



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Εφαρμογή της Παθητικής Δειγματοληψίας για την αξιολόγηση των επιπέδων
φαρμακευτικών ενώσεων και παρασιτοκτόνων στο υδάτινο περιβάλλον**



ΜΑΚΟΥ ΕΛΙΣΣΑΒΕΤ

ΓΕΩΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Ευχαριστίες

Στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Π.Μ.Σ. του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων εκπονήθηκε η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή στο ερευνητικό εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κυρία Δήμητρα Χελά, Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για τη συνεχή επίβλεψη, καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας. Η συμβολή της, η βοήθεια της και η συνεργασία ήταν καθοριστικής σημασίας για την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Ιωάννη Κωνσταντίνου Καθηγητή του Τμήματος Χημείας για την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου της Βιομηχανικής Χημείας για την βοήθειά τους και τις ουσιαστικές υποδείξεις τους.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων τον κύριο Αλμπάνη Τριαντάφυλλο για τη συνεργασία στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, καθώς και τους Δρ. Βάσια Μπότη και Δρ. Χριστίνα Κοσμά για την βοήθεια τους.

Τέλος, ένα επίσης θερμό ευχαριστώ στην οικογένειά μου που με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια σπουδών και συνεχίζει να με στηρίζει.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	2
Περίληψη	8
ABSTRACT	9
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	10
ΡΥΠΑΝΣΗ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.....	10
1.1 Εισαγωγή.....	10
1.2 Φυσικοί υδάτινοι πόροι- Υδρολογικός κύκλος.....	10
1.3 Ρύποι και πηγές Ρύπανσης	12
1.4 Αναδυόμενοι ρύποι	14
1.5 Ρύπανση υδάτινου περιβάλλοντος.....	18
1.6 Τύχη και συμπεριφορά των μικρορύπων στο περιβάλλον	19
1.7 Υδατοκαλλιέργειες	22
1.7.1 Επίδραση υδατοκαλλιεργειών στο περιβάλλον	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	25
Δειγματοληψία	25
2.1 Εισαγωγή.....	25
2.2 Δειγματοληψία- Γενικά.....	25

2.3 Μέθοδος και τεχνικές δειγματοληψίας στο νερό	26
2.4 Παθητική δειγματοληψία- Γενικά	32
2.2 Ταξινόμηση των παθητικών δειγματοληπτών.....	36
1.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των Παθητικών Δειγματοληπτών.....	38
2.4 Συσκευές ημιπερατής μεμβράνης (SPMD)	39
2.5 Polar Organic Chemical Integrative Sampler	41
2.6 Συσκευές Chemcatcher.....	43
2.7 Βασικές αρχές της Παθητικής Δειγματοληψίας	46
2.8 Μέθοδος και σύστημα βαθμονόμησης συσκευών (POCIS)	49
2.8.1 Εργαστηριακή βαθμονόμηση των POCIS.....	49
2.8.2 In situ (επί τόπου) βαθμονόμηση των συσκευών POCIS.....	52
2.9 Εκτίμηση των συγκεντρώσεων μικρορύπων στο νερό στο φυσικό περιβάλλον .	53
2.10 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την Παθητική Δειγματοληψία	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο.....	60
Μέθοδος Εκχύλισης Στερεάς Φάσης-υγρού (Solid Phase Extraction, SPE)	60
3.1 Γενικά	60
3.2 Αρχή της Μεθόδου (SPE)	61
3.3 Τα βασικά στάδια της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE)	61
3.4 Πλεονεκτήματα της Μεθόδου Εκχύλισης- Στερεάς Φάσης (SPE).....	63
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο.....	64
Υγρή Χρωματογραφία	64

4.1 Η χρωματογραφία ως τεχνική ανάλυσης	64
4.2 Υγρή Χρωματογραφία	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο	70
Φασματομετρία Μάζας.....	70
5.1 Εισαγωγή και η έννοια της φασματομετρίας μάζας- Εφαρμογές	70
5.2 Η έννοια της μάζας στην αναλυτική τεχνική της φασματομετρίας μάζας	71
5.3 Αναλυτές Μάζας.....	72
5.4 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS)	73
5.5 Αναλυτής Orbitrap και Αρχή λειτουργίας.....	74
5.6 Τεχνολογία Normalized Collision Energy™	76
5.7 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της χρήσης του αναλυτικού οργάνου- Orbitrap	77
5.8 Φασματομετρία μάζας και τεχνικές ανάλυσης	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο	86
Φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις	86
6.1 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις	86
6.2 Κατηγορίες Φυτοπροστατευτικών Ενώσεων.....	86
6.3 Νομοθετικό πλαίσιο για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις	87
6.4 Φαρμακευτικές ενώσεις.....	88
6.5 Νομοθετικό πλαίσιο για τις φαρμακευτικές ενώσεις.....	89

6.6	Πρότυπες ενώσεις-στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία και αναλύθηκαν μέσω του αναλυτικού οργάνου Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS).	104
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	90
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	90
	Επιλογή χημικών ενώσεων	90
1.1	Επιλογή φυτοπροστατευτικών ενώσεων	90
1.2	Ζιζανιοκτόνα	92
1.3	Εντομοκτόνα	93
1.4	Μυκητοκτόνα	96
1.5	Ακαρεοκτόνα	97
1.6	Επιλογή φαρμακευτικών ενώσεων	97
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	111
	Υλικά και Μέθοδοι	111
1.1	Χημικά, υλικά, όργανα και σκεύη	111
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	115
	Επεξεργασία των Pest και Pharm- Pocis	115
3.1	Εργαστηριακή επεξεργασία των δειγματοληπτών POCIS	115
3.2	Διαδικασία εκχύλισης SPE που ακολουθήθηκε	120
3.3	Συνθήκες ανάλυσης Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS).	124
3.4	Πειραματική διαδικασία και Πρότυπα διαλύματα	125

3.5 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων	130
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο	130
Αποτελέσματα και Συζήτηση	130
4.1 Σκοπός	130
4.2 Τοποθεσία εφαρμογής της Παθητικής Δειγματοληψίας	136
4.3 Συνοπτικά τα μειονεκτήματα της επί τόπου στιγμιαίας δειγματοληψίας έναντι των πλεονεκτημάτων της παθητικής δειγματοληψίας	136
4.4 Εκτίμηση του ρυθμού δειγματοληψίας	138
4.5 Εκτίμηση του παράγοντα συγκέντρωσης CFt Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	
4.6 Πίνακας Βιβλιογραφικών Τιμών Rs	141
4.7 Συμπεράσματα και Συζήτηση	153
ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ	165
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	154

Περίληψη

Όλο και περισσότερες αναφορές για τους αναδυόμενους ρύπους γίνονται τα τελευταία χρόνια, γεγονός που υποδηλώνει την επείγουσα ανάγκη για την παρακολούθηση τους, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικών προϊόντων και των φυτοφαρμάκων στο θαλάσσιο περιβάλλον ιδιαίτερα στα ύδατα των υδατοκαλλιιεργειών. Η παθητική δειγματοληψία έχει αποδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση έναντι της συμβατικής δειγματοληψίας νερού για την παρακολούθηση φαρμακευτικών προϊόντων και φυτοφαρμάκων. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η χρήση των παθητικών, πολικών, οργανικών, χημικών και ενσωματωμένων δειγματοληπτών ως εργαλείο για τον ποσοτικό και ποιοτικό έλεγχο 7 αντιβιοτικών, 13 φυτοφαρμάκων και 25 φαρμακευτικών και ψυχιατρικών ενώσεων στο θαλασσινό νερό. Παρουσιάζονται δεδομένα για την εμφάνιση αυτών των αναλυτών που συλλέχθηκαν δύο φορές το χρόνο χρησιμοποιώντας την τεχνική της παθητικής δειγματοληψίας σε ιχθυοτροφείο στη Μεσόγειο Θάλασσα. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιλεγμένων ενώσεων-στόχων διεξήχθη με υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάλυσης συζευγμένη με Φασματομετρία μάζας Orbitrap (LC-HR-LTQ/Orbitrap-MS). Κατά τη διάρκεια μιας μελέτης παρακολούθησης δύο εποχών Σεπτεμβρίου-Απριλίου, μεταξύ των επιλεγμένων ενώσεων, δύο αντιβιοτικά (Trimethoprim και Sulfadiazine) και μία αντιρρυπαντική ένωση το Irgarol) εντοπίστηκαν σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων της τάξεως των ppt, υποδεικνύοντας την ανάγκη για ένα οργανωμένο σύστημα παρακολούθησης του περιβάλλοντος της θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας. Οι ενώσεις που βρέθηκαν σε επίπεδο ιχνών δεν αποτελούν σοβαρή απειλή για τους θαλάσσιους οργανισμούς.

ABSTRACT

Increasingly widespread reports suggest the urgent demand of monitoring emerging contaminant including pharmaceuticals and pesticides, in the marine environment and specifically in aquaculture waters. Passive sampling has been shown as a promising alternative to conventional water sampling for the monitoring of pharmaceuticals and pesticides. The use of polar organic chemical integrative sampling (POCIS) passive samplers as a semi-quantitative and qualitative tool for screening of 7 antibiotics, 13 pesticides and 25 pharmaceuticals/psychiatric drugs in seawater has been studied. Data on the presence of these analytes are presented that were collected twice a year using passive sampling techniques in a fish farm placed on the Mediterranean Sea. Detection and quantification of the selected target compounds was carried out with liquid chromatography- high-resolution linear ion trap/ Orbitrap mass spectrometry (LC-HR-LTQ/Orbitrap -MS). During a two- season monitoring study, among the selected compounds, two antibiotics (trimethoprim and sulfadiazine) and one antifouling compound (irgarol1051) were detected at the low ppt levels indicating the need for an organized monitoring system of the marine aquaculture surrounding environment. Despite the compounds found, the detected levels do not pose any serious threat to the marine organisms.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΡΥΠΑΝΣΗ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Το νερό αποτελεί πηγή ζωής για τον πλανήτη και είναι άμεσα συνυφασμένο με την διατήρηση και την εξέλιξη της. Αποτελεί έναν φυσικό πόρο ο οποίος δεν είναι ανανεώσιμος, αλλά ανακυκλώσιμος. Το γεγονός αυτό ουσιαστικά σημαίνει ότι τα αποθέματα του νερού παραμένουν σταθερά παρότι ο πληθυσμός της γης συνεχώς αυξάνεται. Ωστόσο, η ραγδαία επιστημονική και τεχνολογική πρόοδος έχει επιβαρύνει σε βάθος χρόνου τα οικοσυστήματα με αποτέλεσμα να απειλείται η ποιότητα του νερού με υποβάθμιση. Η αλόγιστη χρήση των υδάτινων συστημάτων βασίζεται κυρίως στην πεποίθηση ότι τέτοιου είδους συστήματα είναι αχανή και επηρεάζονται δύσκολα, καθώς η αποκατάστασή τους θα ήταν άμεση και γρήγορη από την ίδια τη φύση. Όμως τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο πρόβλημα ρύπανσης των θαλάσσιων οικοσυστημάτων και λαμβάνονται δράσεις πρωτίστως στις παράκτιες περιοχές όπου και εντοπίζεται η μεγαλύτερη αλιευτική δραστηριότητα. Λόγω της μεγάλης ανάπτυξης της τεχνολογίας έχουμε τη σύνθεση και τη χρήση ολοένα και περισσότερων χημικών ενώσεων-ουσιών που δύσκολα αποικοδομούνται και αποτίθενται στα υδάτινα οικοσυστήματα και κυρίως στα θαλάσσια με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τους σε πολύ μεγάλες ποσότητες. Γι' αυτούς τους λόγους κρίνεται αναγκαίος ο έλεγχος των υδάτων με σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους για τον προσδιορισμό και την εκτίμηση της ρύπανσης αλλά και, την ανίχνευση της παρουσίας φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων στους υδάτινους αποδέκτες.

1.2 Φυσικοί υδάτινοι πόροι- Υδρολογικός κύκλος

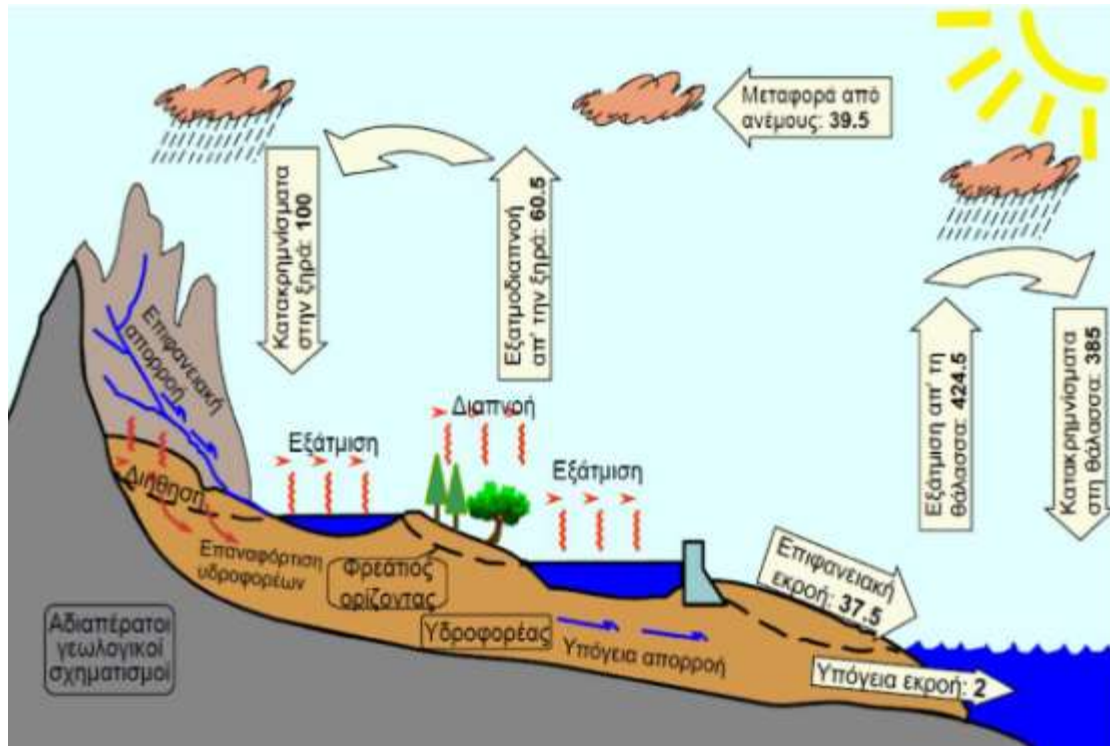
Ως *υδάτινο πόρο* θεωρούμε τον όγκο του νερού- υπόγειου και επιφανειακού- καθορισμένης ποιότητας που μπορεί να αξιοποιηθεί τεχνοοικονομικά σε ορισμένη

χρονική περίοδο χωρίς να προκληθούν ανεπιθύμητες, ποιοτικά και ποσοτικά συνέπειες στο υδατικό δυναμικό της περιοχής ή γειτονικών περιοχών.(Μαρούδης, 2021)

Το νερό θεωρείται ένα περιορισμένο φυσικό αγαθό καθώς το γλυκό νερό αποτελεί ποσοστό 2,5 % της υδρόσφαιρας. Το θαλασσινό νερό ανήκει στους ωκεανούς σε ποσοστό 97,5 % που λόγω της περιεκτικότητας του σε άλατα καθίσταται ακατάλληλο προς χρήση. Το υπόγειο νερό βρίσκεται σε ποσοστό 29,9 % του γλυκού νερού και 0,9 % του γλυκού νερού απαντάται με τη μορφή υγρασίας εδάφους, νερών ελών και μόνιμου πάγου. Τα επιφανειακά νερά αντιστοιχούν σε ποσοστό 0,26% του γλυκού νερού με τη μορφή ποταμών, ταμιευτήρων και λιμνών που ανανεώνονται.(Μαρούδης, 2021)

Με βάση τον υδρολογικό κύκλο το νερό φτάνει στην επιφάνεια της γης με τη μορφή βροχής, χιονιού κλπ. γνωστά και ως κατακρημνίσματα. Στη συνέχεια, το νερό φθάνοντας στην επιφάνεια της γης θα ακολουθήσει τρεις δρόμους :

1. Θα διαπεράσει το έδαφος, θα κατέλθει στον υπόγειο ορίζοντα και θα προστεθεί στο υπόγειο νερό. Αυτή η ποσότητα νερού ονομάζεται κατείδυση.
2. Θα ρεύσει επιφανειακά και μέσω των ποτάμιων συστημάτων θα εκχυθεί τελικώς στη θάλασσα.(επιφανειακή απορροή)
3. Θα επανεξατμισθεί από την επιφάνεια του εδάφους ή να διαπνευσθεί από τα φυτά που το αντλούν από το υπέδαφος.(Μαρούδης, 2021)



Εικόνα 1 Απεικόνιση του υδρολογικού κύκλου και του μέσου ετήσιου υδατικού ισοζυγίου της Γης. (Οι μέσες ετήσιες διακινήσεις νερού έχουν εκφραστεί ως ποσοστό (%) επί της ετήσιας ποσότητας των ατμοσφαιρικών κατακρημνισμάτων στο χερσαίο τμήμα της Γης. Μία ποσοστιαία μονάδα αντιστοιχεί σε 1190 km³/έτος), (Luis and Moncayo, 2016)

Με βάση τις χρήσεις του νερού το 23% της παγκόσμιας κατανάλωσης απορροφάται από την βιομηχανία, το 69% από την γεωργία ενώ το 8 % από τις αστικές χρήσεις. Σύμφωνα με το Υ.Β.Ε.Τ. (Υπουργείο Βιομηχανίας, Έρευνας και Τεχνολογίας) από την ετήσια κατανάλωση νερού στην Ελλάδα που υπολογίστηκε το 1980 το 83,7% χρησιμοποιήθηκε για άρδευση, το 13,9% για οικιακή κατανάλωση και το 2,4% για βιομηχανικούς και ενεργειακούς σκοπούς.

1.3 Ρύποι και πηγές Ρύπανσης

Με τον όρο ρύπο ονομάζουμε την ουσία που μπορεί να δράσει βλαπτικά σε οργανισμούς ή να προκαλέσει ακόμα και θάνατο. Οι ουσίες αυτές μπορεί να είναι επικίνδυνες χημικές ενώσεις, τοξικά αέρια, αιωρούμενα σωματίδια, φυτοφάρμακα κ.ά. Ένας ρύπος είναι τοξικός όταν είναι ικανός να προκαλέσει σοβαρή βλάβη ή θάνατο στον άνθρωπο ή τα ζώα.

Με τον όρο ρύπανσης σύμφωνα με την οδηγία 2000/60/EK (Schratter-Sehn *et al.*, 1992) ονομάζουμε το επιζήμιο αποτέλεσμα των ανθρώπινων δραστηριοτήτων εξαιτίας της εισαγωγής ουσιών ή θερμότητας στο έδαφος, τον αέρα και το νερό. Με αυτό τον τρόπο βάλλεται η υγεία του ανθρώπου, τα υδάτινα και τα χερσαία οικοσυστήματα.

Είναι πολύ σημαντικό να επισημάνουμε τη διαφορά μεταξύ ρύπανσης και μόλυνσης καθώς αποτελούν δύο διαφορετικές έννοιες οι οποίες πολύ συχνά συγχέονται. Με τον όρο μόλυνση αναφερόμαστε μόνο στη μορφή ρύπανσης λόγω της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών στο περιβάλλον ή δεικτών που δηλώνουν την παρουσία τέτοιων μικροοργανισμών.

Οι πηγές ρύπανσης μπορούν να ταξινομηθούν σε φυσικές και ανθρωπογενείς καθώς και σε σημειακές και μη σημειακές πηγές ρύπανσης.

Στην πρώτη κατηγορία, οι φυσικές πηγές οφείλονται στη φυσική δραστηριότητα όπως η διάβρωση πετρωμάτων και η ηφαιστειακή δραστηριότητα και οι ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης που οφείλονται στην ανθρώπινη δραστηριότητα όπως εξόρυξη ορυκτών, βιομηχανία, διυλιστήρια πετρελαίου, παραγωγή λιπασμάτων, πετροχημικά, παραγωγή χημικών, χρωμάτων κλπ. Η υποβάθμιση και επιβάρυνση των υδάτων οφείλεται κυρίως στις ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης.

Στην δεύτερη κατηγορία, οι σημειακές πηγές ρύπανσης είναι αυτές που βρίσκονται σε μια στάσιμη τοποθεσία ή εγκατάσταση που απελευθερώνει επιβαρυντικές ουσίες στο περιβάλλον όπως εργοστάσια, σωλήνες απορροής, τάφροι κ.ά. Οι μη σημειακές πηγές είναι αυτές που δεν βρίσκονται σε ένα συγκεκριμένο σημείο αλλά είναι διάχυτες στο χώρο όπως τα όμβρια ύδατα, οι μεταλλευτικές περιοχές, η γεωργία κ.ά. Γι' αυτό το λόγο και είναι δύσκολη η αντιμετώπισή τους.

Οι επιπτώσεις της ρύπανσης του νερού μπορεί να είναι υγιεινολογικές, οικολογικές και αισθητικές. Στην πρώτη περίπτωση, το νερό αποτελεί φορέα παθογένειας και τοξικότητας προς τον άνθρωπο και τα ζώα που το χρησιμοποιούν. Στην δεύτερη περίπτωση, η ρύπανση του νερού προκαλεί επιβαρυντικές μεταβολές στα υδάτινα οικοσυστήματα και στην τρίτη περίπτωση η ρύπανση του νερού γίνεται η αιτία για

την παρουσία δυσάρεστων οσμών, θολότητας του νερού και χρωματισμού του εμποδίζοντας την χρήση του για αναψυχή.

1.4 Αναδυσόμενοι ρύποι

Ως *αναδυσόμενοι ρύποι* ορίζονται οι ουσίες που δεν συμπεριλαμβάνονται στους υπάρχοντες κανονισμούς της νομοθεσίας της ποιότητας των υδάτων. Επιδρούν βλαπτικά στο περιβάλλον και τον άνθρωπο και οι επιπτώσεις τους δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά. (Brumovský *et al.*, 2017)

Η κατηγορία αυτή των ουσιών αποτελείται από πολλές άλλες υποκατηγορίες χημικών ουσιών και μεταβολιτών όπως φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), προϊόντα προσωπικής φροντίδας (Personal Care Products, PCPs), πρόσθετα τροφίμων, συστατικά χρωμάτων, απορρυπαντικά κ.ά. (León *et al.*, 2019) Αμέσως μετά την είσοδο τους στο περιβάλλον, οι οργανικοί ρύποι υπόκεινται σε διάφορες διεργασίες όπως μετασχηματισμού, αποικοδόμησης, δέσμευσης, μεταφοράς που έχουν συνάφεια με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες όπως η πολικότητα, η διαλυτότητα στο νερό, τάση ατμών κ.ά. (Balmer *et al.*, 2019) Αυτές οι ουσίες έχουν την ιδιότητα να υποδιπλασιάζονται σε μεγάλο χρονικό διάστημα και να βιοσυσσωρεύονται προκαλώντας βαριές ασθένειες. Κάποιες από αυτές είναι καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία τάση για θέσπιση αυστηρότερων νόμων όσον αφορά την διαχείριση των υδάτων τόσο σε ευρωπαϊκό όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Η Ευρωπαϊκή ένωση εκτιμώντας την ύψιστη σημασία των υδάτων για την διατήρηση της ανθρώπινης ζωής και των οικοσυστημάτων, θέσπισε το 2000 την οδηγία πλαίσιο 2000/60/EK για τα νερά που αποτέλεσε καινοτόμα παρέμβαση στη διαχείριση των υδάτινων πόρων. Τέλος, η οδηγία 2000/60/EK, (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 200AD) γνωστή ως οδηγία πλαίσιο για τα νερά (Water Framework Directive) καθώς και η οδηγία 2008/56/EC, (European Commission, 2008) γνωστή ως οδηγία για τη θαλάσσια στρατηγική (Marine Strategy Framework Directive, MSFD) ορίζουν τις χημικές ουσίες-ενώσεις που αποτελούν ρύπους προτεραιότητας και ρύπους υπό παρακολούθηση για την εκτίμηση της

ποιότητας των υδάτων που εκτείνονται μέχρι και 12 μίλια από την πλησιέστερη ακτογραμμή.

Φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις στο υδάτινο περιβάλλον

Η ευρεία κατανάλωση των φυτοφαρμάκων καθώς και η ανεξέλεγκτη χρήση των φαρμακευτικών ουσιών έχουν ως αποτέλεσμα την ανίχνευση αυτών των ενώσεων στο υδάτινο περιβάλλον καθώς η τεχνολογία εξυγίανσης των υδάτων παραμένει ανεπαρκής. Τέτοιου είδους μικρορύπων που συναντώνται στα ύδατα μπορεί να προκαλέσουν μη αναστρέψιμα αποτελέσματα, όπως για παράδειγμα να προκαλέσουν διαταραχές στο ενδοκρινικό σύστημα των έμβιων όντων οι οποίες με τη σειρά τους μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την ψυχολογία αυτών. Επίσης, μπορεί να προκαλέσουν ανοσοκαταστολή και μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό. (Nannou, Boti and Albanis, 2018)

Το περιβαλλοντικό πρόβλημα με τα φυτοφάρμακα είναι ένα πρόβλημα που επηρεάζει όχι μόνο τις χώρες με αναπτυγμένη γεωργία, αλλά και τις χώρες όπου εξάγονται αυτά τα αγροτικά προϊόντα, έτσι είναι απαραίτητο να δοθεί σημασία σε αυτούς τους περιβαλλοντικούς ρύπους (Morin *et al.*, 2012). Η μόλυνση με φυτοφάρμακα στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Η μόλυνση αυτή προκύπτει κυρίως από την χρήση γεωργικών φυτοφαρμάκων για την μείωση των παρασίτων στα φυτά βελτιώνοντας έτσι τις καλλιέργειες. Τα φυτοφάρμακα μπορούν να ταξινομηθούν με διαφορετικούς τρόπους. Οι κύριες κατηγορίες περιλαμβάνουν: φυτοφάρμακα με βάση το είδος ελέγχου των παρασίτων όπως για παράδειγμα τα ζιζανιοκτόνα, τα εντομοκτόνα και τα μυκητοκτόνα και φυτοφάρμακα τα οποία κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με την τοξικότητα τους όπως ιδιαίτερα τοξικά, μέτρια τοξικά, ελαφρώς τοξικά και σχετικά μη τοξικά. Βραζιλιάνικη έρευνα υποδηλώνει ότι τόσο η χρόνια όσο και η πρόσφατη έκθεση σε σύγχρονα φυτοφάρμακα, ειδικά ζιζανιοκτόνα και μυκητοκτόνα, μπορεί επηρεάζουν την λειτουργία του θυρεοειδούς προκαλώντας μείωση της κυκλοφορίας στα επίπεδα των θυρεοειδών ορμονών και κατά συνέπεια και αύξηση της ορμόνης διέγερσης του θυρεοειδούς (TSH) (Paul *et al.*, 2016). Άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα φυτοφάρμακα θα μπορούσαν να παίξουν σημαντικό ρόλο

στην αιτιολογία διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου (Martin *et al.*, 2018), παιδικός καρκίνος, καρκίνο του μαστού (Niehoff *et al.*, 2016), καρκίνο του προστάτη (Kabir, Zendejdel and Tayefeh-Rahimian, 2018), και non-Hodgkin λέμφωμα (NHL) (Luo *et al.*, 2016). Επιπλέον, τα φυτοφάρμακα σχετίζονται με ορισμένες εκφυλιστικές διαταραχές όπως η νόσος του Πάρκινσον (Paul *et al.*, 2016) και ασθένειες Alzheimer . (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Από την άλλη πλευρά τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα που επικεντρώνεται στα φαρμακευτικά κατάλοιπα στο περιβάλλον. Αυτές οι ενώσεις έχουν αναγνωριστεί ως πιθανή απειλή για τα υδάτινα οικοσυστήματα, λόγω της 'ψευδοεπιμονής' τους. Η παρουσία τους έχει μελετηθεί σχετικά λίγο στο θαλάσσιο περιβάλλον που αποτελεί δέκτη της ηπειρωτικής μόλυνσης. Έτσι, η παρακολούθηση των δεδομένων των φαρμακευτικών προϊόντων των θαλάσσιων υδάτων είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων και την ενίσχυση των μελλοντικών κανονισμών για τις αποφάσεις διαχείρισης. Τα φαρμακευτικά προϊόντα είναι βιολογικές δραστικές ενώσεις σχεδιασμένες να αλληλοεπιδρούν με συγκεκριμένες φυσιολογικές οδούς στοχευμένων οργανισμών. Μπορεί να προκαλέσουν κίνδυνο στην υγεία των θαλάσσιων μη στοχευμένων οργανισμών και να λειτουργήσουν ως πρόσθετοι παράγοντες πίεσης στα θαλάσσια οικοσυστήματα που έχουν ήδη επηρεαστεί από την κλιματική αλλαγή, την υπεραλίευση και τον ευτροφισμό. Όπως είναι η κατηγορία αντιβιοτικών ένα από τα πιο συχνά ανιχνευμένα σε θαλάσσια νερά και ιζήματα, η συνολική μόλυνση οδήγησε στο ξέσπασμα ανθεκτικών, στα αντιβιοτικά, βακτήρια που προκαλούν ιδιαίτερη ανησυχία (Branchet *et al.*, 2021).

Επιπρόσθετα, η ανεξέλεγκτη χρήση των φαρμάκων και κυρίως των αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών και παθογόνων μικροοργανισμών απειλώντας την υγεία των οργανισμών και του ανθρώπου, καθώς η απομάκρυνση τους μέσω των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) είναι ανεπαρκής. Όμως, το πιο ανησυχητικό γεγονός είναι η ύπαρξη των μεταβολιτών και των παραπροϊόντων αυτών των χημικών ουσιών αφού η τοξικότητα σε αυτές τις περιπτώσεις πολλαπλασιάζεται μεταξύ όλων αυτών των ουσιών. Για να διασφαλιστεί η υγεία του ανθρώπου, διάφοροι νομοθετικοί οργανισμοί όπως η Ε.Ε., η WHO (World

Health Organization), και η EPA (Environmental protection Agency), θέσπισαν ανώτατα όρια συγκεντρώσεων για διάφορους μικρορύπους γνωστά ως ανώτατα όρια καταλοίπων (Maximum Residue Limits, MRLS). Για την κατηγορία των επιφανειακών υδάτων σύμφωνα με την οδηγία 2013/39/ΕΕ θεσπίστηκαν τα ανώτερα επιτρεπόμενα όρια συγκεντρώσεων για 21 φυτοπροστατευτικές ενώσεις (MACs, Maximum Allowable Concentrations), ενώ για τα ιζήματα δεν έχουν θεσμοθετηθεί αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Λόγω των διαφορών των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του νερού που υπάρχουν στα γλυκά νερά και στο θαλάσσιο περιβάλλον η τύχη των μικρορύπων δεν είναι η ίδια σε αυτά τα οικοσυστήματα. Η αλατότητα, το Ph και η οργανική ύλη είναι παράμετροι οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τη συμπεριφορά αυτών των ρύπων. (Weigel, Kuhlmann and Hühnerfuss, 2002) Για παράδειγμα, η φωτοδιάσπαση των ρύπων στο θαλάσσιο περιβάλλον μπορεί να είναι λιγότερο έντονη από ότι σε ρηχά νερά λόγω της μικρότερης απορρόφησης του ηλιακού φωτός.

Οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις των φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων στο θαλάσσιο περιβάλλον προέρχονται και οφείλονται κυρίως στα παρακάτω :

- Στις εκροές των Μονάδων Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ)(Gulkowska *et al.*, 2007), (Madureira *et al.*, 2010)
- στην μεγάλη ροή στις εκροές, (McEneff *et al.*, 2014)
- στον πληθυσμό και το μέγεθος της αστικής περιοχής, (Zheng *et al.*, 2012)
- στο πλήθος των ποταμών που εκβάλλουν στις παράκτιες περιοχές, (Jiang, Lee and Fang, 2014)
- στον τύπο και τον τρόπο της επεξεργασίας των λυμάτων στις ΜΕΥΑ., (Lara-Martín *et al.*, 2014)
- Στον πιθανό χαμηλό ρυθμό υδροδυναμικής ανάμειξης των υδάτων στις εκροές των ΜΕΥΑ, (Comeau *et al.*, 2008)
- Στον τύπο και τη κλίμακα της κτηνοτροφίας, (Jia *et al.*, 2011)
- Στην μικρή απόσταση από τις υδατοκαλλιέργειες, (He *et al.*, 2012)

Στην υδροδυναμική έκπλυση και στην παραμονή των ουσιών σε κλειστά υδάτινα σώματα, (He *et al.*, 2012)

1.5 Ρύπανση υδάτινου περιβάλλοντος

Ρύπανση του νερού ονομάζουμε την επιβάρυνση του με ύλη ή ενέργεια. Δηλαδή έχουμε την ανεπιθύμητη μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών του όπως τα φυσικά, τα χημικά, τα βιολογικά, τα ραδιολογικά και τα μικροβιολογικά χαρακτηριστικά εξαιτίας κυρίως των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία και την ποιότητα ζωής του ανθρώπου. Μια ουσία που η συγκέντρωση της είναι μεγαλύτερη από αυτή που συναντάται συνήθως στα φυσικά αποθέματα του γλυκού νερού ονομάζεται ρύπος. Οι ανθρωπογενείς χημικές ουσίες απειλούν κυρίως το υδάτινο περιβάλλον καθώς αποτελεί δέκτη:

- Αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων
- Βαρέων μετάλλων και μεταλλοειδών
- Αλογονωμένων και πολυαλογονωμένων ουσιών
- Φυτοφαρμάκων και φαρμακευτικών ουσιών
- Πετρελαιοειδών και ραδιενεργών υλικών
- Επικίνδυνων φερτών υλικών από ποτάμια και χειμάρρους που καταλήγουν στη θάλασσα.(Αλμπάνης, 1999)

Οι πιο σημαντικές σημειακές πηγές ρύπανσης που αποφέρουν ένα μεγάλο μέρος του ρυπαντικού φορτίου στο υδάτινο περιβάλλον είναι:

1. Τα αστικά υγρά απόβλητα από οικισμούς (δίκτυα αποχέτευσης)
2. Οι κεντρικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων
3. Η βιομηχανία
4. Οι χώροι Ανεξέλεγκτης Διάθεσης Απορριμμάτων (ΧΑΔΑ)
5. Και η σταβλισμένη κτηνοτροφία

Ωστόσο, οι ιχθυοκαλλιέργειες, οι χώροι υγειονομικής ταφής απορριμμάτων (ΧΥΤΑ) και τα μεταλλεία-λατομεία αποτελούν πηγές ρύπανσης δευτερευούσης σημασίας. Η ρύπανση του θαλάσσιου περιβάλλοντος είναι ένα ανησυχητικό ζήτημα καθώς

μεγάλο πλήθος χημικών ουσιών καταλήγουν στο θαλασσινό νερό διαμέσου των ποταμών και των άμεσων εκροών. Οι χημικές αυτές ουσίες τελικώς ανιχνεύονται στο νερό, τα ιζήματα, και στους έμβιους οργανισμούς. (Lara-Martín *et al.*, 2014)

1.6 Τύχη και συμπεριφορά των μικρορύπων στο περιβάλλον

Οι μικρορύποι εισέρχονται στο υδάτινο οικοσύστημα με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο. Αναφορικά με τον άμεσο τρόπο απόθεσης, οι μικρορύποι αποτίθενται στο περιβάλλον με την άμεση εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και την διάθεση αχρησιμοποίητων και ληγμένων φαρμάκων. Όσον αφορά τους έμμεσους τρόπους εισχώρησης αυτοί περιλαμβάνουν την επιφανειακή απορροή και την έκπλυση από τις καλλιέργειες (αγρούς) καθώς και τα ατυχήματα σε σημειακές πηγές ρύπανσης όπως εργοστάσια, αποθήκες κ.ά.

Οι οργανικοί ρύποι όταν εισέρχονται στο περιβάλλον υπόκεινται σε διάφορες διαδικασίες μεταφοράς και μετατροπής, οι οποίες είναι φυσικές, χημικές και βιολογικές. Γενικότερα, η παραμονή των χημικών ενώσεων και κατ' επέκταση οι ρύποι στο περιβάλλον εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους όπως : η διαλυτότητα στο νερό, η τάση ατμών, η λιποφιλία, το pH, την υφή του εδάφους και την περιεκτικότητα του σε οργανική ύλη καθώς και η υγρασία και η θερμοκρασία του.

Οι μικρορύποι που καταλήγουν στο περιβάλλον διασπείρονται διαμέσου διεργασιών μεταφοράς και μετατροπής που αναφέρονται παρακάτω:

Προσρόφηση

Η διεργασία της προσρόφησης αποτελεί μια φυσικοχημική διαδικασία κατά την οποία μόρια ή ιόντα μίας χημικής ουσίας έλκονται και στη συνέχεια συγκρατούνται στην επιφάνεια ενός στερεού σώματος. Η προσρόφηση κατηγοριοποιείται σε χημική και φυσική. Κατά την χημική προσρόφηση, οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ του προσροφηθέντος και του προσροφητικού στερεού είναι ισχυροί δεσμοί όπως

ομοιοπολικοί δεσμοί και δεσμοί ηλεκτροστατικής φύσης. Η διεργασία αυτή είναι μη αντιστρεπτή. Από τη άλλη μεριά, η φυσική προσρόφηση είναι η διεργασία κατά την οποία αναπτύσσονται ασθενείς δεσμοί μεταξύ προσροφηθέντος-προσροφητικού στερεού, όπως οι δεσμοί υδρογόνου και οι Van der Waals. Η φυσική προσρόφηση αποτελεί αντιστρεπτή διαδικασία. Το φαινόμενο της προσρόφησης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως: το pH, τη θερμοκρασία του συστήματος, το μέγεθος των σωματιδίων του στερεού, την αλατότητα, την περιεκτικότητα σε οργανική ύλη και άργιλο του στερεού. Επίσης, εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ρύπων όπως την πτητικότητα, την διαλυτότητα, τον όξινο ή βασικό χαρακτήρα τους, το συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού και το σχήμα και το μέγεθος των μορίων τους. Η προσρόφηση ενός ρύπου στο έδαφος μπορεί να εκφραστεί μέσω του συντελεστή κατανομής οκτανόλης- νερού K_{oc} , ο οποίος αποτελεί δείκτη κινητικότητας του ρύπου στο νερό. Όσο αυξάνεται ο συντελεστής K_{oc} τόσο πιο υδρόφοβος είναι ο ρύπος με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα έκπλυσης του και η πιθανότητα ρύπανσης των υδάτων από αυτόν. (Καψή, 2020)

Φωτοδιάσπαση - Φωτόλυση

Η ηλικιακή ακτινοβολία παίζει καθοριστικό ρόλο στην μετατροπή και τη διάσπαση των ρύπων στον περιβάλλον. Αποτελεί την μεγαλύτερη πηγή ενέργειας γι' αυτόν το σκοπό. Οι ρύποι, οι οποίοι είναι διαλυμένοι στην υδατική φάση ή αιωρούνται στην αέρια φάση έχουν την δυνατότητα να απορροφήσουν ακτινοβολία και να διασπαστούν αυθόρμητα. Η διαδικασία της φωτόλυσης μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση. Στην άμεση φωτόλυση έχουμε απευθείας απορρόφηση της ενέργειας της ακτινοβολίας από την ένωση που πρόκειται να διασπαστεί, ενώ στην έμμεση φωτόλυση η ενέργεια της ακτινοβολίας απορροφάται από μόρια άλλων ουσιών στον αέρα ή στο νερό, τα οποία αντιδρούν με τα μόρια των ρύπων. Επίσης, τα μόρια των άλλων ουσιών έχουν την δυνατότητα να παράγουν ελεύθερες ρίζες που συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις προκαλώντας διάσπαση του ρύπου. (Καψή, 2020)

Υδρόλυση

Υδρόλυση ονομάζεται η διεργασία διάσπασης των ρύπων στο νερό, κατά την οποία παρουσιάζεται διάσπαση των μορίων του νερού H^+ και OH^- και στη συνέχεια τα ιόντα αυτά αντιδρούν με τα οργανικά μόρια του εκάστοτε ρύπου. Η διεργασία αυτή της υδρόλυσης μιας χημικής ένωσης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία (π.χ. όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο μεγαλύτερος είναι και ο ρυθμός υδρόλυσης), το pH και τη παρουσία DOM (Dissolved Organic Matter, DOM) δηλαδή τη διαλυμένη οργανική ουσία. (Καψή, 2020)

Εξάτμιση

Η εξάτμιση συνίσταται στη διεργασία μεταφοράς ενός ρύπου από το έδαφος ή το νερό στην αέρια φάση. Η εξάτμιση εξαρτάται τόσο από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ένωσης (διαλυτότητα, τάση ατμών, προσρόφηση) όσο και από παράγοντες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία, κίνηση του αέρα). (Καψή, 2020)

Έκπλυση

Η διεργασία της έκπλυσης συνίσταται στην μεταφορά των οργανικών ρύπων στα στρώματα του εδάφους μέσω της επίδρασης των υδάτων. Ο συντελεστής κατανομής K_{oc} καθώς και η διαλυτότητα της χημικής ένωσης στο νερό αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν το βαθμό της έκπλυσης ενός οργανικού ρύπου. (Καψή, 2020)

Βιολογική Μετατροπή

Μετά την εισαγωγή στο περιβάλλον οι οργανικοί ρύποι μπορεί να προσληφθούν από οργανισμούς οδηγώντας στην μετατροπή των ρύπων. Η χλωρίδα και η πανίδα παίζουν καθοριστικό ρόλο σε αυτή την βιολογική μετατροπή με τους παρακάτω τρόπους:

- Κατά την διαδικασία της βιοσυσσώρευσης ή βιοσυγκέντρωσης, οι οργανικοί ρύποι συσσωρεύονται στους οργανισμούς και μπορεί να επιφέρουν ακόμα και θάνατο.
- Κατά την διεργασία της βιομεγέθυνσης, οι οργανικοί ρύποι μπορούν να μεταφερθούν μέσω της τροφικής αλυσίδας και να συσσωρευτούν στους

οργανισμούς ακόμα και σε αυτούς που βρίσκονται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας όπως τον άνθρωπο και τα άγρια πουλιά. Ο όρος βιομεγέθυνση σε έναν οργανισμό χρησιμοποιείται, όταν η συγκέντρωση του οργανικού ρύπου σε αυτόν είναι υψηλότερη από αυτήν στην τροφή που καταναλώνει.

- Επίσης, ορισμένοι οργανισμοί του νερού και οι μύκητες έχουν την δυνατότητα να μεταβολίζουν και να αποβάλλουν οργανικούς ρύπους στο περιβάλλον συντελώντας έτσι στην διεργασία της βιολογικής μετατροπής.
- Εν κατακλείδι, ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν υπολείμματα των οργανικών ρύπων ή (συμμεταβολισμός) να τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και τροφής για την ανάπτυξη τους. Οι ρύποι αυτοί βιοδιασπώνται σε τελικά προϊόντα CO₂, CH₄, H₂O και ανόργανες ενώσεις. (Καψή, 2020)

1.7 Υδατοκαλλιέργειες

Σύμφωνα με την οδηγία 2006/88/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης υδατοκαλλιέργεια είναι η εκτροφή ή η καλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών χρησιμοποιώντας σχεδιασμένες τεχνικές για την αύξηση της παραγωγής των οργανισμών αυτών περισσότερο από τη φυσική ικανότητα του περιβάλλοντος. (Council, The and Union, 2006) Μία υδατοκαλλιέργεια έχει σκοπό την παραγωγή αλιευμάτων υψηλής θρεπτικής αξίας προς κατανάλωση από τον άνθρωπο, την παραγωγή υδρόβιων οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως για καλλιεργούμενα είδη, την παραγωγή διατροφικών και φαρμακευτικών προϊόντων, ή προϊόντων βιοτεχνολογίας. Σπανιότερα, η υδατοκαλλιέργεια έχει στόχο την παραγωγή γόνου (αβγά, προνύμφες, νεαρά άτομα) για τον εμπλουτισμό των φυσικών αποθεμάτων.

Ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα η παραγωγή υδρόβιων ειδών διακρίνεται σε εκτατικό, ημι-εντατικό και εντατικό τύπο καλλιέργειας. (Καραμανλής, 2018).

- Στον *εκτατικό* τύπο οι οργανισμοί καλλιεργούνται σε φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα όπως μικρές λίμνες ή λιμνοθάλασσες και εξαρτώνται σχεδόν εξ' ολοκλήρου από την τροφή που υπάρχει στο φυσικό περιβάλλον με

ελάχιστη ανθρώπινη παρέμβαση. Όπως για παράδειγμα η καλλιέργεια μαλακίων.

- Στον *ημιεντατικό τύπο* η παραγωγή των οργανισμών γίνεται σε φυσικές υδατοσυλλογές με ανθρώπινη παρέμβαση, δηλαδή την προσθήκη οργανικής ύλης για αύξηση της παραγωγικότητας και ενίσχυση της τροφικής αλυσίδας.
- Στον *εντατικό τύπο* κατά τον οποίο η ανθρώπινη συμβολή και ο έλεγχος είναι σε μέγιστο βαθμό.

Σύμφωνα με μια άλλη ταξινόμηση των υδατοκαλλιεργειών που αφορά το στάδιο ζωής των ειδών που καλλιεργούνται έχουμε :

- τα εκκολαπτήρια που είναι χώροι τεχνητής αναπαραγωγής και εκκόλαψης των αυγών.
- Τις μονάδες προπάχυνσης που είναι χώροι εκτροφής (προνύμφες)
- Τις μονάδες πάχυνσης στις οποίες έχουμε αύξηση των ενηλίκων υδρόβιων οργανισμών
- Και τις μονάδες πλήρους παραγωγής που είναι δυνατόν να καλύψουν όλα τα στάδια παραγωγής. (Καραμανλής, 2018)

1.7.1 Επίδραση υδατοκαλλιεργειών στο περιβάλλον

Για να εγκατασταθεί σε ένα περιβάλλον μια υδατοκαλλιέργεια θα πρέπει η ποιότητα του νερού που την περιβάλλει να επιτρέπει μία τέτοιου είδους δραστηριότητα. Από την άλλη πλευρά, η υδατοκαλλιέργεια επιδρά σημαντικά στο υδάτινο περιβάλλον που δραστηριοποιείται καθώς ως ανοιχτά συστήματα οι ιχθυοκαλλιέργειες δέχονται εισροές και παράγουν εκροές. Στις εισροές περιλαμβάνονται το νερό, η τροφή (η φυσική ή η χορηγούμενη), τα υλικά από τα οποία έχει κατασκευαστεί το σύστημα εκτροφής και οι οργανισμοί που καλλιεργούνται. Στις εκροές περιλαμβάνονται οι καλλιεργούμενοι οργανισμοί που εμπορεύονται και τα απόβλητα όπως νεκρά ψάρια, προϊόντα μεταβολισμού (CO_2 , NH_4), κόπρανα, ούρα, υπολείμματα της χορηγούμενης τροφής, παράσιτα, μικροοργανισμοί και χημικές ουσίες όπως υπολείμματα φυτοφαρμάκων, παρασιτοκτόνων, βιοκτόνων και φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ψαριών. (Ziarrusta *et al.*, 2015)

Οι ουσίες αυτές, αφού χρησιμοποιηθούν καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον και επιδρούν σε οργανισμούς που δεν συμπεριλαμβάνονται στην υδατοκαλλιέργεια, όπως άλλα είδη ελεύθερων ψαριών, μικροοργανισμούς και βενθονικούς οργανισμούς. Αυτές οι χημικές ουσίες επιβαρύνουν τους οργανισμούς αυτούς, συμβάλουν στον καθορισμό της χημείας του ιζήματος και αυξάνουν την μικροβιακή αντοχή απέναντι στις δραστικές φαρμακευτικές ουσίες.

Με σκοπό την προστασία των υδατοκαλλιεργειών από τη χρήση δραστικών χημικών ουσιών ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) εξέδωσε μετά το έτος 2000 δύο κατευθυντήριες Οδηγίες CVMP/VICH Topic GL38 (Ecotoxicity Phase I) και CVMP/VICH Topic GL38 (Phase II).

Κατά τη φάση I, η εκτίμηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων έχει σκοπό τον υπολογισμό της ποσότητας των δραστικών χημικών ουσιών που απελευθερώνονται στο υδάτινο περιβάλλον. Το όριο της εισαγόμενης δραστικής χημικής ουσίας (Environmental Introduction Concentration, EIC aquatic), ώστε να μην υπάρχει κίνδυνος για το περιβάλλον ορίζεται το 1μg/L.(Καραμανλής, 2018)

Κατά τη φάση II, η αξιολόγηση των σκευασμάτων βασίζεται στη μέθοδο του πηλίκου (Risk Quotient, RQ) που ορίζεται ως ο λόγος της μέγιστης συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ένωσης στο δείγμα (Measured Environmental Concentration, MEC) προς την ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση που είναι ικανή να προκαλέσει τοξικό αποτέλεσμα σε μια συγκεκριμένη ταξινομική μονάδα (Predicted no-effect concentration), $RISK\ QUOTIENT = EXPOSURE / TOXICITY$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Δειγματοληψία

2.1 Εισαγωγή

Για να είναι οι αναλυτικές μετρήσεις μιας περιβαλλοντικής ανάλυσης αξιόπιστες και ακριβείς θα πρέπει να ακολουθούνται πιστά τα παρακάτω στάδια :

1. Η Δειγματοληψία
2. Συντήρηση- Προτεργασία Δείγματος
3. Προετοιμασία δειγμάτων για μέτρηση
4. Αναλυτική μεθοδολογία μέτρησης
5. Ποιότητα χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων
6. Ποιότητα οργάνων μέτρησης
7. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων (Δεληγιαννάκης-Χελά, 2002)

2.2 Δειγματοληψία- Γενικά

Ο σκοπός της περιβαλλοντικής ανάλυσης είναι να δώσει μία αντιπροσωπευτική εικόνα των διάφορων συγκεντρώσεων των ρύπων στο χώρο τη στιγμή που γίνεται ένας περιβαλλοντικός έλεγχος. Για παράδειγμα, απαιτείται να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις διάφορων βαρέων μετάλλων στα ιζήματα του πυθμένα μιας λίμνης. Λόγω του ότι είναι πρακτικά αδύνατο να ελεγχθεί το σύνολο του περιβαλλοντικού τμήματος που εξετάζεται, γίνεται συλλογή μιας σειράς δειγμάτων τα οποία αναλύονται και το αποτέλεσμα της ανάλυσης θεωρείται ότι αντικατοπτρίζει τα επίπεδα των συγκεντρώσεων σε όλο το τμήμα του περιβάλλοντος. Η δειγματοληψία η ίδια ενέχει τον κίνδυνο σφάλματος τόσο τυχαίου όσο συστηματικού. Δεν είναι δυνατόν να αποφευχθούν τα σφάλματα στο σύνολό τους, ωστόσο πρέπει να λαμβάνονται μέτρα ώστε να μην επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα. Για να σχεδιαστεί σωστά μια δειγματοληψία είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπ' όψη τα παρακάτω σημεία:

1. Το μέσο στο οποίο θα γίνει η δειγματοληψία (π.χ. νερό, αέρας, έδαφος, οργανισμοί)
2. Τι είναι αυτό που θέλουμε να αντιπροσωπεύει το δείγμα (π.χ. τις ενώσεις που βρίσκονται διαλυμένες στο νερό ή αυτές που βρίσκονται στην αιωρούμενη ύλη)
3. Το μέγεθος του δείγματος εκφρασμένο σε μάζα ή όγκο
4. Ο αριθμός των δειγμάτων
5. Η χωρική κατανομή των θέσεων δειγματοληψίας (πυκνότητα σταθμών)
6. Αν είναι σημαντική ή όχι η εποχιακή διακύμανση των συγκεντρώσεων στο μέσο δειγματοληψίας (π.χ. όταν γίνεται έλεγχος σε ποτάμι)
7. Ο τρόπος που μπορεί να εκτιμηθεί η ποιότητα της δειγματοληψίας (εκτίμηση ακρίβειας, επαναληψιμότητα κλπ.)
8. Ποια είναι τα αποδεκτά επίπεδα σφαλμάτων κατά την δειγματοληψία

Επιπρόσθετα, είναι πολύ σημαντικό κατά την δειγματοληψία να μην αλλοιώνεται η σύσταση του δείγματος, να επιτρέπεται η διατήρηση του δείγματος για όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και η μέθοδος της δειγματοληψίας να είναι φθηνή και απλή.

Λαμβάνοντας υπ' όψην όλους τους παραπάνω παράγοντες σχεδιάζεται ένα λεπτομερές πρωτόκολλο δειγματοληψίας. Το πρωτόκολλο είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν η δειγματοληψία πραγματοποιείται από διαφορετικούς ανθρώπους ή φορείς. Τέλος, κάθε περιβαλλοντικός έλεγχος έχει ιδιαιτερότητες που σχετίζονται με τη φύση του δείγματος (π.χ. αέριο, υγρό, βιολογικό κ.ά.) και με τους στόχους της έρευνας που εξυπηρετεί. Γι' αυτό το λόγο όλα τα παραπάνω εκτιμώνται μαζί με τις εκάστοτε ειδικές απαιτήσεις του περιβαλλοντικού ελέγχου. (Δεληγιαννάκης-Χελά,2002)

2.3 Μέθοδος και τεχνικές δειγματοληψίας στο νερό

Η διαδικασία της δειγματοληψίας σε διάφορα δείγματα νερού (π.χ. επιφανειακό, υπόγειο, υγρά απόβλητα) είναι διαφορετική και εξαρτάται τόσο από τους ίδιους τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιθυμούμε να καταγράψουμε όσο και από τους στόχους του περιβαλλοντικού ελέγχου. Γενικά, τα ζητήματα στα οποία δίνεται

ιδιαίτερη σημασία και αφορούν τη μεθοδολογία της δειγματοληψίας: είναι η επιλογή των κατάλληλων θέσεων της δειγματοληψίας, η επιλογή των παραμέτρων που θα μελετηθούν επιτόπου και τα βοηθητικά στοιχεία (περιβαλλοντικοί παράμετροι) που θα βοηθήσουν στην ερμηνεία των τελικών αποτελεσμάτων. Τέλος, μεγάλη σημασία έχει η επιλογή των κατάλληλων δοχείων για τη μεταφορά των δειγμάτων και τη συντήρησή τους μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης στο εργαστήριο. Παρακάτω αναφέρονται οι σημαντικότερες παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη κατά τη δειγματοληψία νερού:

1. Περιοχή δειγματοληψίας (Location): είναι μια έκταση στην οποία βρίσκονται τα σημεία δειγματοληψίας π.χ. μία θαλάσσια έκταση, μία λίμνη, τμήμα ενός ποταμού κ.ά.
2. Σημείο δειγματοληψίας (Sampling point): είναι το καθορισμένο με ακρίβεια σημείο από το οποίο συλλέγεται το δείγμα και το οποίο ορίζεται από τις γεωγραφικές συντεταγμένες. Έτσι για παράδειγμα στην περίπτωση του νερού της βροχής, το σημείο δειγματοληψίας καθορίζεται από τη θέση του δειγματολήπτη. Στην περίπτωση των υπόγειων νερών το σημείο του δειγματολήπτη καθορίζεται από τη θέση και το βάθος της γεώτρησης ή του πηγαδιού.
3. Πηγή (source): π.χ. η έξοδος λυμάτων ενός αποχετευτικού αγωγού, η έξοδος αποβλήτων ενός εργοστασίου, μία πηγή νερού, ένα πηγάδι, κ.ά.
4. Στιγμιαίο δείγμα (Grab or Catch Sample): είναι ένα δείγμα που συλλέγεται από ένα καθορισμένο σημείο δειγματοληψίας και αντιπροσωπεύει τη σύσταση του νερού στο σημείο εκείνο για το συγκεκριμένο χρόνο.
5. Σύνθετο (composite) και ολοκληρωμένο δείγμα (integrated) : Αν η σύσταση του νερού στο σημείο από όπου λαμβάνεται το δείγμα είναι σταθερή ως προς το χώρο και το χρόνο, τότε το δείγμα θα είναι αντιπροσωπευτικό του νερού που εξετάζουμε. Αν η σύσταση παρουσιάζει χωρικές διακυμάνσεις, τότε πρέπει να πάρουμε δείγματα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, όταν η σύσταση του νερού μεταβάλλεται με το χρόνο. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτουν οι έννοιες των ολοκληρωμένων και των σύνθετων δειγμάτων.

Σύνθετο είναι το δείγμα που προκύπτει από την ανάμειξη πολλών απλών δειγμάτων, τα οποία ελήφθησαν από το ίδιο σημείο δειγματοληψίας, αλλά σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.

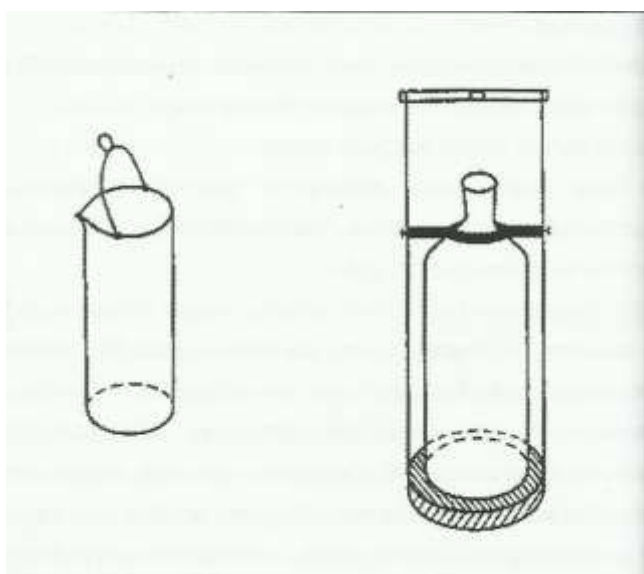
Ολοκληρωμένο είναι το δείγμα που προκύπτει από την ανάμειξη πολλών απλών δειγμάτων, τα οποία ελήφθησαν ταυτόχρονα από διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας.

Τα σύνθετα και ολοκληρωμένα δείγματα χρησιμοποιούνται κυρίως για να περιοριστεί ο αριθμός των αναλύσεων και το δείγμα να ανταποκρίνεται καλύτερα στην πραγματική κατάσταση. (Δεληγιαννάκης-Χελά, 2002)

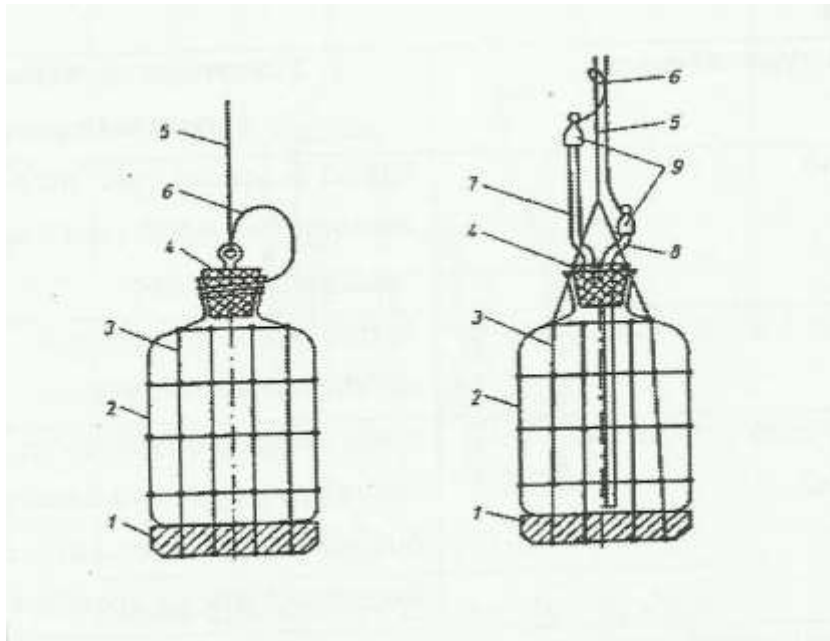
Η τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί για τη δειγματοληψία του νερού εξαρτάται από την κατηγορία του νερού. Έτσι για παράδειγμα χρησιμοποιούνται δύο είδη δειγματοληπτών :

1. Δοχεία- δειγματολήπτες για συλλογή νερού από την επιφάνεια του υδάτινου όγκου.
2. Δοχεία- δειγματολήπτες για τη συλλογή νερού από διάφορα βάθη.

Παρακάτω απεικονίζονται δύο είδη δειγματοληπτών που χρησιμοποιούνται για επιφανειακά και υπο-επιφανειακά δείγματα νερού.



Εικόνα 2 Δοχεία συλλογής επιφανειακών δειγμάτων νερού. (Δεληγιαννάκης-Χελά, 2002)



Εικόνα 3 Δοχεία-δειγματολήπτες για υπο-επιφανειακά δείγματα νερού. Όπου 1.βαρίδιο, 2.δοχείο, 3.Πλέγμα στήριξης, 4.Πώμα, 5.Σχοινί, 6.Μηχανισμός ρύθμισης εισαγωγής του νερού. (Δεληγιαννάκης-Χελά, 2002)

Σε περίπτωση που η δειγματοληψία λαμβάνει χώρα σε θάλασσα, λίμνη ή ποταμούς χρησιμοποιούνται και πλωτά μέσα.

Ανάλογα με το είδος της επιφανειακής συλλογής εξαρτάται και ο αριθμός των δειγμάτων, η συχνότητα της δειγματοληψίας, ο αριθμός και η θέση των δειγματοληπτικών σταθμών. Ένα παράδειγμα είναι ότι η λήψη δειγμάτων νερού από ποτάμια, κανάλια και ρυάκια απαιτεί καλό προγραμματισμό, διότι η ποιότητα του νερού μεταβάλλεται σημαντικά τόσο κατά μήκος του ποταμού, όσο και σε πολλές περιπτώσεις κατά το πλάτος του. Ακριβώς για αυτό το λόγο διάφοροι παράγοντες καθορίζουν τις θέσεις δειγματοληψίας, όπως τα σημεία εισροής των παραποτάμων, των αποχετευτικών αγωγών οικιστικών περιοχών και τα σημεία υδροληψίας με σκοπό την υδροδότηση πόλεων και χωριών ή την άρδευση. Όσο πιο μεγάλο είναι το πλάτος ενός ποταμού, τόσο πιο μεγάλη είναι η ανάγκη για ταυτόχρονη δειγματοληψία σε περισσότερα σημεία κατά πλάτος. Επίσης, ανάλογα με τη χρονική περίοδο παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές της ποιότητας των νερών. Στον παρακάτω Πίνακα 4. δίνονται μερικές περιπτώσεις δειγματοληψιών για διάφορους τύπους νερού. (Δεληγιαννάκης-Χελά, 2002)

Περιοχή Δειγματοληψίας	Συνιστώμενη Μέθοδος Δειγματοληψίας
Υπόγεια νερά Πηγάδια	Τυχαία δειγματοληψία. Να προηγηθεί άντληση του νερού για 10 λεπτά πριν την λήψη δείγματος.
Στάσιμα νερά (Λίμνες, Δεξαμενές, φράγματα)	Τυχαία δειγματοληψία από αντιπροσωπευτικές θέσεις.
Τρεχούμενο νερό (ποτάμια, αγωγοί αποχέτευσης)	Λήψη αριθμού δειγμάτων σε τακτά επαναλήψιμα χρονικά διαστήματα. Εάν είναι δυνατόν να χρησιμοποιείται αυτόματος δειγματολήπτης με χρονόμετρο.
Νερό από βιομηχανικά απόβλητα, μονάδες καθαρισμού.	Λήψη αριθμού δειγμάτων σε τακτά επαναλήψιμα χρονικά διαστήματα.

Πίνακας 4.

Παραδοσιακές μέθοδοι δειγματοληψίας νερού

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος επί του παρόντος για τη μέτρηση των χημικών ρύπων στο νερό είναι η δειγματοληψία σε σημείο (πχ. με δοχείο) που στη συνέχεια ακολουθείται η ανάλογη εργαστηριακή ανάλυση συμπεριλαμβάνοντας όλη την απαραίτητη οργανολογία. Αυτή η μέθοδος είναι καλά καθιερωμένη και επικυρωμένη, οπότε είναι αποδεκτή και από νομική σκοπιά. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση της μεθόδου της δειγματοληψίας είναι αποδεκτή μόνο εάν είναι αντιπροσωπευτική της χημικής ποιότητας του νερού σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία όπου γίνεται η δειγματοληψία. Πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι τα δείγματα συλλέγονται σε μια δεδομένη τοποθεσία και ώρα και ότι οι πληροφορίες που

λαμβάνονται είναι μοναδικές για τον τόπο και την συγκεκριμένη επιλεγμένη ώρα. (Madrid and Zayas, 2007)

Όσον αφορά τα επιφανειακά ύδατα, τα δείγματα συλλέγονται συχνά απευθείας γεμίζοντας το δοχείο του δείγματος. Για βαθύτερα στρώματα νερού, κάτω από περίπου 0,5 m αυτή η μέθοδος δεν λειτουργεί καθόλου, επομένως χρησιμοποιούνται ειδικοί δειγματολήπτες νερού. Αυτού του τύπου οι δειγματολήπτες είναι ανοιχτοί και βυθισμένοι στο νερό με σχοινί ή καλώδιο από χάλυβα, οι οποίοι ενεργοποιούνται από απόσταση για να κλείσουν. Μία άλλη επιλογή είναι η χρήση αντλίας όπως π.χ. οι περισταλτικές αντλίες που προσφέρουν τη δυνατότητα συλλογής μεγάλων ποσοτήτων νερού και μπορεί να χρησιμοποιούνται μαζί με κάποιο φίλτρο, ώστε να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις (πχ. σκόνη αέρα) στο πεδίο. (Madrid and Zayas, 2007)

Μια άλλη προσέγγιση για την απόκτηση πιο αντιπροσωπευτικής εικόνας της ποιότητας του νερού με την πάροδο του χρόνου γίνεται με τη χρήση αυτόματου δειγματολήπτη. Ένας αυτόματος δειγματολήπτης αποτελείται είτε από ένα σύνολο μικρών δοχείων που επιτρέπουν για παράδειγμα τη συλλογή ενός διακριτού δείγματος κάθε ώρα είτε ένα μεγάλο δοχείο που συλλέγει δείγματα σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Η συλλογή των δειγμάτων μπορεί να εξαρτάται από το χρόνο, όταν τα δείγματα συλλέγονται σε τακτικά προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα (πχ. σε 24 ώρες) ή μπορεί να συνδέεται με συσκευές μέτρησης της ροής του νερού. (Madrid and Zayas, 2007)

Η οδηγία πλαίσιο για τα ύδατα, (WFD, Water Frame Directive) της Ευρωπαϊκής Ένωσης αναφέρει ότι η ποιότητα του νερού προσδιορίζεται και από βιολογικά χαρακτηριστικά τα οποία αντιπροσωπεύουν την οικολογική κατάσταση στην οποία βρίσκεται το εκάστοτε δείγμα νερού. Για την μελέτη αυτών των χαρακτηριστικών θα πρέπει να συλλεχθούν οργανισμοί-δείκτες οι οποίοι περιλαμβάνουν φύκια, βακτήρια, ψάρια, μύδια κ.ά. που είναι οργανισμοί που ζουν στον πυθμένα μέσα ή πάνω στο ίζημα των ρεμάτων, των ποταμών, των λιμνών ή της θάλασσας. Επειδή αυτά τα είδη δεν μεταναστεύουν ιδιαίτερα όπως τα ψάρια είναι ένας καλός δείκτης της κατάστασης της ρύπανσης στην τοποθεσία που ερευνάται. (Madrid and Zayas, 2007)

2.4 Παθητική δειγματοληψία- Γενικά

Οι παθητικοί δειγματολήπτες συμπεριλαμβανομένων των ενσωματωμένων δειγματοληπτών, της κινητικής και της φάσης ισορροπίας, αποτελούν νέα καινοτόμα εργαλεία για την δειγματοληψία μικρορύπων στα νερά. Τα εργαλεία αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα, καθώς έχουν προταθεί νέοι τρόποι παρακολούθησης των μικρορύπων σε ένα υδάτινο περιβάλλον μέσω της τεχνικής της παθητικής δειγματοληψίας. Η αρχή της τεχνικής αυτής βασίζεται στη συσσώρευση ρύπων με παθητική διάχυση στις συσκευές της δειγματοληψίας. (Morin *et al.*, 2012) Ως παθητική διάχυση ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο σωματίδια ή μόρια μετακινούνται από περιοχές υψηλότερης συγκέντρωσης προς περιοχές μικρότερης συγκέντρωσης μέσω ημιπερατής μεμβράνης. Το φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα της ενδογενούς θερμικής ενέργειας (θερμότητας) που βρίσκεται σε όλα τα μόρια και αποτελεί μία αυθόρμητη διαδικασία (Παθητική μεταφορά).

Η παθητική δειγματοληψία μπορεί να οριστεί ως το σύνολο των μεθόδων λήψης και εξαγωγής χημικών ουσιών που επιτρέπουν την παρακολούθηση διαφορετικών περιβαλλοντικών ρύπων μακροπρόθεσμα, μέσω ενός μόνου δείγματος συλλογής. Επιπλέον, η παθητική δειγματοληψία είναι μία *in situ* (επί τόπου) διαδικασία λήψης και εξαγωγής που περιλαμβάνει τη διάχυση περιβαλλοντικού δείγματος και την προώθηση των αναλυτών μέσα σε μια συσκευή παθητικής δειγματοληψίας. Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συσκευές υπό συνθήκες βιοπαρακολούθησης δηλαδή, η περιοδική και συστηματική χρήση οργανισμών ώστε να εκτιμηθεί η ποιότητα του περιβάλλοντος. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στο φαινόμενο μαζικής μεταφοράς λόγω της διαφοράς που υπάρχει μεταξύ των χημικών ικανοτήτων των αναλυτών σε ένα δεδομένο περιβαλλοντικό διαμέρισμα και στο μέσο συλλογής (η συσκευή). Η παθητική δειγματοληψία χρησιμοποιεί μία φάση λήψης η οποία θα πρέπει χρονικά να είναι επαρκής σε ημέρες για την σωστή λειτουργία της συσκευής και η αναλυόμενη ουσία που θα εκχυλιστεί (π.χ. από το στερεό προσροφητικό υλικό) να διαχωρίζεται από το δείγμα-διάλυμα μέσω ενός στρώματος περιορισμού της διάχυσης (τη μεμβράνη). Αυτή η μεθοδολογία λειτουργεί με συσκευές δειγματοληψίας που προσφέρουν τη δυνατότητα συλλογής, εξαγωγής και

προσυγκέντρωσης των ενώσεων ενδιαφέροντος. Συνήθως, οι χρόνοι συλλογής είναι μια σειρά ωρών, ημερών, μηνών ακόμη και ετών. Οι χρονικά σταθμισμένες μέσες συγκεντρώσεις (TWA) ρύπων σε διαφορετικά περιβάλλοντα όπως το νερό, ο αέρας και το έδαφος μπορούν να προσδιοριστούν με τη χρήση της παθητικής δειγματοληψίας. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Το πιο σημαντικό τμήμα των παθητικών δειγματοληπτών είναι η μεμβράνη, η οποία αποτελεί το εμπόδιο διάχυσης των μορίων των ρύπων. Για το λόγο αυτό κατασκευάζονται μεμβράνες που πρέπει να πληρούν ορισμένες ιδιότητες όπως να έχουν μεγάλο συντελεστή διαπερατότητας για τους ρύπους, ο οποίος εξαρτάται άμεσα από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά (πολικότητα, μέγεθος πόρων κ.ά.) του υλικού της μεμβράνης και το πάχος της μεμβράνης. (Θωματού *et al.*, 2012)

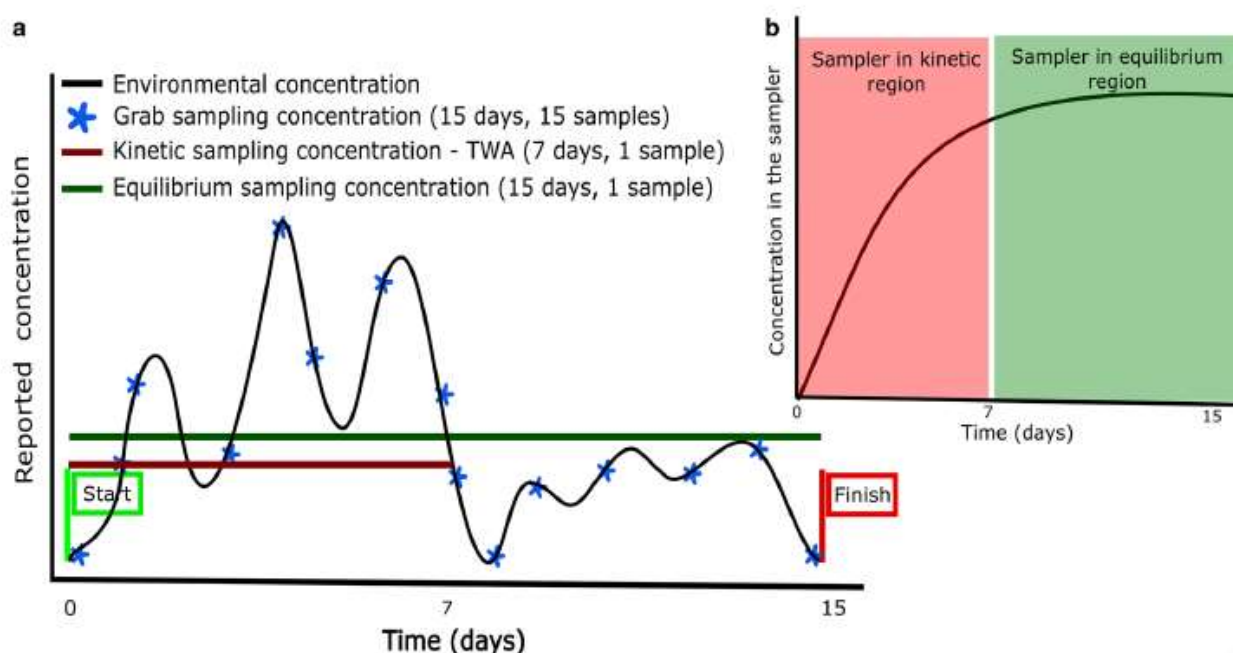
Από την άλλη πλευρά, τα *μειονεκτήματα της στιγμιαίας δειγματοληψίας* σχετίζονται με τον αριθμό συλλογής των δειγμάτων που απαιτείται κάθε φορά κατά την περίοδο της δειγματοληψίας. Επιπλέον, κατά την διαδικασία της στιγμιαίας δειγματοληψίας πρέπει να ληφθούν υπόψιν:

1) ότι η διακύμανση των συγκεντρώσεων των αναλυτών είναι πιο έντονη μέσω της αυξομείωσης της ροής των υδάτων (ποτάμια, ρέματα) και ότι

2) υπάρχει πιθανότητα υποβάθμισης των αναλυτών. Αυτές οι καταστάσεις απαιτούν συχνότερη συλλογή δειγμάτων, που οδηγεί σε περισσότερες επισκέψεις στον τόπο δειγματοληψίας και περισσότερες εργαστηριακές αναλύσεις.

Η παθητική δειγματοληψία προέκυψε από την ανάγκη μείωσης του αριθμού των δειγμάτων που συλλέγονται και την ανάγκη μείωσης του κόστους που σχετίζεται με την προετοιμασία δειγμάτων, την ανάλυση και τα δεδομένα επεξεργασίας. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5) παρουσιάζεται μία γραφική παράσταση που συγκρίνει την παθητική με την στιγμιαία δειγματοληψία. Η στιγμιαία δειγματοληψία περιλαμβάνει τη συλλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μία δεδομένη περίοδο, ενώ η παθητική δειγματοληψία πραγματοποιεί επί τόπου παρακολούθηση των περιβαλλοντικών ρύπων την ίδια περίοδο με τη συλλογή ενός μόνου δείγματος σε κατάσταση ισορροπίας ή για μικρότερο χρονικό διάστημα σε φάση κινητικής

λειτουργίας. Γενικά, η συσκευή μπορεί να λειτουργήσει σε δύο λειτουργίες συσσώρευσης ανάλογα με το χρόνο έκθεσης στη κινητική λειτουργία και την λειτουργία ισορροπίας (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020).



Εικόνα 5 Σύγκριση μεταξύ παθητικής-δειγματοληψίας και της στιγμιαίας-δειγματοληψίας . Λειτουργία πρόσληψης για το δειγματολήπτη κατά την περίοδο της έκθεσης του. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Η παθητική δειγματοληψία μπορεί να καθορίσει μια τιμή συγκέντρωσης μέσω των χρονικά σταθμισμένων συγκεντρώσεων (TWA) (Time-Weighted Average), ωστόσο αυτή η τιμή μπορεί να υπολογιστεί μόνο όταν ο παθητικός δειγματολήπτης είναι σε κινητική φάση. Η μεθοδολογία περιλαμβάνει απλή λειτουργία χωρίς την ανάγκη για εξοπλισμό ηλεκτρικού ρεύματος. Επιπλέον, παρουσιάζεται μειωμένος κίνδυνος για τους ερευνητές λόγω πιθανών δυσπρόσιτων σημείων του περιβαλλοντικού ελέγχου, τόσο των επιφανειακών, όσο και των υπόγειων υδάτων. Επιτρέπει την παρακολούθηση με οικονομικό τρόπο, επειδή ο αριθμός των δειγματοληψιών μειώνεται δραστικά και κατ' επέκταση μειώνεται ο χρόνος προετοιμασίας των δειγμάτων. Τέλος, κατά την ανάλυση μειώνεται η χρήση των υλικών και των αντιδραστηρίων. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση περιστατικών ρύπανσης με ακρίβεια, δεδομένου ότι οι συσκευές που χρησιμοποιούνται είναι ευαίσθητες στις

διακυμάνσεις συγκέντρωσης των αναλυτών στο νερό. Στην παθητική δειγματοληψία οι δειγματολήπτες έχουν αλληλεπίδραση με μεγαλύτερο όγκο νερού σε αντίθεση με τη συλλογή με την στιγμιαία δειγματοληψία, η οποία περιλαμβάνει όγκους νερού σε επίπεδο λίτρου.(Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020) Με άλλα λόγια, αυτή η διαδικασία συγκεντρώνει αναλύτες απευθείας *in situ* (επί τόπου), που συμβάλλει στη μείωση των ορίων ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης (LOQs και LODs) (Morin *et al.*, 2012). Τέλος, η παθητική δειγματοληψία στοχεύει να ελαχιστοποιήσει την πιθανότητα αποσύνθεσης του δείγματος κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση του. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020).

Από την άλλη πλευρά, η στιγμιαία δειγματοληψία συνήθως περιλαμβάνει τη μεταφορά πολλών δειγμάτων από τη θέση δειγματοληψίας στο εργαστήριο και για αυτό μπορεί να είναι δύσκολο να διασφαλιστεί η σταθερότητα των αναλυόμενων ενώσεων στο δείγμα (Grandy *et al.*, 2019). Ωστόσο, μερικές παράμετροι ενδέχεται να περιορίσουν την εφαρμογή και την εύκολη συλλογή των αναλυτών κατά τη διάρκεια της παθητικής δειγματοληψίας. Αν και οι εργαστηριακές δοκιμές επιτρέπουν τον καθορισμό του ρυθμού δειγματοληψίας των παθητικών δειγματοληπτών, μία σειρά μεταβλητών επηρεάζουν την διαδικασία και θα πρέπει να μελετηθούν όπως : η θερμοκρασία, ο ρυθμός ροής του νερού, η βιορύπανση και οι πιθανές διακυμάνσεις της συγκέντρωσης.(Morin *et al.*, 2012)

Αν και πολλές συσκευές παθητικής δειγματοληψίας στην αγορά προσφέρουν οδηγούς για τις διαδικασίες βαθμονόμησης και της εύρεσης των ρυθμών δειγματοληψίας R_s , μερικές φορές είναι ιδιαίτερα περίπλοκοι. Για παράδειγμα, ο ρυθμός δειγματοληψίας μιας ένωσης- ρύπου θα πρέπει να έχει υπολογιστεί προηγουμένως, ο οποίος απαιτεί πολύπλοκα μαθηματικά μοντέλα ανάλογα με τον τύπο του δειγματολήπτη. Τέλος, ένα επίσης σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι οι τεχνικές παθητικής δειγματοληψίας μπορούν να ανιχνεύσουν και να ποσοτικοποιήσουν μία ευρεία γκάμα επίμονων οργανικών ρύπων στο νερό. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020).

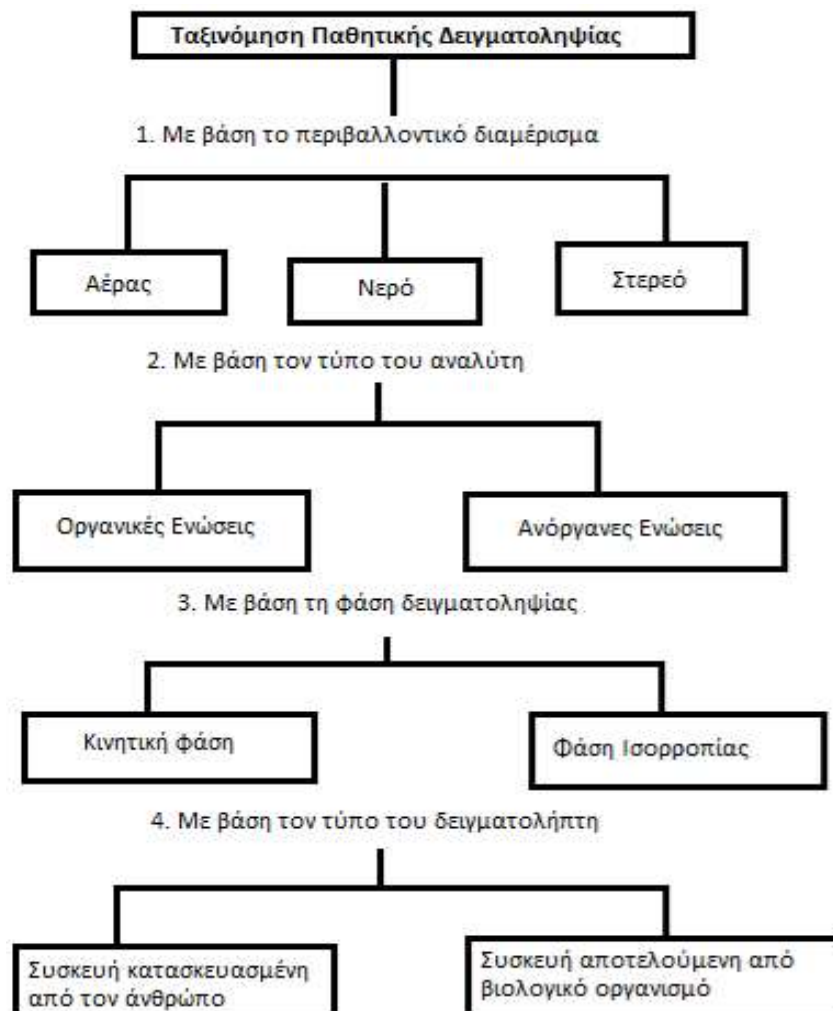
2.2 Ταξινόμηση των παθητικών δειγματοληπτών

Η παθητική δειγματοληψία μπορεί να ταξινομηθεί σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με το μέσο δειγματοληψίας ή το περιβαλλοντικό διαμέρισμα ή την προς ανάλυση ουσία ή τη διαδικασία προσρόφησης ή τη λειτουργία δειγματοληψίας της συσκευής ή τέλος τη συσκευή που χρησιμοποιείται. Όσον αφορά το περιβαλλοντικό διαμέρισμα η παθητική δειγματοληψία μπορεί να ταξινομηθεί σε αέρα, νερού και στερεών (πχ. χώματος).

Σύμφωνα με τον τύπο του αναλύτη που πρόκειται να εξαχθεί, η δειγματοληψία ταξινομείται σε δύο κατηγορίες: την παθητική δειγματοληψία για οργανικές ενώσεις και την παθητική δειγματοληψία για ανόργανες ενώσεις. Η πρώτη ομάδα καλύπτει ως επί το πλείστον ανθεκτικούς οργανικούς ρύπους όπως φυτοφάρμακα, παράνομα και συνταγογραφούμενα φάρμακα, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB) και εκρηκτικά κατάλοιπα και η δεύτερη ομάδα κυρίως μέταλλα Cd, Cu, Ni, Pb, As, Sb, Zn και Cr. Σε πολλές περιπτώσεις η ίδια συσκευή χρησιμοποιείται και για τις δύο οικογένειες ενώσεων, αλλάζοντας μόνο τον τύπο της φάσης του αποδέκτη. Δύο συσκευές που παρουσιάζουν αυτή τη λειτουργία είναι οι DGT (diffusive- gradients in thin-film technique) και οι Chemcatcher δειγματολήπτες. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Σύμφωνα με τον τρόπο πρόσληψης του δειγματολήπτη η παθητική δειγματοληψία μπορεί να ταξινομηθεί ως δειγματοληψία σε λειτουργία *ισορροπίας* ή σε λειτουργία *κινητικής φάσης*. Κατά τη δειγματοληψία στη φάση ισορροπίας ο χρόνος έκθεσης είναι αρκετά μεγάλος για να επιτρέψει την εφαρμογή της θερμοδυναμικής ισορροπίας μεταξύ του νερού και της φάσης αναφοράς (Vrana *et al.*, 2005). Από την άλλη πλευρά, η δειγματοληψία σε λειτουργία κινητικής φάσης υποθέτει ότι ο ρυθμός μεταφοράς μάζας στη φάση αναφοράς/λήψης είναι γραμμικά ανάλογος της διαφοράς μεταξύ της χημικής δραστηριότητας του ρύπου στην υδάτινη φάση και αυτή στη φάση αναφοράς (Vrana *et al.*, 2005). Αυτό σημαίνει ότι διατηρείται η διαδικασία πρόσληψης καθ' όλη τη διάρκεια της έκθεσης. Παρακάτω παρουσιάζεται η Εικόνα 6, όπου η παθητική δειγματοληψία ταξινομείται με βάση το είδος του

περιβαλλοντικού διαμερίσματος στο οποίο εφαρμόζεται κάθε φορά, τον τύπο του αναλύτη, τη φάση της δειγματοληψίας ή με βάση τον τύπο του δειγματολήπτη.



Εικόνα 6 Ταξινόμηση της παθητικής δειγματοληψίας. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Με βάση την εξέλιξη της παθητικής δειγματοληψίας δύο άλλες κατηγορίες υπάρχουν στις οποίες μπορούν να ταξινομηθούν οι παθητικοί δειγματολήπτες. Η πρώτη κατηγορία είναι αυτή στην οποία ανήκουν οι συσκευές που κατασκευάζονται από τον άνθρωπο και η δεύτερη είναι αυτή που καλύπτει τις αρχικές μελέτες παθητικής δειγματοληψίας με βιοπαρατηρητές ή βιολογικούς οργανισμούς (δίθυρα, ψάρια, μπλε μύδια, βενθικά- ασπόνδυλα κλπ.). Και οι δύο αυτοί τύποι εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται. Οι εμπορικά κατασκευασμένες συσκευές μπορούν να

κατηγοριοποιηθούν σε δειγματολήπτες με μία ή δύο φάσεις. Ένας μονοφασικός παθητικός δειγματολήπτης αποτελείται από ένα μόνο μέσο προσρόφησης που εκτίθεται απευθείας στην αξιολογούμενη μήτρα (Salim and Górecki, 2019). Αυτοί οι τύποι δειγματοληπτών κατασκευάζονται με διαφορετικά πολυμερή, όπως χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο (LDPE), πολυοξυμεθυλένιο (POM), και πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (PDMS) ((Zhao *et al.*, 2006). Από την άλλη, ένας διφασικός παθητικός δειγματολήπτης αποτελείται από ένα φράγμα- περιορισμού και τη φάση πρόσληψης (Salim and Górecki, 2019). Παραδείγματα αυτών των συσκευών εμφανίζονται στη «Παθητική δειγματοληψία σε νερό που εφαρμόζεται κυρίως στα φυτοφάρμακα ». (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

1.3 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των Παθητικών Δειγματοληπτών

Η παθητική δειγματοληψία προσφέρει μια ποικιλία πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με την στιγμιαία δειγματοληψία. Η ποικιλία παρακολούθησης που προσφέρει επιτρέπει την εξαγωγή ενός ευρέως φάσματος αναλυτών. Αυτό είναι δυνατόν επειδή οι παθητικοί δειγματολήπτες έχουν διαφορετικούς τύπους φάσης- δέκτη που μπορούν να εξάγουν διαφορετικούς αναλύτες ανάλογα με τη χημική φύση τους όπως για παράδειγμα (μέταλλα, φυτοφάρμακα, φαρμακευτικές ενώσεις, παράνομα ναρκωτικά, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB). Αυτό το εργαλείο διαθέτει μεγάλη ικανότητα συσσώρευσης σε ενώσεις-στόχους και είναι ιδανικό για την ανίχνευση συγκεντρώσεων ιχνοστοιχείων, καθώς ο χρόνος της λειτουργίας πρόσληψης κυμαίνεται από λεπτά έως χρόνια.(Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Στην περίπτωση των δειγματοληπτών στη φάση-ισορροπίας , οι συγκεντρώσεις των ρύπων προκύπτουν εφόσον ο χρόνος έκθεσης του δειγματολήπτη είναι αρκετά μεγάλος. Στην περίπτωση δειγματοληπτών στη κινητική φάση, μπορούν να παραχθούν χρονικά σταθμισμένες μέσες συγκεντρώσεις (Time-Weighted Average) (TWA), εάν η φάση-λήψης λειτουργεί ως «μηδενικός νεροχύτης» (δηλαδή χωρίς απελευθέρωση παγιδευμένων μορίων) και αν τα ποσοστά δειγματοληψίας είναι σταθερά κατά τη διάρκεια του χρόνου έκθεσης. Επιπλέον, παθητικοί δειγματολήπτες συγκεντρώνουν αναλύτες απευθείας *in situ*, γεγονός που μπορεί να επιφέρει μείωση

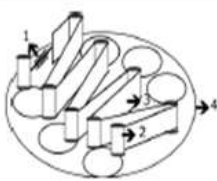
των ορίων ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης (Limits of Quantification and Detection) (LOQs και LODs). Επιπλέον, κάνουν την προετοιμασία δειγματοληψίας ευκολότερη και περιορίζουν την αποδόμηση των παγιδευμένων μορίων κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση τους. Επίσης, είναι σχετικά απλοί στη λειτουργία τους και γενικά μικρές και ελαφριές συσκευές. (Morin *et al.*, 2012)

Ωστόσο, αυτά τα εργαλεία έχουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η ακρίβεια των χρονικά σταθμισμένων μέσων συγκεντρώσεων (TWA) (Time-Weighted-Average), που λαμβάνονται επί τόπου με δειγματολήπτες κινητικής φάσης, επειδή τα ποσοστά δειγματοληψίας, που είναι συγκεκριμένα για την κάθε ένωση και αντιπροσωπεύουν την ποσότητα του νερού που καθαρίζεται από τον δειγματολήπτη ανά μονάδα χρόνου, εξαρτώνται από την ταχύτητα ροής του νερού, τη θερμοκρασία, τη βιορύπανση και από τις πιθανές αυξομειώσεις των συγκεντρώσεων. Επιπλέον, σε σύγκριση με την παθητική δειγματοληψία, η στιγμιαία δειγματοληψία, που χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό της ακρίβειας των συγκεντρώσεων TWA, δεν είναι πραγματικά αξιόπιστη αφού τα στιγμιαία δείγματα δεν παρέχουν ακριβείς μέσες συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, σε στιγμιαίες δειγματοληψίες μπορεί να παραλειφθούν σύντομες αυξομειώσεις συγκέντρωσης. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτοματοποιημένοι δειγματολήπτες εβδομαδιαίας συλλογής, αλλά η χημική διατήρηση των ενώσεων δεν διασφαλίζεται για όλους τους αναλύτες. Υπάρχει ανάγκη μελέτης του χρόνου απόκρισης των παθητικών δειγματοληπτών, προκειμένου να γνωρίζουμε εάν είναι σε θέση να ανιχνεύσουν μικρές εναλλαγές συγκέντρωσης με την πάροδο του χρόνου. Το δείγμα που συλλέγεται ποικίλλει ανάλογα με το είδος του παθητικού δειγματολήπτη που επιλέγεται κάθε φορά και τη μεμβράνη που χρησιμοποιείται αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να μην αντιπροσωπεύει αυστηρά το ελεύθερο διαλυμένο δείγμα. (Morin *et al.*, 2012)

2.4 Συσκευές ημιπερατής μεμβράνης (SPMD)

Η συσκευή ημιδιαπερατής μεμβράνης εισήχθη ως έννοια από τον Huckins *et al.* το 1990 για την προσομοίωση της βιοσυγκέντρωσης των μη-πολικών οργανικών ρύπων από τους υδρόβιους οργανισμούς. Σε αυτή τη συσκευή ένας επίπεδος σωλήνας

χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου (LDPE), (Low –Density-Polyethylene) γεμάτος με μια λεπτή μεμβράνη λιπιδίου λειτουργεί ως φάση του αποδέκτη. Όταν ο δειγματολήπτης τοποθετηθεί σε υδατικό μέσο, οι υδρόφοβες οργανικές ενώσεις μετατοπίζονται και συσσωρεύονται κατά την φάση του αποδέκτη, ενώ το πολυαιθυλένιο λειτουργεί ως εμπόδιο διάχυσης. Αν και το LDPE (Low –Density-polyethylene) είναι ένα μη πορώδες υλικό, μικρές κοιλότητες στη δομή του ή παροδικά ανοίγματα στο εύρος 5-10 Å επιτρέπουν τη διάχυση των ενώσεων (Huckins, Tubergen and Manuweera, 1990). Αυτή ήταν η πρώτη εργασία, που έθεσε σε παρακολούθηση τα φυτοφάρμακα όπως το mirex (οργανοχλωρικό εντομοκτόνο), και το φενβαλικό άλας (πυρεθροειδές εντομοκτόνο), επιτυγχάνοντας καλά αποτελέσματα ανάκτησης για μια περίοδο των 21 ημερών. Οι συσκευές SPMD εφαρμόζονται σε μια ευρεία γκάμα ενώσεων, αλλά η χρήση τους περιορίζεται σε ενώσεις που είναι κυρίως ιοντικές σε περιβαλλοντικό pH με τιμές συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού ($\log P$) μεγαλύτερες από 3 ($\log K_{ow} > 3.0$). Λόγω της υψηλής τους σταθερότητας, τα οργανοχλώρια φυτοφαρμάκων τείνουν να παραμένουν αμετάβλητα στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας στις συσκευές SPMD να χρησιμοποιούνται για μεγάλες περιόδους παθητικής δειγματοληψίας στο εύρος εβδομάδων έως μηνών, δεδομένου ότι λειτουργούν στην κινητική λειτουργία πρόσληψης. Επιπλέον, θεμελιώδεις φυσικοχημικές ιδιότητες όπως διαλυτότητα, τάση ατμών, συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού και οκτανόλης-αέρα επιτρέπουν την εκτίμηση της σχετικής κατανομής αυτών των φυτοφαρμάκων μεταξύ των περιβαλλοντικών διαμερισμάτων και των δειγμάτων SPMD. Η παρακάτω (Εικόνα 7) συνοψίζει τα κύρια χαρακτηριστικά των συσκευών SPMD με τις αντίστοιχες εμπορικές τους εκδοχές. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Device	Main parts	Analytes	Sample preparation after sampling	Time	Refs.
	(1) Spring (2) Pegs (3) Low-density polyethylene lay flat tubing (4) Deployment rack Wall thickness: 70–95 μm . Triolein (receiving phase): ultra-high purity. (6) Weight: 4.4–4.6 g	Pesticides PCBs PAHs Dioxins Furans	Dialysis in organic solvents (hexane)	Days Months	Huckins et al. (1990), Zhao et al. (2018a)

Εικόνα 7 : Τα κύρια χαρακτηριστικά των συσκευών ημιδιαπερατής μεμβράνης (SPMD). PAH: πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, PCB: πολυχλωροδιφαινύλια. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

2.5 Polar Organic Chemical Integrative Sampler

Ο πολικός οργανικός χημικός ενσωματωμένος δειγματολήπτης (POCIS) είναι ένας από τους πιο δημοφιλείς δειγματολήπτες που χρησιμοποιούνται επί του παρόντος. Οι συσκευές POCIS ήταν σχεδιασμένες για να συμπληρώνουν τις εφαρμογές των συσκευών SPMD. Χρησιμοποιούνται για τη δειγματοληψία πολικών οργανικών ενώσεων με $\log K_{ow}$ χαμηλότερο από 4 στα υδάτινα περιβάλλοντα. Φυτοφάρμακα που έχουν χαμηλή τάση ατμών και υψηλή υδροφιλία τείνουν να ξεπλένονται εύκολα από το έδαφος και να είναι διαθέσιμα στο υδάτινο περιβάλλον για δειγματοληψία με POCIS. Αυτή η συσκευή περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1999 κατά τη διάρκεια του διδακτορικής έρευνας του Alvarez (1999). Το πρωτότυπο σχέδιο της συσκευής αποτελείται από 18 cm^2 εκτεθειμένη επιφάνεια μεμβράνης και 100 mg μέσου-δέσμησης (δηλαδή το προσροφητικό υλικό). Η επιφάνεια του εμβαδού ανά μάζα αναλογίας προσροφητικού είναι περίπου 180 cm^2 / g και αυτή είναι η τυπική διαμόρφωση για όλες τις εργασίες στις οποίες χρησιμοποιούνται οι συσκευές POCIS. Αυτή η διάταξη διαμορφώνεται από μια σειρά τριών δίσκων τοποθετημένων σε μία ράβδο στήριξης. Ένα στερεό προσροφητικό υλικό μεταξύ δύο μικροπορώδων πολυαιθεροσουλφόνων (σχηματίζοντας τη διάταξη μεμβράνη –προσροφητικό υλικό– μεμβράνη) είναι τοποθετημένο και σφραγισμένο με δύο δακτυλίους από ανοξείδωτο χάλυβα. Οι μεμβράνες αποφεύγουν τη μετανάστευση διαφορετικών σωματιδίων με μέγεθος (πάνω από 0,1 μm) κατά τη δειγματοληψία. Η φάση του αποδέκτη μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την προς ανάλυση ουσία, και συνήθως δύο εκδόσεις

διαμόρφωσης του POCIS είναι εμπορικά διαθέσιμες : POCIS για φυτοφάρμακα και POCIS για φαρμακευτικές ενώσεις. Για παράδειγμα, ένα τριφασικό μίγμα προσροφητικό πολυμερές Isolute® ENV με άνθρακα Ambersorb 1500 ή 572 άνθρακα διασπαρμένο στο S-X3 BioBeads (βιοκλίνες) χρησιμοποιείται για φυτοφάρμακα και το προσροφητικό υλικό Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance), [προσροφητικό πολυμερές πολύ(Νβινυλοπυρρολιδόνη-διβινυλβενζόλιο)] χρησιμοποιείται για φαρμακευτικές ενώσεις. Η συσκευή POCIS προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ευαισθησία, ικανότητα ρύθμισης του δειγματολήπτη χρησιμοποιώντας κατάλληλο προσροφητικό υλικό, ενώ η μεμβράνη του έχει χαμηλή ευαισθησία στη βιορύπανση και πολλά στοιχεία βαθμονόμησης είναι διαθέσιμα στη βιβλιογραφία για ένα σύνολο πολλών χημικών ενώσεων (Vrana *et al.*, 2005).

Σχεδιασμός των συσκευών POCIS

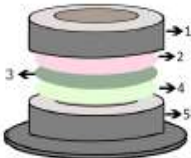
Η συσκευή POCIS αναπτύχθηκε στο Γεωλογικό Ινστιτούτο των ΗΠΑ (Columbia Environmental Research Center, USA). Η αρχική διαμόρφωσή της αποτελούνταν από 100 mg προσροφητικού υλικού μεταξύ δύο μικροπορώδων μεμβρανών πολυαιθεροσουλφόνης (PES) που είναι συγκρατημένες μαζί από δύο ροδέλες από ανοξείδωτο χάλυβα με πάχος 3,2 mm, εσωτερική διάμετρο 3,3 cm και εξωτερική διάμετρο 7 cm. Τα προσροφητικά υλικά ήταν Oasis HLB, το οποίο χρησιμοποιείται σε πολλά φαρμακευτικά σκευάσματα ή μία τριφασική πρόσμιξη η οποία αποτελείται από τρία προσροφητικά υλικά στερεής φάσης (Isolute ENV, πολυστυρένιο διβινυλοβενζόλιο και άνθρακα Ambersorb 1500 διεσπαρμένο σε S-X3 βιοκλίνες). Οι συσκευές POCIS είναι διαθέσιμες στο εμπόριο από τις εταιρίες Environmental Sampling Technologies, Exposmeter και E & H Services. Κατά το 2005, η τριφασική εκδοχή του POCIS διακόπηκε στο εμπόριο καθώς το συστατικό άνθρακα Ambersorb 1500 δεν ήταν πλέον διαθέσιμο. Μετά το 2005, η Exposmeter έλαβε τις συσκευές POCIS από την Environmental Sampling Technologies, οι οποίες είχαν εσωτερική διάμετρο 5,4 cm, ροδέλα από χάλυβα εξωτερικής διαμέτρου 10 cm και περιείχαν 245 mg προσροφητικό υλικό Oasis ή το τριφασικό μίγμα που έχει αναφερθεί. Οι μεμβράνες (PES) πολυαιθεροσουλφόνης έχουν μέγεθος πόρων 0,1μm και πάχος 110-130 μm της εταιρίας Exposmeter. Η συσκευή POCIS από την εταιρία Exposmeter και E & H Services έχει ροδέλες χάλυβα με τις διαστάσεις 5,4 cm εσωτερική διάμετρο,

10cm εξωτερική διάμετρο και 200 mg προσροφητικό υλικό Oasis HLB ή το τριφασικό μίγμα. Οι μεμβράνες PES έχουν πάχος 110-150 μm και μέγεθος πόρων 0,1 μm . Η αναλογία της μάζας του προσροφητικού υλικού των POCIS ανά γραμμάριο είναι 208 cm^2/gr (Environmental Sampling Technologies), 187 cm^2/gr (Exposmeter) και 229 cm^2/gr (E & H Services). Αν και δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μικρές αυτές διακυμάνσεις σε αυτές τις αναλογίες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη δειγματοληψία, δεν φαίνεται να υπάρχει σαφής λόγος για τον οποίο οι κατασκευαστές αποκλίνουν από την αρχική προτεινόμενη αναλογία 180 cm^2/gr του (Alvarez et al. 2004). Η εκτεθειμένη επιφάνεια της μεμβράνης των POCIS αναφέρεται ότι έχει τιμές μεταξύ 41 cm^2 , 46 cm^2 και 44 cm^2 , ανάλογα με τον κατασκευαστή της συσκευής. (Booij and Chen, 2018)

2.6 Συσκευές Chemcatcher

Οι συσκευές Chemcatcher® προτάθηκαν αρχικά από τους (Kingston *et al.*, 2000) με σκοπό να μετρηθούν οι μέσες χρονικές συγκεντρώσεις των οργανικών μικρορύπων σε υδάτινα περιβάλλοντα. Η μελέτη τους περιγράφει δύο πρωτότυπα συστήματα που πρέπει να εφαρμοστούν σύμφωνα με τον τύπο του αναλύτη που πρόκειται να εξαχθεί. Το πρώτο πρότυπο σύστημα είναι για δειγματοληψία μη πολικών οργανικών ενώσεων με $\log K_{ow}$ πάνω από 4, και το δεύτερο πρότυπο σύστημα είναι για πιο πολικά είδη ενώσεων με $\log K_{ow}$ μεταξύ 2 και 4. Η συσκευή είναι κατασκευασμένη από υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο PTFE (Polytetrafluoroethylene), το οποίο προστατεύει το σύστημα εξαγωγής (Εικόνα 8). Το σύστημα εξαγωγής σχηματίζεται από ένα ανοξείδωτο πλέγμα, ακολουθούμενο από μία περιοριστική μεμβράνη και τη φάση λήψης. Τα πρώτα περιοριστικά υλικά της μεμβράνης ήταν η πολυσουλφόνη και το πολυαιθυλένιο, το οποίο επέτρεψε την εξαγωγή πολικών και μη πολικών ενώσεων στις αναλύσεις, αντίστοιχα. Η πρώτη φάση λήψης κατασκευάστηκε από υλικό στερεάς φάσης (47 mm Δίσκος C18 Empore2 disk), και αυτό χρησιμοποιήθηκε και για τα δύο πρωτότυπα συστήματα. Ο (Kingston *et al.*, 2000) ανέλυσε ορισμένα φυτοφάρμακα με αυτή τη συσκευή (ατραζίνη, dieldrin και diuron) με χρόνο περιόδου μεταξύ 1 και 9 ημέρες. Ένα από τα μεγάλα πλεονεκτήματα της συσκευής Chemcatcher® είναι η υψηλή ευελιξία, αφού μπορεί να εφαρμοστεί σε ποικιλία και

των δύο οργανικών και ανόργανων μολυσματικών παραγόντων ανάλογα με το συνδυασμό φάσης λήψης και μεμβράνης.(Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Device	Main parts	Analytes	Sample preparation after sampling	Time	Refs.
	(1) Cap (2) Stainless mesh (3) Limiting membrane materials: Polysulfone, polyethylene, PES, and LDPE (4) Receiving phase: C18 disk, cellulose acetate, SDB-RPS and SDB-XC (5) PTFE*housing	Metals Pesticides Pharmaceuticals PCBs PAHs	Acid extraction (metals) Solvent extraction (organic species)	Days weeks	Ahrens et al. (2015), Tran et al. (2007)

Εικόνα 8: Τα κύρια χαρακτηριστικά των συσκευών Chemcatcher για δειγματοληψία υδάτων. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

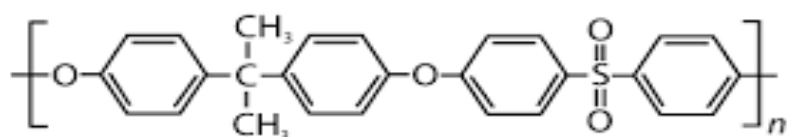
Σχεδιασμός των συσκευών Chemcatcher

Η συσκευή Chemcatcher αναπτύχθηκε στο Πανεπιστήμιο του Portsmouth (Kingston et al. 2000). Στην συνέχεια, χορηγήθηκαν διπλώματα ευρεσιτεχνίας στο Ηνωμένο Βασίλειο το Φεβρουάριο του 2004 και στις ΗΠΑ τον Ιούνιο του 2006. Η συσκευή Chemcatcher αποτελείται από έναν δίσκο εκχύλισης στερεάς φάσης με διάμετρο 47 mm που βρίσκεται μέσα σε ένα περίβλημα από πολύ-τετραφθοροαιθυλένιο ή πολυανθρακικό υλικό, που συνήθως επικαλύπτεται από μεμβράνη. Η έκδοση της συσκευής Chemcatcher για πολικές ενώσεις χρησιμοποιεί συνήθως ένα δίσκο εκχύλισης με πολύ-στυρένιο-συν-διβινυλοβενζόλιο, ο οποίος μπορεί να περιέχει σουλφίδια ή και όχι. Ο πιο χρησιμοποιούμενος τύπος μεμβράνης είναι το μικροπορώδες υλικό (PES) πολυαιθεροσουλφόνη με κάποια περιστασιακή χρήση πολυσουλφόνης (PSU) . Η εκτεθειμένη επιφάνεια και το πάχος της μεμβράνης συχνά δεν καθορίζεται, παρά τη σημασία τους για την κινητική πρόσληψης. Η διάμετρος των πόρων της μεμβράνης είναι είτε 0,1 μm, είτε 0,2μm. Σε αρκετές μελέτες η συσκευή Chemcatcher έχει χρησιμοποιηθεί χωρίς μεμβράνη. Το αρχικό σχέδιο της συσκευής (Kingston et al. 2000) ήταν ένα κυλινδρικό περίβλημα από πολύ-τετραφθοροαιθυλένιο (PTFE) με εξωτερική διάμετρο 60 έως 70 mm, εσωτερική διάμετρο 43 ή 45 mm, εξωτερικό ύψος 39 mm και βάθος κοιλότητας 20 mm. Οι

(Lobpreis et al. 2008) χρησιμοποίησαν ένα πολυανθρακικό περίβλημα με την ίδια εξωτερική και εσωτερική διάμετρο και βάθος κοιλότητας 7 mm. Δύο τροποποιημένα σχέδια κυκλοφορούν επί του παρόντος το Chemcatcher Horizon Atlantic και το Chemcatcher 3M Empore με παρόμοιες διαστάσεις. (Booij and Chen, 2018)

Υλικό Polysulfone (PSU)

Οι πολυσουλφόνες είναι μια οικογένεια θερμοπλαστικών πολυμερών. Αυτά τα πολυμερή είναι γνωστά για τη σκληρότητα και τη σταθερότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Περιέχουν την υπομονάδα aryl-SO₂-aryl, το καθοριστικό χαρακτηριστικό της οποίας είναι η ομάδα σουλφόνης. Οι πολυσουλφόνες εισήχθησαν το 1965 από την Union Carbide στην Αμερική. Λόγω του υψηλού κόστους των πρώτων υλών και της επεξεργασίας, οι πολυσουλφόνες χρησιμοποιούνται σε εξειδικευμένες εφαρμογές και συχνά αποτελούν ανώτερη αντικατάσταση των πολυανθρακικών υλικών.



Polysulfone : PSU

Εικόνα 9 Η δομή του μορίου της Πολυσουλφόνης (Polysulfone, PSU). (http://www.anc-chem.com/products-detail.php?product_id=47#)

Όσον αφορά τις χημικές και τις φυσικές ιδιότητες, αυτά τα πολυμερή είναι άκαμπτα, υψηλής αντοχής και διαφανή, διατηρώντας αυτές τις ιδιότητες μεταξύ των θερμοκρασιών -100 °C και 150 °C. Έχουν πολύ υψηλή σταθερότητα διαστάσεων και αλλάζουν μέγεθος όταν εκτίθενται σε βραστό νερό ή σε αέρα με θερμοκρασία 150 °C.

Η πολυσουλφόνη είναι εξαιρετικά ανθεκτική σε ανόργανα οξέα, αλκάλια και ηλεκτρολύτες, σε pH που κυμαίνεται από 2 έως 13. Είναι ανθεκτική σε οξειδωτικά μέσα, επομένως μπορεί να καθαριστεί με λευκαντικά. Είναι επίσης ανθεκτική σε

επιφανειοδραστικά και έλαια υδρογονανθράκων. Δεν είναι ανθεκτική σε οργανικούς διαλύτες χαμηλής πολικότητας (π.χ. κετόνες και χλωριωμένους υδρογονάνθρακες) και σε αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Από μηχανική σκοπιά, η πολυσουλφόνη έχει υψηλή αντοχή στη συμπίεση, συνιστώντας τη χρήση της υπό υψηλές πιέσεις. Είναι επίσης σταθερή σε υδατικά οξέα και βάσεις και σε πολλούς μη πολικούς διαλύτες. Ωστόσο, είναι διαλυτό σε διχλωρομεθάνιο και μεθυλοπυρρολιδόνη. Τέλος, Η πολυαιθεροσουλφόνη (PES) είναι ένα παρόμοιο πολυμερές με χαμηλή κατακράτηση πρωτεϊνών.https://www.lorric.com/en/WhyLORRIC/Material/psu-material-datasheet?fbclid=IwAR2r1naGn3c7ZxFP_80i3P4p7G5FJ0DyTIViDa-tlNiIM9Pyrrv3oIRUp1Q

2.7 Βασικές αρχές της Παθητικής Δειγματοληψίας

Κατά την παθητική δειγματοληψία, οι ρύποι συγκεντρώνονται στον δειγματολήπτη με βάση την κατάσταση συσσώρευσης (φάση), η οποία μπορεί να είναι είτε η *κινητική* είτε η *φάση ισορροπίας*. Οι παθητικοί δειγματολήπτες είναι σχεδιασμένοι να λειτουργούν σε δύο καταστάσεις (φάσεις) συσσώρευσης.

Στην **κινητική φάση** ο ρυθμός της μεταφοράς της μάζας στο προσροφητικό υλικό είναι γραμμικά ανάλογος με τη διαφορά του χημικού δυναμικού του ρύπου στο προσροφητικό υλικό και τη φάση δειγματοληψίας. (παθητικοί δειγματολήπτες γραμμικής πρόσληψης ή παθητικοί δειγματολήπτες σε φάση μη ισορροπίας). Στη φάση αυτή, η συγκέντρωση ενός ρύπου στον δειγματολήπτη μπορεί να περιγραφεί από ένα μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης ως εξής:

$$C_s(t) = C_w \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_1 t}), \text{ εξίσωση (2.1)}$$

Όπου: $C_s(t)$ είναι η συγκέντρωση του ρύπου στο δειγματολήπτη σε χρόνο t , C_w είναι η συγκέντρωση του ρύπου στο υδατικό περιβάλλον, k_1 η σταθερά του ρυθμού πρόσληψης και k_2 είναι η σταθερά αποδέσμευσης, αντίστοιχα.

Για τους παθητικούς δειγματολήπτες στην κινητική φάση θεωρείται ότι ο ρυθμός μεταφοράς της μάζας παραμένει σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια της δειγματοληψίας και ότι η σχέση της συγκέντρωσης του εκάστοτε ρύπου στο υπόστρωμα του δείγματος με τη συγκέντρωση του ρύπου στο υλικό του παθητικού δειγματολήπτη

είναι γραμμική. Αυτού του τύπου οι δειγματολήπτες δεν φτάνουν σε ισορροπία με το περιβάλλον δείγμα κατά το χρονικό διάστημα της δειγματοληψίας. Παρουσιάζουν μεγάλη ικανότητα δέσμευσης των ρύπων, γεγονός που εξασφαλίζει τον συνεχόμενο εμπλουτισμό στη φάση πρόσληψης καθ' όλη τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Επίσης, στην κινητική φάση αυτού του τύπου οι δειγματολήπτες παρέχουν τις μέσες σταθμισμένες με το χρόνο συγκεντρώσεις των ρύπων στο υπόστρωμα του δείγματος για ένα γνωστό χρονικό διάστημα, (Time-Weighted Average Concentrations, TWA). (Θωμάτου *et al.*, 2012)

Στην αρχή της έκθεσης του δειγματολήπτη στο πεδίο, ο ρυθμός της εκρόφησης του ρύπου από το προσροφητικό υλικό στο νερό είναι αμελητέος, επομένως ο δειγματολήπτης που λειτουργεί στη φάση της γραμμικής πρόσληψης περιγράφεται από την (εξίσωση 2.2) που προκύπτει από την εξίσωση (2.1) :

$$C_s(t) = C_w k_1 t, \text{ (εξίσωση 2.2)}$$

Η παραπάνω εξίσωση (2.2) μπορεί να μετατραπεί σε ισοδύναμη εξίσωση:

$$M_s(t) = C_w R_s t, \text{ (εξίσωση 2.3)}$$

Όπου $M_s(t)$ είναι η μάζα του ρύπου στο προσροφητικό υλικό μετά από περίοδο έκθεσης (t) και R_s είναι ο ρυθμός δειγματοληψίας ή αλλιώς η σταθερά κατανομής, δηλαδή το γινόμενο της σταθεράς του ρυθμού πρόσληψης του ρύπου k_1 και του όγκου του νερού. Ο ρυθμός της δειγματοληψίας R_s μπορεί να οριστεί και ως ο όγκος του νερού που περνάει από τον δειγματολήπτη ανά μονάδα χρόνου της έκθεσης της συσκευής και μετριέται σε μονάδες L/days ή ml/days.

Σημαντική προϋπόθεση για την χρήση και εφαρμογή των παθητικών δειγματοληπτών είναι ο προσδιορισμός του ρυθμού δειγματοληψίας στο εργαστήριο μέσω της βαθμονόμησης των συσκευών ή να έχει προβλεφθεί με τη χρήση εμπειρικών εξισώσεων. (Θωμάτου *et al.*, 2012)

Το 2007 οι Ouyang & Pawliszyn χρησιμοποίησαν την παρακάτω (εξίσωση 2.4) για τον υπολογισμό του ρυθμού δειγματοληψίας με καθορισμένη γεωμετρία και σταθερή θερμοκρασία.

$$R_s = \frac{DA}{L}, \text{ (εξίσωση 2.4)}$$

Όπου D είναι ο συντελεστής μοριακής διάχυσης του ρύπου, A είναι το εμβαδόν της επιφάνειας του δειγματολήπτη και L είναι το μήκος της απόστασης διάχυσης. Το D μπορεί να αναζητηθεί στη βιβλιογραφία, ενώ οι τιμές των A και L είναι γνωστές.

Επίσης, ο Kot- Wasik το 2007 μαζί με τους συνεργάτες του υπολόγισαν το ρυθμό δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας την παρακάτω (εξίσωση 2.5):

$$R_s = k_0 A = k_e k_{DW} V_D, \text{ (εξίσωση 2.5)}$$

Όπου k_0 είναι ο συντελεστής μεταφοράς της μάζας, A είναι το εμβαδόν της επιφάνειας της μεμβράνης, k_e είναι η σταθερά του ρυθμού ανταλλαγής, k_{DW} είναι ο συντελεστής κατανομής του προσροφητικού υλικού/νερού και V_D είναι ο όγκος του προσροφητικού υλικού.

Η βαθμονόμηση των παθητικών δειγματοληπτών σε κινητική φάση βασίζεται κυρίως στον σταθερό ρυθμό δειγματοληψίας κατά την διάρκεια της έκθεσης του δειγματολήπτη στο νερό. Όταν το R_s , ο ρυθμός δειγματοληψίας δηλαδή είναι γνωστός, μπορεί να υπολογιστεί το C_w (μέση συγκέντρωση ενός ρύπου στην υδατική φάση σταθμισμένη ως προς τον χρόνο, TWA) μέσω του R_s , τον χρόνο έκθεσης (t) και την ποσότητα του ρύπου $M_s(t)$ που συσσωρεύεται στο προσροφητικό υλικό. (Kot- Wasik *et al.*, 2007), (Ouyang and Pawliszyn, 2007)

Οι παθητικοί δειγματολήπτες στη φάση ισορροπίας θα πρέπει να έχουν εκτεθεί αρκετά, ώστε να έχει αποκατασταθεί η θερμοδυναμική ισορροπία κατανομής ή προσρόφησης του ρύπου στο προσροφητικό μέσο. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται η (εξίσωση 2.6) που προέρχεται από την μετατροπή της (εξίσωσης 2.1):

$$C_s = C_w \frac{k_1}{k_2} = C_w K, \text{ (εξίσωση 2.6)}$$

Εφόσον είναι γνωστή η τιμή του συντελεστή κατανομής προσροφητικού-νερού (K), μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση του ρύπου στη διαλυτή φάση.

Οι παθητικοί δειγματολήπτες ισορροπίας μπορούν να εφαρμοστούν για εβδομάδες ή και μήνες και χαρακτηρίζονται από την γρήγορη επίτευξη της ισορροπίας των συγκεντρώσεων των ρύπων στο μέσο δειγματοληψίας (πχ. νερό) και τον παθητικό δειγματολήπτη. (Θωματού *et al.*, 2012)

2.8 Μέθοδος και σύστημα βαθμονόμησης συσκευών (POCIS)

2.8.1 Εργαστηριακή βαθμονόμηση των POCIS

Στο εργαστήριο, οι συσκευές POCIS για να βαθμονομηθούν βυθίζονται σε νερό γεμάτο με τα μόρια που μας ενδιαφέρουν. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία, η ανάδευση, οι συγκεντρώσεις ρύπων και οι φυσικοχημικές παράμετροι πρέπει να ελέγχονται. Τα πλεονεκτήματα της *εργαστηριακής βαθμονόμησης* είναι ότι:

1. Όλοι οι ρυθμοί δειγματοληψίας R_s μπορούν να ληφθούν, εφόσον υπάρχουν όλα τα μόρια.
2. Τα εργαστηριακά R_s είναι «αξιόπιστα», καθώς βασίζονται σε σταθερές και ελεγχόμενες συγκεντρώσεις μικρορύπων.

Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έχει ορισμένα μειονεκτήματα:

1. είναι απαραίτητο να βρεθούν οι PRC (Performance Reference Compounds), δηλαδή οι απαραίτητες ενώσεις αναφοράς απόδοσης για τη διόρθωση των εργαστηριακών R_s για όλα τα μόρια που μελετώνται. Ωστόσο, αυτού του τύπου η βαθμονόμηση είναι δαπανηρή και χρονοβόρα.

Για τη διατήρηση σταθερών συγκεντρώσεων των μικρορύπων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρεις μέθοδοι βαθμονόμησης:

- 1) Η στατική βαθμονόμηση** με κλειστό σύστημα, με spiking των ενώσεων στην αρχή του πειράματος.
- 2) Η βαθμονόμηση στατικής ανανέωσης** με κλειστό σύστημα, με spiking των ενώσεων σε σταθερά χρονικά διαστήματα.

3) Η βαθμονόμηση συνεχούς ροής με ανοιχτό σύστημα με συνεχόμενο spiking των ενώσεων.

Η στατική βαθμονόμηση είναι κατάλληλη όταν τα μόρια- ενώσεις που μελετώνται δεν αποικοδομούνται ή δεν απορροφώνται γρήγορα ή όταν η διάρκεια βαθμονόμησης είναι μικρή (δηλαδή μικρότερη από 1 εβδομάδα). Η βαθμονόμηση στατικής ανανέωσης είναι το πιο συχνό χρησιμοποιούμενο σύστημα βαθμονόμησης, καθώς είναι το πιο απλό στην εκτέλεση. Μόνο δύο συγγραφείς χρησιμοποίησαν τη βαθμονόμηση συνεχούς ροής- με το POCIS. Όμως, σχεδόν σε όλες τις αναφορές δεν εμφανίστηκε σταθερότητα στις συγκεντρώσεις του νερού. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα δοχεία ως μέσα έκθεσης των POCIS όπως ποτήρια ζέσεως 1-3 L, φιάλες 3 L και δεξαμενές 8-300 L. Αυτά τα διαφορετικά δοχεία οδηγούν σε διαφορετικά φαινόμενα προσρόφησης λόγω διαφορετικών αναλογιών όγκου προς επιφάνεια και διαφορετικών μεθόδων ανάδευσης. Τα συστήματα βαθμονόμησης χρησιμοποιούν διάφορες ταχύτητες ανάδευσης και συνθήκες θερμοκρασίας. Ένα σύστημα ανάδευσης όπως αυτό που χρησιμοποιείται από τους (Mazzella et al.2007) με ροή κατευθυνόμενη μπροστά από το POCIS, φαίνεται να είναι το πιο αντιπροσωπευτικό για προσομοίωση των περιβαλλοντικών αναταράξεων παρά η μαγνητική ανάδευση ή η ανάδευση με έλικα. Η ανάδευση με ράβδο ανάδευσης, που χρησιμοποιείται συχνά σε ποτήρια ή φιάλες, μπορεί να έχει ταχύτητα 60–900 rpm (revs per minute). Η ανάδευση μπορεί να εκφραστεί σε rpm ή σε cm/s, καθιστώντας τις συγκρίσεις δύσκολες.(Morin *et al.*, 2012)

Παρ' όλα αυτά, οι Li et al. (2010) επισημαίνουν ότι η επίδραση της ανάδευσης κατά την πρόσληψη πολικών ενώσεων πχ. των φαρμακευτικών δεν υπερέβη το διπλάσιο για τις περισσότερες από τις ενώσεις που μελετήθηκαν σε ένα πείραμα κατά την έκθεσή τους επί 21 ημέρες με ρυθμούς ροής 2,6 –37 cm/s . Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πειράματος μπορεί να ποικίλλει από 5 ° C έως 28 ° C. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε μέγιστη διπλάσιων αύξηση του ρυθμού Rs για τις φαρμακευτικές ενώσεις. Γενικά, το pH κατά τις εργαστηριακές βαθμονομήσεις είναι αμετάβλητο και υποτίθεται ότι είναι περίπου 7. Ωστόσο, ορισμένοι συγγραφείς δοκίμασαν την επίδραση του pH στο ρυθμό δειγματοληψίας Rs, όπως οι Li et al. (2011) χρησιμοποιώντας ένα φαρμακευτικό POCIS. Διαπίστωσαν ότι τα όξινα

φαρμακευτικά προϊόντα είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε χαμηλό pH ενώ τα Rs για βασικές ενώσεις ήταν υψηλότερα σε υψηλό pH παρά σε χαμηλό pH. Για ουδέτερες ενώσεις το Rs παρέμεινε αμετάβλητο για το εύρος του pH που δοκιμάστηκε (3 έως 9). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι ρυθμοί πρόσληψης Rs είναι υψηλότεροι για τα ουδέτερα μόρια από τα ιονισμένα μόρια (χαμηλό pH). Το μέσο έκθεσης των POCIS μπορεί να είναι το απεσταγμένο νερό, το νερό βρύσης, το νερό ποταμού ή το θαλασσινό νερό. Η επίδραση της αλατότητας στο ρυθμό δειγματοληψίας Rs έχει αποδειχθεί σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, τα Rs της ατραζίνης ήταν 0,240 L/d σε απεσταγμένο νερό (Alvarez et al. 2007) και 0,239 L/d σε νερό βρύσης (Mazzella et al. 2007), ενώ ήταν 0,042 L/d με θαλασσινό νερό (Hernando et al. 2005). Αντιθέτως, για τα όξινα φαρμακευτικά προϊόντα δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των Rs που λαμβάνονται σε αλατισμένο ή ανάλατο νερό, όπως οι (Zhang et al. 2008) που δοκίμασαν την επίδραση της αλατότητας με φαρμακευτικά προϊόντα (τα οποία μπορεί να είναι όξινα ή βασικά). Το πείραμα έδειξε ότι οι τιμές των Rs δεν διέφεραν σημαντικά. Μια άλλη παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει τα Rs είναι η βιοαπόρριψη (επικάθηση-προσκόλληση οργανισμών), αλλά φαίνεται να αυξάνει τη συσσώρευση για τις αλκυλοφαινόλες. Πράγματι, οι (Harman et al. 2009) υπολόγισαν ότι το Rs είναι 0,13 L/d για την 2,4-διμεθυλφαινόλη σε ένα μη ρυπασμένο με «παρασιτοκτόνο» POCIS και 0,20 L/d για την ίδια ένωση σε ένα ρυπασμένο με «παρασιτοκτόνο» POCIS. Επιπλέον, η βαθμονόμηση των POCIS μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποικίλες συγκεντρώσεις μικρορύπων και διαφορετικούς χρόνους έκθεσης. Προκειμένου να μελετηθεί το βέλτιστο κινητικό καθεστώς του μόρια που συσσωρεύτηκαν στο POCIS, οι χρόνοι έκθεσης κυμαίνονταν από 1 ημέρα έως 56 ημέρες. Γενικά, οι εργαστηριακές βαθμονομήσεις των POCIS πραγματοποιούνται για 21 ημέρες ή 28 ημέρες για τις κυανοτοξίνες, τις αλκυλοφαινόλες, τις ορμόνες, τα φυτοφάρμακα και τα φαρμακευτικά προϊόντα προκειμένου να διασφαλιστεί η παραμονή εντός του κινητικού καθεστώτος. Ωστόσο, ορισμένες ενώσεις δείχνουν ενδείξεις καμπυλόγραμμης συσσώρευσης στα POCIS πριν από 21 ημέρες έκθεσης (π.χ. φυτοφάρμακα) τα οποία είναι πολύ πολικές ή ανιονικές ενώσεις. Τα ποσοστά δειγματοληψίας μπορεί επίσης να διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του POCIS. Επιπλέον, μέθοδοι υπολογισμού των Rs και ο καθορισμός τους μπορεί να διαφέρει

από τον έναν συγγραφέα στον άλλο οδηγώντας σε διαφορετικά αποτελέσματα. Συμπερασματικά, τα εργαστηριακά R_s είναι δύσκολο να ληφθούν καθώς τα αντίστοιχα εργαστηριακά πειράματα βαθμονόμησης είναι δαπανηρά και χρονοβόρα. Τα υπολογιζόμενα R_s μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τις φυσικοχημικές παραμέτρους (π.χ. pH, αλατότητα) την ανάδευση των μέσων έκθεσης, τη θερμοκρασία, τη βιοαπόρριψη καθώς και τον τύπο και το μέγεθος του POCIS. Πιθανότατα, επηρεάζονται επίσης από το επίπεδο συγκέντρωσης των μικρορύπων, τη διάρκεια της έκθεσης των συσκευών POCIS, τα συστήματα βαθμονόμησης και τις μεθόδους υπολογισμού. (Morin *et al.*, 2012)

2.8.2 *In situ* (επί τόπου) βαθμονόμηση των συσκευών POCIS

Σε αυτή την περίπτωση οι συσκευές POCIS εκτίθενται σε υδάτινα περιβάλλοντα επί τόπου. Οι παράμετροι όπως η ανάδευση, η θερμοκρασία, οι φυσικοχημικές παράμετροι, οι συγκεντρώσεις βιορύπανσης και μικρορύπων δεν ελέγχονται. Μπορούν να μετρηθούν μόνο με τη χρήση στιγμιαίας δειγματοληψίας ή αυτοματοποιημένης δειγματοληψίας. Τα πλεονεκτήματα των ρυθμών δειγματοληψίας R_s *in situ* είναι αξιόπιστα και σταθερά για μια συγκεκριμένη τοποθεσία, εάν οι περιβαλλοντικές παράμετροι δεν διαφέρουν πολύ κατά τη διάρκεια της βαθμονόμησης. Έτσι, εάν τα POCIS είναι βυθισμένα σε μια δεδομένη τοποθεσία και εάν οι περιβαλλοντικές παράμετροι είναι κοντά σε αυτές που παρατηρούνται κατά την *in situ* βαθμονόμηση που πραγματοποιείται στην ίδια τοποθεσία, το POCIS μπορεί να παρέχει ακριβείς συγκεντρώσεις TWA (Time Weighted Average). Ωστόσο, είναι σαφώς πολύ δαπανηρό και χρονοβόρο να πραγματοποιηθεί μια *in situ* βαθμονόμηση για κάθε τοποθεσία που μελετάται και για κάθε ημερομηνία δειγματοληψίας. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με τη μεταβλητότητα των *in situ* R_s που να συνδέονται με περιβαλλοντικές παραμέτρους (π.χ. ροή νερού και θερμοκρασία), ενώ πολύ λίγες είναι οι τιμές των *in situ* R_s που έχουν δημοσιευθεί. Οι (Zhang *et al.* 2008) που μελέτησαν την επί τόπου απόδοση των POCIS παρατήρησαν ότι τα *in situ* R_s ήταν υψηλότερα από τα R_s του εργαστηρίου, καθώς η ταχύτητα ροής ήταν υψηλότερη στα λύματα και το νερό του ποταμού μελέτης από ότι στο εργαστήριο. Τέλος, τα *in situ* R_s

φαίνεται να είναι πιο αξιόπιστα από τα εργαστηριακά Rs επειδή λαμβάνουν υπόψη τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ωστόσο, η *in situ* βαθμονόμηση εξακολουθεί να είναι μια διερευνητική προσέγγιση που χρειάζεται περισσότερα δεδομένα και εκστρατείες πεδίου για να αξιολογηθεί η απόδοσή της και η δυνατότητα εφαρμογής της για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων TWA (Time Weighted Average) σε διάφορα είδη νερών. (Morin *et al.*, 2012)

2.9 Εκτίμηση των συγκεντρώσεων μικρορύπων στο νερό στο φυσικό περιβάλλον

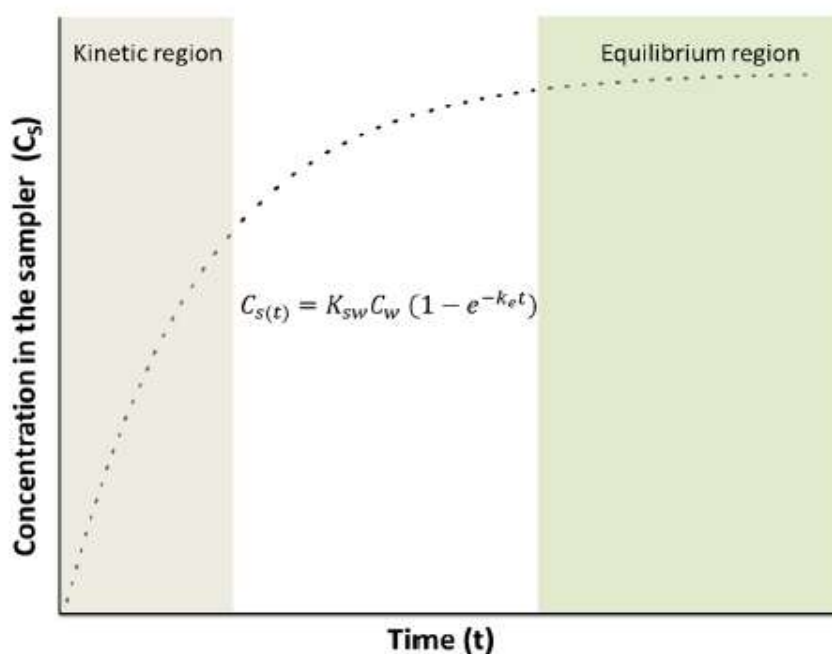
Η ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου που περιγράφει τη διαδικασία της παθητικής δειγματοληψίας είναι ιδιαίτερα σημαντική, κυρίως λόγω δύο παραγόντων. Πρώτον, κάθε δειγματολήπτης έχει διαφορετικούς τρόπους απορρόφησης για διαφορετικές αναλύσεις, οπότε ένα μόνο μαθηματικό μοντέλο δεν μπορεί εφαρμόζεται σε κάθε περίπτωση. Δεύτερον, η παθητική δειγματοληψία είναι μια *in situ* διαδικασία, που σημαίνει ότι δεν υπάρχει έλεγχος των μεταβλητών στον τόπο δειγματοληψίας. Αυτή η ενότητα στοχεύει να περιγράψει εν συντομία τις κύριες πτυχές για τον υπολογισμό των χρονικά σταθμισμένων συγκεντρώσεων TWA (Time-Weighted- Average). Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τη διαδρομή των αναλυτών πριν από τη συλλογή τους στη φάση λήψης. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν δύο μοντέλα υψηλής εφαρμογής που εξηγούν αυτή τη διαδικασία, το κινητικό μοντέλο χημικής αντίδρασης (CRK) (Chemical Reaction Kinetic model) και το μοντέλο μεταφοράς μάζας (MTC) (Mass Transfer Coefficient).

Στην περίπτωση του μοντέλου **CRK** (Chemical Reaction Kinetic), η πρόσληψη ακολουθεί μια κινητική πρώτη τάξης (Charriau *et al.*, 2016). Η (Εικόνα 11) δείχνει ένα προφίλ μοντέλου πρόσληψης ενός αναλύτη ως συνάρτηση του χρόνου σε μια συσκευή παθητικής δειγματοληψίας. Αυτό το προφίλ χαρακτηρίζεται από 3 περιοχές. Πρώτον, μία γραμμική περιοχή. Δεύτερον, μια καμπυλόγραμμη περιοχή και τέλος, μια περιοχή ισορροπίας. Αυτό το προφίλ πρόσληψης περιγράφεται από την (εξίσωση 2.7) (Kot-Wasik *et al.*, 2007).

$$C_s(t) = C_w K_{sw} (1 - e^{-k_e t}), \text{ (εξίσωση 2.7)}$$

Όπου: C_s η συγκέντρωση της ένωσης στον δειγματολήπτη σε μονάδες ng/g, C_w είναι η μέση σταθμισμένη χρονικά συγκέντρωση της ένωσης στο νερό σε μονάδες ng/L, K_{sw} είναι ο συντελεστής κατανομής μεταξύ νερού και της φάσης λήψης σε μονάδες L/g και k_e είναι η σταθερά ρυθμού εξάλειψης της ένωσης από τη φάση λήψης σε μονάδες L/dg και t είναι ο χρόνος έκθεσης του δειγματολήπτη σε μονάδες d (days).

Ανάλογα με το χρόνο έκθεσης, κάθε συσκευή μπορεί να ακολουθήσει πρόσληψη κινητική ή ισορροπίας. Σε κάθε περίπτωση η (εξίσωση 2.7) μπορεί να γίνει πιο απλοποιημένη στη μορφή της (εξίσωσης 2.8) και (εξίσωσης 2.9) για πρόσληψη ισορροπίας και κινητική πρόσληψη αντίστοιχα.



Εικόνα 10 Τυπικό προφίλ λήψης αναλυτών από συσκευές παθητικής δειγματοληψίας. Ο χρόνος έκθεσης καθορίζει τον τρόπο πρόσληψης της συσκευής (κινητική περιοχή ή περιοχή ισορροπίας) (με βάση την αναφορά Mayer et al. 2003)

Σε κατάσταση ισορροπίας η συγκέντρωση εξαρτάται από του συντελεστές κατανομής κάθε αναλύτη και από τον όγκο του δειγματολήπτη στη φάση λήψης. Η συγκέντρωση είναι ανεξάρτητη του όγκου του νερού που αναλύθηκε και μπορεί να προσδιοριστεί από την (εξίσωση 2.8):

$$C_w = \frac{C_s}{K_{sw}} = \frac{N_s}{K_{sw} V_s}, \text{ (εξίσωση 2.8)}$$

Όπου: C_w είναι η μέση σταθμισμένη χρονικά συγκέντρωση της ένωσης στο νερό σε μονάδες ng/L, C_s η συγκέντρωση της ένωσης στον δειγματολήπτη σε μονάδες ng/g, K_{sw} είναι ο συντελεστής κατανομής μεταξύ νερού και της φάσης λήψης σε μονάδες L/g, N_s είναι η ποσότητα του αναλύτη στη φάση λήψης σε (ng) και V_s σε (mL) είναι ο όγκος της φάσης λήψης.

Σε κατάσταση ισορροπίας, η συγκέντρωση στον δειγματολήπτη και η πηγή του νερού είναι ισοδύναμες και το C_w ονομάζεται συγκέντρωση ισορροπίας της δειγματοληψίας (C_{equi}). Από την (εξίσωση 2.8), ο συντελεστής κατανομής μπορεί να εκφραστεί ως εξής (εξίσωση 2.9):

$$K_{SW} = \frac{C_{s(equi)}}{C_w} = \frac{k_e}{K_u}, \text{ (εξίσωση 2.9)}$$

Όπου: K_{sw} είναι ο συντελεστής κατανομής μεταξύ νερού και της φάσης λήψης σε μονάδες L/g, $C_{s(equi)}$ η συγκέντρωση της ένωσης στον δειγματολήπτη σε κατάσταση ισορροπίας σε μονάδες ng/g, C_w είναι η μέση σταθμισμένη χρονικά συγκέντρωση της ένωσης στο νερό σε μονάδες ng/L, k_e είναι η σταθερά ρυθμού εξάλειψης της ένωσης από τη φάση λήψης σε μονάδες L/dg και K_u είναι η σταθερά του ρυθμού προσρόφησης σε μονάδες (L/dg).

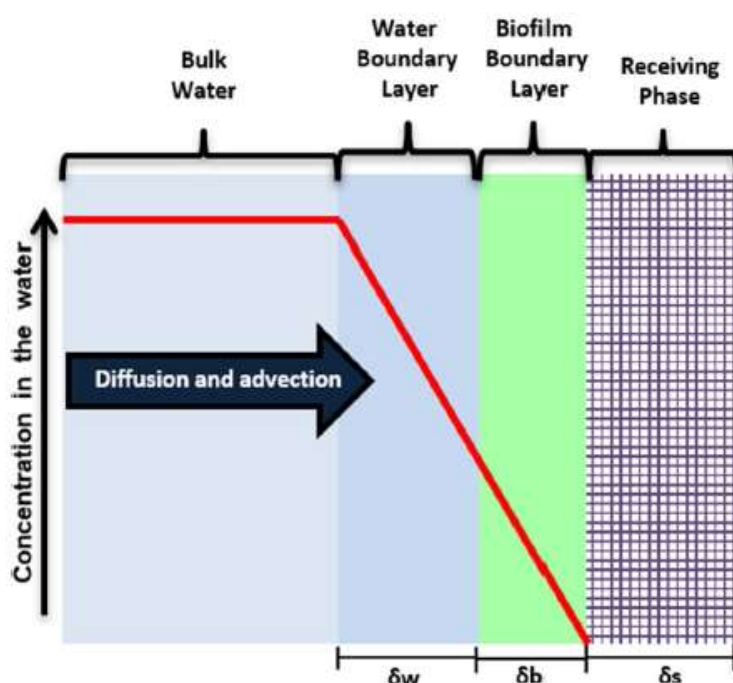
Σε κινητική λειτουργία, η συγκέντρωση της ένωσης προσδιορίζεται μέσω του ρυθμού δειγματοληψίας R_s για συγκεκριμένο δείγμα και χρόνο έκθεσης t (εξίσωση 2.10). Το R_s προσδιορίζεται σε εργαστηριακά πειράματα βαθμονόμησης ή μέσω επιτόπιας βαθμονόμησης. Η κινητική λειτουργία παρέχει συγκεντρώσεις αναλυτών- στόχων στο νερό. Αυτή η λειτουργία πρόσληψης παρέχει μια μακροπρόθεσμη περιγραφή της ποιότητας νερού και προσφέρει υψηλή απόδοση στην παρακολούθηση των μέγιστων παροδικών συγκεντρώσεων των περιβαλλοντικών ρύπων στο νερό. Τα χαρακτηριστικά αυτά, καθιστούν τον τρόπο αυτό τον πιο χρησιμοποιημένο και μελετημένο.

$$C_w = \frac{N_s}{R_s} t, \text{ (εξίσωση 2.10)}$$

Όπου: C_w είναι η μέση σταθμισμένη χρονικά συγκέντρωση της ένωσης στο νερό σε μονάδες ng/L, N_s είναι η ποσότητα του αναλύτη στη φάση λήψης σε (ng), R_s ο ρυθμός

δειγματοληψίας σε μονάδες L/d και t ο χρόνος έκθεσης του δειγματολήπτη σε μονάδες d (days). (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Το μοντέλο **MTC** (Mass Transfer Compound) βασίζεται σε μια μαθηματική περιγραφή της μεταφοράς μάζας της ένωσης στα “διαμερίσματα” των δειγματοληπτών. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η διαδικασία της συσσώρευσης των ρύπων ρυθμίζεται από τις διαδικασίες διάχυσης σε κάθε περιοριστικό φραγμό που επηρεάζει τη μεταφορά μάζας. Είναι μια αναπαράσταση των φραγμών των φυτοφαρμάκων κατά την προσρόφηση τους στο δειγματολήπτη. Σύμφωνα με την (Εικόνα 10), η μεταφορά της μάζας είναι πολλαπλών σταδίων και είναι ένα φαινόμενο που περιλαμβάνει 3 οριακά στρώματα. Το πρώτο είναι η μεταφορά της χημικής ουσίας μέσω του οριακού στρώματος του νερού (WBL), (Water Boundary Layer) που υπάρχει στην επιφάνεια του δειγματολήπτη. Το δεύτερο είναι η μεταφορά μέσω του στρώματος βιοφίλμ, το οποίο αναπτύσσεται ως αποτέλεσμα εκτεταμένης έκθεσης σε φυσικό νερό και το τρίτο είναι η μεταφορά μέσω της μεμβράνης ή και του στρώματος φάσης λήψης του δειγματολήπτη (Vrana *et al.*, 2005) (Allan *et al.*, 2010).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση των φραγμών στα φυτοφάρμακα κατά την απορρόφηση από δειγματολήπτη. Τα (δ) αντιπροσωπεύουν το αποτελεσματικό πάχος του καθενός στη περιοχή (Alvarez *et al.* 2007)

Το μαθηματικό μοντέλο MTC δίνεται από την (εξίσωση 2.11):

$$MTC = \frac{N_s}{A_t} = \lambda_o(C_w - \frac{C_s}{K_{sw}}), \text{ (εξίσωση 2.11)}$$

Όπου: N_s είναι η ποσότητα του αναλύτη στη φάση λήψης σε μονάδες (ng), A είναι η επιφάνεια σε (m^2), t είναι ο χρόνος έκθεσης σε (ημέρες), λ_o είναι ο συνολικός συντελεστής μεταφοράς μάζας (m/s), C_w είναι η μέση συγκέντρωση στο νερό ή TWA (ng/L), C_s είναι η συγκέντρωση της ένωσης στον δειγματολήπτη ως συνάρτηση χρόνου (ng/g), K_{sw} είναι ο συντελεστής κατανομής μεταξύ του νερού και της φάσης λήψης (L/g). (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Όταν οι συσκευές παθητικής δειγματοληψίας δεν φτάνουν σε ισορροπία κατά τη διάρκεια του χρόνου έκθεσης τους, δηλαδή $C_s < C_{s \text{ (equi)}}$ (η συγκέντρωση του αναλύτη σε ισορροπία στο δείγμα), η (εξίσωση 2.11) μπορεί να γραφτεί ως ακολούθως :

$$N_s = \lambda_o A C_w t, \text{ (εξίσωση 2.12)}$$

Από την (εξίσωση 2.11) και (2.12) μπορεί να ληφθεί ο ρυθμός δειγματοληψίας R_s που είναι ο όγκος του νερού που αναλύεται από τη συσκευή ανά μονάδα χρόνου σε (ml/L):

$$R_s = \lambda_o A, \text{ (εξίσωση 2.13)}$$

Η συνολική αντίσταση στη μεταφορά μάζας ($1/\lambda_o$) σε ένα δειγματολήπτη μπορεί να περιγραφεί από την (εξίσωση 2.14):

$$\frac{1}{\lambda_o} = \frac{\delta_w}{D_w} + \frac{\delta_b}{D_b K_{bw}} + \frac{\delta_s}{D_s K_{sw}}, \text{ (εξίσωση 2.14)}$$

όπου δ το πάχος κάθε περιοριστικού φραγμού σε μονάδες (m) και D ο συντελεστής διάχυσης κάθε περιοριστικού φραγμού σε μονάδες (m^2/s), αντίστοιχα w για το νερό, b για τον πιθανό σχηματισμό βιοφίλμ, και s για τη φάση λήψης. Το K_{bw} είναι ο συντελεστής κατανομής ανάμεσα στο νερό και το πιθανό βιοφίλμ, και το K_{sw} είναι ο

συντελεστής κατανομής μεταξύ νερού και λήψης φάση.(Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

Γενικά, οι πιο υδρόφοβες ενώσεις είναι πιο περιορισμένες στο οριακό στρώμα του νερού σε τυπικές αναλύσεις με συντελεστές κατανομής μεγαλύτερους από 3, ($\log K_{ow} > 3$). Αυτό το φράγμα μπορεί να μειωθεί, όταν η αυξημένη ροή του νερού επιτρέπει την μεγαλύτερη διάχυση των αναλυόμενων ουσιών. Σύμφωνα με την έρευνα από τους Assoumani et al. (2014) η υψηλή ταχύτητα ροής παράγει θετική επίδραση στην πρόσληψη του πιο υδρόφοβου στόχου (πχ. φυτοφάρμακα) με $\log K_{ow} > 3.3$, λόγω του ελέγχου WBL(Water boundary layer). Μόλις οι ενώσεις φτάσουν στη φάση του αποδέκτη, θα αρχίσουν να συλλέγονται σε δυναμική ισορροπία. Ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί η ροή συσσώρευσης σταθερής κατάστασης στον παθητικό δειγματολήπτη ορίζεται ως φάση υστέρησης (Assoumani et al., 2014). Όταν η φάση υστέρησης επιτευχθεί, η φάση του αποδέκτη πρέπει να λειτουργήσει ως ο λεγόμενος μηδενικός νεροχύτης, που σημαίνει ότι η φάση του αποδέκτη πρέπει μην αφήσει τα παγιδευμένα μόρια να απελευθερωθούν ακόμη και αν η συγκέντρωση του αναλύτη γύρω από το δείγμα μειώνεται στο μηδέν. (Górecki and Namienik, 2002).

2.10 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την Παθητική Δειγματοληψία

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη διαδικασία της παθητικής δειγματοληψίας. Σύμφωνα με τους Murillo-Martínez et al. (2018), ο παράγοντας που περιορίζει την ανταλλαγή μάζας μεταξύ νερού και δειγματοληπτών είναι το οριακό στρώμα νερού WBL (Water boundary layer). Επομένως, οποιαδήποτε παράμετρος που επηρεάζει το πάχος του WBL θα επηρεάσει σημαντικά την κινητική στη συσκευή του δειγματολήπτη. Με αυτόν τον τρόπο, οι περιβαλλοντικές συνθήκες: όπως η ροή του νερού, η θερμοκρασία, η αλατότητα και η βιορύπανση μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει την ικανότητα εξαγωγής των αναλυτών από την συσκευή. Επειδή, αυτές οι παράμετροι μεταβάλλουν τα ποσοστά δειγματοληψίας, η αξιολόγησή τους κατά τη διάρκεια της βαθμονόμησης είναι σημαντική.

Η ροή του νερού είναι μία από τις πιο συχνά αξιολογούμενες παραμέτρους κατά τη διαδικασία της βαθμονόμησης ενός δειγματολήπτη. Αυτή, η παράμετρος είναι πολύ σημαντική κατά τη μελέτη των υδάτων των ποταμών και των ρεμάτων. Το πάχος του WBL μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη ροή του νερού. Αυτή η παράμετρος μπορεί να δημιουργήσει αλλαγές στο ποσοστό δειγματοληψίας (Assoumani *et al.*, 2014). Διαφορετικές μελέτες με συσκευές POCIS και άλλους δειγματολήπτες όπως των (Assoumani *et al.*, 2014), έχουν αναφέρει ότι η ταχύτερη ροή του νερού μειώνει το πάχος του WBL ευνοώντας την άφιξη των ενώσεων στη φάση λήψης. (Valenzuela, Menezes and Cardeal, 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο

Μέθοδος Εκχύλισης Στερεάς Φάσης-υγρού (Solid Phase Extraction, SPE)

3.1 Γενικά

Όπως είναι ευρέως γνωστό, η προετοιμασία και η κατεργασία του δείγματος είναι ένα πολύ σημαντικό και αναπόφευκτο βήμα στην χημική ανάλυση. Τα περισσότερα από τα αναλυτικά δείγματα δεν μπορούν να εγχυθούν απευθείας σε αναλυτικά όργανα και επομένως, πρέπει να υποβληθούν σε επεξεργασία για να τα καταστούν συμβατά με αναλυτικά όργανα, ειδικά όταν αφορούν επίπεδα ιχνών αναλυτών-στόχων διασκορπισμένων σε πολύπλοκες μήτρες δειγμάτων. Η συλλογή και η προετοιμασία των δειγμάτων απαιτούν περισσότερο από 80% του χρόνου της αναλυτικής διαδικασίας. Ακριβώς για αυτό το λόγο, η προετοιμασία του δείγματος θεωρείται και είναι το πιο χρονοβόρο αλλά κρίσιμο μέρος της όλης ανάλυσης, η οποία επηρεάζει την αποτελεσματικότητα και την απόδοσή της. (Zilfidou *et al.*, 2018)

Η προετοιμασία του δείγματος αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της επεξεργασίας, καθώς τα συστατικά της μήτρας μπορεί να έχουν επιζήμια επίδραση στην απόδοση του αναλυτικού οργάνου ή να επηρεάσουν την ανάλυση των αναλυτών -στόχων. Η συγκέντρωση των αναλυτών στόχων στη μήτρα του δείγματος μπορεί να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης του αναλυτικού οργάνου ή η μήτρα του δείγματος να μην είναι συμβατή με το αναλυτικό όργανο. Πριν από την εισαγωγή των δειγμάτων στο αναλυτικό όργανο για ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών- στόχων θα πρέπει να έχει ακολουθηθεί η σωστή προεργασία όπως :

1. Τροποποίηση του υποστρώματος
2. Καθαρισμός του δείγματος
3. Προ-συγκέντρωση
4. Απομόνωση στοιχείων ενδιαφέροντος (Zilfidou *et al.*, 2018)

3.2 Αρχή της Μεθόδου (SPE)

Η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης-υγρού (SPE) περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε 2 φάσεις:

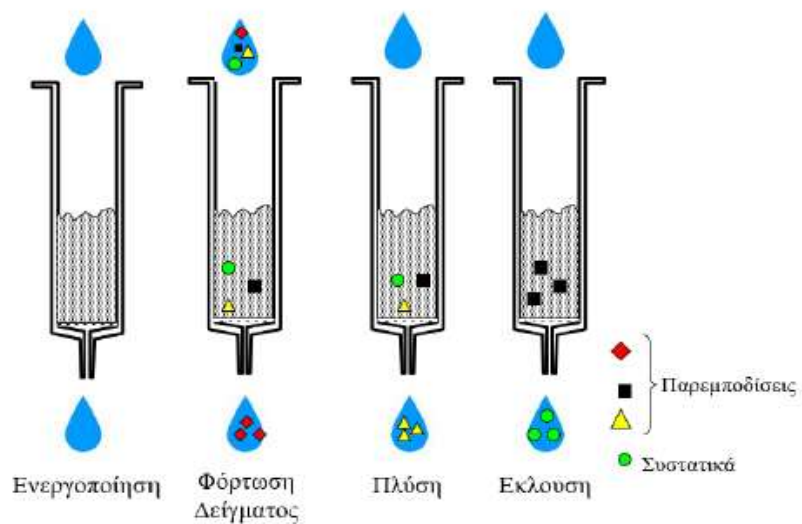
- 1) Τη στερεή φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και
- 2) την υγρή φάση που αποτελεί το υπόστρωμα με όλες τις παρεμποδίσσεις. Αυτή η κατανομή των δύο φάσεων αποτελεί την αρχή της μεθόδου της (SPE). (Λιοδάκης, 2001)

Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των προσδιοριζόμενων συστατικών, δηλαδή των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και του διαλύτη είναι υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλουσης των ενώσεων. (Λιοδάκης, 2001). Η SPE χρησιμοποιεί τη συγγένεια των αναλυτών με το προσροφητικό, συνεπώς το προσροφητικό είναι ο πυρήνας της SPE που καθορίζει την αποτελεσματικότητα και την επιλεκτικότητα της εξαγωγής. (Liu, Shi and Jiang, 2012)

3.3 Τα βασικά στάδια της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE)

Στάδια SPE:

- **Επαναδιαλύτωση (solvation):** Απομάκρυνση διαφόρων επιμολύνσεων με απεσταγμένο H₂O (όχι μέχρι ξηρού).
- **Εγκλιματισμός υλικού (conditioning):** Με διάλυμα εγκλιματισμού παρόμοιας σύστασης με του δείγματος (όχι μέχρι ξηρού).
- **Εισαγωγή δείγματος (sample loading):** Κάποια συστατικά διαφεύγουν (μερικώς καθαρισμός), όπως άλατα σε υδρόφοβα υλικά (μέχρι ξηρού).
- **Έκπλυση υλικού (clean-up):** Καθαρισμός δείγματος από προσμίξεις με τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών κάθε φορά, μέχρι ξηρού.
- **Έκλυση αναλυτών (Elution):** Εκχύλιση αναλυτών με τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών, μέχρι ξηρού. (Λιοδάκης, 2001)



Εικόνα 12 : Συνοπτικά τα στάδια και ο τρόπος εφαρμογής της μεθόδου Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE). (Λιοδάκης, 2001)

Οργανολογία της SPE



Εικόνα 13 : Μικροστήλη SPE.



Εικόνα 14 : Συσκευή SPE.

3.4 Πλεονεκτήματα της Μεθόδου Εκχύλισης- Στερεάς Φάσης (SPE)

Η μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης-υγρού παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα κατά τη χρήση της όπως :

1. ότι απαιτείται μικρός χρόνος εκτέλεσης της διαδικασίας
2. Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλυτών
3. Αποτελεί μια κατάλληλη τεχνική για τον συνδυασμό της με διαφορετικές τεχνικές χρωματογραφίας όπως HPLC,GC και άλλες.
4. Μπορεί να αυτοματοποιηθεί και να αναλυθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων.
5. Να επιτευχθεί ικανοποιητικός καθαρισμός του δείγματος.
6. Επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των συστατικών με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στην ανάλυση.
7. Έχει καλή επαναληψιμότητα.
8. Και παρέχει υψηλά ποσοστά ανάκτησης.

Κατά τη πειραματική διαδικασία των POCIS που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο, χρησιμοποιήθηκε ουσιαστικά το τελευταίο στάδιο της έκλουσης της μεθόδου της SPE, κατά το οποίο εκλούστηκαν οι πιθανοί αναλύτες σε κατάλληλο κάθε φορά διαλύτη. Αυτό συμβαίνει διότι, οι αναλύτες έχουν ήδη προσροφηθεί στο ειδικό προσροφητικό υλικό, το οποίο τοποθετήθηκε καταλλήλως σε μικροστήλες των 6 ml και στη συνέχεια ακολούθησε η έκλουση των αναλυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Υγρή Χρωματογραφία

4.1 Η χρωματογραφία ως τεχνική ανάλυσης

Η χρωματογραφία αποτελεί μία τεχνική διαχωρισμού που βασίζεται στην κατανομή των ενώσεων που πρόκειται να διαχωριστούν εντός δύο φάσεων. Είναι μια τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται σε πολλούς κλάδους της επιστήμης. Αυτές οι δύο φάσεις είναι η στατική φάση και η κινητή φάση. Η στατική φάση είναι η φάση που παραμένει ακίνητη, ενώ η κινητή φάση βρίσκεται υπό συνεχή ροή. Το δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί με τη βοήθεια της κινητής φάσης εισάγεται στη στατική φάση. Οι δύο φάσεις αυτές έχουν σκοπό τη διαφορετική κατανομή των συστατικών μιας ένωσης. Εκείνα τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα στην στατική φάση κινούνται πιο αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης, αντίθετα τα συστατικά που κατακρατούνται ασθενέστερα στην στατική φάση κινούνται ταχύτερα με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται στα συστατικά του μίγματος.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές ταξινομούνται με βάση κυρίως τον τύπο της κινητής φάσης. Έτσι, μπορεί να έχουμε υγρή ή αέρια χρωματογραφία. Επίσης, η ταξινόμηση βασίζεται στον τύπο και τη μορφή της στατικής φάσης, το μηχανισμό του διαχωρισμού και τον τρόπο εισαγωγής του αναλυόμενου δείγματος στη στατική φάση. Η αέρια ή η υγρή χρωματογραφία επιλέγεται για το διαχωρισμό, ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ένωσης που αναλύεται κάθε φορά.

4.2 Υγρή Χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία LC (Liquid Chromatography) είναι η τεχνική ανάλυση κατά την οποία γίνεται διαχωρισμός και ποιοτικός και ποσοτικός διαχωρισμός πολικών, μη πτητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων που δεν είναι δυνατόν να αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία. Εάν δεν διασπαστούν δεν μπορούν να εξαερωθούν.

Κατά την διαδικασία της υγρής χρωματογραφίας έχουμε την ταυτόχρονη δράση της στατικής και της υγρής κινητής φάσης στο προς αναλυόμενο δείγμα. Οι χημικές

ενώσεις διαχωρίζονται μεταξύ της στατικής και της υγρής κινητής φάσης και μετακινούνται στην κινητή φάση με διαφορετικές ταχύτητες με αποτέλεσμα το διαφορετικό χρόνο έκλυσης της κάθε ένωσης μέσα από τη στήλη. Η αλληλεπίδραση της χημικής ουσίας με την στατική και την υγρή κινητή φάση εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και τη πυκνότητα του φορτίου των σωματιδίων της ένωσης κάθε φορά.

Ανάλογα με τη φύση της στατικής φάσης η διαδικασία του διαχωρισμού μπορεί να γίνει με τέσσερις διαφορετικούς τρόπους λειτουργίας (μηχανισμός) .

1. Με χρωματογραφία προσρόφησης, όπου ο διαχωρισμός βασίζεται σε επαναλαμβανόμενα στάδια προσρόφησης- εκρόφησης.
2. Με χρωματογραφία κατανομής, όπου ο διαχωρισμός βασίζεται στην κατανομή μεταξύ κινητής και στατικής φάσης.
3. Με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, όπου η στατική φάση είναι δομημένη από επιφάνεια - ιονισμένη, φορτισμένη με φορτίο αντίθετο από αυτό του δείγματος.
4. Με χρωματογραφία εξαίρεσης μεγέθους, όπου το δείγμα διαχωρίζεται με βάση το μοριακό του μέγεθος, μέσω μια στήλης πληρωμένης με υλικό που έχει επακριβώς ελεγχόμενο μέγεθος πόρων.

Στην υγρή χρωματογραφία, η έκλυση των αναλυτών μπορεί να γίνει ισοκρατικά ή βαθμωτά. Όταν η σύνθεση ενός μίγματος διαλυτών παραμένει σταθερή σε όλο το στάδιο της έκλυσης, τότε έχουμε *ισοκρατική έκλυση*. Από την άλλη πλευρά, όταν η σύνθεση του μίγματος των διαλυτών ποικίλλει κατά τη διάρκεια της έκλυσης, κατά συνέπεια και της συγκέντρωσης του διαλύματος, χρησιμοποιούμε τον όρο της *βαθμωτής έκλυσης*. (Bélanger, Jocelyn Paré and Sigouin, 1997)

Κατά την ισοκρατική έκλυση, που η σύσταση της κινητής φάσης είναι σταθερή παρατηρείται ότι δεν είναι αποτελεσματική για δείγματα πολλών αναλυτών. Από την άλλη πλευρά, κατά την βαθμωτή έκλυση γίνεται ανάμιξη ενός ασθενούς διαλύτη με έναν ισχυρό διαλύτη (κινητή φάση) με αναλογία που διαφέρει κατά την διάρκεια του διαχωρισμού με αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών. Στην αρχή

γίνεται έκλυση των χημικών ενώσεων που έχουν μικρό χρόνο κατακράτησης και στη συνέχεια γίνεται έκλυση των ενώσεων που έχουν μεγαλύτερο χρόνο κατακράτησης. Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός, η στατική φάση επιλέγεται να έχει διαφορετική πολικότητα από εκείνης της κινητής φάσης. Μεγαλύτερη απόδοση διαχωρισμού έχουμε με χαμηλή ταχύτητα ροής λόγω του ότι η υγρή φάση χαρακτηρίζεται κυρίως από χαμηλές ταχύτητες διάχυσης.

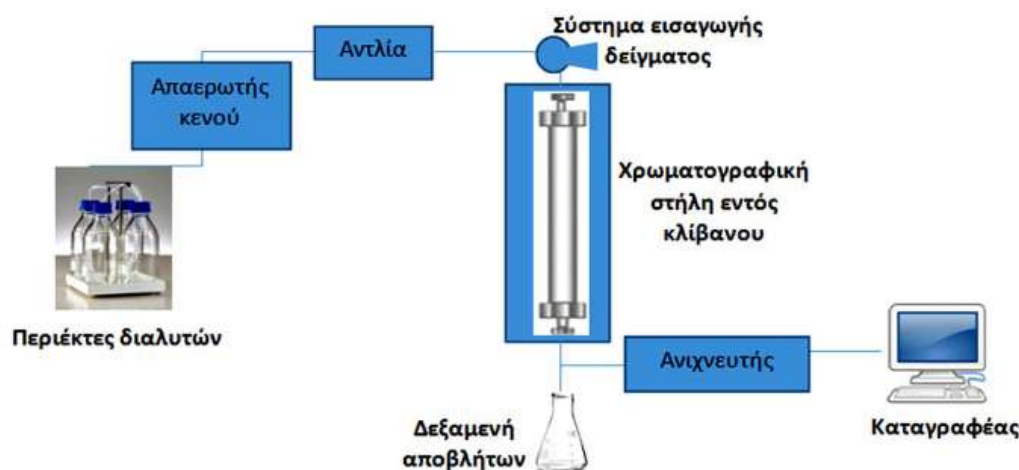
Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) , που παλαιότερα αναφερόταν ως υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, είναι μια τεχνική στην αναλυτική χημεία που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε συστατικού (ένωσης) σε ένα μίγμα. Βασίζεται σε αντλίες για τη διοχέτευση ενός υπό πίεση υγρού -διαλύτη που περιέχει το μίγμα του δείγματος μέσω μιας στήλης γεμάτη με στερεό προσροφητικό υλικό. Κάθε συστατικό στο δείγμα αλληλεπιδρά ελαφρώς διαφορετικά με το προσροφητικό υλικό, προκαλώντας διαφορετικούς ρυθμούς ροής για τα διαφορετικά συστατικά- ενώσεις, οδηγώντας τελικά στον διαχωρισμό των συστατικών αυτών καθώς ρέουν έξω από τη στήλη.

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Σήμερα έχει εξελιχθεί σε απαραίτητο εργαλείο για τα σύγχρονα αναλυτικά εργαστήρια και έχει αντικαταστήσει την αέρια χρωματογραφία (GC) για ποικιλία αναλύσεων. Μέσα από τις εφαρμογές στην ανάλυση τροφίμων, η τεχνική έχει αποκτήσει αυξημένη αποδοχή κυρίως για δύο βασικούς λόγους:

- 1) την ανάγκη για ένα ευρύ φάσμα γρήγορων αναλύσεων για τα θρεπτικά συστατικά των τροφίμων και
- 2) την ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων που μπορεί να είναι εύκολα αυτοματοποιημένοι.

Παρά τα αξιοσημείωτα αυτά πλεονεκτήματα, η ενσωμάτωση της HPLC στα εργαστήρια τροφίμων ήταν αργή σε σύγκριση με άλλους τομείς όπως στη χημεία φαρμάκων και στην ιατροδικαστική τοξικολογία. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες όπως η πολυπλοκότητα της μήτρας στα περισσότερα συστήματα

τροφίμων και τα πολύ χαμηλά επίπεδα πολλών από τα συστατικά ενδιαφέροντος που βρίσκονται σε τρόφιμα. Ωστόσο, σήμερα υπάρχει μια πληθώρα αναλύσεων που γίνονται με HPLC και αναγνωρίζονται από την Ένωση των Επίσημων Αναλυτικών Χημικών. Η τεχνική αυτή έχει σίγουρα ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον για την ανάλυση τροφίμων. (Bélanger, Jocelyn Paré and Sigouin, 1997)



Εικόνα 15 : Σχηματική αναπαράσταση υγρής χρωματογραφίας HPLC. (Karkalousos *et al.*, 2015)

Αναλυτικές στήλες

Οι αναλυτικές στήλες της υγρής χρωματογραφίας αποτελούνται κυρίως από ανοξείδωτο χάλυβα και δομούνται από μικρούς σωλήνες με μήκος μερικών εκατοστών και με μικρή διάμετρο. Τα πληρωτικά υλικά της αναλυτικής στήλης μπορεί να είναι είτε πορώδη σωματίδια είτε σφαιροειδή. Τα πορώδη σωματίδια μπορεί να είναι μικροσωματίδια με διάμετρο 3-10 μm και να αποτελούνται από αλουμίνα, πυρίτιο, ιονανταλλακτική ρητίνη ή συνθετική ρητίνη. Τα σφαιροειδή σωματίδια μπορεί να προέρχονται από ύαλο ή πολυμερές με διάμετρο 30-40 μm . Η επιλογή της αναλυτικής στήλης εξαρτάται κάθε φορά από τα παρακάτω:

1. το μέγεθος των μορίων του υλικού πληρώσεως και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης
2. την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης και τη φύση του υποστρώματος
3. την διάμετρο των πόρων του πληρωτικού υλικού και την περιεκτικότητα σε σιλανολικά υδροξύλια $-\text{Si}-\text{OH}$. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους τόσο

πιο όξινη είναι η στήλη (πολική), άρα τόσο πιο δύσκολη η κατακράτηση των μη πολικών ενώσεων.

Τέλος, οι αναλυτικές στήλες ταξινομούνται επίσης με βάση την εσωτερική διάμετρο, σε συμβατικές στήλες στενής διαμέτρου και σε τριχοειδείς στήλες. Οι δύο πρώτες στήλες είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ενώ, η τριχοειδής στήλη χρησιμοποιείται κυρίως στον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI).

Ανιχνευτές

Οι αναλυτές αφού διαχωριστούν στην αναλυτική στήλη στη συνέχεια ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή στο τέλος της στήλης. Στην υγρή χρωματογραφία οι ανιχνευτές κατηγοριοποιούνται σε αυτούς που βασίζονται σε μία βασική ιδιότητα της κινητής φάσης, δηλαδή το δείκτη διάθλασης, τη διηλεκτρική σταθερά και τη πυκνότητα και σε αυτούς που αποκρίνονται σε μία ιδιότητα της ένωσης- στόχου, όπως ο φθορισμός και η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία μπορεί να είναι:

- ο ανιχνευτής υπεριώδους –ορατού UV-VIS
- ο εκλεκτικός ανιχνευτής φθορισμού FD για φθορίζουσες ενώσεις
- οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές
- και ο ανιχνευτής υπεριώδους με σειρά φωτοδιοδίων UV-DAD

Σύζευξη υγρής χρωματογραφίας LC και φασματομετρίας μάζας MS

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ο συνδυασμός των τεχνικών LC-MS λόγω της επίτευξης της μεγάλης ακρίβειας στις αναλύσεις. Με αυτό τον τρόπο συνδυάζεται ο διαχωρισμός των ενώσεων μέσω της υγρής χρωματογραφίας και η εγκυρότητα της φασματομετρίας μάζας με την ακριβή ταυτοποίηση της ένωσης-στόχου. Στην υγρή χρωματογραφία ο μεγάλος αριθμός των χημικών ενώσεων που ανιχνεύονται έχει ως αποτέλεσμα και την ύπαρξη πολλών χημικών ενώσεων με παρόμοιους χρόνους κατακράτησης που δυσχεραίνουν την ταυτοποίηση τους. Από την άλλη μεριά, αν δεν υπάρξει ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος (δείγμα) πριν την εισαγωγή του στο φασματόμετρο μάζας,

τότε το φάσμα των ενώσεων- στόχων θα περιέχει και ιόντα των υπόλοιπων συστατικών. Η φασματομετρία μάζας έχει την ιδιότητα να ταυτοποιεί ενώσεις με βάση τα φάσματα μαζών που είναι μοναδικά για κάθε ένωση. Τέλος, ο συνδυασμός της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας LC με τη φασματομετρία μάζας MS συνδυάζει τα πλεονεκτήματα και των δύο αυτών τεχνικών οδηγώντας σε αξιόπιστες ταυτοποιήσεις χημικών ενώσεων και αναλύσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

Φασματομετρία Μάζας

5.1 Εισαγωγή και η έννοια της φασματομετρίας μάζας- Εφαρμογές

Η Φασματομετρία μάζας αποτελεί μία αναλυτική τεχνική προσδιορισμού της δομής ενώσεων καθώς και ποσοτικού προσδιορισμού των ίδιων. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι οργανικές, ανόργανες, οργανομεταλλικές και βιολογικά μόρια. Η τεχνική αυτή αποτελείται από τα παρακάτω επιμέρους τμήματα.

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος (τμήμα έγχυσης) πχ. GC/MS, LC/MS
2. Πηγή ιόντων (Ion source)
3. Αναλυτή μαζών (Mass Analyser)
4. Ανιχνευτής (Detector)
5. και ένα σύστημα καταγραφής (Data System)

Η τεχνική της φασματογραφίας μάζας βασίζεται στον ιοντισμό μορίων ή στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων που στη συνέχεια καταγράφεται η ένταση τους (φάσμα μάζας). Η παραγωγή των ιοντικών θραυσμάτων μορίων απεικονίζεται σε ένα φασματόμετρο μάζας ως η αντίστοιχη ένταση ρεύματος του θραύσματος ,η οποία με τη σειρά της αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο m/z του θραύσματος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς της έρευνας και έχει αναπτυχθεί σημαντικά καθώς αποτελεί αναγκαίο εργαλείο της χημικής ανάλυσης. Η εκλεκτικότητα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι ιδιαίτερα μεγάλη καθώς διαθέτει ακρίβεια στην μέτρηση των μοριακών μαζών, γεγονός που επιτρέπει την ταυτοποίηση των ενώσεων παρουσιάζοντας εξαιρετική ευαισθησία.

Η τεχνική της φασματομετρίας μάζας χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές ερευνητικές δραστηριότητες και τομείς. Μερικές από αυτές τις δραστηριότητες είναι οι ακόλουθες :

- περιβαλλοντικές αναλύσεις (στοχευμένη ή μη στοχευμένη ανάλυση)

- έλεγχος της ασφάλειας τροφίμων με προσδιορισμό φυτοφαρμάκων και τοξινών
- εφαρμογή της τεχνικής στην ιατρική τοξικολογία
- έλεγχος και προσδιορισμός απαγορευμένων ουσιών, doping
- εφαρμογή στην κλινική ανάλυση
- εφαρμογή στην φαρμακευτική ανάλυση
- εφαρμογή στην μεταβολική ανάλυση (μεταβολίτες, βιοδείκτες) (Λιοδάκης, 2001)

5.2 Η έννοια της μάζας στην αναλυτική τεχνική της φασματομετρίας μάζας

Στη τεχνική ανάλυσης της φασματομετρίας μάζας χρησιμοποιείται η ακριβής μάζα ενός ισότοπου μιας ένωσης. Ο λόγος m/z αποτελεί το μετρούμενο μέγεθος μάζα προς φορτίο. Συγκεκριμένα, όπου z έχουμε τον αριθμό του φορτίου ή των φορτίων που έχει το προσδιοριζόμενο ιόν.

Στις περισσότερες τεχνικές ανάλυσης γίνεται χρήση της έννοιας της μέσης μοριακής μάζας μιας ένωσης. Η μοριακή και η ατομική μάζα μιας ένωσης μπορεί να εκφραστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους με βάση το σταθερό ισότοπο του $^{12}_6\text{C}$ το οποίο έχει ατομική μάζα 12 εξ'ορισμού. Αυτοί οι τρεις διαφορετικοί τρόποι έκφρασης είναι η μονάδα ατομικής μάζας (atomic mass unit), (amu), το Dalton (Da) και η ενοποιημένη μονάδα ατομικής μάζας (unified atomic mass unit),(u). Συνδέονται μεταξύ τους με την παρακάτω σχέση:

$$1u = 1 \text{ amu} = 1 \text{ Da} = 1,66054 \pm 10^{-27} \text{ kg} \pm 0,59 \text{ ppm}$$

Αυτές οι εκφράσεις της μάζας είναι ισοδύναμες και βασίζονται στη σχετική κλίμακα που καθορίζεται από το ισότοπο του άνθρακα $^{12}_6\text{C}$. (Watson,2007), (De Hoffman E,2007)

Στην τεχνική της φασματομετρίας μάζας καταγράφεται η ακριβής μάζα m ενός συγκεκριμένου ισότοπου ενός στοιχείου, συνήθως του πιο άφθονου και η ακριβής μάζα της ένωσης που έχει συγκεκριμένα ισότοπα στοιχείων. Πιο ειδικά,

χρησιμοποιούνται οι έννοιες της μονοϊσοτοπικής μάζας και η ονομαστική μάζα στοιχείων και μορίων.

Ως **μονοϊσοτοπική μάζα** ενός στοιχείου ονομάζεται η ακριβής μάζα του πιο άφθονου και σταθερού ισοτόπου που βρίσκεται στη φύση, η οποία έχει προσδιοριστεί ως προς τη μάζα του ^{12}C και φέρει την ακριβή τιμή των 12.000 Da. Επίσης, η μονοϊσοτοπική μάζα ενός μορίου, ρίζας ή ιόντος είναι το άθροισμα των μονοϊσοτοπικών μαζών όλων των ατόμων που το συνιστούν.

Από την άλλη πλευρά, ως **ονομαστική μάζα** ενός στοιχείου ορίζεται η ακέραια μάζα του πιο άφθονου σταθερού ισοτόπου. Η ονομαστική μάζα ενός μορίου, ρίζας ή ιόντος είναι το άθροισμα των ονομαστικών μαζών όλων των ατόμων των στοιχείων που το συνιστούν. Ανάλογα με τη διακριτική ικανότητα του εκάστοτε φασματόμετρου μάζας, η ακριβής μοριακή μάζα δίνεται είτε ως ακέραιος αριθμός είτε με δεκαδικά ψηφία. (Μαραγκού, 2010)

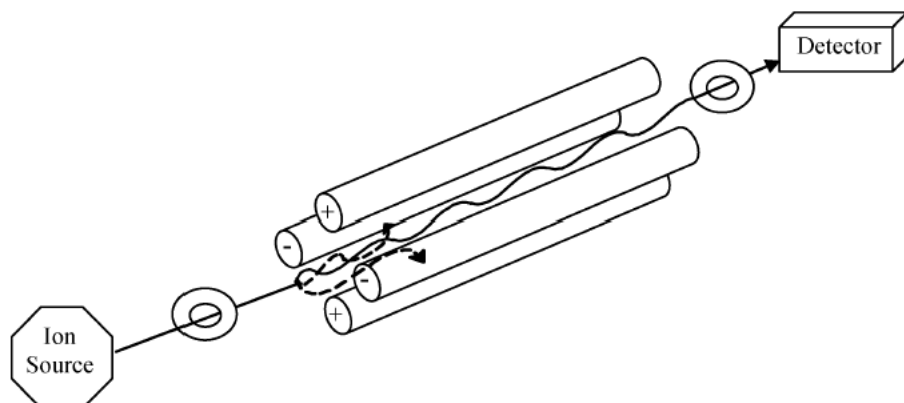
5.3 Αναλυτές Μάζας

Ένας αναλυτής μάζας είναι το μέρος του οργάνου στο οποίο διαχωρίζονται τα ιόντα με βάση τις τιμές m/z . Σε ένα φασματόμετρο μάζας, η απομόνωση ιόντων γίνεται συνήθως ηλεκτρικά, αν και οι παραδοσιακοί αναλυτές, δηλαδή οι μαγνητικού τομέα, χρησιμοποιούν ένα μαγνητικό πεδίο που επηρεάζει το διαχωρισμό των ιόντων. Από άποψη διαθέσιμων μεθοδολογιών υπάρχουν πολυάριθμα συστήματα που μπορούν να απομονώσουν ιόντα με βάση τις τιμές m/z . Επί του παρόντος χρησιμοποιούνται τέσσερις κύριοι αναλυτές:

1. το τετράπολο (quadrupole: Q)
2. η τετραπολική παγίδα ιόντων (quadrupole ion trap: QIT)
3. ο χρόνου πτήσης (Time of flight : ToF)
4. ο κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier transformation ion cyclotron resonance: FT-ICR)

Αυτοί οι αναλυτές ποικίλουν ως προς το μέγεθος, την τιμή, την ανάλυση, το εύρος μάζας και την ικανότητα εκτέλεσης πειραμάτων σε σειρά Tandem MS/MS. Αν και η

τετραπολική παγίδα ιόντων (QIT) είναι ικανή για πολλαπλά φασματομετρικά πειράματα μάζας (MS^n), ο αναλυτής FT-ICR είναι πολύ ισχυρός όσον αφορά τις ακριβείς μετρήσεις μάζας. (El-Aneed, Cohen and Banoub, 2009)

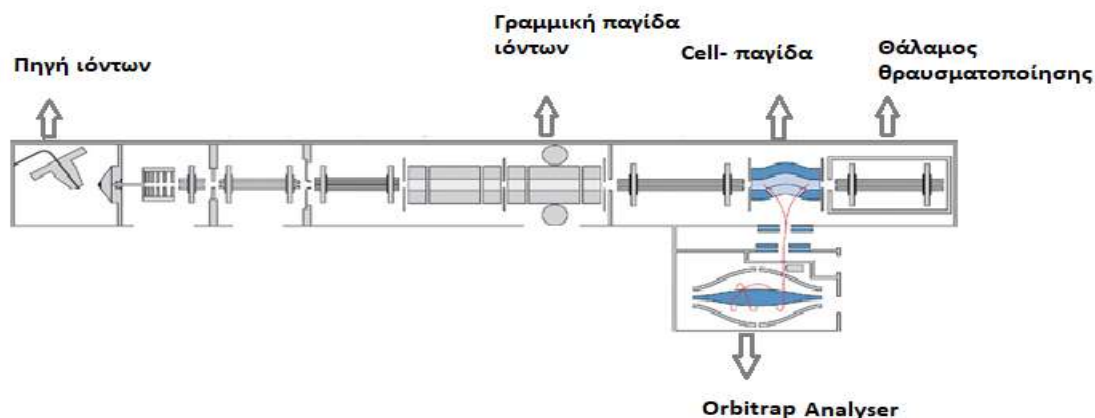


Εικόνα 16 Αναπαράσταση αναλυτή μάζας τετράπολου. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ηλεκτρικές ράβδους με μεταβαλλόμενο συνεχές ρεύμα και εναλλασσόμενο δυναμικό ραδιοσυχνότητων. Μόνο η τιμή ενός φορτίου m/z θα έχει τη «σωστή» τροχιά και θα επιβιώσει από τη διαδρομή για να φτάσει στον ανιχνευτή (συνεχόμενη γραμμή). Τα υπόλοιπα φορτία θα συγκρουστούν με ράβδους και θα εκτιναχθούν (διακεκομμένη γραμμή). (El-Aneed, Cohen and Banoub, 2009)

5.4 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS)

Ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS) (Liquid- Chromatography- High Resolution- Linear ion Trap- Quadrupole- Mass Spectrometry), αποτελεί έναν καινοτόμο αναλυτή μαζών, καθώς είναι ο πρώτος υψηλής απόδοσης που συνδυάζει τη **γραμμική και ηλεκτροστατική παγίδα ιόντων** που κατασκευάστηκε από τη Thermo Electron. Παράλληλα εισήγαγε στην αγορά των αναλυτών μαζών το σύστημα LTQ (linear ion trap quadrupole). Αποτελείται από δύο ειδικά, κεντρικά και εξωτερικά ηλεκτρόδια που είναι διαμορφωμένα με τέτοιο τρόπο, ώστε να υπηρετούν την λειτουργία του υβριδικού αναλυτή. Αυτό το υβριδικό σύστημα συνδυάζει τη **γραμμική παγίδα ιόντων LTQ με τον αναλυτή μαζών Orbitrap** και κατά τη λειτουργία του τα παραγόμενα ιόντα που βρίσκονται στην πηγή ιοντισμού παγιδεύονται στον αναλυτή μαζών LTQ και στην συνέχεια αναλύονται με μεθόδους σάρωσης όπως MS και MS^n .

Ο αναλυτής Orbitrap, ο οποίος είναι τροχιακής παγίδας ιόντων λειτουργεί με βάση τις αρχές της οργανολογίας των αναλυτών μάζας σύμφωνα με την παρακάτω (Εικόνα 12).



Εικόνα 17 Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή (Linear- ion Trap- Quadrupole) Orbitrap. (Olsen et al., 2009)

Ειδικότερα, ο αναλυτής μαζών Orbitrap αποτελείται από τμήματα τα οποία περιλαμβάνουν:

- διαφορικό σύστημα με τελικό κενό μικρότερο από 8×10^{-10} Torr
- πολυπολικούς φακούς μεταφοράς ιόντων σε υψηλό κενό
- κελί θραυσματοποίησης με άζωτο C-Trap
- ευθύγραμμο πολυπολικό κελί θραυσματοποιήσεων
- τροχιακή παγίδα
- σύστημα που ελέγχει με μεγάλη ακρίβεια την θερμοκρασία
- ενισχυτές χαμηλού θορύβου
- και μετατροπείς σήματος σε συνδυασμό με μετασχηματισμούς Fourier (Fourier Transformation, FT) για την απόκτηση τελικών φασμάτων μάζας (Kaklamanos, Aprea and Theodoridis, 2012), (Thermo Scientific, 2010)

5.5 Αναλυτής Orbitrap και Αρχή λειτουργίας

Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας του αναλυτή μαζών Orbitrap τα ιόντα που παράγονται στην πηγή υπόκεινται σε **τροχιακή παγίδευση**. Εισέρχονται στη γραμμική παγίδα ιόντων όπου και συσσωρεύονται. Στη συνέχεια, αρχίζουν να

επιταχύνονται και να εισέρχονται στη C- παγίδα ιόντων, όπου και παγιδεύονται με άμεση και απότομη άνοδο του δυναμικού στο κεντρικό ηλεκτρόδιο. Αμέσως μετά, συμπιέζονται δημιουργώντας ένα νέφος ιόντων και τελικώς εισέρχονται στον αναλυτή Orbitrap. Έπειτα τα συμμετρικά αξονικά ηλεκτρόδια του Orbitrap δημιουργούν ηλεκτροστατικό δυναμικό και τα εισερχόμενα ιόντα εκτελούν περιστροφική κίνηση γύρω από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο, καθώς ταυτόχρονα ταλαντώνονται κατά μήκος του οριζόντιου άξονα. Η ταλάντωση αυτή είναι αρμονική και τα ιόντα που ταλαντώνονται παράγουν περιοδικό σήμα στα εξωτερικά ηλεκτρόδια. Στη συνέχεια το σήμα αυτό ανιχνεύεται με ενισχυτή ως αποτυπώμενο ρεύμα (image current). Τέλος, τα σήματα του αποτυπωμένου ρεύματος δηλαδή τα ιόντα συγκεκριμένης μάζας μετατρέπονται σε φάσμα συχνοτήτων με τη βοήθεια του αλγόριθμου μετατροπής (Fourier FT algorithm). Λόγω του ότι η συχνότητα ταλάντωσης (ω) σχετίζεται άμεσα με το λόγο μάζας/φορτίου m/z , το φάσμα συχνοτήτων μετατρέπεται σε φάσμα μαζών σύμφωνα με την παρακάτω σχέση :

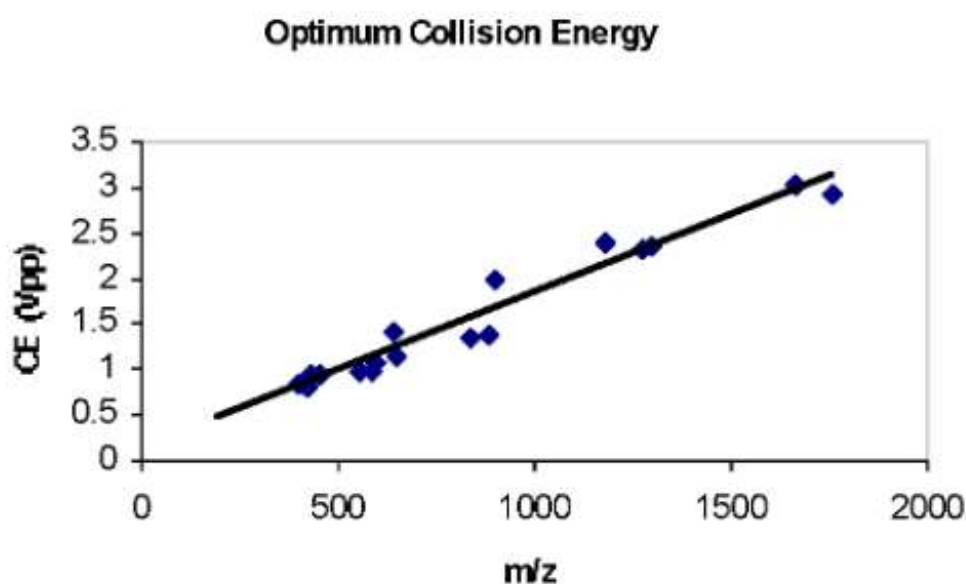
$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

Όπου ω είναι η συχνότητα ταλάντωσης, k η σταθερά του συστήματος και m/z ο λόγος μάζας προς φορτίο.

Τα ιόντα που έχουν διαφορετικό λόγο m/z θα διαφέρουν στην περιστροφική και την αξονική ταλάντωση με αποτέλεσμα να παράγουν διαφοροποιημένα σήματα στον ενισχυτή. Τελικά, ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας προκύπτει από τον υπολογισμό της συχνότητας της ταλάντωσης των ιόντων κάθε φορά. Η ανάλυση των μαζών μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Είτε με Fourier Transform (FT) mode, είτε με Mass Selective Instability (MSI) mode. Στην πρώτη περίπτωση γίνεται μέτρηση των συμφασικών ταλαντώσεων σε οριζόντια κατεύθυνση (image current detection), ενώ στην δεύτερη περίπτωση έχουμε έγχυση ιόντων τα οποία συλλέγονται πάνω σε έναν ανιχνευτή. (Thermo Scientific, 2010), (Donna, 2012)

5.6 Τεχνολογία Normalized Collision Energy™

Η διαδικασία διέγερσης συντονισμού χρησιμοποιείται για την πρόκληση θραυσματοποίησης σε μια παγίδα ιόντων. Καθώς αυξάνεται το πλάτος της εφαρμοζόμενης τάσης των ραδιοσυχνοτήτων RF, το μητρικό ιόν διασπάται σε ιόντα σε ένα μικρό εύρος ενεργειών. Η ενέργεια σύγκρουσης που απαιτείται για την επίτευξη της βέλτιστης απόδοσης θραυσματοποίησης έχει αποδειχθεί ότι ακολουθεί μια γραμμική συσχέτιση με m/z σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 12).



Εικόνα 18 Διάγραμμα γραμμικής συσχέτισης της ενέργειας σύγκρουσης CE και των φορτίων m/z .

Η περαιτέρω αύξηση του πλάτους δεν αλλάζει σημαντικά το μοτίβο της θραυσματοποίησης. Η ενέργεια σύγκρουσης ρυθμίζεται με βάση μία απλή κλίμακα 0-100%. Η αρχή της κανονικοποιημένης ενέργειας σύγκρουσης αντισταθμίζει αυτόματα αυτή τη μαζική εξάρτηση των φορτίων m/z με το ποσοστό της καταναλωμένης ενέργειας σύγκρουσης κάθε φορά. Χρησιμοποιώντας μια ρύθμιση 30% ενέργειας σύγκρουσης σε ένα ιόν με m/z 1800 εφαρμόζεται περισσότερη ενέργεια από ό,τι σε ένα ιόν με m/z 800.

Τα πειράματα Data Dependent™ εφαρμόζουν τη τεχνολογία της κανονικοποιημένης ενέργειας σύγκρουσης. Χρησιμοποιώντας συμβατικές μεθόδους, δεν γίνεται να επιλεγεί μία μόνο τιμή ενέργειας σύγκρουσης που θα παράγει καλά δεδομένα για

ενώσεις με πολύ διαφορετικές μάζες. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν αναλύουμε πρωτεΐνες, όπου τα πεπτίδια έχουν μάζες που κυμαίνονται από 200 Da έως και 2000 Da. Η Normalized Collision Energy διασφαλίζει ότι τα καλά δεδομένα της τεχνικής MSn συλλέγονται αυτόματα, ανεξάρτητα από τη μάζα της αναλυόμενης ουσίας. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα της κανονικοποιημένης ενέργειας σύγκρουσης είναι ότι στις σειρές οργάνων Thermo Scientific LTQ™ και LCQ™ που τη χρησιμοποιούν και λειτουργούν υπό το λογισμικό Xcalibur™ software αυτόματα βαθμονομείται για μια μεγάλη ποικιλία συστημάτων. Αυτό σημαίνει ότι ένα φάσμα MS/MS που λήφθηκε σε ένα όργανο LCQ χρησιμοποιώντας 30 % ενέργεια σύγκρουσης θα είναι ουσιαστικά ίδιο με το φάσμα MS/MS που λαμβάνεται από άλλο όργανο LCQ χρησιμοποιώντας 30 % ενέργεια σύγκρουσης. Για πρώτη φορά, τα φάσματα MSn παράγονται πλέον τόσο εύκολα όσο τα φάσματα κρούσης ηλεκτρονίων. (Scientific, 1800)

5.7 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της χρήσης του αναλυτικού οργάνου- Orbitrap

Στην φασματομετρία μάζας παίζουν σημαντικό ρόλο οι τεχνικές παγίδευσης ιόντων καθώς αποτελούν πολύτιμα εργαλεία της χημικής ανάλυσης. Ο αναλυτής Orbitrap παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα λόγω της αναλυτικής του απόδοσης. Παρουσιάζει υψηλή διακριτική ικανότητα, ακρίβεια μάζας, χωρητικότητα φορτίων και μεγάλο γραμμικό δυναμικό εύρος. Κατά την διάρκεια μιας και μόνο ανάλυσης, οι αναλυτές Orbitrap μπορούν να συνδυάσουν ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών με εξαιρετική αξιοπιστία. Κατά τη λειτουργία του οργάνου το δυναμικό εύρος μπορεί να είναι μεγαλύτερο από 4000 σε μία σάρωση. Επιπλέον, η διακριτική του ικανότητα είναι 60000-100000 σε (m/z 400) με ταχύτητα σάρωσης 1 Hz. Η ευαισθησία του οργάνου φτάνει σε επίπεδα fmol (όπου $\text{fmol}=10^{-15} \text{ mol}$) και το εύρος μάζας κυμαίνεται μεταξύ 50 και 2000 amu. Ο αναλυτής Orbitrap παρέχει τη δυνατότητα παράλληλης ανάλυσης MS και MS^n , όπου $n=1-10$, εφαρμόζοντας διάφορες τεχνικές διάσπασης, όπως για παράδειγμα CID (Collision- Induced Dissociation).

Οι αναλυτές μαζών έχουν διάφορα χαρακτηριστικά επίδοσης των οποίων οι τιμές ποικίλουν. Τα βασικά χαρακτηριστικά τους είναι :

- 1) η διακριτική ικανότητα (Resolving Power ή Resolution, R)
- 2) η ακρίβεια μάζας
- 3) η ταχύτητα ανάλυσης
- 4) η διαπερατότητα των ιόντων

Το σημαντικότερο από τα παραπάνω μεγέθη είναι η διακριτική ικανότητα η οποία ορίζεται ως:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

όπου: Δm είναι η διαφορά μαζών m_1 και m_2 μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών και m είναι η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής ή η μέση τιμή των δύο κορυφών του φάσματος.

Όταν οι δύο κορυφές έχουν παρόμοια ένταση τότε μπορούν να διαχωριστούν ικανοποιητικά εάν το ύψος της βασικής γραμμής μεταξύ τους είναι μικρότερο του 10 % του ύψους τους. Όταν δεν υπάρχει κορυφή με παρόμοια ένταση για να υπάρξει σύγκριση, τότε ως Δm εφαρμόζεται το εύρος του πλάτους στο μισό του μέγιστου ύψους κορυφής που ονομάζεται (Full Width Half Minimum, FWHM).

Ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap αποτελεί ένα σπουδαίο εργαλείο καθώς χρησιμοποιείται σε ερευνητικές δραστηριότητες για την ανάλυση και ταυτοποίηση μεταβολιτών, λιπιδίων καθώς και για τον έλεγχο doping. Λόγω της μεγάλης του ακρίβειας στον προσδιορισμό μαζών (< 5 ppm) και της μη καταστρεπτικής ανίχνευσης ιόντων κατέχει κυρίαρχο ρόλο και στην περιβαλλοντική ανάλυση. Η τεχνολογία Orbitrap παρέχει υψηλή ακρίβεια μάζας, μεγάλη διακριτική ικανότητα και συνολικά μεγάλη ευαισθησία στην ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων μιγμάτων σε προϊόντα τροφίμων και ζωοτροφών. Τέλος, η περιβαλλοντική ανάλυση αποτελεί μια ερευνητική δραστηριότητα που υλοποιείται σε μεγάλο βαθμό από τον αναλυτή Orbitrap λόγω των υψηλών απαιτήσεων της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας για παρακολούθηση των επιπέδων ρύπανσης στα υδάτινα οικοσυστήματα. Η μεγάλη

ευαισθησία της μεθόδου επιτρέπει την ανίχνευση υπολλειμμάτων ενώσεων ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα σε (ng g^{-1}).

Από την άλλη πλευρά, ένας αναλυτής Orbitrap αποτελεί ένα πολύ ακριβό όργανο ιδιαίτερα αν είναι υβριδικού τύπου. Η λειτουργία του είναι σχετικά πολύπλοκη σε σχέση με άλλες μεθόδους ανάλυσης. Επίσης, σε εφαρμογές Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) η σάρωση είναι σχετικά αργή και υπάρχει υψηλή απαίτηση κενού από το όργανο (10^{-8} Torr).

5.8 Φασματομετρία μάζας και τεχνικές ανάλυσης

Οι κύριες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται ευρέως στη φασματομετρία μάζας είναι τρεις και είναι οι ακόλουθες:

1. η τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan, FS)
2. η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM)
3. η φασματομετρία μάζας σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS).

Η τελευταία διακρίνεται σε άλλες περεταίρω υποκατηγορίες τεχνικών σάρωσης.

Η τεχνική πλήρους σάρωσης (FS)

Κατά την διάρκεια της τεχνικής πλήρους σάρωσης (FS) έχουμε την απόκτηση ενός ολοκληρωμένου φάσματος για κάθε αναλυόμενη ουσία (αναλύτη). Με κάθε πλήρη σάρωση η αναλυόμενη ουσία-ένωση σαρώνεται από την πρώτη τιμή m/z έως την τελευταία τιμή χωρίς διακοπή σε συγκεκριμένο και καθορισμένο χρόνο. Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους βοηθά στην ταυτοποίηση μίας ένωσης, ενώ μπορεί να γίνει ακόμα και σύγκριση του φάσματος αυτού με κάποιο πρότυπο φάσμα. Τα πειράματα πλήρους σάρωσης χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ή την επιβεβαίωση της ταυτότητας μιας άγνωστης ένωσης. Με την αύξηση του χρόνου σάρωσης επιτυγχάνουμε και αύξηση του αριθμού των ιόντων που φθάνουν στον ανιχνευτή με αποτέλεσμα να έχουμε αύξηση και στην ευαισθησία κατά τη μέτρηση. Επίσης, η αυξημένη ευαισθησία της μέτρησης μπορεί να γίνει επίσης και με μείωση

του εύρους σάρωσης των μαζών, όμως στην συγκεκριμένη περίπτωση υπάρχει κίνδυνος να χαθούν πληροφορίες. (Thermo Scientific, 2010)

Η τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM)

Η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης των ιόντων (Selected Ion Monitors), (SIM), επιλέγεται και προτιμάται όταν θέλουμε να παρακολουθήσουμε ένα συγκεκριμένο ιόν ή σύνολο ιόντων. Τα πειράματα SIM είναι χρήσιμα για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων μιας ένωσης-στόχου σε ένα σύνθετο μίγμα όταν γνωρίζουμε το φάσμα της μάζας της ένωσης-στόχου. Η τεχνική SIM, μπορεί να επιτύχει μεγαλύτερη ταχύτητα επειδή παρακολουθεί μόνο μερικά ιόντα ενδιαφέροντος, άρα και να μειώσει το χρόνο ανάλυσης. Από την άλλη πλευρά όμως, επειδή η τεχνική SIM παρακολουθεί μόνο συγκεκριμένα ιόντα, κάθε ένωση που θραυσματοποιείται και δίνει αυτά τα ιόντα μπορεί να συμπροσδιοριστεί με τα επιλεγμένα και να αποδώσει ψευδή αποτελέσματα, (false positive). (Thermo Scientific, 2010)

Η τεχνική φασματομετρίας μάζας σε σειρά (MS/MS)

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται περισσότερο από όλες τις άλλες τεχνικές φασματομετρίας μάζας. Είναι γνωστή ως MS/MS ή MSⁿ και περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια φασματομετρίας μάζας με θραυσματοποίηση που εμφανίζεται μεταξύ των σταδίων. Γενικά, στο πρώτο στάδιο επιλέγεται μια ενιαία μάζα ενδιαφέροντος το πρόδρομο ιόν (precursor ion), η οποία στη συνέχεια διέρχεται από μία περιοχή που προκαλεί θραυσματοποίηση στα παράγωγα ιόντα. Τα ιόντα θραυσματοποίησης στη συνέχεια διαχωρίζονται σύμφωνα με τα m/z τους με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα φάσμα MS/MS. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία οργάνων που χρησιμοποιούνται για πειράματα MS/MS. Όλα τα υβριδικά όργανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη δεδομένων και φασμάτων MS/MS. Οι παγίδες ιόντων είναι μακράν οι αναλυτές με το μεγαλύτερο δυναμικό για πειραματισμό MS. Ωστόσο, το όργανο που κυριαρχεί στο πεδίο της ποσοτικής ανάλυσης MS/MS είναι το τριπλό τετράπολο (QQQ) για το οποίο δίνεται παρακάτω μια σύντομη περιγραφή. Τα όργανα τριπλού τετραπόλου

(QQQ) συνδέονται είτε με αέρια χρωματογραφία είτε με υγρή χρωματογραφία για να παρέχουν μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνολογίες που έχουν γίνει πρότυπα εργαλεία ανάλυσης για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών-στόχων. Όταν το αναλυτικό όργανο βρίσκεται σε λειτουργία MS/MS, το πρώτο τετράπολο (Q_1) χρησιμοποιείται για την επιλογή ιόντων συγκεκριμένης μάζας που συγκρούονται με αέριο σύγκρουσης υψηλού δυναμικού ιονισμού (άζωτο ή αργό) σε υψηλή πίεση προκαλώντας θραυσματοποίηση στα πρόδρομα ιόντα στο δεύτερο τετράπολο (Q_2). Αυτή η διαδικασία ονομάζεται διάσπαση που προκαλείται από σύγκρουση (collision-induced dissociation), (CID) και το τετράπολο Q_2 χρησιμοποιείται ως χώρος θραύσης των ιονισμένων μορίων. Στη συνέχεια τα ιόντα που παράγονται αναλύονται από ένα τρίτο τετράπολο το Q_3 . Ο σχηματισμός των παραγόμενων ιόντων περιλαμβάνει διαφορετικούς τύπους ιονισμού, διασπάσεις-ανατάξεις υδρογόνου και μετατοπίσεις ηλεκτρονίων. Αυτή η εφαρμογή του οργάνου έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη χημική εξειδίκευση μειώνοντας τον χημικό θόρυβο στο φάσμα μάζας και καθιστώντας την ανάλυση συγκεκριμένη και ευαίσθητη. Στα πειράματα MS/MS έχουμε τρία είδη λειτουργίας σάρωσης : τη λειτουργία σάρωσης παραγόμενων ιόντων, την λειτουργία πρόδρομου ιόντος και τη λειτουργία ουδέτερου μορίου.

Στη λειτουργία σάρωσης παραγόμενων ιόντων τα επιλεγμένα πρόδρομα ιόντα στο τετράπολο Q_1 θραυσματοποιούνται στο τετράπολο Q_2 και τα παραγόμενα ιόντα σαρώνονται στο τετράπολο Q_3 . Ένα φάσμα μάζας παραγόμενων ιόντων δημιουργείται για κάθε επιλεγμένο πρόδρομο ιόν. Αυτή είναι και η λειτουργία σάρωσης που εφαρμόζεται συχνότερα στην ανάλυση MS/MS.

Στη λειτουργία σάρωσης πρόδρομου ιόντος, το τετράπολο Q_3 μετρά συγκεκριμένα παραγόμενα ιόντα (π.χ. m/z 80) και το τετράπολο Q_1 σαρώνει για πρόδρομες ουσίες αυτού του συγκεκριμένου παραγόμενου ιόντος.

Στη λειτουργία ουδέτερης απώλειας, τόσο το τετράπολο Q_1 όσο και το Q_3 σαρώνουν, αλλά το Q_3 σαρώνει με καθορισμένη μετατόπιση, παράγοντας έτσι ένα φάσμα ιόντων με ουδέτερη απώλεια μιας επιλεγμένης μάζας, π.χ. απώλεια 112 m/z . Αυτό είναι

χαρακτηριστικό μιας συγκεκριμένης ομάδας μορίων. Ως εκ τούτου, η λειτουργία της ουδέτερης απώλειας θα προσδιορίσει συγκεκριμένα αυτές τις ενώσεις.

Ανάλογα με τη λειτουργία σάρωσης μπορούν να ληφθούν διαφορετικές πληροφορίες, οι οποίες μπορεί να είναι υψηλής σημασίας για την έρευνα σε πολύπλοκες βιολογικές μήτρες, π.χ. για τον μεταβολισμό, τη δομή και την ανακάλυψη του μηχανισμού θραυσματοποίησης. Τα τριπλά τετράπολα είναι το βασικό εργαλείο ανάλυσης στα σύγχρονα αναλυτικά εργαστήρια. Αυτά είναι και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση από εκατοντάδες επαγγελματίες στις βιομηχανίες φαρμάκων, τροφίμων/ποτών και χημικών, καθώς και στον ποσοτικό προσδιορισμό σχεδόν όλων των οργανικών μορίων. Αν και όλα τα τριπλά τετράπολα μπορούν να κάνουν τα ίδια πράγματα, στην πραγματικότητα οι διαφορές στην ποιότητα κατασκευής οργάνων, τα συστήματα κενού και ανιχνευτών μπορούν να οδηγήσουν σε τεράστιες διαφορές στην ευαισθησία, αλλά και στη χρησιμότητα τους στα τελικά αποτελέσματα. Οι πωλητές των αναλυτικών οργάνων ισχυρίζονται ότι τα νεότερα όργανα αυξάνουν την ευαισθησία έως και 5 φορές περισσότερο και αυτό μπορεί να ισχύει για ορισμένους ενώσεις. Τα τριπλά τετράπολα τελευταίας γενιάς ή οι υβριδικές παγίδες Q (τριπλά τετράπολα- όπου το τελευταίο τετράπολο αντικαθίσταται από μια παγίδα ιόντων) μπορούν να πραγματοποιήσουν την τεχνική σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα, η οποία προσφέρει την υψηλότερη ευαισθησία και εξειδίκευση στη δυνατότητα αναγνώρισης, επιβεβαίωσης και του σωστού σχολιασμού της αναλυόμενης ουσίας. (Kaklamanos, Aprea and Theodoridis, 2012)

Τεχνική Collision-Induced Dissociation (CID) and Multiple-Stage MS (Διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση και MS πολλών σταδίων)

Οι τεχνικές που αναφέρθηκαν αποτελούν ήπιες και μαλακές τεχνικές. Παράγουν κυρίως:

- Μοριακά ιόντα M^+ ή M^-
- Πρωτονιωμένα μόρια $[M + H]^+$

- Απλά ιόντα προσθήκης $[M + Na]^+$
- Ιόντα που αντιπροσωπεύουν απλές απώλειες όπως η απώλεια ενός μορίου νερού $[M + H - H_2O]^+$

Η προκύπτουσα πληροφορία για το μοριακό βάρος είναι πολύ πολύτιμη, αλλά απαιτούνται συχνά συμπληρωματικές δομικές πληροφορίες. Για την απόκτηση δομικών πληροφοριών, τα ιόντα του αναλύτη θραυσματοποιούνται με σύγκρουση τους με ουδέτερα μόρια με μια διαδικασία γνωστή ως 'διάσπαση επαγόμενη από σύγκρουση' (Collision- Induced Dissociation: CID ή Collisionally Activated Dissociation: CAD). Τάσεις εφαρμόζονται στα ιόντα αναλύτη για να προστεθεί ενέργεια στις συγκρούσεις και να προκληθεί περαιτέρω θραυσματοποίηση.

CID σε ένα στάδιο MS

Η CID συχνά σχετίζεται με φασματόμετρα μάζας πολλαπλών σταδίων, όπου λαμβάνει χώρα μεταξύ κάθε σταδίου φιλτραρίσματος MS, αλλά η CID μπορεί επίσης να επιτευχθεί σε φασματόμετρα μάζας ενός σταδίου τετραπόλου ή χρόνου πτήσης. Σε φασματόμετρα μάζας ενός σταδίου, η CID λαμβάνει χώρα στην πηγή ιόντων και επομένως καλείται συχνά CID πηγής (source CID ή in-source CID). Τα πρόδρομα ιόντα αναλύτη επιταγχύνονται και συγκρούονται με υπολειμματικά ουδέτερα μόρια για να αποδώσουν θραύσματα που ονομάζονται προϊόντα ιόντα.

Το πλεονέκτημα της εκτέλεσης CID σε όργανα ενός σταδίου είναι η απλότητα και το σχετικά χαμηλό κόστος. Το μειονέκτημα είναι ότι όλα τα υπάρχοντα ιόντα θραυσματοποιούνται. Δεν υπάρχει τρόπος να επιλεγεί ένα συγκεκριμένο πρόδρομο ιόν, έτσι δεν υπάρχει τρόπος να προσδιοριστεί ποια ιόντα προήλθαν από ποια πρόδρομα ιόντα. Τα φάσματα που προκύπτουν μπορεί να περιλαμβάνουν κορυφές μάζας από ιόντα της μήτρας του υποστρώματος ή συγχωνευμένες ενώσεις καθώς και από τον αναλύτη που μας ενδιαφέρει. Αυτό το εμπόδιο μπορεί να είναι αποδεκτό όταν αναλύονται σχετικά καθαρά δείγματα, αλλά δεν δίνει καλά αποτελέσματα εάν οι χρωματογραφικές κορυφές δεν είναι καθοριστικές ή τα επίπεδα του υποστρώματος είναι υψηλά. (Thermo Scientific, 2010)

CID και πολλαπλά στάδια MS

Τα MS πολλαπλών σταδίων (που ονομάζεται επίσης διαδοχικό tandem MS ή MS/MS ή MSⁿ) είναι ένας ισχυρός τρόπος για να αποκτηθούν πληροφορίες για τη δομή. Σε όργανα τριπλού τετραπόλου ή τετραπόλου- τετραπόλου ή χρόνου- πτήσης, το πρώτο τετράπολο χρησιμοποιείται για την επιλογή του πρόδρομου ιόντος. Η CID λαμβάνει χώρα στο δεύτερο στάδιο (τετράπολο) το οποίο ονομάζεται κελί σύγκρουσης.

Το τρίτο στάδιο (τετράπολο ή Time of Flight) παράγει τότε ένα φάσμα των ιόντων που προκύπτουν. Μπορεί, επίσης να εκτελέσει SIM μόνο μερικών ιόντων προϊόντων κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων- στόχων.

Στα Ion Trap όλα τα ιόντα εξέρχονται από την παγίδα εκτός από το επιθυμητό πρόδρομο ιόν. Το πρόδρομο ιόν στη συνέχεια ενεργοποιείται και συγκρούεται για τη δημιουργία προϊόντων ιόντων. Τα προϊόντα ιόντα μπορούν να εξέλθουν για να δημιουργήσουν ένα φάσμα μάζας ή ένα συγκεκριμένο προϊόν ιόν μπορεί να διατηρηθεί και να συγκρουστεί για να ληφθούν άλλα προϊόντα ιόντα. Αυτή είναι μια ισχυρή τεχνική για την απόκτηση πληροφοριών για τη μάζα πεπτιδίων που σχετίζονται με την αλληλουχία αμινοξέων σε ένα πεπτίδιο.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της MS πολλαπλών σταδίων είναι η ικανότητα της να χρησιμοποιεί το πρώτο στάδιο της MS για να απορρίπτει ιόντα μη αναλυτών. Ο καθορισμός του δείγματος και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός καθίσταται πολύ λιγότερο χρήσιμοι. Με σχετικά καθαρά δείγματα είναι αρκετά συνηθισμένο να καταργηθεί συνολικά ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και να εγχυθούν δείγματα απ' ευθείας στο φασματόμετρο μάζας για να ληφθούν φάσματα μάζας προϊόντων για χαρακτηρισμό ή επιβεβαίωση. (Thermo Scientific, 2010)

Τεχνική σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα (data dependent)

Η τεχνική σάρωσης “data dependent” (ddMS) ονομάζεται έτσι και χρησιμοποιείται από την εταιρεία Thermo Fisher. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή το TSQ (Thermo Scientific Quantum), το φασματόμετρο μάζας TSQ χρησιμοποιεί τις πληροφορίες σε ένα πείραμα λειτουργίας σάρωσης που εξαρτάται από δεδομένα για τη λήψη

αυτόματων αποφάσεων σχετικά με το επόμενο βήμα του πειράματος χωρίς τη συμβολή περεταίρω πληροφοριών από το χρήστη. Στη λειτουργία σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα, καθορίζονται κριτήρια για να επιλεγεί ένα ή περισσότερα ιόντα ενδιαφέροντος τα οποία θα υποστούν επακόλουθες σαρώσεις, όπως MS/MS. Κατά την τεχνική αυτή, η ανάλυση περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο σαρώσεις εκ των οποίων η δεύτερη είναι η εξαρτώμενη σάρωση με βάση την πρώτη. Η εξαρτώμενη σάρωση χρησιμοποιεί ιόντα- στόχους από την πρώτη, η οποία μπορεί να είναι είτε Full Scan ή SIM .

Η ρύθμιση των παραμέτρων της τεχνικής ddMS μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

- Εάν είναι γνωστό το πρόδρομο ιόν ή αναμένεται μία συγκεκριμένη ομάδα πρόδρομων ιόντων, μπορεί να δημιουργηθεί από τον χρήστη ένας κατάλογος με πιθανά πρόδρομα ιόντα. Στη συνέχεια, όταν ένα από τα πρόδρομα ιόντα ανιχνεύεται κατά την πρώτη σάρωση τότε μπορεί να αποκτηθεί το αντίστοιχο φάσμα των προϊόντων- ιόντων και να αναλυθεί. Επίσης, υπάρχει δυνατότητα να δημιουργηθεί και ένας κατάλογος ιόντων που είναι μη επιθυμητά για θραυσματοποίηση.
- Εάν υπάρχουν λίγες πληροφορίες για την μελετώμενη ένωση, μπορούν να οριστούν οι παράμετροι του ddMS πειράματος έτσι ώστε αν ανιχνευθεί ιόν με ένταση σήματος πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο, τότε το σύστημα TSQ θα καταγράψει αυτόματα το φάσμα προϊόντων-ιόντων. Επειδή μια σάρωση εξαρτώμενης από δεδομένα χρειάζεται να χρησιμοποιήσει ένα ιόν-στόχο από μία προηγούμενη σάρωση, η πρώτη σάρωση δεν μπορεί να είναι ddMS. Από τα φάσματα των παραγόμενων ιόντων (προϊόντων) μπορούν να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες για το πρόδρομο ιόν. (Thermo Scientific, 2010)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

Φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις

6.1 Φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις ή αλλιώς pesticides είναι χημικές ουσίες που έχουν σκοπό την μείωση, την καταστροφή ή την πρόληψη παρασίτων που προσβάλλουν τις καλλιέργειες και μειώνουν την απόδοση τους.

Σύμφωνα με τον Αμερικανικό Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος (U.S. Environmental Protection Agency, USEPA) ως φυτοφάρμακο ορίζεται οποιαδήποτε ουσία ή μίγμα ουσιών για την καταστροφή, μείωση, απώθηση ή πρόληψη των παρασίτων. Επίσης, σύμφωνα με τον Αγγλικό Οργανισμό (Food and Environmental Protection Act, FEPA) ως φυτοφάρμακο ορίζεται οποιαδήποτε ουσία, παρασκεύασμα ή οργανισμός που χρησιμοποιείται για την παρουσία των φυτών, των ξύλων ή άλλων φυτικών προϊόντων από επιβλαβείς οργανισμούς ή για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών. Τέλος, σύμφωνα με το θεσμό της Ευρωπαϊκής ένωσης τα φυτοφάρμακα χωρίζονται σε φυτοπροστατευτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην γεωργία σε καλλιέργειες και σε βιοκτόνα. Τα βιοκτόνα με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ανεπιθύμητων οργανισμών οι οποίοι είναι επιβλαβείς για την υγεία των ανθρώπων ή των ζώων ή για το περιβάλλον ή προκαλούν ζημιές στις ανθρώπινες δραστηριότητες. Οι επιβλαβείς οργανισμοί μπορεί να είναι παράσιτα όπως έντομα, αρουραίοι ή ποντίκια και μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, ιοί ή μύκητες. (https://ec.europa.eu/health/biocides/overview_el)

6.2 Κατηγορίες Φυτοπροστατευτικών Ενώσεων

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις ανάλογα με τη δραστικότητα τους ως προς την καταπολέμηση των παρασίτων- στόχων κατηγοριοποιούνται σε ομάδες.

Αρχικά, η κατηγορία των **ζιζανιοκτόνων** (herbicides) περιλαμβάνει τα σκευάσματα που καταπολεμούν ζιζάνια ή άλλα φυτά που αναπτύσσονται σε μη επιθυμητά μέρη όπως για παράδειγμα το Irgarol.

Τα **εντομοκτόνα** (insecticides), είναι τα σκευάσματα που καταπολεμούν έντομα και αρθρόποδα και εφαρμόζονται στο χώμα είτε στην εναέρια περιοχή του φυτού, όπως για παράδειγμα τα φυτοφάρμακα Azamethiphos, Deltamethrin, Pyrimiphos methyl, Malathion, Tebufenozide, Chlorpirifos methyl, Cypermethrin και Tebufenozide.

Τα **μυκητοκτόνα** (Fungicides) που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ασθενειών που οφείλονται σε μύκητες, όπως το Boscalid, το Ethoxystrobin και το Azoxystrobin.

Τα **ακαρεοκτόνα** (acaricides) που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ακάρεων όπως το Abamectin.

Επίσης, άλλων ειδών τα νηματοδοκτόνα (nematicides), τα βακτηριοκτόνα (bactericides), τα μαλακιοκτόνα (molluscicides), φερομόνες (pheromones), οι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών (plant growth regulators), οι απωθητικές ουσίες (repellents) και τα τρωκτικοκτόνα (rodenticides).

6.3 Νομοθετικό πλαίσιο για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες η χρήση, η εφαρμογή και η αγορά φυτοφαρμάκων ελέγχεται αυστηρά από κανονισμούς λόγω των δυσμενών επιπτώσεων στο περιβάλλον και στον άνθρωπο.

Σύμφωνα με την οδηγία 2000/60/EK, τέθηκαν τα νομικά όρια για τις παραμέτρους της ποιότητας των υδάτων από την Ε.Ε. Η οδηγία αυτή είναι γνωστή και ως οδηγία πλαίσιο για τα νερά και θέσπισε τις διάφορες παραμέτρους του νερού που χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση, ώστε να προστατευθεί η ανθρώπινη υγεία (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 200AD). Επίσης, σύμφωνα με την οδηγία 98/83/EK της ποιότητας των υδάτων θεσπίστηκε ο γενικός κανόνας που θέτει ως όριο την τιμή 0,1 mg/L για μεμονωμένα φυτοφάρμακα και όταν πρόκειται για το άθροισμα των ανιχνευμένων φυτοφαρμάκων η τιμή αυτή ορίζεται στα 0,5 mg/L. (Ευρωπαϊκή

Επιτροπή, 1998). Η συγκεκριμένη οδηγία στη συνέχεια τροποποιήθηκε από την 2013/39/EK (Council, 2020) που θέτει τα όρια για 45 διαφορετικές ενώσεις παρασιτοκτόνων σε υδάτινα σώματα, επιφανειακά, μεταβατικά παράκτια και υπόγεια ύδατα. (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 200AD), (Council, 2020), (Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο and Ευρωπαϊκό Συμβούλιο, 2008). Ανάμεσα σε αυτές τις ενώσεις είναι και φυτοφάρμακα cybutryne (irgarol 1051) 0,016 mg/L και Cypermethrin 6×10^{-5} mg/L.

6.4 Φαρμακευτικές ενώσεις

Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία 2001/83/EK για τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση, φάρμακο ορίζεται η κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που εμφανίζεται να έχει θεραπευτικές ή προφυλακτικές ιδιότητες για τις ασθένειες ανθρώπων (Etqhra *et al.*, 2001).

Για την κατηγοριοποίηση και ταξινόμηση των φαρμάκων χρησιμοποιείται το Ατομικό, Θεραπευτικό και Χημικό σύστημα ταξινόμησης (Anatomic, Therapeutic, Chemical classification system, ATC), το οποίο ελέγχεται από το Collaborating Centre for Drugs Statistics Methodology (WHOC) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και εκδόθηκε το 1976. Το σύστημα ATC ταξινομεί τα συστατικά των φαρμάκων σύμφωνα με το όργανο ή το σύστημα στο οποίο επιδρούν και τις θεραπευτικές, φαρμακολογικές και χημικές ιδιότητές τους. Οι κύριες ομάδες των φαρμάκων σύμφωνα με το ATC σε πρώτο επίπεδο δείχνουν την ανατομική κύρια ομάδα και αποτελούνται από ένα γράμμα. Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας των ανατομικών ομάδων :

A	Πεπτική οδός και μεταβολισμός
B	Αίμα και αιματοποιητικά όργανα
C	Καρδιαγγειακό σύστημα
D	Δερματολογικά
G	Ουρογεννητικό σύστημα και γεννητικές ορμόνες
H	Συστηματικές ορμόνες, εξαιρουμένων των γεννητικών ορμονών και ινσουλινών
J	Κατά των λοιμώξεων για συστηματική χρήση
L	Αντινεοπλασματικοί και ανοσορρυθμιστικοί παράγοντες
M	Μυοσκελετικό σύστημα
N	Νευρικό σύστημα

P	Αντιπαρασιτικά, εντομοκτόνα και εντομοαπωθητικά
R	Αναπνευστικό σύστημα
S	Αισθητήρια όργανα
V	Διάφορα

6.5 Νομοθετικό πλαίσιο για τις φαρμακευτικές ενώσεις

Τα τελευταία χρόνια λόγω της ύπαρξης υπολειμμάτων φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον καθιερώθηκε συγκεκριμένη νομοθεσία για την προστασία των υδάτινων και των χερσαίων οικοσυστημάτων. Οι οδηγίες 2001/82/ΕΚ, (ΟΔΗΓΙΑ 2001/82/ΕΚ, 2012) και 2001/83 , (Etqxra *et al.*, 2001) αφορούν τα κτηνιατρικά φάρμακα και τα φάρμακα προς ανθρώπινη χρήση αντίστοιχα όπου προβλέπεται οι προϋποθέσεις για την έγκριση της κυκλοφορίας τους. Για να εγκριθεί η κυκλοφορία ενός φαρμακευτικού προϊόντος θα πρέπει να υπάρχουν οι αντίστοιχοι έλεγχοι εκτίμησης περιβαλλοντικής επικινδυνότητας (Environmental Risk Assessment, ERA) σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες. Με αυτόν τον τρόπο οι αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις από τα φαρμακευτικά προϊόντα ελέγχονται.

Μέχρι σήμερα έχουν θεσπιστεί ανώτατα όρια κατάλοιπων φαρμακευτικών ενώσεων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης σύμφωνα με τον κανονισμό 470/2009 ,(Κανονισμός 470/2009, 2009), αλλά δεν έχουν θεσπιστεί ακόμα αντίστοιχα όρια στο περιβάλλον. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA), όταν η προβλεπόμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας ενός φαρμάκου είναι υψηλότερη από 1 µg/L, τότε η εκτίμηση της περιβαλλοντικής επικινδυνότητας είναι προαπαιτούμενη για την έγκριση αυτού του φαρμάκου. Αυτή είναι η οδηγία που έχει εκδοθεί από τον οργανισμό FDA για τα φάρμακα που προορίζονται για κατανάλωση από τους ίδιους τους ανθρώπους.

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°

Επιλογή χημικών ενώσεων

1.1 Επιλογή φυτοπροστατευτικών ενώσεων

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που επιλέχθηκαν για μελέτη στη παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έγινε με βάση τη συχνότητα της εφαρμογής τους στην γεωργία αλλά και τη δυνατότητα τους να καταλήξουν στο θαλάσσιο οικοσύστημα λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους. Οι ενώσεις αυτές, επίσης, περιλαμβάνονται σε διεθνείς λίστες ενώσεων προτεραιότητας, όπως η λίστα παρακολούθησης watch list EU 2015/495, (Cortes *et al.*, 2020). Καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δράσης στην Ελλάδα και την Ευρώπη και από τις επιλεγμένες ενώσεις στο σύνολο 13, 8 δρουν ως εντομοκτόνα, 3 ως μυκητοκτόνα, 1 ως ακαρεοκτόνο και 1 ως ζιζανιοκτόνο και βιοκτόνο. Οι ενώσεις αυτές είναι το irgarol, το Azamethiphos, το Deltamethrin, το Azoxystrobin, το Boscalid, το Ethoxystrobin, Pyrimiphos_methyl, το Malathion, το Tebufenozide, το Chlorpirifos_methyl, το Abamectin, το Cypermethrin, και το Teflubenzuron. Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που επιλέχθηκαν με τις αντίστοιχες φυσικοχημικές ιδιότητες τους.

Ένωση	Μοριακός Τύπος	Μοριακό Βάρος(g/mol)	logK _{ow}	Melting point (°C)	Solubility in water (mg/L) at 20 °C	Precursor Adduct
Irgarol	C ₁₁ H ₁₉ N ₅ S	253,367	3,95 ή 2,8	128-133	7	[M+H] ⁺
Azamethiphos	C ₉ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ PS	324,678	1,05	89	1100	[M+H] ⁺

Deltamethrin	C ₂₂ H ₁₉ BrNO ₃	505,199	6,2	98-101	<0,002	[M+Na] ⁺
Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,388	2,5 at 20 °C	116	6	[M+H] ⁺
Boscalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343,207	2,96	142,8- 143,8	4,6 at 2 °C	[M+H] ⁺
Ethoxyquin	C ₁₄ H ₁₉ NO	217,307	4,105	0	17,46 at 25° C	[M+H] ⁺
Pirimiphos methyl	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,334	4,12	15	5 at 30° C	[M+H] ⁺
Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,358	2,36	2,8	143	[M+H] ⁺
Tebufenozide	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	352,470	4,25	191	0,83 at 25 °C	[M+H] ⁺
Chlorpyrifos methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	322,033	4,31	43	4 at 25 °C	[M+H] ⁺
Abamectin	C ₄₈ O ₇₂ O ₁₄	873,0769	4,4	157-162	0,020	[M+H] ⁺
Cypermethrin	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416,297	6,6/6,3	60-80	4x10 ⁻³	[M+Na] ⁺
Teflubenzuron	C ₁₄ H ₆ Cl ₁₂ F ₄ NSO ₂	381,109	4,56	222,5	0,01	[M+H] ⁺

1.2 Ζιζανιοκτόνα

Οι υδατοκαλλιέργειες όπως για παράδειγμα οι ιχθυοτροφικές μονάδες δομούνται κυρίως σε κλειστές περιοχές όπου υπάρχει συσσώρευση των περιττωμάτων, των υπολειμμάτων τροφών και των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται λόγω της δραστηριότητά τους. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να προκληθεί η μεγάλη αύξηση των πλαγκτονικών οργανισμών στις υδατοκαλλιέργειες που στην προκειμένη περίπτωση είναι ανεπιθύμητοι, διότι αποσπούν μεγάλα ποσοστά διαλυμένου οξυγόνου και θρεπτικών αλάτων δυσκολεύοντας την εκτροφή των επιλεγμένων ειδών. Η επιλογή και χρήση των ζιζανιοκτόνων οδηγεί στην αναστολή της παραγωγής της χλωροφύλλης των φυτικών οργανισμών και επομένως στην καταστροφή τους (Zohdi and Abbaspour, 2019). Στην κατηγορία των ζιζανιοκτόνων ανήκει και η χημική ένωση Irgarol.

Irgarol: Το Irgarol ή αλλιώς (Cybutryne) με μοριακό τύπο $C_{11}H_{19}N_5S$ είναι ένα πολύ αποτελεσματικό ζιζανιοκτόνο που εμποδίζει τη φωτοσύνθεση των φυτών. Λόγω των επιβλαβών επιπτώσεων του, η χρήση του ως αντιρρυπαντικό συστατικό βαφής σε πλοία περιορίστηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο, τη Σουηδία, τη Δανία και τη Γαλλία. (Saleh, Sheijooni Fumani and Molaei, 2014) . Χρησιμοποιείται κυρίως ως ενεργό συστατικό σε αντιρρυπαντικές επικαλύψεις για την κατασκευή οικιακών μεταλλικών σκευών και για υποβρύχιες κατασκευές.

Από τη δεκαετία του 1980, το Irgarol χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο ως υποκατάστατο του αντιρρυπαντικού δραστικού συστατικού Tributyl tin (TBT) που απαγορεύεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2003. Μέχρι το 2011 επιτρεπόταν επίσης η χρήση του Irgarol ως αλγοκτόνο για επικαλύψεις εξωτερικών προσόψεων. Από το 2004, η γερμανική Umweltbundesamt (Ομοσπονδιακή Υπηρεσία Περιβάλλοντος) έχει πραγματοποιήσει εκτενείς μελέτες στο δοκιμαστικό της εργοστάσιο τεχνητών ρεμάτων και λιμνών και έχει αναλύσει δείγματα νερού σε εθνικό επίπεδο για τον εντοπισμό του Irgarol. Αυτά τα αποτελέσματα συντέλεσαν στην εξαγωγή των προτύπων ποιότητας περιβάλλοντος (EQS) για το Irgarol και στην αξιολόγηση κινδύνου του ευρωπαϊκού κανονισμού για τα βιοκτόνα 528/2012.

Το Irgarol είναι ανθεκτικό στα υδάτινα οικοσυστήματα, τοξικό για τα φύκια και τα υποβρύχια φυτά και τοξικό για την αναπαραγωγή για τα νεροσαλιγκάρια. (<https://www.umweltprobenbank.de/en/documents/profiles/analytes/21823>)

Στις 28 Απριλίου του 2021, η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (Environmental Protection Agency), (EPA) εξέδωσε ένα δελτίο τύπου ανακοινώνοντας την προσωρινή απόφασή της για το irgarol (cybutryne), που οριστικοποιεί την ακύρωση της χρήσης του ως ενεργό συστατικό στην αντιρρυπαντική βαφή. Η EPA κατέληξε σε αυτήν την απόφαση αφού ολοκλήρωσε την αξιολόγηση οικολογικού κινδύνου και καθόρισε ότι το irgarol είναι τοξικό τόσο για τα γλυκά νερά όσο και για τα θαλάσσια φυτά.

Η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA) είχε εκδώσει την προσωρινή της απόφαση για επανεξέταση της καταχώρισης (PID) για το Irgarol (Cybutryne), στις 23 Οκτωβρίου 2020. Ο ομοσπονδιακός νόμος περί εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και τρωκτικοκτόνων (FIFRA), απαιτεί από την EPA να επανεξετάζει περιοδικά τα φυτοφάρμακα για να διασφαλίζει ότι τα καινούρια δεδομένα της επιστήμης εφαρμόζονται.

Η προσωρινή απόφαση της EPA φαίνεται να είναι συνεπής με τα βήματα που έχει κάνει ο Διεθνής Ναυτιλιακός Οργανισμός (IMO) για την απαγόρευση της χρήσης του cybutryne στις αντιρρυπαντικές βαφές. Αυτή η διεθνής συνθήκη, απαγορεύει τη χρήση ορισμένων ουσιών σε αντιρρυπαντικά χρώματα και άλλα αντιρρυπαντικά συστήματα που θεωρούνται επιβλαβή για το θαλάσσιο περιβάλλον. Σε ορισμένες χώρες, συμπεριλαμβανομένου του Ηνωμένου Βασιλείου, έχει ήδη απαγορευτεί η χρήση του irgarol σε θαλάσσιες επικαλύψεις που χρησιμοποιούνται σε σκάφη.

(<https://www.paint.org/epa-cybutryne-interim/>)

1.3 Εντομοκτόνα

Τα εντομοκτόνα όπως έχει ήδη αναφερθεί χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ανεπιθύμητων εντόμων και αρθροπόδων και εφαρμόζονται στην εναέρια περιοχή των φυτών και στο χώμα όπως το Azamethiphos, το Pyrimiphos_methyl, το Malathion, το Tebufenozide, το Chlorpyrifos_methyl, το Cypermethrin και το Teflubenzuron.

Azamethiphos: Το Azamethiphos είναι ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται ως αντιπαρασιτικός παράγοντας για κτηνιατρική χρήση. Χορηγείται μέσω της τροφής στις ιχθυοκαλλιέργειες για τη καταπολέμηση παρασίτων του ατλαντικού σολομού. Είναι πολύ διαλυτό στο νερό, πτητικό και δεν αναμένεται να εκπλυθεί στα υπόγεια ύδατα. Είναι μέτρια τοξικό για τα θηλαστικά και δεν αναμένεται να βιοσυσσωρευτεί. Είναι μεταλλαξιογόνο, νευροτοξικό και αναστολέας του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός νευρομυϊκού μεταβιβαστή στα αρθρώποδα και τα σπονδυλωτά. Επίσης, είναι εντομοκτόνο οικιακής χρήσης για τον έλεγχο μυγών και εντόμων. Το Azamethiphos είναι πολύ τοξικό για τα πουλιά, τα υδρόβια ασπόνδυλα και μετρίως τοξικό για τα ψάρια.

<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/48.htm>

Deltamethrin: ο Deltamethrin είναι ένα εντομοκτόνο που ανήκει στην οικογένεια των πυρεθροειδών. Τα πυρεθροειδή είναι συνθετικές εκδοχές των πυρεθρινών, φυσικών εντομοκτόνων από άνθη χρυσάνθεμων. Το Deltamethrin χρησιμοποιείται σε εξωτερικούς χώρους για τη καταπολέμηση του δάκου της ελιάς και εντόμων σε οπωροκηπευτικά και καλλωπιστικά φυτά, δρώντας στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Η εκτεταμένη χρήση του οφείλεται στο ότι τα συνθετικά πυρεθροειδή παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα ως προς τον άνθρωπο και τα θηλαστικά. Το Deltamethrin είχε άδεια χρήσης μέχρι και τον Οκτώβριο του 2018, (Agency, 2014) καθώς έπειτα απαγορεύτηκε από τη Ευρωπαϊκή ένωση.

<http://npic.orst.edu/factsheets/DeltaGen.html>

Pirimiphos_methyl: Το εντομοκτόνο Pirimiphos_methyl ανήκει στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και έχει περιορισμένη χρήση για τον έλεγχο παρασίτων σε αποθηκευμένα προϊόντα όπως δημητριακά και καλαμπόκι. Δεν ενδείκνυται για οικιακή χρήση. Αν και θεωρείται μέτρια έως πολύ τοξικό σε πτηνά, ψάρια και υδρόβια ασπόνδυλα, η εμφάνιση αυτής της τοξικότητας μετριάζεται από την ταχεία αποικοδόμησή του και τη χρήση του σε κλειστά συστήματα αποθήκευσης. Το Pirimiphos_methyl δεν θεωρείται μεταλλαξιογόνο ή τερατογόνο.

https://www.cdc.gov/biomonitoring/Pirimiphos-methyl_BiomonitoringSummary.html

Malathion: Το μαλαθείο είναι ένα εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται για τη θανάτωση εντόμων σε καλλιέργειες και κήπους, για την απομάκρυνση των ψειρών

στους ανθρώπους και για τη θεραπεία ψύλλων σε κατοικίδια ζώα. Το μαλαθείο χρησιμοποιείται, επίσης, για να σκοτώσει τα κουνούπια και τις μεσογειακές μύγες σε φρούτα σε μεγάλους εξωτερικούς χώρους. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malathion>

Tebufenozide: Το Tebufenozide είναι ένα εντομοκτόνο που δρα ως ορμόνη τήξης στις προνύμφες (νεανική μορφή που πολλά ζώα υποβάλλονται πριν τη μεταμόρφωσή τους σε ενήλικες). Χρησιμοποιείται κυρίως κατά των παρασίτων της κάμπιας. Λόγω της υψηλής επιλεκτικότητας του σε στοχευμένα παράσιτα και χαμηλή τοξικότητα η εταιρία που το ανακάλυψε Rohm και Haas έλαβε το βραβείο Presidential Green Chemistry Award. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί ως ρυθμιστής της ανάπτυξης των εντόμων, για τον έλεγχο των φυλλοφάγων εντόμων που προκαλούν ζημιά ή θάνατο στα δέντρα.

Chlorpyrifos_methyl: είναι φυτοφάρμακο με χλωριωμένο οργανοφωσφορικό εστέρα (εντομοκτόνο), από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα στην Ευρώπη. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των παρασίτων- εντόμων σε μια σειρά από καλλιέργειες και σε αποθηκευμένα δημητριακά και άδειες αποθήκες. Υπολείμματα του Chlorpyrifos_methyl υπάρχουν συχνά σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και γαλακτοκομικά προϊόντα, καθώς και στο πόσιμο νερό. <https://www.greenfacts.org/en/chlorpyrifos-pesticide/l-2/index.htm>

Cypermethrin: ένα συνθετικό πυρεθροειδές εντομοκτόνο που χρησιμοποιείται σε μεγάλης κλίμακας εμπορικές γεωργικές εφαρμογές καθώς και σε καταναλωτικά προϊόντα για οικιακούς σκοπούς. Συμπεριφέρεται ως νευροτοξίνη ταχείας δράσης στα έντομα. Αποδομείται εύκολα στο έδαφος και στα φυτά, αλλά μπορεί να είναι αποτελεσματικό για εβδομάδες όταν εφαρμόζεται σε εσωτερικές αδρανείς επιφάνειες. Η έκθεσή του στο ηλιακό φως, το νερό και το οξυγόνο επιταχύνει την αποσύνθεσή του. Το Cypermethrin είναι εξαιρετικά τοξικό για τα ψάρια, τις μέλισσες και τα υδρόβια έντομα σύμφωνα με το National Pesticides Telecommunications Network (NPTN). Βρίσκεται σε πολλά οικιακά σκευάσματα κατά των μυρμηγκιών και κατσαρίδων όπως το Raid, και σε ορισμένα προϊόντα του Baygon στη Νοτιοανατολική Ασία.

Teflubenzuron: ταξινομείται ως εντομοκτόνο και βιοκτόνο και χρησιμοποιείται στη θεραπεία προσβολής από θαλάσσιες ψείρες σε σολομό. Επίσης, το teflubenzuron είναι ένας αναστολέας σύνθεσης της χιτίνης (πολυσακχαρίτης) που χρησιμοποιείται και ως βιοκτόνο. Βραχυπρόθεσμες δοκιμές τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης σε αρουραίους και ποντίκια αποκάλυψαν ότι το κύριο όργανο-στόχος για την τοξική επίδραση του teflubenzuron είναι το ήπαρ.(EMEA, 1997)

1.4 Μυκητοκτόνα

Azoxystrobin: Το Azoxystrobin είναι ένα νέο μυκητοκτόνο με νέο βιοχημικό τρόπο δράσης. Έχει υποβληθεί σε επεξεργασία ως φυτοφάρμακο μειωμένου κινδύνου για χρήσεις χλοοτάπητα. Το Azoxystrobin είναι ένα συστηματικό μυκητοκτόνο ευρέος φάσματος που πρωτοπαρουσιάστηκε το 1998. Αναστέλλει τη βλάστηση των σπορίων και χρησιμοποιείται σε αμπέλια, δημητριακά, πατάτες, μήλα, μπανάνες, εσπεριδοειδή, ντομάτες και άλλες καλλιέργειες. Οι μεγαλύτερες χρήσεις καλλιέργειας στην Καλιφόρνια είναι τα αμύγδαλα, το ρύζι, τα φιστίκια, τα οиноποιήσιμα σταφύλια, οι σταφίδες και το σκόρδο. Ανάμεσα στις ασθένειες που καταπολεμά είναι ο περονόσπορος και η ψώρα της μηλιάς.

Boscalid: Το Boscalid είναι ένα ευρέως φάσματος καρβοξιμιδικό μυκητοκτόνο. Έχει χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και δεν είναι πτητικό. Μπορεί να είναι πολύ ανθεκτικό τόσο στο έδαφος όσο και στο υδάτινο σύστημα ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες. Υπάρχει κίνδυνος έκπλυσης στα υπόγεια ύδατα. Είναι μέτρια τοξικό για την πλειονότητα της πανίδας και της χλωρίδας, αν και ο κίνδυνος τοξικότητας είναι χαμηλός για τις μέλισσες. Το Boscalid έχει χαμηλή τοξικότητα για τα θηλαστικά αν προσληφθεί από το στόμα. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/86.htm>

Ethoxystrobin: Το Ethoxystrobin είναι ένα νέο προϊόν διαχείρισης φυτικών ασθενειών που βασίζεται στο φυσικό αντιβιοτικό stobiluron A. Έχει πολύ υψηλή αντιβακτηριδιακή δράση για την ασφάλεια των καλλιεργειών και του περιβάλλοντος, και είναι ένα νέο βακτηριοκτόνο- πρότυπο που καθιερώνεται σταδιακά σε όλο τον κόσμο. Είναι πολύ αποτελεσματικό έναντι ασθενειών που είναι ανθεκτικές σε άλλα μυκητοκτόνα. Έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από τα συμβατικά μυκητοκτόνα. Είναι

εξαιρετικά επιλεκτικό, ασφαλές για καλλιέργειες, ανθρώπους και ζώα και δεν ρυπαίνει το περιβάλλον. Η αιθοξυστροβίνη μπορεί να αναστείλει την εισβολή παθογόνων σπορίων, έχει καλή προστατευτική δράση και ελέγχει ολοκληρωμένα και αποτελεσματικά διάφορες μυκητιάσεις φυτών όπως λαχανικά, οπωροφόρα δέντρα, λουλούδια κ.λπ. <https://patents.google.com/patent/WO2015007176A1/en>

1.5 Ακαρεοκτόνα

Abamectin: Το Abamectin είναι εντομοκτόνο καθώς και ακαρεοκτόνο και νηματοκτόνο. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των μυρμηγκιών και παρέχεται από το στόμα στα άλογα για την αποπαρασίτωσή τους. Αποικοδομείται γρήγορα όταν εκτίθεται στο φως (φωτοαποικοδόμηση) στις επιφάνειες των φυτών, στο έδαφος, την κοπριά και το νερό. Επίσης, το Abamectin είναι πολύ τοξικό για τις μέλισσες είτε εάν το καταναλώσουν είτε εάν έρθουν σε άμεση επαφή.

1.6 Επιλογή φαρμακευτικών ενώσεων

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή επιλέχθηκαν 32 φαρμακευτικές ενώσεις για μελέτη οι οποίες ανήκουν σε διαφορετικές θεραπευτικές κατηγορίες. Η επιλογή αυτών των ενώσεων έγινε διότι αποτελούν ενώσεις υψηλής κατανάλωσης στη χώρα μας τα τελευταία χρόνια είτε είναι συνταγογραφούμενες είτε όχι. Έχει αποδειχθεί η ύπαρξη τους στο περιβάλλον, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία καθώς οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους έχουν ανιχνευτεί λόγω της ανθεκτικότητάς τους. (Bueno *et al.*, 2012)

Ένωση	Μοριακός Τύπος	Μοριακό Βάρος(g/mol)	logK _{ow}	Melting point (°C)	Solubility in water (mg/L) at 20 °C	Precursor Adduct
<u>Mix 7-αντιβιοτικά</u>						

Oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460,434	-0,9	184,5	313 at 25 °C	$[M+H]^+$
Sulfadiazine	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	250,278	-0,9- 0,2	255,5	77 at 25 °C	$[M+H]^+$
Trimethoprim	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	290,318	0,91 ħ 0,6	199-203	400 at 25 °C	$[M+H]^+$
Oxolinic acid	$C_{13}H_{11}NO_5$	261,230	0,94	314-316	3,2	$[M+H]^+$
Sulfamethoxazole	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253,278	0,89	167	610 at 37 °C	$[M+H]^+$
Sulfapyridine	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	249,288	0,35	192	268 at 25 °C	$[M+H]^+$
Sulfamethazine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	278,330	0,14	198,5	1500 at 29 °C	$[M+H]^+$
Paracetamol	$C_8H_9NO_2$	151,163	0,46	170	1400 at 25 °C	$[M+H]^+$
Atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	266,336	0,16	146-148	13300 at 25 °C	$[M+H]^+$
Cimetidine	$C_{10}H_{16}N_6S$	252,339	0,4	141-143	9380 at 25 °C	$[M+H]^+$
Olanzapine	$C_{17}H_{20}N_4S$	312,432	3	189-195	39,88 at 25 °C	$[M+H]^+$
Amisulpride	$C_{17}H_{27}N_3O_4S$	369,479	1,06	126-127	0,293 mg/ml	$[M+H]^+$

Phenazole	$C_{11}H_{12}N_2O$	188,226	0,38	114	51900 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Risperidone	$C_{23}H_{27}FN_4O_2$	410,484	3,49	170	2,16 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Mirtazapine	$C_{17}H_{19}N_3$	265,353	2,9	114-116	1,1 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Venlafaxine	$C_{17}H_{27}NO_2$	277,4018	3,2	215-217	267 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Clozapine	$C_{18}H_{19}ClN_4$	326,823	3,23	183-184	29,15 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Citalopram	$C_{20}H_{21}FN_2O$	324,3919	3,74	182-188	31,09 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Quetiapine	$C_{21}H_{25}N_3O_2S$	383,507	3,17	174-176	0,5869 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Haloperidol	$C_{21}H_{23}ClFNO_2$	375,864	4,3	151,5	14 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Carbamazepine	$C_{15}H_{12}N_2O$	236,269	2,45	189-192	18 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Paroxetine	$C_{19}H_{20}FNO_3$	329,365	1,23	120-138	1131 at 25 ° C	$[M+H]^+$

Amitriptyline	$C_{20}H_{23}N$	277,4033	4,92	196-197	9,71 at 24 ° C	$[M+H]^+$
Fluoxetine	$C_{17}H_{18}F_3NO$	309,326	4,05	193-197	0,0017 mg/ml	$[M+H]^+$
Bupropion	$C_{13}H_{18}ClNO$	239,741	3,85	233- 2342	140 at 24 ° C	$[M+H]^+$
Alprazolam	$C_{17}H_{13}ClN_4$	308,765	2,12	228- 229,5	13,1 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Sertraline	$C_{17}H_{17}Cl_2N$	306,230	5,15	243-249	3,8 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Ketoprofen	$C_{16}H_{14}O_3$	254,281	3,12	94 ° C	51 at 22 ° C	$[M+H]^+$
Bezafibrate	$C_{19}H_{20}ClNO_4$	361,819	1,591	186	0,00155 mg/ml	$[M+H]^+$
Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284,7402	2,82	132	50 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Budesonide	$C_{25}H_{34}O_6$	430,534	1,914	226	10,7 at 25 ° C	$[M+H]^+$
Fenofibrate	$C_{20}H_{21}ClO_4$	360,831	5,2	79-82	0,42 at 25 ° C	$[M+H]^+$

Η πρώτη ομάδα των φαρμακευτικών ενώσεων αποτελείται από 7 αντιβιοτικά-αντιβακτηριδιακές ενώσεις τα οποία είναι τα Oxytetracycline, Sulfadiazine, Trimethoprine, Oxolinic Acid, Sulfamethoxazole, Sulfapyridine και το Sulfamethazine.

Οι αντιβακτηριδιακοί παράγοντες όπως τα παραπάνω αντιβιοτικά είναι συνήθως παρόντα στο υδάτινο περιβάλλον σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι φάρμες ζώων, η ανθρώπινη ιατρική και η υδατοκαλλιέργεια είναι οι κύριες πηγές μόλυνσης του νερού με αντιβακτηριακές ενώσεις. Τα αντιβιοτικά αποδείχθηκε ότι είναι άμεσα τοξικά για τα ψάρια προκαλώντας τους οξειδωτικό στρες, ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις, αιματολογικές, μεταβολικές και αναπαραγωγικές διαταραχές, καθώς και ανοσοκατασταλτικές και γονιδοτοξικές αλλαγές. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στο περιβάλλον διαταράσσουν, επίσης, τις υδρόβιες βακτηριακές κοινότητες προκαλώντας, αλλοιώσεις στη μικροχλωρίδα των ψαριών και την εμφάνιση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων βακτηρίων, με αποτέλεσμα την εξάπλωση ανθεκτικών γονιδίων στα αντιβιοτικά.(Bojarski, Kot and Witeska, 2020)

Η ομάδα των φαρμακευτικών ενώσεων των σουλφοναμίδων **Sulfadiazine**, **Sulfamethoxazole**, **Sulfapyridine** και **Sulfamethazine** είναι μια μεγάλη ομάδα συνθετικών αντιβακτηριακών που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά των βακτηριακών ασθενειών στα ψάρια από το 1948.

Sulfadiazine: Η φαρμακευτική ένωση Sulfadiazine με μοριακό τύπο $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ ανήκει στις σουλφοναμίδες και αποτελεί έναν σουλφοναμιδικό αντιβακτηριακό παράγοντα που χρησιμοποιείται στη θεραπεία ήπιων έως μέτριων λοιμώξεων που οφείλονται σε ευαίσθητους οργανισμούς. Η παρουσία σουλφαδιαζίνης, όπως και άλλα σουλφοναμίδια είναι μια ευρέως γνωστή αιτία ηπατικής βλάβης. Επίσης, είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται εκτενώς και καλύπτει ένα ευρύ φάσμα gram-θετικών και gram-αρνητικών μικροοργανισμών επειδή αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων.(Delgado et al., 2021)

Το **Oxytetracycline** είναι ένα αντιβιοτικό ευρέος φάσματος, δραστικό έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας βακτηρίων. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη βακτηρίων έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αυτό το αντιβιοτικό, γεγονός που έχει μειώσει την

αποτελεσματικότητά του για τη θεραπεία ορισμένων τύπων λοιμώξεων. Επίσης, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται για παράδειγμα από χλαμύδια και από το μυκόπλασμα (π.χ. πνευμονία).

Το **Oxolinic acid** είναι ένα αντιβιοτικό που αναπτύχθηκε στην Ιαπωνία τη δεκαετία του 1970. Μπορεί να λειτουργεί επίσης εκτός από αντιβακτηριδιακός παράγοντας και ως αναστολέας επαναπρόσληψης της ντοπαμίνης.

Το **Trimethoprim** με μοριακό τύπο $C_{14}H_{18}N_4O_3$ αποτελεί φαρμακευτική ένωση με αντιβακτηριακές και αντιπρωτοζωικές ιδιότητες. Η αντιβακτηριακή δράση αυτής της ένωσης ενισχύεται από τα σουλφοναμίδια. Επιπρόσθετα, η τριμεθοπρίμη είναι ευρέως γνωστή ως αντιβακτηριακό φάρμακο που αναστέλλει διαδοχικά βήματα στη βιοσύνθεση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών που είναι απαραίτητη για πολλά βακτήρια. Ο συνδυασμός της με τον αντιμικροβιακό παράγοντα sulfamethoxazole χρησιμοποιείται συνήθως για τη θεραπεία μιας ποικιλίας λοιμώξεων (ουρολοιμώξεις, αναπνευστικές και εντερικές λοιμώξεις). (Granero, Garnero and Longhi, 2002)

Η ομάδα των αναλγητικών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων συμπεριλαμβάνει τις φαρμακευτικές ενώσεις: **Paracetamol**, **Phenazone** και **Ketoprofen**.

Paracetamol : είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του πυρετού και του ήπιου έως μέτριου πόνου.

Phenazone: είναι ένα αναλγητικό, μη στεροειδές- αντιφλεγμονώδες φάρμακο και αντιπυρετικό.

Ketoprofen: χρησιμοποιείται για την ανακούφιση του πόνου. Μειώνει επίσης τον το πρήξιμο και τη δυσκαμψία των αρθρώσεων από την αρθρίτιδα. Αυτό το φάρμακο αποτελεί ένα μη στεροειδές- αντιφλεγμονώδες.

Η επόμενη ομάδα φαρμακευτικών ενώσεων αποτελείται από ψυχιατρικά φάρμακα τα οποία είναι 17 : το **Olanzapine** (αντιψυχωτικό) , το **Amisulpride** (αντιψυχωτικό, αντιεμετικό), το **Risperidone** (αντιψυχωτικό), το **Mitrazapine** (αντικαταθλιπτικό), το **Venlafaxine** (αντικαταθλιπτικό), το **Citalopram** (αντικαταθλιπτικό), το **Quetiapine**

(αντιψυχωτικό), το **Haloperidol** (αντιψυχωτικό), το **Carbamazepine** (επιληπτικό), το **Paroxetine** (αντικαταθλιπτικό), το **Amitriptyline** (αντικαταθλιπτικό), το **Fluoxetine** (αντικαταθλιπτικό), το **Bupropion** (αντικαταθλιπτικό), το **Alprazolam** (ηρεμιστικό ή αλλιώς Xanax), το **Setraline** (αντικαταθλιπτικό), το **Diazepam** (ηρεμιστικό) και το **Clozapine** (αντιψυχωτικό).

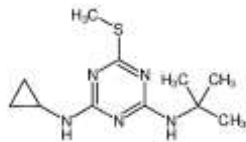
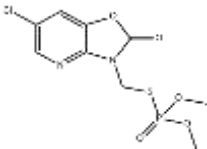
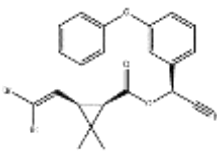
Carbamazepine: Η καρβαμαζεπίνη με μοριακό τύπο $C_{15}H_{12}N_2O$ είναι ένα από τα παλαιότερα αντιεπιληπτικά φάρμακα που ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά από τον Walter Schindler το 1953 και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία γενικευμένων επιληπτικών κρίσεων. Αποτελεί, επίσης, ένα εγκεκριμένο φάρμακο για τη θεραπεία διπολικών διαταραχών, μετατραυματικού στρες, σχιζοφρένειας, νευροπαθητικού πόνου και νευραλγίας. Η καρβαμαζεπίνη μεταβολίζεται σε μεγάλο βαθμό στο ήπαρ στον ενεργό και δυνητικά τοξικό μεταβολίτη της, την καρβαμαζεπίνη-10,11 (CBZE). Οι συχνές παρενέργειες της καρβαμαζεπίνης από τη χρήση της περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό, ξηροστομία, υπονατριαιμία, κόπωση, τρόμο και ζάλη. Τέλος, οι συγκεντρώσεις της καρβαμαζεπίνης στο αίμα συσχετίζονται με την αποτελεσματικότητα και τις ανεπιθύμητες ενέργειες που παρουσιάζονται. Η παρακολούθηση των επιπέδων της καρβαμαζεπίνης στον ορό του αίματος είναι πολύ σημαντική λόγω των αλληλεπιδράσεων με τα φάρμακα που μπορεί να έχει και η συνιστώμενη θεραπευτική δόση της κυμαίνεται μεταξύ 4-12 gr/ml. (Eryavuz Onmaz *et al.*, 2021)

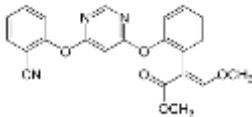
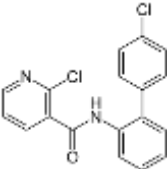
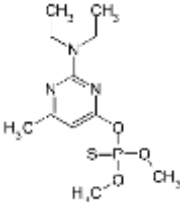
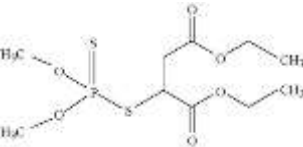
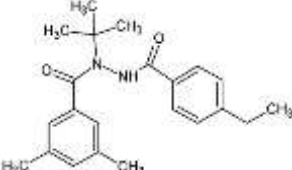
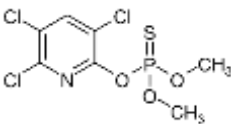
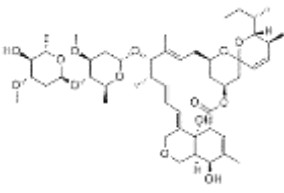
Επίσης, οι φαρμακευτικές ενώσεις **Bezafibrate** και το **Fenofibrate** αποτελούν υπολιπιδαιμικά φάρμακα, δηλαδή φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη μείωση των τριγλυκεριδών και της χοληστερόλης στο αίμα και ονομάζονται επίσης ρυθμιστές λιπιδίων στο αίμα.

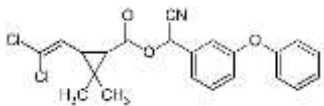
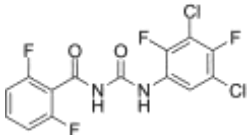
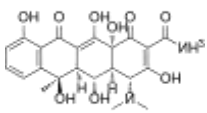
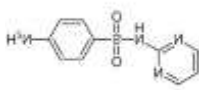
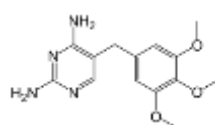
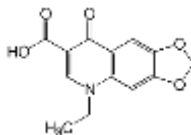
Επιπλέον, το φάρμακο **Atenolol** αποτελεί αντιπερτασικό φάρμακο και χρησιμοποιείται και στις καρδιακές αρρυθμίες. Το **Cimetidine** χορηγείται για τη θεραπεία των γαστρικών ασθενειών (πεπτικό έλκος) και για την καταπολέμηση των οξικών ουσιών. Τέλος, το **Budesonide** αποτελεί κορτικοστεροειδές φάρμακο, δηλαδή είναι στεροειδής ορμόνη με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση.

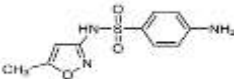
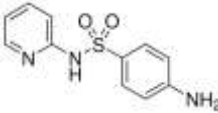
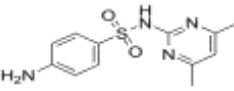
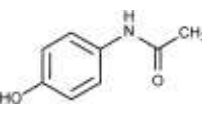
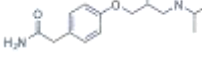
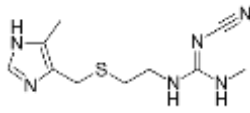
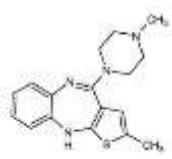
1.7 Πρότυπες ενώσεις-στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία και αναλύθηκαν μέσω του αναλυτικού οργάνου Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS).

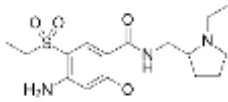
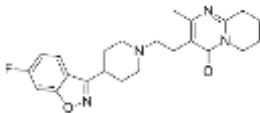
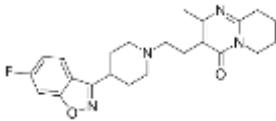
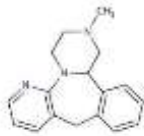
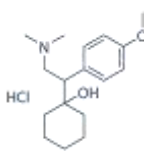
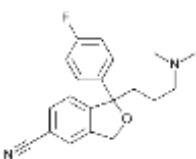
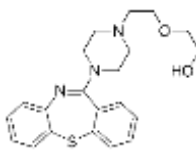
Οι ενώσεις- στόχοι που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση τους ποσοτικά μέσω του οργάνου Orbitrap ανήκουν στην κατηγορία των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και σε φαρμακευτικές ενώσεις. Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα μίγματα διαλυμάτων των ενώσεων αυτών. Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις είναι το μίγμα με όνομα mix 13 και οι φαρμακευτικές ενώσεις τα μίγματα mix 7, (τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των αντιβιοτικών φαρμακευτικών ενώσεων) και το mix 25 αποτελούμενο από φάρμακα αναλγητικά, ψυχιατρικά ακόμα και ναρκωτικές ουσίες. Παρακάτω παρατίθεται ο πίνακας των ενώσεων- στόχων μαζί με τις θεωρητικές τους μάζες.

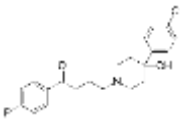
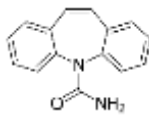
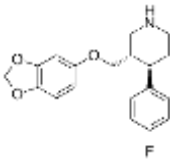
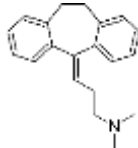
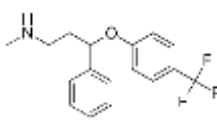
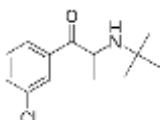
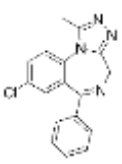
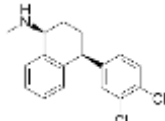
Πρότυπες ενώσεις	Θεωρητική μάζα	Χημική Δομή
<u>Mix 13- φυτοπροστατευτικές ενώσεις</u>		
Irgarol	254,1434	
Azamethiphos	324,9809	
Deltamethrin	523,0051	

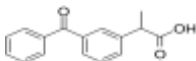
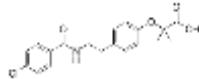
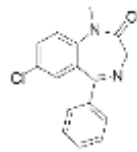
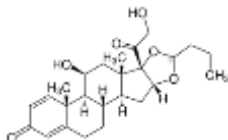
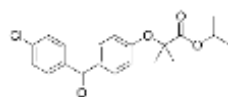
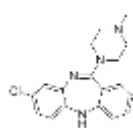
Azoxystrobin	404,1241	
Boscalid	343,0399	
Ethoxystrobin	218,1539	not found.
Pyrimiphos_methyl	306,1036	
Malathion	331,0433	
Tebufenozide	353,2224	
Chlorpyrifos_methyl	323,8993	
Abamectin	895,4724	

Cypermethrin	416,0815	
Teflubenzuron	380,9815	
<u>Mix 7 - φαρμακευτικές ενώσεις -αντιβιοτικά</u>		
Oxytetracycline	461,1555	
Sulfadiazine	251,0597	
Trimethoprim	291,1462	
Oxolinic Acid	262,0710	

Sulfamethoxazole	254,0594	
Sulfapyridine	250,0645	
Sulfamethazine	279,0910	
<u>Mix 25- φαρμακευτικές ενώσεις</u>		
Paracetamol	152,0691	
Atenolol	267,1676	
Cimetidine	253,1205	
Olanzapine	313,1450	

Amisulpride	370,1758	
Phenazone	189,1003	
Risperidone	411,2150	
Mitrazapine	266,1625	
Venlafaxine	278,2078	
Citalopram	325,1678	
Quetiapine	384,1702	

Haloperidol	376,1436	
Carbamazepine	237,0998	
Paroxetine	330,1467	
Amitriptyline	278,1465	
Fluoxetine	310,1382	
Bupropion	240,1126	
Alprazolam	309,0871	
Sertaline	306,0780	

Ketoprofen	255,0990	
Bezafibrate	362,1118	
Diazepam	285,0760	
Budesonide	431,2385	
Fenofibrate	361,1165	
Clozapine	327,1338	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°

Υλικά και Μέθοδοι

1.1 Χημικά, υλικά, όργανα και σκεύη

Πρότυπα Διαλύματα

Χρησιμοποιήθηκαν πυκνά πρότυπα διαλύματα (stock solutions) για τη δημιουργία μιγμάτων των mix 13 με φυτοφάρμακα, των mix 7 με αντιβιοτικά , των mix 25 με φαρμακευτικές ενώσεις και των mix 5 με επιλεγμένα αντιβιοτικά. Στη συνέχεια έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις για τα αραιωμένα πρότυπα διαλύματα εργασίας (working solutions) που παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη ή νερό/ μεθανόλη + 0,1 FA. Τα αραιωμένα δείγματα των διαλυμάτων παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 1ppm, 5ppm, 100 ppm, 250ppb και 500 ppb.

Χημικά και υλικά

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία του πειράματος ήταν η μεθανόλη (methanol LC-MS grade) καθαρότητας $\geq 99,5\%$, το τολουόλιο καθαρότητας $\geq 99,7\%$ και το διχλωρομεθάνιο καθαρότητας $\geq 99,5\%$ του οίκου Merck (Darmstadt, Germany). Επίσης χρησιμοποιήθηκε μικρή ποσότητα φορμικού οξέος (HCOOH) καθαρότητας LC-MS του οίκου Merck (Darmstadt, Germany), απιονισμένο νερό καθώς και ακετόνη για τον καθαρισμό των γυάλινων σκευών.

Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μικροστήλες εκχύλισης Oasis HLB (divinylbenzene/Nvinylpyrrolidone, Copolymer), των 200 mg χωρητικότητας όγκου 6 mL που προμηθεύτηκαν από την Waters Corporation (Milford, CT, ΗΠΑ). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν φιλτράκια πολυαιθυλενίου και φυσίγγια χωρίς φιλτράκια των 6 ml της εταιρείας Supelco των ΗΠΑ. Επίσης, οι δειγματολήπτες POCIS (εσωτερικοί δίσκοι μεμβράνης 47 mm) προμηθεύτηκαν από την Exposmeter SA

(Tavelsjö, Σουηδία) με τη «γενική» σύνθεση για δειγματοληψία φυτοφαρμάκων (Pest-POCIS) και για φαρμακευτική δειγματοληψία (pharm-POCIS).

Σκεύη

Όσον αφορά τα σκεύη, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα φιαλίδια των 2 ml με βιδωτά πλαστικά πώματα, γυάλινα φιαλίδια των 8 ml με πλαστικά πώματα, γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 20, των 50 και των 100 mL, ποτήρια ζέσεως των 25 mL, σιφώνια μετρήσεως των 25 mL, πουάρ τριών βαλβίδων, γυάλινες πιπέτες Pasteur, πουάρ τριών βαλβίδων, γυάλινες rygex κάψες, αυτόματη πιπέτα Transferpette των 250 µL του οίκου Brand (Wertheim, Germany) και αυτόματη πιπέτα Tipor-V των 1000 µL του οίκου Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Belgium).

Συσκευές

Κατά τη πορεία του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν διάφορες εργαστηριακές συσκευές. Όπως ο αναλυτικός ζυγός, ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων του οίκου Kern-Sohn (Stuttgart, Germany), (Εικόνα 19), η συσκευή περιδίνησης Vortrex της εταιρίας Bio-chem, (Ιωάννινα, Ελλάδα), η συσκευή εκχύλισης 12 θέσεων Visiprep DL του οίκου Supelco (Bellefonte, PA, USA), συνδεδεμένη με αντλία κενού του οίκου Laboport (Oxfordshire, United Kingdom) που βλέπουμε στην (Εικόνα 20).



Εικόνα 19 Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας Kern και η συσκευή ανάδευσης Vortex.



Εικόνα 20 Συσκευή εκχύλισης Visiprep DL της εταιρίας Supelco.

Στη συνέχεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε, επίσης, η συσκευή συμπύκνωσης με χρήση αζώτου 24 θέσεων του οίκου Techne (Staffordshire, United Kingdom), Εικόνα 21.



Εικόνα 21 Συσκευή συμπύκνωσης Techne.

Τέλος, για τον ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο των χημικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το αναλυτικό όργανο το οποίο είναι σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής

απόδοσης (UHPLC) συζευγμένο με γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) και τροχιακή παγίδα ιόντων (Orbitrap), του οίκου Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε στο παραπάνω σύστημα είναι η Hypersil Gold (10cm μήκος x 2,1mm εσωτερική διάμετρος, 1,9μm μέγεθος σωματιδίων) του οίκου Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA). Τα φάσματα των χρωματογραφημάτων και η επεξεργασία των αντίστοιχων αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Xcalibur 2.1, που είναι εγκατεστημένο σε Η/Υ, συνδεδεμένο με το σύστημα (UHPLC-LTQ-ORBITRAP). Η γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) είναι εξοπλισμένη με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (Ion Max Electrospray Ionization ESI), η οποία λειτουργεί σε μέθοδο είτε θετικών είτε αρνητικών ιόντων. Στην προκειμένη περίπτωση ήταν ρυθμισμένη στη μέθοδο του θετικού ιοντισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Επεξεργασία των Pest και Pharm- Pocis

3.1 Εργαστηριακή επεξεργασία των δειγματοληπτών POCIS

Παρακάτω θα αναλυθεί ο τρόπος και η διαδικασία της επεξεργασίας που ακολουθήθηκε εργαστηριακά των δειγματοληπτών pest και pharm- pocis. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η μεταφορά προς το εργαστήριο και η διατήρηση των πολυαιθεροσουλφιδικών μεμβρανών (PES) έγινε με αεροστεγή δοχεία καθώς και η περαιτέρω επεξεργασία τους έγινε την ίδια ημέρα ώστε να αποφευχθούν πιθανές αστοχίες του πειράματος.

Κατά την διαδικασία του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 3 μεταλλικά κάνιστρα (κλουβιά) στα οποία τοποθετήθηκαν ανά ζεύγος τα δισκία POCIS αντίστοιχα, τα οποία εμβαπτίστηκαν στο θαλασσινό το νερό σε ιχθυοκαλλιέργεια στο Ιόνιο Πέλαγος σε 3 συγκεκριμένες θέσεις στην αρχή της στεριάς θέση (1), στο κέντρο θέση (2), και στην ανοιχτή θάλασσα θέση (3). Το πρώτο τοποθετήθηκε ανάμεσα στην ακτή και την ιχθυοκαλλιέργεια, το δεύτερο εντός της περιοχής της ιχθυοκαλλιέργειας, ενώ το τρίτο τοποθετήθηκε μακριά από το ιχθυοτροφείο στην ανοιχτή θάλασσα, όλα σε βάθος 2 έως 3 m. Οι δειγματολήπτες εφαρμόστηκαν δύο φορές για 3 εβδομάδες κατά τη διάρκεια της περιόδου Σεπτέμβριος 2020–Απρίλιος 2021. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, τα POCIS ήταν είχαν ελαφρώς βιορυπανθεί ή καθόλου και για το λόγο αυτό, ξεπλύθηκαν με θαλασσινό νερό και με υπερκάθαρο νερό για να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα και καθαρίστηκαν τα παξιμάδια και τα μπουλόνια, τυλίχθηκαν σε αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκαν στα αρχικά τους δοχεία και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό ψυχρές συνθήκες (~4° C).



Εικόνα 22 Η συσκευή POCIS πριν από την εφαρμογή της στη βάση, στο κάνιστρο- κλουβί. Μετά την σωστή τοποθέτηση των συσκευών POCIS ακολούθησε η έκθεση τους στο θαλασσινό νερό για 21 ημέρες.

Η εκχύλιση των ενώσεων-στόχων συνήθως γινόταν την ίδια ημέρα, αλλιώς τα POCIS αποθηκεύονταν, καταψύχονταν και η εκχύλιση πραγματοποιούνταν εντός 24 ωρών. Ένα κενό (blank) POCIS εκτέθηκε στον ανοιχτό αέρα κατά την εφαρμογή, μεταφέρθηκε και αναλύθηκε όπως ένα κανονικά εφαρμοσμένο POCIS. Το blank-POCIS που λήφθηκε υπέστη όλη τη σειρά επεξεργασίας και ανάλυσης.



Εικόνα 23 Απεικόνιση των μεταλλικών κανίστρων που χρησιμοποιήθηκαν για την τοποθέτηση των αντίστοιχων φίλτρων pest και pharm- pocis στο θαλασσινό νερό.

Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας είναι ο εξωτερικός καθαρισμός των μεμβρανών με τη χρήση απιονισμένου νερού και κατάλληλης βούρτσας, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα επιμόλυνσης του προσροφητικού υλικού από αιωρούμενα σωματίδια. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην καταστραφούν οι μεμβράνες (PES).



Εικόνα 24 Ζεύγος φίλτρων pest- rocis πριν και μετά τον εξωτερικό καθαρισμό των μεμβρανών από τα επιπρόσθετα σωματίδια λόγω βιούπανσης..

Κατά το δεύτερο στάδιο της διαδικασίας παρασκευής των δειγμάτων αφαιρούμε τη μεμβράνη από τα μεταλλικά δισκία προσεκτικά και τοποθετούμε το αντίστοιχο προσροφητικό υλικό σε ειδικά κεραμικά σκεύη.



Εικόνα 25 Αφαίρεση της μεμβράνης PES από τις συσκευές POCIS και του προσροφητικού υλικού με τη χρήση ελάχιστου απεσταγμένου νερού.

Στη συνέχεια, αφήνουμε το προσροφητικό υλικό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσει και ζυγίζουμε παίρνοντας τις αντίστοιχες μετρήσεις .



Εικόνα 26 Το προσροφητικό υλικό των POCIS μετά την εξάτμιση του απεσταγμένου νερού. Όπως φαίνεται και στην εικόνα το κίτρινο υλικό (αριστερά) είναι το HLB που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των φαρμακευτικών ενώσεων και το πιο καφετί χρώμα (δεξιά) αντιστοιχεί στο τριφασικό μίγμα (Isolute ENV+ polystyrene divinylbenzene + άνθρακας Ambersorb 1500 διεσπαρμένος σε βιοκλίνες S-X3 για την ανίχνευση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, αντίστοιχα.

Τα δεδομένα των ζυγίσεων σε (gr) του προσροφητικού υλικού των POCIS κατά το μήνα **Σεπτέμβριο 2020** καταγράφηκαν στον παρακάτω πίνακα. Χρησιμοποιήθηκε ζυγός ακριβείας KERN 870.

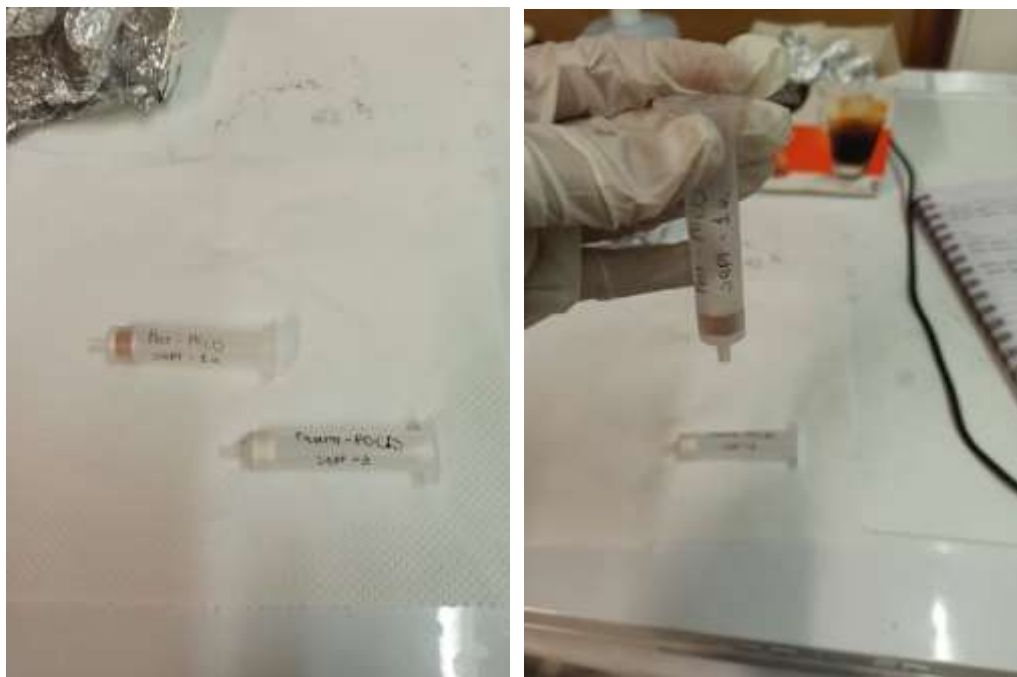
Όνομα δείγματος	Μάζα (gr)
Pest- sept-1a	0,233
Pest-sept-1b	0,213

Pharm- sept-2	0,234
Pest-sept-2	0,206
Pharm- sept-3	0,193

Τα δεδομένα των ζυγίσεων σε (gr) του προσροφητικού υλικού των POCIS κατά το μήνα **Απρίλιο 2021** αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Όνομα δείγματος	Μάζα (gr)
Pest-apr-1	0,235
Pest-apr-2	0,163
Pharm- apr-2	0,229
Pest-apr-3	0,232

Κατά το τρίτο στάδιο της επεξεργασίας των δειγματοληπτών pest και pharm- pocis το εσωτερικό υλικό της κάθε μεμβράνης τοποθετήθηκε σε πλαστικές μικροστήλες των 6ml της Supelco (Filtration Tubes without Frits 6 ml, Supelco) ανάμεσα από δισκάκια πολυαιθυλενίου (Polyethylene Frits 6 ml), όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες .



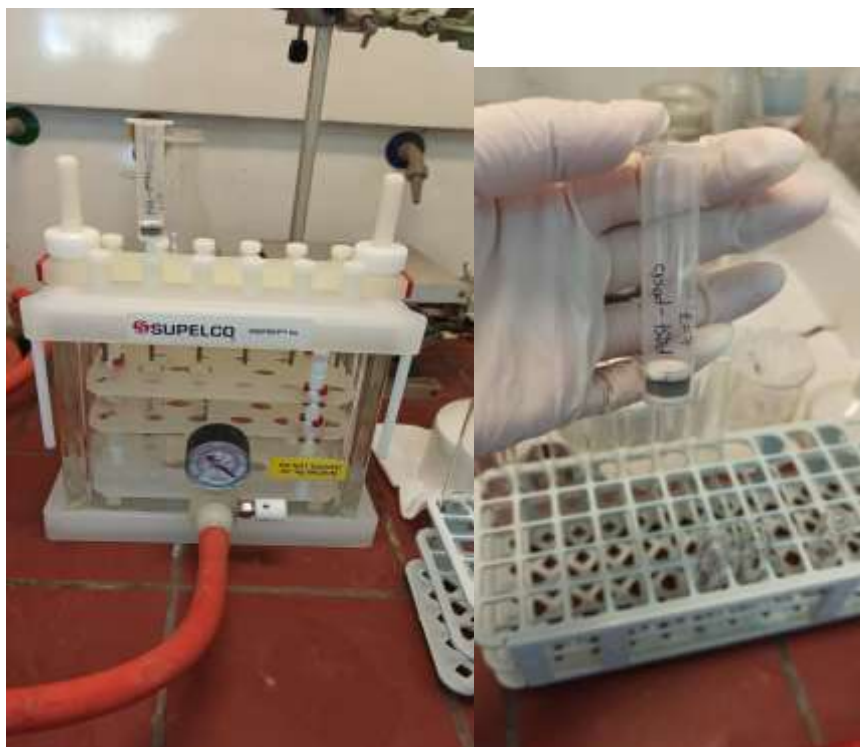
Εικόνα 27: Προετοιμασία δειγμάτων σε μικροστήλες (πλαστικά φυσιγγία των 6 ml), ώστε να ακολουθήσει στη συνέχεια η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης-υγρού SPE (Solid Phase Extraction) των πιθανά ανιχνεύσιμων οργανικών ενώσεων (μικρορύποι).

3.2 Διαδικασία εκχύλισης SPE που ακολουθήθηκε

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις η διαδικασία εκχύλισης τους από το θαλασσινό νερό έγινε με την παρακάτω διαδικασία. Αρχικά ,ετοιμάστηκε μίγμα διαλυτών με διχλωρομεθάνιο (CH_2CH_2), μεθανόλη (CH_3OH), και τολουόλιο (C_7H_8) με αναλογία 8:1:1 αντίστοιχα. Έγινε ενεργοποίηση των ήδη κατασκευασμένων μικροστηλών με τη χρήση του ίδιου διαλύματος και στη συνέχεια έγινε έκλουση 3 φορές διαδοχικά με 10 ml διαλύματος ανά 5 ml με ρυθμό ροής 2 ml/ min. Ο τελικός όγκος που συλλέχθηκε ανά μικροστήλη ήταν 30 ml.

Για τις φαρμακευτικές ενώσεις η διαδικασία εκχύλισης τους από το θαλασσινό νερό που ακολουθήθηκε έγινε ως εξής. Πρώτα, παρασκευάστηκε μίγμα διαλυτών με μεθανόλη (CH_3OH), διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) με αναλογία 1:1. Στη συνέχεια, έγινε ενεργοποίηση των μικροστηλών που κατασκευάστηκαν με το προσροφητικό υλικό των μεμβρανών των pharm- rocis χωρίς να αφεθούν οι στήλες να στεγνώσουν, με τη χρήση του διαλύματος και έγινε έκλουση των αναλυτών 2 φορές με 10 ml , ανά 5ml

με ρυθμό ροής 2ml/min. Ο τελικός όγκος που συλλέχθηκε ανά μικροστήλη ήταν 20 ml έκλουσμα.



Εικόνα 28 Σε αυτή την εικόνα βλέπουμε την τοποθέτηση των μικροστηλών στην συσκευή εκχύλισης Visiprep DL της εταιρίας Supelco συνδεδεμένη με αντλία κενού αέρος, ώστε να επιτευχθεί η έκλουση των πιθανών αναλυτών.

Στη συνέχεια, έγινε συμπύκνωση των εκλουσμάτων με ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και επαναδιαλυτοποίηση των δειγμάτων rest-rocis σε 0,5ml μεθανόλη (CH_3OH), και των δειγμάτων pharm-rocis με μίγμα νερού (H_2O), μεθανόλη (CH_3OH) και φορμικό οξύ (CH_2O_2) με αναλογία 90:10:0,1% αντίστοιχα, σε γυάλινα φιαλίδια των 2 ml. Τέλος, τα δείγματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS), μέσω του αναλυτικού οργάνου Orbitrap.



Εικόνα 29 Στο τελικό στάδιο έγινε συμπύκνωση μέχρι ξηρού με τη χρήση της συσκευής αζώτου του οίκου Techne (Staffordshire, United Kingdom) και επαναδιαλυτοποίηση των δειγμάτων σε τελικό όγκο 0,5 ml σε γυάλινα φιαλίδια των 2 ml όπως φαίνεται στην δεύτερη εικόνα.

Κατά το δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας ακολούθησε η βαθμονόμηση και η εύρεση του ρυθμού δειγματοληψίας R_s των POCIS κατά την κινητική φάση για συγκεκριμένες ενώσεις φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές στο εργαστήριο, υπό συγκεκριμένες εργαστηριακές συνθήκες. Το πείραμα διήρκεσε 21 μέρες συνολικά κατά το οποίο εμβαπτίστηκαν 4 δειγματολήπτες POCIS τύπου 'generic' σε 4 διαφορετικά ποτήρια ζέσεως των 2 L με απιονισμένο νερό όγκου 1 L σε θερμοκρασία περιβάλλοντος $T=12^\circ\text{C}$. Οι συσκευές POCIS αποσύρονταν διαδοχικά σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα των 3, 7, 14, και 21 ημερών. Ο ρυθμός ανάδευσης ήταν ίδιος και στα 4 ποτήρια ζέσεως (υπό ήπιες συνθήκες ανάδευσης 480 rpm) και η ποσότητα των mix των φυτοφαρμάκων που επισυνάπτονταν κάθε μέρα στο απιονισμένο νερό ήταν 50 ml διαλύματος συγκέντρωσης 100 ppm, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 5 ppm στο απιονισμένο νερό. Η ποσότητα του νερού, όγκου 1 L ανανεωνόταν καθημερινά με νέα και επισυνάπτονταν πάλι η ποσότητα των 50 ml από το διάλυμα των φυτοφαρμάκων, επίσης καθημερινά, ώστε να διατηρείται η συγκέντρωση στα ποτήρια ζέσεως σταθερή.



Εικόνα 30 Βαθμονόμηση των συσκευών POCIS και εύρεση των κινητικών προσρόφησης υπό σταθερές συνθήκες. Ανάδευση σε απιονισμένο νερό ($T = 12^{\circ} \text{C}$)

Στην συνέχεια ακολουθήθηκε πάλι η ίδια διαδικασία της εργαστηριακής επεξεργασίας των POCIS. Οι 4 συσκευές POCIS τύπου generic απομακρύνθηκαν από το απιονισμένο νερό σε 3, 7, 14, και 21 μέρες. Στην συνέχεια παρασκευάστηκαν οι αντίστοιχες μικροστήλες των 6 ml με το προσροφητικό υλικό των φίλτρων POCIS το οποίο βρίσκεται τοποθετημένο ανάμεσα από μικρά φίλτρα πολυαιθυλενίου. Ακολούθησε η μέτρηση της μάζας των τεσσάρων Pest-rocis και στη συνέχεια η τεχνική εκχύλισης SPE με μίγμα διαλυτών διχλωρομεθάνιο- μεθανόλη με αναλογία 1:1 και όγκο 20 ml για την έκλουση των αναλυτών όπως έχει περιγραφεί και παραπάνω. Τα εκλούσματα συμπυκνώθηκαν μέχρι ξηρού με τη χρήση της συσκευής αζώτου και επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη με όγκο 0,5 ml. Κατασκευάστηκαν οι πρότυπες αντίστοιχες καμπύλες 9 σημείων για το mix 13 των φυτοφαρμάκων και το mix5 για τις φαρμακευτικές ενώσεις με συγκεντρώσεις 1 ppb-2,5ppb- 5ppb-10 ppb-25 ppb- 50 ppb-100 ppb-250 ppb-500 ppb . Τέλος, τα 4 δείγματα αναλύθηκαν μέσω του αναλυτικού οργάνου Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS).

Pest-t3	0,213 gr
Pest-t7	0,210 gr

Pest-t14	0,217 gr
Pest-t21	0,245 gr

3.3 Συνθήκες ανάλυσης Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS).

Για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry). Κατά τη χρωματογραφική ανάλυση επιλέχθηκε η καταλληλότερη χρωματογραφική στήλη Hypersil Gold 100mm x2.1 mm, 2.6 μm παρέχοντας ικανοποιητική ευαισθησία και σχήμα κορυφών. Κατά την κινητή φάση του εκλουστικού συστήματος επιλέχθηκαν το νερό και η μεθανόλη. Με την προσθήκη φορμικού οξέος στην κινητή φάση βελτιώνεται η απόκριση των περισσότερων ενώσεων . Αυτό συμβαίνει διότι η παρουσία οξέος μετατοπίζει την ισορροπία διάστασης των ιόντων προς την πιο πρωτονιωμένη τους μορφή μέσα στο διάλυμα. Με αυτό τον τρόπο διευκολύνεται η διαδικασία του ιοντισμού. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι χρωματογραφικές συνθήκες του αναλυτικού οργάνου που χρησιμοποιήθηκαν.

Αναλυτική στήλη (analytical column)	Hypersil Gold 100mm x2.1 mm, 2.6 μm
Κινητή φάση (mobile phase)	A) Water+0.1 %FH+FNH ₄ B) MeOH+0.1%FH+FNH ₄

Πίεση (Pump phase)	145 psi (pounds per inch), 1 psi = 0.069× bar
Ταχύτητα ροής (flow range)	800 μl/s
Θερμοκρασία στήλης (column oven temperature)	20 °C
Θερμοκρασία εσωτ.χώρου αυτόματου δειγμ/τη (tray temperature)	20 °C
Διαλύτης Έγχυσης (Injection solvent)	A) MeOH B) H ₂ O/ MeOH 90/10 +0.1% FH
Όγκος έγχυσης δείγματος (injection volume)	5 μl

Εικόνα 31 Χρωματογραφικές συνθήκες για τα μίγματα των φυτοπροστατευτικών και των φαρμακευτικών ενώσεων.

3.4 Πειραματική διαδικασία και Πρότυπα διαλύματα

Για την ανάλυση των τελικών δειγμάτων μετά τη διαδικασία εκχύλισης με τη τεχνική SPE, παρασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση των πιθανών ενώσεων- στόχων. Για τις φαρμακευτικές ενώσεις παρασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη cc-Mix 7,25 από τα πρότυπα διαλύματα των φαρμακευτικών ουσιών με αναλογία διαλυτών νερό (H₂O), μεθανόλη (CH₃OH) και φορμικό οξύ (CH₂O₂), 90:10:0,1 %. Οι τιμές συγκέντρωσης της καμπύλης είναι 1ppb- 2,5ppb- 5ppb- 10ppb- 25ppb- 50ppb- 100ppb- 250ppb- 500ppb με 0,5 ml όγκο διαλύματος σε κάθε vial της καμπύλης. Αντίστοιχα, για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις παρασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη από πρότυπα διαλύματα του μίγματος

των ενώσεων με τιμές συγκέντρωσης 1ppb-2,5ppb- 10 ppb- 25 ppb-50 ppb 100 ppb- 250 ppb-500 ppb με διαλύτη μεθανόλη (CH₃OH), και όγκο σε κάθε vial 0,5 ml.

Οι πρότυπες καμπύλες των μιγμάτων των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν έπειτα από αραιώσεις πρότυπων διαλυμάτων με βάση το νόμο της αραιώσης.

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Όπου: C1 η αρχική συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας, C2 η τελική συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας, V1 ο αρχικός όγκος του διαλύματος και V2 ο τελικός όγκος του διαλύματος.

Οι πρότυπες καμπύλες αναλύθηκαν μέσω του οργάνου Orbitrap (LC-HR-LTQ/ Orbitrap- MS) και προέκυψαν οι κορυφές RT (Retention Time) και το σήμα του αναλυτικού οργάνου NL (Normalization Level) που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πρότυπες ενώσεις	Μοριακός Τύπος	Μοριακό βάρος (g/mol)	Θεωρητική μάζα (m/z)	RT	NL
<i><u>Mix 13- φυτοπροστατευτικές ενώσεις</u></i>					
Irgarol	C ₁₁ H ₁₉ N ₅ S	253,367	254,1434	5,87	10 ⁷
Azamethiphos	C ₉ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ PS	324,678	324,9809	4,89	10 ⁶
Deltamethrin	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	505,199	523,0051	7,03	10 ⁶
Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,3888	404,1241	5,54	10 ⁷

Boscalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343,207	343,0399	5,67	10 ⁷
Ethoxyquin	C ₁₄ H ₁₉ NO	217,307	218,1539	5,57	10 ⁶
Pyrimiphos_methyl	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,334	306,1036	6,21	10 ⁷
Malathion	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,358	331,0433	5,72	10 ⁷
Tebufenozide	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	330,358	353,2224	5,98	10 ⁶
Chlorpirifos_methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	322,033	323,8993	6,33	10 ⁵
Abamectin	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	873,0769	895,4724	7,16	10 ⁵
Cypermethrin	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	416,297	416,0815	7,00	10 ³
Teflubenzuron	C ₁₄ H ₆ ClF ₄	381,109	380,9815	4,80	10 ³
<u>Mix 7 - φαρμακευτικές ενώσεις -αντιβιοτικά</u>					
Oxytetracycline	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	460,434	461,1555	3,8	10 ⁴
Sulfadiazine	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250,278	251,0597	3,47	10 ⁶
Trimethoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,318	291,1462	3,67	10 ⁷
Oxolinic Acid	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	261,230	262,0710	4,19	10 ⁵
Sulfamethoxazole	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,278	254,0594	3,89	10 ⁶

Sulfapyridine	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	249,288	250,0645	3,61	10^6
Sulfamethazine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	278,330	279,0910	3,78	10^6
<i><u>Mix 25- φαρμακευτικές ενώσεις</u></i>					
Paracetamol	$C_8H_9NO_2$	151,163	152,0691	3,43	10^6
Atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	266,336	267,1676	3,36	10^7
Cimetidine	$C_{10}H_{16}N_6S$	252,339	253,1205	3,40	10^6
Olanzapine	$C_{17}H_{20}N_4S$	312,432	313,1450	3,54	10^7
Amisulpride	$C_{17}H_{27}N_3O_4S$	369,479	370,1758	3,63	10^7
Phenazone	$C_{11}H_{12}N_2O$	188,226	189,1003	3,97	10^7
Risperidone	$C_{23}H_{27}FN_4O_2$	410,484	411,2150	4,02	10^7
Mitrazapine	$C_{17}H_{19}N_3$	265,353	266,1625	3,92	10^7
Venlafaxine	$C_{17}H_{27}NO_2$	277,4018	278,2078	4,14	10^7
Citalopram	$C_{20}H_{21}FN_2O$	324,3919	325,1678	4,17	10^7
Quetiapine	$C_{21}H_{25}N_3O_2S$	383,507	384,1702	4,30	10^7

Haloperidol	$C_{21}H_{23}ClFNO_2$	375,869	376,1436	4,26	10^7
Carbamazepine	$C_{15}H_{12}N_2O$	236,269	237,0998	4,60	10^7
Paroxetine	$C_{19}H_{20}FNO_3$	329,365	330,1467	4,42	10^7
Amitriptyline	$C_{20}H_{23}N$	277,4033	278,1465	4,56	10^4
Fluoxetine	$C_{17}H_{18}F_3NO$	309,326	310,1382	4,60	10^7
Bupropion	$C_{13}H_{18}ClNO$	239,741	240,1126	4,09	10^7
Alprazolam	$C_{17}H_{13}ClN_4$	308,765	309,0871	4,83	10^7
Sertaline	$C_{17}H_{17}Cl_2N$	306,230	306,0780	4,73	10^7
Ketoprofen	$C_{16}H_{14}O_3$	254,281	255,0990	4,92	10^6
Bezafibrate	$C_{19}H_{20}ClNO_4$	361,819	362,1118	5,02	10^6
Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284,7402	285,0760	5,16	10^7
Budesonide	$C_{25}H_{34}O_6$	430,534	431,2385	5,42	10^7
Fenofibrate	$C_{20}H_{21}ClO_4$	360,831	361,1165	5,38	10^4
Clozapine	$C_{18}H_{19}ClN_4$	326,823	327,1338	4,22	10^7

3.5 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων

Ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοπροστατευτικών και των φαρμακευτικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη:

- ✓ Το χρόνο κατακράτησης RT των πρότυπων ουσιών σε σχέση με το χρόνο κατακράτησης των ουσιών που προσδιορίστηκαν στο εκάστοτε δείγμα με απόκλιση $\pm 2,5\%$
- ✓ Την ακριβή μάζα των ψευδο-μοριακών ιόντων σε σχέση με την πρότυπη ουσία (με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και σχετικό σφάλμα μάζας $<5 \text{ ppm}$)
- ✓ Την ακριβή μάζα των θυγατρικών ιόντων MS^2 σε σχέση με αυτά της πρότυπης ουσίας (με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και σχετικό σφάλμα μάζας $<5 \text{ ppm}$)

Ο ποιοτικός κι ο ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπυλών βαθμονόμησης 1ppb-2,5ppb- 5ppb- 10ppb- 25ppb- 50ppb- 100ppb- 250ppb- 500ppb με 0,5 ml όγκο διαλύματος σε κάθε vial της καμπύλης όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να προσδιοριστούν μέσω της παθητικής δειγματοληψίας τα επίπεδα επιλεγμένων φαρμακευτικών και φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο θαλάσσιο περιβάλλον, ώστε να επιτευχθεί ο **ποιοτικός έλεγχος** του θαλασσινού νερού του υδάτινου οικοσυστήματος εντός της ιχθυοκαλλιέργειας.

4.2 Εκτίμηση του ρυθμού δειγματοληψίας R_s και του παράγοντα συγκέντρωσης C_{Ft}

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν εργαστηριακά οι ρυθμοί δειγματοληψίας R_s , κατά την κινητική φάση πρόσληψης των POCIS, των παρακάτω φυτοπροστατευτικών ουσιών και αντιβιοτικών σύμφωνα με τον παράγοντα συγκέντρωσης C_{Ft} : Azamethiphos, Ethoxyquin, Azoxystrobin, Boscalid, Malathion, irgarol, Tebufenozide, Pirimiphos methyl, Chlorpyrifos methyl, Abamectin και Sulfadiazine, Sulfapyridine, Sulfamethazine, Trimethoprim, Sulfamethoxazole.

Το πείραμα διήρκησε 21 μέρες . Σύμφωνα με τον τύπο έχουμε:

$$C_{Ft} = M_{s_t} / C_w = R_s * t, \text{ όπου}$$

M_{s_t} : η μάζα του αναλύτη στο στερεό προσροφητικό υλικό σε ng

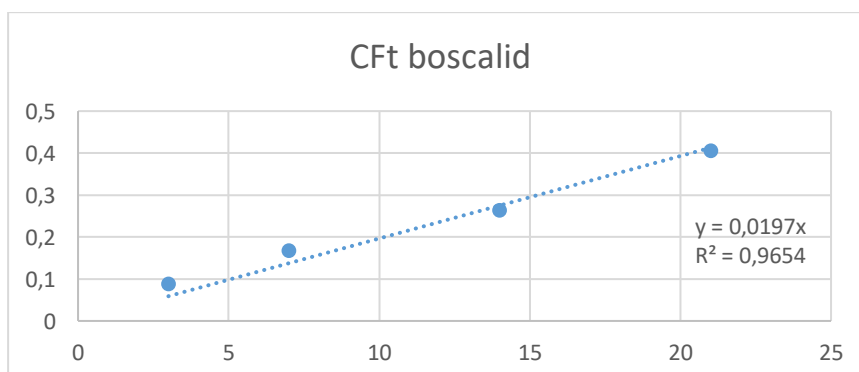
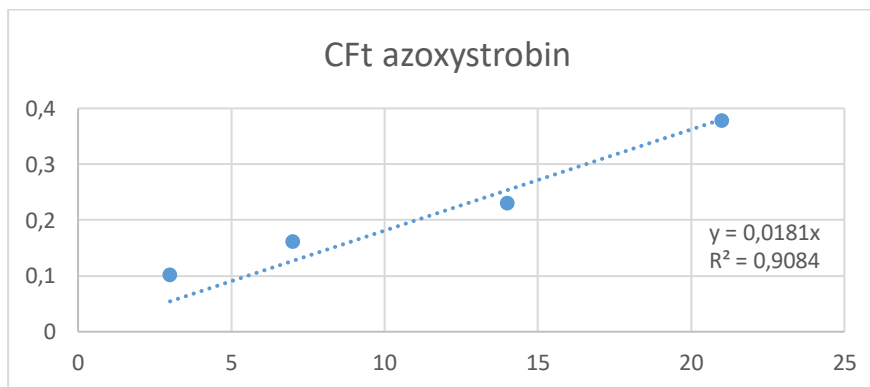
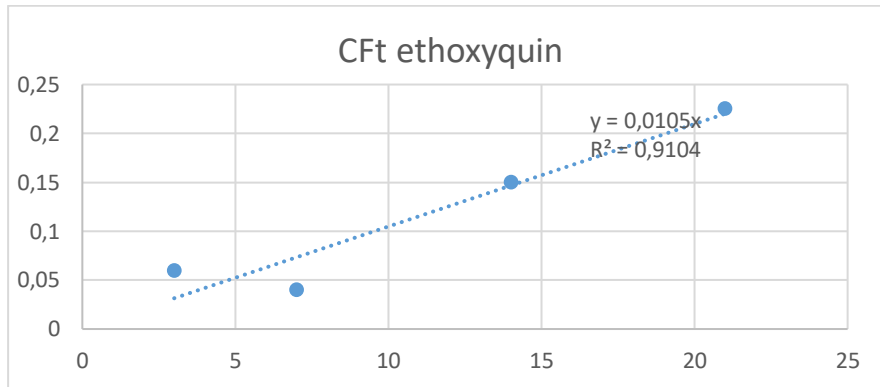
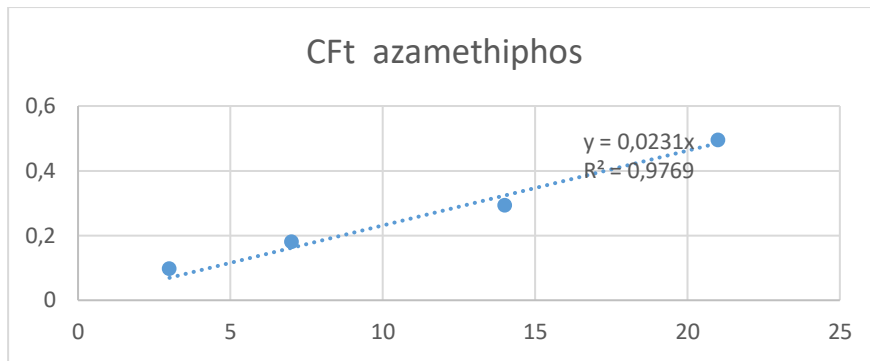
C_w : η μέση σταθμισμένη συγκέντρωση του αναλύτη στο νερό σε μονάδες ng/L

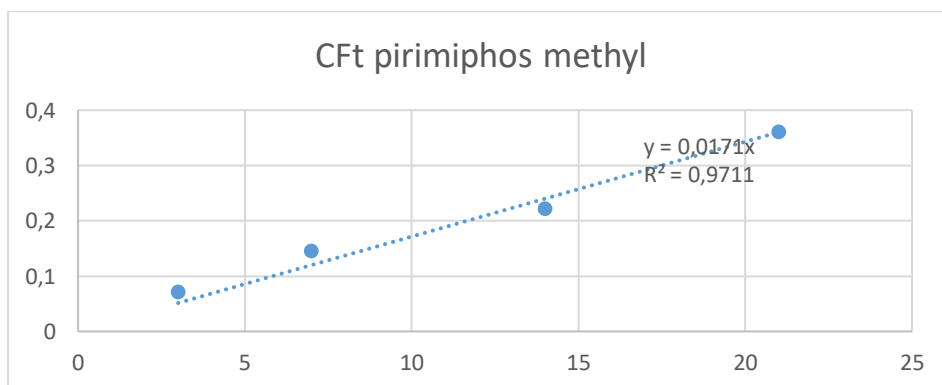
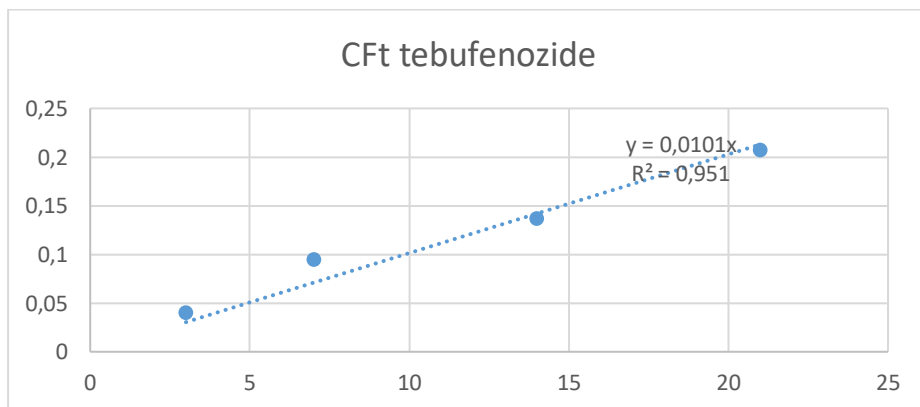
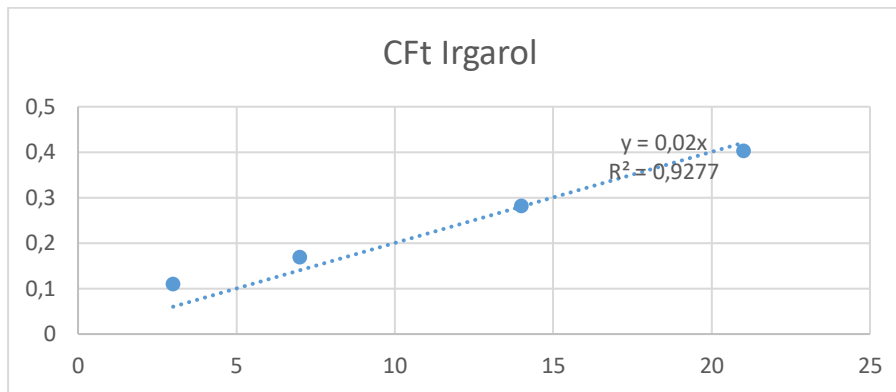
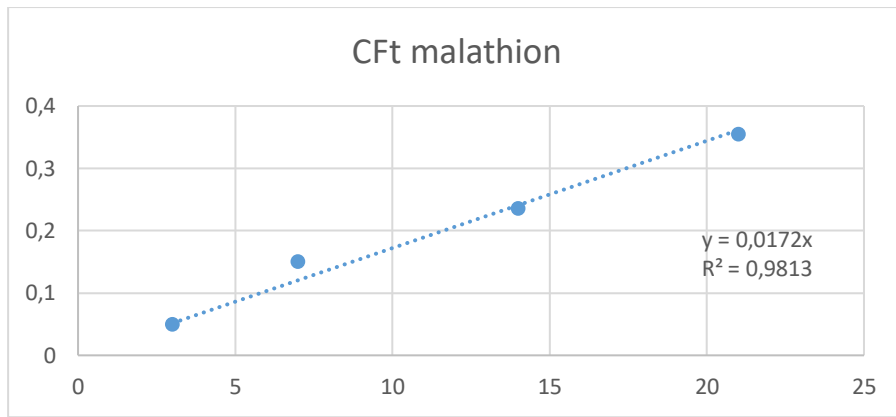
R_s : ο ρυθμός δειγματοληψίας σε μονάδες L/d

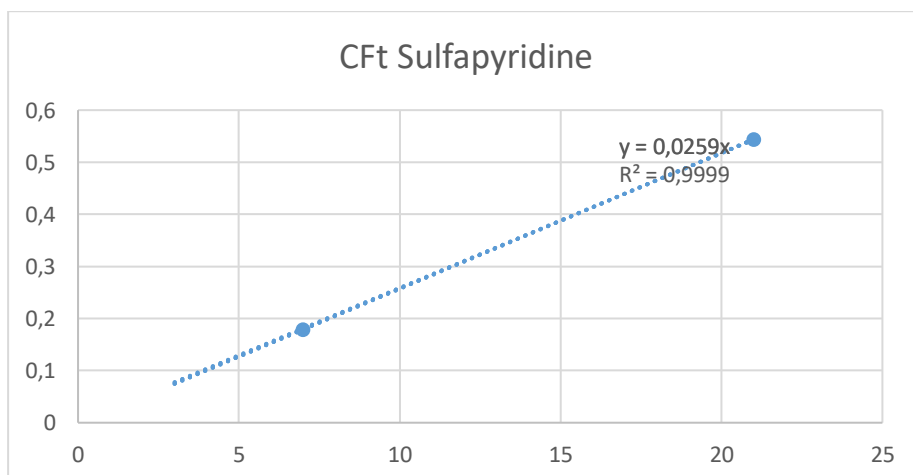
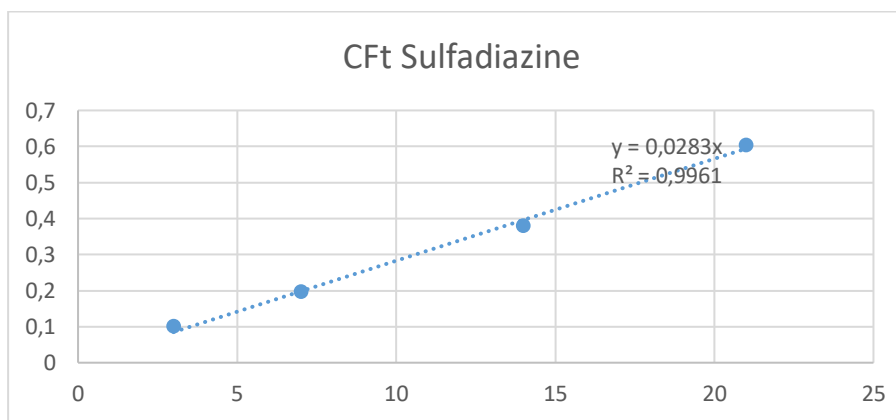
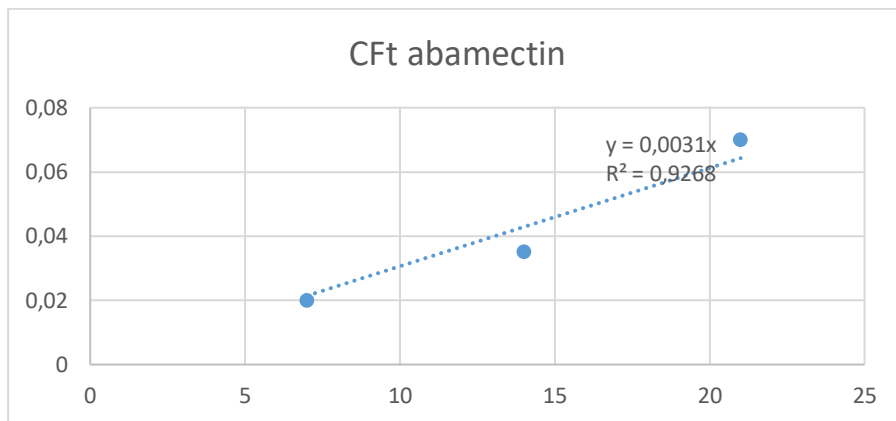
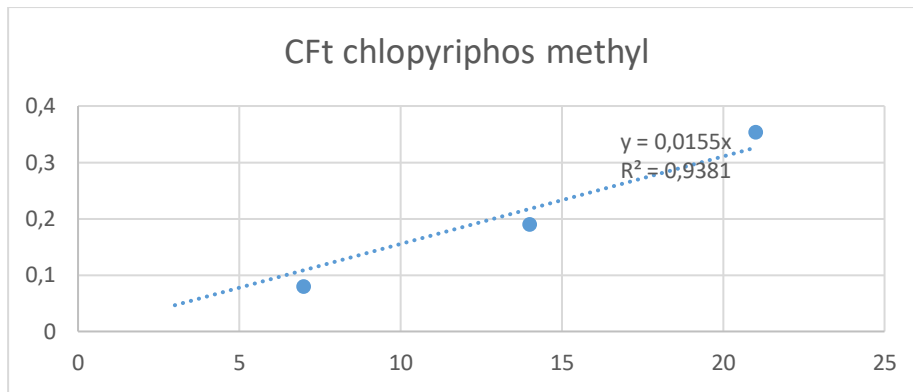
t : η χρονική περίοδος δειγματοληψίας σε ημέρες d.

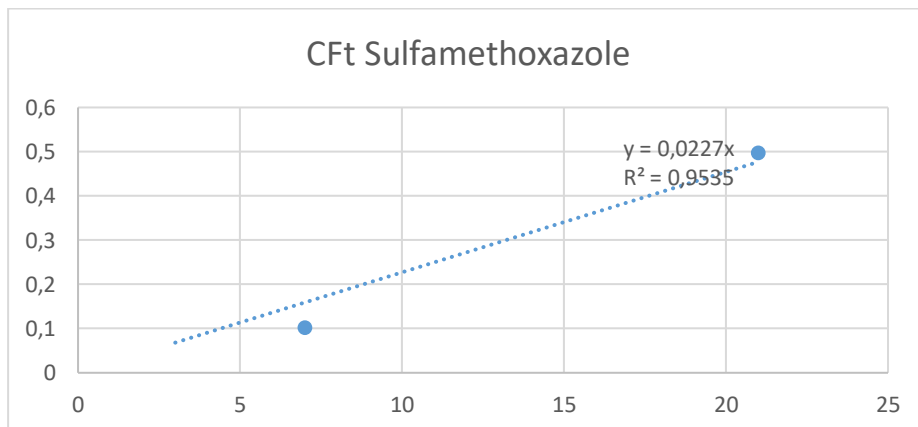
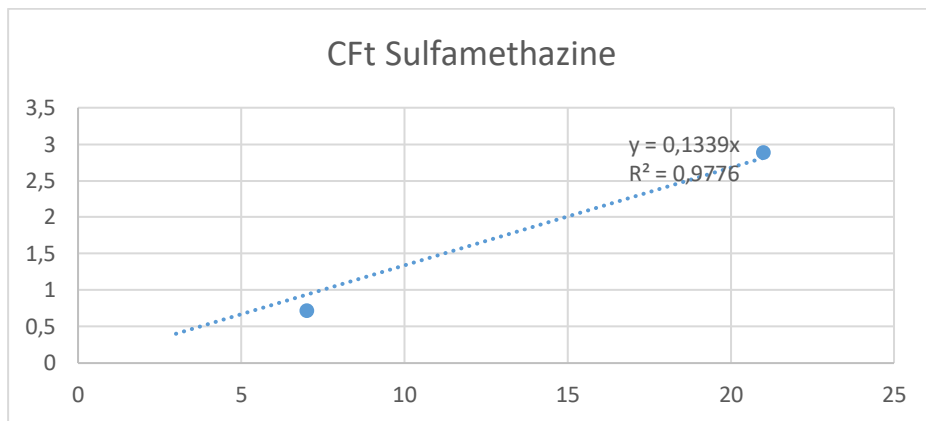
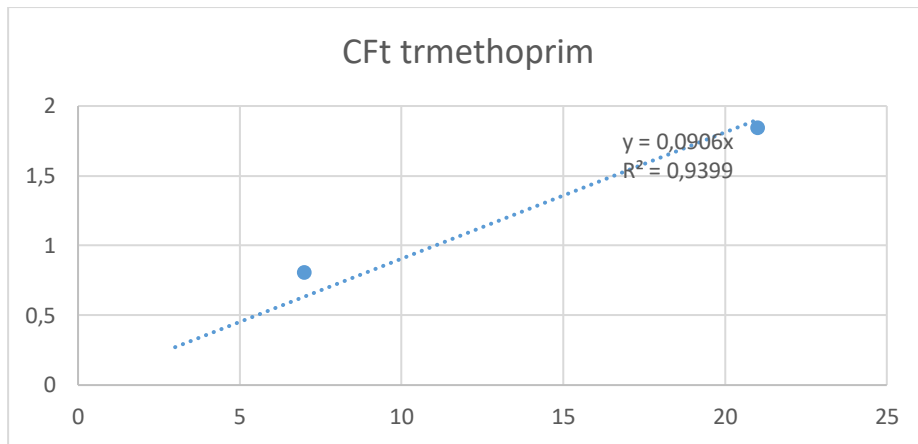
Η γραφική παράσταση του παράγοντα συγκέντρωσης C_{Ft} προς το χρόνο αποτελεί μία γραμμική σχέση της οποίας η κλίση παριστάνει τον ρυθμό δειγματοληψίας R_s του αναλύτη.

Παρακάτω έχουν υπολογιστεί οι γραμμικές σχέσεις (ευθείες) για 10 φυτοπροστατευτικές ενώσεις και 5 αντιβιοτικά. Οι τιμές R_s ποικίλουν για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις από 0,010 L/d έως 0,981 L/d και για τα αντιβιοτικά από 0,025 L/d έως 0,134 L/d. Παρακάτω παρουσιάζονται οι γραφικές παραστάσεις του παράγοντα C_{Ft} με το χρόνο t , όπου η κλίση της ευθείας αντιπροσωπεύει τον Ρυθμό δειγματοληψίας της κάθε χημικής ένωσης.









4.2 Τοποθεσία εφαρμογής της Παθητικής Δειγματοληψίας

Η μέθοδος της παθητικής δειγματοληψίας εφαρμόστηκε με επιτυχία σε θαλασσινό νερό στην περιοχή της Σαγιάδας Ν. Θεσπρωτίας σε 2 διαφορετικές περιόδους Σεπτέμβριος 2020 και Απρίλιος 2021 αντίστοιχα. Τα **σημεία** δειγματοληψίας βρίσκονταν σε επιλεγμένα σημεία εντός της ιχθυοκαλλιέργειας, ανάμεσα στην ακτή και την ιχθυοκαλλιέργεια και μακριά από το ιχθυοτροφείο στην ανοιχτή θάλασσα .

Συνοπτικά τα μειονεκτήματα της επί τόπου στιγμιαίας δειγματοληψίας έναντι των πλεονεκτημάτων της παθητικής δειγματοληψίας

Η επί τόπου στιγμιαία δειγματοληψία είναι ένα αποτελεσματικό μέσο για την εκτίμηση της συγκέντρωσης ρύπων στα επιφανειακά ύδατα. Ωστόσο, έχει αρκετά μειονεκτήματα ως μέθοδος δειγματοληψίας:

- Η χημική ανάλυση που θα ακολουθήσει θα αποδώσει την συγκέντρωση ενός στιγμιαίου δείγματος μια συγκεκριμένης χρονικής στιγμής του περιβάλλοντος
- Θα πρέπει να συλλέγονται μεγάλοι όγκοι νερού, καθώς συχνά οι ρύποι είναι παρόντες μόνο σε συγκεντρώσεις επιπέδου ιχνών
- τα επεισοδιακά συμβάντα ρύπανσης μπορεί να παραλειφθούν αυξάνοντας την ανάγκη για ένα σύστημα δειγματοληψίας με αυξημένη συχνότητα συλλογής δειγμάτων σε μια δεδομένη περίοδο, μέθοδος η οποία είναι πολύ δαπανηρή και σε πολλές περιπτώσεις δεν είναι πρακτική, καθώς απαιτείται μια πολύ ασφαλής τοποθεσία εφαρμογής της μεθόδου
- προκύπτουν διαφορετικές συγκεντρώσεις ρύπων ανάλογα με τη προεργασία των δειγμάτων που εφαρμόζεται και δεν παρέχονται πληροφορίες για το διαλυμένο βιοδιαθέσιμο κλάσμα των ρύπων.

Από την άλλη πλευρά, η παθητική δειγματοληψία είναι μια τεχνική που βασίζεται στη διάχυση χημικών ουσιών από ένα μέσο σε μια φάση λήψης που διαχωρίζεται από το μέσο με μια μεμβράνη, δηλαδή λόγω της διαφοράς που υπάρχει μεταξύ των χημικών αυτών των βαθμίδων.

- Στην παθητική δειγματοληψία η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας μετριέται ως σταθμισμένη συνάρτηση του χρόνου δειγματοληψίας
- Είναι λιγότερο ευαίσθητη σε τυχαίες ακραίες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης οργανικών ρύπων, παρέχοντας έτσι πιο επαρκείς πληροφορίες για τη μακροπρόθεσμη παρακολούθηση των ρύπων σε ένα περιβαλλοντικό διαμέρισμα
- μόνο μία συσκευή είναι απαραίτητη σε μια δεδομένη θέση κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας
- μετριοούνται οι πραγματικά διαλυμένες συγκεντρώσεις των ρύπων
- επειδή είναι απαραίτητες μόνο λίγες αναλύσεις κατά την περίοδο παρακολούθησης, το αναλυτικό κόστος που συνήθως συνδέεται με ακριβές τεχνικές απομόνωσης και προσυγκέντρωσης των δειγμάτων, μπορεί να μειωθεί σημαντικά
- ελαχιστοποιείται η πιθανότητα αποσύνθεσης του δείγματος μέσω της μεταφοράς του ή της αποθήκευσης του, καθώς και κατά το στάδιο του εμπλουτισμού του
- σε αντίθεση με τις άλλες τεχνικές η παθητική δειγματοληψία είναι μία απλή τεχνική και μετά το στάδιο της απομόνωσης και εμπλουτισμού του δείγματος δεν απαιτείται συνήθως περεταίρω προετοιμασία

Οι δειγματολήπτες Pocis της παθητικής δειγματοληψίας έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στην παρακολούθηση των πολικών οργανικών μικρορύπων και περιλαμβάνουν ένα προσροφητικό μέσο που βρίσκεται ανάμεσα σε δύο μικροπορώδεις μεμβράνες πολυαιθεροσουλφόνης που περιορίζουν την διάχυση. Συνήθως χρησιμοποιούνται δύο ειδών διαμορφώσεις-εκδοχές των δειγματοληπτών POCIS:

- η «generic» διαμόρφωση που αποτελείται από ένα μίγμα τριών προσροφητικών υλικών (isolute ENV+ πολυστυρένιο διβινυλοβενζόλιο και άνθρακας Amborsorb 1500 διασκορπισμένος σε S-X3 Biobeads), που χρησιμοποιείται για τις περισσότερες φυτοπροστατευτικές ενώσεις και ορμόνες και τις περισσότερες χημικές ουσίες που σχετίζονται με τα λύματα

- και η «pharmaceutical» διαμόρφωση που περιέχει ένα προσροφητικό υλικό στερεάς φάσης (Oasis HLB) που έχει σχεδιαστεί για υπολείμματα φαρμάκων

Η παθητική δειγματοληψία, επίσης, επιτρέπει τον προσδιορισμό των χρονικά σταθμισμένων μέσων συγκεντρώσεων (TWA) της διαλυμένης φάσης για εκτεταμένες περιόδους δειγματοληψίας.

4.3 Εκτίμηση του ρυθμού δειγματοληψίας

Ο ρυθμός δειγματοληψίας R_s είναι μια παράμετρος που επιτρέπει τον προσδιορισμό της μάζας των αναλυτών στις συσκευές της παθητικής δειγματοληψίας.

Για τον υπολογισμό των επιπέδων της περιβαλλοντικής συγκέντρωσης χρησιμοποιείται η ακόλουθη εξίσωση για τον προσδιορισμό του ρυθμού δειγματοληψίας της εκάστοτε χημικής ένωσης:

$$C_w = \frac{M}{R_s \times t}, \text{ όπου :}$$

M = η μάζα του αναλύτη στη συσκευή POCIS σε (g)

C_w = η συγκέντρωση του αναλύτη στο νερό σε g/L

t = η χρονική περίοδος της δειγματοληψίας σε (d)

R_s = ο ρυθμός δειγματοληψίας σε (L/d)

Στον παρακάτω πίνακα υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις τριών αναλυτών στο νερό σε μονάδες ng/L σύμφωνα με τις τιμές R_s που βρέθηκαν εργαστηριακά κατά την κινητική φάση του δειγματολήπτη, (Li *et al.*, 2018), (Vrana *et al.*, 2021)

Compound	R_s (L/d)¹	C_w (ng/L)

Trimethoprim	0,09	0,11
Sulfadiazine	0,028	5,95
Irgarol	0,02	1,7

Η μάζα του αναλύτη στη συσκευή POCIS υπολογίστηκε με τη βοήθεια του αναλυτή Orbitrap αρχικά με τη μορφή συγκεντρώσεων :

χημική ένωση	C	Μάζα
sulfadiazine	7.0 ppb	3.5 ng
trimethoprim	4.3 ppb	2.15 ng
Irgarol	1.4 ppb	0.7 ng

Και στη συνέχεια λόγω προσυγκέντρωσης προέκυψαν οι παραπάνω τιμές μάζας των τριών αναλυτών σε μονάδες ng.

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των αναλυτών που προσδιορίστηκαν, δεν διατρέχεται κανένας κίνδυνος μόλυνσης ή τοξικής επίδρασης καθώς η τιμή PNC που προτάθηκε για το trimethoprim είναι 16 µg/L, ενώ η ελάχιστη τιμή EC50 για το sulfadiazine ήταν 0,11 mg/L.

Η τιμή PNC (predicted no-effect concentration) ή αλλιώς η προβλεπόμενη συγκέντρωση χωρίς επιπτώσεις, είναι η συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας που σηματοδοτεί το όριο κάτω από το οποίο δεν μετριοούνται αρνητικές επιπτώσεις κατά την έκθεσή της σε ένα οικοσύστημα . Οι τιμές PNC προορίζονται να είναι συντηρητικές και να προβλέπουν τη συγκέντρωση στην οποία μια χημική ουσία πιθανότατα δεν θα έχει τοξική επίδραση.

Επίσης, η τιμή EC50 (Half maximal effective concentration) είναι ένα μέτρο της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου ή τοξικής ουσίας που προκαλεί απόκριση στα μισά του δρόμου μεταξύ της βασικής γραμμής και της μέγιστης μετά από έναν

καθορισμένο χρόνο έκθεσης. Πιο απλά, το EC50 μπορεί να οριστεί ως η συγκέντρωση που απαιτείται για να επιτευχθεί 50% αποτέλεσμα.

Ωστόσο, η μέση ετήσια συγκέντρωση EQS (Environmental quality Standards) για το Irgarol στο θαλάσσιο περιβάλλον έχει προταθεί να είναι η τιμή 2,5 και 16 ng/L. Η τιμή EQS είναι ένα είδος δεσμευτικού μέσου νομικής πολιτικής που επιβλήθηκε για την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από διάχυτες πηγές εκπομπών (μόλυνση), όπως η οδική κυκλοφορία και η γεωργία.

Για τον υπολογισμό των C_w χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές R_s της βιβλιογραφίας. Το trimethoprim είναι ένας αντιμικροβιακός παράγοντας διαμινοπυριμιδίνης που χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική. Χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με ένα σουλφοναμίδιο, (όπως η σουλφαδιαζίνη) σε αναλογία συγκέντρωσης 1:5.

Από την άλλη πλευρά, το Irgarol -1051 είναι ένα ενισχυτικό βιοκτόνο που έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της βιορύπανσης σε βυθισμένες επιφάνειες, όπως σκάφη, σημαδούρες πλοήγησης, υποβρύχιο εξοπλισμό και πλοία σε θαλάσσιο περιβάλλον.

Και οι τρεις αναλύτες ανιχνεύθηκαν με βάση τον χρόνο κατακράτησης R_t (retention time), το πρωτονιωμένο μοριακό ιόν [M+H]⁺ και τουλάχιστον ένα ιόν θραυσματοποίησης MS²:

Trimethoprim 291.1452 → 230.1162

Sulfadiazine 251.0579 → 156.0114

Irgarol 254.1434 → 198.0811

4.6 Πίνακας Βιβλιογραφικών Τιμών Rs

Πρότυπες ενώσεις	Μοριακός Τύπος	Rs(L/d) - βιβλιογραφίας	Βιβλιογραφία
<u>Mix 13- φυτοπροστατευτικές ενώσεις</u>			
Irgarol	C ₁₁ H ₁₉ N ₅ S	0.129 ^h (h= salted water) 0.032 ^h 0.041 ^h 0.07 0.14 0.01 0.05	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Ahrens <i>et al.</i> , 2015)
Azamethiphos	C ₉ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ PS	-	-
Deltamethrin	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃	0.003-0.005	(Hernando, Martínez-Bueno and Fernández-Alba, 2005)
Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	4.3	(Assoumani <i>et al.</i> , 2014)
Boscalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	0.45 0.01	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Ahrens <i>et al.</i> , 2015)
Ethoxyquin	C ₁₄ H ₁₉ NO	-	-

Pyrimiphos_methyl	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	0.114 0.10	(Thomatou <i>et al.</i> , 2015) (Urík, 2020)
Malathion	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	0.005 0.308	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Thomatou <i>et al.</i> , 2011)
Tebufenozide	$C_{22}H_{28}N_2O_2$	-	-
Chlorpirifos_methyl	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	0.095	(Thomatou <i>et al.</i> , 2011)
Abamectin	$C_{48}H_{72}O_{14}$	-	-
Cypermethrin	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	0.011 ^h 0.012 ^h	(Morin <i>et al.</i> , 2012)
Teflubenzuron	$C_{14}H_6ClF_4$	-	-
<u>Mix 7 - φαρμακευτικές ενώσεις -αντιβιοτικά</u>			
Oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	0.023 ^h 0.023	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Hernando, Martínez-Bueno and

		0.13	Fernández-Alba, 2005) (Urík, 2020)
Sulfadiazine	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	49 ±5, (V0 = 0 cm/s) 89 ±7, (V1 = 2–3 cm/s) 149 ±10, (V2 = 6–7 cm/s) 202 ±14, (V3 = 20 cm/s) 0.05	(Guibal, Lissalde and Guibaud, 2020) (Urík, 2020)
Trimethoprim	$C_{14}H_{18}N_4O_3$	0.436(± 0.006), 0.411 (± 0.073) 0.213 (±0.035) ^f 0.215(± 0.003) ^c 0.360 (±0.210) 0.090(± 0.074) ^c 0.03 (field) 74 ±8, (V0 = 0 cm/s) 238 ±31, (V1 = 2–3 cm/s) 238 ±19, (V2 = 6–7 cm/s) 350 ±63, (V3 = 20 cm/s)	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Techniques and Strategies, 2014) (Guibal, Lissalde and Guibaud, 2020) (Urík, 2020)
		0.08	

Oxolinic Acid	$C_{13}H_{11}NO_5$	0.10	(Urík, 2020)
Sulfamethoxazole	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	0.21 ^b , 0.339 (± 0.057) 0.348(± 0.049) 0.291(± 0.04) ^f 0.202(± 0.019) ^c 0.43 0.22 0.339 53 $\pm$ 5, (V0 = 0 cm/s) 96 $\pm$ 6, (V1 = 2–3 cm/s) 119 $\pm$ 7, (V2 = 6–7 cm/s) 154 $\pm$ 11, (V3 = 20 cm/s) 0.08	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Li, Helm and Metcalfe, 2010) (Guibal, Lissalde and Guibaud, 2020) (Urík, 2020)
Sulfapyridine	$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	0.1 0.462 0.09	(Techniques and Strategies, 2014) (Li, Helm and Metcalfe, 2010) (Urík, 2020)
Sulfamethazine	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	0.18 ^b 0.114 (± 0.029) 0.049(± 0.040) 0.1(field)	(Morin <i>et al.</i> , 2012)

			(Techniques and Strategies, 2014)
<u>Mix 25- φαρμακευτικές ενώσεις</u>			
Paracetamol	C ₈ H ₉ NO ₂	0.02 0.06	(Tapie <i>et al.</i> , 2011) (Urík, 2020)
Atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	0.094(±0.015) 0.087 (±0.003) ^f 0.073 (±0.013) ^c 0.040 (±0.070) 0.037 (±0.064) ^c 0.090 (±0.064) 0.01 (field) 53 ±6, (V0 = 0 cm/s) 145 ±20, (V1 = 2–3 cm/s) 146 ±12, (V2 = 6–7 cm/s) 228 ±33, (V3 = 20 cm/s) 0.05	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Techniques and Strategies, 2014) (Urík, 2020)
Cimetidine	C ₁₀ H ₁₆ N ₆ S	0.751 ±0.023	(Kim and Ph, 2018)
Olanzapine	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S	0.15	(Urík, 2020)
Amisulpride	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₄ S	0.01 (field)	(Techniques and Strategies, 2014)

Phenazone	$C_{11}H_{12}N_2O$	LogRs= -1.10 LogRs= -1.26 0.06	(Wang <i>et al.</i> , 2020) (Urík, 2020)
Risperidone	$C_{23}H_{27}FN_4O_2$	1.050, 1 0.090, 2 0.120, 3 0.085, 4 0.216, 5 0.07	(Project <i>et al.</i> , 2010) (Urík, 2020)
Mitrazapine	$C_{17}H_{19}N_3$	0.29	(Urík, 2020)
Venlafaxine	$C_{17}H_{27}NO_2$	0.10 0.01 0.13	(Munaron <i>et al.</i> , 2012) (Techniques and Strategies, 2014) (Urík, 2020)

Citalopram	$C_{20}H_{21}FN_2O$	0.758 (mean Rs) 0.37 (calculated for 14-day exposure period)	(Li, Helm and Metcalfe, 2010) (Fedorova <i>et al.</i> , 2014)
Quetiapine	$C_{21}H_{25}N_3O_2S$	0.12	(Urík, 2020)
Haloperidol	$C_{21}H_{23}ClFNO_2$	0.909, 1 0.036, 2 0.063, 3 0.168, 4 0.09	(Project <i>et al.</i> , 2010) (Urík, 2020)
Carbamazepine	$C_{15}H_{12}N_2O$	0.20 ^b 0.561 (±0.024) 0.397 (±0.018) 0.230 (±0.016) ^f 0.235 (±0.046) ^c 0.348 (±0.116) 0.112 (±0.023) ^c 0.40	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Tapie <i>et al.</i> , 2011)
Paroxetine	$C_{19}H_{20}FNO_3$	0.987(±0.082) 0.942 (±0.044) 0.905 (±0.023) ^f 0.605 (±0.023) ^c 0.883 (±0.545)	(Morin <i>et al.</i> , 2012)

Amitriptyline	C ₂₀ H ₂₃ N	0.448 0.11	(Munaron <i>et al.</i> , 2012) (Urík, 2020)
Fluoxetine	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	0.974(±0.045) (0.694 (±0.009) 0.484 (±0.012) ^f 0.433 (±0.058) ^c 1.37 (±0.35) 0.223 (±0.130) ^c 0.086 (±0.023) ^a 0.012 (±0.007) ^{a,c} 0.200 0.027 ^c	(Morin <i>et al.</i> , 2012)
Bupropion	C ₁₃ H ₁₈ ClNO	0.450, 1 0.084, 2	(Project <i>et al.</i> , 2010)
Alprazolam	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	0.498(±0.074), T=between 15 and 25 °C 0.08	(Miège <i>et al.</i> , 2012) (Urík, 2020)
Sertaline	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	0.909 (mean Rs)	(Li, Helm and Metcalfe, 2010)
Ketoprofen	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	0.135(±0.035) 0.083 (±0.078) ^c 111 ±12, (V0 = 0 cm/s) 213 ±23, (V1 = 2–3 cm/s) 222 ±14, (V2 = 6–7 cm/s) 313 ±49, (V3 = 20 cm/s)	(Morin <i>et al.</i> , 2012) (Guibal, Lissalde and Guibaud, 2020)

f:temperature $\leq 10^{\circ}\text{C}$

h: salted water

1: Pharm Pocis, stirring 25°C

2: Pharm Pocis, non-stirring 5°C

3: Pharm Pocis, non-stirring 25°C

4: Pest Pocis, non-stirring 5°C

5: Pest Pocis, non-stirring 25°C

Irgarol

Για να χαρακτηρίσουμε την κινητική πρόσληψης των ενώσεων-στόχων προσδιορίζονται οι αντίστοιχοι ρυθμοί δειγματοληψίας. Οι ρυθμοί δειγματοληψίας R_s (L/d) μετρούν τον όγκο του νερού που καθαρίζεται από τις ενώσεις-στόχους ανά μονάδα χρόνου. Με άλλα λόγια, ο ρυθμός δειγματοληψίας επιτρέπει τον προσδιορισμό της μάζας των χημικών ουσιών που συσσωρεύονται με παθητικό τρόπο στις συσκευές δειγματοληψίας.

Στις περισσότερες θεωρητικές προσεγγίσεις υποτίθεται ότι ο ρυθμός μεταφοράς μάζας στη φάση λήψης είναι ο ρυθμός δειγματοληψίας R_s , ο οποίος είναι γραμμικά ανάλογος με τη διαφορά μεταξύ της χημικής δραστηριότητας ενός ρύπου στο νερό και στο δειγματολήπτη.

Σύμφωνα με τους (Hernando, Martínez-Bueno and Fernández-Alba, 2005), οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το καθεστώς ροής/ αναταράξεων ή η θερμοκρασία καθορίζουν το ρυθμό δειγματοληψίας των χημικών ουσιών και τα θεωρητικά μοντέλα μπορούν να περιγράψουν την απόδοση του δειγματολήπτη. Το πείραμα που περιγράφηκε από τους (Hernando, Martínez-Bueno and Fernández-Alba, 2005) πραγματοποιήθηκε υπό σταθερές αναταράξεις και σε θερμοκρασία 18°C . Η τιμή 18°C επιλέχθηκε προκειμένου να προσεγγιστούν οι περιβαλλοντικές συνθήκες στο θαλασσινό νερό κατά την περίοδο άνοιξης- καλοκαιριού. Η τιμή R_s για το φυτοφάρμακο irgarol σε διάρκεια 24 ημερών είναι 0,045 L/d με τη χρήση του

Generic – Pocis, ενώ με τη χρήση της εκδοχής του φαρμακευτικού -POCIS είναι 0,032 L/d σε θαλασσινό νερό υπό τις εργαστηριακές συνθήκες.

Ωστόσο, ο ρυθμός πρόσληψης του φυτοφαρμάκου irgarol σύμφωνα με τους (Martínez Bueno *et al.*, 2009) με τιμή $R_s=0,129$ (L/d) ακολουθεί μια γραμμική τάση. Το πείραμα τους διεξήχθη στο εργαστήριο υπό συγκεκριμένες συνθήκες σε θαλασσινό νερό. Ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να αλλάξουν τον ρυθμό πρόσληψης των αναλυτών στους δειγματολήπτες. Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό το ρυθμό πρόσληψης **καθώς μπορεί να τον επεκτείνει**. Επίσης, ο παράγοντας αυτός μπορεί να μειώσει ή να αυξήσει τις διεργασίες της διάχυσης στη διεπαφή μεταξύ μεμβράνης- νερού του POCIS. Η τιμή $R_s= 0,129$ L/d του irgarol αντιστοιχεί σε θερμοκρασία 21° C (Martínez Bueno *et al.*, 2009) και σε διάρκεια χρόνου 7 ημερών.

Από την άλλη πλευρά, σε δείγματα εργαστηριακά των POCIS παρατηρούμε διαφοροποίηση στις τιμές R_s του φυτοφαρμάκου irgarol ή αλλιώς cybutryne που αποτελεί χημική ουσία προτεραιότητας σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανόνα EU Water Framework Directive. Σύμφωνα με τους (Ahrens *et al.*, 2015) διεξήχθη εργαστηριακό πείραμα για τον προσδιορισμό του R_s του Irgarol σε νερό του ποταμού Φύρη από την Ουψάλα της Σουηδίας σε θερμοκρασία 20° C υπό καθεστώς υδατικής αναταραχής μέσω 2 ηλεκτρικών αντλιών. Η λήψη των τιμών R_s έγινε για τις ημέρες 5,11,20,26 με τις τιμές αντίστοιχα $R_s=0,007$ L/d, $R_s=0,14$ L/d, $R_s=0,01$ L/d, $R_s=0,05$ L/d με διαφορετικού τύπου δειγματολήπτη κάθε φορά. (Ahrens *et al.*, 2015)

Trimethoprim

Σύμφωνα με τους (Li, Helm and Metcalfe, 2010), οι τιμές R_s του αντιβιοτικού trimethoprim διαφέρουν ανάλογα με τη θερμοκρασία που επικρατεί κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σε διάρκεια 8 ημερών διεξάγοντας την πειραματική πορεία τους οι (Li, Helm and Metcalfe, 2010) κατέγραψαν τιμές R_s του αντιβιοτικού για θερμοκρασίες 5° C, 15° C και 25° C με αντίστοιχες τιμές $R_s=0,213$ L/d, $R_s=0,411$ L/d, $R_s=0,436$ L/d. Παρατήρησαν ότι ο ρυθμός δειγματοληψίας για το trimethoprim, επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του νερού καθώς αυξάνεται η τιμή R_s όσο

αυξάνεται και η θερμοκρασία. Επίσης, κατά το εργαστηριακό τους πείραμα παρατήρησαν ότι ο ρυθμός δειγματοληψίας R_s φάνηκε να μειώνεται όσο αυξάνεται η πολικότητα της αναλυόμενης ουσίας, ενώ όσο υψηλότερη είναι η ροή του νερού αυξάνεται και η τιμή R_s για την αντίστοιχη χημική ένωση.

Από τη άλλη πλευρά, οι (MacLeod, McClure and Wong, 2007) με το πείραμά τους υπό συνθήκες ροής σε 28° C και σε μη αναδυσόμενες συνθήκες 22° C (pH 6-8) κατέγραψαν τις τιμές $R_s = 0,360$ L/d και $R_s = 0,090$ L/d για το trimethoprim (απεσταγμένο νερό). Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η τιμή R_s είναι διαφορετική υπό συνθήκες διαφορετικού ρυθμού ροής του νερού (MacLeod, McClure and Wong, 2007).

Sulfadiazine

Σύμφωνα με τους (Urík, 2020) η τιμή για το αντιβιοτικό sulfadiazine ήταν $R_s = 0,05$ L/d σε πείραμα που διεξήχθη στον ποταμό Svratka της Τσέχικης Δημοκρατίας με μέση θερμοκρασία 19° C και ταχύτητα ροής του νερού 14,1-49,2 m³/s. Η διάρκεια έκθεσης των POCIS στο πεδίο ήταν 28 ημέρες. Έχει αποδειχθεί ότι οι τιμές R_s της δειγματοληψίας των POCIS μεμονωμένων χημικών ουσιών δεν είναι σταθερές. Η μεταβλητότητα τους προκαλείται από τις συνθήκες έκθεσης συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας του νερού, της γραμμικής ταχύτητας του νερού, του pH, των αιωρούμενων σωματιδίων και της βιορύπανσης. Δεν βρέθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις του R_s σε σχέση με τη θερμοκρασία του νερού. Αυτό δείχνει ότι η μεταβλητότητα του R_s προκαλείται από έναν συνδυασμό πολλών παραγόντων. Δεδομένου ότι οι in situ βαθμονομήσεις πραγματοποιήθηκαν υπό περιβαλλοντικές συνθήκες οι οποίες δεν μπορούσαν να ελεγχθούν, οι (Urík, 2020) δεν μπόρεσαν να προσδιορίσουν κανένα κυρίαρχο περιβαλλοντικό παράγοντα που επηρεάζει τις τιμές R_s . Επίσης, η απουσία συσχέτισης του πειραματικού R_s με τις φυσικοχημικές ιδιότητες σε συνδυασμό με την έλλειψη μηχανιστικής κατανόησης της πρόσληψης της ένωσης στο POCIS, έδειξε ότι η πρακτική εκτίμηση των υδατικών συγκεντρώσεων από την πρόσληψη στο POCIS εξαρτάται από τα ειδικά για την κάθε ένωση πειραματικά δεδομένα βαθμονόμησης.

Από την άλλη πλευρά, οι (Guibal, Lissalde and Guibaud, 2020) στο πείραμά τους διάρκειας 21 ημέρες με συνθήκες θερμοκρασίας 16° C, σε νερό βρύσης από τη Λιμόζ της Γαλλίας δημιούργησαν 4 διαφορετικές ροές νερού με ταχύτητες V_0 , V_1 , V_2 και V_3 . Οι τιμές R_s που βρέθηκαν ήταν $R_{s0}=49$ L/d, $R_{s1}=89$ L/d, $R_{s2}=149$ L/d, $R_{s3}=202$ L/d για τις ταχύτητες ροής αντίστοιχα $V_0=0$ cm/s, $V_1=2-3$ cm/s, $V_2=6-7$ cm/s, $V_3=20$ cm/s. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της ταχύτητας ροής προκάλεσε και αύξηση στην δειγματοληψία του αντιβιοτικού sulfadiazine. Η αύξηση του ρυθμού δειγματοληψίας της χημικής ένωσης σε ορισμένες περιπτώσεις οφείλεται σε μείωση του πάχους του οριακού στρώματος του νερού στην περιοχή της μεμβράνης του POCIS που συμβαίνει λόγω της αύξησης της ταχύτητας ροής. Η επίδραση της μείωσης του οριακού στρώματος διάχυσης στην πρόσληψη στοχευμένων ενώσεων είναι επί του παρόντος γνωστή και έχει συζητηθεί για διάφορους τύπους παθητικών δειγματοληπτών. (Guibal, Lissalde and Guibaud, 2020)

4.7 Συμπεράσματα και Συζήτηση

- Η εκτεταμένη χρήση των αναλυτών- στόχων και κατά συνέπεια η διασπορά τους στα θαλάσσια ύδατα και ιδιαίτερα στα ύδατα που υπάρχουν εγκαταστάσεις υδατοκαλλιέργειας, υποδεικνύει την ανάγκη συνεχούς παρακολούθησης του υδάτινου περιβάλλοντος και των οργανισμών που ζουν σε αυτό.
- Η στιγμιαία δειγματοληψία σε συνδυασμό με μια επικυρωμένη μέθοδο SPE παρέχει αξιόπιστα ποσοτικά αποτελέσματα, αλλά τα χρονικά διαστήματα μεταξύ της δειγματοληψίας μπορεί να οδηγήσουν σε ελάχιστη ερμηνεία των πραγματικών περιβαλλοντικών επιπέδων συγκέντρωσης, λόγω απώλειας ανίχνευσης στοιχείων της ρύπανσης.
- Όσον αφορά την ανίχνευση των χημικών ενώσεων –στόχων των φαρμακευτικών ενώσεων, το trimethoprim και το sulfadiazine ανιχνεύθηκαν σε επίπεδα ιχνών ppt τον μήνα Απρίλιο. Τα επίπεδα συγκέντρωσης για το trimethoprim είναι 0,11 ng/L και για το sulfadiazine από 5,95 ng/L, ανάλογα με τις αντίστοιχες τιμές R_s που βρέθηκαν εργαστηριακά .

- Όσον αφορά την ανίχνευση των χημικών ενώσεων –στόχων των φυτοπροστατευτικών ενώσεων το irgarol 1051 ανιχνεύθηκε σε 1,7 ng/L μόνο τον μήνα Σεπτέμβριο.
- Η παθητική δειγματοληψία μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για ερευνητικούς σκοπούς για την εξασφάλιση του ποιοτικού ελέγχου του θαλασσινού νερού από τους αναδυόμενους ρύπους, λόγω της ενοποιητικής της φύσης, αν και οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν τους ρυθμούς δειγματοληψίας και κατά συνέπεια τις μετρούμενες συγκεντρώσεις, υποδεικνύοντας ότι απαιτείται περαιτέρω εργασία για να βελτίωση της απόδοσης.
- Οι τεχνικές σημειακής και παθητικής δειγματοληψίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των ρύπων και των πιθανών κινδύνων για τα υδάτινα περιβάλλοντα, ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω βελτιώσεις, όπως οι ειδικοί ρυθμοί δειγματοληψίας και η συχνότητα δειγματοληψίας, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η σημασία τους για την υδάτινη παρακολούθηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

‘16.6.2009’ (2009), pp. 11–22.

Agency, T. (2014) ‘Informatics developmen t agency’, 2005, pp. 2010–2012.

Ahrens, L. *et al.* (2015) ‘Characterization of five passive sampling devices for monitoring of pesticides in water’, *Journal of Chromatography A*, 1405, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.chroma.2015.05.044.

Allan, I. J. *et al.* (2010) ‘Short-term exposure testing of six different passive samplers

for the monitoring of hydrophobic contaminants in water', *Journal of Environmental Monitoring*, 12(3), pp. 696–703. doi: 10.1039/b921326k.

Assoumani, A. *et al.* (2014) 'Use of passive stir bar sorptive extraction as a simple integrative sampling technique of pesticides in freshwaters: Determination of sampling rates and lag-phases', *Journal of Chromatography A*, 1333, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.chroma.2014.01.063.

Balmer, J. E. *et al.* (2019) 'Levels and trends of current-use pesticides (CUPs) in the arctic: An updated review, 2010–2018', *Emerging Contaminants*, 5, pp. 70–88. doi: 10.1016/j.emcon.2019.02.002.

Bélanger, J. M. R., Jocelyn Paré, J. R. and Sigouin, M. (1997) 'Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications', *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, 18(C), pp. 37–59. doi: 10.1016/S0167-9244(97)80011-X.

Bojarski, B., Kot, B. and Witeska, M. (2020) 'Antibacterials in aquatic environment and their toxicity to fish', *Pharmaceuticals*, 13(8), pp. 1–24. doi: 10.3390/ph13080189.

Booij, K. and Chen, S. (2018) 'Review of atrazine sampling by polar organic chemical integrative samplers and Chemcatcher', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(7), pp. 1786–1798. doi: 10.1002/etc.4160.

Branchet, P. *et al.* (2021) 'Pharmaceuticals in the marine environment: What are the present challenges in their monitoring?', *Science of the Total Environment*, 766, p. 142644. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142644.

Brumovský, M. *et al.* (2017) 'Contaminants of emerging concern in the open sea waters of the Western Mediterranean', *Environmental Pollution*, 229, pp. 976–983. doi: 10.1016/j.envpol.2017.07.082.

Bueno, M. J. M. *et al.* (2012) 'Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring', *Environmental Pollution*, 164, pp. 267–273. doi:

10.1016/j.envpol.2012.01.038.

Charriau, A. *et al.* (2016) 'Overview of the Chemcatcher® for the passive sampling of various pollutants in aquatic environments Part A: Principles, calibration, preparation and analysis of the sampler', *Talanta*, 148, pp. 556–571. doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.064.

Comeau, F. *et al.* (2008) 'The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada', *Science of the Total Environment*, 396(2–3), pp. 132–146. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.02.031.

Cortes, L. G. *et al.* (2020) *JRC Technical Report: Selection of substances for the 3rd Watch List under WFD*. doi: 10.2760/194067.

Council, O. F. T. H. E. (2020) 'Directive 2013/11/EU of the European Parliament and of the Council', *Fundamental Texts On European Private Law*, 2013(July), pp. 1–17. doi: 10.5040/9781782258674.0032.

Council, T. H. E., The, O. F. and Union, E. (2006) 'L 328/14', *Regulation*.

Donna (2012) 'LTQ Orbitrap XL混合线性离子阱质谱仪对绿茶和红茶提取物的代谢组学分析', *中国食品*, (22), pp. 82–85. Available at: <http://lib.cqvip.com/qk/44140303.html>.

El-Aneed, A., Cohen, A. and Banoub, J. (2009) 'Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers', *Applied Spectroscopy Reviews*, 44(3), pp. 210–230. doi: 10.1080/05704920902717872.

EMA (1997) 'The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - Veterinary Medicines Evaluation Unit. Committee for veterinary medicinal products teflubenzuron summary report (1)', *Emea/Mrl/221/97-Final*, (May).

Eryavuz Onmaz, D. *et al.* (2021) 'Determination of serum carbamazepine and its metabolite by validated tandem mass spectrometric method and the effect of

carbamazepine on various hematological and biochemical parameters', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 205, p. 114299. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114299.

Ετqρα, S. O. *et al.* (2001) 'οδηγία 2001/83', (6).

European Commission (2008) 'Οδηγία 2008/56/Εκ Του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου Και Του Συμβουλίου Της 17ης Ιουνίου 2008 Περί Πλαισίου Κοινοτικής Δράσης Στο Πεδίο Της Πολιτικής Για Το Θαλάσσιο Περιβάλλον (Οδηγία-Πλαίσιο Για Τη Θαλάσσια Στρατηγική)', *Επίσημη Εφημερίδα Της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Fedorova, G. *et al.* (2014) 'A passive sampling method for detecting analgesics, psycholeptics, antidepressants and illicit drugs in aquatic environments in the Czech Republic', *Science of the Total Environment*, 487(1), pp. 681–687. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.091.

Górecki, T. and Namienik, J. (2002) 'Passive sampling', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 21(4), pp. 276–291. doi: 10.1016/S0165-9936(02)00407-7.

Grandy, J. J. *et al.* (2019) 'Introducing a mechanically robust SPME sampler for the on-site sampling and extraction of a wide range of untargeted pollutants in environmental waters', *Environmental Pollution*, 252, pp. 825–834. doi: 10.1016/j.envpol.2019.06.013.

Guibal, R., Lissalde, S. and Guibaud, G. (2020) 'Experimental Estimation of 44 Pharmaceutical Polar Organic Chemical Integrative Sampler Sampling Rates in an Artificial River under Various Flow Conditions', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(6), pp. 1186–1195. doi: 10.1002/etc.4717.

Gulkowska, A. *et al.* (2007) 'The occurrence of selected antibiotics in Hong Kong coastal waters', *Marine Pollution Bulletin*, 54(8), pp. 1287–1293. doi: 10.1016/j.marpolbul.2007.04.008.

He, X. *et al.* (2012) 'Residues of fluoroquinolones in marine aquaculture environment of the Pearl River Delta, South China', *Environmental Geochemistry and Health*, 34(3),

pp. 323–335. doi: 10.1007/s10653-011-9420-4.

Hernando, M. D., Martínez-Bueno, M. J. and Fernández-Alba, A. R. (2005) 'Seawater quality control of microcontaminants in fish farm cage systems: Application of passive sampling devices', *Boletín - Instituto Español de Oceanografía*, 21(1–4), pp. 37–46.

Huckins, J. N., Tubergen, M. W. and Manuweera, G. K. (1990) 'Semipermeable membrane devices containing model lipid: A new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential', *Chemosphere*, 20(5), pp. 533–552. doi: 10.1016/0045-6535(90)90110-F.

Jia, A. *et al.* (2011) 'Occurrence and source apportionment of sulfonamides and their metabolites in Liaodong Bay and the adjacent Liao River basin, North China', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(6), pp. 1252–1260. doi: 10.1002/etc.508.

Jiang, J. J., Lee, C. L. and Fang, M. Der (2014) 'Emerging organic contaminants in coastal waters: Anthropogenic impact, environmental release and ecological risk', *Marine Pollution Bulletin*, 85(2), pp. 391–399. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.12.045.

Kabir, A., Zendehdel, R. and Tayefeh-Rahimian, R. (2018) 'Dioxin exposure in the manufacture of pesticide production as a risk factor for death from prostate cancer: A meta-analysis', *Iranian Journal of Public Health*, 47(2), pp. 148–155.

Kaklamanos, G., Aprea, E. and Theodoridis, G. (2012) *Mass Spectrometry, Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*. doi: 10.1016/B978-0-12-384862-8.00009-1.

Karkalousos, P. *et al.* (2015) 'Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Απόδοσης) Στην Κλινική Χημεία. Βασικές Αρχές Και Παραδείγματα.', *Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας*. Available at: <http://hdl.handle.net/11419/5388>.

Kim, H. and Ph, D. (2018) 'Evaluation of Exposure to and Human Health Risks from PCPPs in Drinking Water from Lake Erie'.

Kingston, J. K. *et al.* (2000) 'Development of a novel passive sampling system for the time-averaged measurement of a range of organic pollutants in aquatic

environments', *Journal of Environmental Monitoring*, 2(5), pp. 487–495. doi: 10.1039/b003532g.

Kot-Wasik, A. *et al.* (2007) 'Advances in passive sampling in environmental studies', *Analytica Chimica Acta*, 602(2), pp. 141–163. doi: 10.1016/j.aca.2007.09.013.

Lara-Martín, P. A. *et al.* (2014) 'Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY)', *Marine Pollution Bulletin*, 85(2), pp. 710–719. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.022.

León, V. M. *et al.* (2019) 'PAHs, pesticides, personal care products and plastic additives in plastic debris from Spanish Mediterranean beaches', *Science of the Total Environment*, 670, pp. 672–684. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.216.

Li, H., Helm, P. A. and Metcalfe, C. D. (2010) 'Sampling in the great lakes for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances using the passive polar organic chemical integrative sampler', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), pp. 751–762. doi: 10.1002/etc.104.

Li, Y. *et al.* (2018) 'Selection of performance reference compound (PRC) for passive sampling of pharmaceutical residues in an effluent dominated river', *Chemosphere*, 211, pp. 884–892. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.179.

Liu, Q., Shi, J. and Jiang, G. (2012) 'Application of graphene in analytical sample preparation', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 37, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.trac.2012.03.011.

Luis, F. and Moncayo, G. (no date) *No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析*Title.

Luo, D. *et al.* (2016) 'Exposure to organochlorine pesticides and non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis of observational studies', *Scientific Reports*, 6(January), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep25768.

MacLeod, S., McClure, E. and Wong, C. (2007) 'Laboratory calibration and field deployment of the Polar Organic Chemical Integrative Sampler for pharmaceuticals

and personal care products in wastewater and surface water', *Environmental Toxicology and Chemistry*, preprint(2007), p. 1. doi: 10.1897/07-238.

Madrid, Y. and Zayas, Z. P. (2007) 'Water sampling: Traditional methods and new approaches in water sampling strategy', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26(4), pp. 293–299. doi: 10.1016/j.trac.2007.01.002.

Madureira, T. V. *et al.* (2010) 'Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal)', *Science of the Total Environment*, 408(22), pp. 5513–5520. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.07.069.

Martin, F. L. *et al.* (2018) 'Increased exposure to pesticides and colon cancer: Early evidence in Brazil', *Chemosphere*, 209, pp. 623–631. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.118.

Martínez Bueno, M. J. *et al.* (2009) 'Application of passive sampling devices for screening of micro-pollutants in marine aquaculture using LC-MS/MS', *Talanta*, 77(4), pp. 1518–1527. doi: 10.1016/j.talanta.2008.09.047.

Mathon, B. *et al.* (2022) 'Polar organic chemical integrative samplers as an effective tool for chemical monitoring of surface waters – Results from one-year monitoring in France', *Science of the Total Environment*, 824. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153549.

McEneff, G. *et al.* (2014) 'A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves', *Science of the Total Environment*, 476–477, pp. 317–326. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.123.

Miège, C. *et al.* (2012) 'Polar organic chemical integrative sampler (POCIS): Application for monitoring organic micropollutants in wastewater effluent and surface water', *Journal of Environmental Monitoring*, 14(2), pp. 626–635. doi: 10.1039/c1em10730e.

Morin, N. *et al.* (2012) 'Chemical calibration, performance, validation and applications of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in aquatic environments', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 36, pp. 144–175. doi:

10.1016/j.trac.2012.01.007.

Munaron, D. *et al.* (2012) 'Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers', *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 114, pp. 82–92. doi: 10.1016/j.ecss.2011.09.009.

Nannou, C. I., Boti, V. I. and Albanis, T. A. (2018) 'Trace analysis of pesticide residues in sediments using liquid chromatography–high-resolution Orbitrap mass spectrometry', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(7), pp. 1977–1989. doi: 10.1007/s00216-018-0864-6.

Niehoff, N. M. *et al.* (2016) 'Childhood and adolescent pesticide exposure and breast cancer risk', *Epidemiology*, 27(3), pp. 326–333. doi: 10.1097/eDe.0000000000000451.

Olsen, J. V. *et al.* (2009) 'A dual pressure linear ion trap orbitrap instrument with very high sequencing speed', *Molecular and Cellular Proteomics*, 8(12), pp. 2759–2769. doi: 10.1074/mcp.M900375-MCP200.

Ouyang, G. and Pawliszyn, J. (2007) 'Configurations and calibration methods for passive sampling techniques', *Journal of Chromatography A*, 1168(1–2), pp. 226–235. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.133.

Paul, K. C. *et al.* (2016) 'Organophosphate Pesticide Exposures , Nitric Oxide Synthase Gene Variants ', 570(5), pp. 570–577.

Project, D. *et al.* (2010) 'Laboratory calibration of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for passive sampling of pharmaceuticals in aquatic environments'.

Saleh, A., Sheijooni Fumani, N. and Molaei, S. (2014) 'Microfunnel-supported liquid-phase microextraction: Application to extraction and determination of Irgarol 1051 and diuron in the Persian Gulf seawater samples', *Journal of Chromatography A*, 1356, pp. 32–37. doi: 10.1016/j.chroma.2014.06.057.

Salim, F. and Górecki, T. (2019) 'Theory and modelling approaches to passive sampling', *Environmental Science: Processes and Impacts*, 21(10), pp. 1618–1641. doi:

10.1039/c9em00215d.

Schratter-Sehn, A. U. *et al.* (1992) 'Prävention Lokaler Schleimhautläsionen Während Oropharynx-Bestrahlung Durch Einen Plombenschutz', *Strahlentherapie und Onkologie*, 168(1), pp. 35–38.

Scientific, T. F. (1800) 'Thermo - normalizovaná kolizní energie - brochure'.

Tapie, N. *et al.* (2011) 'Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water', *Water Science and Technology*, 63(10), pp. 2418–2426. doi: 10.2166/wst.2011.129.

Techniques, S. and Strategies, S. (2014) 'Addressing Blind Spots in the Assessment of Pesticides in Surface Waters: A Complete Screening using Trace-Level Mass Spectrometry Techniques and Complementary', (22246).

Thermo Scientific (2010) 'TSQ Series Manual', (October).

Thomatou, A. A. *et al.* (2011) 'Passive sampling of selected pesticides in aquatic environment using polar organic chemical integrative samplers', *Environmental Science and Pollution Research*, 18(7), pp. 1222–1233. doi: 10.1007/s11356-010-0436-6.

Thomatou, A. A. *et al.* (2015) 'Laboratory calibration of twelve pesticides using polar organic chemical integrative samplers', *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95(13), pp. 1230–1241. doi: 10.1080/03067319.2015.1070405.

Urík, J. (2020) 'Optimisation, calibration and field testing of passive sampling devices for monitoring of polar organic compounds'.

Valenzuela, E. F., Menezes, H. C. and Cardeal, Z. L. (2020) 'Passive and grab sampling methods to assess pesticide residues in water. A review', *Environmental Chemistry Letters*, 18(4), pp. 1019–1048. doi: 10.1007/s10311-020-00998-8.

Vrana, B. *et al.* (2005) 'Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water', *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(10), pp. 845–868. doi:

10.1016/j.trac.2005.06.006.

Vrana, B. *et al.* (2021) 'In situ calibration of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring of pharmaceuticals in surface waters', *Environmental Pollution*, 269. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116121.

Wang, L. *et al.* (2020) 'Sampling rate of polar organic chemical integrative sampler (POCIS): Influence factors and calibration methods', *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(16). doi: 10.3390/app10165548.

Weigel, S., Kuhlmann, J. and Hühnerfuss, H. (2002) 'Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: Occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea', *Science of the Total Environment*, 295(1–3), pp. 131–141. doi: 10.1016/S0048-9697(02)00064-5.

Zhao, W. *et al.* (2006) 'On-rod standardization technique for time-weighted average water sampling with a polydimethylsiloxane rod', *Journal of Chromatography A*, 1124(1–2), pp. 112–120. doi: 10.1016/j.chroma.2006.05.062.

Zheng, Q. *et al.* (2012) 'Occurrence and distribution of antibiotics in the Beibu Gulf, China: Impacts of river discharge and aquaculture activities', *Marine Environmental Research*, 78, pp. 26–33. doi: 10.1016/j.marenvres.2012.03.007.

Ziarrusta, H. *et al.* (2015) 'Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion', *Journal of Chromatography A*, 1391(1), pp. 18–30. doi: 10.1016/j.chroma.2015.02.072.

Zilfidou, E. *et al.* (2018) 'Fabric phase sorptive extraction: Current state of the art and future perspectives', *Separations*, 5(3), pp. 1–23. doi: 10.3390/separations5030040.

Zohdi, E. and Abbaspour, M. (2019) 'Harmful algal blooms (red tide): a review of causes, impacts and approaches to monitoring and prediction', *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(3), pp. 1789–1806. doi: 10.1007/s13762-018-2108-x.

Αλμπάνης, Τ. (1999) 'Ρύπανση Και Τεχνολογία Προστασίας Περιβάλλοντος'.

‘Αναπτυξη μεθοδων προσδιορισμου ενωσεων που προκαλουν ορμονικες διαταραχες με υγροχρωματογραφια – φασματομετρια μαζων’ (2010).

Εργασία, Μ. Δ. (2021) ‘Γεωπονικο Πανεπιστημιο Αθηνων Τμημα Αξιοποιησης Φυσικων Πορων & Γεωργικης Μηχανικης Προγραμμα Μεταπτυχιακων Σπουδων Φυσικοι Ποροι Γεωπεριβαλλον Γεωπληροφορικη Και Γεωργικη Μηχανικη’.

Ευρωπα, Τ. Η. Σ. and Ενωσησ, Ί. Κ. Η. Σ. (1998) ‘ΔΗγια 98/83/Εκ Τ Υ Συμβ Υλι Υ Της 3ΗΣ Ν Εμ Ρ Υ 1998 Σ Ετικ Με Την Π Ι Τητα Τ Υ Νερ Υ Ανθρω Πινης Καταν Λωσης’, 1998(8), pp. 32–54.

Ευρωπαϊκή Επιτροπή (200AD) ‘Οδηγια 2000/60/Εκ Του Ευρωπαϊκου Κοινοβουλιου Και Του Συμβουλιου Της 23ΗΣ Οκτωβρίου 2000’, *Το Ευρωπαϊκο Κοινοβουλιο Και Το Συμβουλιο Της Ευρωπαϊκης Ενωσης*, p. 90.

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο and Ευρωπαϊκό Συμβούλιο (2008) ‘Οδηγία 2008/105/Εκ’, *Επίσημη Εφημερίδα Της Ευρωπαϊκής Ένωσης*, 2007, pp. 84–97.

Θωματος, Α. Α. *et al.* (2012) ‘Πανεπιστημιο Δυτικης ελλαδας’.

Καραμανλής, Ξ. Ν. (2018) ‘Υδατινο Περιβαλλον Αλληλεπιδρασεις Μεταξυ Περιβαλλοντος Και Υδατοκαλλιεργειων’, *Σημειώσεις Μαθήματος: Υδάτινο Περιβάλλον-Αλληλεπιδράσεις Μεταξύ Περιβάλλοντος Και Υδατοκαλλιεργειών*, p. 61.

Καψή (2020) ‘Αναπτυξη αναλυτικων μεθοδων προσδιορισμου παρασιτοκτονων σε ιχθυοκαλλιεργειες και εκτιμηση επικινδυνοτητας’.

Λιοδάκης, Σ. (2001) *Αναλυτική Χημεία, Αναλυτική Χημεία*. Available at: http://www.lib.ntua.gr/gr/el_sources/ebooks/liodakis/index.htm.

‘ΟΔΗΓΙΑ 2001/82/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ’ (2012), 25.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

<https://books.google.gr/books?id=tWum1pbwKmMC&pg=PA402&dq=%27trimethoprim%27+%27LOD%27&hl=el&sa=X&ved=2ahUKEwjFIKz2xtb0AhV0QfEDHefKAS0Q6AF6BAGCEAI#v=onepage&q='trimethoprim'%20'LOD'&f=false>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548681/>

http://www.endmemo.com/sconvert/mg_mlug_ml.php

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim>

<https://www.umweltprobenbank.de/en/documents/profiles/analytes/21823>

<https://www.paint.org/epa-cybutryne-interim/>

https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=ox1bWqYqZT4C&oi=fnd&pg=PR23&dq=watson+sparkman+mass+spectrometry&ots=GhzfsHTNU3&sig=4Bz7rMfIdxRQOYMx2O9c8N2KN6o&redir_esc=y#v=onepage&q=watson%20sparkman%20mass%20spectrometry&f=false

https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=pqhr5XQZDtUC&oi=fnd&pg=PR11&dq=De+Hoffmann+E+2007+principles+and+applications&ots=6odTxbR1tZ&sig=CN0FGbLubWdZpZmWt6MjU329R_A&redir_esc=y#v=onepage&q=De%20Hoffmann%20E%202007%20principles%20and%20applications&f=false

http://www.anc-chem.com/products-detail.php?product_id=47#

https://www.lorric.com/en/WhyLORRIC/Material/psu-material-datasheet?fbclid=IwAR2r1naGn3c7ZxFP_80i3P4p7G5FJ0DyTIViDa-tlNiLM9Pyrrv3oIRUp1Q