	3,3
Chlorothalonil	M	*	*	*	*	0% (0)	16
Chlorpyrifos-methyl	E	*	*	*	*	0% (0)	3,3
Parathion-Methyl	E	*	*	*	*	0% (0)	33
Chlorpyrifos	E	*	*	*	*	0% (0)	8,2
Irgarol	Z	9,3	9,3	6,2	9,3	33.3% (1)	3,3
Rresmethrin	E	*	*	*	*	33.3% (1)	8,2
λ-cyhalothrin	E	18,1	18,1	12,1	18,1	66,6% (2)	16
Permethrin	E	*	*	*	*	0% (0)	16

(όπου M: μυκητοκτόνο, Z: ζιζανιοκτόνο, E: εντομοκτόνο), \* Δεν ανιχνεύθηκε

<sup>a</sup> Ελάχιστη συγκέντρωση

<sup>b</sup> Μέση συγκέντρωση (θεωρώντας τη μη ανίχνευση ως μηδέν) not detected as zero

<sup>c</sup> Μέση συγκέντρωση των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύθηκαν φυτοφάρμακα

<sup>d</sup> Θετικές ανιχνεύσεις (%)

**Πίνακας 12.7:** Εύρος συγκεντρώσεων (μέγιστη, ελάχιστη, μέση), θετικές ανιχνεύσεις (%), των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν στα δείγματα μυδιών

Ένωση	Δράση	Μύδια ( <i>mytilus galloprovincialis</i> ) (n/g)				Συχνότητα ανίχνευσης <sup>d</sup> (n=30)	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )
		Min <sup>a</sup>	Max	Mean <sup>b</sup>	Mean <sup>c</sup>		
Ethoxyquine	M	*	*	*	*	0% (0)	9,0
Atrazine	Z	*	*	*	*	0% (0)	3,3
Chlorothalonil	M	*	*	*	*	0% (0)	8,3
Chlorpyrifos-methyl	E	*	*	*	*	0% (0)	3,3
Parathion-Methyl	E	*	*	*	*	0% (0)	3,3
Chlorpyrifos	E	10,1	14,1	8,0	12,1	66,6% (2)	8,3
Irgarol	Z	*	*	*	*	0% (0)	3,3
Rresmethrin	E	*	*	*	*	0% (0)	16
λ-cyhalothrin	E	*	*	*	*	0% (0)	33
Permethrin	E	*	*	*	*	0% (0)	8,3

Το εντομοκτόνο λ-cyhalothrin, αποτελεί υδρόφοβη ένωση (Log Kow 7), έχει την τάση να προσροφάται από τα βράγχια και να βιοσυσσωρεύεται στον λιπαρό ιστό των ψαριών, ιδιαίτερα των βενθικών (Vieira and dos Reis Martinez, 2018). Λόγω της αποτελεσματικότητάς του, ταξινομείται ως πυρεθροειδές τύπου II και χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τον έλεγχο τόσο των γεωργικών, των οικιακών παρασίτων καθώς και στην προστασία των τροφίμων

(Alalibo et al., 2019). Σύμφωνα με τους Corcellas et al., σε τρία είδη ψαριών από πέντε ποταμούς της Ιβηρικής χερσονήσου, καταγράφηκαν οι εξής συγκεντρώσεις γριβάδι (*Carpio*) 46-1017 ng g<sup>-1</sup>, πέστροφα (*trout*) 379-583 ng g<sup>-1</sup>, *Luciobarbus graellsii* 102-504 ng g<sup>-1</sup> (Alalibo et al., 2019). Επίσης, οι Masiá et al., αναφέρουν συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 2,11-6,32 ng g<sup>-1</sup>, για το είδος *Barbus* (οικογένεια Κυπρινίδες) και 9,94 και 44,75 ng g<sup>-1</sup> για τον κοινό κυπρίνο (*Cyprinus carpus*) (Masiá et al., 2015a).

Τέλος, το εντομοκτόνο chlorpyrifos (Log K<sub>ow</sub> 4,96) παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα στο νερό και τείνει να συσσωρεύεται στον λιπαρό ιστό των ψαριών. Έρευνες αναφέρουν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 168,62 ng g<sup>-1</sup> για τον κυπρίνο και 840,25 ng g<sup>-1</sup> για το είδος *Silurus glanis* (Csanccara et al., 2016).

### 12.8 Επίπεδα συγκεντρώσεων σε δείγματα Ευρωπαϊκών υδατοκαλλιεργειών

Κατά τη διάρκεια της μελέτης συλλέχθηκαν 27 δείγματα επιφανειακών νερών από τα οποία μόνο σε ένα δείγμα (Ιταλία-IT-9), ανιχνεύθηκε το ζιζανιοκτόνο-βιοκτόνο irgarol πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης ( $4,3 \text{ ng L}^{-1}$ ) (Πίνακας 12.8). Στα σημεία δειγματοληψίας στην Ιταλία (IT-10, IT-11, IT-12) ανιχνεύθηκε η ίδια ένωση, όμως κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης. Κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης ανιχνεύθηκε και το βιοκτόνο-εντομοκτόνο chlorothalonil σε σημείο δειγματοληψίας στην Νορβηγίας (NO-23). Η ανίχνευση των δύο ενώσεων αυτών, σχετίζεται με την χρήση τους στα υφαλοχρώματα προκειμένου να αντιμετωπιστούν οι επικαθίσεις στα σκάφη και στα μέρη των εγκαταστάσεων που έρχονται σε επαφή με το νερό (Albanis et al., 2002).

Αναφορικά με τα δείγματα των ιζημάτων, ανιχνεύθηκε το βιοκτόνο-ζιζανιοκτόνο irgarol στην Πορτογαλία (PT-17) με συγκέντρωση  $95,2 \text{ ng g}^{-1}$  και στο Ηνωμένο Βασίλειο (UK-21) με συγκέντρωση  $1,3 \text{ ng g}^{-1}$  (Πίνακας 12.9). Κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης ανιχνεύθηκε η ένωση irgarol στην Νορβηγία (NO-24), και το εντομοκτόνο azamethiphos στην Ελλάδα στο σημείο GR-3.

Τέλος, στα δείγματα αχινών που συλλέχθηκαν από τις Πορτογαλικές ακτές Carreges, Praia Norte και Vila Chã (νότια και βόρεια κάθε σημείου) κοντά σε μονάδες υδατοκαλλιέργειες, δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης. Κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης ανιχνεύθηκε το εντομοκτόνο chlorpyrifos στην περιοχή Vila Chã και το permethrin στο σημείο του Praia Norte (Βόρειο) (Πίνακας 12.10).











**Πίνακας 12.10:** Συγκεντρώσεις ( $\text{ng g}^{-1}$ ) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα αχινών κοντά σε μονάδες υδατοκαλλιέργειας (Πορτογαλία)

Ένωση	Carreço-N	Carreço-S	Praia Norte-N	Praia Nort-Se	Vila Chã-N	Vila Chã-S
azamethipos	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
atrazine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
ethoxyquine	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
irgarol	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
parathion-methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
chlorothalonil	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
chlorpyrifos-methyl	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
chlorpyrifos	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MQL	<MQL
resmethrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
λ-cyhalothrin	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
permethrin	<MDL	<MDL	<MQL	<MDL	<MDL	<MDL

## Γ. Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας

### 12.9 Εισαγωγή

Για την εκτίμηση της επικινδυνότητας (Risk Assessment) μπορούν να χρησιμοποιηθούν προσδιοριστικές μέθοδοι και ποσοτικές μέθοδοι με την χρήση μοντέλων πιθανοτήτων (Lambropoulou et al., 2015). Οι υπολογισμοί βασίζονται στις συγκεντρώσεις των ρύπων που ανιχνεύθηκαν και σε τοξικολογικά δεδομένα. Οι τιμές οξείας τοξικότητας ( $EC_{50}/LC_{50}$ ), συλλέγονται από τη βιβλιογραφία και από κατάλληλο λογισμικό (ECOSAR v 1.11-ECOLOGICAL Structure Activity Relationship) (Cancara et al., 2016; Masiá et al., 2015 και Stamatidis et al., 2013).

Δύο από τις βασικές υπολογιστικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται είναι η μέθοδος του πηλίκου ή τοξικής μονάδας (Risk Quotient or Toxic Unit method) και η μέθοδος κατανομής των πιθανοτήτων (probabilistic) (Hela et al., 2005). Όσον αφορά την Ελλάδα, σχεδόν όλες οι μελέτες εκτίμησης την επικινδυνότητας χρησιμοποιούν τη μέθοδο του πηλίκου (Lambropoulou et al., 2015).

### 12.10 Μέθοδος του πηλίκου (Risk Quotient Method)

Η μέθοδος του πηλίκου είναι ο πιο απλός τρόπος να εκτιμηθεί ο περιβαλλοντικός κίνδυνος για συγκεκριμένες ενώσεις και οργανισμούς. Η κάθε επιβλαβής ουσία συμβάλει στην ολική τοξικότητα και η συνεισφορά της δίνεται από τη τιμή του πηλίκου, το οποίο εκφράζεται από την εξίσωση 12.1 (Cruzeiro et al., 2017 και Kapsi et al., 2019):

$$RQ = \frac{\text{Έκθεση}}{\text{Τοξικότητα}} = \frac{\text{Συγκέντρωση της ουσίας (MEC)}}{LC_{50} \text{ ή } EC_{50} \text{ ή } NOEC (PNEC)} \quad (\text{Εξίσωση 12.1})$$

Η τιμή MEC, αντιστοιχεί στη μέγιστη συγκέντρωση της ουσίας που ανιχνεύθηκε στα δείγματα, με σκοπό την εκτίμηση του κινδύνου στις πιο ακραίες περιπτώσεις (worst-case scenario) (Affum et al., 2018 και Papadakis et al., 2015b). Η τιμή PNEC υπολογίστηκε διαιρώντας τη μικρότερη τιμή των συγκεντρώσεων  $EC_{50}$  ή  $LC_{50}$  (μέση αποτελεσματική συγκέντρωση ή μέση θανατηφόρα συγκέντρωση) ή των χρόνιων συγκεντρώσεων μη παρατηρούμενων επιδράσεων NOEC (No Observed Effect Concentration), με κατάλληλο συντελεστή αβεβαιότητας (Assessment Factor, AF).

Στην παρούσα μελέτη, για κάθε φυτοπροστατευτική ένωση πραγματοποιήθηκαν δύο εκτιμήσεις από τα δεδομένα τοξικότητας που προέκυψαν από τη βιβλιογραφία. Η πρώτη βασίστηκε στον υπολογισμό του  $PNEC_{acute}$  από τα δεδομένα οξείας τοξικότητας (Cruzeiro et al., 2017 και Papadakis et al., 2015b):

$$PNEC_{acute} = \frac{EC_{50} \text{ ή } LC_{50}}{1000} \quad (\text{Εξίσωση 12.2})$$

Και η δεύτερη βασίστηκε στον υπολογισμό του  $PNEC_{chronic}$  από τα δεδομένα χρόνιας τοξικότητας (Masiá et al., 2015 και Paradakis et al., 2015b):

$$PNEC_{chronic} = \frac{NOEC}{AF(100, 50 \text{ ή } 10)} \quad (\text{Εξίσωση 12.3})$$

Πιο συγκεκριμένα, όταν είναι διαθέσιμη μόνο μια βραχυπρόθεσμη τιμή δεδομένων τοξικότητας για τα τρία τροφικά επίπεδα εφαρμόζεται ο συντελεστής 1000, όταν είναι διαθέσιμη μία μακροπρόθεσμη τιμή δεδομένων τοξικότητας NOEC εφαρμόζεται ο συντελεστής αβεβαιότητας 100, όταν υπάρχουν διαθέσιμες τιμές για δύο από τα τρία τροφικά επίπεδα εφαρμόζεται ο συντελεστής αβεβαιότητας 50 ενώ όταν υπάρχουν τιμές NOEC και για τα τρία τροφικά επίπεδα εφαρμόζεται ο συντελεστής αβεβαιότητας 10 (Affum et al., 2018; Cruzeiro et al., 2017 και Lambropoulou et al., 2015).

Στη συνέχεια οι τιμές συγκρίνονται με επίπεδα ανησυχίας και όταν η τιμή του πηλίκου (RQ) είναι ίση ή μεγαλύτερη από τη μονάδα ( $RQ \geq 1$ ) θεωρείται ότι υπάρχει «υψηλός ή πολύ υψηλός κίνδυνος» για το συγκεκριμένο είδος. Τα επίπεδα ανησυχίας που προτείνονται στην βιβλιογραφία χαρακτηρίζονται ως εξής:  $RQ < 0.01$  «μηδαμινός κίνδυνος»,  $0,01 < RQ < 0,1$  «Χαμηλός κίνδυνος» και  $0,1 < RQ < 1$  «μεσαίος κίνδυνος» (Affum et al., 2018; Csanccara et al., 2016 και Masiá et al., 2015).

### 12.11 Εκτίμηση οξείας τοξικότητας

Για την εκτίμηση του οικοτοξικολογικού κινδύνου που σχετίζεται με την παρουσία των ανιχνευθέντων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα επιφανειακά ύδατα, υπολογίστηκαν οι τιμές RQ, σύμφωνα με την οδηγία 93/67/ΕΚ, χρησιμοποιώντας δεδομένα οξείας τοξικότητας για τις τρεις κατηγορίες υδάτινων οργανισμών (άλγη, ζωοπλαγκτόν και ψάρια) (Πίνακα 12.11) (European Commission, 1993).

Η μέγιστη και η μέση συγκέντρωση για κάθε ένωση που ανιχνεύθηκε, καθώς και οι τιμές των PNEC (βάσει δεδομένων τοξικότητας  $LC_{50}$   $EC_{50}$ ) και RQ που υπολογίστηκαν για ψάρια, ασπόνδυλα και άλγη παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.12. Για τις ενώσεις που δεν ανιχνεύθηκαν, ως μέγιστη συγκέντρωση ορίστηκε η μισή του ορίου ανίχνευσης (MDL/2). Για τα ψάρια, ως κύριος εκπρόσωπος των ελληνικών ποταμών επιλέχθηκε η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), για τα υδρόβια ασπόνδυλα, η *Daphnia Magna*, ενώ για τα άλγη χρησιμοποιήθηκαν τα πιο συχνά είδη που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, καθώς είναι κοινά για τα περισσότερα υδάτινα οικοσυστήματα (Konstantinou et al., 2004b).

**Πίνακας 12.11:** Βιβλιογραφικά δεδομένα για την οξεία τοξικότητα για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν

Ένωση	Φυτοπλαγκτόν		Ζωοπλαγκτόν		Ψάρια		Αναφορά
	LC <sub>50</sub> / EC <sub>50</sub> (mg/L)	Οργανισμός	LC <sub>50</sub> / EC <sub>50</sub> (mg/L)	Οργανισμός	LC <sub>50</sub> / EC <sub>50</sub> (mg/L)	Οργανισμός	
atrazine	0,059	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	85	<i>Daphnia magna</i>	4,5	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	*
parathion-methyl	3	<i>Scenedemus subspicatus</i>	0,073	<i>Daphnia magna</i>	2,7	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Vryzas et al., 2009) (Stamatis et al., 2013)
chlorpyrifos	0,48	<i>unknown species</i>	0,0046	<i>Daphnia magna</i>	0,024	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Papadakis et al., 2015a) (Cruzeiro et al., 2017)
irgarol	0,025	<i>Selenastrum capricornutum</i>	2,4	<i>Daphnia magna</i>	0,86	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Papadakis et al., 2015a)
resmethrin	1,6	<i>unknown species</i>	0,0037	<i>Daphnia magna</i>	0,017	<i>Lepomis macrochirus</i>	*
λ-cyhalothrin	>0,005	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0,3	<i>Daphnia magna</i>	0,00025	<i>Lepomis macrochirus</i>	(Affum et al., 2018)
permethrin	0,0125	<i>unknown species</i>	0,0006	<i>Daphnia magna</i>	0,0125	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	*

\* PPDB: Pesticide Properties Database, University of Hertfordshire

**Πίνακας 12.12:** Περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις για τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά ύδατα, PNECs και RQ για άλγη, το ζωοπλαγκτόν και τα ψάρια

Ένωση	Φυτοπλαγκτόν						Ζωοπλαγκτόν						Ψάρια	
	MEC <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	MEC <sub>m</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	PNEC <sub>acute</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	RQ <sub>ex</sub>	RQ <sub>m</sub>	PNEC <sub>acute</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	RQ <sub>ex</sub>	RQ <sub>m</sub>	PNEC <sub>acute</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	RQ <sub>ex</sub>	RQ <sub>m</sub>	PNEC <sub>acute</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	RQ <sub>ex</sub>	RQ <sub>m</sub>
	atrazine	0,250	0,0108	0,059	4,23	0,18	85,00	0,003	0,000	4,500	0,056	0,002	0,056	0,002
parathion- methyl	0,300	0,0534	3,000	0,10	0,02	0,073	4,109	0,731	2,700	0,110	0,019	0,110	0,019	
chlorpyrifos	0,470	0,2210	0,480	0,98	0,05	0,005	102,2	4,804	0,024	19,58	0,921	19,58	0,921	
irgarol	0,108	0,0134	0,025	4,32	0,54	2,400	0,045	0,001	0,860	0,136	0,016	0,136	0,016	
resmethrin	0,047	0,0034	1,600	0,03	0,00	0,004	12,70	0,919	0,017	2,765	0,200	2,765	0,200	
λ-cyhalothrin	0,041	0,0023	0,005	8,20	0,46	0,300	0,137	0,008	0,000	164,0	9,200	164,0	9,200	
permethrin	0,042	0,0009	0,012	3,36	0,07	0,001	70,00	1,500	0,012	3,360	0,072	3,360	0,072	

RQ<sub>ex</sub> (RQ extreme): Υπολογίζεται βάσει της μέγιστης συγκέντρωσης

RQ<sub>m</sub> (RQ mean): Υπολογίζεται βάσει της μέσης συγκέντρωσης



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το εντομοκτόνο permethrin, παρουσίασε  $RQ > 1$  σε όλα τα επίπεδα της υδρόβιας ζωής, για τη μέγιστη συγκέντρωση (Πίνακας 12.12). Όταν στους υπολογισμούς χρησιμοποιείται η μέση συγκέντρωση, το permethrin εμφάνισε χαμηλό κίνδυνο για τις ταξινομικές ομάδες του φυτοπλαγκτόν και των ψαριών, ενώ για την ομάδα του ζωοπλαγκτόν υψηλό κίνδυνο.

Το ζιζανιοκτόνο atrazine παρουσίασε πολύ υψηλό κίνδυνο για τα άλγη όταν στο πηλίκιο χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση και χαμηλό κίνδυνο για την μέση τιμή. Για την ομάδα του ζωοπλαγκτόν το atrazine εμφάνισε μηδαμινό κίνδυνο  $RQ_{ex} = 0,003$  (μέγιστη συγκέντρωση) ενώ για την ομάδα των ψαριών εμφάνισε χαμηλό κίνδυνο με τιμή πηλίκου  $RQ_{ex} = 0,056$  (μέγιστη συγκέντρωση). Από τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό, ότι τα ζιζανιοκτόνα παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα κυρίως στα άλγη, γεγονός που σχετίζεται με την δράση τους έναντι των φυτών-εχθρών, μπλοκάροντας τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης (Lambropoulou et al., 2015 και Papadakis et al., 2015a)

Το irgarol παρουσίασε χαμηλό κίνδυνο για την ομάδα του ζωοπλαγκτόν, μεσαίο κίνδυνο για την ομάδα των ψαριών και υψηλό κίνδυνο για την ομάδα του φυτοπλαγκτόν. Αντίστοιχα, για την μέση συγκέντρωση το irgarol παρουσιάζει μεσαία τοξικότητα στο φυτοπλαγκτόν, μηδαμινή τοξικότητα στο ζωοπλαγκτόν και χαμηλή στα ψάρια.

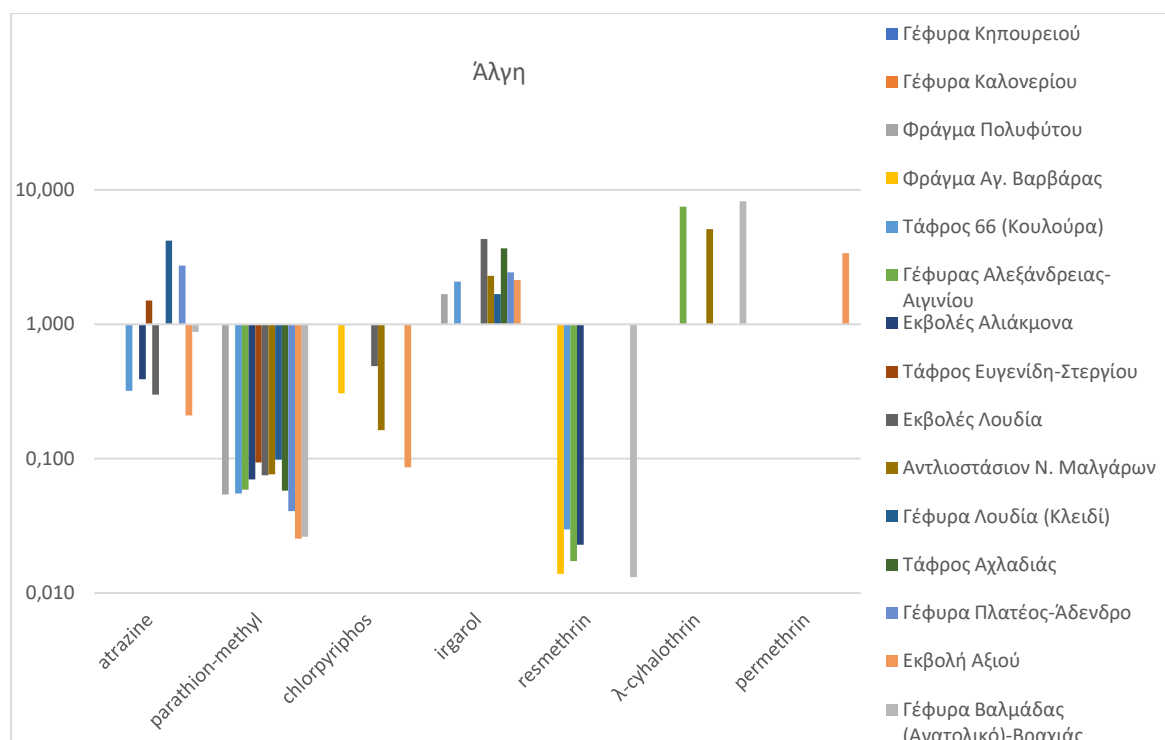
Το RQ για την ένωση parathion-methyl, ήταν μεγαλύτερο από την μονάδα μόνο για την μέγιστη συγκέντρωση για το ζωοπλαγκτόν, ενώ για τις υπόλοιπες ομάδες εμφανίστηκε χαμηλός κίνδυνος. Οι ενώσεις resmethrin και chlorpyrifos σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο στο ζωοπλαγκτόν και τα ψάρια και χαμηλό για το φυτοπλαγκτόν, όταν στον υπολογισμό του πηλίκου χρησιμοποιείται η μέγιστη συγκέντρωση.

Σχετικά με το πυρεθροειδές λ-cyhalothrin, μεγαλύτερες πιέσεις δέχονται τα άλγη και τα ψάρια με τιμές πηλίκου  $RQ > 1$ . Παλαιότερες μελέτες που έχουν λάβει χώρα στην Ελλάδα, επιβεβαιώνουν τις τιμές  $RQ > 1$  (πολύ υψηλός κίνδυνος) για την ένωση λ-cyhalothrin και για τρεις κατηγορίες υδάτινων οργανισμών (Papadakis et al., 2015a).

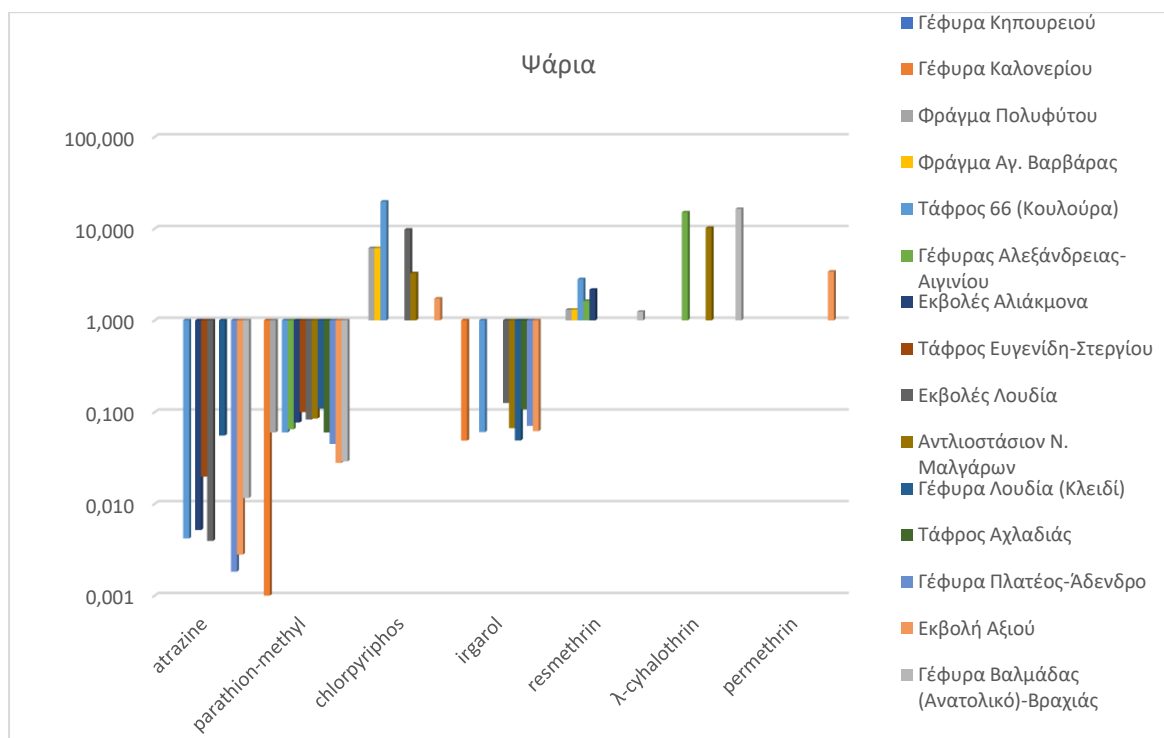
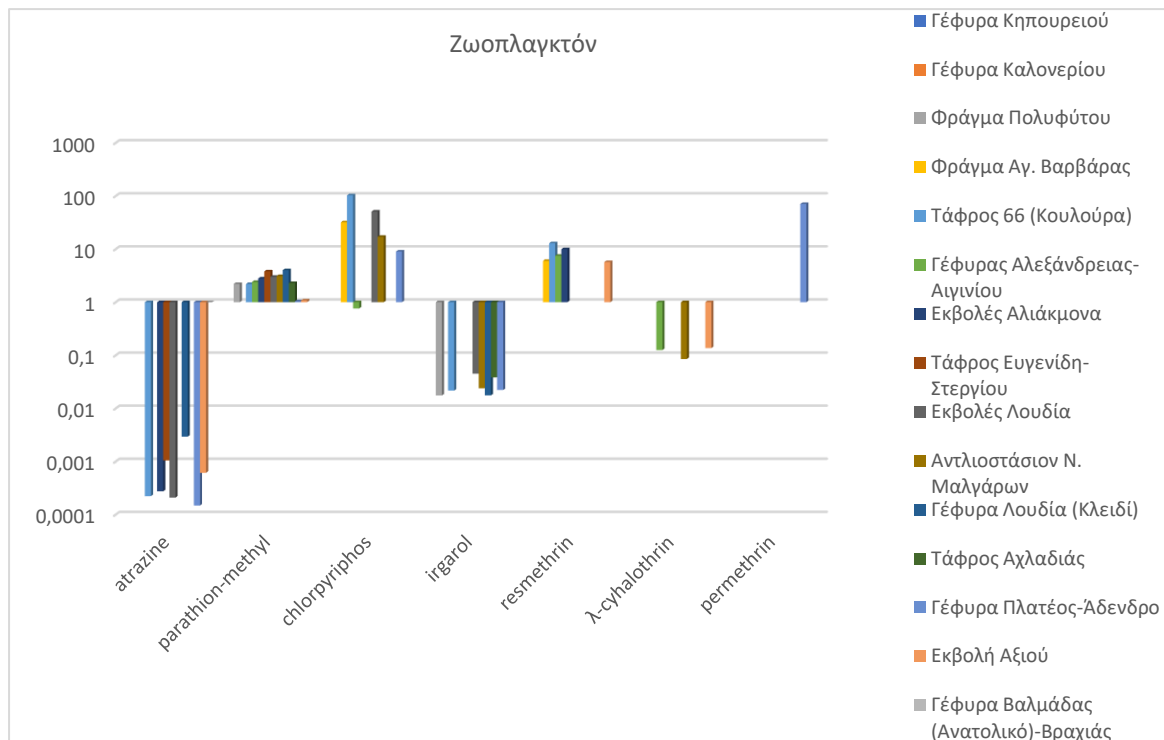
Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την υψηλή τοξικότητα των εντομοκτόνων στο ζωοπλαγκτόν και τα ψάρια έναντι της χαμηλής-μεσαίας για τα άλγη (Lambropoulou et al., 2015 και Papadakis et al., 2015b). Επίσης τα οργανοφωφορικά εντομοκτόνα ασκούν μεγαλύτερες πιέσεις στην ταξονομική ομάδα του ζωοπλαγκτόν (*D. Magna*) από ότι τα ζιζανιοκτόνα (Stamatis et al., 2013). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, οι Stamatis et al., αναφέρουν υψηλές τιμές  $RQ > 115,5$  για ενώσεις με εντομοκτόνο δράση, πιθανότατα λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν στην υπό μελέτη και των αρκετά χαμηλών τιμών PNEC (Stamatis et al., 2013).

Όσον αφορά παλαιότερες μελέτες που έχουν λάβει στο σύστημα μελέτης, αναφέρουν πολύ υψηλό κίνδυνο τοξικότητας  $RQ > 1$  για αρκετές ενώσεις για την ομάδα του φυτοπλαγκτόν στον ποταμό Αξιό. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση atrazine, παρουσίασε μεσαία έως υψηλή τοξικότητα ( $RQ < 1$ ) στον ποταμό Λουδία, Αλιάκμονα και τον Αξιό (Lambropoulou et al., 2015). Τα αποτελέσματα της εκτίμησης επικινδυνότητας της παρούσας μελέτης ως προς την ένωση parathion-methyl, συμφωνούν με βιβλιογραφικά δεδομένα των Lambropoulou et al, που αναφέρουν μεσαίο έως υψηλό κίνδυνο  $0.1 < RQ < 1$  για το τροφικό επίπεδο του ζωοπλαγκτόν στους ποταμούς Αξιό, Λουδία και Αλιάκμονα (Lambropoulou et al., 2015).

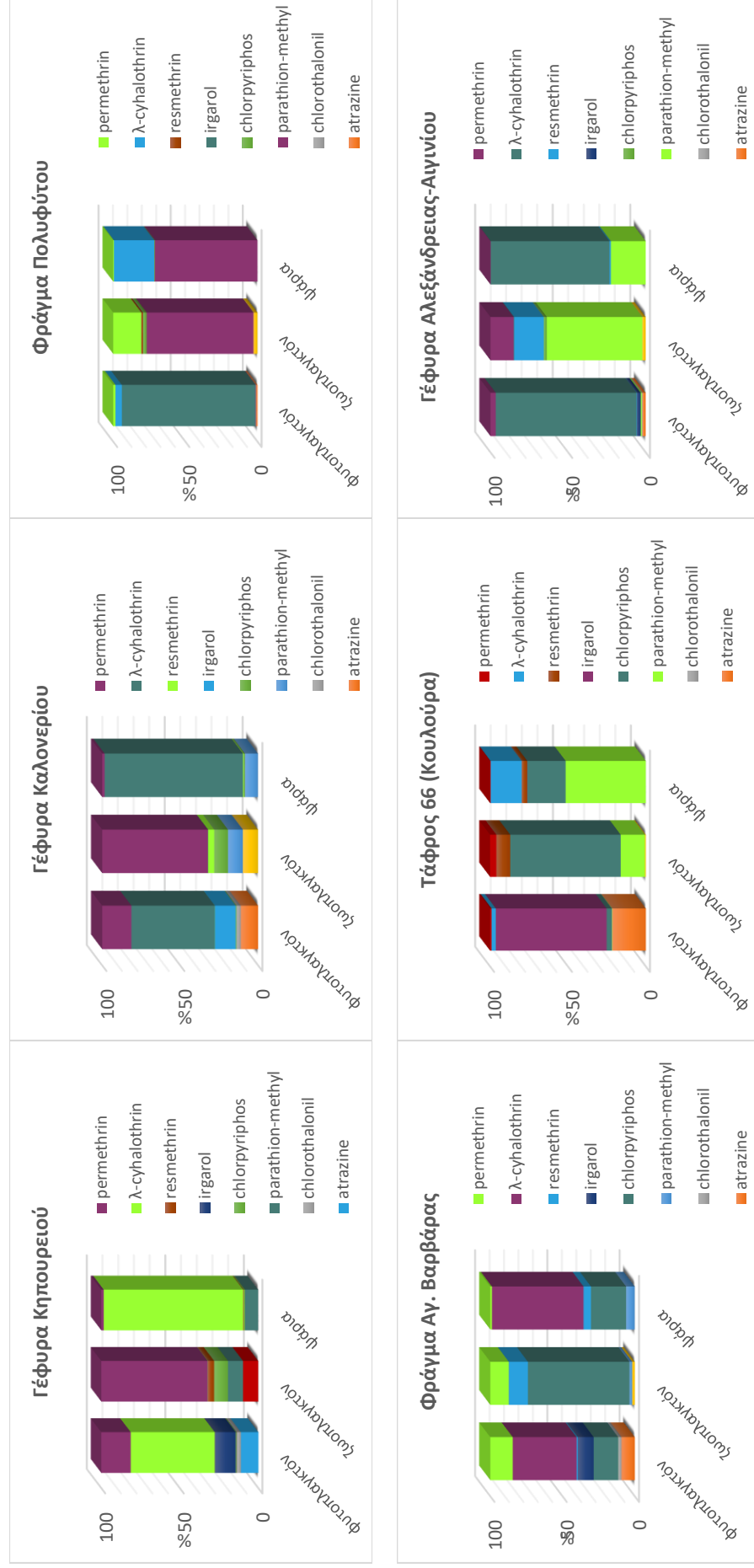
Στο Σχήμα 12.8 (α-γ) που ακολουθεί αποτυπώνεται η εκτίμηση οξείας τοξικότητας για τις υπό μελέτη φυτοπροστατευτικές ενώσεις για τα τρία τροφικά επίπεδα της υδρόβιας ζωής βάσει της μέγιστης συγκέντρωσης σε κάθε σταθμό δειγματοληψίας. Στο Σχήμα 12.9, παρουσιάζεται η εκατοστιαία συνεισφορά κάθε ένωσης στην ολική τοξικότητα, ανά σημείο δειγματοληψίας, ανά τροφικό επίπεδο.



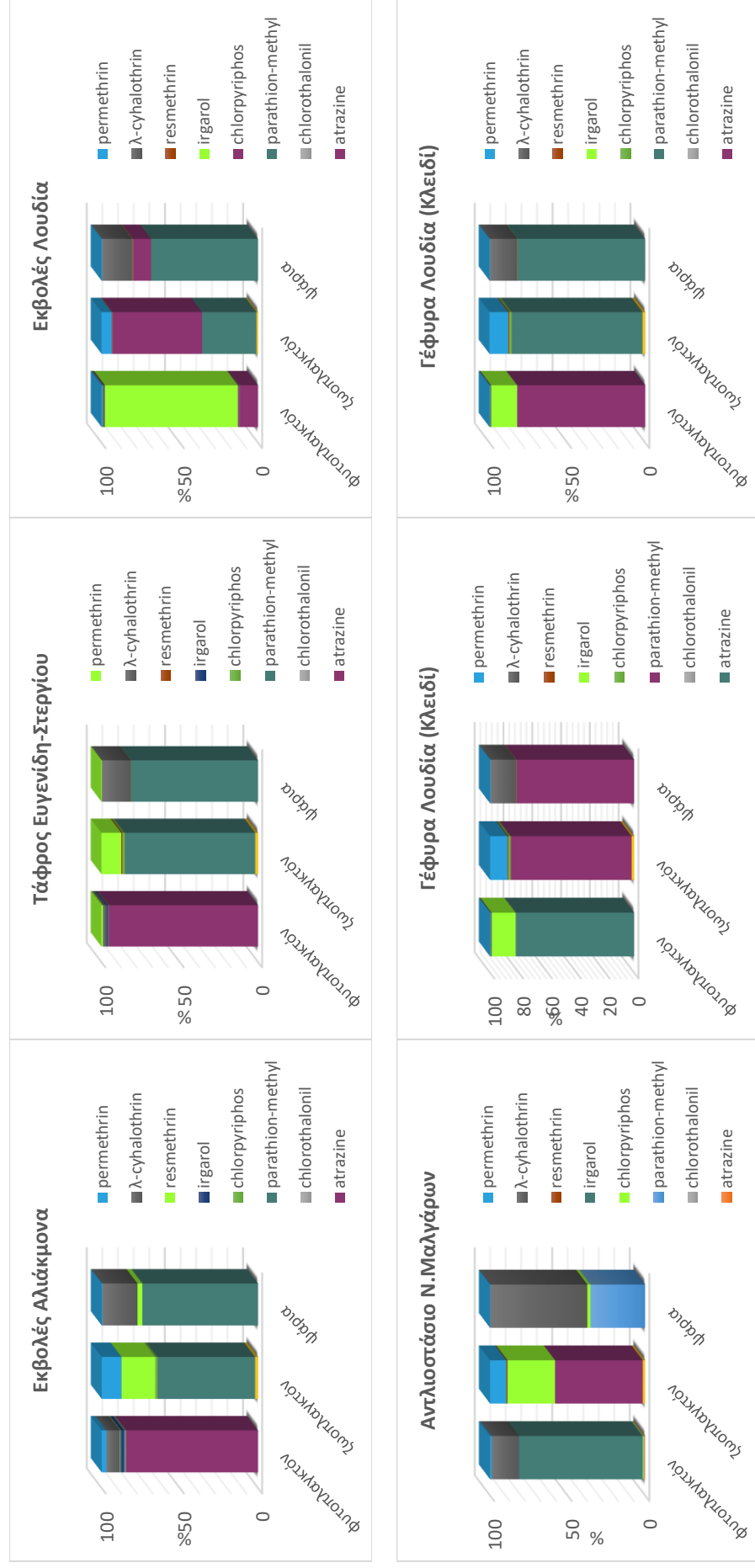
(α)



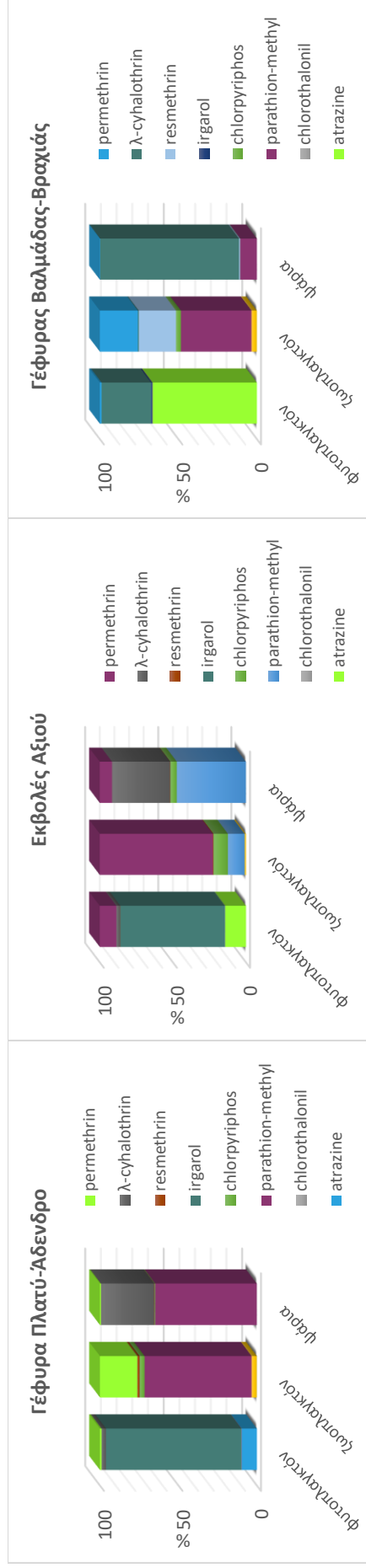
**Σχήμα 12.8:** Εκτίμηση οξείας τοξικότητας για τα (α) άλγη, (β) ζωοπλαγκτόν και (γ) ψάρια



Σχήμα 12.9: Εκατοστιαία συνεισφορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην ολική τοξικότητα (ανά σημείο δειγματοληψίας)



**Σχήμα 12.9:** (συνέχεια) Εκατοστιαία συσισφορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην ολική τοξικότητα (ανά σημείο δειγματοληψίας)



**Σχήμα 12.9:** (συνέχεια) Εκατοστιαία συνεισφορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην ολική τοξικότητα (ανά σημείο δειγματοληψίας)

### 12.12 Εκτίμηση χρόνιας τοξικότητας

Η μέγιστη και η μέση συγκέντρωση για κάθε ένωση, καθώς και οι τιμές NOEC και RQ που υπολογίστηκαν για τα άλγη, τα ασπόνδυλα και τα ψάρια παρουσιάζονται στους Πίνακες 12.13-12.14. Για τις ενώσεις resmethrin και irgarol που δεν υπήρχαν διαθέσιμες βιβλιογραφικές τιμές NOEC, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές LC<sub>50</sub> ή EC<sub>50</sub> (Affum et al., 2018; Lambropoulou et al 2015 και Papadakis et al., 2015a).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 12.13, στα άλγη και στα ψάρια η ένωση irgarol εμφάνισε χαμηλή χρόνια τοξικότητα για την μέγιστη συγκέντρωση (RQ<sub>ex</sub>=0,04) και μηδαμινή τοξικότητα για την μέση συγκέντρωση (RQ<sub>m</sub>=0,005). Για την ομάδα του ζωοπλακτόν η ένωση irgarol παρουσίασε μηδαμινό κίνδυνο και για τη μέση και για τη μέγιστη συγκέντρωση.

Για την ταξονομική ομάδα του ζωοπλακτόν, πολύ υψηλό κίνδυνο παρουσίασαν τα εντομοκτόνα chlorpyrifos και λ-cyhalothrin μόνο όταν στον υπολογισμό του πηλίκου χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση. Οι ενώσεις parathion-methyl, resmethrin και permethrin παρουσίασαν μεσαίο κίνδυνο για τη μέγιστη συγκέντρωση. Τα αποτελέσματα αυτά, συνάδουν με βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς μελέτες αναφέρουν πολύ υψηλή χρόνια τοξικότητα για τις ενώσεις parathion-methyl και chlorpyrifos για την ομάδα του ζωοπλακτόν στην Ελλάδα και στην Ευρώπη (Papadakis et al., 2015a και Vryzas et al., 2009).

Τέλος, η ταξονομική ομάδα των ψαριών δέχεται τις σοβαρότερες πιέσεις από την παρουσία των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και συγκεκριμένα των εντομοκτόνων chlorpyrifos, resmethrin, permethrin και λ-cyhalothrin όταν χρησιμοποιούνται οι μέγιστες συγκεντρώσεις (RQ>1). Το ζιζανιοκτόνο atrazine, παρουσίασε μηδαμινή χρόνια τοξικότητα στα ψαρια όπως ήταν αναμενόμενο, τόσο για τη μέση όσο και για τη μέγιστη συγκέντρωση.

Παλαιότερες μελέτες επιβεβαιώνουν την πολύ υψηλή χρόνια τοξικότητα των ενώσεων chlorpyrifos, resmethrin και λ-cyhalothrin για την ταξονομική ομάδα των ψαριών με τιμές RQ<sub>ex</sub>=117 για την μέγιστη συγκέντρωση και RQ<sub>m</sub>=42,6 για την μέση αντίστοιχα (Cscanccara et al., 2016 και Papadakis et al., 2015a). Πιθανότατα λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν και των αρκετά χαμηλών τιμών αναφοράς.

Στο Σχήμα 12.10 αποτυπώνεται η εκτίμηση της χρόνιας τοξικότητας για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις για τα τρία τροφικά επίπεδα της υδρόβιας ζωής για κάθε σημείο δειγματοληψίας, ενώ στο Σχήμα 12.11 η εκατοστιαία συνεισοφρά κάθε ένωσης στην ολική τοξικότητα για τα τρία τροφικά επίπεδα της υδρόβιας ζωής.

**Πίνακας 12.13:** Βιβλιογραφικά δεδομένα για την χρόνια τοξικότητα για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν

Ένωση	Φυτοπλαγκτόν		Ζωοπλαγκτόν		Ψάρια		Αναφορά
	NOEC (mg L <sup>-1</sup> )	Οργανισμός	NOEC (mg L <sup>-1</sup> )	Οργανισμός	NOEC (mg L <sup>-1</sup> )	Οργανισμός	
atrazine	0,1	<i>Green algae</i>	0,25	<i>Daphnia Magna</i>	2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Vryzas et al., 2009) (Papadakis et al., 2015) (Tsaboula et al., 2016)
methyl-parathion	3	<i>Scenedemus subspicatus</i>	0,018	<i>Daphnia Magna</i>	0,089	<i>Cyprinodon variegatus</i>	(Vryzas et al., 2009) (Tsaboula et al., 2016)
chlorpyrifos	0,048	<i>unknown species</i>	0,0046	<i>Daphnia Magna</i>	0,0014	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Papadakis et al., 2015) (Csanccapa et al., 2016) **
irgarol	0,025	<i>Scenedemus subspicatus</i>	2,4*	<i>Daphnia Magna</i>	0,024	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	**
resmethrin	1,6*	<i>unknown species</i>	0,0037*	<i>Daphnia Magna</i>	0,00032	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	(Tsaboula et al., 2016) (Papadakis et al., 2015)
λ-cyhalothrin	>0,31	<i>unknown species</i>	0,00023	<i>Daphnia Magna</i>	0,00006	<i>Pimephales promelas</i>	**
permethrin	0,0125	<i>unknown species</i>	0,0006	<i>Daphnia Magna</i>	0,000093	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	**

\* L(E)C<sub>50</sub>.

\*\* PPDB: Pesticide Properties Database, University of Hertfordshire

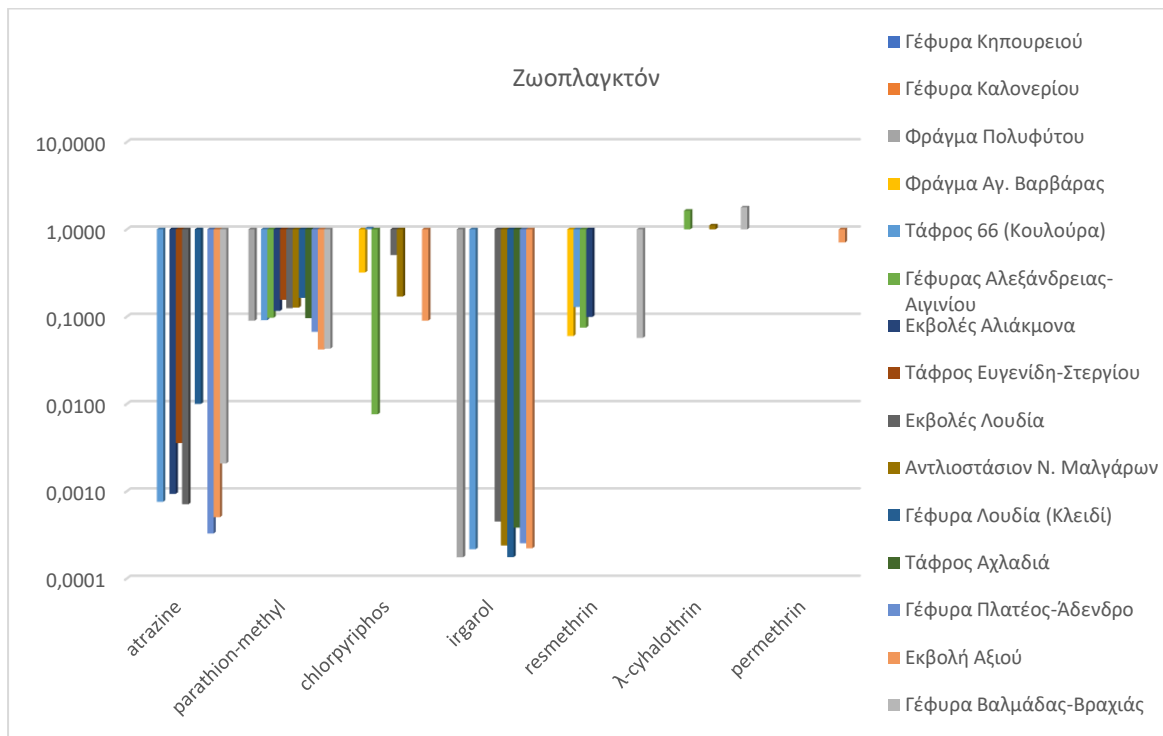
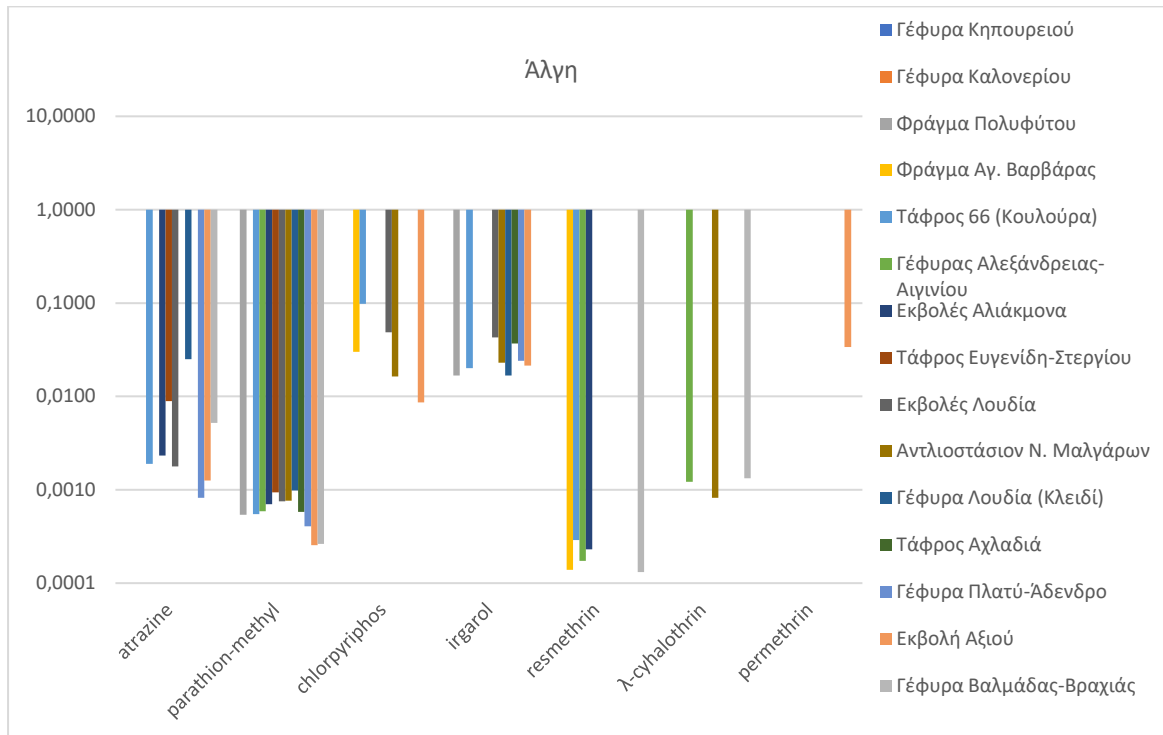
**Πίνακας 12.14:** Περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις για τις ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα επιφανειακά ύδατα, PNECs και RQ για άλγη, το ζωοπλαγκτόν και τα ψάρια

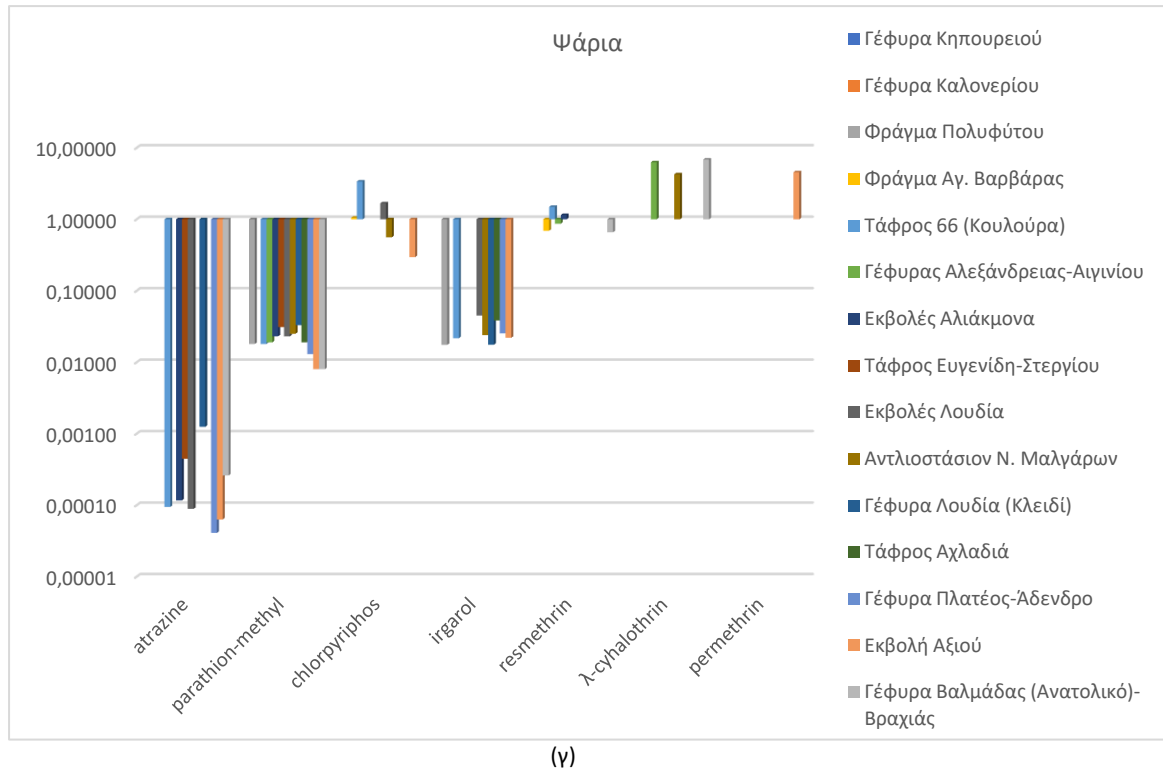
Ένωση	Φυτοπλαγκτόν			Ζωοπλαγκτόν			Ψάρια				
	MEC <sub>ex</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	MEC <sub>m</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	PNEC <sub>chronic</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	RQ <sub>ex</sub>	RQ <sub>m</sub>	PNEC <sub>chronic</sub> (μg L <sup>-1</sup> )	RQ <sub>ex</sub>	RQ <sub>m</sub>	PNEC <sub>chronic</sub> (μg L <sup>-1</sup> )		
atrazine	0,250	0,011	10	0,0250	0,0011	25	0,0100	0,0004	200	0,0012	0,0006
methyl-parathion	0,300	0,053	300	0,0100	0,0002	1,8	0,1600	0,0297	8,9	0,0337	0,0059
chlorpyrifos	0,470	0,022	4,8	0,0979	0,0058	0,46	1,020	0,0480	0,14	3,357	0,1579
irgarol	0,108	0,013	2,5	0,0432	0,0052	240	0,0004	0,0000	2,4	0,0450	0,0054
resmethrin	0,047	0,003	160	0,0003	0,0000	0,37	0,1270	0,0081	0,03	1,469	0,0930
λ-cyhalothrin	0,041	0,002	31	0,0013	0,0000	0,02	1,782	0,0860	0,006	6,833	0,3300
permethrin	0,042	0,001	1,25	0,0336	0,0008	0,06	0,7000	0,0160	0,009	4,516	0,1070

RQ<sub>ex</sub> (RQ extreme): Υπολογίζεται βάσει της μέγιστης συγκέντρωσης

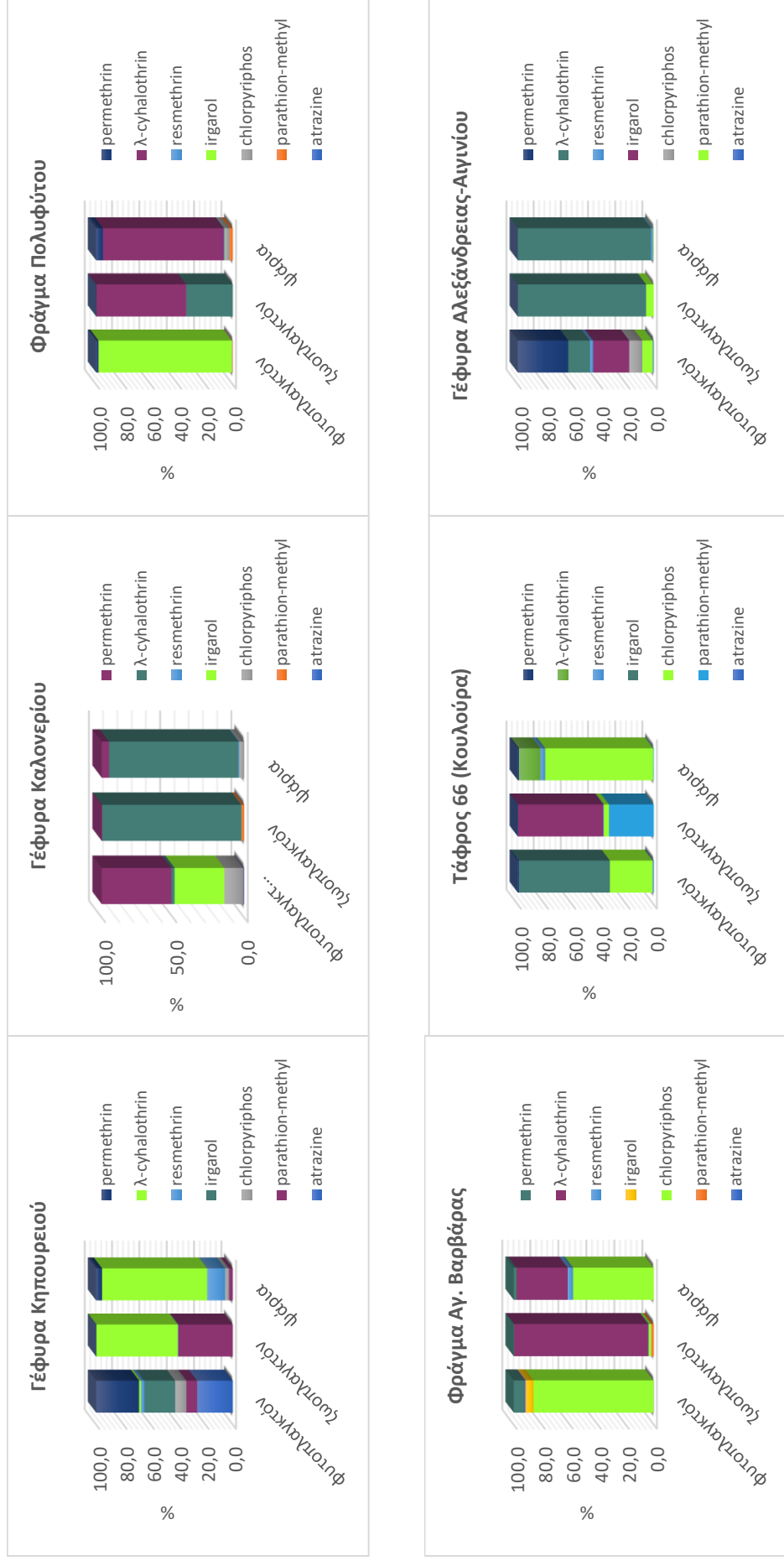
RQ<sub>m</sub> (RQ mean): Υπολογίζεται βάσει της μέσης συγκέντρωσης



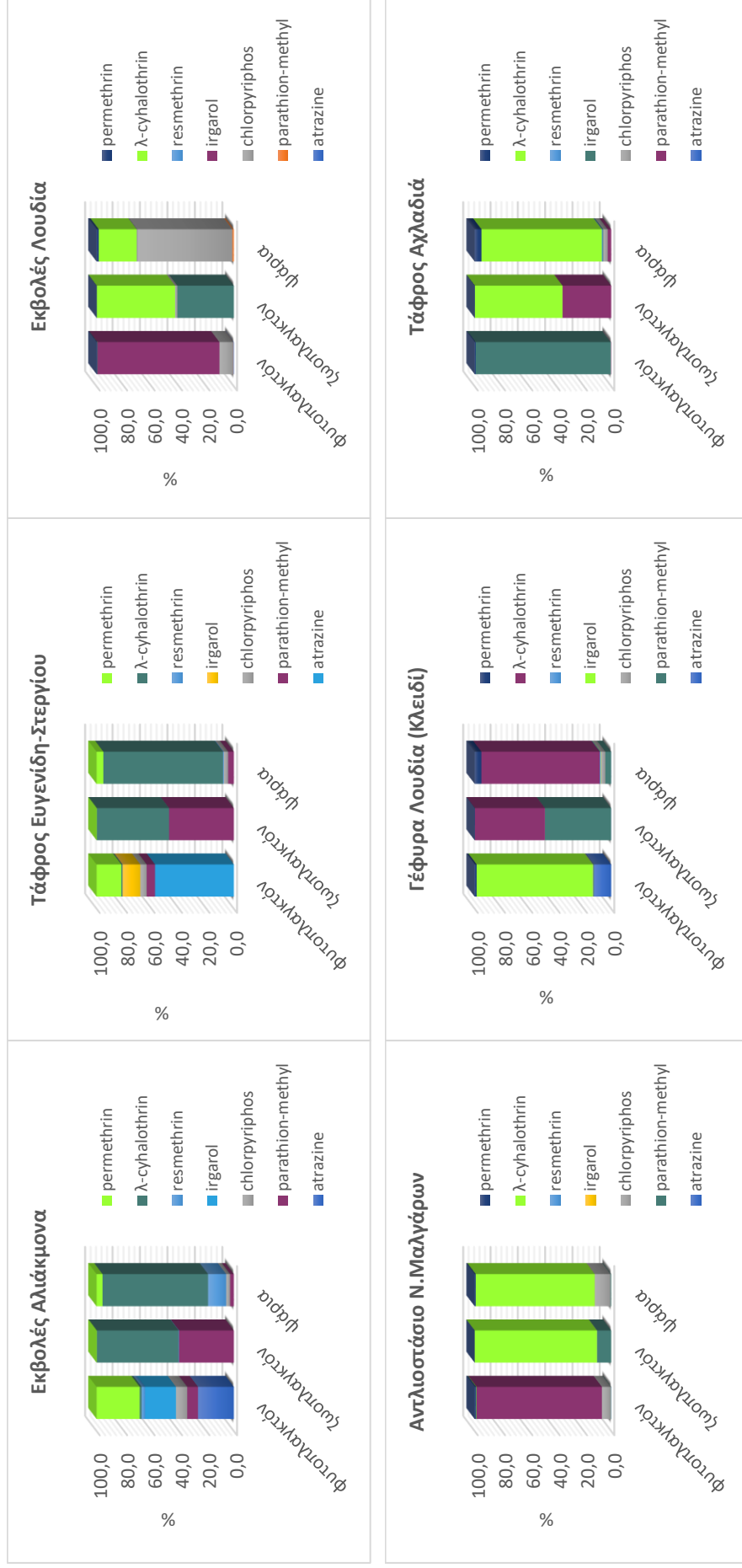




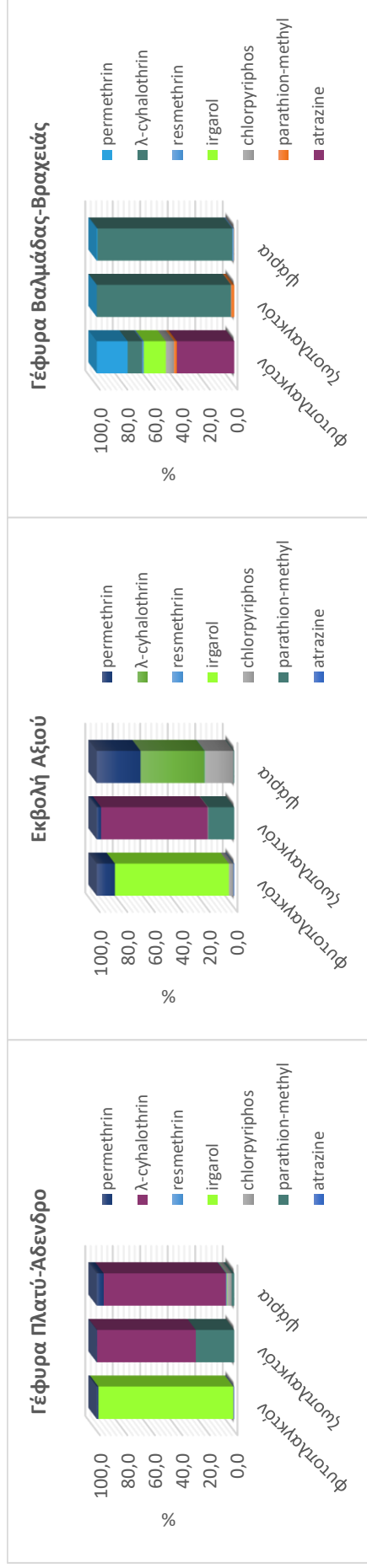
**Σχήμα 12.10:** Εκτίμηση χρόνιας τοξικότητας για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα (α) άλγη, (β) ασπόνδυλα, (γ) ψάρια



Σχήμα 12.11: Εκατοστιαία συνεισφορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην ολική τοξικότητα (ανά σημείο δειγματοληψίας)



Σχήμα 12.11: (συνέχεια) Εκατοστιαία συνεισφορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην ολική τοξικότητα (ανά σημείο δειγματοληψίας)



**Σχήμα 12.11:** (συνέχεια) Εκατοστιαία συνεισφορά φυτοπροστατευτικών ενώσεων στην ολική τοξικότητα (ανά σημείο δειγματοληψίας)



---

## Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---





## E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή, αναπτύχθηκαν, βελτιστοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό δώδεκα φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε επιφανειακά νερά (ποτάμια και θαλασσινά), ιζήματα, μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια-γοβιοί (*gobio-gobio*), αχιμούς (*Paracentrotus lividus*) και στο υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna minor*.

Η επιλογή των φυτοπροστατευτικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με βάση την συχνότητα χρήσης, την αποδεδειγμένη παρουσία τους στο περιβάλλον σύμφωνα με την πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία και την εν δυνάμει επικινδυνότητά τους για την τροφική αλυσίδα και τον άνθρωπο. Οι επιλεγμένες ενώσεις ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες και διαφοροποιούνται ως προς τη δομή και την περιβαλλοντική τους συμπεριφορά. Συνολικά παρασκευάστηκαν δύο μείγματα ενώσεων (μείγμα I & II) βάσει των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των προτύπων ενώσεων.

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων του μείγματος I χρησιμοποιήθηκε σύστημα αέριας χρωματογραφίας Trace GC Ultra συζευγμένο με ανιχνευτή μάζας ISQ mass spectrometer της Thermo και αυτόματο δειγματολήπτη AI/AS 3000. Αντίστοιχα, για το μείγμα II η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερευψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (Ultra High Pressure Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry, UHPLC–HRMS) και συγκεκριμένα με τον υβριδικό αναλυτή μάζας LTQ/Orbitrap MS.

Η ποσοτικοποίηση σε όλα τα υποστρώματα κατά την βελτιστοποίηση, επικύρωση και εφαρμογή των μεθόδων, πραγματοποιήθηκε με καμπύλες αναφοράς προσομοιωμένες στο υπόστρωμα (matrix-matched calibration curves) ενώ χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα και εσωτερικά πρότυπα, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση ή υποεκτίμηση πραγματικών συγκεντρώσεων. Τα κριτήρια για τον ορθό ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό που εφαρμόστηκαν ήταν τα προβλεπόμενα από την οδηγία 2002/657/EK.

Για την εκχύλιση των υδατικών δειγμάτων, βελτιστοποιήθηκε, επικυρώθηκε και εφαρμόστηκε η μέθοδος της μαγνητικής εκχύλισης στερεάς φάσης (MSPE). Ως προσροφητικά υλικά χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια μαγνητίτη, επικαλυμμένα με στρώμα διοξειδίου του πυριτίου  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C}18$ . Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο θερμικής συγκαταβύθισης ιόντων δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου ( $\text{Fe}^{2+}$  και  $\text{Fe}^{3+}$ ) σε αλκαλικές συνθήκες, με υδροθερμική επεξεργασία. Τα συντεθειμένα υλικά, χαρακτηρίστηκαν ως προς

τη δομή, τη μορφολογία και τις ιδιότητες με τεχνικές NMR, FT-IR, TGA, SEM, DSC, XRD, ESI(+)-MS και BET.

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι κύριες επιδράσεις και τυχόν αλληλεπιδράσεις των σημαντικότερων παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση της MSPE, όπως (α) η ποσότητα προσροφητικού  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  (β) ο χρόνος εκχύλισης και (γ) ο χρόνος έκλουσης, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη πειραματικού σχεδιασμού βασιζόμενη στο σχέδιο Box-Behnken Design (BBD). Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό BBD, πραγματοποιήθηκαν 15 πειράματα και υψηλότερες ανακτήσεις παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν οι υψηλότερες ποσότητες προσροφητικού υλικού  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  και ο υψηλότερος χρόνος εκχύλισης. Τέλος, οι βέλτιστες συνθήκες, υπολογίστηκαν μέσω της συνάρτησης επιθυμητότητας (*desirability function*) του στατιστικού πακέτου STATISTICA7.0.

Κατά την μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης, 54 mg προσροφητικού υλικού προηγουμένως ενεργοποιημένα με 2 mL μεθανόλης, προστίθενται σε 10 mL υδατικού δείγματος. Τα δείγματα ανακινούνται σε συσκευή περιδίνησης και στη συνέχεια μεταφέρονται σε λουτρό υπερήχων. Τα νανοσωματίδια σιδήρου διαχωρίζονται από το διάλυμα με την χρήση μαγνήτη και το υπερκείμενο αποχύνεται. Οι προσροφημένοι στην επιφάνεια του προσροφητικού  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{C18}$  αναλυτές, εκλύονται με 2 x 1,5 mL οξικού αιθυλεστέρα. Τα δείγματα αναδεύονται, τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων και τέλος απομονώνονται τα μαγνητικά υλικά παρουσία μαγνητικού πεδίου. Το συνολικό έκλουσμα, ξηραίνεται παρουσία άνυδρου θειικού νατρίου, συμπυκνώνεται υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύεται σε 20 μL εξανίου.

Μελετήθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των μαγνητικών προσροφητικών υλικών για την εκχύλιση των επιλεγμένων αναλυτών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι ανακτήσεις για δύο από τους δέκα αναλυτές (chlorothalonil και λ-cyhalothrin) ήταν μικρότερες από 60 % κατά την διάρκεια του τέταρτου κύκλου, ενώ για τις υπόλοιπες ενώσεις οι ανακτήσεις ήταν μεγαλύτερες από 60 %. Τα RSDs των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 8 έως 19 %. Επομένως, τα μαγνητικά υλικά παρουσιάζουν σταθερότητα και δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, αφού η ικανότητα εκχύλισής τους παρέμεινε σταθερή και δύναται να χρησιμοποιηθούν για τρεις κύκλους, χωρίς να παρατηρείται μεταφορά των αναλυτών από το προσροφητικό (carry-over effect).

Τα αποτελέσματα από την επικύρωση της μεθόδου επιβεβαίωσαν την καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων. Συγκεκριμένα, οι ανακτήσεις των ενώσεων κυμάνθηκαν από 60 έως 99 %, η γραμμικότητα μεταξύ 0,9901 και 0,9999, τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν μεταξύ 6,4 και 206 ng/L ενώ η επαναληψιμότητα (RSD, %-

Intra) και η αναπαραγωγικότητα ( $RSD_R\%$ -Inter) μεταξύ των ημερών ήταν μικρότερη από 15% και 17% για όλες τις ενώσεις, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, η προτεινόμενη μέθοδος υδατικών δειγμάτων MSPE συγκρίθηκε με την κλασική υγρή στερεή εκχύλισης (SPE). Η SPE αποτελεί την πιο διαδεδομένη αναλυτική τεχνική εκχύλισης που προτείνεται από οργανισμούς προστασίας του Περιβάλλοντος, για τον προσδιορισμό ρύπων προτεραιότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα. Στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής επιλέχθηκαν δύο αναλυτικά πρωτόκολλα, ένα για κάθε μείγμα ενώσεων (μείγμα I & II), με διαφοροποιήσεις ως προς το προσροφητικό υλικό των μικροστηλών, τον διαλύτη ενεργοποίησης και έκλουσης και την ιοντική ισχύ. Οι μικροστήλες C18 ήταν το καταλληλότερο προσροφητικό για το μείγμα I, ενώ οι μικροστήλες Oasis HLB για το μείγμα II.

Για το μείγμα I, οι μικροστήλες καθαρίζονται 2 x 6 mL οξικού αιθυλεστέρα και η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού πραγματοποιείται με διαδοχική προσθήκη 2 x 6 mL μεθανόλης και 6 mL νερού LC-MS. Στη συνέχεια εκχυλίζονται 250 mL υδατικού δείγματος ( $pH=7$ ), στο οποίο είχε προηγουμένως προστεθεί 2 % μεθανόλη. Μετά από έκπλυση με 5 mL υπερ-κάθαρου νερού, οι προσροφημένες στην επιφάνεια του προσροφητικού ενώσεις, εκκλύονται με 2 x 6 mL οξικού αιθυλεστέρα. Το έκλουσμα ξηραίνεται παρουσία άνυδρου θειικού νατρίου, συμπυκνώνεται υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύεται σε 100  $\mu$ L εξανίου.

Για το μείγμα II, οι μικροστήλες ενεργοποιούνται με 6 mL μεθανόλης και 6 mL νερού LC-MS, πριν τη διέλευση 250 mL υδατικού δείγματος ( $pH=7$ ). Οι μικροστήλες εκπλαίνονται με 6 mL υπερ-κάθαρου νερού. Στην συνέχεια ακολουθεί έκλυση με 3 mL διχλωρομεθανίου, 3 mL εξανίου και 3 mL ακετόνης. Το συνολικό έκλουσμα συμπυκνώνεται υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύεται σε 200  $\mu$ L 0,1 % μυρμηκικό οξύ σε νερό:μεθανόλη 90:10 (v/v).

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά κατά την επικύρωση των μεθόδων, αποδεικνύουν την καταλληλότητα της SPE για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων στα φυσικά νερά. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις του μείγματος I στα ποτάμια νερά, οι τιμές των ανακτήσεων για τα τρία επίπεδα εμβολιασμού κυμάνθηκαν μεταξύ 69,3-92,6 % (χαμηλό), 71,3-99,1 % (μεσαίο) και 81,6-103 % (υψηλό) αντίστοιχα. Για τα θαλασσινά νερά, οι ανακτήσεις ήταν ελαφρώς υψηλότερες λόγω αύξησης ιοντικής ισχύος (72-111 %). Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα  $RSD_r\%$ -Intra και η αναπαραγωγικότητα  $RSD_R\%$ -Inter ήταν μικρότερη από 14%. Τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν μεταξύ 3,3 και 40 ng/L για το ποτάμιο νερό και 3,3 και 33 ng/L για το θαλασσινό.

Οι ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων του μείγματος II, σε θαλασσινό νερό κυμάνθηκαν από 83,2-93,1 %, 90,1-97,5 % και 92,6-97,4 % για το χαμηλό, μεσαίο και υψηλό

επίπεδο εμβολιασμού αντίστοιχα. Η επαναληψιμότητα  $RSD_r\%$ -Intra ήταν μικρότερη από 8,9 % και η αναπαραγωγικότητα  $RSD_r\%$ -Inter ήταν μικρότερη από 11,2 % για όλους τους αναλύτες. Τέλος, τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν μεταξύ 0,3 και 12,5 ng/L.

Η εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από υποστρώματα όπως: αχινοί (*Paracentrotus lividus*), μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), ψάρια-γοβιοί (*Gobio-gobio*) και το υδρόβιο μακρόφυτο (*Lemna Minor*) πραγματοποιήθηκε με τη σύγχρονη μέθοδο QuEChERS ακολουθούμενη από το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) με εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (d-SPE). Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα προσροφητικά της εκχύλισης για το μείγμα I στα υποστρώματα ιζήματα, μύδια, ψάρια-γοβιοί και αχινοί επιλέχθηκε το πρωτότυπο πρωτόκολλο εκχύλισης (original), ενώ για το υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna Minor*, τα ιζήματα (μείγμα II) και τους αχινοί (μείγμα II) επιλέχθηκε η προσέγγιση AOAC.2007.01 (6 g  $MgSO_4$ , 1,5 g NaOAc). Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο (10 mL), με προσθήκη 0,1 % οξικού οξέος (v/v) στην περίπτωση του πρωτοκόλλου AOAC.2007.01. Παράγοντες βελτιστοποίησης αποτέλεσαν η ποσότητα δείγματος, ο όγκος νερού, οι χρόνος εκχύλισης και περιδίνησης καθώς επίσης και διαφορετικοί συνδυασμοί. Τα τελικά εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκαν σε 100 μL εξανίου (μείγμα I) και σε 200 μL νερό:μεθανόλη 90:10 (v/v) με μυρμηκικό οξύ 0,1% (v/v).

Τα αποτελέσματα από την επικύρωση της μεθόδου QuEChERS για τα παραπάνω πρωτόκολλα, επιβεβαιώνουν την καταλληλότητά της για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων στα παραπάνω στερεά υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα, για το μείγμα I στα ιζήματα οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 51,2 και 118 %, τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 3,3 και 29 ng/g, η επαναληψιμότητα ( $RSD_r\%$ -Intra) ήταν μικρότερη από 11 % και η αναπαραγωγικότητα ( $RSD_r\%$ -Inter) μικρότερη από 14 %.

Στους γοβιούς (*gobio-gobio*), οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 53,6 και 109 %, τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 3,3 και 26 ng/g, η επαναληψιμότητα ( $RSD_r\%$ -Intra) ήταν μικρότερη από 14% και η αναπαραγωγικότητα ( $RSD_r\%$ -Inter) μικρότερη από 16 %. Για τα μύδια (*Mytilus galloprovincialis*), οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν εντός εύρους 51,6-108 %, τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ 3,3 και 16 ng/g, ενώ η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγικότητα μικρότερη από 15 και 17 % αντίστοιχα. Για τους αχινοί (*paracentrotus lividus*) οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 52,2 έως 103 %, τα όρια ποσοτικοποίησης από 3,3 έως 33 ng/g, η επαναληψιμότητα ( $RSD_r\%$ -Intra) ήταν μικρότερη από 12 % και η αναπαραγωγικότητα μικρότερη από 13 %. Για το υδρόβιο μακρόφυτο *Lemna Minor* οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν μεταξύ 59,1 και 116 %, τα όρια ποσοτικοποίησης μεταξύ από 3,3 έως 33 ng/g, η

επαναληψιμότητα (RSDr %-Intra) ήταν μικρότερη από 11 % και η αναπαραγωγιμότητα μικρότερη από 15 %.

Για τις ενώσεις του μείγματος II για τα ιζήματα οι ανακτήσεις της μεθόδου QuEChERS κυμάνθηκαν μεταξύ 84,3 και 106 %, τα όρια ποσοτικοποίησης από 3,3 έως 29 ng/g, η επαναληψιμότητα (RSDr %-Intra) μικρότερη από 8,1 % και η αναπαραγωγιμότητα μικρότερη από 10 %. Για το υπόστρωμα των αχινών, οι ανακτήσεις της μεθόδου QuEChERS κυμάνθηκαν μεταξύ 85,9 και 103 %, τα όρια ποσοτικοποίησης από 2,9 έως 31 ng/g, η επαναληψιμότητα (RSDr %-Intra) μικρότερη από 9,5 % και η αναπαραγωγιμότητα μικρότερη από 12 %.

Με βάση τις παραπάνω μεθοδολογίες, ερευνήθηκε η παρουσία των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στον υγρότοπο του Δέλτα των ποταμών Αξιού, Λουδία, Αλιάκμονα, έναν υδροβιότοπο μεγάλης περιβαλλοντικής σημασίας και έκτασης, ο οποίος προστατεύεται από τις συνθήκες Ramsar και Βέρνης. Συνολικά ορίστηκαν 15 σημεία δειγματοληψίας επί των ποταμών από τις πηγές μέχρι και τις εκβολές στον Θερμαϊκό κόλπο. Κατά την περίοδο Ιανουάριος 2018 έως Σεπτέμβριος 2018 πραγματοποιήθηκαν τρεις δειγματοληψίες και συλλέχθηκαν πάνω από 80 δείγματα μεταξύ των οποίων επιφανειακά ύδατα, ιζήματα, μύδια, ψάρια και υδρόβια μακρόφυτα (*Lemna Minor*).

Οι συχνότερα απαντώμενες ενώσεις στα νερά ήταν οι resmethrin, parathion-methyl και irgarol, ενώ δεν ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις ethoxyquine, chlorothalonil και chlorpyrifos-methyl. Στον ποταμό Αλιάκμονα, το 75 % των δειγμάτων (n=18) συμμορφώνονται με τα πρότυπα ποιότητας πόσιμου νερού (Drinking Water Quality Standard- DWQs) και με την Οδηγία 2000/60/ΕΚ (98/83/ΕΚ) για το πόσιμο νερό καθώς η μέγιστη συγκέντρωση για κάθε φυτοφάρμακο είναι μικρότερη από 0,1 µg/L.

Η Οδηγία 2013/39/ΕΕ, θεσπίζει ανώτατα επιτρεπτά όρια συγκεντρώσεων για 45 ουσίες προτεραιότητας και ρύπους, στον τομέα των επιφανειακών, παράκτιων και μεταβατικών υδάτων. Η ένωση atrazine παρουσίασε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση (EQs=2 µg/L) σε όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας κατά μήκος των ποταμών Λουδία και Αξιού.

Η ένωση chlorpyrifos παρουσίασε ελαφρώς υψηλότερη τιμή από τα EQs στις εκβολές Λουδία (SS:9), από τη μέση τιμή με συγκέντρωση 0,078 µg/L (EQs=0,03 µg/L) και από την θεσμοθετημένη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση με τιμή 0,234 µg/L (EQs=0,1 µg/L).

Κατά τη διάρκεια της μελέτης παρακολούθησης (monitoring study) στα ιζήματα, το 70 % των δειγμάτων ήταν απαλλαγμένα από φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Συνολικά ανιχνεύθηκαν επτά φυτοπροστατευτικές ενώσεις και συγκεκριμένα τα εντομοκτόνα parathion-methyl, permethrin, chlorpyrifos και λ-cyhalothrin, τα ζιζανιοκτόνα atrazine και

irgarol (βιοκτόνο) και το μυκητοκτόνο chlorothalonil. Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που ανιχνεύθηκαν κυμαίνονται από 12,3 ng/g για το atrazine έως 78,2 ng/g για το permethrin.

Στους γοβιούς (*gobio-gobio*) ανιχνεύθηκαν συνολικά δύο φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα εντομοκτόνα chlorpyrifos (9,3 ng/g) και λ-cyhalothrin (18,1 ng/g), ενώ στα μύδια (*Mytilus galloprovincialis*) ανιχνεύθηκε μόνο το εντομοκτόνο chlorpyrifos με συγκεντρώσεις 10,1 ng/g (Απρίλιος '18) και 14,1 ng/g (Σεπτέμβριος '18) αντίστοιχα. Στο υδρόβιο μακρόφυτο *L.Minor*, δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης.

Επιπρόσθετα, οι προτεινόμενες μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν στην ανάλυση δειγμάτων στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού ερευνητικού έργου "*Real-time monitoring of sea contaminants by an autonomous Lab-on-a-chip biosensor*".

Συνολικά ορίστηκαν 33 σταθμοί δειγματοληψίας σε χώρες που δραστηριοποιούνται υδατοκαλλιέργειες όπως η Ελλάδα, Αλβανία, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Νορβηγία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Κατά το διάστημα Απρίλιος 2016 έως Ιούνιος 2016, συλλέχθηκαν 27 υδατικά δείγματα, 25 ιζήματα και 6 δείγματα αχινών.

Στα δείγματα των ιζημάτων που συλλέχθηκαν από την Πορτογαλία (PT-17) και το Ην. Βασίλειο (UK-21) ανιχνεύθηκε το βιοκτόνο irgarol με συγκέντρωση 95,2 ng/g και 1,3 ng/g αντίστοιχα. Η ίδια ένωση ανιχνεύθηκε και σε ένα υδατικό δείγμα από την Ιταλία (IT-9) με συγκέντρωση 4,3 ng/g.

Τέλος, στα δείγματα αχινών που συλλέχθηκαν από τις Πορτογαλικές ακτές Carreges, Praia Norte και Vila Chã (νότια και βόρεια κάθε σημείου) κοντά σε μονάδες υδατοκαλλιέργειες, δεν ανιχνεύθηκε καμία φυτοπροστατευτική ένωση πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης. Δύο εντομοκτόνα ανιχνεύθηκαν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, το chlorpyrifos στην περιοχή Vila Chã και το permethrin στο σημείο του Praia Norte (Βόρειο).

Η εκτίμηση της επικινδυνότητας (οξείας και χρόνιας) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του πηλίκου για τα τρία τροφικά επίπεδα (φύκη, ασπόνδυλα και ψάρια). Από τους υπολογισμούς των πηλίκων επικινδυνότητας για τα δεδομένα οξείας τοξικότητας, σοβαρότερες πιέσεις δέχεται η ταξινομική ομάδα του ζωοπλαγκτόν. Συγκεκριμένα, υψηλή τοξικότητα εμφάνισαν οι ενώσεις parathion-methyl, chlorpyrifos, resmethrin και permethrin. Τα ζιζανιοκτόνα atrazine και irgarol παρουσίασαν πολύ υψηλό κίνδυνο για τα άλγη  $RQ > 1$ , γεγονός που σχετίζεται με την δράση τους έναντι των φυτών-εχθρών, μπλοκάροντας τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Για την ομάδα των ψαριών υψηλό κίνδυνο εμφάνισαν οι ενώσεις chlorpyrifos, resmethrin, permethrin και λ-cyhalothrin.

Ο υπολογισμός των πηλίκων επικινδυνότητας για τα δεδομένα χρόνιας τοξικότητας

## Συμπεράσματα

στα φύκη κατέδειξε ότι καμία φυτοπροστατευτική ένωση δεν εμφανίστηκε υψηλή τοξικότητα. Η ταξινομική ομάδα των ψαριών δέχεται τις σοβαρότερες πιέσεις από την παρουσία των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και συγκεκριμένα των εντομοκτόνων chlorpyrifos, resmethrin, permethrin και λ-cyhalothrin. Τέλος, για την ταξινομική ομάδα του ζωοπλακτόν, πολύ υψηλό κίνδυνο παρουσίασαν τα εντομοκτόνα chlropryifos και λ-cyhalothrin.





**Βιβλιογραφία**

- Afolabi H., Mudalip S., Alara O., 2018. Microwave-assisted extraction and characterization of fatty acid from eel fish (*Monopterus albus*). *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 7, 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.04.003>
- Affum A., Acquaaah S., Osae S., Kwaansa-Ansah E., 2018. Distribution and risk assessment of banned and other current-use pesticides in surface and groundwaters consumed in an agricultural catchment dominated by cocoa crops in the Ankobra Basin, Ghana. *Sci. Total Environ.* 633, 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.129>
- Aguilar-Arteaga K., Rodriguez J., Barrado E., 2010. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta* 674, 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.043>
- Ahmad W., Al-Sibaai A., Bashammakh A., Alwael H., El-Shahawi M., 2015. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 72, 181–192. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.04.022>
- Ahmadi M., Elmongy H., Madrakian T., Abdel-Rehim M., 2017. Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review. *Anal. Chim. Acta.* <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.062>
- Akbarzadeh A., Samiei M., Davaran S., 2012. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* 7, 144. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-144>
- Akitt J. and Mann B., 2017. *NMR and Chemistry.* CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315274690>
- Akoto O., Azuure A., Adotey K., 2016. Pesticide residues in water, sediment and fish from Tono Reservoir and their health risk implications. *Springerplus* 5, 1849. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3544-z>
- Alalibo K., Patricia U., Ransome D., 2019. Effects of Lambda Cyhalothrin on the behaviour and histology of gills of *Sarotherodon melanotheron* in brackish water. *Sci. African* 6. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00178>
- Alara O., Abdurahman N., Ukaegbu C., 2018. Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 11, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.07.003>
- Albanis T.A., 1991. Runoff losses of EPTC, Molinate, Simazine, Diuron, Propanil and Metolachlor in Thermaikos Gulf, N. Greece. *Chemosphere* 22, 645–653. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(91\)90292-L](https://doi.org/10.1016/0045-6535(91)90292-L)

- Albanis T.A., Lambropoulou D.A., Sakkas V.A., Konstantinou I.K., 2002. Antifouling paint booster biocide contamination in greek marine sediments. *Chemosphere* 48, 475–485. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00134-0)
- Albanis T., Danis T., Voutsas D., Kouimtzis T., 1995. Evaluation Of Chemical Parameters In Aliakmon River Northern Greece. Part III. Pesticides. *J. Environ. Sci. Heal. Part A Environ. Sci. Eng. Toxicol.* 30, 1945–1956. <https://doi.org/10.1080/10934529509376314>
- Albanis T., Vosniakos F., Nikolaou K., Vasilikiotis G., Kochubovski M., Gjorgjef D., Diamantopoulos C., Lampropoulou D., Zavlaris K., Selimi P., 2009. Axios River Pollution. Part I. the Pesticides. *J. Environ. Prot. Ecol.* 10, 32–36.
- Albert C., Ferrari L., Fröhlich J., Schlein B., 2006. Magnetism and the weiss exchange field-a theoretical analysis motivated by recent experiments. *J. Stat. Phys.* 125, 77–124. <https://doi.org/10.1007/s10955-006-9120-0>
- Alexandridis T., Lazaridou E., Topaloglou C., Zalidis G., 2006a. Remotely sensed baseline data for monitoring the protected wetland of delta Axios-Loudias-Aliakmonas. *Fresenius Environmental Bulletin* 15, 1161-1167
- Alexandridis T., Zalidis G., 2006b. Chlorophyll- $\alpha$ , total suspended matter and sea surface temperature for monitoring water quality of Thermaikos gulf (Greece). *Fresenius Environmental Bulletin* 10, 2636-2644
- Ali A., Zafar H., Zia M., Ul Haq I., Phull A., Ali J., Hussain, A., 2016. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 9, 49–67. <https://doi.org/10.2147/NSA.S99986>
- Ali M., Chen J., Zhang H., Li Z., Zhao L., Qiu H., 2019. Effective extraction of flavonoids from *Lycium barbarum* L. fruits by deep eutectic solvents-based ultrasound-assisted extraction. *Talanta* 203, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.012>
- Alim S., Vejayan J., Yusoff M., Kafi A., 2018. Recent uses of carbon nanotubes & gold nanoparticles in electrochemistry with application in biosensing: A review. *Biosens. Bioelectron.* <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.051>
- Álvarez-Muñoz D., Rodríguez-Mozaz S., Maulvault A., Tediosi A., Fernández-Tejedor M., Van den Heuvel F., Kotterman M., Marques A., Barceló D., 2015. Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environ. Res.* 143, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.09.018>
- Amara I., Miled W., Slama R. Ben, Ladhari N., 2018. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*

- <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.12.001>
- Amde M., Liu J.F., Pang L., 2015. Environmental Application, Fate, Effects, and Concerns of Ionic Liquids: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 49, 12611–12627. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03123>
- Anastassiades M., Lehotay S., Štajnbaher D., Schenck F., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412–431. <https://doi.org/10.1021/jf00110a037>
- Andrade-Eiroa A., Canle M., Leroy-Cancellieri V., Cerdà V., 2016a. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80, 641–654. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>
- Andrade-Eiroa A., Canle M., Leroy-Cancellieri V., Cerdà V., 2016b. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80, 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>
- Antonopoulou M., Konstantinou I., 2013. Optimization and Modeling of the Photocatalytic Degradation of the Insect Repellent DEET in Aqueous TiO<sub>2</sub> Suspensions. *CLEAN - Soil, Air, Water* 41, 593–600. <https://doi.org/10.1002/clen.201200405>
- Arisekar U., Shakila R., Jeyasekaran G., Shalin R., Kumar P., Malani A., Rani V., 2018. Accumulation of organochlorine pesticide residues in fish, water, and sediments in the Thamirabarani river system of southern peninsular India. *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.* 11, 100194. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2018.11.003>
- Aschenbrenner O., Supasitmongkol S., Taylor M., Styring P., 2009. Measurement of vapour pressures of ionic liquids and other low vapour pressure solvents. *Green Chem.* 11, 1217. <https://doi.org/10.1039/b904407h>
- Asensio-Ramos M., Hernández-Borges J., Borges-Miquel T., Rodríguez-Delgado M., 2011. Ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1218, 4808–4816. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.11.030>
- Awad W., Gilman J., Nyden M., Harris R., Sutto T., Callahan J., Trulove P., DeLong H., Fox D., 2004. Thermal degradation studies of alkyl-imidazolium salts and their application in nanocomposites. *Thermochim. Acta* 409, 3–11. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(03\)00334-4](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(03)00334-4)

- Azis M., Asia L., Pira A., Buchari B., Doumenq P. and Setiyanto P., 2018, "Matrix effects on organic pollutants in marine sediment", *Journal of Physics, Conf. Ser.* 1013 012193, doi:10.1088/1742-6596/1013/1/012193
- Azzouz A., Kailasa S., Lee S., J. Rascón A., Ballesteros E., Zhang M., Kim K., 2018. Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.009>
- Bai S.S., Li.Z., Zang X.H., Wang C., Wang Z., 2013. Graphene-based magnetic solid phase extraction-dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatographic method for determination of five acetanilide herbicides in water and green tea samples. *Fenxi Huaxue/ Chinese J. Anal. Chem.* 41, 1177–1182. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60672-6](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60672-6)
- Baker G.A., Baker S.N., Pandey S., Bright F.V., 2005. An analytical view of ionic liquids. *Analyst* 130, 800. <https://doi.org/10.1039/b500865b>
- Balmer, J.E., Morris, A.D., Hung, H., Jantunen, L., Vorkamp, K., Rigét, F., Evans, M., Houde, M., Muir, D.C.G., 2019. Levels and trends of current-use pesticides (CUPs) in the arctic: An updated review, 2010–2018. *Emerg. Contam.* 5, 70–88. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2019.02.002>
- Balsebre A., Báez M.E., Martínez J., Fuentes E., 2018. Matrix solid-phase dispersion associated to gas chromatography for the assessment in honey bee of a group of pesticides of concern in the apicultural field. *J. Chromatogr. A* 1567, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.062>
- Barbieri M.V., Postigo C., Guillem-Argiles N., Monllor-Alcaraz L.S., Simionato J.I., Stella E., Barceló D., López de Alda M., 2019. Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. *Sci. Total Environ.* 653, 958–967. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.289>
- Bee A., Massart R., Neveu S., 1995. Synthesis of very fine maghemite particles. *J. Magn. Mater.* 149, 6–9. [https://doi.org/10.1016/0304-8853\(95\)00317-7](https://doi.org/10.1016/0304-8853(95)00317-7)
- Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escalera L.A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta.* <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bi W., Tian M., Row K.H., 2011. Ultrasonication-assisted extraction and preconcentration of medicinal products from herb by ionic liquids. *Talanta* 85, 701–706. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2011.04.054>
- Bonanse R.I., Amé M.V., Wunderlin D.A., 2013. Determination of priority pesticides in water

- samples combining SPE and SPME coupled to GC–MS. A case study: Suquía River basin (Argentina). *Chemosphere* 90, 1860–1869. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.10.007>
- Bonhôte P., Dias A.P., Papageorgiou N., Kalyanasundaram K., Grätzel M., 1996. Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts <sup>†</sup>. *Inorg. Chem.* 35, 1168–1178. <https://doi.org/10.1021/ic951325x>
- Böttcher T., Schroll R., 2007. The fate of isoproturon in a freshwater microcosm with *Lemna minor* as a model organism. *Chemosphere* 66, 684–9.
- Bouriou M., Mazzitelli J.Y., Marty P., Budzinski H., Aleya L., Bonnafé E., Geret F., 2018. Assessment of *Lemna minor* (duckweed) and *Corbicula fluminea* (freshwater clam) as potential indicators of contaminated aquatic ecosystems: responses to presence of psychoactive drug mixtures. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 11192–11204.
- Brumovský M., Bečanová J., Kohoutek J., Borghini M., Nizzetto L., 2017. Contaminants of emerging concern in the open sea waters of the Western Mediterranean. *Environ. Pollut.* 229, 976–983. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.082>
- Brunner G., 2009. Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *J. Supercrit. Fluids* 47, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2008.09.002>
- Bruzzoniti M.C., Checchini L., De Carlo R.M., Orlandini S., Rivoira L., Del Bubba M., 2014. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 4089–4116. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7798-4>
- Bunaciu A.A., Udriștioiu E. gabriela Aboul-Enein H.Y., 2015. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.949616>
- Bureau S., Cozzolino D., Clark C.J., 2019. Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. *Postharvest Biol. Technol.* 148, 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2018.10.003>
- Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2, MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Cacho J.I., Campillo N., Viñas P., Hernández-Córdoba M., 2016. Improved sensitivity gas chromatography–mass spectrometry determination of parabens in waters using ionic liquids. *Talanta* 146, 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.022>
- Caldas S.S., Rombaldi C., de Oliveira Arias J.L., Marube L.C., Primel E.G., 2016. Multi-residue

- method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 146, 676–688. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.06.047>
- Capriotti A.L., Cavaliere C., Foglia P., Samperi R., Stampachiachchiere S., Ventura S., Laganà A., 2015. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends Anal. Chem.* 71, 186–193. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.03.012>
- Carmona E., Andreu V., Picó Y., 2017. Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish—Turia River as case study. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 146, 117–125.
- Carvalho R.F., Bromilow R.H., Greenwood R., 2007. Uptake of pesticides from water by curly waterweed *Lagarosiphon major* and lesser duckweed *Lemna minor*. *Pest Manag. Sci.* 63, 789–797.
- Ccancapa A., Masiá A., Navarro-Ortega A., Picó Y., Barceló D., 2016. Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment. *Environ. Pollut.* 211, 414–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059>
- Chatzimitakos T., Binellas C., Maidatsi K., Stalikas C., 2016. Magnetic ionic liquid in stirring-assisted drop-breakup microextraction: Proof-of-concept extraction of phenolic endocrine disrupters and acidic pharmaceuticals. *Anal. Chim. Acta* 910, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.015>
- Chen M., Yi Q., Hong J., Zhang L., Lin K., Yuan D., 2015. Simultaneous determination of 32 antibiotics and 12 pesticides in sediment using ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Methods* 7, 1896–1905. <https://doi.org/10.1039/C4AY02895C>
- Clare B., Sirwardana A., MacFarlane D.R., 2009. Synthesis, Purification and Characterization of Ionic Liquids, in: *Topics in Current Chemistry*. pp. 1–40. [https://doi.org/10.1007/128\\_2008\\_31](https://doi.org/10.1007/128_2008_31)
- Clark K.D., Nacham O., Purslow J.A., Pierson S.A., Anderson J.L., 2016. Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta* 934, 9–21. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2016.06.011>
- Clark K.D., Nacham O., Yu H., Li T., Yamsek M.M., Ronning D.R., Anderson J.L., 2015. Extraction of DNA by magnetic ionic liquids: Tunable solvents for rapid and selective DNA analysis. *Anal. Chem.* 87, 1552–1559. <https://doi.org/10.1021/ac504260t>
- Claver A., Ormad P., Rodríguez L., Ovelleiro J.L., 2006. Study of the presence of pesticides in

- surface waters in the Ebro river basin (Spain). *Chemosphere* 64, 1437–1443.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.034>
- Cruzeiro C., Amaral S., Rocha E., Rocha M.J., 2017. Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.010>
- Cruz-Vera M., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M., 2009. One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1216, 6459–6465.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2009.07.040>
- Cushing B.L., Kolesnichenko V.L., O'Connor C.J., 2004. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* 104, 3893–3946.  
<https://doi.org/10.1021/cr030027b>
- Das R.N., Roy K., 2013. Advances in QSPR/QSTR models of ionic liquids for the design of greener solvents of the future. *Mol. Divers.* 17, 151–196.  
<https://doi.org/10.1007/s11030-012-9413-y>
- Dendisová M., Jenišťová A., Parchaňská-Kokaislová A., Matějka P., Prokopec V., Švecová M., 2018. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. *Anal. Chim. Acta* 1031, 1–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.046>
- Deng N., Li M., Zhao L., Lu C., de Rooy S.L., Warner I.M., 2011. Highly efficient extraction of phenolic compounds by use of magnetic room temperature ionic liquids for environmental remediation. *J. Hazard. Mater.* 192, 1350–1357.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.053>
- Dhara K., Debiprosad R.M., 2019. Review on nanomaterials-enabled electrochemical sensors for ascorbic acid detection. *Anal. Biochem.* 586, 113415.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113415>
- DisQue (2011), "QuEChERS PROCEDURE for Multi-RESidue PESTICIDE ANALYSIS-disQue dispersive Sample Preparation", Waters.  
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003643en.pdf>
- Domínguez I., Romero González R., Arrebola Liébanas F.J., Martínez Vidal J.L., Garrido Frenich A., 2016. Automated and semi-automated extraction methods for GC–MS determination of pesticides in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 12, 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/J.TEAC.2016.09.001>
- Dong K., Wang Q., Lu X., Zhou Q., Zhang S., 2014. Structure, Interaction and Hydrogen Bond.

- pp. 1–38. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38619-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38619-0_1)
- Drost W., Matzke M., Backhaus T., 2007. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere* 67, 36–43.
- Dzyuba S.V., Bartsch R.A., 2002. Influence of Structural Variations in 1-Alkyl(aralkyl)-3-Methylimidazolium Hexafluorophosphates and Bis(trifluoromethylsulfonyl)imides on Physical Properties of the Ionic Liquids. *ChemPhysChem* 3, 161–166. [https://doi.org/10.1002/1439-7641\(20020215\)3:2<161::AID-CPHC161>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1439-7641(20020215)3:2<161::AID-CPHC161>3.0.CO;2-3)
- EC (2011), European Commission, ([https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/pesticidesdatabase/%20%CE%9A%CE%B1%CE%BD.%20\(%CE%95%CE%95\)%20540/2011](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/pesticidesdatabase/%20%CE%9A%CE%B1%CE%BD.%20(%CE%95%CE%95)%20540/2011))
- EEA (2018), European Environmental Agency, ([https://www.eea.europa.eu/airs/2\\_018/environment-and-health/pesticides-sales](https://www.eea.europa.eu/airs/2_018/environment-and-health/pesticides-sales))
- EFSA (2015), European Food Safety Authority, Safety and efficacy of ethoxyquin (6-ethoxy-1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinoline) for all animal species, <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4272>
- EFSA (2019), European Food Safety Authority, Chlorpyrifos: assessment identifies human health effects, <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/chlorpyrifos-assessment-identifies-human-health-effects>
- Elbashir A.A., Aboul-Enein H.Y., 2018. Application of gas and liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry in pesticides: Multiresidue analysis. *Biomed. Chromatogr.* 32, e4038. <https://doi.org/10.1002/bmc.4038>
- Elkins A.C., Deseo M.A., Rochfort S., Ezernieks V., Spangenberg G., 2019. Development of a validated method for the qualitative and quantitative analysis of cannabinoids in plant biomass and medicinal cannabis resin extracts obtained by super-critical fluid extraction. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1109, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.01.027>
- EMFF (2016), European Maritime and Fisheries Fund (EMFF) "United Kingdom-Overview", [https://issuu.com/capnh/docs/op-united-kingdom-fact-sheet\\_en](https://issuu.com/capnh/docs/op-united-kingdom-fact-sheet_en).
- Europe.eu (European Commission Investigation), “Verification of Vulnerable Zones Identified Under the Nitrate Directive\and sensitive areas Identified under the Urban Waste Water Treatment Directive – Greece”, <https://ec.europa.eu/environment/water/water-urbanwaste/pdf/greece.pdf>



## Βιβλιογραφία

- European Commission (1979), Council Directive 79/409/EEC of 2 April 1979 on the conservation of wild birds. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=LEGISSUM%3A128046>
- European Commission (1992), Council Directive 92 /43 /EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31992L0043&from=EL>
- European Commission (1993), Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993 laying down the principles for assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A31993L0067>
- European Commission (1998), Council directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption. Off J Eur Communities 330:32–54. doi: 2004R0726 - v.7 of 05.06.2013
- European Commission (2000), Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Off J Eur Communities 327:1–72. doi: 2004R0726 - v.7 of 05.06.2013
- European Commission (2000b), European Commission Directive 2000/817/EC of the European Parliament and of the Council <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32000D0817>
- European Commission (2002), Directive 2002/79/EK/EC of the European Parliament and the Council of 2 October 2002 on as regards the fixing of maximum levels for certain pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables amending Council Directive 76/895/EEC. Off. J. Eur. Communities
- European Commission (2002b), Commission Decision 2002/657/EC, of the European Parliament and the Council of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Commun., L221, 2002, 8–36.
- European Commission (2003), European Commission Directive 2003/166/EC of the European Parliament and of the Council Regulation <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32003D0166>
- European Commission (2005), Directive 2005/396/EC of the European Parliament and the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and

- feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. Off. J. Eur. Communities
- European Commission (2006), Council Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals' products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquaculture. Official J Eur Union 328:14–56. doi: 10.1111/jfd.12323
- European Commission (2008a), Directive 2008/105/EC of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/ECC, 86/280/ECC and amending Directive 2000/60/EC. Off J Eur Union L348:84–97. doi: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32008L0105>
- European Commission (2008), Directive 2008/56/EC of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union 164:19–40. doi: 10.1016/j.biocon.2008.10.006
- European Commission (2009), Directive 2009/128/EC of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Off J Eur Communities 309:71–86. doi: 10.3000/17252555.L\_2009.309
- European Commission (2009), Commission Directive No 1107/2009 of 21 October 2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32009R1107>
- European Commission (2013), Directive 2013/39/EU amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Off J Eur Union 226:1–17.
- European Commission (2015), Commission Implementing Regulation (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union L78/40:20–30.
- European Commission (2017), European Commission Directive 2017/962/EC of the European Parliament and of the Council. Off J Eur Union [http://data.europa.eu/eli/reg\\_impl/2017/962/oj](http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2017/962/oj)
- European Commission (2018), European Commission Directive 2018/1262/EC of the European Parliament and of the Council [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L\\_.2018.2.38.01.0062.01.ENG](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2018.2.38.01.0062.01.ENG)

- European Council (2006), Parliamentary Questions on of 20 February 2006 on pollution of the River Axios <http://europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEX T+WQ+E-2006-0637+0+DOC+XML+V0//EL>
- Eurostat (2016), European Statistics, Sales of pesticides in the EU (<https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/DDN-20181015-1>)
- Eurostat (2019), European Statistics, Pesticide sales (<https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/submitViewTableAction.do>)
- Eurostat (2012), Agriculture forestry and fishery statistics 2012 edition, Eurostat. <https://doi.org/10.2785/3341>
- Exe-Plan (2016), Estuary Management Plan, "Protecting our Estuary for future generations, 2016". <http://www.licco.eu/wp-content/uploads/2015/03/1.-Preface Contents4.pdf>
- Fan, C., Liang, Y., Dong, H., Ding, G., Zhang, W., Tang, G., Yang, J., Kong, D., Wang, D., Cao, Y., 2017. In-situ ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction using a new anion-exchange reagent combined Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for determination of pyrethroid pesticides in water samples. *Anal. Chim. Acta* 975, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.036>
- FAO (2005), Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries & Aquaculture Department, "National Aquaculture Sector Overview - Norway". [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso\\_norway/en](http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_norway/en)
- FAO (2016), The State of World Fisheries and Aquaculture 2016, Contributing to food security and nutrition for all. doi: 10.5860/CHOICE.50-5350
- Faraji M., Noorani M., Nasiri Sahneh B., 2017. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Method Followed by Ionic Liquid-Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of Trace Amount of Bisphenol A in Canned Foods. *Food Anal. Methods* 10, 764–772. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0635-y>
- Fekete-Kertész I., Kunglné-Nagy Z., Gruiz K., Magyar Á., Farkas É., Molnár M., 2015. Assessing Toxicity of Organic Aquatic Micropollutants Based on the Total Chlorophyll Content of Lemna minor as a Sensitive Endpoint. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 59, 262–271.
- Feo M.L., Eljarrat E., Barceló D., Barceló D., 2010. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* 29, 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.03.011>
- Ferhan A.R., Zainol N., Kim D.-H., 2015. A facile method towards rough morphology polymer brush for increased mobility of embedded nanoparticles. *Polymer (Guildf)*. 75, 57–63. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2015.08.027>

- Ferronato G., Viera M., Prestes O., Adaime M., Zanella R., 2018. Determination of organochlorine pesticides (OCPs) in breast milk from Rio Grande do Sul, Brazil, using a modified QuEChERS method and gas chromatography-negative chemical ionisation-mass spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 98, 1005–1016. <https://doi.org/10.1080/03067319.2018.1518441>
- Freitas S., Serafim F., Lanças F., Freitas S., Serafim F., Lanças F., 2018. Determination of Target Pesticide Residues in Tropical Fruits Employing Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Extraction Followed by High Resolution Gas Chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.* 29, 1140–1148. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180041>
- Fu X., Cai J., Zhang X., Li W., Di Ge H., Hu Y., 2018. Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.006>
- Fuentes E., Báez M.E., Quiñones A., 2008. Suitability of microwave-assisted extraction coupled with solid-phase extraction for organophosphorus pesticide determination in olive oil. *J. Chromatogr. A* 1207, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.08.051>
- Gadelha J., Rocha A.C., Camacho C., Eljarrat E., Peris A., Aminot Y., Readman J., Boti, V., Nannou C., Kapsi M., Albanis T., Rocha F., Machado A., Bordalo A., Valente L., Nunes M., Marques A., Almeida C., 2019. Persistent and emerging pollutants assessment on aquaculture oysters (*Crassostrea gigas*) from NW Portuguese coast (Ria De Aveiro). *Sci. Total Environ.* 666, 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.280>
- Gaffney J.S., Marley, N.A. 2018. Chemical Measurements and Instrumentation, in: *General Chemistry for Engineers*. Elsevier, pp. 493–532. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810425-5.00015-1>
- Gao Y., Zhou Q., Xie G., Yao Z., 2012. Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with HPLC with ultraviolet detector for the determination of fungicides. *J. Sep. Sci.* 35, 3569–3574. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200553>
- Gardecka A.J., 2016. Synthesis and characterization of niobium doped TiO<sub>2</sub> semiconducting materials, Doctoral thesis- UCL (University College London) ,<https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/1528770/>
- Geng Q., Li T., Li P., Wang X., Chu W., Ma Y., Ma H., Ni H., 2018. The accumulation, transformation, and effects of quinetrol in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.). *Sci. Total Environ.* 634, 1034–1041.
- Ghandi K., 2014. A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *Green Sustain. Chem.*

- 04, 44–53. <https://doi.org/10.4236/gsc.2014.41008>
- Giakisikli G., Anthemidis A.N., 2013. Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. A review. *Anal. Chim. Acta* 789, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.021>
- Gilart N., Marcé R.M., Borrull F., Fontanals N., 2014. New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. *TrAC - Trends Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.10.010>
- Gil-García M.D., Barranco-Martínez D., Martínez-Galera M., Parrilla-Vázquez P., 2006. Simple, rapid solid-phase extraction procedure for the determination of ultra-trace levels of pyrethroids in ground and sea water by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 2395–2403. <https://doi.org/10.1002/rcm.2600>
- Giroud B., Bruckner S., Straub L., Neumann P., Williams G.R., Vulliet E., 2019. Trace-level determination of two neonicotinoid insecticide residues in honey bee royal jelly using ultra-sound assisted salting-out liquid liquid extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem. J.* 151, 104249. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104249>
- Goldstein J., Newbury D., Michael J., Ritchie N., Scott J., Joy D. “Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis”.
- Gonçalves R.A., Schatzmayr D., Albalat A., Mackenzie S., 2018. Mycotoxins in aquaculture: feed and food. *Rev. Aquac.* <https://doi.org/10.1111/raq.12310>
- González-Curbelo M.Á., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A.V., González-Sálamo J., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado M.Á., 2015. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends Anal. Chem.* 71, 169–185.
- González-Fuenzalida R.A., Moliner-Martínez Y., Molins-Legua C., Campíns-Falcó P., 2019. Miniaturized liquid chromatography coupled on-line to in-tube solid-phase microextraction for characterization of metallic nanoparticles using plasmonic measurements. A tutorial. *Anal. Chim. Acta.* <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.073>
- González-Sálamo J., Socas-Rodríguez B., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado M., 2016. Nanomaterials as sorbents for food sample analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.09.009>
- Guo J., Li Z., Ranasinghe P., Bonina S., Hosseini S., Corcoran M.B., Smalley C., Kaliappan R., Wu Y., Chen D., Sandy A.L., Wang Y., Rockne K.J., Sturchio N.C., Giesy J.P., Li A., 2016. Occurrence of Atrazine and Related Compounds in Sediments of Upper Great Lakes.

- Environ. Sci. Technol. 50, 7335–7343. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00706>
- Ha G.-S., Kim J.-H., 2016. Kinetic and thermodynamic characteristics of ultrasound-assisted extraction for recovery of paclitaxel from biomass. *Process Biochem.* 51, 1664–1673. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.08.012>
- Haig A., 2017. Determination of nutrients in aquatic sediments, in: *Manual of Physico-Chemical Analysis of Aquatic Sediments*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742, pp. 175–227. <https://doi.org/10.1201/9780203748176-8>
- Hajšlová J., Čajka T., 2007. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), in: *Food Toxicants Analysis*. Elsevier, pp. 419–473. <https://doi.org/10.1016/B978-044452843-8/50013-4>
- Halfadji A., Halfadji A., Touabet A., 2013. “Comparison of soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and ultrasonic extraction for the determination of pcbs congeners in spiked soils by transformer oil”. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 5, 63-75.
- Hastak R., Sivaraman P., Potphode D., Shashidhara K., Samui A., 2012. All solid supercapacitor based on activated carbon and poly [2,5-benzimidazole] for high temperature application. *Electrochim. Acta* 59, 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2011.10.102>
- Hayes R., Warr G.G., Atkin R., 2015. Structure and Nanostructure in Ionic Liquids. *Chem. Rev.* 115, 6357–6426. <https://doi.org/10.1021/cr500411q>
- He L., Luo X., Xie H., Wang C., Jiang X., Lu K., 2009. Ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample. *Anal. Chim. Acta* 655, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.044>
- He Q., Yuan T., Wei S., Haldolaarachchige N., Luo Z., Young D.P., Khasanov A., Guo Z., 2012. Morphology- and Phase-Controlled Iron Oxide Nanoparticles Stabilized with Maleic Anhydride Grafted Polypropylene. *Angew. Chemie Int. Ed.* 51, 8842–8845. <https://doi.org/10.1002/anie.201203347>
- Heinzen H., Nollet L.M, Fernandez-Alba A., 2017, “Multiresidue Methods for the Analysis of Pesticide Residues in Food”, CRC press, 1<sup>st</sup> edition, ISBN 9781482235098
- Hela D.G., Lambropoulou D.A., Konstantinou I.K., Albanis T.A., 2005. Environmental monitoring and ecological risk assessment for pesticide contamination and effects in Lake Pamvotis, northwestern Greece. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1548–1556.

- <https://doi.org/10.1897/04-455R.1>
- Hemery G., Keyes A.C., Garaio E., Rodrigo I., Garcia J.A., Plazaola F., Garanger E., Sandre O., 2017. Tuning Sizes, Morphologies, and Magnetic Properties of Monocore Versus Multicore Iron Oxide Nanoparticles through the Controlled Addition of Water in the Polyol Synthesis. *Inorg. Chem.* 56, 8232–8243. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00956>
- Henning S., Adhikari R., 2017. Scanning Electron Microscopy, ESEM, and X-ray Microanalysis, in: *Microscopy Methods in Nanomaterials Characterization*. Elsevier, pp. 1–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46141-2.00001-8>
- Herrero-Hernández E., Andrades M.S., Álvarez-Martín A., Pose-Juan E., Rodríguez-Cruz M.S., Sánchez-Martín M.J., 2013. Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *J. Hydrol.* 486, 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.01.025>
- Herrero-Hernández E., Rodríguez-Cruz M.S., Pose-Juan E., Sánchez-González S., Andrades M.S., Sánchez-Martín M.J., 2017. Seasonal distribution of herbicide and insecticide residues in the water resources of the vineyard region of La Rioja (Spain). *Sci. Total Environ.* 609, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.113>
- Hibbert D.B., 2012. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>
- Ho T.D., Canestraro A.J., Anderson J.L., 2011. Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. *Anal. Chim. Acta* 695, 18–43. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.034>
- Hoff R.B., Pizzolato T.M., 2018. Combining extraction and purification steps in sample preparation for environmental matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications. *TrAC - Trends Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.002>
- Hoffmann E. de., Stroobant V., 2007. *Mass spectrometry : principles and applications*. J. Wiley.
- Hossain M.S., Chowdhury M.A.Z., Pramanik M.K., Rahman M.A., Fakhruddin A.N.M., Alam M.K., 2015. Determination of selected pesticides in water samples adjacent to agricultural fields and removal of organophosphorus insecticide chlorpyrifos using soil bacterial isolates. *Appl. Water Sci.* 5, 171–179. <https://doi.org/10.1007/s13201-014-0178-6>
- Huang Y., Shi T., Luo X., Xiong H., Min F., Chen Y., Nie S., Xie M., 2019. Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS. *Food Chem.* 275, 255–264. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.094>

- Huang Y.W., Lee H.K., Shih H.K., Jen J.F., 2018. A sublimate sorbent for stir-bar sorptive extraction of aqueous endocrine disruptor pesticides for gas chromatography-electron capture detection. *J. Chromatogr. A* 1564, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.018>
- Inkson B.J., 2016. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization, in: *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. Elsevier Inc., pp. 17–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>
- IR Spectroscopy Tutorial: aromatics, orgchemboulder Spectroscopy (<https://orgchemboulder.com/Spectroscopy/irtutor/aromaticsir.shtml>).
- Ismail N.A.H., Wee S.Y., Aris A.Z., 2017. Multi-class of endocrine disrupting compounds in aquaculture ecosystems and health impacts in exposed biota. *Chemosphere* 188, 375–388. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.08.150>
- Jabbari M., Razmi H., Farrokhzadeh S., 2016. Application of Magnetic Graphene Nanoparticles for Determination of Organophosphorus Pesticides Using Solid-Phase Microextraction. *Chromatographia* 79, 985–993. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3117-x>
- Jamkhande P., Ghule N., Bamer A., Kalaskar M., 2019. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 53, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
- Jordan T., Nichols D., Kerr N., 2009. Selection of SPE cartridge for automated solid-phase extraction of pesticides from water followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 2257–2266. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2924-4>
- Jun Y., Lee J., Cheon J., 2008. Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging. *Angew. Chemie Int. Ed.* 47, 5122–5135. <https://doi.org/10.1002/anie.200701674>
- Kabir A., Furton K., 2014. Fabric Phase Sorptive Extractor (FPSE). U.S. Patent US 20140274660A1, [http://doi: 10.3390/separations4020021](http://doi:10.3390/separations4020021)
- Kabir E., Kumar V., Kim K., Yip A., Sohn J., 2018. Environmental impacts of nanomaterials. *J. Environ. Manage.* <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.087>
- Kadhim A., Kazim A., 2018. Synthesis and characterization of benzimidazole by using O-phenylenediamine with different aldehydes and carboxylic acids in the presence of p-tsoh as a catalyst. *Orient. J. Chem.* 34, 2131–2136. <https://doi.org/10.13005/ojc/3404054>



- Kafilzadeh F., 2015. Assessment of Organochlorine Pesticide Residues in Water, Sediments and Fish from Lake Tashk, Iran. *Achiev. Life Sci.* 9, 107–111. <https://doi.org/10.1016/J.ALS.2015.12.003>
- Kalogridi E., Christophoridis C., Bizani E., Drimaropoulou G., Fytianos K., 2014. Part I: Temporal and spatial distribution of multiclass pesticide residues in lake waters of Northern Greece: application of an optimized SPE-UPLC-MS/MS pretreatment and analytical method. *Environ Sci Pollut Res* (2014) 21:7239–7251. DOI 10.1007/s11356-014-2793-z <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2793-z>
- Kapsi M., Tsoutsis C., Paschalidou A., Albanis T., 2019. Environmental monitoring and risk assessment of pesticide residues in surface waters of the Louros River (N.W. Greece). *Sci. Total Environ.* 650, 2188–2198. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.09.185>
- Karanis P., Chronis I., Zakas G., Kourenti C., Sotiriadou I., Papadopoulou C., 2005. A Preliminary Survey of the Level of Microbiological Pollution of Major Rivers in Northern Greece. *Acta Hydrochim. hydrobiol* 33, 354. <https://doi.org/10.1002/aheh.200400581>
- Karunakaran C., Balamurugan M., Marimuthu D., 2018a. Applications of Nuclear Magnetic Resonance. *Spin Reson. Spectrosc.* 111–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813608-9.00003-4>
- Karunakaran C., Rajkumar R., Balamurugan M., 2018b. Principles of Nuclear Magnetic Resonance and Pulsed Nuclear Magnetic Resonance. *Spin Reson. Spectrosc.* 1–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813608-9.00001-0>
- Katritzky A.R., Singh S., Kirichenko K., Holbrey J.D., Smiglak M., Reichert W.M., Rogers R.D., 2005. 1-Butyl-3-methylimidazolium 3,5-dinitro-1,2,4-triazolate: a novel ionic liquid containing a rigid, planar energetic anion. *Chem. Commun.* 0, 868. <https://doi.org/10.1039/b414683b>
- Katritzky A.R., Yang H., Zhang D., Kirichenko K., Smiglak M., Holbrey J.D., Reichert W.M., Rogers R.D., 2006. Strategies toward the design of energetic ionic liquids: nitro- and nitrile-substituted N,N'-dialkylimidazolium salts. *New J. Chem.* 30, 349. <https://doi.org/10.1039/b509260d>
- Kelly M., Symonds R., 2013. Carotenoids in sea urchins, in: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier B.V., pp. 171–177.
- Kemmerich M., Bernardi G., Prestes O., Adaime M., Zanella R., 2018. Comprehensive Method Validation for the Determination of 170 Pesticide Residues in Pear Employing Modified QuEChERS Without Clean-Up and Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods* 11, 556–577.

- <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1026-8>
- Kim K., Kabir E., Jahan S., 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575, 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kim L., Lee D., Cho H., Choi S., 2019. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. *Trends Environ. Anal. Chem.* 22, e00063. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>
- Konstantinou I., Hela D. and Albanis T., 2004b, An overview of pesticide residues in surface waters of Greece during the last two decades and ecological risk assessment. 3<sup>rd</sup> European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the environment, 2004, Heraklio-Crete Island
- Konstantinou I.K., Albanis T.A., 2004a. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: A review. *Environ. Int.* 30, 235–248. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00176-4)
- Kouzayha A., Rabaa A.R., Iskandarani M. Al, Rahman Rabaa A., Al Iskandarani M., Beh D., Budzinski H., Jaber F., 2012. Multiresidue Method for Determination of 67 Pesticides in Water Samples Using Solid-Phase Extraction with Centrifugation and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Food safety and security View project Pesticide degradation. *Am. J. Anal. Chem.* 3, 257–265. <https://doi.org/10.4236/ajac.2012.33034>
- Lambropoulou D., Hela D., Koltsakidou A., Konstantinou I., 2015. Overview of the Pesticide Residues in Greek Rivers: Occurrence and Environmental Risk Assessment. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 205–240. [https://doi.org/10.1007/698\\_2015\\_428](https://doi.org/10.1007/698_2015_428)
- Lehotay S.J., De Kok A., Hiemstra M. and Van Bodegraven P., 2005. Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. *JAOAC Int.*, 88, 595-614.
- León V.M., García-Agüera I., Moltó V., Fernández-González V., Llorca-Pérez L., Andrade J.M., Muniategui-Lorenzo S., Campillo J.A., 2019. PAHs, pesticides, personal care products and plastic additives in plastic debris from Spanish Mediterranean beaches. *Sci. Total Environ.* 670, 672–684. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.216>
- Leong M., Fuh M., Huang S., 2014. Beyond dispersive liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1335, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.021>
- Li N., Li Q., Guo X., Yuan M., Pang H., 2019. Controllable synthesis of oxalate and oxalate-

- derived nanomaterials for applications in electrochemistry. *Chem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.04.127>
- Li S., Gao H., Zhang J., Li Y., Peng B., Zhou Z., 2011. Determination of insecticides in water using in situ halide exchange reaction-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 34, 3178–3185. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100577>
- Li T., Joshi M.D., Ronning D.R., Anderson J.L., 2013. Ionic liquids as solvents for in situ dispersive liquid-liquid microextraction of DNA. *J. Chromatogr. A* 1272, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.11.055>
- Li Z., Chen F., Wang X., Wang C., 2013. Ionic liquids dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatographic determination of irbesartan and valsartan in human urine. *Biomed. Chromatogr.* 27, 254–258. <https://doi.org/10.1002/bmc.2784>
- Ligler F.S., White H.S., 2013. Nanomaterials in Analytical Chemistry. *Anal. Chem.* 85, 11161–11162. <https://doi.org/10.1021/ac403331m>
- Lioupi A., Kabir A., Furton K.G., Samanidou V., 2019. Fabric phase sorptive extraction for the isolation of five common antidepressants from human urine prior to HPLC-DAD analysis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1118–1119, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.045>
- Liu Y., Zhao E., Zhu W., Gao H., Zhou Z., 2009. Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples. *J. Chromatogr. A* 1216, 885–891. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.076>
- Llompart M., Celeiro M., García-Jares C., Dagnac T., 2019. Environmental applications of solid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* 112, 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2018.12.020>
- Loganathan S., Valapa R.B., Pugazhenti G., 2017. Thermogravimetric Analysis for Characterization of Nanomaterials. *Therm. Rheol. Meas. Tech. Nanomater. Charact.* 67–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46139-9.00004-9>
- López-Darias J., Pino V., Ayala J.H., Afonso A.M., 2011. In-situ ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction method to determine endocrine disrupting phenols in seawaters and industrial effluents. *Microchim. Acta* 174, 213–222. <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0636-x>
- López-Sanz S., Guzmán Bernardo F.J., Rodríguez Martín-Doimeadios R.C., Ríos Á., 2019. Analytical metrology for nanomaterials: Present achievements and future challenges. *Anal. Chim. Acta.* <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.009>

- Łozowicka B., Rutkowska E., Jankowska M., 2017. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 7124–7138.
- Lu J., Yang S., Ng K.M., Su C.-H., Yeh C.-S., Wu Y.-N., Shieh D.-B., 2007. Solid-state synthesis of monocrystalline iron oxide nanoparticle based ferrofluid suitable for magnetic resonance imaging contrast application. *Nanotechnology* 18, 289001–289001. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/25/289001>
- Lubomirsky E., Padró J.M., Reta M.R., 2016. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction technique for the analysis of aryloxyphenoxy-propionate herbicides in soy-based foods. *Microchem. J.* 129, 63–70. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2016.06.015>
- Lucena R., Simonet B.M., Cárdenas S., Valcárcel M., 2011. Potential of nanoparticles in sample preparation. *J. Chromatogr. A* 1218, 620–637. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.069>
- Luciano G., Traverso P., Letardi P., *Corrosion Science*, 52,2750-2757, 2010
- Lyon J.L., Fleming D.A., Stone M.B., Schiffer P., Williams M.E., 2004. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. *Nano Lett.* 4, 719–723. <https://doi.org/10.1021/nl035253f>
- Madej K., Jonda A., Borcuch A., Piekoszewski W., Chmielarz L., Gil B., 2019. A novel stir bar sorptive-dispersive microextraction in combination with magnetically modified graphene for isolation of seven pesticides from water samples. *Microchem. J.* 147, 962–971. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.04.002>
- Mai N., Ahn K., Koo Y., 2014. Methods for recovery of ionic liquids-A review. *Process Biochem.* 49, 872–881. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.016>
- Maldaner L., Jardim I., 2012. Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 100, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.006>
- Mansour F.R., Danielson N.D., 2018. Solvent-terminated dispersive liquid-liquid microextraction: a tutorial. *Anal. Chim. Acta* 1016, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2018.02.005>
- Marsili R.T., Laskonis C.R., 2019. Evaluation of Sequential-SBSE and TF-SPME Extraction Techniques Prior to GC-TOFMS for the Analysis of Flavor Volatiles in Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 77, 113–118. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1590070>
- Martín-Pozo L., de Alarcón-Gómez B., Rodríguez-Gómez R., García-Córcoles M.T., Çipa M.,

- Zafra-Gómez A., 2019. Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.056>
- Martins M.V.A., Mane M.Â., Frontalini F., Santos J.F., da Silva F.S., Terroso D., Miranda P., Figueira R., Laut L.L.M., Bernardes C., Filho J.G.M., Coccioni R., Dias J.M.A., Rocha F., 2015. Early diagenesis and clay mineral adsorption as driving factors of metal pollution in sediments: the case of Aveiro Lagoon (Portugal). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 10019–10033. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4185-4>
- Masahiro Yoshizawa, Wu Xu and Angell C. 2003. Ionic Liquids by Proton Transfer: Vapor Pressure, Conductivity, and the Relevance of  $\Delta pK_a$  from Aqueous Solutions. <https://doi.org/10.1021/JA035783D>
- Masiá A., Campo J., Navarro-Ortega A., Barceló D., Picó Y., 2015. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Sci. Total Environ.* 503–504, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.095>
- Masiá A., Campo J., Vázquez-Roig P., Blasco C., Picó Y., 2013. Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). *J. Hazard. Mater.* 263, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.035>
- Masiá A., Vásquez K., Campo J., Picó Y., 2015a. Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin. *J. Chromatogr. A* 1378, 19–31.
- Mastovska K., Dorweiler K.J., Lehotay S.J., Wegscheid J.S., Szpylka K.A., 2010. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques †. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5959–5972.
- McIntosh A.J.S., Griffith J., Gräsvik J., 2016. Methods of Synthesis and Purification of Ionic Liquids. *Appl. Purification, Recover. Ion. Liq.* 59–99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63713-0.00002-X>
- Mehdi H., Binnemans K., Van Hecke K., Van Meervelt L., Nockemann P., 2010. Hydrophobic ionic liquids with strongly coordinating anions. *Chem. Commun.* 46, 234–236. <https://doi.org/10.1039/B914977E>
- Meseguer-Lloret S., Torres-Cartas S., Catalá-Icardo M., Simó-Alfonso E.F., Herrero-Martínez J.M., 2017. Extraction and preconcentration of organophosphorus pesticides in water by using a polymethacrylate-based sorbent modified with magnetic nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 3561–3571. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0294-x>

- Milovanovic, M., 2007. Water quality assessment and determination of pollution sources along the Axios/Vardar River, Southeastern Europe. *Desalination* 213, 159–173. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.06.022>
- Miossec C., Lancelleur L., Monperrus M., 2018. Adaptation and validation of QuEChERS method for the simultaneous analysis of priority and emerging pollutants in sediments by gas chromatography—mass spectrometry. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 98, 695–708. <https://doi.org/10.1080/03067319.2018.1496245>
- Mitsou K., Koulianou A., Lambropoulou D., Pappas P., Albanis T., Lekka M., 2006. Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*. *Chemosphere* 62, 275–284.
- Miyawaki T., Tobiishi K., Takenaka S., Kadokami K., 2018. A Rapid Method, Combining Microwave-Assisted Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry with a Database, for Determining Organochlorine Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Sediments. *Soil Sediment Contam. An Int. J.* 27, 31–45. <https://doi.org/10.1080/15320383.2017.1360245>
- Mlynárik V., 2017. Introduction to nuclear magnetic resonance. *Anal. Biochem.* 529, 4–9. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2016.05.006>
- Mohamed R.S., Mansoori G.A., 2002. The Use of Supercritical Fluid Extraction Technology in Food Processing, *Food Technology Magazine*.20,134-139. <https://trl.lab.uic.edu/1.OnlineMaterials/SCEinFoodTechnology.pdf>
- Mohammadpour H., Sadrameli S.M., Eslami F., Asoodeh A., 2019. Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. *Ind. Crops Prod.* 131, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.030>
- Molina-Ruiz J.M., Cieslik E., Cieslik I., Walkowska I., 2015. Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography—mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 369–378.
- Montesdeoca-Esponda S., Guedes-Alonso R., Santana-Viera S., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodríguez J., 2018. Applications of Fabric Phase Sorptive Extraction to the Determination of Micropollutants in Liquid Samples. *Separations* 5, 35. <https://doi.org/10.3390/separations5030035>
- Montgomery D.C., 2009, "Introduction to Statistical Quality Control", 6th edition, John Wiley & Sons, New York, USA.
- Montgomery D.C., 2005. "Design and Analysis of Experiments", 6th edition, John Wiley & Sons

- Inc, New Jersey, USA.
- Morais da Costa E.H., Collins C.H., Jardim I.C.S.F., 2018. Pesticide determination in sweet peppers using QuEChERS and LC–MS/MS. *Food Chem.* 249, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.092>
- Moreno-González R., León V.M., 2017. Presence and distribution of current-use pesticides in surface marine sediments from a Mediterranean coastal lagoon (SE Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 8033–8048. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8456-0>
- Morrison S.A., Sieve K.K., Ratajczak R.E., Bringolf R.B., Belden J.B., 2016. Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. *Talanta* 146, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.021>
- Mou, R.X., Chen, M.X., Cao, Z.Y., Zhu, Z.W., 2011. Simultaneous determination of triazine herbicides in rice by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 706, 149-156.
- Mulens V., Morales M. del P., Barber D.F., 2013. Development of Magnetic Nanoparticles for Cancer Gene Therapy: A Comprehensive Review. *ISRN Nanomater.* 2013, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/646284>
- Muniz F.T.L., Miranda M.A.R., Morilla Dos Santos C., Sasaki J.M., 2016. The Scherrer equation and the dynamical theory of X-ray diffraction. *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv.* 72, 385–390. <https://doi.org/10.1107/S205327331600365X>
- Muñoz I., Martínez Bueno M.J., Agüera A., Fernández-Alba A.R., 2010. Environmental and human health risk assessment of organic micro-pollutants occurring in a Spanish marine fish farm. *Environ. Pollut.* 158, 1809–1816. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.006>
- Murtada K., de Andrés F., Zougagh M., Ríos Á., 2019. Strategies for antidepressants extraction from biological specimens using nanomaterials for analytical purposes: A review. *Microchem. J.* 150, 104193. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104193>
- Musarurwa H., Chimuka L., Pakade V.E., Tavengwa N.T., 2019. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *J. Food Compos. Anal.* 84, 103314. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103314>
- Nacham O., Clark K.D., Anderson J.L., 2016. Synthesis and characterization of the physicochemical and magnetic properties for perfluoroalkyl ester and Fe(iii) carboxylate-based hydrophobic magnetic ionic liquids. *RSC Adv.* 6, 11109–11117.



<https://doi.org/10.1039/C5RA25002A>

- Nacham O., Clark K.D., Yu H., Anderson J.L., 2015. Synthetic Strategies for Tailoring the Physicochemical and Magnetic Properties of Hydrophobic Magnetic Ionic Liquids. *Chem. Mater.* 27, 923–931. <https://doi.org/10.1021/cm504202v>
- Nardelli V., Casamassima F., Gesualdo G., Li D., Marchesiello W.M. V., Nardiello D., Quinto M., 2018. Sensitive Screening Method for Determination of Pyrethroids in Chicken Eggs and Various Meat Samples by Gas Chromatography and Electron Capture Detection. *J. Agric. Food Chem.* 66, 10267–10273. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04851>
- Nödler K., Licha T., Bester K., Sauter M., 2010. Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 6511–6521. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.048>
- Nollet L.M.L., Rathore H.S., 2010. *Handbook of pesticides : methods of pesticide residues analysis*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Nyström B., Becker-Van Slooten K., Bérard A., Grandjean D., Druart J.-C., Leboulanger C., 2002. Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Geneva. *Water Res.* 36, 2020–8. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00404-3](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00404-3)
- Pa'e N., Salehudin M.H., Hassan N.D., Marsin A.M., Muhamad I.I., 2019. Thermal Behavior of Bacterial Cellulose-Based Hydrogels with Other Composites and Related Instrumental Analysis. pp. 763–787. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3\\_26](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_26)
- Pano-Farias N.S., Ceballos-Magaña S.G., Muñoz-Valencia R., Gonzalez J., 2017. Validation and assessment of matrix effect and uncertainty of a gas chromatography coupled to mass spectrometry method for pesticides in papaya and avocado samples. *J. Food Drug Anal.* 25, 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.09.005>
- Palma P., Köck-Schulmeyer M., Alvarenga P., Ledo L., Barbosa I.R., López de Alda M., Barceló D., 2014. Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal). *Sci. Total Environ.* 488–489, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.088>
- Papadakis M., Tsaboula A., Kotopoulou A., Kintzikoglou K., Vryzas Z., Papadopoulou-Mourkidou E., 2015a. Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 536, 793–802. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.099>
- Papadakis E.N., Vryzas Z., Kotopoulou A., Kintzikoglou K., Makris K.C., Papadopoulou-Mourkidou E., 2015b. A pesticide monitoring survey in rivers and lakes of northern



- Greece and its human and ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.033>
- Papadopoulos V.D., Beligiannis G.N., Hela D.G., 2011. Combining experimental design and artificial neural networks for the determination of chlorinated compounds in fish using matrix solid-phase dispersion. *Appl. Soft Comput. J.* 11, 5155–5164. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2011.05.044>
- Parween T., Jan S., Mahmooduzzafar S., Fatma T., Siddiqui Z.H., 2016. Selective Effect of Pesticides on Plant—A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 160–179. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.787969>
- Pastor-Belda M., Drauschke T., Campillo N., Arroyo-Manzanares N., Torres C., Pérez-Cárceles M.D., Hernández-Córdoba M., Viñas P., 2020. Dual stir bar sorptive extraction coupled to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disruptors in human tissues. *Talanta* 207, 120331. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120331>
- Patsula V., Moskvina M., Dutz S., Horák D., 2016. Size-dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *J. Phys. Chem. Solids* 88, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2015.09.008>
- Peja N., Vaso A., Miho A., Rakaj N., Crivelli A.J., 1996. Characteristics of Albanian lagoons and their fisheries. *Fish. Res.* 27, 215–225. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(95\)00467-X](https://doi.org/10.1016/0165-7836(95)00467-X)
- Pena M.T., Casais M.C., Mejuto M.C., Cela R., 2009. Development of an ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *J. Chromatogr. A* 1216, 6356–6364. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2009.07.032>
- Perestrelo R., Silva P., Porto-Figueira P., Pereira J.A.M., Silva C., Medina S., Câmara J.S., 2019. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Anal. Chim. Acta.* <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.02.036>
- Pérez-Fernández V., Mainero Rocca L., Tomai P., Fanali S., Gentili A., 2017. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.029>
- Pico Y., Belenguer V., Corcellas C., Diaz-Cruz M.S., Eljarrat E., Farré M., Gago-Ferrero P., Huerta B., Navarro-Ortega A., Petrovic M., Rodríguez-Mozaz S., Sabater L., Santín G., Barcelo, D., 2019. Contaminants of emerging concern in freshwater fish from four Spanish Rivers. *Sci. Total Environ.* 659, 1186–1198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.366>

- Pierson S.A., Nacham O., Clark K.D., Nan H., Mudryk Y., Anderson J.L., 2017. Synthesis and characterization of low viscosity hexafluoroacetylacetonate-based hydrophobic magnetic ionic liquids. *New J. Chem.* 41, 5498–5505. <https://doi.org/10.1039/C7NJ00206H>
- Plechkova N.V., Seddon K.R., 2008. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.* 37, 123–150. <https://doi.org/10.1039/B006677J>
- Prijic S., Sersa G., 2011. Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology. *Radiol. Oncol.* 45, 1–16. <https://doi.org/10.2478/v10019-011-0001-z>
- Primel E.G., Caldas S.S., Marube L.C., Escarrone A.L.V., 2017. An overview of advances in dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 14, 1–18. <https://doi.org/10.1016/J.TEAC.2017.03.001>
- Qiao S.Z., Liu J., Qing (Max) Lu G., 2011. Synthetic Chemistry of Nanomaterials, in: *Modern Inorganic Synthetic Chemistry*. Elsevier, pp. 479–506. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53599-3.10021-6>
- Ramli N.H., Yusup S., Quitain A.T., Johari K., Kueh B.W. Bin, 2019. Optimization of saponin extracts using microwave-assisted extraction as a sustainable biopesticide to reduce *Pomacea canaliculata* population in paddy cultivation. *Sustain. Chem. Pharm.* 11, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.12.002>
- Ramos L., 2019. Use of new tailored and engineered materials for matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends Anal. Chem.* 118, 751–758. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.006>
- Ravelo-Pérez L.M., Hernández-Borges J., Herrera-Herrera A. V., Rodríguez-Delgado M.Á., 2009. Pesticide extraction from table grapes and plums using ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 2387–2395. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3133-x>
- Rawat R.S., 2015. Dense Plasma Focus - From Alternative Fusion Source to Versatile High Energy Density Plasma Source for Plasma Nanotechnology, in: *Journal of Physics: Conference Series*. Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/591/1/012021>
- Rawn D.F.K., Judge J., Roscoe V., 2010. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2525–2531.
- Rehman H., Althbyani A., Saggi S., Aziz A.T., Abbas Z.K., Mohan A., Ansari A.A., 2014. Systematic review on pyrethroid toxicity with special reference to deltamethrin. *Artic. J.*

Entomol. Zool. Stud. 2.

- Rejczak T., Tuzimski T., 2015. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem* 13, 980–1010. <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0109>
- Rezaee M., Assadi Y., Milani Hosseini M.-R., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S., 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1116, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>
- Richardson S.D., Ternes T.A., 2018. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 90, 398–428. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04577>
- Rigano F., Tranchida P.Q., Dugo P., Mondello L., 2019. High-performance liquid chromatography combined with electron ionization mass spectrometry: A review. *TrAC - Trends Anal. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.032>
- Rizzetti T.M., Kemmerich M., Martins M.L., Prestes O.D., Adaime M.B., Zanella R., 2016. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS. *Food Chem.* 196, 25–33.
- Rockwood A.L., Kushnir M.M., Clarke N.J., 2018. Mass Spectrometry, in: *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*. Elsevier, pp. 33–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5>
- Rodríguez-González N., Beceiro-González E., González-Castro M.J., Alpendurada M.F., 2016. On-line solid-phase extraction method for determination of triazine herbicides and degradation products in seawater by ultra-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1470, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.007>
- Rodríguez-González N., González-Castro M.-J., Beceiro-González E., Muniategui-Lorenzo S., 2017. Development of a matrix solid phase dispersion methodology for the determination of triazine herbicides in marine sediments. *Microchem. J.* 133, 137–143. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2017.03.022>
- Roig N., Sierra J., Nadal, M., Moreno-Garrido I., Nieto E., Hampel M., Gallego E.P., Schuhmacher M., Blasco J., 2015. Assessment of sediment ecotoxicological status as a complementary tool for the evaluation of surface water quality: The Ebro river basin case study. *Sci. Total Environ.* 503–504, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.125>

- Ruiz-Gil L., Romero-González R., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J.L., 2008. Determination of pesticides in water samples by solid phase extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 31, 151–161. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700299>
- Ruiz-Matute A.I., Rodríguez-Sánchez S., Sanz M.L., Soria A.C., 2018. Chromatographic Technique: Gas Chromatography (GC), in: *Modern Techniques for Food Authentication*. Elsevier, pp. 415–458. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00012-8>
- Rutkowska E., Łozowicka B., Kaczyński P., 2018. Modification of Multiresidue QuEChERS Protocol to Minimize Matrix Effect and Improve Recoveries for Determination of Pesticide Residues in Dried Herbs Followed by GC-MS/MS. *Food Anal. Methods* 11, 709–724.
- Rykowska I., Ziemblińska J., Nowak I., 2018. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. *J. Mol. Liq.* 259, 319–339. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2018.03.043>
- Sadowska-Rociek A., Surma M., Cieślík E., 2013. Application of QuEChERS method for simultaneous determination of pesticide residues and PAHs in fresh herbs. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 508–13.
- Sajid M., 2019. Magnetic ionic liquids in analytical sample preparation: A literature review. *TrAC Trends Anal. Chem.* 113, 210–223. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.02.007>
- Sajid M., Alhooshani K., 2018. Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review. *TrAC Trends Anal. Chem.* 108, 167–182. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2018.08.016>
- Sakkas V.A., Islam M.A., Stalikas C., Albanis T.A., 2010. Photocatalytic degradation using design of experiments: a review and example of the Congo red degradation. *J. Hazard. Mater.* 175, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.050>
- Sakkas V.A., Konstantinou I.K., Lambropoulou D.A., Albanis T.A., 2002. Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 327–332. <https://doi.org/10.1007/BF02987576>
- Santana-Mayor Á., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A. V., Rodríguez-Delgado M.Á., 2019. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 116, 214–235. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.018>
- SANTE (2017) SANTE/11813/2017; Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.
- Santos E., Albo J., Irabien A., 2014. Magnetic ionic liquids: synthesis, properties and

- applications. RSC Adv. 4, 40008–40018. <https://doi.org/10.1039/C4RA05156D>
- Sass J.B., Colangelo A., 2006. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. Int. J. Occup. Environ. Health. <https://doi.org/10.1179/oeh.2006.12.3.260>
- Scano P., Cusano E., Caboni P., Consonni R., 2019. NMR metabolite profiles of dairy: A review. Int. Dairy J. 90, 56–67. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.11.004>
- Schmidt K., Podmore I., 2015. Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCS) as Potential Biomarkers of Cancer. J. Mol. Biomark. Diagn. 06. <https://doi.org/10.4172/2155-9929.1000253>
- Silva V., Mol H.G.J., Zomer P., Tienstra M., Ritsema C.J., Geissen V., 2019. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. Sci. Total Environ. 653, 1532–1545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>
- Skieneh J., Najafabadi B.K., Horne S., Rohani S., 2016. Crystallization of Esomeprazole Magnesium Water/Butanol Solvate. Molecules 21. <https://doi.org/10.3390/molecules21040544>
- Skoog D., Holler J. και Crouch S., (2007) «Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης», 6<sup>η</sup> Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα
- Soares K.L., Cerqueira M.B.R., Caldas S.S., Primel E.G., 2017. Evaluation of alternative environmentally friendly matrix solid phase dispersion solid supports for the simultaneous extraction of 15 pesticides of different chemical classes from drinking water treatment sludge. Chemosphere 182, 547–554. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.05.062>
- Socratic aromatic ring, orgchemboulder Spectroscopy, (<https://socratic.org/questions/how-do-you-determine-if-a-compound-has-an-aromatic-ring>), <https://orgchemboulder.com/Spectroscopy/irtutor/aromaticsir.shtml>
- Sousa J.C.G., Ribeiro A.R., Barbosa M.O., Pereira M.F.R., Silva A.M.T., 2018. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. J. Hazard. Mater. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.058>
- Stalikas C., Fiamegos Y., Sakkas V., Albanis T., 2009. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. J. Chromatogr. A. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.060>
- Stamatis N., Hela D., Triantafyllidis V., Konstantinou I., 2013. Spatiotemporal variation and risk assessment of pesticides in water of the lower catchment basin of acheloos river, Western Greece. Sci. World J. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/231610>

- Starling M.C.V.M., Amorim C.C., Leão M.M.D., 2019. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *J. Hazard. Mater.* 17–36. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.043>
- Stachniuk A., Fornal E., 2016. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Analysis of Pesticide Residues in Food. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0342-0>
- Stauffer E., Dolan J.A., Newman R., 2008. Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry, in: *Fire Debris Analysis*. Elsevier, pp. 235–293. <https://doi.org/10.1016/B978-012663971-1.50012-9>
- Stöber W., Fink A., Bohn E., 1968. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* 26, 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- Stremel T.R.D.O., Domingues C.E., Zittel R., Silva C.P., Weinert P.L., Monteiro F.C., Campos S.X., 2018. Development, validation and matrix effect of a QuEChERS method for the analysis of organochlorine pesticides in fish tissue. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 53, 246–254. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1410414>
- Sun J.-N., Shi Y.-P., Chen J., 2011. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for sensitive determination of trace celastrol in urine. *J. Chromatogr. B* 879, 3429–3433. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2011.09.019>
- Sun R., Sun P., Zhang J., Esquivel-Elizondo, S., Wu, Y., 2018. Microorganisms-based methods for harmful algal blooms control: A review. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.175>
- Synaridou M., Sakkas V., Stalika, C., Albanis T., 2014. Evaluation of magnetic nanoparticles to serve as solid-phase extraction sorbents for the determination of endocrine disruptors in milk samples by gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1348, 71–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.092>
- Taiwo A.M., 2019. A review of environmental and health effects of organochlorine pesticide residues in Africa. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.001>
- Tankiewicz M., Fenik J., Biziuk M., 2010. Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29, 1050–1063. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.008>
- Tian J., Chen X., Bai X., 2012. Comparison of dispersive liquid-liquid microextraction based on organic solvent and ionic liquid combined with high-performance liquid chromatography for the analysis of emodin and its metabolites in urine samples. *J. Sep. Sci.* 35, 145–152.

- <https://doi.org/10.1002/jssc.201100729>
- Tour J.M., 2014. Top-Down versus Bottom-Up Fabrication of Graphene-Based Electronics. *Chem. Mater.* 26, 163–171. <https://doi.org/10.1021/cm402179h>
- Tripathy V., Sharma K.K., Yadav R., Devi S., Tayade A., Sharma K., Pandey P., Singh G., Patel A.N., Gautam R., Gupta R., Kalra S., Shukla P., Walia S., Shakil N.A., 2019. Development, validation of QuEChERS-based method for simultaneous determination of multiclass pesticide residue in milk, and evaluation of the matrix effect. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 1–13. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1574169>
- Trohalaki S., Pachter R., 2005. Prediction of Melting Points for Ionic Liquids. *QSAR Comb. Sci.* 24, 485–490. <https://doi.org/10.1002/qsar.200430927>
- Trujillo-Rodríguez M.J., Nacham O., Clark K.D., Pino V., Anderson J.L., Ayala J.H., Afonso A.M., 2016. Magnetic ionic liquids as non-conventional extraction solvents for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta* 934, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.014>
- Trujillo-Rodríguez M.J., Pino V., Anderson J.L., 2017. Magnetic ionic liquids as extraction solvents in vacuum headspace single-drop microextraction. *Talanta* 172, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.021>
- Tsabouta A., Papadakis E.N., Vryzas Z., Kotopoulou A., Kintzikoglou K., Papadopoulou-Mourkidou E., 2016. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. *Environ. Int.* 91, 78–93. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.008>
- Tsavidaridis M., 2013. “Political and International implications of integrated water resources management of transboundary river basins: The case of Axios/Vardar River basin”, Master thesis, University of Macedonia, Department of Balkan, Slavic and Oriental studies. <https://dspace.lib.uom.gr/bitstream/2159/15938/6/TsavidaridisMichailMsc2013.pdf>
- Tsipi D., Botitsi H. and Economou A., 2015. “Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and their Metabolites”, John Wiley & Sons, ISBN:978-1-118-50017-0
- Unesdoc (1997), United Nations Educational, Scientifics and Cultural Organization, “Methodological guide to intergrated coastal zone management”. <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000121249>
- Urbina M.A., Cumillaf J.P., Paschke K., Gebauer P., 2019. Effects of pharmaceuticals used to treat salmon lice on non-target species: Evidence from a systematic review. *Sci. Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.334>

- Utz pesticides watchlist (2015), List of banned pesticides and pesticides watchlist [https://utz.org/wp-content/uploads/2015/12/EN\\_UTZ\\_List-of-Banned-PesticidesWatchlist\\_v1.0\\_2015.pdf](https://utz.org/wp-content/uploads/2015/12/EN_UTZ_List-of-Banned-PesticidesWatchlist_v1.0_2015.pdf)
- Vaghar-Lahijani G., Aberoomand-Azar P., Saber-Tehrani M., Soleimani M., 2017. Application of ionic liquid-based ultrasonic-assisted microextraction coupled with HPLC for determination of citalopram and nortriptyline in human plasma. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 40, 1–7. <https://doi.org/10.1080/10826076.2016.1274999>
- Vallabani N.V.S., Singh S., 2018. Recent advances and future prospects of iron oxide nanoparticles in biomedicine and diagnostics. *3 Biotech* 8, 279. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1286-z>
- Varma R.S., Namboodiri V.V., 2001. An expeditious solvent-free route to ionic liquids using microwaves. *Chem. Commun.* 0, 643–644. <https://doi.org/10.1039/b101375k>
- Vázquez M.M.P., Vázquez P.P., Galera M.M., García M.D.G., 2012. Determination of eight fluoroquinolones in groundwater samples with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction prior to high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 748, 20–27. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2012.08.042>
- Velásquez A.A., Marín C.C., Urquijo J.P., 2018. Synthesis and characterization of magnetite-maghemite nanoparticles obtained by the high-energy ball milling method. *J. Nanoparticle Res.* 20, 72. <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4166-x>
- Venkatraman V., Evjen S., Knuutila H.K., Fiksdahl A., Alsberg B.K., 2018. Predicting ionic liquid melting points using machine learning. *J. Mol. Liq.* 264, 318–326. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2018.03.090>
- Viaroli P., Giordani G., Bartoli M., Naldi M., Azzoni R., Nizzoli D., Ferrari I., Comenges J.M.Z., Bencivelli, S., Castaldelli G., Fano E.A., 2005. The Sacca di Goro Lagoon and an Arm of the Po River. pp. 197–232. [https://doi.org/10.1007/698\\_5\\_030](https://doi.org/10.1007/698_5_030)
- Vieira C.E.D., dos Reis Martinez C.B., 2018. The pyrethroid  $\Lambda$ -cyhalothrin induces biochemical, genotoxic, and physiological alterations in the teleost *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 210, 958–967. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.115>
- Viñas P., Campillo N., 2019. Gas Chromatography: Mass Spectrometry Analysis of Polyphenols in Foods, in: *Polyphenols in Plants*. Elsevier, pp. 285–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00016-5>
- Vincenzi S., Caramori G., Rossi R., De Leo G.A., 2006. Estimating clam yield potential in the Sacca di Goro lagoon (Italy) by using a two-part conditional model. *Aquaculture* 261,



- 1281–1291. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.014>
- Vlastos D., Antonopoulou M., Konstantinou I., 2016. Evaluation of toxicity and genotoxicity of 2-chlorophenol on bacteria, fish and human cells. *Sci. Total Environ.* 551–552, 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.043>
- Volpatto F., Wastowski A.D., Bernardi G., Prestes O.D., Zanella R., Adaime M.B., 2016. Evaluation of QuEChERS Sample Preparation and Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry for the Determination of Pesticide Residues in Grapes. *Artic. J. Braz. Chem. Soc* 27, 1533–1540.
- Voulvoulis N., 2006. Antifouling paint booster biocides: Occurrence and partitioning in water and sediments. *Handb. Environ. Chem. Vol. 5 Water Pollut.*, 5, 155-170, [https://doi: 10.1007/698\\_5\\_053](https://doi.org/10.1007/698_5_053)
- Vryzas Z., Vassiliou G., Alexoudis C., Papadopoulou-Mourkidou E., 2009. Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. *Water Res.* 43, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.09.021>
- Wang C., Daimon H., Onodera T., Koda T., Sun S., 2008. A General Approach to the Size- and Shape-Controlled Synthesis of Platinum Nanoparticles and Their Catalytic Reduction of Oxygen. *Angew. Chemie Int. Ed.* 47, 3588–3591. <https://doi.org/10.1002/anie.200800073>
- Wang K., Xie X., Zhang Y., Huang Y., Zhou S., Zhang W., Lin Y., Fan H., 2018. Combination of microwave-assisted extraction and ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for separation and enrichment of pyrethroids residues in Litchi fruit prior to HPLC determination. *Food Chem.* 240, 1233–1242. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.08.061>
- Wang, P., Luo M., Liu D., Zhan J., Liu X., Wang F., Zhou Z., Wang P., 2018. Application of a magnetic graphene nanocomposite for organophosphorus pesticide extraction in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 1535, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.003>
- Wang S., Ren L., Xu Y., Liu F., 2011. Application of ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of fungicides in red wine. *Microchim. Acta* 173, 453–457. <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0577-4>
- Wang W., Ma R., Wu Q., Wang C., Wang Z., 2013. Magnetic microsphere-confined graphene for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples coupled with high performance liquid chromatography-fluorescence analysis. *J.*

- Chromatogr. A 1293, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.071>
- Weerachanchai P., Lee J., 2014. Recyclability of an ionic liquid for biomass pretreatment. *Bioresour. Technol.* 169, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.072>
- WHO (1989), World Health Organization, Environmental Health Criteria of cypermethrin, <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc82.htm>
- WHO (1996), World Health Organization, Environmental Health Criteria 183, Chlorothalonil <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc183.htm#SubSectionNumber:1.1.1>
- WHO (2004), World Health Organization “Chlorpyrifos in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality” [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/chlorpyrifos.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/chlorpyrifos.pdf)
- WHO (2009), World Health Organization, "WHO Specifications and evaluations for public health pesticides Chlorpyrifos" [https://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos\\_WHO\\_specs\\_eval\\_Mar\\_2009.pdf](https://www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos_WHO_specs_eval_Mar_2009.pdf)
- Wilm M., 2011. Principles of Electrospray Ionization. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.009407. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009407>
- Wong J.W., Hayward, D.G., Zhang K., 2013. Gas Chromatography–Mass Spectrometry Techniques for Multiresidue Pesticide Analysis in Agricultural Commodities. pp. 3–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62623-3.00001-0>
- Woudneh M.B., Oros D.R., 2006. Pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in sediments by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1135, 71–77. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.09.017>
- Wu C., Liu N., Wu Q., Wang C., Wang Z., 2010. Application of ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of some organophosphorus pesticides in water samples. *Anal. Chim. Acta* 679, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.009>
- Wu W., He Q., Jiang C., 2008. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* 3, 397–415. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9>
- Wu W., Wu Z., Yu T., Jiang C., Kim W., 2015. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 16, 023501. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>
- Xia Y., Xiong Y., Lim B., Skrabalak S.E., 2009. Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanocrystals: Simple Chemistry Meets Complex Physics? *Angew. Chemie Int. Ed.* 48, 60–103. <https://doi.org/10.1002/anie.200802248>

- Xie J., Liu T., Song G., Hu Y., Deng C., 2013. Simultaneous analysis of organophosphorus pesticides in water by magnetic solid-phase extraction coupled with GC-MS. *Chromatographia* 76, 535–540. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2408-8>
- Xue N., Li F., Hou H., Li B., 2008. Occurrence of endocrine-disrupting pesticide residues in wetland sediments from Beijing, China. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1055–1062. <https://doi.org/10.1897/07-511.1>
- Yan H., Wang H., 2013. Recent development and applications of dispersive liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1295, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2013.04.053>
- Yan Y., Chen X., Hu S., Bai X., 2014. Applications of liquid-phase microextraction techniques in natural product analysis: A review. *J. Chromatogr. A* 1368, 1–17. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.09.068>
- Yang M., Gu Y., Wu X., Xi X., Yang X., Zhou W., Zeng H., Zhang S., Lu R., Gao H., Li J., 2018. Rapid analysis of fungicides in tea infusions using ionic liquid immobilized fabric phase sorptive extraction with the assistance of surfactant fungicides analysis using IL-FPSE assisted with surfactant. *Food Chem.* 239, 797–805. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.080>
- Yang M., Wu X., Jia Y., Xi X., Yang X., Lu R., Zhang S., Gao H., Zhou W., 2016. Use of magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction to extract fungicides from environmental waters with the aid of experimental design methodology. *Anal. Chim. Acta* 906, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.019>
- Yankova R. and Radev L., 2016. Structural and Electronic Properties of [Co(benzimidazole)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>. *International Journal of Materials and Chemistry.* 6, 19-27. <http://article.sapub.org/10.5923.j.ijmc.20160602.01.html>
- Yao C., Li T., Twu P., Pitner W.R., Anderson J.L., 2011. Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid–liquid microextraction using functionalized ionic liquids. *J. Chromatogr. A* 1218, 1556–1566. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.035>
- Yao W., Zhang Z., Song S., Hao X., Xu Y., Han L., 2019. Multi-residue Analysis of 34 Pesticides in Black Pepper by QuEChERS with d-SPE Vs. d-SLE Cleanup. *Food Anal. Methods* 12, 176–189. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1350-7>
- Ye Q., Liu L., Chen Z., Hong L., 2014. Analysis of phthalate acid esters in environmental water by magnetic graphene solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass

- spectrometry. J. Chromatogr. A 1329, 24–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.086>
- Yu H., Clark K.D., Anderson J.L., 2015. Rapid and sensitive analysis of microcystins using ionic liquid-based in situ dispersive liquid-liquid microextraction. J. Chromatogr. A 1406, 10–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.075>
- Yu H., Merib J., Anderson J.L., 2016. Faster dispersive liquid-liquid microextraction methods using magnetic ionic liquids as solvents. J. Chromatogr. A 1463, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.007>
- Yu P., Wang Q., Zhang Xifeng, Zhang Xuesong, Shen S., Wang Y., 2010. Development of superparamagnetic high-magnetization C18-functionalized magnetic silica nanoparticles as sorbents for enrichment and determination of methylprednisolone in rat plasma by high performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 678, 50–5. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.012>
- Yu X., Sun Y., Jiang C., Sun X., Gao Y., Wang Y., Zhang H., Song D., 2012. Magnetic solid-phase extraction of five pyrethroids from environmental water samples followed by ultrafast liquid chromatography analysis. Talanta 98, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.022>
- Zech O., Stoppa A., Buchner R., Kunz W., 2010. The Conductivity of Imidazolium-Based Ionic Liquids from (248 to 468) K. B. Variation of the Anion. J. Chem. Eng. Data 55, 1774–1778. <https://doi.org/10.1021/jc900793r>
- Zhang C., Cagliero C., Pierson S.A., Anderson J.L., 2017. Rapid and sensitive analysis of polychlorinated biphenyls and acrylamide in food samples using ionic liquid-based in situ dispersive liquid-liquid microextraction coupled to headspace gas chromatography. J. Chromatogr. A 1481, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.013>
- Zhang L., Chen F., Liu S., Chen B., Pan C., 2012. Ionic liquid-based vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of organophosphorus pesticides in apple and pear. J. Sep. Sci. 35, 2514–2519. <https://doi.org/10.1002/jssc.201101060>
- Zhang Yaohai, Zhang Yan, Nie J., Jiao B., Zhao Q., 2016. Determination of Triazole Fungicide Residues in Fruits by QuEChERS Combined with Ionic Liquid-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction: Optimization Using Response Surface Methodology. Food Anal. Methods 9, 3509–3519. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0548-9>
- Zhang Z., Kong J., 2011. Novel magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles as adsorbents for removal of organic dyes from aqueous solution. J. Hazard. Mater. 193, 325–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.033>

- Zhao G., Song S., Wang C., Wu Q., Wang Z., 2011. Determination of triazine herbicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography using graphene-coated magnetic nanoparticles as adsorbent. *Anal. Chim. Acta* 708, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.006>
- Zhao P., Zhao J., Lei S., Guo X., Zhao L., 2018. Simultaneous enantiomeric analysis of eight pesticides in soils and river sediments by chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 204, 210–219. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.03.204>
- Zhao R., Wang X., Sun J., Hu C., Wang X., 2011. Determination of triclosan and triclocarban in environmental water samples with ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to HPLC-ESI-MS/MS. *Microchim. Acta* 174, 145–151. <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0607-2>
- Zhou J., Sui, H. Jia Z., Yang Z., He L., Li X., 2018. Recovery and purification of ionic liquids from solutions: a review. *RSC Adv.* 8, 32832–32864. <https://doi.org/10.1039/C8RA06384B>
- Zhou Q., Bai H., Xie G., Xiao J., 2008. Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A* 1188, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.094>
- Zhou Q., Zhang X., Xiao J., 2009. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction: A novel approach for the sensitive determination of aromatic amines in water samples. *J. Chromatogr. A* 1216, 4361–4365. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2009.03.046>
- Zhou Q., Zhang X., Xie G., 2011. Simultaneous analysis of phthalate esters and pyrethroid insecticides in water samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Anal. Methods* 3, 1815. <https://doi.org/10.1039/c1ay05137g>
- Zhu S., Wang L., Su A., Zhang H., 2017. Dispersive liquid-liquid microextraction of phenolic compounds from vegetable oils using a magnetic ionic liquid. *J. Sep. Sci.* 40, 3130–3137. <https://doi.org/10.1002/jssc.201700274>
- Zhu W., Wu P., Yang L., Chang Y., Chao Y., Li H., Jiang Y., Jiang W., Xun S., 2013. Pyridinium-based temperature-responsive magnetic ionic liquid for oxidative desulfurization of fuels. *Chem. Eng. J.* 229, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.05.115>
- Zhu Y., Liu X., Hu Y., Wang R., Chen M., Wu J., Wang Y., Kang S., Sun Y., Zhu M., 2019. Behavior, remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments. *Environ. Res.*

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.014>

Ziarrusta H., Olivares M., Delgado A., Posada-Ureta O., Zuloaga O., Etxebarria N., 2015. Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 1391, 18–30.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.072>

Zohdi E. and Abbaspour M., 2019. Harmful algal blooms (red tide): a review of causes, impacts and approaches to monitoring and prediction. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*

<https://doi.org/10.1007/s13762-018-2108-x>

#### ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αντωνοπούλου Μ. (2013), «Φωτοκαταλυτική διάσπαση οργανικών ρύπων προτεραιότητας σε υδατικά συστήματα», Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών

Βούτσινος Γ., Κοσμάς Κ., Καλκάνης Γ. και Σούτσας Κ. (1998) «Διαχείριση Φυσικών Πόρων», Εκδόσεις ΟΕΔΒ, Αθήνα

Δεληγιαννάκης Ι., Χελά Δ. και Κωνσταντίνου Ι. (2010) «Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση», Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη

Θεοχάρης Μ. (2013), «Ρύπανση υδάτινων πόρων», Σημειώσεις τμήματος Φυτικής Παραγωγής, ΤΕΙ Ηπείρου

Κ.Υ.Α. 2048/19/5/2010: «Καθορισμός ποιοτικών περιβαλλοντικών προτύπων στον ποταμό Ασωπό και οριακών τιμών εκπομπών υγρών βιομηχανικών αποβλήτων στη λεκάνη απορροής του Ασωπού» Εφημερίδα Κυβερνήσεως, Τευχ. Β', Αρ. Φύλλου 749, σελ. 9409, 31/5/2010.

Κακλαμάνου Γ. (2009), «Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ορμονών με αυξητική δράση σε βιολογικά δείγματα με υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μαζών», Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Καραμανλής Ξ. (2018), «Υδάτινο περιβάλλον, αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιβάλλοντος και υδατοκαλλιεργειών» Σημειώσεις Εργαστηρίου οικολογίας και προστασίας περιβάλλοντος, Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Καψή Μ. (2013), «Βελτιστοποίηση αναλυτικών τεχνικών προσδιορισμού σύγχρονων φυτοφαρμάκων και εκτίμηση των επιπτώσεών τους στη λεκάνη απορροής του Λούρου ποταμού και τον Αμβρακικό κόλπο», Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Κοτρίκλα Α., (2015), «Ναυτιλία και Περιβάλλον», Τμήμα Ναυτιλίας και Επιχειρηματικών Υπηρεσιών Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών (ΣΕΑΒ)

- Κοσμά Χ. (2013), «Ανίχνευση, μεταφορά και φωτολυτική διάσπαση φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον», Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- Κουμπάρης Μ. (2015), «Έλεγχος και Διασφάλιση Ποιότητας – Διαπίστευση, Έκδοση: 1.0» Εθνικών και Καποδιστριακών Πανεπιστημίων Αθηνών <http://opencourses.uoa.gr/courses/CHEM102>.
- ΚΥΑ 12966 (2009), Κοινή Υπουργική Απόφαση Υπ' Αριθ' 12966 «Χαρακτηρισμός των χερσαίων, υδάτινων και θαλάσσιων περιοχών των εκβολών των ποταμών Γαλλικού, Αξιού, Λουδία και Αλιάκμονα, της Αλυκής Κίτρους και της λιμνοθάλασσας Καλοχωρίου και της ευρύτερης περιοχής τους ως Εθνικού Πάρκου και καθορισμός χρήσεων, όρων και περιορισμών δόμησης». Αθήνα.
- ΚΥΑ 14874/3291 (1998), Κοινή Υπουργική Απόφαση Υπ' Αριθ' 14874/3291 «Μέτρα για την προστασία των υδροτόπων της Αλυκής Κίτρους, του κάτω ρου και του Δέλτα των ποταμών Αλιάκμονα, Λουδία, Αξιού, Γαλλικού, της λιμνοθάλασσας Καλοχωρίου και της ευρύτερης περιοχής τους». Αθήνα.
- Π.Δ 51/2007: Καθορισμός μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη προστασία και διαχείριση των υδάτων σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της Οδηγίας 2000/60/ΕΚ «Για την θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων» του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23<sup>ης</sup> Οκτωβρίου 2000
- Παππάς Γ. (2012) «Σύνθεση και χαρακτηρισμός πολυμερών στην επιφάνεια ανόργανων νανοσωματιδίων», Μεταπτυχιακή διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο, Τμήμα Χημείας.
- ΣΕΘ (2018), Σύλλογος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια-Ετήσια έκθεση 2018, [https://www.fgm.com.gr/uploads/file/FGM\\_18\\_GR\(2\).pdf](https://www.fgm.com.gr/uploads/file/FGM_18_GR(2).pdf)
- Ταπεινός Χ (2013), «Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Τροποποιημένων Πολύ-λειτουργικών Νανοπεριεκτών», Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Διαχείρισης περιβάλλοντος και φυσικών πόρων.
- Τσόνας Ι., (2017), «Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου και υπολογισμός μεγέθους με τεχνικές περίθλασης ακτίνων-Χ και μαγνητομετρίας», Πολυτεχνική σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- ΦΕΚ Α' 280/9.12.2003: Νόμος 3199/2003: «Προστασία και διαχείριση των υδάτων-Εναρμόνιση με την Οδηγία 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23<sup>ης</sup> Οκτωβρίου 2000».
- Φορέας διαχείρισης Θερμαϊκού κόλπου <https://axiosdelta.gr/%CE%B5%CE%B8%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CF%8C-CF%80%CE%AC%CF%81%CE%BA%CE%BF/%CE%BF%CE%B9>

## Βιβλιογραφία

%CE%BA%CE%BF%CF%83%CF%85%CF%83%CF%84%CE%B7%CE%BC%CE%B9%CE%BA  
%CE%AD%CF%82-%CF%85%CF%80%CE%B7%CF%81%CE%B5%CF%83%CE%AF%CE%B  
5%CF%82/%CE%BC%CF%85%CE%B4%CE%BF%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%  
B9%CE%AD%CF%81%CE%B3%CE%B5%CE%B9%CE%B1/

Χατζηχρήστου Ε., (2016), «Προσδιορισμός μυκήτων και μυκοτοξινών σε ιχθυοτροφές και συστατικά ιχθυοτροφών», Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.



## Συντομογραφίες

Ακρωνύμιο	Αγγλικός όρος	Απόδοση στα ελληνικά
AF	Assessment Factor	Συντελεστής αβεβαιότητας
ANOVA	Analysis of Variance	Ανάλυση διακύμανσης
DOE	Design of Experiments	Πειραματικός σχεδιασμός
DWQs	Drinking Water Quality standards	Πρότυπα ποιότητας για το πόσιμο νερό
EC	European Commission	Ευρωπαϊκή Επιτροπή
EC50	Effective Concentration 50	Ποσότητα ουσίας που προκαλεί το 50%
ECs	Emerging Contaminants	Αναδυόμενοι ρύποι
EDCs	Endocrine Disrupting Compounds	Ενδοκρινικοί διαταράκτες
EEA	European Environmental Agency	Ευρωπαϊκή Υπηρεσία Περιβάλλοντος
EFSA	European Food Safety Agency	Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EAAT)
EI	Electron (Impact) Ionization	Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων
EPRW	European Pesticides Residues Workshop	Ευρωπαϊκό συνέδριο για τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων
EQS	Environmental Quality Standard	Πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος
ERA	Environmental Risk Assessment	Εκτίμηση περιβαλλοντικής επικινδυνότητας
ESI	Electrospray Ionization	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
FA	Formic Acid	Μυρμηκικό (μυρμηκικό) οξύ
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Οργανισμός τροφίμων και γεωργίας του ΟΗΕ
FEPA	Food and Environment Protection Act	Αγγλικός Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος και Τροφίμων

<b>FS</b>	Full Scan	Πλήρης σάρωση φασμάτων μάζας
<b>FT</b>	Fourier Transform	Μετασχηματισμός Fourier
<b>FWHM</b>	Full Width Half Maximum	Πλήρες εύρος στο μισό του μέγιστου
<b>GC</b>	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
<b>GCB</b>	Graphitized Carbon Black	Γραφίτοποιημένος άνθρακας
<b>GC-MS</b>	Gas Chromatography–Mass spectrometry	Αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας
<b>GESAMP</b>	Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution	Επιστημονική Επιτροπή για τη Θαλάσσια Ρύπανση
<b>GF</b>	Glass Fiber Filters	Φίλτρα (ίνες υαλοβάμβακα)
<b>GMP</b>	Good Manufacturing Practice	Ορθή Βιομηχανική Πρακτική
<b>LC</b>	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
<b>LOD</b>	Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
<b>LOF</b>	Lack of Fit	Έλλειψη προσαρμογής
<b>LOQ</b>	Limit of Detection	Όριο ποσοτικοποίησης
<b>MEC</b>	Measured Environmental Concentration	Συγκέντρωση ουσίας που ανιχνεύθηκε
<b>MIL</b>	Magnetic Ionic Liquid	Μαγνητικό Ιοντικό Υγρό
<b>MNPs</b>	Magnetic Nanoparticles	Μαγνητικά νανοσωματίδια
<b>MSPE</b>	Magnetic Solid Phase Extraction	Μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης
<b>RQ</b>	Risk Quotient	Μέθοδος πηλίκου
<b>RSD</b>	Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
<b>RSM</b>	Response Surface Methodology	Μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης
<b>RT</b>	Retention Time	Χρόνος κατακράτησης
<b>SIM</b>	Selected Ion Monitoring	Μέθοδος ανίχνευσης επιλεγμένων ιόντων

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**  
**ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ**

**Πίνακας 1:** Φυσικοχημικές ιδιότητες atrazine

Μοριακός τύπος	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>
Χημική κατηγορία	Τριαζίνη
Δράση	Ζιζανιοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	215.69
CAS-number	1912-24-9
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	35
pKa	4.12 & 14.48
Σημείο τήξης (°C)	175.8
Σημείο βρασμού (°C)	Διασπάται πριν τον βρασμό
Τάση ατμών (mPa)	0.039
Log K <sub>ow</sub>	2.6
Log P	2.2
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	1.50 x 10 <sup>-4</sup>

**Πίνακας 2:** Φυσικοχημικές ιδιότητες ethoxyguanine

Μοριακός τύπος	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO
Χημική κατηγορία	Κινολόνη
Δράση	Μυκητοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	217.31
CAS-number	1912-24-9
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	60
pKa	5.15
Σημείο τήξης (°C)	175.8
Σημείο βρασμού (°C)	Διασπάται πριν τον βρασμό
Τάση ατμών (mPa)	0.346
Log K <sub>ow</sub>	3.1
Log P	3.4
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	4.43 x 10 <sup>-2</sup>

**Πίνακας 3:** Φυσικοχημικές ιδιότητες chlorothalonil

Μοριακός τύπος	C <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub> N <sub>2</sub>
Χημική κατηγορία	Χλωρονιτρίλιο
Δράση	Μυκητοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	265.9
CAS-number	1912-24-9
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	0.81
pKa	*
Σημείο τήξης (°C)	175.8
Σημείο βρασμού (°C)	Διασπάται πριν τον βρασμό
Τάση ατμών (mPa)	0.076
Log K <sub>ow</sub>	3.05
Log P	4.1
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	2.5 x 10 <sup>-2</sup>

**Πίνακας 4:** Φυσικοχημικές ιδιότητες chlorpyrifos-methyl

Μοριακός τύπος	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
Χημική κατηγορία	Οργανοφωσφορικό
Δράση	Εντομοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	322.5
CAS-number	1897-45-6
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	2.74
pKa	*
Σημείο τήξης (°C)	252.1
Σημείο βρασμού (°C)	347
Τάση ατμών (mPa)	3.0
Log K <sub>ow</sub>	4.31
Log P	4.07
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	0.235

**Πίνακας 5:** Φυσικοχημικές ιδιότητες parathion-methyl

Μοριακός τύπος	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> NO <sub>5</sub> PS
Χημική κατηγορία	Οργανοφωσφορικό
Δράση	Εντομοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	263.2
CAS-number	298-00-0
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	55
pKa	7.15
Σημείο τήξης (°C)	35.5
Σημείο βρασμού (°C)	**
Τάση ατμών (mPa)	0.2
Log K <sub>ow</sub>	2.86
Log P	2.6
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	8.5 x 10 <sup>-3</sup>

**Πίνακας 6:** Φυσικοχημικές ιδιότητες chlorpyrifos

Μοριακός τύπος	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS
Χημική κατηγορία	Οργανοφωσφορικό
Δράση	Εντομοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	350.5
CAS-number	2921-88-2
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	1.05
pKa	*
Σημείο τήξης (°C)	42
Σημείο βρασμού (°C)	Διασπάται πριν τον βρασμό
Τάση ατμών (mPa)	1.43
Log K <sub>ow</sub>	4.96
Log P	4.78
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	0.478

**Πίνακας 7:** Φυσικοχημικές ιδιότητες resmethrin

Μοριακός τύπος	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>
Χημική κατηγορία	Πυρεθροειδές
Δράση	Εντομοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	338.4
CAS-number	10453-86-8
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	0.01
pKa	*
Σημείο τήξης (°C)	56.5
Σημείο βρασμού (°C)	Διασπάται πριν τον βρασμό
Τάση ατμών (mPa)	0.0015
Log K <sub>ow</sub>	5.43
Log P	5.07
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	8.9 x 10 <sup>-2</sup>

**Πίνακας 8:** Φυσικοχημικές ιδιότητες λ-cyhalothrin

Μοριακός τύπος	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>3</sub>
Χημική κατηγορία	Πυρεθροειδές
Δράση	Εντομοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	449.85
CAS-number	91465-08-6
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	0.005
pKa	10.65
Σημείο τήξης (°C)	49.2
Σημείο βρασμού (°C)	Διασπάται πριν τον βρασμό
Τάση ατμών (mPa)	0.0002
Log K <sub>ow</sub>	7.00
Log P	5.68
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	2 x 10 <sup>-2</sup>

**Πίνακας 9:** Φυσικοχημικές ιδιότητες permethrin

Μοριακός τύπος	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Χημική κατηγορία	Πυρεθροειδές
Δράση	Εντομοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	391.29
CAS-number	52645-53-1
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	0.2
pKa	*
Σημείο τήξης (°C)	34.5
Σημείο βρασμού (°C)	200
Τάση ατμών (mPa)	0.007
Log K <sub>ow</sub>	6.5
Log P	5.7
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	1.89 x 10 <sup>-3</sup>

**Πίνακας 10:** Φυσικοχημικές ιδιότητες Irgarol

Μοριακός τύπος	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S
Χημική κατηγορία	Τριαζίνη
Δράση	Ζιζανιοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	253.37
CAS-number	28159-98-0
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	7.0
pKa	6.68 & 14.13
Σημείο τήξης (°C)	128
Σημείο βρασμού (°C)	**
Τάση ατμών (mPa)	0.088
Log K <sub>ow</sub>	3.99
Log P	2.99
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	**

**Πίνακας 11:** Φυσικοχημικές ιδιότητες deltamethrin

Μοριακός τύπος	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
Χημική κατηγορία	Πυρεθροειδές
Δράση	Εντομοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	505.2
CAS-number	52918-63-5
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	0.0002
pKa	*
Σημείο τήξης (°C)	101
Σημείο βρασμού (°C)	Διασπάται πριν τον βρασμό
Τάση ατμών (mPa)	0.0000124
Log K <sub>ow</sub>	
Log P	4.6
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	3.10 X 10 <sup>-2</sup>

**Πίνακας 12:** Φυσικοχημικές ιδιότητες azamethiphos

Μοριακός τύπος	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> PS
Χημική κατηγορία	Οργανοφωσφορικό
Δράση	Εντομοκτόνο
Μοριακό βάρος (g mol <sup>-1</sup> )	324.68
CAS-number	35575-96-3
Διαλυτότητα στο νερό mg L <sup>-1</sup> (25°C)	1100
pKa	*
Σημείο τήξης (°C)	89
Σημείο βρασμού (°C)	Διασπάται πριν τον βρασμό
Τάση ατμών (mPa)	0.0049
Log K <sub>ow</sub>	
Log P	1.05
Σταθερά Henry (Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	1.45 X 10 <sup>-06</sup>





**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**  
**ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΡΟΤΕΡΑΙΟΤΗΤΑΣ**

**Πίνακας 1:** Πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος (ΠΠΠ) για ουσίες προτεραιότητας και αναδυόμενους ρύπους σύμφωνα με την Οδηγία 200/105/ΕΚ.

Αριθ.	Ονομασία ουσίας	ΕΜΤ-ΠΠΠ Επιφανειακά ύδατα (μg/L)	ΕΜΤ-ΠΠΠ Λοιπά επιφανειακά (μg/L)	ΜΕΣ-ΠΠΠ Επιφανειακά ύδατα (μg/L)	ΜΕΣ-ΠΠΠ Λοιπά επιφανειακά (μg/L)	ΠΠΠ Ζώντες (μg/kg) οργ/σμοί
(1)	Alachlor	0,3	0,3	0,7	0,7	
(2)	Ανθρακένιο	0,1	0,1	0,1	0,1	
(3)	Ατραζίνη	0,6	0,6	2,0	2,0	
(4)	Βενζόλιο	10	8	50	50	
(5)	Βρωμιούχοι διφαινυλαιθέρες			0,14	0,014	0,0085
(6)	Κάδμιο και οι ενώσεις του (ανάλογα με τις κατηγορίες σκληρότητας νερού)	≤ 0,08 (Κατηγορία 1) 0,08 (Κατηγορία 2) 0,09 (Κατηγορία 3) 0,15 (Κατηγορία 4) 0,25 (Κατηγορία 5)	0,2	≤ 0,45 (Κατηγορία 1) 0,45 (Κατηγορία 2) 0,6 (Κατηγορία 3) 0,9 (Κατηγορία 4) 1,5 (Κατηγορία 5)	≤ 0,45 (Κατηγορία 1) 0,45 (Κατηγορία 2) 0,6 (Κατηγορία 3) 0,9 (Κατηγορία 4) 1,5 (Κατηγορία 5)	
(6α)	τετραχλωράνθρακας	12	12	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(7)	Χλωροαλκάνια C10-13	0,4	0,4	1,4	1,4	
(8)	Chlorfenvinphos	0,1	0,1	0,3	0,3	
(9)	Chlorpyrifos (Chlorpyrifos-ethyl)	0,03	0,03	0,1	0,1	
(9α)	Φυτοφάρμακα κυκλοδιενίου:Αλδρίνη, Διελδρίνη, Ενδρίνη, Ισοδρίνη	Σ=0,01	Σ=0,005	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(9β)	Ολικό DDT	0,025	0,025	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(10)	1,2-Διχλωροαιθάνιο	10	10	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(11)	Διχλωρομεθάνιο	20	20	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	

(12)	Φθαλικό δι(2-αιθυλεξίλιο) (DEHP)	1,3	1,3	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(13)	Διuron (Διουρόνη)	0,2	0,2	1,8	1,8	
(14)	Endosulfan (Ενδοσουλφάνη)	0,005	0,0005	0,01	0,004	
(15)	Φλουορανθένιο	0,0063	0.0063	0,12	0,12	30
(16)	Εξαχλωροβε-νζόλιο			0,05	0,05	10
(17)	Εξαχλωροβου-ταδιένιο			0,6	0,6	55
(18)	Εξαχλωροκυ-κλοεξάνιο	0,02	0,002	0,04	0,02	
(19)	Isoproturon (Ισοπροτου-ρόνη)	0,3	0,3	1,0	1,0	
(20)	Μόλυβδος και οι ενώσεις	1,2 <sup>13</sup>	1,3	14	14	
(21)	Υδράργυρος και οι ενώσεις του			0,07	0,07	20
(22)	Ναφθαλίλιο	2	2	130	130	
(23)	Νικέλιο και οι ενώσεις του	4	8,6	34	34	
(24)	Εννεύλοφαινόλες (4- εννεύλοφαινόλη)	0,3	0,3	2,0	2,0	
(25)	Οκτυλοφαινόλη ((4-,1',3,3'- τετραμεθυλβουτυλική)- φαινόλη))	0,1	0,1	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(26)	Πενταχλωροβενζόλιο	0,007	0,0007	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(27)	Πενταχλωροφαινόλη	0,4	0,4	1	1	
(28)	Πολυκυκλικό αρωματικό υδρογονάνθρακες (PAH)	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
	Βενζο(α)πυρένιο	1,7×10 <sup>-4</sup>	1,7×10 <sup>-4</sup>	0,27	0,027	5
	Βενζο(β)φλουορανθένιο			0,017	0,017	
	Βενζο(κ)φλουορανθένιο			0,017	0,017	
	βενζο(g,h,i)περυλένιο			8,2×10 <sup>-3</sup>	8,2×10 <sup>-4</sup>	
	Ινδενο(1,2,3-cd)πυρένιο			δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(29)	Σιμαζίνη	1	1	4	4	
(29α)	Τετραχλωροαιθυλένιο	10	10	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(29β)	Τριχλωροαιθυλένιο <sub>7</sub>	10	10	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(30)	Ενώσεις τριβουτυλοκασιτέρου (κατιόν τριβουτυλοκασιτέρου)	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015	

(31)	Τριχλωροβενζόλια	0,4	0,4	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(32)	Τριχλωρομεθάνιο	2,5	2,5	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(33)	Τριφλουραλίνη	0,03	0,03	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(34)	Dicofof	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-5}$	δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	33
(35)	Υπερφθορο κτανοσουλφονικό οξύ και τα παράγωγά του (PFOS)	$6,5 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	36	7,2	9,1
(36)	Quinoxifen	0,15	0,015	2,7	0,54	
(37)	Διοξίνες και παρόμοιες με τις διοξίνες ενώσεις			δεν εφαρμόζεται	δεν εφαρμόζεται	
(38)	Aclonifen	0,12	0,012	0,12	0,012	
(39)	BifenoX	0,012	0,0012	0,04	0,004	
(40)	Cybutryne	0,0025	0,0025	0,016	0,016	
(41)	Κυπερμεθρίνη	$8 \times 10^{-5}$	$8 \times 10^{-6}$	$6 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-5}$	
(42)	Dichlorvos	$6 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-5}$	
(43)	Εξαβρωμοκυκλο- δωδεκάνιο (HBCDD)	0,0016	0,0008	0,5	0,05	167
(44)	Heptachlor και εποξειδίο του heptachlor	$2 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-8}$	$3 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-3}$
(45)	Τερβουτρίνη	0,065	0,0065	0,34	0,034	

[http://www.cylaw.org/nomoi/enop/non-ind/2004\\_1\\_13/full.html](http://www.cylaw.org/nomoi/enop/non-ind/2004_1_13/full.html)

**Πίνακας 2:** Πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος (ΠΠΠ) για ουσίες προτεραιότητας και αναδουόμενους ρύπους σύμφωνα με την ΚΥΑ 20488/2010 (ΦΕΚ 749 Β).

A/A	Ουσία	Αριθμός CAS <sup>1</sup>	Μονάδες	ΠΠΠ – Ετήσια Μέση Συγκέντρωση (ΕΜΣ) <sup>2</sup>	ΠΠΠ - Μέγιστη Επιτρεπόμενη Συγκέντρωση (ΜΕΣ) <sup>2,3</sup>
1	Alachlor	15972-60-8	μg/l	0,3	0,7
2	Ανθρακένιο	120-12-7	μg/l	0,1	0,4
3	Ατραζίνη	1912-24-9	μg/l	0,6	2
4	Βενζόλιο	71-43-2	μg/l	10	50
5	Βρωμιούχος διφαινυλαιθέρας <sup>4</sup>	32534-81-9	μg/l	0,0005	*
6	Κάδμιο και ενώσεις του (διαλυτό) <sup>5</sup>	7440-43-9	μg/l	0,08 (<40 mgCaCO <sub>3</sub> /l) 0,08 (40-50 mgCaCO <sub>3</sub> /l) 0,09 (50-100 mgCaCO <sub>3</sub> /l) 0,15 (100-200 mgCaCO <sub>3</sub> /l) 0,25 (>200 mgCaCO <sub>3</sub> /l)	0,45 (<40 mgCaCO <sub>3</sub> /l) 0,45 (40-50 mgCaCO <sub>3</sub> /l) 0,60 (50-100 mgCaCO <sub>3</sub> /l) 0,90 (100-200 mgCaCO <sub>3</sub> /l) 1,50 (>200 mgCaCO <sub>3</sub> /l)
7	C10-13 Χλωροαλκάνια	85535-84-8	μg/l	0,4	1,4
8	Chlorfenvinphos	470-90-6	μg/l	0,1	0,3
9	Chlorpyrifos (Chlorpyrifos-ethyl)	2921-88-2	μg/l	0,03	0,1
10	1,2 Διχλωροαιθάνιο	107-06-2	μg/l	10	*
11	Διχλωρομεθάνιο	75-09-2	μg/l	20	*
12	Φθαλικό δι(2-αιθυλεξίλιο) – (ΦΔΕΕ-DEHP)	117-81-7	μg/l	1,3	*
13	Diuron	330-54-1	μg/l	0,2	1,8
14	Ενδοσουλφάνιο	115-29-7	μg/l	0,005	0,01
15	Φλουρανθένιο	206-44-0	μg/l	0,1	1
16	Εξαχλωροβενζόλιο	118-74-1	μg/l	0,01	0,05
17	Εξαχλωροβουταδιένιο	87-68-3	μg/l	0,1	0,6
18	Εξαχλωροκυκλοεξάνιο	608-73-1	μg/l	0,02	0,04
19	Isoroturon	34123-59-6	μg/l	0,3	1
20	Μόλυβδος και ενώσεις του (διαλυτός)	7439-92-1	μg/l	7,2	*
21	Υδράργυρος και ενώσεις του (διαλυτός)	7439-97-6	μg/l	0,05	0,07
22	Ναφθαλένιο	91-20-3	μg/l	2,4	*
23	Νικέλιο και ενώσεις του (διαλυτό)	7440-02-0	μg/l	20	*
24	Εννεόλοφαινόλη [4-εννεόλοφαινόλη]	104-40-5	μg/l	0,3	2
25	Οκτολοφαινόλη [(4-(1,1', 3,3'-τετραμεθυλβουτυλική)-φαινόλη)]	140-66-9	μg/l	0,1	*
26	Πενταχλωροβενζόλιο	608-93-5	μg/l	0,007	*
27	Πενταχλωροφαινόλη	87-86-5	μg/l	0,4	1
28	Πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΡΑΗ) <sup>6</sup>	*	*	*	*
28α	Βενζο(α)πυρένιο	50-32-8	μg/l	0,05	0,1
28β	Βενζο(β)φθορανθένιο	205-99-2	μg/l	Σ=0,03	*
28γ	Βενζο(κ)φθορανθένιο	207-08-9	μg/l		
28δ	Βενζο(ζ,η,θ)-περιλένιο	191-24-2	μg/l	Σ=0,002	*
28ε	ΙνδENO(1,2,3-γδ)πυρένιο	193-39-5	μg/l		
29	Σιμαζίνη	122-34-9	μg/l	1	4
30	Ενώσεις τριβουτυλίνης (κατιόν τριβουτυλίνης)	36643-28-4	μg/l	0,0002	0,0015

**Πίνακας 2:** (συνέχεια) Πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος (ΠΠΠ) για ουσίες προτεραιότητας και αναδυόμενους ρύπους σύμφωνα με την ΚΥΑ 20488/2010 (ΦΕΚ 749 Β).

40	1,1,1-Τριχλωροαιθάνιο	71-55-6	μg/l	10	**
41	1,1,2- Τριχλωροαιθάνιο	79-00-5	μg/l	10	**
42	1,1-Διχλωροαιθυλένιο	75-35-4	μg/l	10	**
43	1,2- Διχλωροαιθυλένιο	540-59-0	μg/l	10	**
44	1,2-Διχλωροβενζόλιο	95-50-1	μg/l	10	**
45	1,3- Διχλωροβενζόλιο	541-73-1	μg/l	10	**
46	1,4- Διχλωροβενζόλιο	106-46-7	μg/l	10	**
47	2,4,5-Τ (τριχλωροφαινοξιοξικό οξύ) και εστέρες	93-76-5	μg/l	0,1	**
48	2,4-D (2,4- διχλωροφαινοξιοξικό οξύ) και εστέρες	94-75-7	μg/l	0,1	**
49	2-χλωροτολουόλιο	95-49-8	μg/l	1	**
50	3,4-διχλωροανιλίνη	95-76-1	μg/l	0,5	**
51	3-hydroxyphenol (resorcinol)	108-46-3	μg/l	12,5	**
52	4- χλωροτολουόλιο	106-43-4	μg/l	1	**
53	4-hydroxyphenol (hydroquinone)	8027-02-9	μg/l	2	**
54	4-χλωροανιλίνη	106-47-8	μg/l	0,05	**
55	Azinphosethyl	2642-71-79	μg/l	0,005	0,01
56	Azinphosmethyl	86-50-0	μg/l	0,005	0,01
57	Bentazone	25057-89-0	μg/l	0,1	**
58	Chlordane	57-74-9	μg/l	0,003	**
59	Coumaphos	56-72-4	μg/l	0,07	**
60	Demeton (O+S)	8065-48-3	μg/l	0,05	0,14
61	Demeton-S-Methyl	919-86-8	μg/l	0,1	**
62	Dichlorprop	120-36-5	μg/l	0,1	**
63	Dimethoate	60-51-5	μg/l	0,5	23
64	Disulfoton	298-04-4	μg/l	0,004	**
65	Fenitrothion	122-14-5	μg/l	0,003	0,01
66	Fenthion	55-38-9	μg/l	0,001	0,01
67	Heptaclor	76-44-8	μg/l	0,05	**
68	Heptaclor hepoxide	102-45-73	μg/l	0,05	**
69	Linuron	330-55-2	μg/l	0,5	1
70	Malathion	121-75-5	μg/l	0,01	**
71	MCPA	94-74-6	μg/l	0,1	**
72	Mecoprop	7085-19-0	μg/l	0,1	**
73	Methamidophos	10265-92-6	μg/l	0,1	**
74	Mevinphos	7786-34-7	μg/l	0,01	**
75	Monolinuron	1746-81-2	μg/l	0,1	**
76	Omethoate	1113-02-6	μg/l	0,1	**
77	Oxydemeton-methyl	301-12-2	μg/l	0,1	**
78	Parathion	56-38-2	μg/l	0,01	0,065
79	Parathion methyl	298-00-0	μg/l	0,01	**
80	Propanil	709-98-8	μg/l	0,1	**
81	Pyrazon	1698-60-8	μg/l	0,1	**
82	Triazophos	24017-47-8	μg/l	0,03	**
83	Trichlorfon	52-68-6	μg/l	0,002	**
84	Αιθυλοβενζόλιο	100-41-4	μg/l	10	**
85	Κυανιούχα	74-90-8	μg/l	10	**
86	Ξυλόλια (m+p)	108-38-3, 106-42-3	μg/l	10	**
87	Ξυλόλια (o)	95-47-6	μg/l	10	**
88	Ολικές φαινόλες		μg/l	50	**
89	Πολυχλωριωμένα διφαινόλια		μg/l	0,014	**
90	Τολουόλιο	108-88-3	μg/l	10	380
91	Φαινόλη	108-95-2	μg/l	8	46
92	Χλωροβενζόλιο	108-90-7	μg/l	1	**
93	Αργίλιο		μg/l	87	750
94	Άργυρος		μg/l	3,2	**
95	Αρσενικό		μg/l	30	340

(<http://www.ypeka.gr/LinkClick.aspx?fileticket=53H7w8FMglw%3D&tabid=367>)

