



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ

ΓΑΤΙΔΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΛΟΓΟΣ

Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων, μελέτη της τοξικότητάς τους και ανίχνευσή τους στο περιβάλλον

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μυτιλήνη 2005

ΣΥΝΘΕΣΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

κ. Λέκκας Θεμιστοκλής, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τμήματος Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου (Επιβλέπων)

κ. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

κ. Βουδριάς Ευάγγελος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης (μέλος Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής)

κ. Χαλβαδάκης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τμήματος Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου (μέλος Επταμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης)

κ. Τσιρτσής Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Επιστήμης της Θάλασσας του Πανεπιστημίου Αιγαίου (μέλος Επταμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης)

κ. Γκολφινόπουλος Σπυρίδων, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Οικονομίας και Διοίκησης του Πανεπιστημίου Αιγαίου (μέλος Επταμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης)

κ. Θωμαΐδης Νικόλαος, Λέκτορας Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών (μέλος Επταμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης)

Στον πατέρα μου που δεν πρόλαβε να δει το τέλος...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διατριβής αυτής ήταν η διερεύνηση της συμπεριφοράς και της τοξικότητας δύο ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν για πρώτη φορά διάφορες μέθοδοι ταυτόχρονης απομόνωσης και προσδιορισμού των βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων irgarol 1051 (2-methylthio-4-tert-butylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine) και diuron [1-(3,4 dichlorophenyl) 3,3 dimethyl urea] καθώς και των κύριων μεταβολιτών τους, M1 (2-methylthio-4-tert-butylamino-s-triazine), DCPMU [1-(3,4 dichlorophenyl)-3 methyl urea], DCPU [1-(3,4 dichlorophenyl) urea] και DCA (3,4 dichloroaniline) σε δείγματα θαλασσινού νερού και θαλάσσιου ιζήματος.

Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των έξι ουσιών με υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (LC-DAD) σε δείγματα θαλασσινού νερού. Κατά τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης εξετάστηκαν ο τύπος του προσροφητικού υλικού των φυσίγγων εκχύλισης και ο τύπος του οργανικού διαλύτη έκλουσης. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού των ουσιών, ενώ παράλληλα εξετάστηκε και η ανθεκτικότητα της χρωματογραφικής μεθόδου σε σχέση με τις επιπτώσεις μικρών μεταβολών τριών παραγόντων που σχετίζονται με αυτή (θερμοκρασία χρωματογραφικής στήλης, ροή κινητής φάσης, αρχική ισχύς του ακετονιτριλίου) πάνω στο χρόνο συγκράτησης, το διαχωρισμό και το εμβαδόν κορυφής των έξι ουσιών. Η βέλτιστη μέθοδος που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει απομόνωση των ουσιών από το θαλασσινό νερό με την τεχνική της μη αυτοματοποιημένης εκχύλισης στερεής φάσης χρησιμοποιώντας φύσιγγες C18 και έκλουση των ουσιών με μεθανόλη. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε αποδείχθηκε επαναλήψιμη και αναπαραγώγιμη με σχετική τυπική απόκλιση < 14 % για όλες τις ουσίες. Οι ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν ήταν πάνω από 82 % για όλες τις ουσίες εκτός από τη DCA για την οποία παρατηρήθηκαν χαμηλές ανακτήσεις (30 %). Τα όρια ανίχνευσης των ουσιών κυμάνθηκαν μεταξύ 0,005 (DCPMU) και 0,026 (M1) $\mu\text{g L}^{-1}$.

Επίσης, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των έξι ουσιών σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με LC-DAD. Η εκχύλιση των ουσιών από το ιζήμα επιτεύχθηκε με χρήση υπερήχων, χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως διαλύτη εκχύλισης. Κατά τη βελτιστοποίηση αυτής της διαδικασίας εξετάστηκαν ο όγκος του διαλύτη, η ποσότητα του

εκχυλιζόμενου ιζήματος, καθώς και η διάρκεια και η θερμοκρασία της εκχύλισης. Ο καθαρισμός των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση φυσίγγων εκχύλισης στερεής φάσης C18. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε αποδείχθηκε επαναλήψιμη και αναπαραγωγίμη με σχετική τυπική απόκλιση < 10 % για όλες τις ουσίες, εκτός από τη DCA για την οποία παρατηρήθηκαν σχετικές τυπικές αποκλίσεις έως και 15 %. Επιτεύχθηκαν ικανοποιητικές ανακτήσεις (πάνω από 80 %) για όλες τις ουσίες εκτός από τη DCA για την οποία οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 35 και 50 %. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε κυμάνθηκαν μεταξύ 1,7 (DCPU) και 4,0 (DCPMU) ng g⁻¹ ξηρού βάρους ιζήματος.

Επιπλέον, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μέθοδος εκχύλισης του irgarol 1051 και του κύριου μεταβολίτη του M1 από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με χρήση μικροκυμάτων και αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η απομόνωση των ουσιών από το ίζημα επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη εκχύλισης. Βελτιστοποιήθηκαν οι βασικές παράμετροι που σχετίζονται με τη διαδικασία της εκχύλισης και συγκεκριμένα η ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος, ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, η διάρκεια και η θερμοκρασία της εκχύλισης. Ο καθαρισμός των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση φυσίγγων εκχύλισης στερεής φάσης C18. Ικανοποιητική απομόνωση των δύο ουσιών από το υπόστρωμα παρατηρήθηκε όταν 3 g θαλάσσιου ιζήματος εκχυλίστηκαν με 30 mL νερού για 10 min στους 115 °C. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης προσαρμοσμένης στη μήτρα του δείγματος χρησιμοποιώντας εσωτερικό πρότυπο (atrazine-d₅). Επιτεύχθηκαν ανακτήσεις πάνω από 85 % και για τις δύο ουσίες για τα επίπεδα των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν (σχετική τυπική απόκλιση ≤ 14 %). Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε βρέθηκαν να είναι 0,9 και 1,7 ng g⁻¹ ξηρού βάρους ιζήματος για τον M1 και το irgarol 1051, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η παρουσία των έξι ουσιών σε δείγματα θαλασσινού νερού και θαλάσσιου ιζήματος, τα οποία συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια ενός έτους από δύο διαφορετικές θαλάσσιες περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου και συγκεκριμένα από το Shoreham Harbour (λιμάνι) και τη Brighton marina (μαρίνα). Η απομόνωση των ουσιών από το νερό πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση στερεής φάσης σε φύσιγγες C18. Από το ίζημα οι ουσίες irgarol 1051 και M1 απομονώθηκαν με χρήση μικροκυμάτων, ενώ το diuron και οι κύριοι μεταβολίτες του απομονώθηκαν με χρήση υπερήχων. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων νερού και ιζήματος για τον προσδιορισμό των τριαζινών (irgarol 1051, M1) πραγματοποιήθηκε με GC-MS, ενώ για τις

ουρίες (diuron, DCPMU, DCPU) και την ανιλίνη (DCA) με LC-DAD. Ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις του irgarol 1051 στο νερό έως 136 και 102 ng L⁻¹ και στο ίζημα έως 40 και 49 ng g⁻¹ για το Shoreham Harbour και τη Brighton marina, αντίστοιχα. Ο M1 ανιχνεύτηκε στο νερό σε συγκεντρώσεις έως 59 (και έως 23 ng g⁻¹ στο ίζημα) και 37 ng L⁻¹ (και έως 5,6 ng g⁻¹ στο ίζημα) για το Shoreham Harbour και τη Brighton marina, αντίστοιχα. Από τις υπόλοιπες ουσίες στο νερό ανιχνεύτηκε μόνο το diuron σε συγκεντρώσεις έως 366 (Shoreham Harbour) και 236 ng L⁻¹ (Brighton marina), ενώ στο ίζημα ανιχνεύτηκε μόνο η DCPMU σε συγκεντρώσεις έως 122 (Shoreham Harbour) και 56 ng g⁻¹ (Brighton marina) για τις δύο περιοχές δειγματοληψίας. Στο ίζημα ανιχνεύτηκε και το diuron όμως μόνο σε δύο δείγματα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των ουσιών παρατηρήθηκαν και στις δύο περιοχές κατά την περίοδο που η δραστηριότητα των σκαφών αναψυχής ήταν έντονη (Μάιος – Ιούλιος) καθώς και κατά την περίοδο προετοιμασίας των σκαφών (Ιανουάριος - Φεβρουάριος). Χωρικά, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στα σημεία όπου υπήρχε μεγάλη πυκνότητα σκαφών αναψυχής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μη παραμετρικής συσχέτισης κατά Spearman, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων του irgarol 1051 και του M1 καθώς και μεταξύ του οργανικού άνθρακα και του μικρού κλάσματος των δειγμάτων ιζήματος από το λιμάνι με τις συγκεντρώσεις των δύο ουσιών.

Τέλος, μελετήθηκε για πρώτη φορά η τοξικότητα των ουσιών irgarol 1051, diuron, M1 και DCA πάνω σε δύο θαλάσσιους φυτοπλαγκτονικούς μικροοργανισμούς το χλωροφύκος *Dunaliella tertiolecta* και το διάτομο *Naviculla forcipata*. Οι τιμές της EC₅₀ για τους δύο μικροοργανισμούς κυμάνθηκαν από 1,1 (irgarol 1051) έως 6381 (DCA) µg L⁻¹ (*Dunaliella tertiolecta*) και από 0,6 (irgarol 1051) έως 6269 (DCA) µg L⁻¹ (*Naviculla forcipata*). Το διάτομο αποδείχθηκε πιο ευαίσθητο στην παρουσία όλων σχεδόν των ουσιών εκτός του diuron. Η σειρά μειούμενης τοξικότητας των ουσιών και για τους δύο μικροοργανισμούς βρέθηκε να είναι: irgarol 1051 > diuron > M1 > DCA.

ABSTRACT

The aim of this study was the investigation of the behavior and the toxicity of two antifouling booster biocides. In the present thesis, various methods were developed for the simultaneous determination of irgarol 1051 (2-methylthio-4-tert-butylamino-6-cyclopropylamino-s-triazine) and diuron [1-(3,4 dichlorophenyl) 3,3 dimethyl urea] as well as their main metabolites M1 (2-methylthio-4-tert-butylamino-s-triazine), DCPMU [1-(3,4 dichlorophenyl)-3 methyl urea], DCPU [1-(3,4 dichlorophenyl) urea], DCA (3,4 dichloroaniline) in seawater and marine sediment samples.

A method for the simultaneous determination of the six substances in seawater by high performance liquid chromatography – diode array detector (LC-DAD) was developed for the first time. The optimization of the extraction procedure included the type of the sorbent and the type of the organic solvent used for the elution step. Furthermore, the chromatographic separation of the compounds was optimized and the robustness of the developed method was also tested in respect to the effect of three factors (column temperature, flow rate and initial strength of acetonitrile) on the retention times, peak resolution and peak area of the six compounds. The optimum procedure included the extraction of the six substances with off-line solid phase extraction using C18 cartridges and elution with methanol. The developed method was reproducible with a relative standard deviation (RSD) < 14% for all the compounds. Recoveries higher than 82 % were achieved for all the compounds, except DCA for which the recoveries obtained were low (30 %). Limits of detection of the compounds ranged between 0.005 (DCPMU) and 0.026 (M1) $\mu\text{g L}^{-1}$.

Then, a method for the simultaneous determination of the six substances in marine sediments by LC-DAD was developed. The isolation of the compounds from the sediment was accomplished using methanolic ultrasonic extraction. The optimization of the extraction procedure included the variation of the volume of the extraction solvent, the amount of the extracted sediment, the duration and the temperature of sonication. Clean-up of the extracts was accomplished by solid phase extraction using C18 cartridges. The developed method was reproducible with RSDs < 10 % for all the compounds, apart from DCA for which RSDs up to 15 % were obtained. Satisfactory recoveries (higher than 80 %) were achieved for all the compounds

except DCA for which the recoveries ranged between 35 and 50 %. Limits of detection of the six substances ranged between 1.7 (DCPU) and 4.0 (DCPMU) ng g⁻¹ dry weight of sediment.

A method for the determination of irgarol 1051 and its main metabolite M1 from marine sediment using microwave assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) was developed for the first time. The isolation of the compounds from the sediment samples was accomplished using water as an extraction solvent. Carefully, all the key parameters related to the extraction procedure (amount of the sediment, volume of the extraction solvent, duration and temperature of the extraction) were optimized. Clean-up of the extracts was accomplished by solid phase extraction using C18 cartridges. Satisfactory isolation of the two compounds from the matrix was achieved when 3 g of sediment were extracted with 30 mL of water for 10 min in 115 °C. Quantification was performed with matrix-matched calibration using atrazine-d₅ as internal standard. Recoveries higher than 85 % were obtained for both compounds for all the tested levels (RSD ≤ 14 %). The limits of detection of the developed method were 0.9 and 1.7 ng g⁻¹ dry weight of sediment for M1 and irgarol 1051, respectively.

The presence of the six substances in seawater and marine sediment samples collected during a year from two different sampling areas in United Kingdom (Shoreham Harbour and Brighton marina) was also studied. The isolation of the compounds from water was accomplished by solid phase extraction using C18 cartridges. The isolation of the compounds irgarol 1051 and M1 from marine sediments was performed using microwave assisted extraction, whereas the isolation of diuron and its main metabolites were achieved using sonication. Analysis of both water and sediment extracts for the determination of triazines (irgarol 1051, M1) was performed using GC–MS, whereas LC-DAD was used for ureas (diuron, DCPMU, DCPU) and aniline (DCA). The detected concentrations for irgarol 1051 in water were up to 136 and 102 ng L⁻¹ and in sediment up to 40 και 49 ng g⁻¹ for Shoreham Harbour and Brighton marina, respectively. M1 was detected in water samples in concentrations up to 59 (and up to 23 ng g⁻¹ dry weight of sediment) and 37 ng L⁻¹ (and up to 5.6 ng g⁻¹ dry weight of sediment) for Shoreham Harbour and Brighton marina, respectively. Among the other compounds studied, diuron was detected only in water in concentrations up to 366 (Shoreham Harbour) and 236 ng L⁻¹ (Brighton marina) for the two sampling areas, whereas in sediment DCPMU was detected in concentrations up to 122 (Shoreham Harbour) and 56 ng g⁻¹ (Brighton marina). Diuron was also detected in two sediment samples only. The highest concentrations of the target compounds were observed in both areas

during high boat season (May – July) and during the time that boats were prepared for the new season (January – February). Higher concentrations were observed in those sites where the density of the pleasure crafts was high. Statistical analysis of the results (Spearman non parametric correlation) shown that there is correlation between the observed concentrations of the irgarol 1051 and M1 as well as between the concentrations of the two compounds and the organic carbon and the fine fraction <63 μm of sediment samples collected from the harbour.

The toxicity of irgarol 1051, diuron, M1 and DCA on two marine phytoplanktonic microorganisms *Dunaliella tertiolecta* (green alga) and *Naviculla forcipata* (diatom) was also studied for the first time. EC_{50} values for the two microorganisms ranged from 1.1 (irgarol 1051) to 6381 (DCA) $\mu\text{g L}^{-1}$ (*Dunaliella tertiolecta*) and from 0.6 (irgarol 1051) to 6269 (DCA) $\mu\text{g L}^{-1}$ (*Naviculla forcipata*). Diatoms were found to be more sensitive in the presence of all the compounds except diuron. The toxicity of the four compounds in decreasing order was irgarol 1051 > diuron > M1 > DCA.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο Τμήμα Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου. Από τον Ιούλιο του 1999 μέχρι και το Δεκέμβριο του 2002 τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Ποιότητας Υδάτων και Αέρα, ενώ από το Φεβρουάριο του 2003 μέχρι το Φεβρουάριο του 2004 πραγματοποιήθηκαν πειράματα στο Εργαστήριο του Κέντρου Περιβάλλοντος, Φυσικής και Χημείας του Πανεπιστημίου του Sussex (UK). Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν με τις γνώσεις και την εμπειρία τους και με στήριξαν υλικά και ηθικά.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τμήματος Περιβάλλοντος, Καθηγητή κ. Λέκκα Θεμιστοκλή για την ανάθεση του θέματος, την παροχή υλικοτεχνικής υποδομής, τη διακριτική επίβλεψη και κατανόησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ πολύ τον Λέκτορα Περιβαλλοντικής Επιστήμης του Πανεπιστημίου του Sussex κ. Zhou L. John, για την επίβλεψη και τη βοήθειά του κατά την παραμονή μου στο Brighton.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αλμπάνη Τριαντάφυλλο καθώς και τον Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης κ. Βουδριά Ευάγγελο για τη βοήθειά τους ως μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής.

Ευχαριστώ επίσης τον Καθηγητή Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τμήματος Περιβάλλοντος κ. Χαλβαδάκη Κωνσταντίνο, τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης της Θάλασσας κ. Τσιρτσή Γεώργιο, τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Οικονομίας και Διοίκησης κ. Γκολφινόπουλο Σπυρίδωνα καθώς και τον Λέκτορα Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Θωμαΐδη Νικόλαο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Επταμελή Επιτροπή Αξιολόγησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Τον κ. Θωμαΐδη θα ήθελα να τον ευχαριστώ ιδιαίτερα διότι, παρότι μέλος της Επταμελούς Επιτροπής Αξιολόγησης της διδακτορικής μου διατριβής, με τις γνώσεις και την εμπειρία του συνέβαλλε τα μέγιστα στην πραγματοποίηση της διατριβής μου. Η βοήθεια του και η ηθική του στήριξη ήταν πολύτιμες καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Ειλικρινά χαίρομαι για τη συνεργασία μας και εύχομαι να συνεχιστεί στο μέλλον.

Ευχαριστώ θερμά τη Διδάκτορα του Τμήματος Περιβάλλοντος κα. Κοτρίκλα Άννα γιατί με βοήθησε σημαντικά, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα στάδια της διδακτορικής μου διατριβής, προσφέροντάς μου πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές σε θέματα υδροχρωματογραφίας και τοξικολογίας.

Ευχαριστώ επίσης τους Διδάκτορες του Τμήματος Περιβάλλοντος κ.κ. Νικολάου Αναστασία και Στασινάκη Αθανάσιο για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την ηθική τους στήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ πολύ τους Χημικούς ΕΔΤΠ του Τμήματος Περιβάλλοντος, κ.κ. Καραντανέλλη Γεώργιο και Ατσικμπάση Σπυρίδωνα για την παροχή γυαλικών και αντιδραστηρίων την περίοδο πραγματοποίησης των πειραμάτων.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους φίλους που έδειξαν υπομονή και κατανόηση όλο αυτό το διάστημα. Τους ευχαριστώ γιατί ήταν πάντα πρόθυμοι να με βοηθήσουν, γιατί ήταν πάντα εκεί όταν τους χρειάστηκα. Ελπίζω να τους το ανταποδώσω κάποια μέρα.

Ευχαριστώ πολύ την Ευρωπαϊκή Ένωση για τη χορήγηση της υποτροφίας Marie Curie στα πλαίσια της διδακτορικής μου διατριβής. Τόσο οι εμπειρίες που απέκτησα όσο και τα χρήματα που έλαβα με βοήθησαν σημαντικά.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου Μαυρουδή και Σμαρώ που με έμαθαν να έχω επιμονή και υπομονή και ήταν πάντα δίπλα μου στις αποφάσεις μου. Στη μητέρα μου οφείλω ένα επιπλέον μεγάλο ευχαριστώ γιατί παρόλες τις δύσκολες μέρες που αντιμετωπίσαμε, δεν έπαψε ποτέ να με στηρίζει και να μου δίνει κουράγιο να συνεχίσω.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	iv
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	xix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xxiv
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	4
ΥΦΑΛΟΧΡΩΜΑΤΑ	
1.1 Εισαγωγή	4
1.2 Κατηγορίες των υφαλοχρωμάτων	6
1.2.1 Συμβατικά υφαλοχρώματα (conventional paints)	6
1.2.2 Υφαλοχρώματα μακράς διάρκειας (long-life paints)	6
1.2.3 Συμπολυμερή αυτολειανόμενα υφαλοχρώματα (Shelf-Polishing Copolymer Paints)	7
1.3 Δραστικά συστατικά υφαλοχρωμάτων	8
1.4 Οργανοκασσιτερικές ενώσεις	9
1.4.1 Τριβουτυλο-κασσίτερος (TBT)	10
1.5 Χαλκός	11
1.6 Οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες	12
1.7 Εναλλακτικές μέθοδοι προστασίας των υφάλων χωρίς τη χρήση βιοκτόνων ουσιών	16
1.7.1 Φυσικές βιοκτόνες ουσίες	16
1.7.2 Ολισθηρά επιχρίσματα	20
1.7.3 Χρήση ηλεκτρικού ρεύματος	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	22
ΤΥΧΗ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΒΙΟΚΤΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΩΝ	

ΥΦΑΛΟΧΡΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

2.1 Εισαγωγή	22
2.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ουσιών	22
2.3 Απελευθέρωση από τα υφαλοχρώματα	25
2.4 Αβιοτική αποδόμηση	26
2.4.1 Φωτοδιάσπαση	26
2.4.2 Υδρόλυση	28
2.5 Βιοτική αποδόμηση	29
2.6 Κατανομή μεταξύ ιζήματος και νερού	31
2.7 Εξάτμιση	32
2.8 Βιοσυσσώρευση	32
2.9 Μεταφορά	32
2.10 Επίπεδα των εξεταζόμενων ουσιών στο περιβάλλον	33
2.10.1 Irgarol 1951 και M1	33
2.10.2 Diuron και κύριοι μεταβολίτες του	39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

42

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ

ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.1 Εισαγωγή	42
3.2 Προκατεργασία δειγμάτων ύδατος	43
3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	43
3.2.2 Υγρή /υγρή εκχύλιση	44
3.2.3 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid phase extraction-SPE)	45
3.2.3.1 Ενεργοποίηση	47
3.2.3.2 Προσρόφηση	47
3.2.3.3 Έκπλυση	47
3.2.3.4 Έκλουση	48
3.2.3.5 Συμπύκνωση εκλουσμάτων	48
3.2.3.6 Προσροφητικά υλικά	48
3.2.4 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Micro Extraction –	51

SPME)	
3.3 Προκατεργασία δειγμάτων ιζήματος	52
3.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων	52
3.3.2 Υγρή-στερεή εκχύλιση	52
3.3.2.1 Εκχύλιση Soxhlet	53
3.3.2.2 Εκχύλιση Soxtec (αυτοματοποιημένη εκχύλιση Soxhlet)	54
3.3.2.3 Εκχύλιση με ανάδευση	54
3.3.2.4 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων	54
3.3.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (supercritical fluid extraction- SFE)	55
3.3.4 Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων (Microwave assisted extraction –MAE)	55
3.3.5 Επιταχυνόμενη εκχύλιση υπό πίεση (Accelerated solvent extraction- ASE)	56
3.4 Καθαρισμός εκλουσμάτων	57
3.5 Τεχνικές προσδιορισμού οργανικών ουσιών στα εκχυλίσματα	58
3.6 Υγροχρωματογραφία	59
3.6.1 Οργανολογία συστήματος υγροχρωματογραφίας	60
3.6.2 Αντλίες συστημάτων υγροχρωματογραφίας	61
3.6.3 Χρωματογραφικές στήλες	62
3.6.3.1 Διαστάσεις χρωματογραφικών στηλών	62
3.6.3.2 Υλικά χρωματογραφικών στηλών	62
3.6.4 Θέρμανση χρωματογραφικών στηλών	68
3.6.5 Ανιχνευτές	69
3.7 Αεριοχρωματογραφία	73
3.7.1 Αεριοχρωματογραφία ή χρωματογραφία αερίου-υγρού	73
3.7.1.1 Φέρον αέριο	74
3.7.1.2 Εισαγωγή δείγματος	74
3.7.1.3 Στήλες	74
3.7.1.4 Φούρνος στήλης	78
3.7.1.5 Ανιχνευτές	78
3.7.2 Χρωματογραφία αερίου-στερεού	84

3.8 Προσδιορισμός βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων σε περιβαλλοντικά δείγματα	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	87
ΑΡΧΕΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ	
4.1 Εισαγωγή	87
4.2 Επιλογή κατάλληλου οργανισμού	87
4.3 Δοκιμές τοξικότητας	88
4.3.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας (acute toxicity tests)	90
4.3.2 Δοκιμές υποχρόνιας τοξικότητας (sub-chronic ή early life stage toxicity tests)	90
4.3.3 Δοκιμές χρόνιας τοξικότητας (chronic toxicity tests)	90
4.3.4 Δοκιμές βιοσυγκέντρωσης	91
4.3.5 Δοκιμές τοξικότητας ιζήματος	93
4.4 Συστήματα έκθεσης	93
4.5 Καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης	94
4.6 Σημεία λήξης δοκιμών (End points)	95
4.7 Πρότυπες μέθοδοι δοκιμών	96
4.8 Τοξικότητα μιγμάτων χημικών ουσιών	97
4.9 Μέθοδοι ανάλυσης των αποτελεσμάτων των πειραμάτων τοξικότητας μιγμάτων	98
4.10 Παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα	103
4.10.1 Παράγοντες που σχετίζονται με την ουσία	104
4.10.2 Παράγοντες που σχετίζονται με τον εκτιθέμενο οργανισμό	104
4.10.3 Παράγοντες που σχετίζονται με το χρόνο έκθεσης	105
4.10.4 Παράγοντες που σχετίζονται με το εξωτερικό περιβάλλον	106
4.10.4.1 Θερμοκρασία	106
4.10.4.2 Διαλυμένο οξυγόνο	106
4.10.4.3 pH	107
4.10.4.4 Αλατότητα	107
4.11 Τοξικότητα των βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων στο	107

θαλάσσιο περιβάλλον	
4.11.1 Irgarol 1051 και M1	107
4.11.2 Diuron και κύριοι μεταβολίτες του	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	113
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	
5.1 Κύριος Εξοπλισμός	113
5.1.1 Υγροχρωματογράφος	113
5.1.2 Αεριοχρωματογράφος	113
5.2. Βοηθητικός Εξοπλισμός	114
5.2.1 Φούρνος μικροκυμάτων	114
5.2.2 Λουτρό Υπερήχων	115
5.2.3 Αναλυτής οργανικού άνθρακα	115
5.2.4 Συσκευή υποδοχής φυσίγγων	116
5.2.5 Περιστροφικός εξατμιστήρας	116
5.2.6 Φυγόκεντρος	117
5.2.7 Μηχανικός αναδευτήρας	117
5.2.8 Κλίβανος αποστείρωσης	117
5.2.9 Επωαστικός θάλαμος	117
5.2.10 Μικροσκόπιο	118
5.2.11 Σταθερό και φορητό pHμετρο	118
5.2.12 Συσκευή παραγωγής υπερκαθαρού νερού	118
5.2.13 Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός	119
5.2.14 Συσκευή διήθησης	119
5.2.15 Πιπέτες μεταβλητού όγκου	119
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	120
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IRGAROL 1051, ΤΟΥ DIURON ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ	

ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ

6.1 Εισαγωγή	120
6.2 Δειγματοληψία	122
6.3 Εξοπλισμός	122
6.4 Αντιδραστήρια	122
6.5 Μεθοδολογία	123
6.5.1 Διαδικασία της εκχύλισης	123
6.5.2 Διερεύνηση δυνητικών απωλειών κατά την εκχύλιση	123
6.5.2.1 Έλεγχος εξάτμισης με περιστροφικό εξάτμιστή	124
6.5.2.2 Έλεγχος εκχύλισης στερεής φάσης	124
6.5.2.3 Έλεγχος εξάτμισης με ρεύμα αζώτου	124
6.5.3 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης	124
6.5.4 Ανάλυση με HPLC-DAD	125
6.5.5 Βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης	126
6.5.6 Έλεγχος της ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης	128
6.5.7 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας	130
6.5.8 Σταθερότητα των ουσιών υπό εργαστηριακές συνθήκες	131
6.6 Αποτελέσματα και συζήτηση	132
6.6.1 Προσδιορισμός δυνητικών απωλειών κατά την εκχύλιση	132
6.6.2 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης	133
6.6.3 Βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης	136
6.6.4 Έλεγχος της ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης	139
6.6.5 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας	144
6.6.6 Σταθερότητα των ουσιών υπό εργαστηριακές συνθήκες	146
6.6.7 Ανάλυση φυσικών δειγμάτων	148
6.7 Συμπεράσματα	150

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

152

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IRGAROL 1051, ΤΟΥ DIURON ΚΑΙ

**ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΙΖΗΜΑ ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ
ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ**

7.1 Εισαγωγή	152
7.2 Δειγματοληψία	153
7.3 Εξοπλισμός	153
7.4 Αντιδραστήρια	153
7.5 Μεθοδολογία	154
7.5.1 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης	154
7.5.1.1 Ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος	155
7.5.1.2 Όγκος διαλύτη εκχύλισης	155
7.5.1.3 Διάρκεια της εκχύλισης	155
7.5.1.4 Θερμοκρασία της εκχύλισης	155
7.5.2 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας	156
7.6 Ανάλυση με HPLC-DAD	157
7.7 Αποτελέσματα και συζήτηση	157
7.7.1 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης	157
7.7.1.1 Ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος	158
7.7.1.2 Όγκος διαλύτη εκχύλισης	159
7.7.1.3 Διάρκεια της εκχύλισης	160
7.7.1.4 Θερμοκρασία της εκχύλισης	161
7.7.2 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας	162
7.8 Συμπεράσματα	164

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 166

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IRGAROL 1051 ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΡΙΟΥ
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΤΟΥ Μ1 ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΙΖΗΜΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ
ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ
ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ**

8.1 Εισαγωγή	166
8.2 Δειγματοληψία	167

8.3 Εξοπλισμός	168
8.4 Αντιδραστήρια	168
8.5 Μεθοδολογία	168
8.5.1 Επιλογή των βέλτιστων παραμέτρων εκχύλισης	168
8.5.2 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας	170
8.6 Χρωματογραφική ανάλυση	171
8.7 Αποτελέσματα και συζήτηση	172
8.7.1 Επιλογή των βέλτιστων παραμέτρων εκχύλισης	172
8.7.2 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας	177
8.7.3 Εφαρμογή της μεθόδου σε φυσικά δείγματα	183
8.8 Συμπεράσματα	184
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	186
ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ IRGAROL 1051 ΤΟΥ DIURON ΚΑΙ ΤΩΝ	
ΚΥΡΙΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ	
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	
9.1 Εισαγωγή	186
9.2 Δειγματοληψία	187
9.3 Περιοχές δειγματοληψίας	188
9.3.1 Shoreham Harbour	188
9.3.2 Brighton Marina	188
9.4 Εξοπλισμός	191
9.5 Αντιδραστήρια	191
9.6 Μεθοδολογία	191
9.6.1 Μέτρηση φυσικοχημικών ιδιοτήτων δειγμάτων νερού	191
9.6.2 Μέτρηση φυσικοχημικών ιδιοτήτων δειγμάτων ιζήματος	192
9.6.2.1 Μέτρηση pH θαλάσσιου ιζήματος	192
9.6.2.2 Κοκκομετρική ανάλυση ιζήματος	192
9.6.2.3 Προσδιορισμός οργανικού άνθρακα θαλάσσιου ιζήματος	193
9.6.3 Εκχύλιση θαλασσινού νερού	193

9.6.4 Εκχύλιση θαλάσσιου ιζήματος	194
9.7. Ανάλυση	194
9.8 Αποτελέσματα και συζήτηση	195
9.8.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων νερού	195
9.8.1.1 pH	195
9.8.1.2 Αλατότητα	196
9.8.1.3 Αγωγιμότητα	197
9.8.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων ιζήματος	197
9.8.2.1 pH	197
9.8.2.2 % οργανικός άνθρακας	197
9.8.2.3 Κοκκομετρική ανάλυση	199
9.8.3 Επίπεδα των συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών στο νερό	199
9.8.3.1 Irgarol 1051	199
9.8.3.2 M1	204
9.8.3.3 Diuron	206
9.8.4 Επίπεδα των συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών στο ίζημα	207
9.8.4.1 Irgarol 1051	207
9.8.4.2 M1	208
9.8.4.3 Diuron	211
9.8.4.4 DCPMU	211
9.8.5 Επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του νερού	211
9.8.6 Επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του ιζήματος	213
9.9 Συμπεράσματα	215
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10	217
ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ	
IRGAROL 1051 ΚΑΙ DIURON ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ	
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ M1 ΚΑΙ DCA ΣΕ	
ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ	
10.1 Εισαγωγή	217
10.2 Εξοπλισμός	218

10.3 Αντιδραστήρια	218
10.4 Καλλιέργειες μικροοργανισμών	219
10.5 Μεθοδολογία	219
10.5.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου medium f/2	219
10.5.2 Παρασκευή lugol	221
10.5.3 Παρασκευή προκαλλιιεργειών των μικροοργανισμών	221
10.5.4 Παρασκευή των διαλυμάτων των εξεταζόμενων ουσιών για την εκτίμηση της τοξικότητας	221
10.5.5 Πειράματα οξείας τοξικότητας	222
10.5.6 Επώαση	222
10.5.7 Μέτρηση κυτταρικού αριθμού	223
10.5.8 Υπολογισμός του ρυθμού ανάπτυξης	224
10.5.9 Υπολογισμός της % μείωση της ανάπτυξης	225
10.5.10 Τοξικότητα του οργανικού διαλύτη	225
10.5.11 Προσδιορισμός του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων	225
10.5.12 Εκτίμηση της οξείας τοξικότητας των εξεταζόμενων ουσιών	226
10.6 Αποτελέσματα και συζήτηση	230
10.6.1 Επίδραση της ακετόνης στην ανάπτυξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών	230
10.6.2 Προσδιορισμός εύρους αποτελεσματικών συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών	232
10.6.3 Εκτίμηση της οξείας τοξικότητας των εξεταζόμενων ουσιών	233
10.7 Συμπεράσματα	238
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΕΡΕΥΝΑ	239
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	243
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	268
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	277

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

	Τίτλος	Σελ.
1.1	Συμβατικό υφαλόχρωμα	6
1.2	Συμπολυμερές αυτολειαινόμενο υφαλόχρωμα	7
1.3	Ρυθμός απελευθέρωσης τοξικής ουσίας σε συμπολυμερές αυτολειαινόμενο υφαλόχρωμα	8
2.1	Συντακτικοί τύποι των εξεταζόμενων ουσιών	23
2.2	Βιοχημικός τρόπος δράσης τριαζινών και υποκατεστημένων ουριών (Ciba, 1999)	25
2.3	Φωτοδιάσπαση του irgarol 1051 σε φυσικό νερό (αναπαραγωγή από τους Penuela et al., 2000; Sakkas et al., 2002)	27
2.4	Προϊόντα μεταβολισμού του diuron (αναπαραγωγή από τους Giacomazzi and Cochet, 2003)	30
3.1	Βασικά στάδια της διαδικασίας εκχύλισης στερεής φάσης	46
3.2	Χημική δομή (α) δεκαοκτυλομάδας (C18) και (β) οκτυλομάδας (C8) χημικά προσδεδεμένης πάνω στην επιφάνεια πυριτικής πηκτής	49
3.3	Χημική δομή πολυμερούς υλικού υδροξυλιομένου πολυστηρενίου – διβινυλοβενζολίου	50
3.4	Τύποι δραστικών ομάδων πηκτής του οξειδίου του πυριτίου. α: γέφυρα σιλοξανίου, β: ελεύθερη σιλανόλη, γ: σιλανοδιόλη, δ: συζευγμένες σιλανόλες	53
3.5	Πολυμερές πληρωτικό υλικό χρωματογραφικών στηλών στυρενίου-διβινυλοβενζολίου	67
3.6	Πολυδιαυλικό φασματόμετρο συστοιχίας διόδων	70
3.7	Κυψελίδα ανιχνευτή υπεριώδους για HPLC	71
3.8	Φάσματα απορρόφησης εκλούσματος μίγματος τριών στεροειδών ληφθέντα σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα των 5 s	72
3.9	Διάγραμμα ενός τυπικού αεριοχρωματογράφου τριχοειδούς στήλης	82

	συζευγμένου με φασματοφράφο μαζών (GS/MS)	
3.10	Σχηματικό διάγραμμα διαχωριστή πίδακα	82
3.11	Ανιχνευτής ιοντικής παγίδας	83
4.1	Τυπική μορφή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης	95
4.2	Διάγραμμα ισοβόλων για τις LC50 δύο ουσιών Α και Β. Η αθροιστική δράση παριστάνεται με την διαγώνιο	99
5.1	Στήλη αντίδρασης για τον προσδιορισμό του οργανικού άνθρακα (οι διαστάσεις δεν ανταποκρίνονται σε κανονική κλίμακα)	115
6.1	Φάσματα απορρόφησης των έξι ουσιών σε πρότυπο διάλυμα	126
6.2	Πειραματικές συνθήκες βελτιστοποίησης του διαχωρισμού με ταυτόχρονη μεταβολή της ισχύος του διαλύτη και της θερμοκρασίας	128
6.3	Διαχωρισμός των έξι ουσιών για θερμοκρασία στήλης 45 °C και χρόνο βαθμωτής έκλουσης 60 min. Μήκος κύματος ανιχνευτή $\lambda=234$ nm	138
6.4	Χρωματογράφημα των έξι ουσιών ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) στις βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης (θερμοκρασία στήλης: 30°C, ροή κινητής φάσης: 1,7 mL min^{-1} , αρχική κινητή φάση: 20% ACN – 80% H ₂ O)	139
6.5	Μέση ανάκτηση (%) του irgarol 1051 σε σχέση με το χρόνο για τους δύο τρόπους συντήρησης	147
6.6	Μέση ανάκτηση (%) του diuron σε σχέση με το χρόνο για τους δύο τρόπους συντήρησης	148
6.7	Χρωματογράφημα δείγματος θαλασσινού νερού προερχόμενο από τη μαρίνα της Καλαμάτας (α: άγνωστη κορυφή)	150
6.8	Χρωματογράφημα δείγματος θαλασσινού νερού προερχόμενο από τη λιμάνι της Μυτιλήνης (α, β: άγνωστες κορυφές)	150
7.1	Χρωματογραφήματα των έξι ουσιών κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης της ποσότητας του εκχυλιζόμενου ιζήματος. (α) 2 g, (β) 5 g, (γ) 10 g, (δ) 15 g; $\lambda = 234$ nm. Κορυφές (από αριστερά προς τα δεξιά): 1- DCPU; 2- DCPMU; 3- M1; 4- diuron; 5- DCA; 6- irgarol 1051	159
8.1	Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης $500 \mu\text{g L}^{-1}$ των εξεταζόμενων ουσιών (irgarol 1051 και M1) και του εσωτερικού	172

	προτύπου (atrazine-d ₅) σε SIM mode καθώς και τα φάσματα μαζών τους	
8.2	Χρωματογράφημα δείγματος θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενο από το σημείο δειγματοληψίας Lady Bee marina καθώς και τα φάσματα μαζών του M1 και του irgarol 1051 σε SIM mode (α, β: άγνωστες κορυφές)	184
9.1	Σημεία δειγματοληψίας στο Shoreham Harbour. A: Aldrington Wharf, B: The Canal, C: Lady Bee Marina, D: Middle Pier, E: Surry Boat Yard, F: Emerald Quay, G: Soldier Point, H: Old Fort και I: West Pier	189
9.2	Σημεία δειγματοληψίας στη Brighton Marina. Είσοδος μαρίνας : M,P,W,L,J,I,H, εσωτερικά : A,B,C,E,O,G,F,D	190
9.3	Διακύμανση της μέσης τιμής του pH σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour κατά τη διάρκεια των εννέα δειγματοληψιών (1: 03/2003, 2: 05/2003, 3: 07/2003, 4: 08/2003, 5: 10/2003, 6: 11/2003, 7: 12/2003, 8: 01/2004, 9: 02/2004)	196
9.4	Διακύμανση της αλατότητας του θαλασσινού νερού στα δείγματα που συλλέχθηκαν από 03/2003 ως 02/2004 από το Shoreham Harbour	197
9.5	Διακύμανση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα (μέσες τιμές) στα δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour	198
9.6	Διακύμανση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα (μέσες τιμές) των δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina	199
9.7	Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης των τριών ουσιών (M1, irgarol 1051 και diuron) που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina με το χρόνο	201
9.8	Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του irgarol 1051 με το χρόνο στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour	202
9.9	Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του irgarol 1051 με το χώρο στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour	203
9.10	Χρωματογράφημα δείγματος θαλασσινού νερού προερχόμενο από το σημείο δειγματοληψίας Lady Bee marina στο Shoreham Harbour	204

	καθώς και τα φάσματα του M1 και του irgarol 1051 σε SIM (α, β, γ: άγνωστες κορυφές)	
9.11	Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του M1 με το χρόνο στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour	205
9.12	Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του M1 με το χώρο στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour	206
9.13	Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του irgarol 1051 με το χρόνο στα δείγματα θαλασσινού νερού και θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina	208
9.14	Μέση τιμή των συγκεντρώσεων του M1 και του irgarol 1051 κατά τη διάρκεια των τριών δειγματοληψιών στα δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina	209
9.15	Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του M1 1051 με το χρόνο στα δείγματα θαλασσινού νερού και θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina	210
9.16	Τυπικό χρωματογράφημα δείγματος θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενο από το σημείο δειγματοληψίας O στη Brighton marina καθώς και τα φάσματα του M1 και του irgarol 1051 σε SIM (α, β, γ, δ: άγνωστες κορυφές)	210
10.1	Χαρακτηριστικά κυβέτας Palmer-Maloney: διάμετρος = 18 mm, βάθος = 0,45 mm, όγκος = 0,1 mL	224
10.2	Ανάπτυξη της <i>Dunaliella tertiolecta</i> (κύτταρα ημέρα ⁻¹) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1	227
10.3	Ανάπτυξη της <i>Navicula forcipata</i> (κύτταρα ημέρα ⁻¹) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1	227
10.4	Αναχαίτιση (%) του ρυθμού ανάπτυξης της <i>Dunaliella tertiolecta</i> εξαιτίας της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1	228
10.5	Αναχαίτιση (%) του ρυθμού ανάπτυξης της <i>Naviculla forcipata</i> εξαιτίας της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1	228
10.6	Εκτίμηση της EC50 για 96 h έκθεσης της <i>Dunaliella tertiolecta</i> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του M1	229

10.7	Εκτίμηση της EC ₅₀ για 96 h έκθεσης της <i>Navicula forcipata</i> σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του M1	230
10.8	Επίδραση των διαφορετικών όγκων της ακετόνης στην ανάπτυξη της <i>Dunaliella tertiolecta</i>	231
10.9	Επίδραση των διαφορετικών όγκων της ακετόνης στην ανάπτυξη της <i>Navicula forcipata</i>	231
10.10	Εύρος των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων (μg L ⁻¹) του diuron στην ανάπτυξη της <i>Dunaliella tertiolecta</i>	233

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Τίτλος	Σελ.
1.1	Είδη θαλάσσιων οργανισμών που αποικίζουν επιφάνειες βυθισμένες στο νερό	4
1.2	Ιστορία των υφαλοχρωμάτων	9
1.3	Βιοκτόνοι παράγοντες υφαλοχρωμάτων με βάση το χαλκό	12
1.4	Κύριες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες που χρησιμοποιούνται στα υφαλοχρώματα νέας γενιάς	13
1.5	Άλλες εφαρμογές των οργανικών ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων	14
1.6	Δευτερεύουσες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες των υφαλοχρωμάτων	15
1.7	Κύριες φυσικές ουσίες κατά του αποικισμού των επιφανειών	16
1.8	Δευτερεύουσες φυσικές ουσίες κατά του αποικισμού των επιφανειών	18
2.1	Κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ουσιών	24
2.2	Συγκεντρώσεις του irgarol 1051 σε δείγματα νερού και ιζήματος προερχόμενα από διάφορες περιοχές	36
2.3	Συγκεντρώσεις του M1 σε δείγματα νερού και ιζήματος προερχόμενα από διάφορες περιοχές	39
2.4	Συγκεντρώσεις του diuron σε δείγματα νερού και ιζήματος προερχόμενα από διάφορες περιοχές	40
3.1	Υποκαταστάτες της χημικά τροποποιημένης πηκτής του οξειδίου του πυριτίου και ο μηχανισμός διαχωρισμού στον οποίο ανταποκρίνονται	64
3.2	Ευρέως χρησιμοποιούμενες υγρές φάσεις στηλών αεριοχρωματογραφίας	76
3.3	Ιδιότητες και χαρακτηριστικά τυπικών στηλών αεριοχρωματογραφίας	78
4.1	Τοξικότητα του irgarol 1051 πάνω σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς	109
4.2	Τοξική δράση του irgarol 1051 παρουσία άλλων ενισχυτικών βιοκτόνων	110

	ουσιών	
4.3	Τοξικότητα του diuron πάνω σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς	112
6.1	Επίπεδα των παραγόντων που εξετάστηκαν κατά τον έλεγχο ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου	129
6.2	Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) του irgarol 1051, του diuron και των μεταβολιτών τους κατά τον έλεγχο των σταδίων προεπεξεργασίας του δείγματος	132
6.3	Μέση ανάκτηση και τυπικές αποκλίσεις, RSDs (% $n=3$) των έξι ουσιών κατά τη βελτιστοποίηση του διαλύτη έκλουσης. Φύσιγγες εκχύλισης C18 (Sep-Pak)	134
6.4	Μέση ανάκτηση και τυπικές αποκλίσεις, RSDs (% $n=3$) των έξι ουσιών κατά τη βελτιστοποίηση του διαλύτη έκλουσης. Φύσιγγες εκχύλισης SDVB (Enviro-Chrom P)	135
6.5	Μέση ανάκτηση και τυπικές αποκλίσεις, RSDs (% $n=3$) των έξι ουσιών κατά τη βελτιστοποίηση του διαλύτη έκλουσης. Φύσιγγες εκχύλισης υδροξυλειωμένου SDVB (Isolute ENV+)	136
6.6	Συντελεστές διαχωρισμού κατά τη βαθμωτή έκλουση των έξι ουσιών με ταυτόχρονη μεταβολή της θερμοκρασίας και της ισχύος του διαλύτη	137
6.7	Κανονικοποιημένη επίδραση και κρίσιμες επιδράσεις των τριών παραγόντων πάνω στο χρόνο συγκράτησης της κάθε ουσίας καθώς και οι % διαφορές (d) του χρόνου συγκράτησης από τον αντίστοιχο χρόνο συγκράτησης που παρατηρείται στις ονομαστικές τιμές του κάθε παράγοντα	141
6.8	Κανονικοποιημένη επίδραση και κρίσιμες επιδράσεις των τριών παραγόντων πάνω στο εμβαδόν της κορυφής της κάθε ουσίας καθώς και οι % διαφορές (d) του εμβαδού της κάθε κορυφής από το αντίστοιχο εμβαδό που παρατηρείται στις ονομαστικές τιμές του κάθε παράγοντα	142
6.9	Κανονικοποιημένη επίδραση και κρίσιμες επιδράσεις των τριών παραγόντων πάνω στο διαχωρισμό μεταξύ των έξι ουσιών καθώς και οι % διαφορές (d) του συντελεστή διαχωρισμού από τον αντίστοιχο συντελεστή που παρατηρείται στις ονομαστικές τιμές του κάθε	143

	παράγοντα	
6.10	Καμπύλες βαθμονόμησης, συντελεστές συσχέτισης (R^2) και όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης των έξι ουσιών σε θαλασσινό νερό	145
6.11	Πιστότητα της διαδικασίας εκχύλισης πάνω σε φύσιγγες C18 (Sep-Pak) και υδροξυλειωμένου SDVB (Isolute ENV+), για επίπεδο συγκέντρωσης των εξεταζόμενων ουσιών $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$	146
6.12	Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, R.S.D. (n=4) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 500 mL θαλασσινού νερού επιφορτισμένο σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης των έξι ουσιών	146
6.13	Συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε φυσικά δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από διάφορες ελληνικές περιοχές	149
7.1	Ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση διαφορετικών ποσοτήτων ιζήματος εις διπλούν με 20 ml μεθανόλης για 30 min στους $50 \text{ }^\circ\text{C}$ με χρήση υπερήχων	158
7.2	Ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 2 g ιζήματος εις διπλούν με διαφορετικούς όγκους μεθανόλης για 30 min στους $50 \text{ }^\circ\text{C}$ με χρήση υπερήχων	160
7.3	Ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 2 g ιζήματος εις διπλούν με 20 ml μεθανόλης στους $50 \text{ }^\circ\text{C}$ για διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης με χρήση υπερήχων	161
7.4	Ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 2 g ιζήματος εις διπλούν με 20 ml μεθανόλης για 30 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες με χρήση υπερήχων	162
7.5	Καμπύλες βαθμονόμησης (με το τυπικό σφάλμα της κλίσης της ευθείας βαθμονόμησης και του σταθερού όρου), συντελεστές συσχέτισης (R^2) και όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης των έξι ουσιών σε θαλάσσιο ίζημα. Ο προσδιορισμός έγινε βάσει του ύψους της κορυφής	163
7.6	Πιστότητα της διαδικασίας εκχύλισης για επίπεδο συγκέντρωσης των εξεταζόμενων ουσιών 25 ng g^{-1}	163

7.7	% Ανάκτηση και σχετική τυπική απόκλιση, R.S.D. (n=3) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 2 g θαλάσσιου ιζήματος επιφορτισμένο σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεως των ουσιών	164
8.1	Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, RSD (% , n = 3) του M1 και του irgarol 1051 μετά την εκχύλιση διαφορετικών ποσοτήτων θαλάσσιου ιζήματος με 30 mL για 3 min στους 105°C χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE	173
8.2	Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, RSD (% , n = 3) του M1 και του irgarol 1051 μετά την εκχύλιση 1 g θαλάσσιου ιζήματος με διαφορετικούς όγκους νερού για 3 min στους 105 °C χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE	174
8.3	Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, RSD (% , n = 3) του M1 και του irgarol 1051 μετά την εκχύλιση 1 g θαλάσσιου ιζήματος με 30 mL νερού στους 105 °C για διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE	175
8.4	Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, RSD (% , n = 3) του M1 και του irgarol 1051 μετά την εκχύλιση 1 g θαλάσσιου ιζήματος με 30 mL νερού για 3 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE	176
8.5	Καμπύλες βαθμονόμησης, συντελεστές συσχέτισης (R^2) και όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης του M1 και του irgarol 1051 σε θαλάσσιο ίζημα	178
8.6	Πιστότητα της διαδικασίας εκχύλισης για επίπεδο των εξεταζόμενων ουσιών 100 ng	179
8.7	Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, R.S.D. (n=3) του M1 και του irgarol 1051 έπειτα από εκχύλιση 3 g θαλάσσιου ιζήματος επιφορτισμένο σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεως	180
8.8	Σύγκριση της απόδοσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό του irgarol 1051. Οι ανακτήσεις του M1 επίσης αναφέρονται στις περιπτώσεις που η ουσία μελετήθηκε	181

8.9	Συγκεντρώσεις του M1 και του irgarol 1051 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour (Ηνωμένο Βασίλειο)	183
9.1	Εύρος συγκεντρώσεων, διάμεση τιμή, αριθμητικός και γεωμετρικός μέσος των συγκεντρώσεων (ng L^{-1}) των ουσιών irgarol 1051 και M1 σε δείγματα θαλασσινού νερού	200
9.2	Εύρος συγκεντρώσεων (ng L^{-1}), διάμεση τιμή (ng L^{-1}), αριθμητικός και γεωμετρικός μέσος των συγκεντρώσεων των ουσιών irgarol 1051 και M1 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος	207
9.3	Μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού για το Shoreham Harbour	212
9.4	Μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιζήματος για τη Brighton marina	212
9.5	Μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιζήματος για το Shoreham Harbour	214
9.6	Μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιζήματος για τη Brighton marina	214
10.1	Σύσταση θρεπτικού μέσου medium f	220
10.2	Σύσταση μίγματος βιταμινών	221
10.3	Συντεταγμένες των εννιά περιοχών του μικροσκοπίου καθώς και ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας $f(n)$ για κάθε περιοχή	224
10.4	Εύρος των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών στα δύο είδη μικροοργανισμών	232
10.5	Οξεία τοξικότητα των εξεταζόμενων ουσιών στα δύο είδη μικροοργανισμών εκφρασμένη ως μέση τιμή EC_{50} ($\mu\text{g L}^{-1}$) των δύο επαναλήψεων. Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι τιμές της EC_{50} που προσδιορίστηκαν για τις δύο επαναλήψεις	234

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα προβλήματα που δημιουργεί ο αποικισμός των διαφόρων θαλάσσιων οργανισμών πάνω στις εκτεθειμένες στο νερό επιφάνειες είναι γνωστά για περισσότερα από 2000 χρόνια. Τα πρώτα συστήματα προστασίας ήταν με τη μορφή κεριού, πίσσας ή ρητίνης και είχαν ως βάση ελάσματα χαλκού ή μολύβδου. Το 19^ο αιώνα ξεκίνησε η πρώτη βιομηχανική χρήση των υφαλοχρωμάτων τα οποία αποτελούνταν από σουλφίδια του χαλκού, ενώ από το 1960 και για αρκετές δεκαετίες, ο τριβουτυλοκασιτέρος (TBT) αποτέλεσε το κύριο βιοκτόνο συστατικό των χρωμάτων αυτών. Τα προβλήματα ρύπανσης όμως που δημιούργησε η εκτενής χρήση του οδήγησαν στη απαγόρευσή του διεθνώς και στην εισαγωγή νέων βιοκτόνων οργανικών ουσιών στην αγορά των υφαλοχρωμάτων (Κεφάλαιο 1).

Όπως συμβαίνει με όλες τις ουσίες, οι ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες των υφαλοχρωμάτων αμέσως μετά την εισαγωγή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον υπόκεινται σε διάφορες βιοτικές και αβιοτικές διεργασίες ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Ο βαθμός στον οποίο λαμβάνουν χώρα οι παραπάνω διεργασίες καθορίζει την τύχη και την περαιτέρω συμπεριφορά αυτών των ουσιών στο περιβάλλον. Η παρουσία τους στο θαλάσσιο περιβάλλον καθώς και των προϊόντων μεταβολισμού – αποδόμησής τους, αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία για διάφορες Ευρωπαϊκές και μη περιοχές (Κεφάλαιο 2).

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, διάφορες τεχνικές απομόνωσης και προσδιορισμού των οργανικών αυτών ενώσεων σε φυσικά δείγματα έχουν αναπτυχθεί με στόχο την παρακολούθηση των συγκεντρώσεών τους στο περιβάλλον και την εκτίμηση της κατάστασης της ρύπανσης που προκαλεί η χρήση τους (Κεφάλαιο 3).

Η χρήση των οργανικών ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων, μακροπρόθεσμα μπορεί να επηρεάσει ανεπανόρθωτα τα οικοσυστήματα, διότι η τοξική τους δράση δεν περιορίζεται μόνο στους οργανισμούς - στόχους. Πρόβλημα επίσης αποτελεί και η συνδυασμένη τοξική δράση εξαιτίας της συνύπαρξης αυτών των ουσιών με άλλες ουσίες καθώς και με τα προϊόντα μεταβολισμού τους (Κεφάλαιο 4).

Το irgarol 1051 και το diuron αποτελούν δύο από τις 18 συνολικά οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες που χρησιμοποιούνται διεθνώς στα υφαλοχρώματα. Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα αφορούν κυρίως στην ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό των αρχικών αυτών ουσιών στο θαλάσσιο περιβάλλον. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η βιοαποδόμηση, η φωτοδιάσπαση και η χημική υδρόλυση του irgarol 1051 οδηγούν μέσω *N*-απαλκυλίωσης στο

σχηματισμό του κύριου μεταβολίτη της ουσίας M1 (2-methylthio-4-tert-butylamino-s-triazine), ενώ το diuron στο περιβάλλον κάτω από αερόβιες συνθήκες, μέσω N-διμεθυλίωσης, μετατρέπεται αρχικά σε DCPMU [1-(3,4 dichlorophenyl)-3 methyl urea] και στη συνέχεια σε DCPU [1-(3,4 dichlorophenyl) urea], ενώ η υδρόλυσή του οδηγεί στο σχηματισμό της DCA (3,4 dichloroaniline). Λίγες αναφορές γίνονται για τον κύριο μεταβολίτη του irgarol 1051, τον M1, ενώ ακόμη λιγότερα στοιχεία υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία για τους κύριους μεταβολίτες του diuron, DCPMU και DCPU. Αναφορικά με τον τελικό μεταβολίτη του diuron, τη DCA, τα στοιχεία που αφορούν στην παρουσία της στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι επίσης ελλιπή. Εξαιτίας των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των παραπάνω ουσιών, συχνά απαιτείται μάλιστα πολύς χρόνος για την ανάλυση των φυσικών δειγμάτων καθώς ο προσδιορισμός είναι διαφορετικός για κάθε χημική κατηγορία ουσιών. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού αυτών των έξι ουσιών, είτε σε δείγματα θαλασσινού νερού, είτε σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος κάτι που θα μείωνε σημαντικά το χρόνο ανάλυσης. Επιπλέον θα πρέπει να τονιστεί ότι μέχρι σήμερα η απομόνωση των ουσιών από στερεά υποστρώματα πραγματοποιείται με παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης, οι οποίες είναι συχνά χρονοβόρες και βασίζονται στη χρήση οργανικών διαλυτών και όχι διαλυτών φιλικών προς το περιβάλλον όπως είναι το νερό. Σε ότι αφορά την τοξικότητα των παραπάνω ουσιών πάνω σε θαλάσσιους οργανισμούς τα στοιχεία είναι επίσης ελλιπή. Επιπλέον τα τοξικολογικά δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία, αφορούν κυρίως στη μελέτη των δυσμενών επιπτώσεων αυτών των ουσιών πάνω σε υδρόβιους οργανισμούς του γλυκού νερού.

Τα κενά που διαπιστώθηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία προσπάθησε να καλύψει η παρούσα διδακτορική διατριβή.

Κύριος στόχος της ήταν η διερεύνηση της συμπεριφοράς και της τοξικότητας δύο ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων του irgarol 1051 και του diuron.

Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκαν αναλυτικές μέθοδοι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αυτών των δύο οργανικών ουσιών αλλά και των κύριων μεταβολιτών τους σε θαλασσινό νερό και ίζημα με διάφορες τεχνικές. Οι ουσίες που εξετάστηκαν ήταν το diuron και οι μεταβολίτες του DCPMU, DCPU, DCA και το irgarol 1051 και ο κύριος μεταβολίτης του M1. Οι τεχνικές αναπτύχθηκαν με γνώμονα τη βέλτιστη ακρίβεια, επαναληψιμότητα, ανθεκτικότητα και ταχύτητα που πρέπει να χαρακτηρίζει μια μέθοδο.

Συγκεκριμένα στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε:

- Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου για την ταυτόχρονη απομόνωση του irgarol 1051, του diuron και των κύριων μεταβολιτών τους από δείγματα θαλασσινού νερού, με την τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης, καθώς και ανάπτυξη και βελτιστοποίηση χρωματογραφικής ανάλυσης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ουσιών αυτών με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων.
- Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου εκχύλισης του irgarol 1051, του diuron και των κύριων μεταβολιτών τους από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με χρήση υπερήχων καθώς και ταυτόχρονος προσδιορισμός των ουσιών αυτών με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων.
- Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου εκχύλισης με χρήση μικροκυμάτων του irgarol 1051 και του κύριου μεταβολίτη του M1, χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη εκχύλισης, από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος, καθώς και ταυτόχρονος προσδιορισμός των ουσιών αυτών με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών.
- Στη συνέχεια διερευνήθηκαν τα επίπεδα και η ύπαρξη των αρχικών ουσιών καθώς και των μεταβολιτών τους στο θαλάσσιο περιβάλλον. Συγκεκριμένα έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της χωρικής και χρονικής διακύμανσης των συγκεντρώσεων του irgarol 1051, του diuron και των κύριων μεταβολιτών τους σε δείγματα θαλασσινού νερού και ιζήματος προερχόμενα από το θαλάσσιο περιβάλλον του Ηνωμένου Βασιλείου καθώς και συσχέτιση των συγκεντρώσεων που ανιχνεύτηκαν με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού και του ιζήματος.
- Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της μεμονωμένης τοξικής δράσης του irgarol 1051, του diuron και των κύριων μεταβολιτών τους M1 και DCA, αντίστοιχα, πάνω σε δύο είδη θαλάσσιων φυτοπλαγκτονικών μικροοργανισμών, το διάτομο *Naviculla forcipata* και το χλωροφύκος *Dunaliella tertiolecta*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΥΦΑΛΟΧΡΩΜΑΤΑ

1.1 Εισαγωγή

Είναι γνωστό ότι οποιαδήποτε επιφάνεια εκτίθεται στο νερό αποτελεί πιθανό ενδιαίτημα για τους οργανισμούς (φυτικούς και ζωικούς) που ζουν σε αυτό. Επιφάνειες, όπως ύφαλα σκαφών, πλωτήρες, κλωβοί ιχθυοκαλλιεργειών, πετρελαιοαγωγοί, αγωγοί ψύξης θερμοηλεκτρικών εργοστασίων κ.λ.π. υπόκεινται σε αποικισμό από τους θαλάσσιους οργανισμούς.

Αρχικά οι επιφάνειες αποικούνται από βακτήρια και μικροφύκη, κυρίως διάτομα (Rosowski et al., 1986), τα οποία σχηματίζουν ένα θρεπτικό στρώμα πολυσακχαρίτη (Cooksey and Cooksey, 1986). Το στρώμα αυτό διευκολύνει την προσκόλληση άλλων οργανισμών, κυρίως μακροφυκών, όπως είναι τα χλωροφύκη (π.χ *Enteromorpha*) και φαιοφύκη (π.χ. *Ectocarpus*), καθώς και ζωικών οργανισμών, όπως είναι τα οστρακοειδή (Callow 1986).

Έχουν καταμετρηθεί 1746 διαφορετικά είδη θαλάσσιων οργανισμών οι οποίοι προσκολλώνται πάνω στις βυθισμένες στο νερό επιφάνειες (Omae, 2003a). Πρόκειται για οστρακοειδή, φύκη, θαλάσσια βρύα και υδρόζωα όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1 Είδη θαλάσσιων οργανισμών που αποικίζουν επιφάνειες βυθισμένες στο νερό.

Οργανισμός	Αριθμός ειδών
Βακτήρια	37
Μύκητες	14
Διάτομα	111
Φύκη	452
Πρωτόζωα	99
Σπόγγοι	33
Κνιδόζωα ή κοιλεντερόζωα	286
Δακτυλιοσκώληκες	108
Κτενοφόρα	139
Αρθρόποδα	292
Εχινόδερμα	19

Συνέχεια Πίνακα 1.1

Οργανισμός	Αριθμός ειδών
Χορδωτά	127
Άλλα ασπόνδυλα	29
Σύνολο	1746

Η ανάπτυξη όλων αυτών των οργανισμών πάνω στις επιφάνειες συνεπάγεται μια σειρά προβλημάτων όπως:

- διάβρωση των επιφανειών εξαιτίας του θρεπτικού υλικού που εκκρίνεται από τους οργανισμούς ώστε να είναι δυνατή η προσκόλλησή τους
- αύξηση του βάρους των επιφανειών
- φράξιμο των υποθαλάσσιων αγωγών
- μείωση της ροής του νερού μεταξύ των κλωβών στις ιχθυοκαλλιέργειες με αποτέλεσμα να μειώνεται και η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου σε αυτούς, ενώ είναι δυνατόν να δημιουργηθούν και εστίες μόλυνσης
- αύξηση του βάρους των σκαφών που οδηγεί σε μείωση της υδροδυναμικής συμπεριφοράς τους, διότι χαμηλώνει η θέση του κέντρου βάρους των σκαφών, γεγονός που επηρεάζει την ικανότητα ελιγμών
- αύξηση της τριβής των σκαφών με το θαλασσινό νερό που συνεπάγεται μείωση της ταχύτητάς τους. Υπολογίζεται ότι ένα κολλώδες στρώμα επιστρώσεων, πάχους 1 mm αυξάνει την τριβή κατά 80 % με αποτέλεσμα η ταχύτητα του σκάφους να μειώνεται κατά 15 % (MER, 1996). Σε αυτές τις περιπτώσεις για να διατηρηθεί η επιθυμητή ταχύτητα των σκαφών, θα πρέπει να αυξηθεί η κατανάλωση των καυσίμων η οποία όμως συνεπάγεται αύξηση του κόστους αλλά και των εκπομπών αέριων ρύπων. Εκτιμάται ότι η κατανάλωση καυσίμων αυξάνεται κατά 6 % για κάθε 100 μm αύξησης της τραχύτητας των υφάλων (Townsin, 1987; Liu et al, 1997).

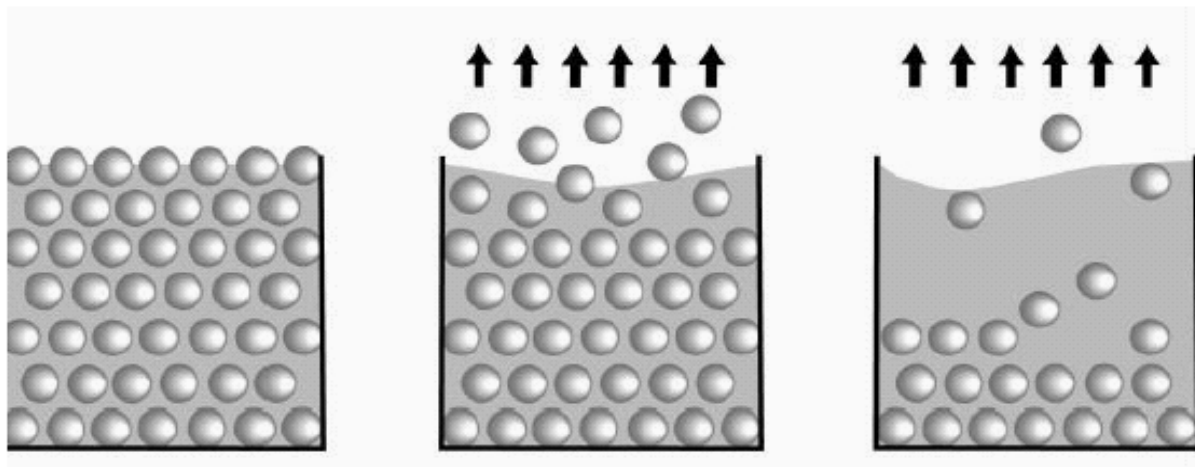
Ο μόνος τρόπος για την προστασία όλων αυτών των επιφανειών είναι να καταστούν ακατάλληλες προς αποικισμό. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της επίστρωσής τους με χρώματα, τα αποκαλούμενα υφαλοχρώματα, τα οποία περιέχουν και απελευθερώνουν στο νερό τοξικές ουσίες (Terlizzi et al., 2001).

1.2 Κατηγορίες των υφαλοχρωμάτων

Τα υφαλοχρώματα ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τις χημικές τους ιδιότητες, το συστατικό που αποτελεί τη βάση του χρώματος (μήτρα) και τους μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα κατά την απελευθέρωση των τοξικών ουσιών στο περιβάλλον.

1.2.1 Συμβατικά υφαλοχρώματα (conventional paints)

Σε αυτή την κατηγορία των υφαλοχρωμάτων η βάση του χρώματος είναι συνήθως μια υδατοδιαλυτή ρητίνη μέσα στην οποία διασπείρεται η τοξική ουσία (Σχήμα 1.1). Εξαιτίας της μη χημικής σύζευξης της τοξικής ουσίας και της ρητίνης, η πρώτη διαφεύγει ελεύθερα στο περιβάλλον με ανεξέλεγκτο ρυθμό απελευθέρωσης, ο οποίος μειώνεται εκθετικά με το χρόνο. Έτσι, ενώ αρχικά η συγκέντρωση της τοξικής ουσίας είναι πολύ μεγάλη πολύ σύντομα μειώνεται, ελαττώνοντας συγχρόνως και τη δραστικότητα και αποτελεσματικότητα του υφαλοχρώματος. Η διάρκεια της αποτελεσματικής δράσης αυτής της κατηγορίας υφαλοχρωμάτων είναι από 6 ως 12 μήνες (Terlizzi et al., 2001).



Σχήμα 1.1 Συμβατικό υφαλόχρωμα.

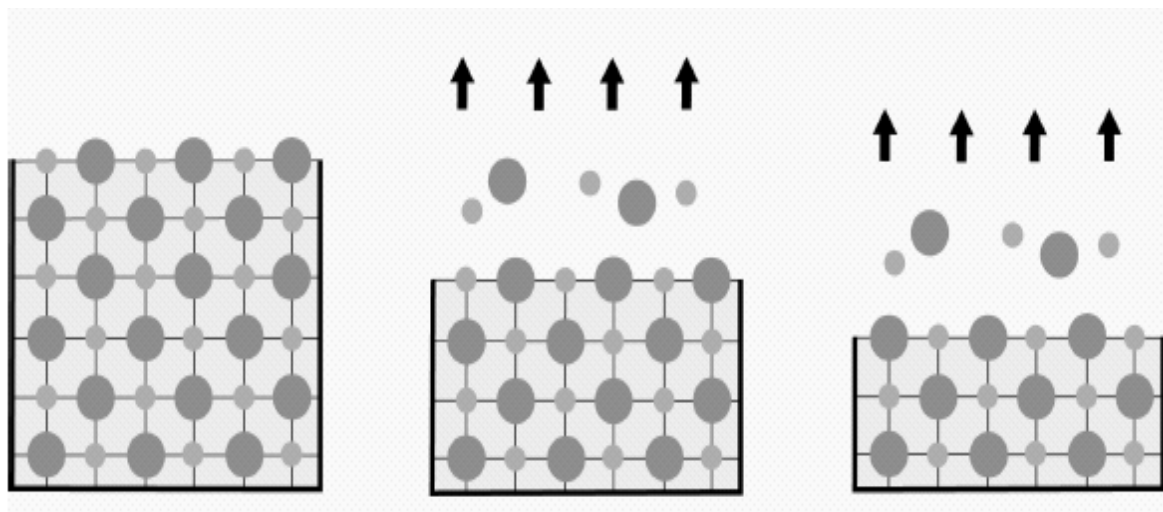
1.2.2 Υφαλοχρώματα μακράς διάρκειας (long-life paints)

Στην κατηγορία αυτή η μήτρα του υφαλοχρώματος είναι αδιάλυτη στο νερό με αποτέλεσμα η τοξική ουσία να διαχέεται στη διεπιφάνεια χρώματος – νερού, διαμέσου διαύλων που δημιουργούνται στη μήτρα. Οι διάυλοι αυτοί δεν είναι σταθεροί αλλά μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου, οδηγώντας σε μείωση του ρυθμού απελευθέρωσης της τοξικής ουσίας

στο περιβάλλον και γρήγορη ελάττωση της διάχυσής της. Η δραστική ουσία μετά την παρέλευση 18-24 μηνών, ουσιαστικά εγκλωβίζεται μέσα στη μήτρα του χρώματος με αποτέλεσμα να μειώνεται η δραστηριότητα του υφαλοχρώματος (Terlizzi et al., 2001).

1.2.3 Συμπολυμερή αυτολειαινόμενα υφαλοχρώματα (Shelf-Polishing Copolymer Paints)

Στην κατηγορία αυτή των υφαλοχρωμάτων, η τοξική ουσία προσδένεται χημικά πάνω σε ένα πολυμερές υπόστρωμα (Σχήμα 1.2). Η τοξική ουσία απελευθερώνεται στο περιβάλλον χάρις στο μηχανισμό της υδρόλυσης, η οποία ουσιαστικά λύει τους χημικούς δεσμούς μεταξύ τοξικής ουσίας και υποστρώματος. Έτσι με την κίνηση του νερού διαρκώς οι οργανισμοί εκτίθενται σε μια νέα τοξική επιφάνεια η οποία παρεμποδίζει την προσκόλλησή τους. Ο ρυθμός απελευθέρωσης της τοξικής ουσίας σε αυτή την περίπτωση είναι ελεγχόμενος και σταθερός (Σχήμα 1.3) ενώ η διάρκεια της αποτελεσματικής δράσης του υφαλοχρώματος είναι ανάλογη του πάχους του στρώματός του. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 4 ή 5 ετών (Terlizzi et al., 2001; Omae, 2003b).



Σχήμα 1.2 Συμπολυμερές αυτολειαινόμενο υφαλόχρωμα.



Σχήμα 1.3 Ρυθμός απελευθέρωσης τοξικής ουσίας σε συμπολυμερές αυτολειαινόμενο υφαλόχρωμα.

1.3 Δραστικά συστατικά υφαλοχρωμάτων

Η ιστορία της χρήσης των υφαλοχρωμάτων ξεκινά πριν το 2000 π.Χ. (Πίνακας 1.2). Τα πρώτα συστήματα προστασίας των εκτεθειμένων στο νερό επιφανειών ήταν με τη μορφή κεριού, πίσσας ή ρητίνης και είχαν ως βάση ελάσματα χαλκού ή μολύβδου. Πριν τη δεκαετία του 1960 εισήχθησαν στην αγορά τα συμβατικά υφαλοχρώματα με κύριο συστατικό το οξείδιο του χαλκού (Cu_2O). Μετά τη δεκαετία του 1960 άρχισαν να χρησιμοποιούνται οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις οι οποίες ακόμη και σήμερα χρησιμοποιούνται εκτεταμένα παγκοσμίως καθώς βρίσκουν πολλές εφαρμογές (Omae, 2003b).

Πίνακας 1.2 Ιστορία των υφαλοχρωμάτων

Παλαιότερα	Ελάσματα χαλκού πάνω σε ξύλινες επιφάνειες
2000 π.Χ.	Επικάλυψη των σκαφών με κομμάτια χαλκού (copper bolts) και ελάσματα μολύβδου
300 π.Χ.	Χρώματα από κερί ή πίσσα με κύριο συστατικό τις ενώσεις του αρσενικού, του θείου κ.τ.λ.
19 ^{ος} αιώνας	Πρώτη βιομηχανική χρήση υφαλοχρωμάτων (σουλφίδια του χαλκού)
Πριν τη δεκαετία του 1960	Συμβατικά υφαλοχρώματα με βάση το οξείδιο του χαλκού, οργανικές ενώσεις του υδραργύρου, του μολύβδου, του αρσενικού, των αλογόνων και του θείου
1960-	Οργανοκασσιτερικές ενώσεις
1974-	Συμπολυμερή αυτολειαινόμενα υφαλοχρώματα
1980-	Πολυμερείς ενώσεις του πυριτίου
1990-	Υφαλοχρώματα χωρίς τριβουτυλοκασσίτερο

Πηγή: Omae, 2003a.

1.4 Οργανοκασσιτερικές ενώσεις

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις έχουν τον γενικό τύπο: $R_nSnX_{(4-n)}$ όπου R: οργανική ομάδα (αλκύλιο ή φαινύλιο), X: ανιόν (αλογόνο, οξείδιο, υδροξείδιο, -OH, -OR', -SH, -SR', -OOCR' κ.λ.π.) και $n=1-4$. Οι ενώσεις του τύπου R_2SnX_2 και R_3SnX είναι οι πιο σημαντικές κατηγορίες που κυκλοφορούν στο εμπόριο (Hoch, 2001; Omae, 2003b).

Οι οργανοκασσιτερικές ενώσεις βρίσκουν εφαρμογή ως διαλύτες, προσθετικά βενζίνης, σταθεροποιητές PVC, συντηρητικά ξυλείας, αντιοξειδωτικά, παρεμποδιστές διάβρωσης, αντιδραστήρια επιμετάλλωσης, προσθετικά χρωμάτων, απολυμαντικά, εντομοκτόνα, παρασιτοκτόνα κλπ (Hoch, 2001).

Είναι ενώσεις σχετικά αδιάλυτες στο νερό, λιποδιαλυτές και σχετικά σταθερές στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μεγάλο συντελεστή βιοσυσώρευσης.

Η χρήση τους στα υφαλοχρώματα όπως προαναφέρθηκε, ξεκίνησε τη δεκαετία του 1960 με τον τριβουτυλο-κασσίτερο να χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα, παρά τους περιορισμούς της χρήσης του, κατά κόρον στα χρώματα που εφαρμόζονται στα μεγάλα σκάφη.

1.4.1 Τριβουτυλο-κασσίτερος (TBT)

Ο TBT έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών συμπεριλαμβανομένου τη χρήση του ως μυκητοκτόνο, βακτηριοκτόνο, εντομοκτόνο και συντηρητικό ξυλείας. Άρχισε να χρησιμοποιείται ως δραστικό συστατικό των υφαλοχρωμάτων που είχαν ως βάση το χαλκό, τη δεκαετία του '60. Εξαιτίας της μεγάλης αποτελεσματικότητάς του συγκριτικά με το χαλκό, η χρήση του αυξήθηκε κατακόρυφα τη δεκαετία του '70 (Omae 2003b).

Αρχικά ο TBT αντικατέστησε τις ενισχυτικές ουσίες των υφαλοχρωμάτων (π.χ. οργανοϋδράργυρος, αρσενικό και μόλυβδος) σε χρώματα, των οποίων ο κύριος βιοκτόνος παράγοντας ήταν ο χαλκός αλλά χρησιμοποιήθηκε και μεμονωμένα ως βιοκτόνος παράγοντας (Bryan et al, 1992).

Μέχρι τη δεκαετία του 1970 αποτέλεσε κύριο συστατικό των συμβατικών υφαλοχρωμάτων. Από τα μέσα όμως της δεκαετίας του '70, με την εισαγωγή στην αγορά των συμπολυμερών αυτολειαινόμενων υφαλοχρωμάτων, ο TBT χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα αφού ο νέος τύπος σκευασμάτων αύξησε την αποτελεσματικότητά του (Omae, 2003a).

Το πρόβλημα της ρύπανσης από τον TBT αναγνωρίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Μέχρι τότε ο κόλπος d' Arcachon της Γαλλίας αποτελούσε την πιο σημαντική περιοχή για την καλλιέργεια στρειδιών (*Crassostrea gigas*) με την παραγωγή να φτάνει στους 15,000 tn yr⁻¹. Παράλληλα όμως στον κόλπο υπήρχε έντονη δραστηριότητα σκαφών αναψυχής με αποτέλεσμα οι εισροές του TBT στο θαλάσσιο περιβάλλον να ανέρχονται σε 8 kg d⁻¹ (Ruiz et al., 1996). Η μείωση της παραγωγής των στρειδιών στον κόλπο έγινε αιτία να αναγνωρισθούν οι επιβλαβείς επιπτώσεις του TBT πάνω σε οργανισμούς που δεν αποτελούσαν στόχο των υφαλοχρωμάτων. Ο TBT χαρακτηρίστηκε ως η πιο τοξική ουσία που εσκεμμένα διοχετεύτηκε στο θαλάσσιο περιβάλλον με πιο σημαντική επίπτωση τη διαταραχή του ορμονικού συστήματος των θαλάσσιων οργανισμών που οδηγεί στην εμφάνιση αρσενικών χαρακτηριστικών από θηλυκά άτομα. Η ανωμαλία αυτή του αναπαραγωγικού συστήματος των οργανισμών συνεπάγεται τη γρήγορη εξαφάνισή τους. Το παραπάνω φαινόμενο είναι γνωστό ως “imposex” (imposed sex) και για πρώτη φορά περιγράφηκε από τον Smith (1971).

Η καταστροφή οστρακοειδών στις αλιευτικές περιοχές και ο κίνδυνος στους άλλους θαλάσσιους οργανισμούς, όπως επίσης και οι πιθανές απειλές στην ανθρώπινη υγεία, οδήγησαν σε εκτεταμένους περιορισμούς της χρήσης του TBT στη δεκαετία του '80. Το 1982 οι Γαλλικές αρχές απαγόρευσαν τη χρήση χρωμάτων που περιείχαν πάνω από 3% οργανομεταλλικές ενώσεις του κασσιτέρου σε πλοία κάτω των 25 m τα οποία έπλεαν σε

παράκτια ύδατα κοντά σε καλλιέργειες στρεϊδιών. Τα μέτρα αυτά αρχικά λήφθηκαν για μια περίοδο τριών μηνών, αργότερα όμως επεκτάθηκαν, και τον Σεπτέμβριο του ίδιου έτους απαγορεύτηκε σε όλη τη γαλλική ακτογραμμή η χρήση τέτοιου είδους χρωμάτων σε σκάφη κάτω των 25 m. Η διάταξη αυτή, το 1987 υιοθετήθηκε για απεριόριστο χρονικό διάστημα (Alzieu, 1991). Από τα τέλη της δεκαετίας του '80 μέχρι τις αρχές του '90 παρόμοια νομοθεσία εισήγαγαν και άλλες χώρες όπως ο Καναδάς, η Αυστραλία, η Νέα Ζηλανδία, οι ΗΠΑ και η Νότια Αφρική, το Χονγκ Κονγκ και οι περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες. Στην Ιαπωνία, απαγορεύτηκε η παραγωγή υφαλοχρωμάτων που περιείχαν TBT το 1997.

Το 1989 η Ευρωπαϊκή Ένωση εξέδωσε την οδηγία 89/677/ΕΟΚ σύμφωνα με την οποία οι οργανομεταλλικές ενώσεις του κασσιτέρου "δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται ως δραστικές ουσίες και συστατικά παρασκευασμάτων που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν κατά της απόθεσης ακαθαρσιών από μικροοργανισμούς, φυτά ή ζώα (Communaute Europeenne, 1989):

α) Στα ύφαλα σκαφών με εξωτερικό ολικό μήκος, όπως ορίζεται στο πρότυπο ISO 8666, μικρότερο από 25 m.

β) Στους κλωβούς, τους πλωτήρες, τα δίχτυα καθώς και σε κάθε εγκατάσταση ή εξοπλισμό που χρησιμοποιείται στην ιχθυοκαλλιέργεια και στην οστρακοκαλλιέργεια.

γ) Σε εγκαταστάσεις ή εξοπλισμό που βρίσκεται εν όλω ή εν μέρει κάτω από το νερό.

Η Ελληνική νομοθεσία εναρμονίστηκε με την παραπάνω οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την υπ. αριθμ. Ν.1100/91 Απόφαση του Ανωτάτου Συμβουλίου Χημείας και την Ν.3010875/478/92 Υπουργική Απόφαση της Ελληνικής Κυβέρνησης.

Πρόσφατα κάποιες ευρωπαϊκές κυβερνήσεις πρότειναν την επέκταση της απαγόρευσης, καλύπτοντας έτσι τα πλοία των 50 m, ή και λιγότερο, καθώς και εκείνα που σχετίζονταν με το παράκτιο εμπόριο (Khalimonon, 1995).

Τον Οκτώβριο του 2001 ο IMO (Διεθνής Θαλάσσιος Οργανισμός) πρότεινε την απαγόρευση της χρήσης του TBT διεθνώς από την 1η Ιανουαρίου του 2003 ώστε από την 1^η Ιανουαρίου 2008 να εξαφανιστεί ο TBT από τα υφαλά όλων των πλοίων, ενώ η Ευρωπαϊκή ένωση κατέταξε τον TBT, σύμφωνα με την Οδηγία-Πλαίσιο για το νερό (Water Framework Directive) 2000/60/EC, στις επικίνδυνες ουσίες προτεραιότητας (priority hazardous substances).

1.5 Χαλκός

Οι απαγορεύσεις αναφορικά με τη χρήση του TBT στα υφαλοχρώματα οδήγησαν στην επαναχρησιμοποίηση των υφαλοχρωμάτων με βάση το χαλκό. Ο χαλκός είναι ο πιο

σημαντικός βιοκτόνος παράγοντας εκτός από τις οργανοκασιτερικές ενώσεις. Αποτελεί κύριο συστατικό των υφαλοχρωμάτων που δεν περιέχουν κασσίτερο και οι μορφές που χρησιμοποιούνται ως δραστικά συστατικά είναι τόσο ο μεταλλικός χαλκός όσο και οι ενώσεις του (Πίνακας 1.3). Το χαρακτηριστικό των ενώσεων του χαλκού είναι η δυνατότητα σχηματισμού ιόντων Cu^{++} με την είσοδό τους στο νερό. Ο δισθενής χαλκός είναι πιο σταθερή και τοξική μορφή σε σχέση με τον μονοσθενή χαλκό (Ranke, 2000; Omae 2003a).

Πίνακας 1.3 Βιοκτόνοι παράγοντες υφαλοχρωμάτων με βάση το χαλκό.

Μεταλλικός χαλκός	Cu
Κράματα χαλκού	Cupronickel : Cu-Ni (90-10%, 70-30%), Cu-Ni-M (M=Cr, Fe, Co, Ti, Zr, Nb, Ta, V, P, Ga, In, Ag), (Cu + Ni \geq 80%), Cu-As (As=0.34%) Aluminum bronze (Cu=89.22%, Al=7.20%), Aluminum brass (Cu=76.31%, Zn= 21.36% Al=1.99%)
Ανόργανες ενώσεις του χαλκού	Cu_2O , μίγμα Cu_2O και CuO , μίγμα Cu_2S και CuS , $CuSCN$
Οργανικές ενώσεις του χαλκού	$PhCu$, $Me(CH_2=CH)CuLi$, $EtCu(CN)Li$ $BuCuBF_3$
Αρωματικές ενώσεις του χαλκού	Copper pyrithione, copper picolinic acid amide, acetylacetone copper aluminum, ethylenediamine copper aluminum

Πηγή: Omae, 2003a.

Ο χαλκός παρέχει προστασία από οργανισμούς όπως οστρακοειδή, προνύμφες και μια πληθώρα φυτοπλαγκτονικών οργανισμών. Εντούτοις όμως κάποια είδη φυκών όπως π.χ. τα *Enteromorpha spp.*, *Ectocarpus spp.* και *Achnanthes spp* παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στο χαλκό. Για την προστασία λοιπόν από τέτοια ανθεκτικά είδη, διάφορες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες χρησιμοποιούνται μαζί με το χαλκό ώστε να ελεγχθεί η ρύπανση από αυτούς (Voulvoulis et al., 1999a).

1.6 Οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες

Οι κύριες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με το χαλκό, ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες όπως είναι: οι ετεροκυκλικές αμίνες, οι αρωματικές αλογονούχες ενώσεις, οι καρβαμιδικές ενώσεις κ.λ.π. (Πίνακας 1.4) (Voulvoulis et al., 1999a; Omae, 2003a). Αυτές οι οργανικές ουσίες περιέχουν άζωτο, οξυγόνο, αλογόνα,

θείο και βόριο. Η δραστηριότητά τους οφείλεται στους χημικούς δεσμούς των στοιχείων αυτών είτε μεταξύ τους είτε με άτομα άνθρακα, υδρογόνου ή μετάλλων.

Πίνακας 1.4 Κύριες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες που χρησιμοποιούνται στα υφαλοχρώματα νέας γενιάς.

Οργανική ενισχυτική βιοκτόνος ουσία	Εμπορική ονομασία
1. Ετεροκυκλικές αμίνες	
zinc complex of 2-mercaptopyridine-1-oxide	zinc pyrithione
2-methylthio-4-butylamino-6-cyclopropylamine-s-triazine	Irgarol 1051
2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine	TCMSpyridine
(2-thiocyanomethylthio)benzothiazole	TCMTB
(4,5-dichloro-2- <i>n</i> -octyl-4-isothiazolin-3-one)	Sea-Nine 211, Kathon 5287
pyridine triphenylborane complex	KH101
2. Αρωματικές αλογονούχες ενώσεις	
(2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile)	Chlorothalonil
3-(3,4-dichlorophenyl)1,1-dimethylurea	Diuron
2,4,6-trichlorophenylmaleimide	
3. Καρβαμιδικές ενώσεις	
zinc bis(dimethyl thiocarbamate)	Ziram
zinc ethylene bisdithiocarbamate	Zineb
bis(dimethylthiocarbamoyl)disulfide	Thiram
3-iodo-2-propynyl butylcarbamate	
manganese ethylene bisdithiocarbamate	Maneb
4. Άλλες ενώσεις	
<i>N,N</i> -dimethyl- <i>N'</i> -phenyl(<i>N'</i> -fluorodichloromethyl-thiosulfamide	Dichlorofluanid
<i>N</i> -(fluorodichloromethylthio)phthalimide	
diiodomethyl- <i>p</i> -tolysulfone	

Πηγή: Omae, 2003a.

Στην Ελλάδα έχει βρεθεί ότι χρησιμοποιούνται μόνο επτά από τις ουσίες που αναφέρονται στον Πίνακα 1.4. Αυτές είναι οι: diuron, irgarol 1051, zinc pyriithione, dichlofluanid, chlorothalonil, ziram, folpet (ACE, 2002).

Οι περισσότερες από τις ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες είναι γνωστά φυτοφάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια στη γεωργία ως ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα ή βακτηριοκτόνα (Πίνακας 1.5).

Πίνακας 1.5 Άλλες εφαρμογές των οργανικών ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων.

Ουσία	Άλλη εφαρμογή
Chlorothalonil	Γεωργία (μυκητοκτόνο), χρώματα, κόλλες
Dichlofluanid	Γεωργία (μυκητοκτόνο)
Diuron	Γεωργία (ζιζανιοκτόνο)
TCMTB	Γεωργία (μυκητοκτόνο), συντηρητικό ξυλείας, βιομηχανία δερμάτων
Zinc pyriithione	Γεωργία (βακτηριοκτόνο, μηκυτοκτόνο), υγρά λουσίματος (σαμπουάν) σε συγκέντρωση $\approx 1\%$
Irgarol 1051	Γεωργία (ζιζανιοκτόνο)
Zineb	Γεωργία (μηκυτοκτόνο)
Ziram	Γεωργία (μηκυτοκτόνο)
Maneb	Γεωργία (μηκυτοκτόνο)
Thiram	Γεωργία (μηκυτοκτόνο)

Εκτός από τις κύριες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες, υπάρχουν και δευτερεύουσες οι οποίες μπορεί να είναι επίσης ετεροκυκλικές αμίνες, αρωματικές αλογονούχες ενώσεις, φαινόλες, ενώσεις του θείου ή του φωσφόρου και άλλες όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.6 (Omae, 2003a).

Πίνακας 1.6 Δευτερεύουσες οργανικές ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες των υφαλοχρωμάτων.

1. Ετεροκυκλικές αμίνες
5,6-dihydroxy-3-(2-thienyl)-1,4,2-oxathiazine, 4-oxide
2,5,6-tribromo-1-methylgramine
(3-dimethylaminomethyl-2,5,6-tribromo-1-methylindole)
2,3-dibromo-N-(6-chloro-3-pyridyl)succinimide
thiazoleureas
3-(3,4-dichlorophenyl)-5,6-dihydroxy-1,4,2-oxathiozine oxide
2-trifluoromethyl-3-bromo-4-cyano-5-parachlorophenyl pyrrole
2. Αρωματικές αλογονούχες ενώσεις
2-bromo-4ϕ-chloroacetanilide
3. Φαινόλες
2,6-bis(2ϕ,4ϕ-dihydroxybenzyl)-4-methylphenyl
2,2-bis(3,5-dimethoxy-4-hydroxyphenyl)propane
acylphloroglucinols: 2,6-diacyl-1,3,5-trihydroxybenzene
4. Σύμπλοκα φαινυλοβορικών αμινών
triphenylboron pyridine complex
alkyldiphenylboron isoquinoline complexes
triphenylboron octadecylamine complex
triphenylboron ethylenediamine complex
5. Άλλες αμίνες
guanidines: 1,3-dicyclohexyl-2-(3-chlorophenyl)guanidine
alkylamines: auryldimethylamine
6. Ενώσεις φωσφόρου
dialkylphosphonates: phosphoric acid di(2-ethylhexylester)
7. Ενώσεις θείου
alkyl haloalkyl disulfides: <i>n</i> -octylchloromethyl disulfide
4,5-dicyano-1,3-dithiole-2-thione
8. Άλλες ενώσεις
enzymes: endopeptidase

Πηγή: Omae, 2003a.

Σήμερα από τις κύριες ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες, το irgarol 1051 και το diuron δεν επιτρέπεται να εφαρμόζονται σε ύφαλα σκαφών μήκους < 25 m σε ορισμένες ευρωπαϊκές χώρες όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Σουηδία και τη Δανία. Στο Ηνωμένο Βασίλειο μάλιστα η χρήση του diuron, το οποίο σύμφωνα με την Οδηγία-Πλαίσιο για το νερό (Water Framework Directive) 2000/60/EC, ανήκει στις ουσίες προτεραιότητας, έχει απαγορευτεί εντελώς στα υφαλοχρώματα (Konstantinou and Albanis, 2004).

1.7 Εναλλακτικές μέθοδοι προστασίας των υφάλων χωρίς τη χρήση βιοκτόνων ουσιών

1.7.1 Φυσικές βιοκτόνες ουσίες

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί όπως οι σπόγγοι, τα κοράλλια, τα θαλάσσια φυτά, τα δελφίνια κ.λ.π. αυτοπροστατεύονται από την προσκόλληση πάνω τους ανεπιθύμητων οργανισμών χάρις την έκκριση χαρακτηριστικών ουσιών οι οποίες τους παρέχουν προστασία και επιπλέον δεν προκαλούν σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα διότι είναι φυσικής προέλευσης. Τέτοιου είδους ουσίες με έντονη αναισθητική και απωθητική δράση που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στα φιλικά προς το περιβάλλον υφαλοχρώματα, ανιχνεύονται και σε χερσαία φυτά όπως το πράσινο τσάι, και τα φύλλα της βελανιδιάς (Omae, 2003a).

Οι κύριες φυσικές ουσίες κατά του αποικισμού των επιφανειών (Πίνακας 1.7) προέρχονται από τέσσερα διαφορετικά φύλα ζώων: Κνιδόζωα, Σπογγόζωα, Βρυόζωα, Χορδωτά και δύο είδη θαλάσσιων φυτών τα Θαλλόφυτα και τα Αγγειόσπερμα (Clare, 1998). Εκτός από τοξίνες μπορεί να είναι και ουσίες με αναισθητική ή απωθητική δράση, ουσίες που αναχαιτίζουν την ανάπτυξη, την προσκόλληση και τη μεταμόρφωση των οργανισμών. Έτσι μπορεί να δράσουν αποτελεσματικά ενάντια στο πρόβλημα του αποικισμού των διαφόρων επιφανειών.

Πίνακας 1.7 Κύριες φυσικές ουσίες κατά του αποικισμού των επιφανειών.

Οργανισμός	Τοξική ουσία	Δράση
<i>Κνιδόζωα</i>		
<i>Leptogorgia virgulata, L. setacea</i>	homarine	Αναστολή αύξησης
<i>Pseudopterogorgia americana</i>	furanogermacrene	Αναστολή αύξησης
<i>Renilla reniformis</i>	renillafoulins	Αναστολή αποικισμού
<i>Leptogorgia virgulata</i>	pukalide	Αναστολή αποικισμού
	epoxy pukalide	
<i>Lobophytum pauciflorum</i>	14-hydroxycembra-1,3,7,11-tetraene	Αναστολή αύξησης
	15-hydroxycembra-1,3,7,11-tetraene	

Συνέχεια Πίνακα 1.7

Οργανισμός	Τοξική ουσία	Δράση
<i>Muricea fruticosa</i>	muricins	Αναστολή αύξησης των διατόμων
<i>Sinularia</i> sp.	(-)-β-bisabolene	Αποθητική
<i>Sinularia</i> sp.	13 ^α -acetoxypukalide	Κατά των μυδιών
	(9E)-4-(6,10-dimethylocta-9-11-dienyl)-furan-2-carboxylic acid	Κατά των οστρακοειδών
Σπογγόζωα		
40 sponge spp	terpenoids	Αντιβακτηριδιακή, μυκητοκτόνο, αναστολή αποικισμού
<i>Aplysina fistularis</i>	aerothionin	Αναστολή μεταμόρφωσης
	homoaerothionin	
<i>Aplysilla glacialis</i>	1-methyladenine	Αντιβακτηριδιακή
<i>Phyllospongia papyracea</i>	furospongolide	Αναστολή αποικισμού
<i>Dysidea herbacea</i>	herbacin	Αναστολή αποικισμού
<i>Crella incrustans</i>	lyso-platelet aggregating factor	Αναστολή αποικισμού
Βρυόζωα		
<i>Zoobotryon pellucidum</i>	1-methyl-2,5,6-tribromogramine	Αναστολή αποικισμού
Χορδωτά		
<i>Eudistoma olivaceum</i>	eudistomins G (H)	Αναστολή αποικισμού
<i>Halocynthia roretzi</i>	lysophosphatidylinositols	Μυκητοκτόνο
Θαλλόφυτα		
<i>Delisea pulchra</i>	halogenated furanones	Αναστολή των οστρακοειδών, των φυκών, του αποικισμού, και της ανάπτυξης μικροβίων
Αγγειόσπερμα		
<i>Zostera marina</i>	p-(sulfooxy)cinnamic acid	Αναστολή αποικισμού

Πηγή: Omae, 2003a.

Εκτός από τις κύριες υπάρχουν και δευτερεύουσες ουσίες που παρέχουν προστασία από τους ανεπιθύμητους οργανισμούς. Οι ουσίες αυτές ταξινομούνται σε δέκα διαφορετικές

κατηγορίες ενώσεων: τερπένια (υδρογονάνθρακες βιολογικής προέλευσης), ακετυλένια, πολυκυκλικές ενώσεις, στεροειδή, φαινόλες, ισοθειοκυανικοί εστέρες, ενώσεις αζώτου, παράγωγα γλυκερόλης, ανώτερα λιπαρά οξέα και ένζυμα (Πίνακας 1.8). Γενικότερα όμως μπορούν να διακριθούν σε δύο μόνο κατηγορίες: τα τερπένια και τα μη τερπένια. Τα τερπένια περιλαμβάνουν ομάδες ακόρεστων υποκαταστατών και οξυγόνου όπως καρβοξύλια, φουράνια, λακτόνες, αιθέρες και υδροξύλια. Αντίθετα τα μη τερπένια έχουν ως υποκαταστάτες άζωτο, οξυγόνο, υδροξύλιο, καρβοξύλιο, χλώριο, βρώμιο και αμινομάδες. Όλες αυτές οι ενώσεις παράγονται από οργανισμούς όπως οι σπόγγοι, τα φύκη, τα κοράλλια, οι αστερίες και τα μύδια (Omae, 2003a).

Πίνακας 1.8 Δευτερεύουσες φυσικές ουσίες κατά του αποικισμού των επιφανειών.

1. Τερπένια		
monoterpene	1,4-dibromo-2,3,6-trichloro-3,7-dimethyl-7-octene (temperate red alga)	<i>Plocamium costatum</i>
susquiterpens	3-acetoxy- <i>E</i> - Δ^1 -bisabolene (marine red alga)	<i>Laurencia rigida</i>
	Isocyanosquiterpene alcohol (1 <i>S</i> *,4 <i>S</i> *,7 <i>R</i> *10 <i>S</i> *)10-isocyano-5-cadinen-4-ol) nudibranch	<i>Phyllidia pustulosa</i>
	2-hydroxy-9,11-dimethyl-10-methylene-3-oxatricyclo[7.3.1.0 _{2,6}]tridec-5-en-4-one (alauan marine sponge)	<i>Dysidea herbacea</i>
diterpenes	<i>epi</i> -agelasine C (marine sponge)	<i>Agelas mauritiana</i>
	eleganolone (common brown alga)	<i>Bifurcaria bifurcata</i>
	Renillafoulins (Atlantic sea pansy)	<i>Renilla reniformis</i>
	kalihinenes (Kalihinol A) (marine sponge)	<i>Acanthella cavernosa</i>
sesterterpene	22-acetoxy-16'-hydroxy-24-methyl-24-oxoscalarano-25,12'-lactone (alauan marine sponge)	<i>Lendenfeldia chondrodes</i>
terpene glucosides	pittosporanoside A2 pittosporum	<i>Pittosporum tobira</i> Ait

Συνέχεια Πίνακα 1.8

2. Ακετυλένια		
polyacetylenes	callytetraynetriol (marine sponge)	<i>Callyspongia truncata</i>
3. Πολυκυκλικές ενώσεις		
solenioide	bis(deacetyl)solenioide D (marine sponge)	<i>Psammaphysilla purpurea</i>
4. Στεροειδή		
epidioxy sterol	5-R,8R-epidioxycholest-6-en-3,-ol (Palauan marine sponge)	<i>Lendenfeldia chondrodes</i>
seco-steroids	12R-actoxy-13,17-seco-cholesta-1,4-diene-3-ones (octocoral)	<i>Dendronephthya</i> sp.
	3-methoxy-19-norpregna-1.3,5(10),20-tetraene (octocoral)	<i>Alcyonium gracillimum</i>
steroid lycosides	ϕ9(11)3,,6R-dihydrosteroidal aglycon (starfish)	<i>Henricia downeyae</i>
5. Φαινόλες		
	tannins epigallocatechingallate (green tea)	
phloroglucinols	3,5-diformyl phloroglucinols (blue mussel)	<i>Eucalyptus</i> sp.
kaempferol glucopyranosides	kaempferol coumaroylglucopyranoside (leaves of oak tree)	<i>Quercus dentata</i>
stilben glucoside	polydatin coumarate (eucalyptus)	<i>Eucalyptus rubida</i>
monophenols	capsaicin (pepper)	
6. Εστέρες του ισοθειοκυανικού οξέος		
alkyl isothiocyanates	phenylethylisothiocyate (wasabi)	<i>Wasabi japonicas</i> Matsum
7. Ενώσεις αζώτου		
pyrroles	pseudoceratidine (marine sponge)	<i>Pseudoceratina purpurea</i>
	mauritiamine (marine sponge)	<i>Agelas mauritiana</i>
indoles	2,5,6-tribromo-1-methylgramine (zoobotryon)	<i>Zoobotryon pellucidum</i>
amides	<i>N</i> -docosanoyl- <i>D</i> -erythro-(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-16-methyl-heptadecasphing-4(<i>E</i>)-enine (marine sponge)	<i>Haliclona koremella</i>
	nicotinamide (mallotus)	<i>Mallotus japonicus</i> Mueller-Arg

Συνέχεια Πίνακα 1.8

carbamates	ethyl <i>N</i> -(2-phenylethyl)carbamate (marine bacteria)	<i>Cytophaga</i> sp.
primary amines	ceratinamine (marine sponge)	<i>Pseudoceratina</i>
8. Παράγωγα γλυκερόλης		
glycoylglycerolipids	digalactosyl diacylglycerol [wakame (sea weed)]	<i>Undaria pinnatifida</i>
9. Ανώτερα λιπαρά οξέα		
	arachidonic acid, palmitoleic acid (marine sponge)	<i>Phyllospongia papyracea</i>
10. Ένζυμα		
	phenoloxidase (blue mussel)	<i>Mytilus edulis</i>

Πηγή: Omae, 2003a.

1.7.2 Ολισθηρά επιχρίσματα

Εκτός από τη χρήση υφαλοχρωμάτων που περιέχουν βιοκτόνους παράγοντες, η προστασία των επιφανειών μπορεί να επιτευχθεί και με τη χρήση αντιρρυπαντικών συστημάτων τα οποία είναι απαλλαγμένα από τοξικές ουσίες. Μια τέτοια περίπτωση είναι η χρήση οργανοπυριτικών ενώσεων, όπως οι σιλικόνες (Omae, 2003a).

Οι σιλικόνες είναι πολυμερή που περιέχουν δεσμούς Si-O. Κύρια χαρακτηριστικά τους είναι ο πολύ ισχυρός δεσμός Si-O (428 kJ mol^{-1}) και η μικρή ενδομοριακή δύναμη. Η χαμηλή ενδομοριακή δύναμη οφείλεται ουσιαστικά στα ίδια τα άτομα του Si και του O. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν μεγάλη διαφορά ηλεκτραρνητικότητας με αποτέλεσμα οι ομοιοπολικοί και ιοντικοί δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ τους να προκαλούν πόλωση του μορίου της σιλικόνης και άρα χαμηλή ενδομοριακή δύναμη. Αντίθετα οι δεσμοί SiC-O εμφανίζουν μικρή ιοντική ισχύ. Εξαιτίας όμως αυτών των δύο ιδιοτήτων δηλαδή της χαμηλής ενδομοριακής δύναμης και της χαμηλής ιοντικής ισχύος των ομάδων του μεθυλίου, οι σιλικόνες είναι πολύ υδρόφοβες ενώσεις, ανθεκτικές στις κλιματολογικές συνθήκες, με έντονες λιπαντικές ιδιότητες και καθιστούν ολισθηρή την επιφάνεια πάνω στην οποία εφαρμόζονται αποτρέποντας έτσι την προσκόλληση μικροοργανισμών (Omae, 2003a).

Τα χρώματα που περιέχουν σιλικόνες διαφοροποιούνται από τα αυτολειαινόμενα επειδή τα δεύτερα περιέχουν τοξικές ουσίες. Λογικά αυτού του είδους τα χρώματα θα έπρεπε πλήρως να προστατεύουν τις διάφορες επιφάνειες από την προσκόλληση οργανισμών. Στην

πραγματικότητα όμως παρέχουν ασθενή προστασία διότι καθώς αυξάνεται το ποσοστό της ρύπανσης στα ύφαλα και καθώς κινείται το σκάφος οι δεσμοί Si-O γίνονται ασθενείς σε σημείο που λύνονται, οπότε παύει και η αποτελεσματική δράση του χρώματος (Omae, 2003a).

1.7.3 Χρήση ηλεκτρικού ρεύματος

Υπάρχουν δύο τρόποι αποτροπής της ρύπανσης με τη χρήση ηλεκτρικού ρεύματος. Ο πρώτος καλείται ηλεκτρική απολύμανση. Στην περίπτωση αυτή τοποθετείται στην επιφάνεια που πρέπει να προστατευτεί ένα θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο το οποίο έλκει και σκοτώνει τα ηλεκτρικά φορτισμένα κύτταρα των βακτηρίων με ηλεκτρικό ρεύμα τάσης 1-1,5 V. Το ίδιο το ηλεκτρόδιο προστατεύεται από την προσκόλληση βακτηρίων με την εφαρμογή εναλλασσόμενης τάσης. Τα συστήματα αυτά δεν προκαλούν ηλεκτρόλυση του θαλασσινού νερού (η οποία μεταβάλλει το pH και τη συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου) διότι το ηλεκτρικό δυναμικό που χρησιμοποιείται δεν είναι αρκετά υψηλό (Omae, 2003a).

Η άλλη περίπτωση είναι η χρήση ηλεκτροαγώγιμων χρωμάτων που διευκολύνουν την ηλεκτρόλυση του θαλασσινού νερού αποτρέποντας την προσκόλληση των οργανισμών χάρις τις ουσίες που παράγονται λόγω ηλεκτρόλυσης. Τα ύφαλα αρχικά επιστρώνονται με ένα μονωτικό υλικό και στη συνέχεια επικαλύπτονται με ένα ηλεκτροαγώγιμο χρώμα που περιέχει μέταλλα (π.χ. χαλκό). Το αγωγίμο στρώμα διαπερνάται από ηλεκτρικό ρεύμα μετατρέποντάς το σε κάθοδο ενώ το υπόλοιπο τμήμα των υφάλων λειτουργεί ως άνοδος. Με τη χρήση ελάχιστου ηλεκτρικού ρεύματος στο ηλεκτροαγώγιμο στρώμα, το νερό ηλεκτρολύεται παράγοντας ιόντα υποχλωριώδους οξέος και ιόντα χλωρίου τα οποία λειτουργούν ως μυκητοκτόνα. Ηλεκτρικό ρεύμα έντασης $0,3 \text{ A m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ είναι αρκετό να αποτρέψει την προσκόλληση των οργανισμών. Η χρήση τέτοιων συστημάτων δεν προξενεί προβλήματα στο περιβάλλον διότι τα ιόντα υποχλωριώδους οξέος με την υπεριώδη ακτινοβολία μετατρέπονται πολύ γρήγορα σε ιόντα χλωρίου ενώ και η κατανάλωση ενέργειας δεν είναι μεγάλη (100 w h^{-1} για πλοίο βάρους 40-100 τόνους) (Omae, 2003a).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΥΧΗ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΒΙΟΚΤΟΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΩΝ ΥΦΑΛΟΧΡΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

2.1 Εισαγωγή

Αμέσως μετά την εισαγωγή μιας ουσίας στο περιβάλλον, λαμβάνουν χώρα διάφορες πολύπλοκες διεργασίες οι οποίες καθορίζουν την τύχη και την περαιτέρω συμπεριφορά της. Οι διεργασίες αυτές ουσιαστικά ελέγχουν τις συγκεντρώσεις μιας οργανικής ένωσης στο περιβάλλον και ο βαθμός στον οποίο πραγματοποιούνται εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ένωσης. Μπορούν να διακριθούν σε μη αναστρέψιμες, σε αναστρέψιμες και σε διεργασίες μεταφοράς στην υδάτινη στήλη (Burns and Baughman, 1985).

Οι *μη αναστρέψιμες* ή αλλιώς *διεργασίες μετασχηματισμού*, περιλαμβάνουν αντιδράσεις που επιτυγχάνονται με τη βοήθεια του ηλιακού φωτός όπως είναι η άμεση και η έμμεση φωτόλυση, αντιδράσεις μεταβολισμού των ουσιών όπως η μικροβιακή αποδόμηση και ο βιομετασχηματισμός και αντιδράσεις που προκαλούνται από την αντίδραση του νερού με τις ουσίες (υδρόλυση). Κατά τις διαδικασίες αυτές μια αρχική ένωση μετατρέπεται σε μια άλλη θυγατρική της ή σε μια νέα που αποτελεί προϊόν μεταβολισμού της πρώτης.

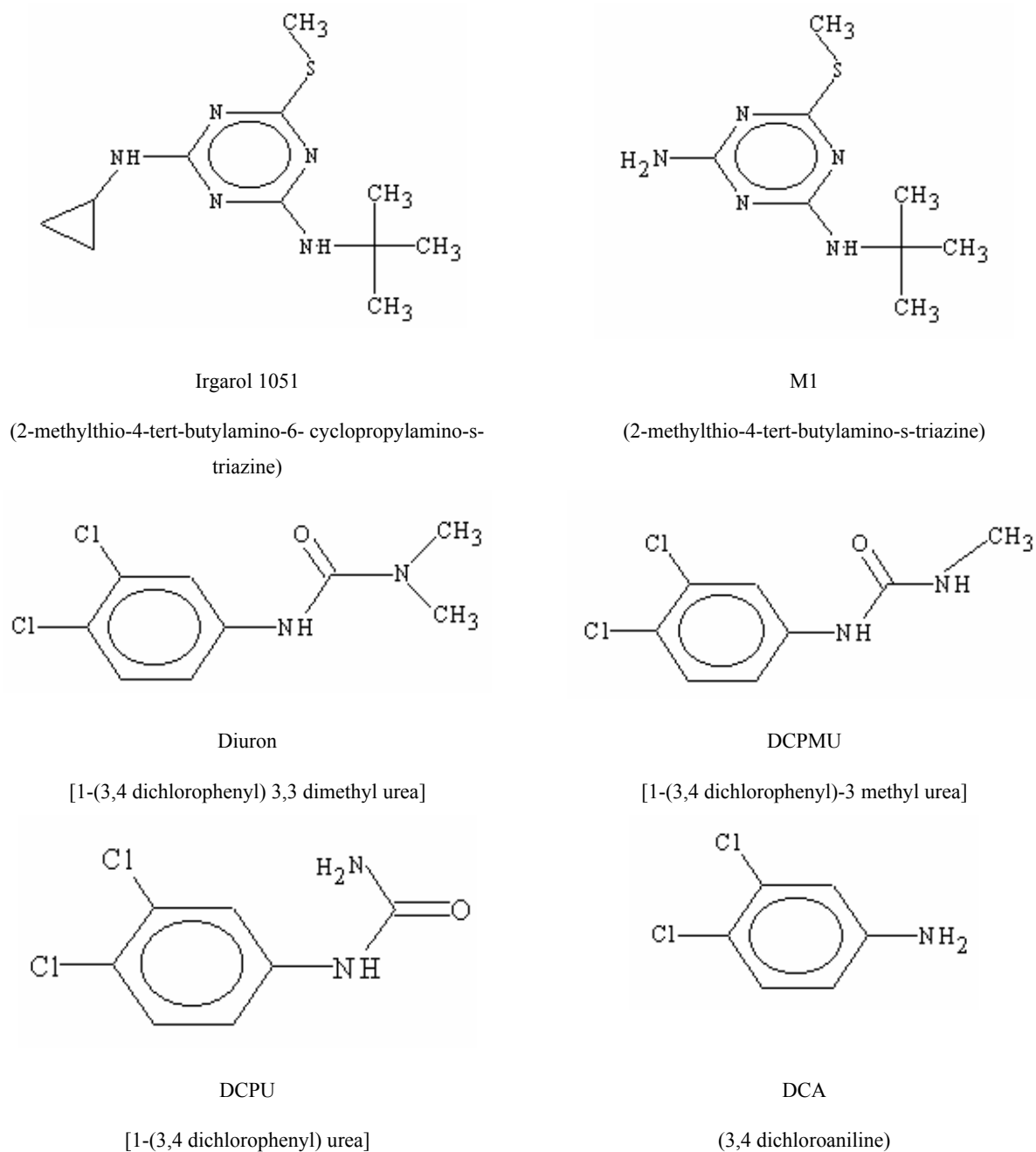
Στις *αναστρέψιμες διαδικασίες* ανήκουν η διάσταση των οργανικών ουσιών αφού οι περισσότερες είναι οξέα ή βάσεις οπότε κάτω από κατάλληλες συνθήκες ιονίζονται, η ρόφηση στο ίζημα και στα αιωρούμενα σωματίδια και η συμπλοκοποίηση.

Οι *διαδικασίες φυσικής μεταφοράς* περιλαμβάνουν τη μεταφορά των ουσιών από το ένα σημείο στο άλλο, λόγω υδροδυναμικών κινήσεων ή λόγω μετακίνησης της στερεής φάσης από το νερό, καθώς και τη μεταφορά από τη στήλη του νερού στο ίζημα ή τη διεπιφάνεια μεταξύ νερού – ιζήματος.

2.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ουσιών

Η συμπεριφορά και η τύχη μιας οργανικής ουσίας στο περιβάλλον καθορίζεται από τις φυσικοχημικές της ιδιότητες. Για παράδειγμα η παραμονή στη στήλη του νερού ή η προσρόφηση στο έδαφος, το ίζημα ή τους οργανισμούς εξαρτάται από την υδατοδιαλυτότητα, από το συντελεστή κατανομής οκτανόλης – νερού, από το συντελεστή κατανομής στον οργανικό άνθρακα αλλά και από τη σταθερά διάστασης (όταν λαμβάνει χώρα διάσταση), η οποία επιπλέον επηρεάζει τη φωτόλυση και την εξάτμιση μιας ουσίας, ενώ η τάση ατμών και

η σταθερά του νόμου του Henry καθορίζουν την κατανομή μιας ουσίας μεταξύ της ατμόσφαιρας και του νερού (Howard, 1991). Στο Σχήμα 2.1 δίνονται οι συντακτικοί τύποι των εξεταζόμενων ουσιών ενώ στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι βασικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες για όποιες από τις ουσίες υπάρχουν δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία.

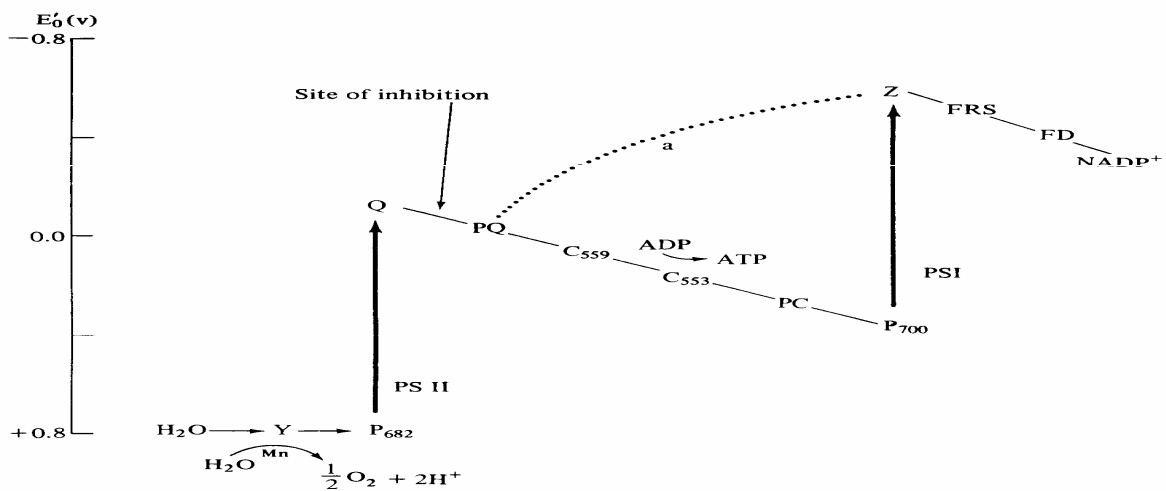


Σχήμα 2.1 Συντακτικοί τύποι των εξεταζόμενων ουσιών.

Πίνακας 2.1 Κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των εξεταζόμενων ουσιών.

Ουσία	Υδατοδιαλυτότητα (mg L ⁻¹) (20 ή 25 οC)	Χρόνος ημίσειας ζωής στο νερό (ημέρες)	Συντελεστής κατανομής κανονικοποιημένος προς τον οργανικό άνθρακα (logK _{oc})	Συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (logK _{ow})	Τάση ατμών (mm Hg) (20-25 °C)	Σταθερά νόμου Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	Σταθερά ιοντισμού pK _a ή pK _b
Irgarol 1051	7 (Ciba-Geigy, 1985)	100 (θαλασσινό νερό) 200 (γλυκό νερό) (Ciba-Geigy, 1995)	2,38 (Ciba Specialty Chemicals, 1999)	2,80 (Schmiedel, 1997)	6,6x10 ⁻⁷ (Ciba Specialty Chemicals, 1999)	-	-
Diuron	42 (Hornsby et al., 1997)	-	2,68 (Hornsby et al., 1997)	2,68 (Hornsby et al., 1997)	6,9x10 ⁻⁸ (Hornsby et al., 1997)	51x10 ⁻⁶ (Spencer , 1982)	-
M1	<1 (Ciba Specialty Chemicals, 2002)	82 (Thomas et al., 2002)	-	-	-	-	-
DCPMU	107 (SRC organization)	50 (Thomas et al., 2002)	-	2,65 (SRC organization)	2,02x10 ⁻⁵ (SRC organization)	2,55x10 ⁻⁶ (SRC organization)	-
DCPU	225 (SRC organization)	33 (Thomas et al., 2002)	-	2,65 (SRC organization)	3,26x10 ⁻⁵ (SRC organization)	1,17x10 ⁻⁶ (SRC organization)	-
DCA	600 (Wolff and Crossland, 1985)	-	-	2,7 (Leo &Hansch, 1971)	0,00632 (Daubert & Danner, 1991)	0,35 (Crossland , 1988)	2,97 (SRC organization)

Το irgarol 1051 ανήκει στην κατηγορία των συμμετρικών τριαζινών ενώ το diuron είναι υποκατεστημένη ουρία. Και οι δύο ουσίες εμφανίζουν τοξική δράση σε φύκη, φυτά και γενικότερα φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Όσον αφορά τον τρόπο δράσης τους χαρακτηρίζονται ως αναστολείς της φωτοσύνθεσης διότι εμποδίζουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα II P680 αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την αντίδραση Hill της φωτοσύνθεσης όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2 (Corbet, 1974; Ciba, 1999). Πιστεύεται όμως ότι η τοξική δράση των ουσιών αυτών δεν οφείλεται μόνο στην αλληλεπίδρασή τους με τη φωτοσύνθεση αλλά και στο σχηματισμό τοξικών προϊόντων κατά τη διάρκεια αναστολής της αντίδρασης Hill τα οποία συνεισφέρουν στο θάνατο των εκτεθειμένων οργανισμών (Ελευθεροχωρινός, 1996).



Σχήμα 2.2 Βιοχημικός τρόπος δράσης τριαζινών και υποκατεστημένων ουριών (Ciba, 1999).

2.3 Απελευθέρωση από τα υφαλοχρώματα

Μια σημαντική παράμετρος για την εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου που προέρχεται από τις ενισχυτικές βιοκτόνες ουσίες των υφαλοχρωμάτων είναι ο ρυθμός με τον οποίο οι ουσίες αυτές απελευθερώνονται στο υδάτινο περιβάλλον από μια βαμμένη επιφάνεια. Υπάρχουν δύο πρότυπα πρωτόκολλα για τον προσδιορισμό του ρυθμού απελευθέρωσης μιας ένωσης. Το πρώτο υιοθετήθηκε από την EPA (USA) και βασίζεται στη μέθοδο D5108-80 της ASTM (American Society of Testing Materials) ενώ το δεύτερο, το οποίο υιοθετήθηκε και εφαρμόζεται τόσο από τον οργανισμό Health and Safety Executive (UK) όσο και από άλλες ευρωπαϊκές χώρες, στηρίζεται στη μέθοδο ISO/DIS 15181-1.2 του International Standards Organization (ISO). Και στις δύο περιπτώσεις για τον προσδιορισμό του ρυθμού

απελευθέρωσης ένας κύλινδρος κατασκευασμένος από πολυκαρβονικό πολυμερές βάφεται με χρώμα που περιέχει την υπό εξέταση ουσία και τοποθετείται μέσα σε ένα δοχείο (baffled beaker) το οποίο περιέχει συνθετικό θαλασσινό νερό. Μέσα στο δοχείο ο κύλινδρος περιστρέφεται με ρυθμό 60 rpm ενώ περιοδικά λαμβάνεται δείγμα θαλασσινού νερού ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας που απελευθερώθηκε. Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται ο ρυθμός απελευθέρωσης της ουσίας σε μικρογραμμάρια ουσίας ανά τετραγωνικό εκατοστό βαμμένης επιφάνειας ανά ημέρα. Η μέθοδος είναι σχεδιασμένη με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος του pH, της θερμοκρασίας και της αλατότητας (Thomas, 2001a).

Ο ρυθμός απελευθέρωσης του irgarol 1051 στο περιβάλλον κυμαίνεται από 0,12 έως 16 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{day}^{-1}$ (Ciba-Geigy, 1995; Thomas et al., 1999; Boxall et al., 2000) ενώ για το diuron από 0,8 έως 4,64 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{day}^{-1}$ (Thomas et al., 1999; Boxall et al., 2000).

Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως είναι το pH, η αλατότητα και η θερμοκρασία, είναι δυνατόν να επηρεάσουν το ρυθμό απελευθέρωσης μιας ουσίας όταν μεταβάλλονται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι Thomas et al. (1999) αναφέρουν ότι η αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10 °C (από 15 σε 25 °C) για διάστημα 4 ημερών δεν μετέβαλλε το ρυθμό απελευθέρωσης του irgarol 1051 ενώ για διάστημα 90 ημερών ο ρυθμός απελευθέρωσης της ουσίας από ένα συμβατικό υφαλόχρωμα αυξήθηκε κατά 1,6 $\mu\text{g cm}^{-2} \text{day}^{-1}$. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει γρηγορότερη απελευθέρωση της συγκεκριμένης ουσίας σε θερμότερα νερά άρα και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της στο περιβάλλον. Στην ίδια έρευνα το diuron συμπεριφέρθηκε ανάλογα. Βέβαια, εκτός των περιβαλλοντικών παραμέτρων σημαντικό ρόλο στη μεταβολή του ρυθμού απελευθέρωσης μιας ουσίας παίζουν και ο τύπος του ίδιου του υφαλοχρώματος, η ταχύτητα με την οποία κινείται το σκάφος, η ποσότητα της ουσίας που απομακρύνεται λόγω αποδόμησης και ο ρυθμός επιφανειακής διάβρωσης της βαμμένης επιφάνειας (Thomas et al., 1999).

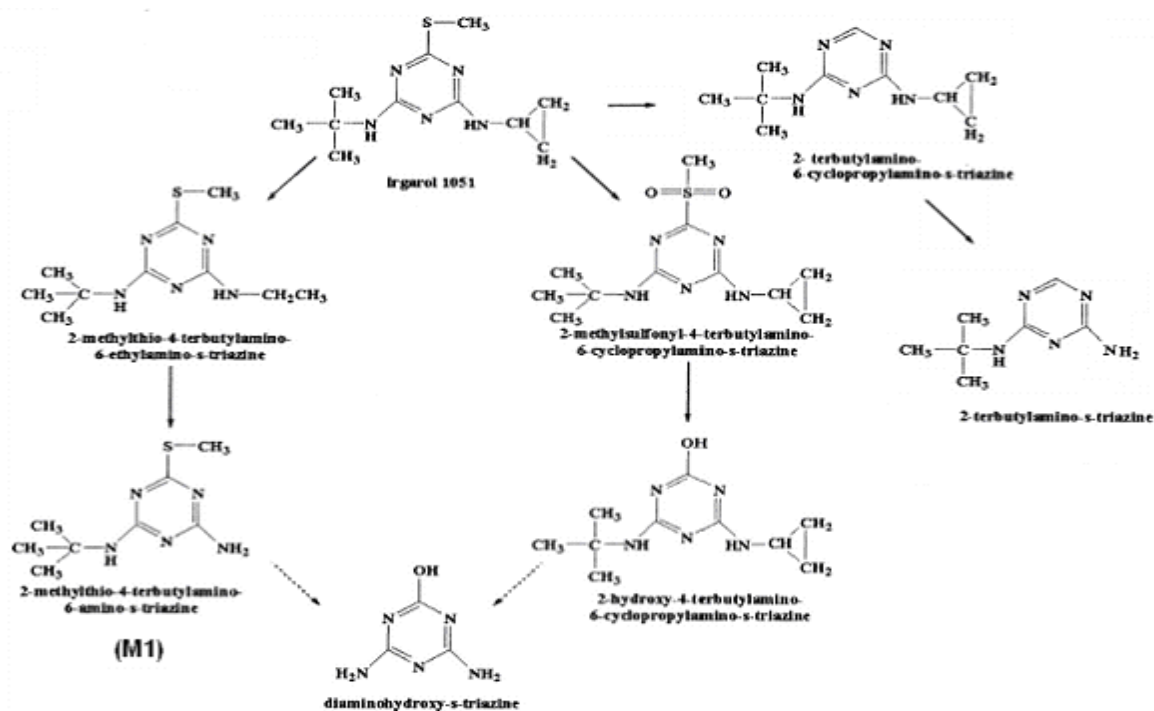
2.4 Αβιοτική αποδόμηση

2.4.1 Φωτοδιάσπαση

Η φωτοδιάσπαση ή φωτόλυση μπορεί να διακριθεί σε άμεση και έμμεση. Κατά την άμεση φωτόλυση η ηλιακή ακτινοβολία απορροφάται από την ίδια την ουσία και οι χημικές αντιδράσεις που ακολουθούν συνεπάγονται το θρυμματισμό του μορίου της σε μικρότερα τμήματα. Κατά την έμμεση φωτόλυση, η ηλιακή ακτινοβολία δεν απορροφάται απευθείας

από τη χημική ένωση. Αντίθετα το ηλιακό φέως απορροφάται από μόρια που υπάρχουν φυσικά στη διαλυμένη οργανική ύλη του νερού. Τα μόρια αυτά, όπως είναι οι χουμικές ενώσεις, καλούνται ευαισθητοποιητές (sensitizers) και αμέσως μετά την απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας, διεγείρονται και στη συνέχεια αντιδρούν χημικά με την ουσία σχηματίζοντας νέα προϊόντα. Μια άλλη περίπτωση έμμεσης φωτόλυσης είναι αυτή κατά την οποία μια ουσία αντιδρά με κάποιο δραστικό οξειδωτικό μέσο (ρίζες υπεροξειδίου και υδροξειδίου και ατομικό οξυγόνο) το οποίο σχηματίζεται εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του ηλιακού φωτός, των χουμικών ενώσεων και του διαλυμένου οξυγόνου (Burns and Baughman, 1985).

Το irgarol 1051 παρόλο που θεωρείται ότι είναι ουσία αρκετά σταθερή στο περιβάλλον με χρόνο ημίσειας ζωής στο θαλασσινό νερό 100 d (Thomas, 2001a), είναι δυνατόν να φωτοδιασπαστεί σχηματίζοντας διάφορους μεταβολίτες όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.3 (Penuela et al., 2000; Konstantinou et al., 2001; Sakkas et al., 2002a; Okamura, 2002). Ο κύριος μεταβολίτης του irgarol 1051 είναι η ουσία M1 και σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία είναι ουσία πολύ πιο σταθερή στην ηλιακή ακτινοβολία (Okamura et al., 1999; 2002). Η διαδικασία της φωτοδιάσπασης του irgarol 1051 στο φυσικό νερό μπορεί να επιταχυνθεί από διάφορους φωτοευαισθητοποιητές που υπάρχουν φυσικά στο νερό όπως είναι οι χουμικές και φουλβικές ενώσεις (Sakkas et al., 2002a; Okamura, 1999).



Σχήμα 2.3 Φωτοδιάσπαση του irgarol 1051 σε φυσικό νερό (αναπαραγωγή από τους Penuela et al., 2000; Sakkas et al., 2002a).

Το diuron, σε αντίθεση με το irgarol 1051, υπό την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας του ηλιακού φωτός διασπάται σε πολύ μικρό βαθμό (Okamura, 2002), γεγονός που επιβεβαιώνεται και από το μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής της ουσίας, ο οποίος κυμαίνεται από ένα μήνα έως και ένα χρόνο (Okamura, 2002; Wauchope et al., 1992).

Η DCA φωτοδιασπάται πολύ γρήγορα εξαιτίας της μεγάλης απορρόφησης που παρουσιάζει σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 300 nm και τη σχετικά υψηλή κβαντική της απόδοση (Othmen and Boule, 1999). Μάλιστα κατά τη διάρκεια του χειμώνα ο ρυθμός μετασχηματισμού της ουσίας μπορεί να ολοκληρωθεί σε 20 d, ενώ κατά τους καλοκαιρινούς μήνες η DCA φωτοδιασπάται με ρυθμό 10 φορές μεγαλύτερο από ότι το χειμώνα. Γενικά οι διχλωροανιλίνες υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας μετατρέπονται αρχικά σε φαινολικές ενώσεις και στη συνέχεια σε αμινοφαινοξυαζόνες (Othmen and Boule, 1999).

2.4.2 Υδρόλυση

Οι τρεις επικρατέστερες υδρολυτικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στη φύση είναι αυτές που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια ιόντων υδρογόνου, ιόντων υδροξυλίου καθώς και οι αντιδράσεις όπου το νερό άμεσα αντιδρά με μια ουσία. Η ταχύτητα της υδρόλυσης εξαρτάται από το pH του νερού διότι μεταβολές της τιμής του επιφέρουν αλλαγή στις συγκεντρώσεις των υδρογονοκατιόντων και των υδροξυλίωντων (Burns and Baughman, 1985).

Το diuron εμφανίζει πολύ αργό ρυθμό υδρόλυσης όταν το pH του νερού είναι ουδέτερο και η θερμοκρασία 25 °C. Όταν όμως το φαινόμενο λαμβάνει χώρα, είναι μη αναστρέψιμο και το μοναδικό προϊόν που σχηματίζεται είναι η DCA ενώ η διαλυμένη οργανική και ανόργανη ύλη που υπάρχουν στο νερό είναι δυνατόν να δράσουν καταλυτικά, βοηθώντας έτσι την υδρόλυση της ουσίας (Salverstrini et al., 2002).

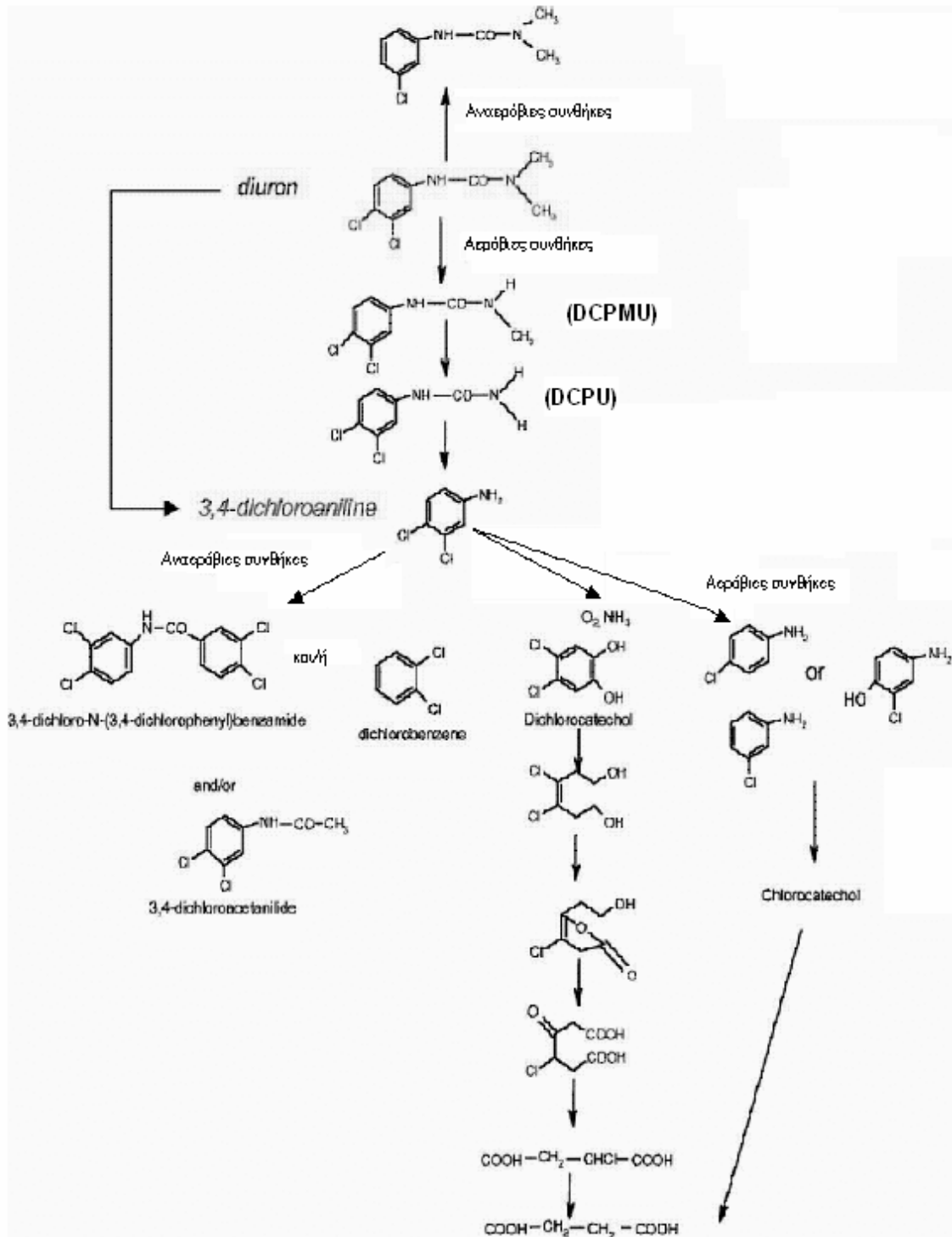
Το irgarol 1051 είναι ουσία πολύ σταθερή στην υδρόλυση. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ASTM (1989), όταν μια ουσία υδρολύεται σε ποσοστό πάνω από 10 % μέσα σε 7 ημέρες και σε θερμοκρασία 25 °C, τότε ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι μικρότερος από έξι μήνες. Μελέτη της αποδόμησης του irgarol 1051 λόγω υδρόλυσης για χρονική διάρκεια μιας εβδομάδας, απέδειξε ότι η ουσία δεν υδρολύεται στους 50 °C (Okamura et al., 1999). Αντίθετα η υδρόλυση της ουσίας είναι ταχύτερη παρουσία HgCl₂, ενός άλατος που συχνά χρησιμοποιείται έως συντηρητικό δειγμάτων νερού (Liu et al., 1999a; Lam et al., 2004).

2.5 Βιοτική αποδόμηση

Η βιοαποδόμηση των οργανικών ουσιών αποτελεί σημαντική διεργασία απομάκρυνσής τους από το περιβάλλον. Διάφοροι μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια τις χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας προκαλώντας μείωση των συγκεντρώσεών τους. Η διεργασία λαμβάνει χώρα είτε σε αερόβιες συνθήκες (στήλη του νερού, επιφανειακό ίζημα) είτε σε αναερόβιες (βαθύτερα στρώματα ιζήματος).

Η βιοαποδόμηση αποτελεί την κυριότερη αιτία αποδόμησης του *diuron* στο έδαφος. Σε αυτή εμπλέκονται διάφοροι μικροοργανισμοί όπως τα κατά Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια, οι μύκητες και οι ακτινομύκητες ανεξάρτητα από το περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται η διεργασία (αερόβιο / αναερόβιο) (Giacomazzi and Cochet, 2003).

Για πρώτη φορά ο μεταβολισμός του *diuron* στο έδαφος, κάτω από αερόβιες συνθήκες περιγράφηκε το 1966 από τους Dalton et al. Ο μεταβολισμός της ουσίας επιτυγχάνεται χάρις την N-διμεθυλίωση (N-dimethylation) και την υδρόλυση του αμιδικού δεσμού του μορίου της (Dalton et al. 1966). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.4, το *diuron* μετατρέπεται αρχικά σε DCPMU, με την απώλεια της μιας μεθυλομάδας από το μόριό του, και στη συνέχεια σε DCPU με την απώλεια και της δεύτερης μεθυλομάδας. Η υδρόλυση του αμιδικού δεσμού στο μόριο της DCPU που ακολουθεί, οδηγεί στο σχηματισμό της DCA η οποία είναι και το κύριο τελικό προϊόν της βιοτικής αποδόμησης του *diuron* στις περισσότερες περιπτώσεις (Ellis and Champer, 1982; Cullington and Walker, 1999; Tixier et al., 2001; Sorensen et al., 2003). Όμως κάποιες φορές η αποδόμηση του *diuron* είναι πλήρης χωρίς το σχηματισμό αρωματικών ενώσεων. Οι El-Deeb et al. (2000) διαπίστωσαν ότι ένα είδος *Pseudomonas* sp. βακτηρίων, το οποίο απομονώθηκε από το έδαφος, παρουσία του *diuron* αναπτύχθηκε κανονικά, χρησιμοποιώντας την ουσία ως μοναδική πηγή άνθρακα. Οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι αρχικά διασπάστηκε ο αρωματικός δακτύλιος από το υπόλοιπο αλειφατικό τμήμα της ουσίας το οποίο και χρησιμοποιήθηκε από τα βακτήρια. Ο αρωματικός δακτύλιος αποδομήθηκε περαιτέρω σχηματίζοντας μεταβολίτες του κιτρικού οξέος.



Σχήμα 2.4 Προϊόντα μεταβολισμού του diuron (αναπαραγωγή από τους Giacomazzi and Cochet, 2003).

Αναερόβια βιοαποδόμηση του diuron λαμβάνει χώρα στο ίζημα και το προϊόν μεταβολισμού της ουσίας είναι η 1-(3-chlorophenyl)-3,1 dimethylurea (Attaway et al., 1982).

Σε αντίθεση με τα βακτήρια, η βιοαποδόμηση του diuron από μύκητες έχει μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό μέχρι σήμερα (Vroumsia et al., 1996; Khadrani et al., 1999; Tixier et al., 2000).

Η DCA χαρακτηρίζεται ως ουσία που δεν βιοαποδομείται εύκολα. Παρόλα αυτά όμως από διάφορους ερευνητές αναφέρεται ότι η ουσία βιοαποδομείται παρουσία βακτηρίων ή μυκήτων τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες (Arjmand and Sandermann, 1985; Sandermann et al., 1998; Travkin et al., 2002; Tixier et al., 2002; Travkin et al., 2003; Dejonghe et al., 2003).

Το irgarol 1051 μεταβολίζεται στο νερό από τους μύκητες. Σύμφωνα με τους Liu et al. (1997) παρουσία του μύκητα *Phanerochaete chrysosporium*, η ουσία αποδομείται μέσω απαλκυλίωσης (N-dealkylation) της κυκλοπροπυλικής της ομάδας σχηματίζοντας τον M1. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός βιοαποδόμησης, είναι χαρακτηριστικός των συμμετρικών χλωροτριαζινών (Kaufman and Kearney, 1970). Στην ίδια έρευνα διαπιστώθηκε ότι οι μύκητες δεν μπορούν να προσβάλουν την 4-τερτ-βουτυλομάδα του μορίου του irgarol 1051 με αποτέλεσμα ο M1 να αποτελεί το τελικό και πολύ σταθερό προϊόν μεταβολισμού της ουσίας. Σε πιο πρόσφατη έρευνα βρέθηκε ότι μια περοξυδάση του Μαγγανίου, ένα ένζυμο που εκκρίνεται από το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium*, ευθύνεται τελικά για τη βιοαποδόμηση του irgarol 1051, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό, εκτός από τον M1, και ενός δεύτερου προϊόντος μεταβολισμού το οποίο έχει ίδιο φάσμα μάζας με τον M1 αλλά διαφορετικό φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες (Ogawa et al., 2004). Σε αντίθεση με τους μύκητες, τα βακτήρια στο νερό δεν μεταβολίζουν ούτε το irgarol 1051 ούτε το diuron (Callow and Willingham, 1996).

2.6 Κατανομή μεταξύ ιζήματος και νερού

Το irgarol 1051 είναι η πιο υδρόφοβη ουσία από την ομάδα των τριαζινών εξαιτίας της ταυτόχρονης παρουσίας στο μόριό της βουτυλομάδας και κυκλοπροπυλικής ομάδας. Επομένως αναμένονται υψηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας στο ίζημα από ότι στη στήλη του νερού. Άλλωστε η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα (7 mg L^{-1}) και ο σχετικά υψηλός συντελεστής οκτανόλης-νερού ($\log K_{ow}=3,95$) της ουσίας επίσης υποδηλώνουν μεγαλύτερη συσσώρευση της στη σωματιδιακή ύλη και στο ίζημα (Bard and Pedersen, 1992). Διάφορες έρευνες όμως που πραγματοποιήθηκαν και αφορούσαν στη διερεύνηση των συγκεντρώσεων του irgarol 1051 στο ίζημα απέδειξαν ότι υπάρχει μικρή τάση συσσώρευσης της ουσίας στη σωματιδιακή ύλη (Gough et al., 1994; Tolosa et al., 1996a; Thomas et al., 2002) και ότι κατά

κύριο λόγω η ουσία θα βρίσκεται στη διαλυμένη φάση (Rogers et al., 1996; Tolosa et al., 1996a; Hall et al., 1999; Boxall et al., 2000; Haglund et al., 2001). Η κατανομή της ουσίας μεταξύ νερού και ιζήματος παρόλο που είναι σχετικά χαμηλή (Thomas et al., 2002; Voulvoulis et al., 2002) αναφέρεται από διάφορους ερευνητές (Comber et al., 2002; Ranke, 2002; Voulvoulis et al., 2002).

Το diuron βρίσκεται κατά κύριο λόγο στη διαλυμένη φάση. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν οι Boxall et al. (2000) μετά από έρευνα πεδίου. Όμως και οι Voulvoulis et al. (2002) διαπίστωσαν ότι μεταξύ των τεσσάρων βιοκτόνων ουσιών diuron, irgarol 1051, dichlofluanid και chlorothalonil, το diuron παρουσιάζει τη μικρότερη προτίμηση για το ίζημα, σε σχέση με τις υπόλοιπες ουσίες.

2.7 Εξάτμιση

Σύμφωνα με τον Montgomery (1997) ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry $< 10^{-7} \text{ atm m}^3 \text{ mole}^{-1}$ είναι λιγότερο πτητικές από το νερό οπότε η συγκέντρωσή τους θα αυξάνεται καθώς το νερό θα εξατμίζεται, ενώ ουσίες με σταθερά του νόμου του Henry $= 10^{-3} \text{ atm m}^3 \text{ mole}^{-1}$ εξατμίζονται γρήγορα. Οι εξεταζόμενες ουσίες λόγω των χαμηλών τιμών της σταθεράς του Henry που εμφανίζουν (Πίνακας 2.1) δεν αναμένεται να εξατμίζονται σε σημαντικό βαθμό από τη στήλη του νερού στις συνθήκες συνθήκες.

2.8 Βιοσυσσώρευση

Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για τη συσσώρευση των εξεταζόμενων ουσιών στους διάφορους οργανισμούς. Το irgarol 1051 έχει ανιχνευτεί σε μακρόφυτα τόσο του γλυκού νερού (Tóth et al., 1996) όσο και του θαλασσινού (Scarlett et al., 1997; 1999a) ενώ από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ψάρια διαπιστώθηκε ότι συσσωρεύεται στους ιστούς τους (Hall et al., 1999). Αντίθετα για το diuron οι συντελεστές βιοσυσσώρευσης που έχουν προβλεφτεί υποδηλώνουν ασήμαντη συσσώρευση της ουσίας στους υδατικούς οργανισμούς (Kenaga, 1980).

2.9 Μεταφορά

Η μεταφορά μιας ουσίας στο υδατικό περιβάλλον μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της διασποράς, της ιζηματοποίησης και της διάχυσης. Κατά τη διάρκεια αυτών των διεργασιών η ουσία είτε διαλύεται στο νερό, είτε συνδέεται με το ίζημα είτε μόριά της μετακινούνται από περιοχές υψηλών συγκεντρώσεων προς περιοχές με χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τα

δεδομένα που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία για τον τρόπο μεταφοράς των ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών δεν είναι επαρκή. Πάντως από τις μέχρι τώρα μελέτες διαπιστώνεται ότι οι ουσίες ανιχνεύονται κυρίως σε περιοχές με έντονη δραστηριότητα σκαφών και περιορισμένη ανανέωση του νερού όπως είναι οι μαρίνες, ενώ όταν συμβαίνει μεταφορά των ουσιών σε βαθύτερα νερά (offshore waters) πραγματοποιείται διάλυση καθώς σε αυτά τα νερά οι συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλές (Thomas et al., 1999).

Η εκβάθυνση που πραγματοποιείται σε λιμάνια και μαρίνες αποτελεί επίσης έναν τρόπο μεταφοράς των ουσιών από τη μια περιοχή στην άλλη, καθώς με τη διαδικασία αυτή μεταφέρονται στις περιοχές στις οποίες γίνεται η απόθεση οι ουσίες που είναι προσροφημένες στο ίζημα (Thomas, 2001a). Παράλληλα το ίζημα στις περιοχές με έντονη δραστηριότητα σκαφών περιέχει συχνά κομμάτια υφαλοχρώματος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος παραμονής των βιοκτόνων ουσιών στο περιβάλλον (Thomas et al., 2003).

2.10 Επίπεδα των εξεταζόμενων ουσιών στο περιβάλλον

2.10.1 Irgarol 1951 και M1

Το irgarol 1051 αποτελεί την πρώτη ενισχυτική βιοκτόνο ουσία που χαρακτηρίστηκε ως περιβαλλοντικός ρύπος. Ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 1993 στη Γαλλία και συγκεκριμένα στη μαρίνα Côte d' Azur σε συγκεντρώσεις που έφταναν τα 1700 ng L^{-1} (Readman et al., 1993). Από τότε μέχρι σήμερα η παρουσία του έχει αναφερθεί σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες καθώς επίσης και στις Η.Π.Α., την Ιαπωνία και την Αυστραλία (Πίνακας 2.2). Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο, συγκεντρώσεις του irgarol 1051 ανιχνεύτηκαν τόσο σε δείγματα νερού όσο και ιζήματος, τα οποία προήλθαν από διάφορες περιοχές όπως μαρίνες, λιμάνια, παράκτιες ζώνες και εκβολές. Παρόμοιες συγκεντρώσεις αναφέρθηκαν και στην περιοχή της Μεσογείου και συγκεκριμένα στην Ισπανία (Καταλονία και Νοτιοανατολική Ακτή), στη Γαλλία (Côte d' Azur και Ριβιέρα) και στην Ελλάδα (κυρίως λιμάνια και μαρίνες της χώρας όπως Πειραιάς, Θεσσαλονίκη, Πάτρα και Ηγουμενίτσα). Βέβαια η ουσία έχει ανιχνευτεί και σε άλλες ευρωπαϊκές περιοχές εκτός από τις παραπάνω (Δυτική ακτή της Σουηδίας, θαλάσσια περιοχή κοντά στη Στοκχόλμη, περιοχές Sas van Gent, Schaar van Ouden και Δυτικό Sheldt στην Ολλανδία, Βαλτική και Βόρεια θάλασσα κοντά στη Γερμανία, μαρίνες στη Δανία). Εκτός Ευρώπης, το irgarol 1051 έχει προσδιοριστεί στα Seto inland waters (Ιαπωνία), στη Florida (Η.Π.Α.), στην παράκτια ζώνη της Σγκαπούρης και στην περιοχή του λιμανιού Hamilton (Bermuda).

Η ουσία έχει ανιχνευτεί και στο γλυκό νερό και συγκεκριμένα στη λίμνη της Γενεύης (Tóth et al., 1996), στη Νότια Αγγλία (Thomas et al., 2001b), στους ποταμούς Sheldt (Steen et al., 1997), Miami (Gardinali et al., 2002) και κάποιους στην Πορτογαλία (De Almeida Azevedo et al., 2000) εξαιτίας της αυξημένης κίνησης εμπορικών σκαφών και σκαφών αναψυχής στις περιοχές αυτές.

Το irgarol 1051 έχει ανιχνευτεί επίσης σε βιολογικά δείγματα. Οι Scarlett et al. (1999a) προσδιόρισαν την ουσία σε θαλάσσιο γρασίδι σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 2 έως 71 ng g⁻¹ στη ΝΔ Αγγλία ενώ στο Queensland (Αυστραλία) η συγκέντρωση της ουσίας ήταν έως και 118 ng g⁻¹ (Scarlett et al., 1999b). Σε δείγματα μακρόφυτων, μυδιών και φυκών προερχόμενα από τη λίμνη της Γενεύης τα επίπεδα των συγκεντρώσεων του irgarol 1051 που προσδιορίστηκαν ήταν μεταξύ 52 και 103 ng g⁻¹ (Tóth et al., 1996; Nyström et al., 2002). Από τη διεθνή βιβλιογραφία λοιπόν, σχετικά με την παρουσία του irgarol 1051 στο περιβάλλον, είναι προφανές ότι σε παγκόσμια κλίμακα είναι η πιο συχνά ανιχνεύσιμη ενισχυτική βιοκτόνος ουσία από αυτές που χρησιμοποιούνται.

Οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται από διάφορους ερευνητές ποικίλουν από μερικά ng έως μη ανιχνεύσιμες ανάλογα με την αναλυτική μέθοδο που κάθε φορά χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ουσίας στα διάφορα υποστρώματα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν βρεθεί στη νότια ακτή του Ηνωμένου Βασιλείου (Thomas et al., 2001b), στη μαρίνα Côte d'Azur της Γαλλίας (Readman et al., 1993) καθώς και στη ΝΑ Ισπανία (Hernando et al., 2001) σε επίπεδα που έφτασαν τα 1421, 1700 και 1000 ng L⁻¹ αντίστοιχα.

Γενικότερα οι υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας έχουν προσδιοριστεί σε περιοχές με έντονη δραστηριότητα σκαφών αναψυχής (Gough et al., 1994; Rogers et al., 1996; Tolosa et al., 1996a; Scarlett et al., 1997; Hall et al., 1999). Αντίθετα, στα λιμάνια και γενικά στις περιοχές όπου οι πυκνότητα των σκαφών αναψυχής είναι χαμηλή συγκριτικά με τα μεγαλύτερα πλοία, οι μετρούμενες συγκεντρώσεις της ουσίας είναι χαμηλότερες (Readman et al., 1993; Gough et al., 1994; Tolosa et al., 1996a; Rogers et al., 1996; Tolosa and Readman, 1996b; Hall et al., 1999; Liu et al., 1999b; Gardinali et al., 2002). Η μορφολογία των μαρίνων αποτελεί μια άλλη αιτία των υψηλών επιπέδων της ουσίας σε αυτές τις περιοχές. Σε αντίθεση με τα λιμάνια, οι μαρίνες αποτελούν «κλειστά» περιβάλλοντα με σχετικά χαμηλούς ρυθμούς ανανέωσης του νερού. Η σύγκριση των επιπέδων των συγκεντρώσεων της ουσίας σε δείγματα από διαφορετικές μαρίνες, απέδειξε ότι οι μαρίνες με υψηλότερη πυκνότητα σκαφών και χαμηλούς ρυθμούς ανανέωσης του νερού, στις οποίες τα σκάφη παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις του irgarol 1051 όπως επίσης και άλλων ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών (Sargent et al., 2000; Biselli et al.,

2000 Lamoree et al., 2002). Εκτός από τα λιμάνια και στις εκβολές και στις παράκτιες περιοχές οι συγκεντρώσεις που προσδιορίζονται είναι χαμηλές (Steen et al., 1997; Hall et al., 1999; Liu et al., 1999b).

Οι περιοχές με έντονη αλιευτική δραστηριότητα (Fishery harbors) μπορεί επίσης να αποτελούν σημαντική πηγή ρύπανσης. Σύμφωνα με τους Liu et al., (1999b) σε αλιευτικές περιοχές της Ιαπωνίας προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις του irgarol 1051 έως και 264 ng L⁻¹. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας υποδεικνύουν ότι εκτός από τις μαρίνες και τα λιμάνια και οι αλιευτικές περιοχές μπορεί να λειτουργήσουν ως «δεξαμενές» συσσώρευσης των διαφόρων ρύπων, αφού τα αλιευτικά σκάφη λόγω της εντατικότερης χρήσης τους απαιτούν συχνότερη εφαρμογή ισχυρών υφαλοχρωμάτων για την προστασία τους.

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του irgarol 1051 έχουν προσδιοριστεί την άνοιξη και την αρχή του καλοκαιριού, ενώ οι χαμηλότερες το φθινόπωρο και το χειμώνα όπου η δραστηριότητα των σκαφών αναψυχής είναι χαμηλότερη (Gough et al., 1994; Ferrer and Barceló, 1999; Voulvoulis et al., 2000; Okamura et al., 2000a; Biselli et al., 2000; Thomas et al., 2001b; Albanis et al., 2002; Lamoree et al., 2002). Η μείωση αυτή των συγκεντρώσεων είναι αποτέλεσμα της μικρότερης δραστηριότητας των σκαφών καθώς και της ανάμειξης του νερού. Σε πολλές περιπτώσεις έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση είναι μέγιστη την περίοδο μεταξύ Απριλίου και Μαΐου, κατά την οποία αρχίζει και η έντονη δραστηριότητα των σκαφών (Tóth et al., 1996; Dahl and Blanck 1996; Ferrer et al., 1997). Σύμφωνα με τους Thomas et al. (2001b) η εποχικότητα των συγκεντρώσεων του irgarol 1051 μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους ανάλογα με το είδος της μαρίνας. Αν η μαρίνα είναι κλειστή, με μικρή είσοδο και άρα μικρή ανανέωση του νερού, τότε μέγιστες συγκεντρώσεις της ουσίας παρατηρούνται τον Ιανουάριο (όταν στα σκάφη ανανεώνεται το υφαλόχρωμα που απομακρύνθηκε κατά τους φθινοπωρινούς μήνες) καθώς και την περίοδο από Απρίλιο μέχρι και Ιούνιο. Αντίθετα στις ανοιχτές μαρίνες όπου το νερό ανανεώνεται επαρκώς, μέγιστες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στα μέσα του καλοκαιριού (Thomas et al., 2001b).

Οι παραπάνω διαπιστώσεις επιβεβαιώνονται και από άλλες έρευνες. Οι Bowman et al. (2003) προσδιόρισαν υψηλές συγκεντρώσεις του irgarol 1051 κατά τους χειμερινούς μήνες εξαιτίας της ανανέωσης των υφαλοχρωμάτων στα σκάφη καθώς και την περίοδο από τον Απρίλιο ως τον Ιούλιο λόγω των φρεσκοβαμμένων σκαφών που επέστρεψαν στη μαρίνα. Σύμφωνα με την ίδια έρευνα αμέσως μετά την απομάκρυνση ιζήματος από τον πυθμένα της υπό μελέτη περιοχής, παρατηρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας οι οποίες αποδόθηκαν στην εκρόφησή της από το ίζημα ώστε να επέλθει ισορροπία των συγκεντρώσεων της ουσίας μεταξύ νερού και ιζήματος.

Πίνακας 2.2 Συγκεντρώσεις του irgarol 1051 σε δείγματα νερού και ιζήματος προερχόμενα από διάφορες περιοχές.

Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία	Νερό (ng L ⁻¹)	Ιζημα (ng g ⁻¹)	Αναφορά
Ηνωμένο Βασίλειο				
<i>Μαρίνες</i>				
Kent, Sussex, Hampshire	8/1993	52– 500	*	Gough et al. (1994)
Sutton Harbour	4-10/1998	<1 – 69	*	Thomas et al. (2001b)
Plymouth Sound	7-8/1995	28 – 127	*	Scarlett et al. (1997)
Conwy, Wales	1-3/1999	7 – 543	*	Sargent et al. (2000)
Southern coast	1-10/1999	<1-1421	*	Thomas et al. (2001b)
Brighton	11/1999-1/2001	<1-964	<1-77	Bowman et al. (2003)
Humber	4-9/1995	169-682	*	Zhou et al. (1996)
Orwell	9/1998-2/1999	5,6-201,4	<10-1011	Boxall et al. (2000)
Hamble	9/1998-2/2000	18,3-61,1	<10	Boxall et al. (2000)
<i>Εκβολές ποταμών</i>				
Hamble	7-9/1993	12-190	12-132	Gough et al. (1994)
Hamble	9/1998-2/1999	7,3-17,9	<10	Boxall et al. (2000)
Hamble	4-10/1998	<1-141	*	Thomas et al. (2001b)
Humber	4-9/1995	<1-39	*	Zhou et al. (1996)
Medway	8/1993	4-18	*	Gough et al. (1994)
Blackwater, Essex	10/1998-6/1999	150-680	3,3-222	Voulvoulis et al. (2000)
River Crouch	4-10/1998	<1-49	*	Thomas et al. (2001b)
Yealm and Salcombe	Καλοκαίρι 1997- Άνοιξη 1998	<3-10	*	Scarlett et al. (1999a)
Southampton Water	4-10/1998	<1-403	*	Thomas et al. (2001b)
	10/1998	*	<1-40	Thomas et al. (2000)
	Καλοκαίρι 2000	<1-305	0,3-3,5	Thomas et al. (2002)
Southern coast	1-10/1998	<1-32	*	Thomas et al. (2001b)
<i>Λιμάνια, παράκτιες περιοχές</i>				
Kent, Sussex, Hampshire	8/1993	9-14	*	Gough et al. (1994)
	7-9/1993	<2-11	*	Gough et al. (1994)
Γαλλία				
<i>Μαρίνες</i>				
Co`te d' Azur	6/1992	110-1700	*	Readman et al. (1993)
Riviera, Monaco	5-6/1995	22-640	*	Tolosa et al. (1996a)
		132-275	*	Tolosa and Readman (1996b)
<i>Λιμάνια</i>				
Côte d' Azur	6/1992	<5-280	*	Readman et al. (1993)
Riviera, Monaco	5-6/1995	13,8-264	*	Tolosa et al. (1996a)
<i>Παραλίες</i>				
Côte d' Azur	6/1992	αμελητέα	*	Readman et al. (1993)
Riviera, Monaco	5-6/1995	<1,5-1	*	Tolosa et al. (1996a)
Ισπανία				
<i>Μαρίνες</i>				
Catalonia	1996-1997	7-325	*	Ferrer et al. (1997)
	1-8/1999	<50	*	Martinez et al. (2000)

Συνέχεια Πίνακα 2.2

Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία	Νερό (ng L ⁻¹)	Ίζημα (ng g ⁻¹)	Αναφορά
	4/1996-1/1999	15-320	*	Ferrer and Barcelo (1999)
	6/2000	*	<0,2-88	Martinez and Barcelo (2001)
Barcelona (Masnou)	2/1997-6/1998	έως 119	3-57	Ferrer and Barcelo (2001)
Almeria		25-450	*	Agüera et al. (2000)
Tarragona-Cambrils	3-6/1999	<10-50	*	Pocurull et al. (2000)
Southeast Spain		50-1000	*	Hernando et al. (2001)
Ελλάδα				
<i>Μαρίνες</i>				
Πειραιάς-Ελευσίνα	10/1999-9/2000	έως 90	έως 690	Sakkas et al. (2002b)
Θεσσαλονίκη		έως 68	75-350	Albanis et al. (2002)
Πάτρα		12-24	έως 37	Albanis et al. (2002)
Χαλκίδα		-	έως 88	Albanis et al. (2002)
Ηγουμενίτσα-Άκτιο		έως 27	έως 74	Albanis et al. (2002)
<i>Λιμάνια</i>				
Πειραιάς	10/1999-9/2000	10-24	έως 19	Sakkas et al. (2002b),
Θεσσαλονίκη		-	έως 11	Albanis et al. (2002)
Πάτρα		-	έως 11	Albanis et al. (2002)
Ολλανδία				Albanis et al. (2002)
<i>Μαρίνες</i>				
(Dutch coast)	4-11/2000	8-90	*	Lamoree et al. (2002)
Rotterdam coastal area	10, 1998	*	<1	Thomas et al. (2000)
<i>Εκβολές ποταμών</i>				
Western Scheldt	4/1996	1,6-10	*	Steen et al. (1997)
	4/1996-3/1996	8-37	*	Steen et al. (2001)
Sas Gent Schaar van Ouden		5-42	*	Hall et al. (1999)
Ελβετία				
Lake Geneva	8/1994-3/1995	2,5-145	2,5-8	Toth et al. (1996)
Lake Geneva	9/1999	έως 135	*	Nystrom et al. (2002)
Γερμανία				
<i>Μαρίνες</i>				
North Sea	7-9/1997	11-170	3-25	Biselli et al. (2000)
Baltic sea	7-9/1998	80-440	4-220	Biselli et al. (2000)
Πορτογαλία				
River water (Ponte Aranha)	4-7/1999	10-260	*	Almeida Azevedo et al. (2000)
Σουηδία				
<i>Μαρίνες</i>				
Fiskebäckskil (West coast)	6/1993-9/1994	30-400	*	Dahl and Blanck (1996)
Karlsund, Sth Stockholm	4/1996-11/1996	4-125	2-9	Haglund et al. (2001)
Η.Π.Α.				
<i>Biscayne Bay</i>				
Μαρίνες	3/1999-9/2000	<1-15,2	*	Gardinali et al. (2002)

Συνέχεια Πίνακα 2.2

Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία	Νερό (ng L ⁻¹)	Ίζημα (ng g ⁻¹)	Αναφορά
Λιμάνια	3/1999-9/2001	<1-1,1	*	Gardinali et al. (2002)
Ποταμός Miami	3/1999-9/2002	<1-60,9	*	Gardinali et al. (2002)
Florida	Καλοκαίρι 2001	12,2-144,2	*	Owen et al. (2002)
Ιαπωνία				
<i>Seto Inland Sea</i>				
Μαρίνες, αλιευτικές περιοχές	8/1999	έως 262	*	Okamura et al. (2003)
	7-8/1997	έως 142	-	Okamura et al. (2000a)
	5-11/1998	55-296	-	Okamura et al. (2000a)
	7-8/1997	12-264	*	Liu et al. (1999b)
Λιμάνια	8/1999	έως 136	*	Okamura et al. (2003)
	1996	0-19,5	*	Liu et al. (1999b)
Καναδάς				
Μαρίνες, λιμάνια	1996-1997	-	*	Liu et al. (1999b)
Σιγκαπούρη				
Παράκτιες περιοχές	10-11/2000	3020-4200	*	Basheer et al. (2002)
Bermuda				
Hamilton harbour	6/1995	10-590	*	Connelly et al. (2001)
	Καλοκαίρι 2000, 2001	3-294	*	Owen et al. (2002)

* : δεν λήφθηκε δείγμα

- : η ουσία δεν ανιχνεύτηκε

Οι συγκεντρώσεις του κύριου μεταβολίτη του irgarol 1051, M1, που έχουν κατά καιρούς προσδιοριστεί είναι γενικότερα χαμηλότερες από αυτές του irgarol 1051 (Thomas et al., 2002) γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ρυθμός μετασχηματισμού του irgarol 1051 στο περιβάλλον είναι χαμηλός και ότι ο ρυθμός αποδόμησης του M1 είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό σχηματισμού του (Thomas et al., 2002). Οι διαπιστώσεις αυτές όμως έρχονται σε αντίθεση με άλλες έρευνες σύμφωνα με τις οποίες το irgarol 1051 και ο κύριος μεταβολίτης του M1 έχουν παρόμοιους χρόνους ημίσειας ζωής στο θαλασσίνο νερό (Hall et al., 1999) και εκτιμάται ότι ο M1 παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον από ότι το irgarol 1051 (Okamura et al., 2002). Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του M1 που έχουν κατά καιρούς προσδιοριστεί. Οι έρευνες για τα επίπεδα των συγκεντρώσεων του M1 στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι σαφώς λιγότερες και πιο πρόσφατες (2000-2003) συγκριτικά με αυτές που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα για την αρχική ουσία.

Πίνακας 2.3 Συγκεντρώσεις του M1 σε δείγματα νερού και ιζήματος προερχόμενα από διάφορες περιοχές.

Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία	Νερό (ng L ⁻¹)	Ίζημα (ng g ⁻¹)	Αναφορά
Ηνωμένο Βασίλειο				
Southampton Water	10/1998	13-99	<0,4-1,2	Thomas et al. (2000)
	Καλοκαίρι 2000	<1-59	0-0,3	Thomas et al. (2002)
Ισπανία				
Catalonia	1-8/1999	<2-400	*	Martinez et al. (2000)
Barcelona (Masnou)	2/1997-6/1998	έως 23	0,2-3,3	Ferrer and Barceló (2001)
Mediterranean Coast		*	<0,3-13	Martinez and Barceló (2001)
Ιαπωνία				
Seto Inland Sea	8/1999	έως 80	*	Okamura et al. (2003)
	7-8/1997	19,7-1270	-	Okamura et al. (2000a)
	5-11/1998	έως 1870	-	Okamura et al. (2000a)

* : δεν λήφθηκε δείγμα

- : η ουσία δεν ανιχνεύτηκε

2.10.2 Diuron και κύριοι μεταβολίτες του

Η παρουσία του diuron στο υδατικό περιβάλλον εξαιτίας της χρήσης του στα υφαλοχρώματα έχει αναφερθεί από διάφορους ερευνητές. Συγκεντρώσεις του έχουν ανιχνευτεί σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες όπως το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Σουηδία, την Ολλανδία, την Ισπανία, την Πορτογαλία, αλλά και μη Ευρωπαϊκές όπως την Ιαπωνία (Πίνακας 2.4) (Dahl and Blanck, 1996; Ferrer et al., 1997; Thomas, 1998; Ferrer and Barceló, 1999; Almeida-Azedevio et al., 2000; Boxall et al., 2000; Martinez et al., 2000; Thomas et al., 2000, 2001b, 2002; Martinez and Barceló, 2001; Lamoree et al., 2002; Okamura et al., 2003). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις έχουν παρατηρηθεί στο Ηνωμένο Βασίλειο (έως 6742 ng L⁻¹), στην Ισπανία (έως 2000 ng L⁻¹) και στην Ιαπωνία (έως 3054 ng L⁻¹). Όπως και στην περίπτωση του irgarol 1051, υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρούνται την περίοδο κατά την οποία η δραστηριότητα των σκαφών αναψυχής είναι έντονη (Lamoree et al., 2002) ενώ τα επίπεδα της ουσίας μειώνονται με την έναρξη του φθινοπώρου αφού τότε παύει και η τουριστική περίοδος (Thomas et al., 2001b).

Γενικότερα οι συγκεντρώσεις του diuron που έχουν βρεθεί είναι υψηλότερες από αυτές του irgarol 1051 και άλλων βιοκτόνων (Martinez and Barceló, 2001; Thomas et al., 2002; Lamoree et al., 2002). Η ευρέως διαδεδομένη παρουσία του είναι αναμενόμενη αφού αποτελεί μια από τις πιο κοινές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως ενισχυτικά βιοκτόνα στα υφαλοχρώματα αλλά επιπλέον έχει και άλλες χρήσεις. Σήμερα όμως κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται στα υφαλοχρώματα.

Σε πολλές περιπτώσεις το diuron έχει ανιχνευτεί σε περιοχές όπως εκβολές ποταμών και παράκτιες ζώνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από χαμηλή δραστηριότητα σκαφών συγκριτικά με τις μαρίνες και τα λιμάνια., σε συγκεντρώσεις που φτάνουν τα 42 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Albanis et al., 1994; Gennaro et al., 1995; House et al., 1997; Feild et al., 1997; Almeida-Azedevno et al., 2000). Στις περιπτώσεις αυτές η παρουσία του diuron συνδέεται με άλλες χρήσεις της ουσίας όπως σε φυτοπροστατευτικά σκευάσματα.

Πίνακας 2.4 Συγκεντρώσεις του diuron σε δείγματα νερού και ιζήματος προερχόμενα από διάφορες περιοχές.

Περιοχή δειγματοληψίας	Ημερομηνία	Νερό (ng L^{-1})	Ίζημα (ng g^{-1})	Αναφορά
Ηνωμένο Βασίλειο				
Sutton Harbour	4-10/1998	1-334	*	Thomas et al. (2001b)
Orwell	9/1998-2/1999	21,9-768	<12-395	Boxall et al. (2000)
Hamble	9/1998-2/1999	58,3-247,2	<12	Boxall et al. (2000)
5 μαρίνες	1/1998	3-117	*	Thomas (1998)
<i>Εκβολές ποταμών</i>				
Hamble	9/1998-2/1999	10,5-36,3	<12	Boxall et al. (2000)
Hamble	4-10/1998	1-613	*	Thomas et al. (2001b)
River Crouch	4-10/1998	5-305	*	Thomas et al. (2001b)
Southampton Water	4-10/1998	<1-6742	*	Thomas et al. (2001b)
	10/1998	*	<100-1420	Thomas et al. (2000)
	Καλοκαίρι 2000	16-1005	0,4-2,3	Thomas et al. (2002)
Ισπανία				
Mediterranean coast (Mansou marina and EbreDelta ports)	1996-1997	10-180	*	Ferrer et al. (1997)
	1-8/1999	5-2000	*	Martinez et al. (2000)
	4/1996-1/1999	5-200	*	Ferrer and Barceló (1999)
	6/2000	*	<0,4-136	Martinez and Barceló (2001)
Ολλανδία				
Μαρίνες	4-11/2000	90-1130	*	Lamoree et al. (2002)
Rotterdam coastal area	10/1998	*	<100	Thomas et al. (2000)
Πορτογαλία				
River water (Ponte Aranha)	4-7/1999	10-1240	*	De Almeida Azevedo et al. (2000)
Σουηδία				
Μαρίνες (West coast)	6/1993-9/1994	10-100	*	Dahl and Blanck (1996)
Ιαπωνία				
<i>Seto Inland Sea</i>				
Μαρίνες, αλιευτικές περιοχές	8/1999	έως 3054	*	Okamura et al. (2003)
Λιμάνια	8/1999	έως 710	*	Okamura et al. (2003)

* : δεν λήφθηκε δείγμα, - : η ουσία δεν ανιχνεύτηκε.

Από τα προϊόντα μεταβολισμού του diuron, η DCPMU και η DCPU ανιχνεύτηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο σε δείγματα νερού σε συγκεντρώσεις μεταξύ <1 και 78 ng L⁻¹ και <6 ng L⁻¹ αντίστοιχα (Thomas et al., 2002). Η DCPMU έχει προσδιοριστεί και στο ίζημα σε συγκεντρώσεις < 25 ng g⁻¹ (Martinez and Barceló, 2001).

Όπως προέκυψε από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, η μοναδική ουσία από τις εξεταζόμενες που έχει μελετηθεί αρκετά στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι το irgarol 1051. Τα δεδομένα που αφορούν στη διερεύνηση των επιπέδων των συγκεντρώσεων του κύριου μεταβολίτη του irgarol 1051, M1 είναι πολύ περιορισμένα. Η ουσία diuron επίσης δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Παγκοσμίως ο αριθμός των ερευνών που αφορούν στην παρουσία του στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι πολύ μικρός παρ' όλη την εκτεταμένη χρήση της ουσίας στα υφαλοχρώματα, ενώ οι μεταβολίτες του diuron DCPMU, DCPU και DCA έχουν επίσης μελετηθεί ελάχιστα. Οι απογορεύσεις που αφορούν στη χρήση των αρχικών ουσιών (irgarol 1051 και diuron) στα υφαλοχρώματα εφαρμόζονται σε ελάχιστες χώρες επομένως η παρακολούθηση των επιπέδων αυτών των ουσιών στο θαλάσσιο περιβάλλον καθίσταται αναγκαία καθώς σε πολλές χώρες, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, οι ουσίες αυτές χρησιμοποιούνται ακόμα όμως τα δεδομένα για τη ρύπανση που προκαλείται από τη χρήση τους είναι ελάχιστα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.1 Εισαγωγή

Τα επίπεδα των διαφόρων οργανικών ενώσεων στο περιβάλλον είναι συνήθως της τάξεως των $\mu\text{g L}^{-1}$ ή $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ή ακόμα χαμηλότερα. Αυτό οφείλεται εν μέρει και στα πολύ χαμηλά ανώτερα επιτρεπτά όρια που θεσπίζονται από τους αρμόδιους φορείς αναφορικά με την παρουσία των ρύπων στα διάφορα υποστρώματα και είναι επίσης της ίδιας τάξης μεγέθους. Επομένως οι τεχνικές προκατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται, θα πρέπει να παρουσιάζουν τη μέγιστη δυνατή απόδοση, ώστε να είναι εφικτή η ανίχνευση και η παρακολούθηση τόσο χαμηλών επιπέδων συγκέντρωσης ευρέου φάσματος ουσιών διαφόρων χημικών κατηγοριών.

Η προκατεργασία των δειγμάτων αποτελεί θεμελιώδες στάδιο της συνολικής ανάλυσης. Σκοπός της είναι η παροχή κλασμάτων δείγματος, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με όλες τις ουσίες-στόχους, αλλά απαλλαγμένα από τυχόν προσμίξεις του υποστρώματος που παρεμποδίζουν την περαιτέρω ανάλυση. Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία των δειγμάτων ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος και μετά ακολουθεί η προκατεργασία η οποία αποτελείται ουσιαστικά από τρία βασικά βήματα: την απομόνωση των ουσιών-στόχων από το υπόστρωμα μέσω εκχύλισης, τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων από προσμίξεις του υποστρώματος, αλλά και από ουσίες που δεν αποτελούν στόχο, και την προσυγκέντρωση των εκχυλισμάτων.

Ο προσδιορισμός των ουσιών-στόχων από τα προσυγκεντρωμένα εκχυλίσματα πραγματοποιείται κυρίως με τη βοήθεια χρωματογραφικών τεχνικών με σπουδαιότερες αυτές της υγροχρωματογραφίας ή της αεριοχρωματογραφίας ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των προς ανάλυση ουσιών (π.χ. πολικότητα, πτητικότητα, σταθερότητα στις υψηλές θερμοκρασίες).

3.2 Προκατεργασία δειγμάτων ύδατος

3.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων συνήθως είναι ανάλογη της διαδικασίας εκχύλισης που ακολουθείται. Όταν χρησιμοποιείται η τεχνική της υγρής/υγρής εκχύλισης τα δείγματα χρησιμοποιούνται αδιάθικτα, γεγονός που επιτρέπει την εκχύλιση των ουσιών που τυχόν είναι προσροφημένες στα αιωρούμενα σωματίδια (Dommarco et al, 1998), ενώ στην περίπτωση της εκχύλισης στερεής φάσης τα δείγματα διηθούνται ώστε να αποφευχθεί το φράξιμο των πόρων του προσροφητικού υλικού (Biziuk et al, 1996).

Στην περίπτωση που τα δείγματα πρόκειται να αναλυθούν για όξινες ουσίες τότε με τη χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων ή οξέων το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται σε τιμή < 3 ώστε όλες οι ουσίες να βρίσκονται σε μοριακή μορφή (Guenu and Hennion, 1996; Crespin et al, 1997; Lagana et al, 1998). Δυστυχώς όμως η μείωση της τιμής του pH μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στη χρωματογραφική ανάλυση, ειδικά στην υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης, καθώς συνεπάγεται αύξηση των παρεμβολών από τη διαλυμένη οργανική ύλη που γίνονται αισθητές στην αρχή κυρίως του χρωματογραφήματος (Chiron et al, 1993; Onnerfjord et al, 1996; Pichon et al, 1996).

Τέλος, όταν οι εξεταζόμενες ουσίες εμφανίζουν υψηλή υδατοδιαλυτότητα, τότε αυξάνεται η ιοντική ισχύς του δείγματος με προσθήκη NaCl ή KCl. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων στο νερό και αυξάνει η απόδοση τόσο της εκχύλισης στερεής φάσης (Reupert et al, 1990; Aguilar et al, 1996; Junker-Buchheit and Witznbacher, 1996; Martin-Esteban et al, 1996; Aguilar et al, 1999; Pinto and Jardim, 2000) όσο και της υγρής/υγρής εκχύλισης (Furniss et al, 1989).

Οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των διαφόρων ουσιών από τα υδατικά υποστρώματα είναι η υγρή/υγρή εκχύλιση, η εκχύλιση στερεής φάσης ενώ πιο πρόσφατα άρχισε να χρησιμοποιείται και η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεής φάσης.

3.2.2 Υγρή /υγρή εκχύλιση

Η τεχνική της υγρής/υγρής εκχύλισης βασίζεται στην κατανομή της εξεταζόμενης ουσίας μεταξύ δύο φάσεων που δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Η μια φάση είναι η υδατική ενώ η άλλη ένας οργανικός διαλύτης. Η τεχνική ενδείκνυται περισσότερο για την απομόνωση υδρόφοβων ουσιών διότι οι πιο υδρόφιλες ουσίες προτιμούν ως γνωστόν την πολική υδατική φάση (Snyder et al., 1997).

Μετά την εκχύλιση των δειγμάτων οι ουσίες που υπάρχουν στην οργανική φάση ανακτώνται εξατμίζοντας τον οργανικό διαλύτη με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα (rotary evaporator) ή συμπυκνωτή Kuderna-Danish, επειδή ο όγκος των εκχυλισμάτων είναι πολύ μεγάλος (Dean, 1998). Περαιτέρω συμπύκνωση των εκχυλισμάτων (< 500 μ L) επιτυγχάνεται με τη χρήση ασθενούς ρεύματος καθαρού αερίου, συνήθως ηλίου ή αζώτου, πάνω από την επιφάνεια του εκχυλίσματος (Hennion and Scribe, 1993). Η εξάτμιση των εκχυλισμάτων μέχρι ξηρού με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα θα πρέπει να αποφεύγεται καθώς υπάρχει κίνδυνος απώλειας των πτητικότερων ουσιών.

Η υγρή/υγρή εκχύλιση χαρακτηρίζεται για την απλότητα και το χαμηλό κόστος της, μιας και δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό και αναλώσιμα (Hennion and Scribe, 1993; Pacakova et al, 1996; Snyder et al, 1997). Τα κυριότερα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι:

- η δημιουργία γαλακτωμάτων που διασπώνται δύσκολα
- η απαίτηση μεγάλου χρόνου (ακόμα και ώρες) ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία
- η ανάγκη εξάτμισης και ασφαλούς διάθεσης μεγάλων όγκων εύφλεκτων και τοξικών διαλυτών, κίνδυνος έκθεσης του αναλυτή σε τοξικούς διαλύτες ή στους ατμούς τους
- τα πολλαπλά στάδια χειρισμού του δείγματος όπου σε κάθε στάδιο θα πρέπει να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις και η απώλεια των συστατικών του
- ο αυτοματισμός της συνολικής διαδικασίας εκχύλισης και συμπύκνωσης απαιτεί ακριβό εξοπλισμό, ενώ είναι δύσκολη η διενέργεια υγρής/υγρής εκχύλισης in situ
- οι ανακτήσεις πολικών οργανικών ουσιών είναι σχετικά μικρές. Αυτό αντιτίθεται στην σύγχρονη τάση της περιβαλλοντικής ανάλυσης να συμπεριλαμβάνει εκτός των μητρικών ουσιών και τα προϊόντα διάσπασης, τα οποία συχνά είναι πολικότερα (Crescenzi et al, 1996; Guenu and Hennion, 1996; Hennion, 1999).

3.2.3 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid phase extraction-SPE)

Η εκχύλιση στερεής φάσης αποτελεί μια τεχνική προεπεξεργασίας των δειγμάτων κατά την οποία οι υπό ανάλυση ουσίες απομονώνονται από την κινητή φάση του δείγματος μέσω της ρόφησης των ουσιών πάνω σε ένα προσροφητικό υλικό που τοποθετείται σε στήλη ή φύσιγγα μιας χρήσης (Hennion and Scribe, 1993; Supelco, 1997) ή παγιδεύεται σε ένα αδρανές υπόστρωμα μεμβρανώδους δίσκου (Hagen et al, 1990; Viana et al, 1996).

Ανάλογα με το είδος των ουσιών που πρόκειται να εκχυλιστούν, αλλά και τον τύπο του υποστρώματος (π.χ. πολικός ή μη πολικός διαλύτης) εφαρμόζονται κατά περίπτωση οι παρακάτω μηχανισμοί ρόφησης (Thurman and Mills, 1998):

Μηχανισμός αντίστροφης φάσης. Πρόκειται για μη πολικό μηχανισμό απομόνωσης των ουσιών κατά τον οποίο οι ουσίες περνούν από μια πολική φάση, όπως είναι το νερό, σε μια μη πολική όπως είναι το προσροφητικό υλικό C18.

Μηχανισμός κανονικής φάσης. Στην περίπτωση αυτή οι υπό ανάλυση ουσίες προσροφούνται πάνω σε μια πολική επιφάνεια, όπως η αλουμίνα (alumina) και η πυριτία (silica). Η SPE κανονικής φάσης συνήθως χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό επιβαρυσμένων εκχυλισμάτων και όχι για την απευθείας εκχύλιση των ουσιών από υδατικά δείγματα.

Μηχανισμός ιοντοανταλλαγής. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει την ανταλλαγή ιόντων μεταξύ των φορτισμένων οργανικών ενώσεων που υπάρχουν στο διαλύτη (πολικό ή μη) και των αντίθετα φορτισμένων προσροφητικών υλικών.

Μικτός μηχανισμός. Αναφέρεται στη σκόπιμη χρήση δύο διαφορετικών ενεργών ομάδων πάνω στο ίδιο προσροφητικό υλικό. Συνήθως η απομόνωση των ουσιών γίνεται με ταυτόχρονη εκχύλιση αντίστροφης φάσης και ανταλλαγής κατιόντων.

Η εκχύλιση στερεής φάσης μπορεί να είναι μη-αυτοματοποιημένη τεχνική (off-line), δηλαδή η προκατεργασία του δείγματος να μην συνδέεται με την επακολουθούσα χρωματογραφική ανάλυση ή αυτοματοποιημένη (on-line), δηλαδή το σύστημα εκχύλισης να συνδέεται απ' ευθείας με το χρωματογραφικό σύστημα (Hennion and Scribe, 1993; Snyder et al., 1997).

Τα βασικά πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεής φάσης είναι:

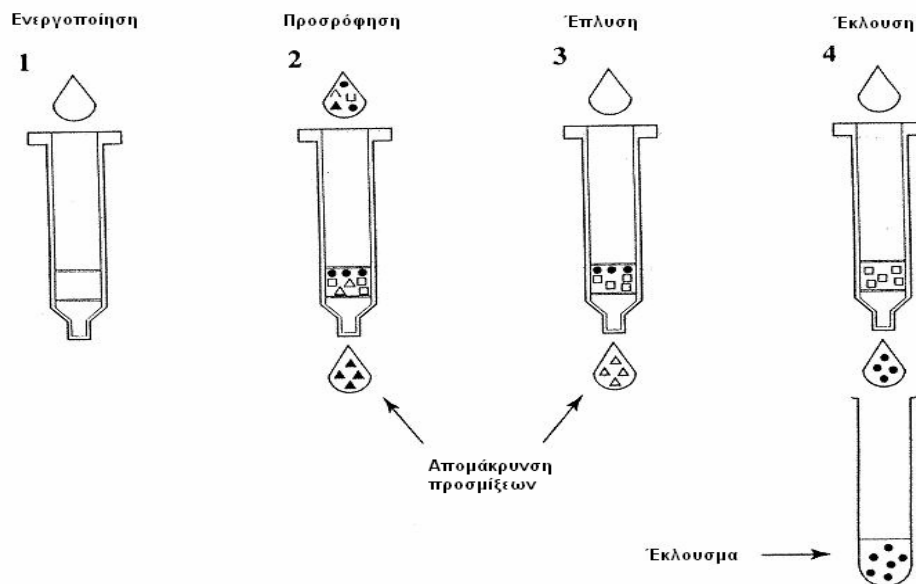
- Ταχύτητα και ευκολία χειρισμών
- Πληρέστερη εκχύλιση του δείγματος
- Χρήση πολύ μικρών όγκων οργανικών διαλυτών

- Απουσία γαλακτωμάτων και καθαρότερα δείγματα
- Μεγαλύτεροι συντελεστές προσυγκέντρωσης
- Ευκολότερος αυτοματισμός της διαδικασίας

Η εκχύλιση στερεής φάσης όταν είναι μη αυτοματοποιημένη παρόλη την ταχύτητά της μειονεκτεί συγκριτικά με την αυτοματοποιημένη εκχύλιση, διότι εισάγεται στο χρωματογράφο για ανάλυση μόνο ένα κλάσμα από το τελικό διάλυμα γεγονός που συνεπάγεται μείωση της ευαισθησίας, υπάρχει κίνδυνος επιμολύνσεων σε διάφορα στάδια της διαδικασίας, ενώ στο στάδιο της εξάτμισης υπάρχει η πιθανότητα απώλειας των πτητικότερων συστατικών (Hennion and Scribe, 1993; Aguilar et al, 1996; Dupas et al, 1996; Onnerfjord et al, 1996).

Η διαδικασία της εκχύλισης στερεής φάσης ουσιαστικά αποτελείται από τέσσερα βασικά βήματα (Σχήμα 3.1):

- ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού
- προσρόφηση των ουσιών πάνω στο προσροφητικό υλικό
- έκπλυση του προσροφητικού υλικού μετά το πέρας της εκχύλισης
- έκλυση των προσροφημένων ουσιών.



Σχήμα 3.1 Βασικά στάδια της διαδικασίας εκχύλισης στερεής φάσης.

3.2.3.1 Ενεργοποίηση

Η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού έχει ως στόχο τη διαβροχή των πόρων του με έναν οργανικό διαλύτη διαλυτό στο νερό ώστε να “εκτείνονται” οι υδρόφοβες αλυσίδες των υδρογονανθράκων και να αυξάνεται η ειδική επιφάνεια, ενώ επιπλέον διευκολύνεται η είσοδος της υδατικής φάσης στο εσωτερικό των πόρων και η αλληλεπίδραση των ουσιών με το προσροφητικό υλικό (Van Horne, 1990; Font et al, 1993; Sabik et al, 2000). Επιπλέον απομακρύνονται με τον τρόπο αυτό τυχόν προσμίξεις που μπορεί να υπάρχουν και οι οποίες είναι δυνατόν στη συνέχεια να επιμολύνουν το έκλουσμα.

Η μεθανόλη αποτελεί τον πιο προσφιλή οργανικό διάλυτη για την ενεργοποίηση των φυσίγγων ή των δίσκων. Όμως όταν ο όγκος του εκχυλιζόμενου υδατικού δείγματος είναι μεγάλος, η μεθανόλη απομακρύνεται σταδιακά από τους πόρους του προσροφητικού υλικού. Για αυτό το λόγο προτείνεται η προσθήκη μικρής ποσότητας μεθανόλης στο δείγμα πριν την έναρξη της εκχύλισης (Sabik et al, 2000). Η προσθήκη αυτή μειώνει επιπλέον τις απώλειες των υδρόφοβων ουσιών λόγω προσρόφησης στα πολυμερή τοιχώματα των φυσίγγων και σε γυάλινες επιφάνειες (Pichon et al, 1998), αλλά επηρεάζει αρνητικά τη συγκράτηση των περισσότερο υδατοδιαλυτών ουσιών (Reupert et al, 1990; Papadopoulou-Mourkidou and Patsias, 1996; Pichon et al, 1998; Sabik et al, 2000). Αναφέρεται επίσης ότι η προσθήκη μεθανόλης στο δείγμα έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη συγκράτηση των πολικών χουμικών ουσιών και καθαρότερα εκλούσματα (Pichon et al, 1998).

3.2.3.2 Προσρόφηση

Κατά τη αναρρόφηση του δείγματος μέσα από τις φύσιγγες ή τους δίσκους, οι ουσίες που υπάρχουν στην υγρή φάση συγκρατούνται πάνω στο προσροφητικό υλικό χάρις την ανάπτυξη διαφόρων χημικών δεσμών που αναπτύσσονται (δεσμοί van der Waal's, δεσμοί υδρογόνου, δεσμοί διπόλου-διπόλου) (Thurman and Mills, 1998).

3.2.3.3 Έκπλυση

Μετά το πέρας της εκχύλισης οι φύσιγγες ή οι δίσκοι αποπλένονται ώστε να απομακρυνθεί οτιδήποτε προσροφήθηκε πέραν των ουσιών-στόχων. Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για την έκπλυση του προσροφητικού υλικού δεν είναι απλή υπόθεση καθώς ο διαλύτης θα πρέπει να

απομακρύνει όσο το δυνατόν περισσότερα συστατικά του υποστρώματος που συνπροσροφήθηκαν. Για παράδειγμα το νερό από μόνο του είναι ικανό να απομακρύνει διάφορα ανόργανα ιόντα, αν όμως επιφορτιστεί με μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη τότε η αποτελεσματικότητά του αυξάνεται. Πρέπει όμως να τονιστεί ότι το ποσοστό του οργανικού διαλύτη δεν θα πρέπει να είναι πολύ υψηλό γιατί τότε υπάρχει κίνδυνος μερικής εκρόφησης των ουσιών (Fritz, 1999).

3.2.3.4 Έκλυση

Στο στάδιο αυτό οι ουσίες απομακρύνονται από το προσροφητικό υλικό με τη χρήση κατάλληλων οργανικών διαλυτών (ή μίγματος αυτών) οι οποίοι επιλέγεται συνήθως να είναι συμβατοί με τη χρωματογραφική τεχνική που πρόκειται να ακολουθηθεί για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών.

Επειδή πάντα συγκρατείται κάποια ποσότητα νερού στους πόρους του προσροφητικού υλικού, οι φύσιγγες ή δίσκοι συνηθίζεται να ξηραίνονται υπό κενό για κάποιο χρονικό διάστημα πριν την έκλυση, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία δύο φάσεων στα εκχυλίσματα στην περίπτωση που ο διαλύτης έκλυσης δεν αναμιγνύεται με το νερό. Στην αντίθετη περίπτωση, δηλαδή όταν υπάρχει συμβατότητα μεταξύ του διαλύτη έκλυσης και του νερού, πάλι δημιουργείται πρόβλημα διότι παρουσία του νερού κάποιες ουσίες θα είναι περισσότερο διαλυμένες από το επιθυμητό (Fritz, 1999).

3.2.3.5 Συμπύκνωση εκλουσμάτων

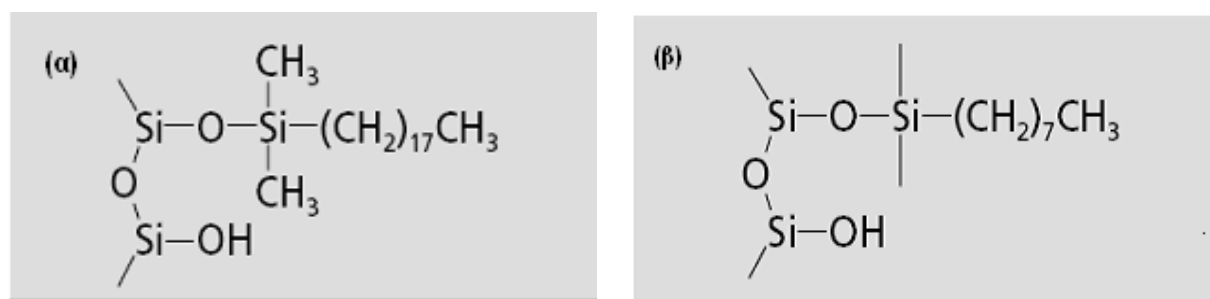
Η συμπύκνωση των εκλουσμάτων μέχρι πολύ μικρού όγκου (< 500 μ L) επιτυγχάνεται με τη χρήση ασθενούς ρεύματος καθαρού αερίου, συνήθως ηλίου ή αζώτου, πάνω από την επιφάνεια του εκχυλίσματος (Hennion and Scribe, 1993). Εξάλλου οι αρχικοί όγκοι των εκλουσμάτων είναι μικροί (μερικά mL) οπότε η χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα αποφεύγεται.

3.2.3.6 Προσροφητικά υλικά

Τα κυριότερα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση στερεής φάσης είναι:

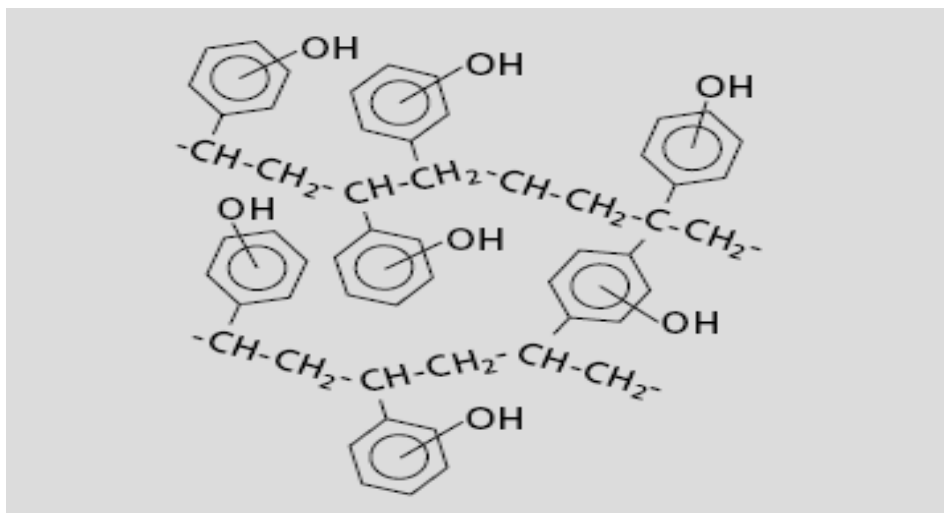
n-Αλκυλομάδες, συζευγμένες σε πυριτική πηκτή. Οι αλκυλομάδες που συνήθως προσδένονται χημικά πάνω στην πυριτική πηκτή είναι οι όκτυλο- (C8) και δεκαόκτυλο- (C18)

ομάδες (Σχήμα 3.2). Η ειδική επιφάνεια αυτών των υλικών κυμαίνεται μεταξύ 500-600 m² g⁻¹ (Hennion, 1999). Η ευρεία χρήση τους οφείλεται στην καλή επαναληψιμότητα, στη γρήγορη εξισορρόπηση κατά την αλλαγή διαλυτών και στο γεγονός ότι σπάνια προσροφούν μη αντιστρεπτά (Hennion and Scribe, 1993). Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ικανοποιητική απομόνωση μεγάλου φάσματος ουσιών διαφόρων χημικών κατηγοριών (φαινόλες, προϊόντα διάσπασης κλπ) εκτός των πολικών για τις οποίες η απόδοση είναι χαμηλή (Pichon, 2000). Το βασικό τους μειονέκτημα είναι η αστάθεια που παρουσιάζουν σε τιμές του pH <2 και >8 (Van Horne, 1990).



Σχήμα 3.2 Χημική δομή (α) δεκαοκτυλομάδας (C18) και (β) οκτυλομάδας (C8) χημικά προσδεδεμένης πάνω στην επιφάνεια πυριτικής πηκτής.

Πολυμερή προσροφητικά υλικά. Παραγόνται με ταυτόχρονο πολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου. Η παρουσία του διβινυλοβενζολίου προκαλεί διαδικτύωση (cross-linking) του τελικού πολυμερούς σε ποσοστό ανάλογο με τη συγκέντρωσή του στο αρχικό μίγμα (Lee, 1988). Στο Σχήμα 3.3 παρουσιάζεται η χημική δομή του πολυμερούς υλικού υδροξυλιομένου πολυστυρενίου – διβινυλοβενζολίου.



Σχήμα 3.3 Χημική δομή πολυμερούς υλικού υδροξυλιωμένου πολυστηρενίου – διβινυλοβενζολίου.

Τα πρώτα πολυμερή υλικά είχαν ειδική επιφάνεια μεταξύ $350-500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ και κυκλοφόρησαν σε μορφή προστηλών για αυτοματοποιημένα συστήματα εκχύλισης HPLC (PRP-1, PLRP-S) ή με τη μορφή δίσκων για μη αυτοματοποιημένα συστήματα (Pichon, 2000). Σήμερα η ειδική επιφάνεια των υλικών που κυκλοφορούν με τη μορφή φυσίγγων μιας χρήσης έχει αυξηθεί ($700-1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) με αποτέλεσμα να αυξηθεί και η απόδοση στη συγκράτηση εξαιρετικά πολικών ουσιών όταν ο όγκος του εκχυλιζόμενου δείγματος είναι πολύ μικρός ($<50 \text{ mL}$) (Hennion, 1999; Pichon, 2000).

Τα πολυμερή υλικά εμφανίζουν 20-50 φορές μεγαλύτερη ισχύ συγκράτησης σε σύγκριση με τα υλικά C18 (Pichon, 2000). Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους για πρόσθετες π-π αλληλεπιδράσεις με αρωματικές ενώσεις (Reubsaet and Vieskar, 1999). Είναι σταθερά σε $\text{pH}=1-14$ (Hennion and Scribe, 1993; Pichon, 2000), ενώ θα πρέπει να αποφεύγεται η εφαρμογή μεγάλων ροών κατά την εκχύλιση καθώς δεν είναι ιδιαίτερα σταθερά υλικά σε υψηλές πιέσεις (Hennion and Scribe, 1993).

Γραφίτης. Οι γραφίτες μπορεί να είναι πορώδεις ή ομογενείς. Διαθέτουν διάφορες επιφανειακές δομικές ομάδες που τους προσδίδουν αξιοσημείωτες προσροφητικές ιδιότητες (Hennion, 1999). Εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα συγκράτησης, μέσω υδρόφοβων ή πολικών αλληλεπιδράσεων, σε σχέση με τα υλικά C18 (Pichon, 2000). Χρησιμοποιούνται για την

ταυτόχρονη εκχύλιση όξινων, βασικών και ουδέτερων ουσιών (Di Corcia and Marchetti, 1992; Hennion and Scribe, 1993). Απαιτούν τη χρήση ισχυρών διαλυτών έκλουσης, όπως το διγλωρομεθάνιο και το τετραυδροφουράνιο (Hennion, 1999).

Προσροφητές ιονανταλλαγής. Τα προσροφητικά αυτά υλικά αποτελούνται από ασθενής και ισχυρές δραστικές ομάδες κατιόντων ή ανιόντων οι οποίες προσδενονται χημικά πάνω στην πυριτική πηκτή. Οι ισχυρές δραστικές ομάδες κατιόντων αποτελούνται από σουλφονικές ομάδες ενώ οι ασθενείς από καρβοξυλικές ομάδες. Ισχυρές δραστικές ομάδες ανιόντων είναι οι τεταρτοταγείς αμίνες, ενώ οι πρωτοταγείς, δευτεροταγείς και τριτοταγείς αμίνες αποτελούν ασθενείς θέσεις ανταλλαγής ανιόντων. Οι ισχυρές δραστικές ομάδες δεν επηρεάζονται από την τιμή του pH ενώ οι ασθενείς είναι διαθέσιμες ανάλογα με την τιμή του pH. Η χωρητικότητα των υλικών αυτών κυμαίνεται από 0,5 έως 1,5 meq g⁻¹ (Thurman and Mills, 1998).

Προσροφητές ανοσοσυγγένειας (immunosorbents) ή πολυμερή με εξειδικευμένα σημεία αναγνώρισης για συγκεκριμένα μόρια (molecular imprinted polymers). Πρόκειται για πολύ πρόσφατα υλικά εκχύλισης με εξαιρετικά αυξημένη εκλεκτικότητα χάρις τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντιγόνου - αντισώματος. Τα αντισώματα προσδέονται χημικά πάνω σε κατάλληλο προσροφητικό υλικό και δημιουργούν τους προσροφητές ανοσοσυγγένειας. Η πρόσδεση της προσδιοριζόμενης ουσίας πάνω στο αντίσωμα είναι αποτέλεσμα ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Με τα υλικά αυτά επιτυγχάνεται ταυτόχρονα η εκχύλιση, η προσυγκέντρωση και ο καθαρισμός (Hennion, 1999).

3.2.4 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Micro Extraction – SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Pawliszyn et al. (1990). Πρόκειται για μια τεχνική κατά την οποία πραγματοποιείται ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των ουσιών από το υπόστρωμα. Κατά το πρώτο βήμα μια ίνα τηγμένης πυριτίας (fused-silica fiber) επικαλυμμένη με ένα πολυμερές υλικό, εισάγεται μέσα στο δείγμα. Αμέσως μετά την εισαγωγή της ίνας αρχίζει η κατανομή των ουσιών μεταξύ της υδατικής και της στατικής φάσης. Κατά το δεύτερο βήμα η ίνα με τις προσροφημένες ουσίες μεταφέρεται και κατευθείαν εισάγεται στον εκάστοτε χρωματογράφο, ώστε να πραγματοποιηθεί η εκρόφηση, ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των ουσιών (Krutz et al., 2003).

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης πλεονεκτεί έναντι των πιο παραδοσιακών τεχνικών διότι είναι γρήγορη και απλή τεχνική, απαλλαγμένη από οργανικούς διαλύτες, αυτοματοποιείται

εύκολα τόσο για την υγροχρωματογραφία όσο και για την αεριοχρωματογραφία ενώ με τη χρήση της επιτυγχάνεται πολύ καλή γραμμικότητα και ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου (Navalon et al. 2002; Bouaid et al., 2001; Zambonin et al., 2000; Guan et al., 1998; Eisert et al., 1997).

3.3 Προκατεργασία δειγμάτων ιζήματος

3.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η προεπεξεργασία των στερεών δειγμάτων πριν την εκχύλιση εξαρτάται από το είδος της ανάλυσης που πρόκειται να ακολουθήσει. Σαφέστατα η αποθήκευση ξηρών δειγμάτων είναι ευκολότερη όμως όταν πρόκειται να γίνει προσδιορισμός σχετικά πτητικών ενώσεων (π.χ. αλκυλο-βενζολίων) τότε είναι προτιμότερο τα δείγματα να καταψυχθούν μέχρι την ανάλυση και να εκχυλιστούν υγρά. Όταν η ξήρανση δε δημιουργεί πρόβλημα (προσδιορισμός λιγότερο ή μη πτητικών ουσιών) τότε τα δείγματα, είτε με λυοφιλίωση, είτε με ξήρανση στους 35-40 °C, απαλλάσσονται από το περιεχόμενο νερό, στη συνέχεια λειοτριβούνται ώστε να μετατραπούν σε λεία σκόνη και εκχυλίζονται. Το στερεό δείγμα υγρό ή στερεό εκχυλίζεται ως σύνολο (όλα τα κλάσματα). Στην περίπτωση που η ανάλυση αφορά στην εκχύλιση μόνο της ίλυος και της αργίλου (μέγεθος κόκκων < 63 μm) τότε το δείγμα διαχωρίζεται στα διάφορα κλάσματά του με υγρή κοσκίνιση. Η κοσκίνιση ξηρού δείγματος αποφεύγεται καθώς απαιτείται λειοτρίβιση η οποία όμως δεν συνεπάγεται την αρχική κατανομή μεγέθους των σωματιδίων του δείγματος (Wells, 1993).

3.3.2 Υγρή-στερεή εκχύλιση

Η απομόνωση των διαφόρων ρύπων από τα στερεά δείγματα πραγματοποιείται συνήθως με μια από τις παραδοσιακές μεθόδους υγρής-στερεής εκχύλισης οι οποίες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: αυτές που απαιτούν θερμότητα, όπως είναι η εκχύλιση Soxhlet ή Soxtec και σε αυτές που δεν απαιτούν θερμότητα, όπως η εκχύλιση ανάδευσης και η εκχύλιση με χρήση υπερήχων (εκτός και αν απαιτείται από την αναλυτική μέθοδο υψηλή θερμοκρασία). Βέβαια η εκχύλιση με υπερήχους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μπορεί να οδηγήσει σε μικρή αύξηση της θερμοκρασίας (Dean, 1998).

3.3.2.1 Εκχύλιση Soxhlet

Κατά την εκχύλιση Soxhlet το στερεό δείγμα τοποθετείται σε ένα πορώδες κυλινδρικό φυσίγγιο μιας χρήσεως, κατασκευασμένο από σκληρό χαρτί διήθησης (Soxhlet thimble) το οποίο με τη σειρά του τοποθετείται στη συσκευή Soxhlet. Θερμός διαλύτης εκχύλισης συμπυκνώνεται μέσα στο φυσίγγιο απομονώνοντας τις ουσίες από το υπόστρωμα. Η συσκευή Soxhlet είναι έτσι κατασκευασμένη ώστε να αναρροφά τα εκχυλίσματα κάθε φορά που φρέσκος διαλύτης έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα. Τα εκχυλίσματα που έχουν αναρροφηθεί επιστρέφουν στο δοχείο απόσταξης της συσκευής και η διαδικασία εκχύλισης επαναλαμβάνεται τόσες φορές όσες απαιτούνται για την πλήρη απομάκρυνση των ουσιών από το δείγμα (Snyder et al., 1997).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet είναι:

- Εύκολοι χειρισμοί και χαμηλό κόστος που επιτρέπουν την ταυτόχρονη εκχύλιση μεγάλου αριθμού δειγμάτων,
- Δεν απαιτείται διήθηση των εκχυλισμάτων,
- Δεν εξαρτάται από το προς εκχύλιση υπόστρωμα,
- Υπάρχει δυνατότητα εκχύλισης μεγάλων ποσοτήτων δείγματος (ως 200 g),
- Χάρη την επαναλαμβανόμενη επαφή του δείγματος με φρέσκο διαλύτη εκχύλισης αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης,
- Η θερμοκρασία της εκχύλισης παραμένει σχετικά υψηλή επειδή η θερμότητα που εφαρμόζεται στο δοχείο απόσταξης μεταδίδεται εν μέρει στο φυσίγγιο εκχύλισης (Wells, 1993; Luque de Castro and Garcia-Ayuso, 1998).

Η εκχύλιση Soxhlet μειονεκτεί συγκριτικά με άλλες παραδοσιακές τεχνικές, καθώς απαιτούνται πάρα πολλές ώρες για την πλήρη εκχύλιση του δείγματος που συχνά μπορεί να ξεπεράσουν τις 24 (Snyder et al., 1997), αφού η συσκευή εκχύλισης είναι τέτοια που καθιστά αδύνατη την ανάδευση κατά την εκχύλιση, γεγονός που θα επιτάχυνε τη διαδικασία. Απαιτούνται μεγάλοι όγκοι οργανικών διαλυτών των οποίων το κόστος είναι υψηλό. Η χρήση μεγάλου όγκου οργανικού διαλύτη καθιστά επιπλέον υποχρεωτική τη συμπύκνωση των εκχυλισμάτων, ενώ για την ασφαλή διάθεση των μεγάλων ποσοτήτων τοξικών αποβλήτων που παράγονται επίσης το κόστος είναι υψηλό. Υπάρχει κίνδυνος διάσπασης των ουσιών, οι οποίες είναι ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες, αφού η εκχύλιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία ίση με το σημείο βρασμού του διαλύτη εκχύλισης. Τέλος υπάρχει περιορισμός όσον αφορά τους διαλύτες εκχύλισης, καθώς η τεχνική απαιτεί διαλύτες αρκετά πτητικούς, στους οποίους οι εξεταζόμενες

ουσίες πρέπει να εμφανίζουν μεγάλη διαλυτότητα, αλλά το υπόστρωμα να διαλύεται ελάχιστα (Snyder et al., 1997; Luque de Castro and Garcia-Ayuso, 1998).

3.3.2.2 Εκχύλιση Soxtec (αυτοματοποιημένη εκχύλιση Soxhlet)

Εκχύλιση Soxtec καλείται η αυτοματοποιημένη εκχύλιση Soxhlet. Αποτελείται από τρία βασικά στάδια. Αρχικά το φυσίγγιο που περιέχει το δείγμα εμβαπτίζεται για 60 min μέσα στον οργανικό διαλύτη ο οποίος βρίσκεται σε κατάσταση βρασμού (πρώτο στάδιο) και στη συνέχεια ανυψώνεται για άλλα 60 min πάνω από το διαλύτη, οπότε το δείγμα εκχυλίζεται όπως ακριβώς και στην εκχύλιση Soxhlet (δεύτερο στάδιο). Τέλος, πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη μέσα στην ίδια τη συσκευή Soxtec (τρίτο στάδιο) (Dean, 1998).

Πρόκειται για πολύ γρήγορη μέθοδο εκχύλισης συγκριτικά με την εκχύλιση Soxhlet αφού απαιτούνται περίπου 2 h για την εκχύλιση ενός δείγματος, ενώ απαιτείται μόνο το 20 % από την ποσότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούνται κατά την εκχύλιση Soxhlet (Dean, 1998). Εκτός όμως από την εξοικονόμηση χρόνου, με την εκχύλιση Soxtec επιτυγχάνονται πολύ καλές ανακτήσεις των ισχυρά προσροφημένων ουσιών στο στερεό δείγμα χάρις το στάδιο της εμβαπτίσης στο διαλύτη που βράζει (Luque de Castro and Garcia-Ayuso, 1998).

3.3.2.3 Εκχύλιση με ανάδευση

Αποτελεί ίσως την απλούστερη και πιο παραδοσιακή μέθοδο εκχύλισης στερεών δειγμάτων. Κατάλληλη ποσότητα δείγματος τοποθετείται σε ένα γυάλινο δοχείο, προστίθεται ο διαλύτης εκχύλισης και το δοχείο αναδεύεται είτε μηχανικά είτε χειροκίνητα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Μετά την εκχύλιση ο οργανικός διαλύτης στον οποίο περιέχονται οι ουσίες διαχωρίζεται από το υπόστρωμα με διήθηση ή φυγοκέντριση. Σχεδόν πάντα η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές και τα συνδυάζονται εκχυλίσματα διηθούνται ή φυγοκεντρούνται. Αυτό συμβαίνει ώστε κάθε φορά φρέσκος διαλύτης να είναι σε επαφή με το δείγμα αυξάνοντας με αυτόν το τρόπο την απόδοση της μεθόδου (Dean, 1998).

3.3.2.4 Εκχύλιση με χρήση υπερήχων

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή το δείγμα, το οποίο είναι βυθισμένο μέσα σε θερμό οργανικό διαλύτη, αναταράσσεται με τη βοήθεια υπερήχων για συγκεκριμένο χρόνο. Οι ουσίες περνούν

από τη στερεή φάση του δείγματος στην υγρή φάση του διαλύτη καθώς λύνονται οι χημικοί δεσμοί ουσιών - υποστρώματος λόγω της ανατάραξης σε υψηλή θερμοκρασία. Η παραπάνω διαδικασία συνήθως πραγματοποιείται εις τριπλούν και τα τελικά εκχυλίσματα συνδυάζονται και είτε διηθούνται, είτε φυγοκεντρώνονται, ώστε να διαχωριστούν ο οργανικός διαλύτης και το υπόστρωμα. Ακολουθεί συμπύκνωση του οργανικού διαλύτη ώστε να μειωθεί ο όγκος του (Dean, 1998).

3.3.3 Εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (supercritical fluid extraction- SFE)

Η εκχύλιση στο υπερκρίσιμο σημείο αποτελεί εναλλακτική τεχνική απομόνωσης ουσιών από στερεά, ημι-στερεά, ακόμα και υγρά υποστρώματα έναντι των πιο παραδοσιακών μεθόδων στις οποίες χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο οργανικοί διαλύτες (Turner et al., 2002). Η πρώτη χρήση αυτής της τεχνικής αναφέρεται το 1978 από τον Zosel (Wells, 1993).

Η SFE αποτελείται ουσιαστικά από δύο ολοκληρωμένα στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο οι ουσίες αρχικά εκχυλίζονται από το υπόστρωμα και στη συνέχεια συλλέγονται είτε άμεσα σε έναν χρωματογράφο (αυτοματοποιημένη συλλογή) είτε έμμεσα σε μια συσκευή συλλογής (μη αυτοματοποιημένη συλλογή). Η συσκευή συλλογής μπορεί να είναι ένα άδειο δοχείο, ένα δοχείο που περιέχει μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη ή μια παγίδα στερεής φάσης (solid-phase trap) της οποίας το πληρωτικό υλικό μπορεί να είναι γυαλί, ατσάλι, υλικό στηλών SPE ή αεριοχρωματογραφίας ή κρυοπαγίδα. Φτάνοντας στη συσκευή συλλογής, το υπερκρίσιμο υγρό αποσυμπιέζεται αποδεσμεύοντας τις εκχυλισμένες ουσίες που εμπεριέχει υπό τη μορφή αερολυμάτων (aerosols) (Snyder et al., 1997; Turner et al., 2002).

Από τα ρευστά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση των ουσιών με την τεχνική SFE, το CO₂ είναι το πιο προσφιλές χάρις το χαμηλό κόστος του, τη χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία του ($T_c=31,3$ °C) και τη χαμηλή κρίσιμη πίεσή του ($P_c=72,2$ atm) (Wells, 1993).

Η τεχνική της SPE θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως περιβαλλοντικά ήπια τεχνική αφού δεν απαιτεί τη χρήση οργανικών διαλυτών ή αν απαιτεί, για την τελική συλλογή των ουσιών, η ποσότητα είναι πολύ μικρή (Turner et al., 2002).

3.3.4 Εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην προσρόφηση της ενέργειας μικροκυμάτων από το διαλύτη έκλυσης γεγονός που συνεπάγεται αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης με αποτέλεσμα να

είναι δυνατή η διάχυση των ουσιών από το υπόστρωμα στο διαλύτη (Hoogerbrugge et al., 1997). Η θέρμανση του διαλύτη είναι εφικτή χάρις την άμεση επίδραση των μικροκυμάτων πάνω στα μόριά του με δύο τρόπους: της ιοντικής επαγωγής (ionic conduction) και της διπολικής περιστροφής (dipole rotation). Η ιοντική επαγωγή είναι ουσιαστικά η ηλεκτροφορητική μετακίνηση (electrophoretic migration) των ιόντων όταν εφαρμόζεται ηλεκτρομαγνητικό πεδίο. Η αντίσταση που παρουσιάζει το διάλυμα σε αυτή τη μετακίνηση συνεπάγεται αύξηση της τριβής και επομένως αύξηση της θερμοκρασίας. Διπολική περιστροφή σημαίνει ευθυγράμμιση των διπόλων με το εφαρμοζόμενο πεδίο. Αυτή η εξαναγκασμένη κίνηση των μορίων ώστε να ευθυγραμμιστούν προκαλεί τη θέρμανση του διαλύτη (Eskilsson and Björklund, 2000).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της εκχύλισης με μικροκύματα είναι ο μικρός χρόνος που απαιτείται για την απομόνωση των ουσιών, χάρις την άμεση θέρμανση των διαλυτών, η χρήση πολύ μικρότερων όγκων οργανικών διαλυτών και η ταυτόχρονη εκχύλιση πολλών δειγμάτων (μέχρι και 14) (Eskilsson and Björklund, 2000). Επιπρόσθετα, η παρουσία νερού στα δείγματα (% υγρασία) μπορεί να αποβεί ευεργετική για την εκχύλιση (Xiong et al., 1999) καθώς βελτιώνει την ανάκτηση των εκχυλιζόμενων ουσιών (Lopez-Avila et al., 1994; Barnabas et al., 1995; Xiong et al., 1999) και βοηθά στην απορρόφηση της ενέργειας μικροκυμάτων από τους μη πολικούς διαλύτες (Pastor et al., 1997). Όμως το νερό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και από μόνο του ως διαλύτης για την εκχύλιση ορισμένων οργανικών ουσιών (Steinheimer et al., 1993; Stout et al., 1996; Xiong et al., 1998; Xiong et al., 1999; Shen and Lee, 2003).

Πέρα από τα πλεονεκτήματα όμως, η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων εμφανίζει και μειονεκτήματα όπως όλες οι μέθοδοι. Το πιο βασικό είναι ότι ο διαλύτης έκλουσης θα πρέπει να έχει την ικανότητα να απορροφά την ενέργεια μικροκυμάτων, ενώ και εδώ απαιτείται καθαρισμός των εκλουσμάτων για την απομάκρυνση προσμίξεων που εκχυλίζονται ταυτόχρονα με τις υπό εξέταση ουσίες και μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στη χρωματογραφική ανάλυση (Eskilsson and Björklund, 2000; Shen and Lee, 2003). Τέλος, αν η ανάλυση πρόκειται να πραγματοποιηθεί με αεριοχρωματογραφία, οι ουσίες θα πρέπει να μεταφερθούν σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη πριν την ανάλυση.

3.3.5 Επιταχυνόμενη εκχύλιση υπό πίεση (Accelerated solvent extraction- ASE)

Πρόκειται για μια καινούρια μέθοδο εκχύλισης όπου οι οργανικοί διαλύτες χρησιμοποιούνται κάτω από συνθήκες πολύ υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας μέχρι και 200 bar και 200 °C

αντίστοιχα (Camel, 2000). Η υψηλή θερμοκρασία συνεπάγεται αύξηση της διαλυτότητας των ουσιών, επιτάχυνση του ρυθμού διάχυσης των ουσιών από το υπόστρωμα στο διαλύτη εκχύλισης, αύξηση του ρυθμού της εκχύλισης καθώς φρέσκος διαλύτης έρχεται σε επαφή με το δείγμα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η μεταφορά μάζας, και τέλος μείωση του ιξώδους του διαλύτη γεγονός που αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης, γιατί αυξάνεται η διείσδυσή του στο υπόστρωμα. Στη μεγαλύτερη διείσδυση του διαλύτη στο υπόστρωμα βοηθά και η υψηλή πίεση η οποία επιτρέπει στο διαλύτη να παραμένει σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία πάνω από το σημείο βρασμού του (Dean, 1998).

Η ASE είναι μια μέθοδος εκχύλισης που χαρακτηρίζεται από εύκολους χειρισμούς και επιτρέπει τη γρήγορη εκχύλιση δειγμάτων με τη χρήση μικρών όγκων διαλυτών. Τα εκχυλίσματα είναι κατά πολύ καθαρότερα σε σχέση με αυτά που λαμβάνονται από άλλες μεθόδους, οπότε συνήθως παρακάμπτεται το στάδιο του καθαρισμού (Camel, 2000).

Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο πολύ ακριβός εξοπλισμός της, ενώ η παρουσία νερού στα δείγματα καθώς και η ύπαρξη συστατικών του υποστρώματος που συνεκχυλίζονται είναι δυνατόν να παρεμποδίσουν τη λειτουργία του (Camel, 2000).

3.4 Καθαρισμός εκλουσμάτων

Πολύ συχνά τα εκχυλίσματα, ιδίως όταν τα αρχικά δείγματα περιέχουν υψηλό ποσοστό οργανικού φορτίου, καθαρίζονται με διάφορες, ως επί το πλείστον απλές, μεθόδους ώστε να απομακρυνθούν οι χουμικές και φουλβικές ενώσεις οι οποίες δημιουργούν προβλήματα κατά την ανάλυση (Hennion, 1999). Ο καθαρισμός των εκλουσμάτων λοιπόν πραγματοποιείται με:

- στήλες διαπέρασης πηκτής, florasil, πηκτής πυριτίου, αλουμίνας και αμινοπρόπυλο-στήλες (Tóth et al., 1996; Biselli et al., 2000; Albanis et al., 2002; Bowman et al., 2003). Ο καθαρισμός με τον τρόπο αυτό αυξάνει την πολυπλοκότητα, το χρόνο και το κόστος ανάλυσης. Ο καθαρισμός με υλικά κανονικής φάσης (florasil, silica, alumina) προϋποθέτει τη διάλυση του ξηρού εκλούσματος σε κάποιον οργανικό διαλύτη όπως εξάνιο ή ισοοκτάνιο, στους οποίους η διαλυτότητα πολικών φυτοφαρμάκων είναι περιορισμένη (Hennion, 1999),
- χρήση δύο στηλών αντίστροφης φάσης σε σειρά (Dupas et al, 1996; Van der Heeft, 2000). Π.χ., δύο στήλες C18 και PRP-1 συνδέονται σε σειρά (Dupas et al, 1996), οπότε σημαντικό ποσοστό των παρεμποδιστών συγκρατείται στην πρώτη προστήλη,

- χρήση διαλύτη χαμηλής ισχύος έκλουσης (π.χ. 1 mL μίγματος ακετονιτριλίου/νερού 5/95) (Dupas et al, 1996). Με την μέθοδο αυτή μπορεί να παρασυρθεί μέρος των πολικών ουσιών,
- μείωση του όγκου του δείγματος (π.χ. από 500 στα 200 mL) μειώνει τις παρεμβολές αλλά και τον βαθμό προσυγκέντρωσης όλων των φυτοφαρμάκων (Dupas et al, 1996),
- προσθήκη μεθανόλης στο δείγμα (π.χ. 10 % v/v) που μειώνει το αρχικό «κύρτωμα», που παρατηρείται συνήθως στα χρωματογραφήματα, αλλά και τις ανακτήσεις των πολικότερων ουσιών (Pichon et al, 1998; Hennion, 1999),
- προσθήκη Na₂SO₃ στο υδατικό δείγμα (Masque et al, 1998a; Masque et al, 1998b),
- αύξηση του pH. Η συγκράτηση των χουμικών ουσιών σε υλικά αντίστροφης φάσης αυξάνεται καθώς το pH του διαλύματος μειώνεται (Reupert et al, 1990; Chiron et al, 1993; Onnerfjord et al, 1996; Pichon et al, 1996), πιθανόν λόγω πρωτονίωσης των χουμικών ουσιών,
- για νερό με εξαιρετικά υψηλό περιεχόμενο σε χουμικά οξέα (Thier and Zeumer, 1992) πραγματοποιείται εκχύλιση με φύσιγγα C18 και έκλουση με ακετονιτρίλιο. Το ακετονιτρίλιο εξατμίζεται έως ξηρού, το ξηρό υπόλειμμα παραλαμβάνεται με διχλωρομεθάνιο. Το διχλωρομεθάνιο εκχυλίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα pH=10, παραλαμβάνεται η οργανική φάση και εξατμίζεται έως ξηρού,
- χρήση υλικών ανοσοσυγγένειας και πολυμερή με εξειδικευμένα σημεία αναγνώρισης για συγκεκριμένα μόρια (Hennion, 1999; Bruzzoniti et al, 2000; Matsui et al, 2000; Pichon, 2000). Τα υλικά αυτά εμφανίζουν καλή απόδοση κατά την εκχύλιση και τον καθαρισμό σύνθετων δειγμάτων, λόγω μεγάλης εκλεκτικότητας. Προσροφητικά υλικά που εμποδίζουν την πρόσβαση μεγαλομορίων στο εσωτερικό των πόρων (restricted access materials) όπως για παράδειγμα τα αλκυλο-διολ-υλικά (Onnerfjord et al, 1996; Hennion, 1999) είναι αποτελεσματικά για τον καθαρισμό του δείγματος, δεν συγκρατούν όμως πολικές ουσίες.

3.5 Τεχνικές προσδιορισμού οργανικών ουσιών στα εκχυλίσματα

Η ανάλυση των εκχυλισμάτων των δειγμάτων, υδατικών και στερεών, για την ανίχνευση οργανικών ουσιών πραγματοποιείται συνήθως χρωματογραφικά.

Η χρωματογραφία είναι μια τεχνική συνεχούς κατανομής των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δύο φάσεων. Η μία φάση καλείται στατική, διότι παραμένει σταθερή, ενώ η άλλη

καλείται κινητή, καθώς διέρχεται μέσα ή πάνω από την επιφάνεια της στατικής φάσης. Λόγω της σχετικής κίνησης της μιας φάσης ως προς την άλλη, οι στιγμιαίες συγκεντρώσεις καθώς και οι αντίστοιχες στιγμιαίες χημικές ισορροπίες των υπό διαχωρισμό ουσιών διαρκώς μεταβάλλονται. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μετατοπίζονται οι κατανομές συγκέντρωσης προς την κατεύθυνση κίνησης της κινητής φάσης με διαφορετική όμως ταχύτητα για κάθε ουσία (Pecsok et al., 1980).

Ανάλογα με το είδος της κινητής φάσης η χρωματογραφία διακρίνεται σε υγροχρωματογραφία, όταν η κινητή φάση είναι υγρή, και αεριοχρωματογραφία, όταν η κινητή φάση είναι αέρια.

3.6 Υγροχρωματογραφία

Στην υγροχρωματογραφία, όπως προαναφέρθηκε, η κινητή φάση είναι υγρή (συνήθως μίγμα οργανικού διαλύτη και νερού) ενώ η στατική φάση είναι ένα πορώδες υλικό (Pecsok et al., 1980).

Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης και το μηχανισμό χάρις τον οποίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ουσιών που υπάρχουν σε ένα δείγμα, διακρίνονται τα παρακάτω είδη υγροχρωματογραφίας (Pecsok et al, 1980; Meyer, 1994, Μέγκουλας, 2004):

- Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, όπου η στατική φάση είναι μη πολική ενώ η κινητή είναι πολική ή πολικότερη της στατικής. Ο διαχωρισμός των ουσιών βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, στην κατανομή ή την προσρόφηση της ουσίας στη στατική φάση. Επιπλέον μπορεί να επιτευχθεί με το μηχανισμό της καταστολής ιόντος ή το μηχανισμό ζεύγους ιόντων.
- Χρωματογραφία κανονικής φάσης, όπου η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή. Στην περίπτωση αυτή τα μόρια της ουσίας ανταγωνίζονται την κινητή φάση καθώς προσπαθούν να αντικαταστήσουν τα προσροφημένα στη στατική φάση μόριά της. Σε κάποιες περιπτώσεις όταν απαιτείται διαχωρισμός ιδιαίτερα πολικών ουσιών, όπως σάκχαρα ή πεπτίδια, η κινητή φάση περιέχει μεγάλο ποσοστό νερού το οποίο σχηματίζει ένα επιφανειακό στρώμα πάνω από τη στατική φάση. Έτσι ο διαχωρισμός των ουσιών οφείλεται στην κατανομή τους μεταξύ της κινητής φάσης και στο εμπλουτισμένο με νερό επιφανειακό στρώμα της στατικής φάσης.

- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (ion-exchange chromatography) όπου η στατική φάση είναι ένα στερεό πολυμερές που φέρει ιονισμένες δραστικές ομάδες, χημικά προσδεδεμένες και έχει μηδαμινή διαλυτότητα στην κινητή φάση. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται χάρις τις αλληλεπιδράσεις των ιοντικών ουσιών του δείγματος με τις αντίθετου φορτίου ιονισμένες δραστικές ομάδες της στατικής φάσης.
- Χρωματογραφία κατανομής όπου η στατική φάση αποτελείται από ένα πορώδες υλικό (συνήθως πηκτή διοξειδίου του πυριτίου) το οποίο περιβάλλεται από μια υγρή στοιβάδα.
- Χρωματογραφία αποκλεισμού είτε κατά μέγεθος είτε αποκλεισμού ιόντος. Στην πρώτη περίπτωση η στατική φάση είναι ένα πορώδες υλικό και ο διαχωρισμός πραγματοποιείται ανάλογα με το μέγεθος των πόρων του και το μοριακό βάρος των ουσιών. Στη δεύτερη, η στατική φάση περιέχει δραστικές ομάδες ίδιου φορτίου με το φορτίο των υπό διαχωρισμό ιόντων και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ιόντων ασθενών οξέων ή βάσεων.

3.6.1 Οργανολογία συστήματος υγροχρωματογραφίας

Ένα τυπικό σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελείται από τα εξής τμήματα:

- τα δοχεία παροχής κινητής φάσης, η σύσταση της οποίας μπορεί να μεταβάλλεται (βαθμωτή έκλυση) ή να παραμένει σταθερή (ισοκρατική έκλυση) καθ' όλη τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης,
- το τμήμα απαέρωσης της κινητής φάσης η οποία πραγματοποιείται, με διέλευση αερίου ηλίου, με ανάπτυξη υποπίεσης, με χρήση υπερήχων ή χρήση ημιπερατών μεμβρανών,
- την αντλία, η οποία προωθεί με επιλεγμένη ταχύτητα ροής την κινητή φάση,
- τον εισαγωγέα, ο οποίος αποτελείται από βρόγχο καθορισμένου ή μεταβλητού όγκου και μπορεί να συνδεθεί με σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη,
- τη στήλη ανάλυσης,
- το θερμοστατούμενο θάλαμο θέρμανσης στηλών,
- το σύστημα παραγωγοποίησης, για τις περιπτώσεις στις οποίες οι εξεταζόμενες ουσίες εμφανίζουν μικρό συντελεστή απόκρισης για τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή,
- τον ανιχνευτή,
- το σύστημα ελέγχου, το λογισμικό επεξεργασίας και τη μονάδα αποθήκευσης των δεδομένων.

3.6.2 Αντλίες συστημάτων υγροχρωματογραφίας

Οι αντλίες των συστημάτων υγροχρωματογραφίας διακρίνονται σε αντλίες σταθερού όγκου και σταθερής πίεσης. Για αναλυτικούς σκοπούς χρησιμοποιούνται αποκλειστικά αντλίες σταθερού όγκου οι οποίες μπορεί να είναι τύπου σύριγγας ή παλινδρομικών πιστονιών (Katz et al., 1998).

Τα βασικότερα ποιοτικά χαρακτηριστικά των αντλιών είναι η σταθερή και ακριβής ταχύτητα παροχής της κινητής φάσης και η ακριβής σύσταση των διαλυτών στην περίπτωση της βαθμωτής έκλουσης ή της ανάμιξης διαλυτών (Kele and Guiochon, 1999).

Αντλίες τύπου σύριγγας. Η λειτουργία τους βασίζεται στη μηχανικά ελεγχόμενη κίνηση ενός πιστονιού με σταθερή ταχύτητα, το οποίο βρίσκεται μέσα σε θάλαμο σταθερού όγκου. Η αστάθεια όμως του παρεχόμενου όγκου διαλυτών σε υψηλές πιέσεις εξαιτίας της συμπιεστότητας των διαλυτών, ο πεπερασμένος ολικός όγκος που μπορεί να αντληθεί, καθώς και το μεγάλο κόστος τους είχαν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της χρήσης τους στη χρωματογραφία υπερκρίσιμων ρευστών και στις τριχοειδείς στήλες (Katz et al., 1998).

Αντλίες παλινδρομικών πιστονιών. Στις αντλίες αυτού του τύπου ένα πιστόνι κινείται παλινδρομικά μέσα σε ένα θάλαμο όγκου 10-400 μL ο οποίος αποτελείται από δύο βαλβίδες μια εισόδου και μια εξόδου. Όταν το πιστόνι απομακρύνεται από το θάλαμο δημιουργείται υποπίεση η οποία συνεπάγεται ενεργοποίηση της βαλβίδας εισόδου οπότε εισέρχεται κινητή φάση μέσα στο θάλαμο. Στη συνέχεια το πιστόνι εισέρχεται στο θάλαμο οπότε ανοίγει η βαλβίδα εξόδου η οποία ενεργοποιείται από την αύξηση της πίεσης. Όταν η αντλία είναι μονοπίστονη παρουσιάζεται μεγάλη παλμικότητα στην παροχή κινητής φάσης. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τη χρήση δύο θαλάμων είτε παράλληλων, με αντίθετη κίνηση πιστονιών, είτε σε σειρά. Στην πρώτη περίπτωση, εξαιτίας της αντίθετης κίνησης των δύο πιστονιών παράγονται δύο αντίθετα πρότυπα ροής, το άθροισμα των οποίων παρουσιάζει σημαντικά μικρότερο βαθμό παλμικότητας. Κατά τη δεύτερη περίπτωση, ο δεύτερος βοηθητικός θάλαμος που τοποθετείται, δεν έχει βαλβίδες εισόδου και εξόδου ενώ το πιστόνι του και εδώ έχει αντίθετη αλλά μικρότερη κίνηση από το κύριο πιστόνι (Katz et al., 1998).

Το κύριο πλεονέκτημα αυτού του τύπου αντλιών είναι η δυνατότητα συνεχούς παροχής κινητής φάσης. Μικρομεταβολές στις υψηλές πιέσεις λειτουργίας του συστήματος μπορεί να προκαλέσουν μικρομεταβολές στην ταχύτητα παροχής κινητής φάσης, πρόβλημα όμως που αντιμετωπίζεται με την τοποθέτηση ελεγκτή πίεσης ώστε να διατηρείται η πίεση σταθερή στο τμήμα της αντλίας (Katz et al., 1998).

3.6.3 Χρωματογραφικές στήλες

Η επιλογή της κατάλληλης αναλυτικής στήλης σε συνδυασμό με τη σωστή κινητή φάση αποτελούν βασική προϋπόθεση για το βέλτιστο διαχωρισμό των ουσιών-στόχων κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Οι χρωματογραφικές στήλες ταξινομούνται με βάση τις διαστάσεις τους και με βάση το πληρωτικό τους υλικό.

3.6.3.1 Διαστάσεις χρωματογραφικών στηλών

Για αναλυτικούς σκοπούς χρησιμοποιούνται συνήθως χρωματογραφικές στήλες με εσωτερικές διαμέτρους 4 ή 4,6 mm. Η χρήση στηλών μικρότερης διαμέτρου προσφέρει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μειωμένη χρήση διαλυτών, αλλά απαιτεί πολύ μικρές ροές οι οποίες για να επιτευχθούν απαιτούνται ειδικές αντλίες υψηλής ακρίβειας και άρα υψηλού κόστους (Majors, 1998).

Τα συνηθεσμένα μήκη στηλών είναι 5, 10, 15 ή 25 cm ενώ η διάμετρος των σωματιδίων πλήρωσης είναι σήμερα 5 μm. Στήλες με μικρότερα σωματίδια (<3 μm) αυξάνουν τη διαχωριστικότητα αλλά είναι πολύ ευαίσθητες (φράζουν πολύ εύκολα) και επιρρεπείς στις αυξημένες πιέσεις (Majors, 1998). Τα σωματίδια πλήρωσης μπορεί να είναι εξ' ολοκλήρου πορώδη ή αδρανή σφαιρίδια με επιφανειακό στρώμα πορώδους ενεργού υλικού (porous layer beads) (Meyer, 1994).

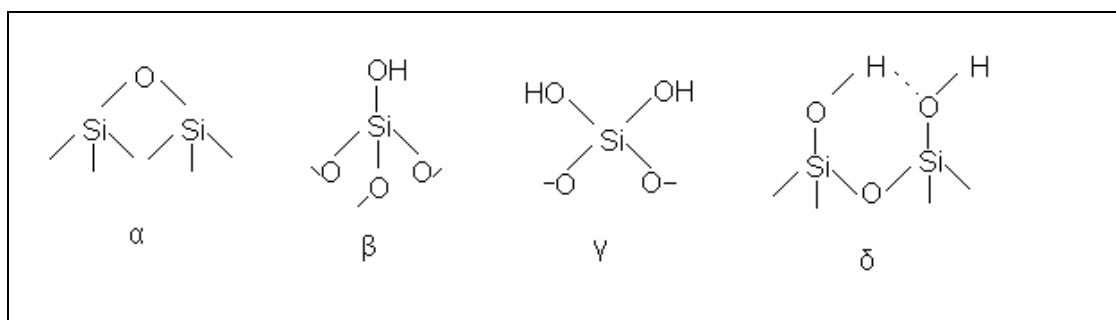
Το υλικό κατασκευής των χρωματογραφικών στηλών είναι συνήθως ατσάλι (κράμα χρωμίου-νικελίου-μολυβδαινίου) ώστε να αντέχουν στις υψηλές πιέσεις λειτουργίας του συστήματος και στη χημική διάβρωση. Για την προστασία των στηλών από επιβαρημένα δείγματα, τοποθετείται στην αρχή τους προστήλη μικρού μήκους η οποία έχει το ίδιο πληρωτικό υλικό με τη στήλη (Meyer, 1994).

3.6.3.2 Υλικά χρωματογραφικών στηλών

Πηκτή του οξειδίου του πυριτίου

Το συνηθέστερο πληρωτικό υλικό των χρωματογραφικών στηλών είναι η πηκτή του οξειδίου του πυριτίου (SiO₂) (Meyer, 1994).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.4, η επιφάνεια της πηκτής αποτελείται από δίκτυο μονών σιλανολικών ομάδων, σιλανοδιολών, συζευγμένων με δεσμούς υδρογόνου σιλανολών, εσωτερικών σιλανολικών ομάδων, γεφυρών σιλοξανίου και δεσμευμένου νερού με δεσμούς υδρογόνου (Legrand, 1998).



Σχήμα 3.4 Τύποι δραστικών ομάδων πηκτής του οξειδίου του πυριτίου. α: γέφυρα σιλοξανίου, β: ελεύθερη σιλανόλη, γ: σιλανοδιόλη, δ: συζευγμένες σιλανόλες.

Το μέγεθος των πόρων κυμαίνεται μεταξύ 5 και 15 nm, στις συμβατικές στήλες, ενώ για το διαχωρισμό βιοπολυμερών είναι της τάξης των 30 nm. Αποφεύγεται η χρήση πόρων μεγέθους <2 nm λόγω φαινόμενων ισχυρής προσρόφησης και αποκλεισμού κατά μέγεθος που μπορεί να εμφανιστούν παρόλο που αυξάνεται η διαχωριστικότητα (Legrand, 1998).

Τα κύρια μειονεκτήματα των πληρωτικών υλικών αυτού του τύπου είναι η υψηλή διαλυτότητα που παρουσιάζουν σε βασικό περιβάλλον και η υδρόλυση των χημικά τροποποιημένων υλικών σε ισχυρά όξινο περιβάλλον. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων έχουν αναπτυχθεί σήμερα εναλλακτικές στατικές φάσεις από άλλα ανόργανα οξείδια με βασικότερα τα οξείδια του αργιλίου, του τιτανίου και του ζirkονίου. Όμως τα υλικά αυτά, παρόλη τη σταθερότητά τους σε ακραίες τιμές του pH, έχουν πολύπλοκο και δύσκολα ρυθμιζόμενο μηχανισμό ανόσχεσης και μη ικανοποιητική επαναληψιμότητα με αποτέλεσμα να βρίσκουν περιορισμένη εφαρμογή (Pesek and Matysak, 2002).

Χημικά τροποποιημένη πηκτή του οξειδίου του πυριτίου

Η πηκτή του οξειδίου του πυριτίου συχνά τροποποιείται χημικά ώστε να αυξηθεί η απόδοσή της. Μέσω προσθήκης διαφόρων αντιδραστηρίων και αντιδράσεων που ακολουθούν, οι επιφανειακές

ομάδες –OH αντικαθίστανται από διάφορους υποκαταστάτες. Η τροποποίηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το τελικό πληρωτικό υλικό να παρουσιάζει πολύ πιο βελτιωμένες και εξειδικευμένες ιδιότητες (Mayer, 1994). Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι πιο κοινοί υποκαταστάτες καθώς και οι μηχανισμοί διαχωρισμού που λαμβάνουν χώρα με τη χρήση τους (Μέγκουλας, 2004) .

Πίνακας 3.1 Υποκαταστάτες της χημικά τροποποιημένης πηκτής του οξειδίου του πυριτίου και ο μηχανισμός διαχωρισμου στον οποίο ανταποκρίνονται.

Ομάδα	Υποκαταστάτης	Μηχανισμός διαχωρισμού
Αλκύλιο	-CH ₃ -C ₄ H ₉ -C ₈ H ₁₇ -C ₁₈ H ₃₇ -C ₃₀ H ₆₁	Αντίστροφης φάσης
Φθοροαλκύλιο	-(CH ₂) ₂ (CF ₂) ₅ CF ₃ -(CH ₂) ₂ C(CF ₃) ₂ C ₃ F ₇	Αντίστροφης φάσης
Φαινύλιο	-C ₆ H ₅ -C ₆ F ₅	Αντίστροφης φάσης
Κυάνιο	-(CH ₂) ₃ CN	Κανονικής και Αντίστροφης φάσης
Άμινο	-(CH ₂) ₃ NH ₂	Κανονικής και Αντίστροφης φάσης και ασθενούς ιονανταλλαγής
Διόλη	- (CH ₂) ₃ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)	Κανονικής φάσης και αποκλεισμού κατά μέγεθος
Αμίδιο	-(CH ₂) ₃ NHCOC ₁₃ H ₂₇	Αντίστροφης φάσης
Καρβαμίδιο	-(CH ₂) ₃ OCONHC ₈ H ₁₇	Αντίστροφης φάσης
Σουλφονικό οξύ	-(CH ₂) ₃ SO ₃ H -C ₆ H ₄ SO ₃ H -(CH ₂) ₃ C ₆ H ₄ SO ₃ H	Ισχυρής κατιονανταλλαγής

Συνέχεια Πίνακα 3.1

Ομάδα	Υποκαταστάτης	Μηχανισμός διαχωρισμού
Καρβοξυλικό οξύ	$-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{COOH}$ $-(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ $-(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{COOH}$	Ασθενούς κατιονανταλλαγής
Διμεθυλαμίνη	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Ασθενούς ανιονανταλλαγής
Τεταρτογενής αμίνη	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Ισχυρής ανιονανταλλαγής

Οι αντιδράσεις που συνήθως λαμβάνουν χώρα για την παρασκευή χημικά τροποποιημένης πηκτής του οξειδίου του πυριτίου είναι:

- η αντίδραση μονοδραστικού οργανοσιλανίου ($\text{Cl-Si-R}_2\text{R}'$) με σιλανολικές ομάδες ($-\text{Si-OH}$) που οδηγεί στο σχηματισμό δεσμού σιλοξανίου ($-\text{Si-O-Si-R}_2\text{R}'$)
- η αντίδραση πρώτα πολυμερισμού τριδραστικού οργανοσιλανίου ($\text{Cl}_3\text{-Si-R}$) και στη συνέχεια πρόσδεση του παραγόμενου πολυμερούς στην επιφάνεια της πηκτής οξειδίου του πυριτίου (κάθετος πολυμερισμός)
- η αντίδραση πολυμερισμού τριδραστικού οργανοσιλανίου ($\text{Cl}_3\text{-Si-R}$) κατευθείαν στην επιφάνεια της πηκτής οξειδίου του πυριτίου (επιφανειακός ή οριζόντιος πολυμερισμός)
- η αντίδραση αρχικά υδρόλυσης του τριαιθυλοσιλανίου $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{SiH}$ και στη συνέχεια αντίδραση των παραγόμενων προϊόντων με τις σιλανολικές ομάδες που οδηγεί στο σχηματισμό υδριδίου του πυριτίου ($-\text{Si-O-Si-H}$) το οποίο έπειτα αντιδρά με ακραίες ολεφίνες οπότε σχηματίζεται δεσμός άνθρακα - πυριτίου ($-\text{Si-O-Si-R}$) (Sander and Wise, 1995; Sander et al., 1999; Li et al., 2000).

Η χημικά τροποποιημένη πηκτή οξειδίου του πυριτίου εμφανίζει μεγάλη αστάθεια σε τιμές $\text{pH} < 2$ (υδρόλυση των δεσμών σιλοξανίου) και > 8 (καταστροφή της δομής οξειδίου του πυριτίου) ενώ παρόλη την επεξεργασία ένα ποσοστό των επιφανειακών ομάδων $-\text{OH}$ παραμένει ελεύθερο προκαλώντας προβλήματα στη χρωματογραφική ανάλυση καθώς προσδίδει πολικότητα στη στατική φάση του συστήματος. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με περαιτέρω επεξεργασία για την κάλυψη των άκρων (endcapping), συνήθως με τριμεθυλοχλωροσιλοξάνιο και εξαμεθυλοδισιλαζίνη (Meyer, 1994).

Η αστάθεια σε ακραίες τιμές του pH περιορίζεται με τη χρήση οργανοσιλανικών αντιδραστηρίων που φέρουν μεγάλες πλευρικές ομάδες (-ισοπροπυλο ή -ισοβουτυλο) (προστασία σε χαμηλό pH) ή χρήση πληρωτικού υλικού το οποίο αποτελείται από συσσωμάτωση κολλοειδών σωματιδίων πηκτής οξειδίου του πυριτίου και χαρακτηρίζονται από μικρή ποροσιμότητα και άρα μικρή ενεργό επιφάνεια (προστασία σε υψηλό pH) (Kirkland and Henderson, 1994; Kirkland et al., 1997).

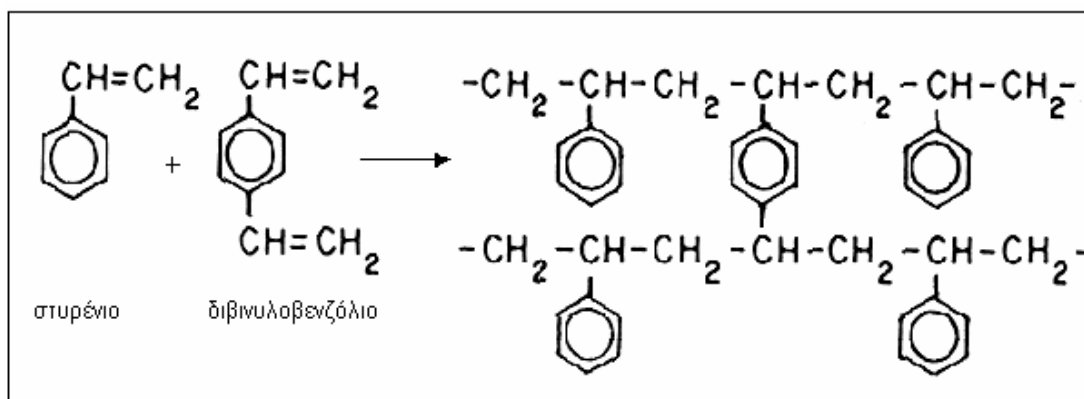
Πολυμερή υλικά

Τα πολυμερή υλικά που χρησιμοποιούνται για την πλήρωση των χρωματογραφικών στηλών διακρίνονται σε μακροπορώδη πολυμερή και πολυμερή τύπου πηκτής.

Μακροπορώδη πολυμερή. Σχηματίζονται με ταυτόχρονο πολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου. Ένας διαλύτης αναμιξιμος με τα μονομερή, μη αναμιξιμος με το νερό και φτωχός για το τελικό πολυμερές προστίθεται στο μίγμα των μονομερών και κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού δημιουργεί σταγονίδια μέσα στο πολυμερές, με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να εμφανίζει μεγάλο μέγεθος πόρους. Η παρουσία του διβινυλοβενζολίου προκαλεί διαδικτύωση (cross-linking) του τελικού πολυμερούς σε ποσοστό ανόλογο με τη συγκέντρωσή του στο αρχικό μίγμα. Τα μακροπορώδη πολυμερή περιέχουν τουλάχιστον 20 % διβινυλοβενζόλιο, μέγεθος σωματιδίων από 5 ως 20 μm , μέγεθος πόρων από 2 ως 400 nm και ενεργό επιφάνεια από 50 ως 500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ (Lee, 1988).

Πολυμερή τύπου πηκτής. Τα υλικά αυτά σχηματίζονται από τον ταυτόχρονο πολυμερισμό στυρενίου και διβινυλοβενζολίου παρουσία όμως καταλύτη βενζυλοϋπεροξειδίου. Το ποσοστό του διβινυλοβενζολίου μπορεί να κυμαίνεται από 4 ως 12 %. Ποσοστό μικρότερο από 4 % συνεπάγεται ασταθείς ρητίνες κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ μεγαλύτερο από 12 % δημιουργεί φαινόμενα αποκλεισμού (Lee, 1988).

Τα πολυμερή υλικά είναι σταθερά για εύρος τιμών pH 1-13 και χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις εκείνες όπου απαιτείται η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης σε ακραίες τιμές (Majors, 1998). Στο Σχήμα 3.5 φαίνεται το πολυμερές υλικό στυρενίου-διβινυλοβενζολίου.



Σχήμα 3.5 Πολυμερές πληρωτικό υλικό χρωματογραφικών στηλών στυρενίου-διβινυλοβενζολίου.

Ανόργανα οξείδια με επικάλυψη πολυμερών

Τα υλικά αυτά μπορεί να είναι είτε σωματίδια με επιφανειακή κάλυψη πολυμερούς είτε σύνθετα σωματίδια ή αλλιώς σωματίδια υψηλής διάχυσης.

Σωματίδια με επιφανειακή κάλυψη πολυμερούς. Στην περίπτωση αυτή, πραγματοποιείται επιφανειακός πολυμερισμός κατά τον οποίο ένα λεπτό στρώμα πολυμερούς ακινητοποιείται πάνω στην επιφάνεια ενός ανόργανου οξειδίου μέσω αντίδρασης με ελεύθερες ρίζες ή ανάπτυξης χημικών δεσμών ανάμεσα στο πολυμερές και τις σιλανολικές ή άλλες προστιθέμενες δραστικές ομάδες (Braekeleer et al., 1999).

Σύνθετα σωματίδια ή σωματίδια υψηλής διάχυσης. Για τη δημιουργία αυτών των σωματιδίων ένα ημιπαρασκευασμένο πολυμερές, πολυμερίζεται εκ νέου μέσα στους πόρους του ανόργανου οξειδίου (Wang et al., 2000).

Πορώδης γραφίτης

Στην περίπτωση αυτή πάνω σε σωματίδια οξειδίου του πυριτίου αποτίθονται οργανικά μονομερή τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε γραφίτη με ταυτόχρονη διαλυτοποίηση του οξειδίου του πυριτίου. Τα παραγόμενα σωματίδια έχουν μέγεθος 5-7 μm, μέση διάμετρο πόρων 25 nm και ενεργό επιφάνεια 100-120 m² g⁻¹ (Hennion, 2000).

Μη πορώδη σωματίδια

Τα μη πορώδη σωματίδια, τα οποία βρίσκουν κυρίως εφαρμογή στην ανάλυση βιοπολυμερών, έχουν διάμετρο 1-5 μm και ενεργό επιφάνεια 0,5-3 m² g⁻¹. Η έλλειψη πόρων έχει ως αποτέλεσμα τη γρηγορότερη μεταφορά μάζας (Chen and Horvath, 1995). Τα υλικά αυτά έχουν περιορισμένη εφαρμογή καθώς τα μικρά τους σωματίδια αυξάνουν την πίεση κατά την ανάλυση. Το πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί με χρήση στηλών μικρότερου μήκους και χαμηλότερες ροές κινητής φάσης όμως αυτό συνεπάγεται εισαγωγή μικρότερου όγκου δείγματος λόγω μικρότερης χωρητικότητας της στήλης (Issaeva et al., 1999).

Μονόλιθοι

Τα πληρωτικά υλικά αυτού του τύπου αποτελούνται από ένα συνεχές πορώδες υλικό και παρασκευάζονται με:

- Συμπολυμερισμό υδατοδιαλυτών μονομερών, όπως είναι τα ακρυλαμίδια, παρουσία ανόργανων αλάτων,
- Συμπολυμερισμό οργανικών μονομερών, όπως είναι το στυρένιο και το διβινυλοβενζόλιο, παρουσία πορογενετικού αντιδραστηρίου,
- Ράβδους σωματιδίων οξειδίου του πυριτίου, οι οποίοι αποτελούνται από ένα συνεχές δίκτυο πόρων,
- Συσσωμάτωση σωματιδίων οξειδίου του πυριτίου τα οποία αιωρούνται μέσα σε ένα κολλώδες διάλυμα οξειδίου του πυριτίου

Πρόκειται για υλικά που μόλις την τελευταία δεκαετία εισήχθησαν στην αγορά και τα οποία μέχρι στιγμής τουλάχιστον δεν πλεονεκτούν σημαντικά έναντι των συμβατικών πληρωτικών υλικών που χρησιμοποιούνται (Gusev et al., 1999; Liao, 2000; Nakanishi et al., 2000; Ratnayake et al., 2000).

3.6.4 Θέρμανση χρωματογραφικών στηλών

Η θέρμανση της χρωματογραφικής στήλης είναι συχνά επιθυμητή καθώς συνεπάγεται στενότερες κορυφές διαχωρισμού εξαιτίας της αύξησης του αριθμού των θεωρητικών πλακών, *N* (Wolcott and Dolan, 1999).

Οι κλίβανοι που χρησιμοποιούνται για τη θερμοστάτηση της στήλης διακρίνονται σε:

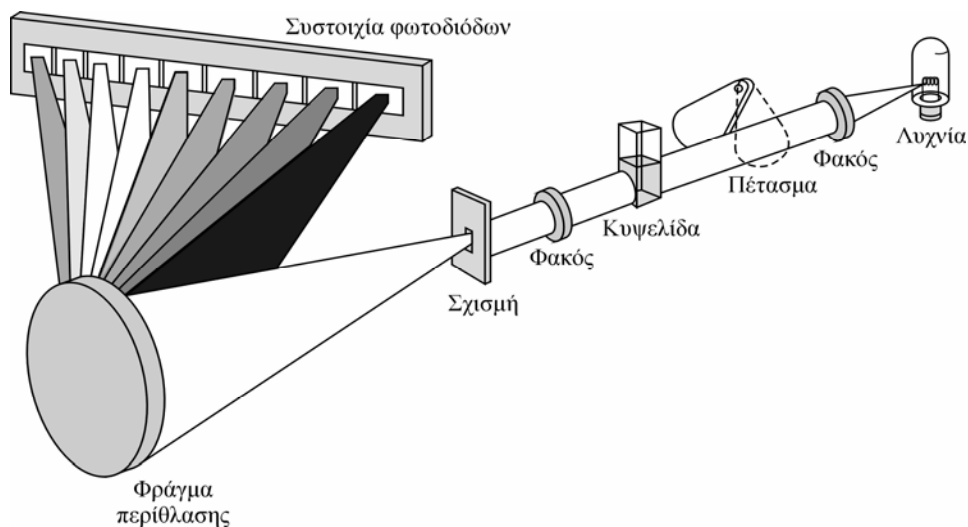
- κλιβάνους με μεταλλικές πλάκες (block-heaters) κατασκευασμένες συνήθως από αλουμίνιο, οι οποίες φέρουν εσοχές και πάνω τους τοποθετείται η χρωματογραφική στήλη. Σε αυτού του τύπου κλιβάνους, θερμαίνεται μόνο η στήλη ενώ οι σωληνώσεις και ο εισαγωγέας είναι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος γεγονός που μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα κατά την ανάλυση εξαιτίας των διευρυμένων κορυφών που παρατηρούνται (Wolcott and Dolan, 1999),
- κλιβάνους θερμαινόμενου αέρα (air bath column heaters), αντίστοιχης λειτουργίας με τους κλιβάνους της αεριοχρωματογραφίας (Zhu and Dolan, 1996). Στους κλιβάνους αυτούς είναι τεχνικά δυνατό να θερμανθούν ταυτόχρονα η στήλη, οι σωληνώσεις και ο εισαγωγέας.

3.6.5 Ανιχνευτές

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των διαχωρισμένων ουσιών πραγματοποιείται κυρίως με οπτικούς ανιχνευτές, ηλεκτροχημικούς ή με φασματοόμετρο μαζών.

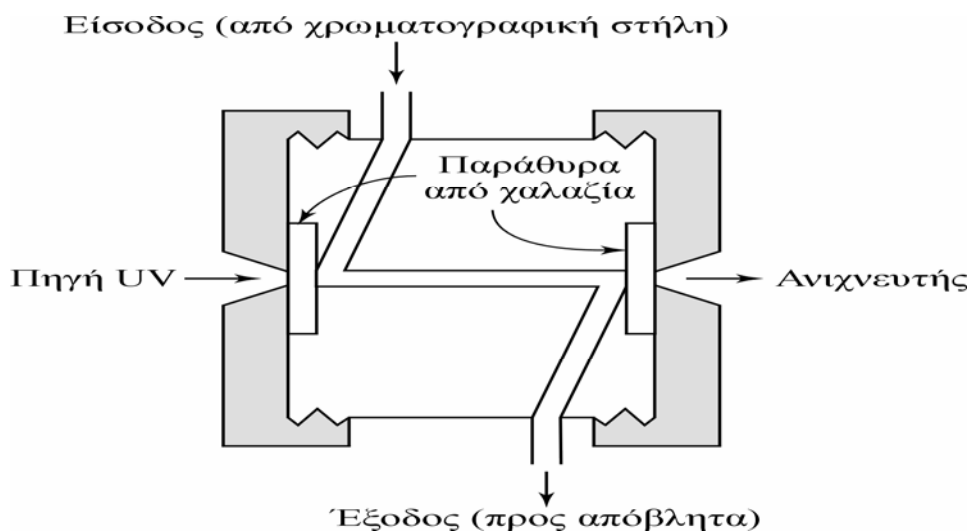
Στους οπτικούς ανιχνευτές ανήκουν:

- *Ο φωτομετρικός ανιχνευτής UV/Vis*, η αρχή λειτουργίας του οποίου βασίζεται στην ταυτόχρονη κάθετη πρόσπτωση ακτινοβολίας σε δύο κυψελίδες, εκ των οποίων η μια περιέχει το έκλουσμα της χρωματογραφικής στήλης και η άλλη κινητή φάση. Η ακτινοβολία η οποία έχει μήκος κύματος στην περιοχή του ορατού – υπεριώδους μετράται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή και από τη διαφορά τους υπολογίζεται η απορρόφηση της ουσίας (Huber and George, 1993),
- *ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων*, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διατριβή, αποτελείται από μια σειρά φωτοδιόδων στο εστιακό επίπεδο ενός πολυχρωμάτορα (Huber and George, 1993), (Σχήμα 3.6).



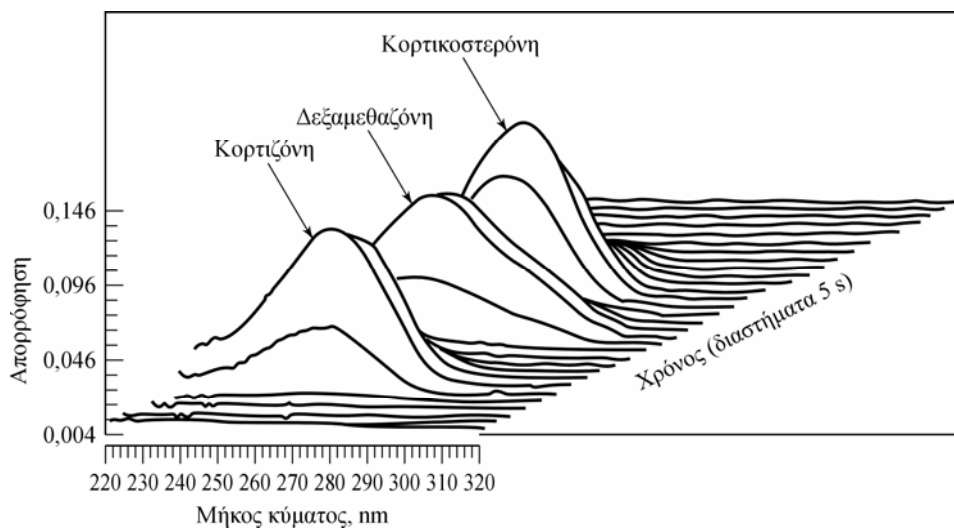
Σχήμα 3.6 Πολυδιαυλικό φασματόμετρο συστοιχίας διόδων

Το έκλουσμα μετά την έξοδό του από τη χρωματογραφική στήλη ανάλυσης εισέρχεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης στην κυψελίδα του ανιχνευτή (Σχήμα 3.7). Η οπτική κυψελίδα έχει μήκος 6 mm και όγκο 4,7 μL . Αριστερά και δεξιά της οπτικής κυψελίδας υπάρχουν δύο φακοί χαλαζία. Η υπεριώδης ακτινοβολία εκπέμπεται από μια λυχνία δευτερίου και προσπίπτει πάνω στην οπτική κυψελίδα. Στη συνέχεια εστιάζεται στον πολυχρωμάτορα και αναλύεται.



Σχήμα 3.7 Κυψελίδα ανιχνευτή υπεριώδους για HPLC.

Οι ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων πλεονεκτούν καθώς είναι δυνατή η μέτρηση της απορρόφησης μιας ουσίας σε όλο το φάσμα του ορατού – υπεριώδους σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα επομένως παρέχεται περισσότερη πληροφορία για τη σύσταση του δείγματος. Επειδή λαμβάνεται το φάσμα UV κάθε μιας χρωματογραφικής κορυφής ξεχωριστά είναι δυνατή η επιλογή του βέλτιστου μήκους κύματος για την τελική χρωματογραφική μέθοδο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον μπορεί να εκτιμηθεί η καθαρότητα της κάθε λαμβανόμενης χρωματογραφικής κορυφής διότι είναι εφικτή η σύγκριση του φάσματος απορρόφησης της με τα φάσματα απορρόφησης πρότυπων ουσιών (Snyder et al., 1997). Στο Σχήμα 3.8 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης εκλούσματος μίγματος κορτιζόνης, δεξαμεθαζόνης και κορτικοστερόνης για διαδοχικά χρονικά διάστημα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.



Σχήμα 3.8 Φάσματα απορρόφησης εκλούσματος μίγματος τριών στεροειδών ληφθέντα σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα των 5 s.

- ο *φθορισμετρικός ανιχνευτής*, η λειτουργία του οποίου βασίζεται στην εκπομπή δευτερογενούς ακτινοβολίας από διεγερμένη φθορίζουσα ουσία, εξαιτίας της πρόσπτωσης πάνω της ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος. Η πηγή της προσπίπτουσας

ακτινοβολίας είναι συνήθως λυχνία δευτερίου (190-400 nm) ή ξένου (200-850 nm) σε συνδυασμό με μονοχρωμάτορες ή φίλτρα ώστε να είναι δυνατή η επιλογή του επιθυμητού μήκους κύματος (Setford and Saini, 2000),

- ο *ανιχνευτής χημειοφωταύγειας*, στην περίπτωση του οποίου η διέγερση της φθορίζουσας ουσίας προκαλείται από την ενέργεια που απελευθερώνεται από μια εξώθερμη χημική αντίδραση ή με κατάλληλη χημική αντίδραση παράγεται κατευθείαν διεγερμένο μόριο της ουσίας (Birks, 1989),
- ο *ανιχνευτής δείκτη διάθλασης*, ο οποίος ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας του διακρίνεται σε απόκλισης, ανάκλασης ή συμβολομετρικό ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής τύπου απόκλισης βασίζεται στην απόκλιση μιας ακτίνας φωτός, όταν αυτή διέρχεται από τη διηλεκτρική μεσεπιφάνεια δύο υλικών το καθένα από τα οποία έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης. Ο ανιχνευτής τύπου ανάκλασης ουσιαστικά ανιχνεύει τη μεταβολή της έντασης της ακτινοβολίας όταν αυτή διέρχεται από τη διηλεκτρική μεσεπιφάνεια ενός γυάλινου πρίσματος και του εκλούσματος της αναλυτικής στήλης. Τέλος ο συμβολομετρικός ανιχνευτής στηρίζεται στην αναλογική σχέση που υπάρχει ανάμεσα στην ταχύτητα του φωτός, όταν αυτό διέρχεται από ένα υλικό και στο δείκτη διάθλασης του υλικού (Parriott, 1993).

Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές διακρίνονται σε αγωγιμομετρικούς, αμπερομετρικούς και παλμικούς αμπερομετρικούς.

- *Αγωγιμομετρικός ανιχνευτής*. Η λειτουργία του βασίζεται στην εφαρμογή εναλλασσόμενου δυναμικού μεταξύ δύο ηλεκτρόδιων, τα οποία είναι τοποθετημένα μέσα σε κατάλληλη κυψελίδα, καθώς και στη μέτρηση της αντίστασης του εκλούσματος (Kissinger and Heineman, 1995).
- *Αμπερομετρικός σταθερού δυναμικού και παλμικός αμπερομετρικός ανιχνευτής*. Στον αμπερομετρικό ανιχνευτή σταθερού δυναμικού, πάνω στο ηλεκτρόδιο εργασίας, το οποίο είναι τοποθετημένο μέσα σε κατάλληλη κυψελίδα, οι εκλούμενες από τη στήλη ουσίες ανάγονται ή οξειδώνονται παράγοντας ηλεκτρικό ρεύμα του οποίου η ένταση μετράται υπό σταθερό δυναμικό. Η ένταση του ρεύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας (Kissinger and Heineman, 1995). Ο παλμικός αμπερομετρικός ανιχνευτής λειτουργεί όπως ο αμπερομετρικός σταθερού δυναμικού, με τη διαφορά ότι το δυναμικό μεταβάλλεται συνήθως με τη μορφή παλμών τριών σταδίων που είναι: το δυναμικό μέτρησης, υψηλό

δυναμικό για τον καθαρισμό της επιφάνειας και αρνητικό δυναμικό για την απενεργοποίηση του ηλεκτροδίου μετά την εφαρμογή του υψηλού δυναμικού (LaCourse, 1997).

Τέλος το *φασματομέτρο μαζών* αποτελεί έναν τύπο ανιχνευτή που εκτός από τον ποσοτικό προσδιορισμό μπορεί να δώσει πληροφορίες και για το συντακτικό τύπο μιας ουσίας μέσω του ιστογράμματος σχετικής αφθονίας των ιόντων που παρέχει. Τα ιόντα παράγονται κατά τη θραυσματοποίηση μιας ουσίας υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Επειδή το φάσμα μαζών είναι χαρακτηριστικό για κάθε ουσία, σε συνδυασμό με τις συνθήκες θραυσματοποίησης μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και του συντακτικού τύπου της ουσίας-στόχο. Τα τμήματα από τα οποία αποτελείται ένα φασματομέτρο μαζών είναι το σύστημα διασύνδεσης με την έξοδο της αναλυτικής στήλης, η πηγή ιόντων που προκαλεί τον ιοντισμό και τη θραυσματοποίηση των ουσιών, ο αναλυτής μαζών στον οποίο διαχωρίζονται τα ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z) και ο ανιχνευτής (Gross and Caprioli, 2000).

3.7 Αεριοχρωματογραφία

Υπάρχουν δύο τύποι αεριοχρωματογραφίας: η *χρωματογραφία αερίου-υγρού* ή *αεριοχρωματογραφία*, η οποία είναι και η ευρέως χρησιμοποιούμενη, και η *χρωματογραφία αερίου-στερεού*, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό διαφόρων αερίων (στατικά του αέρα, υδρόθειο, διθειάνθρακας, οξείδια του αζώτου, μονοξείδιο και διοξείδιο του άνθρακα, ευγενή αέρια).

3.7.1 Αεριοχρωματογραφία ή χρωματογραφία αερίου-υγρού

Η αεριοχρωματογραφία βασίζεται στην κατανομή της υπό εξέταση ουσίας μεταξύ της αέριας φάσης και μιας στατικής φάσης, η οποία ουσιαστικά είναι μια υγρή φάση ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού (Skoog et al., 2002).

Τα βασικά μέρη ενός συστήματος αεριοχρωματογραφίας είναι:

- Φέρον αέριο
- Εισαγωγέας
- Στήλη
- Φούρνος στήλης

- Ανιχνευτής

3.7.1.1 Φέρον αέριο

Το φέρον αέριο που αποτελεί την κινητή φάση, είναι χημικά αδρανές και συνήθως επιλέγεται ανάλογα με τον τύπο του ανιχνευτή που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Το ήλιο, το άζωτο και το υδρογόνο είναι τα τρία αέρια που κυρίως χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία.

3.7.1.2 Εισαγωγή δείγματος

Η πιο γνωστή τεχνική έγχυσης δείγματος είναι η ένεση με μικροσύριγγα διαμέσου ενός αυτοσφραγιζόμενου ελαστικού διαφράγματος σιλκόνης (septum). Από το στόμιο εισόδου το δείγμα εισέρχεται στο χώρο ταχείας εξάτμισης, ο οποίος βρίσκεται στην κεφαλή της στήλης. Στο χώρο εξάτμισης η θερμοκρασία που επικρατεί είναι συνήθως 50 °C πάνω από το σημείο βρασμού της λιγότερο πτητικής ουσίας που θεωρητικά εμπεριέχεται στο δείγμα (Skoog et al., 2002).

Ο όγκος του εισαγόμενου δείγματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η ποσότητα του διαθέσιμου δείγματος, η χωρητικότητα της στήλης και η ευαισθησία του ανιχνευτή. Για τις κοινές αναλυτικές στήλες κυμαίνεται από 0,1 ως 20 μL ενώ για τις τριχοειδείς από 10^{-3} ως 10^{-2} μL (Pecsok et al., 1980). Για την εισαγωγή τόσο μικρού όγκου δείγματος, όπως στην περίπτωση των τριχοειδών στηλών, τοποθετείται πριν τη στήλη ένα σύστημα διαχωρισμού, οπότε μόνο ένας πολύ μικρός όγκος δείγματος επιτρέπεται να εισέλθει στο εσωτερικό της στήλης, ενώ το υπόλοιπο οδηγείται στα απόβλητα (Skoog et al., 2002).

3.7.1.3 Στήλες

Πληρωμένες στήλες

Οι στήλες αυτές κατασκευάζονται από γυαλί, μέταλλο (ανοξείδωτος χάλυβας, χαλκός, αλουμίνιο) ή πλαστικό (Teflon). Έχουν τυπικό μήκος 2-3 m και εσωτερική διάμετρο 2-4 mm. Πληρούνται πυκνά με ένα λεπτά και ομοιόμορφα κονιοποιημένο πληρωτικό υλικό, το λεγόμενο *υλικό στήριξης* το οποίο καλύπτεται με ένα λεπτό στρώμα στατικής φάσης πάχους από 0,05 ως 1

μm. Για την ευκολότερη τοποθέτησή τους στο θερμοστατούμενο φούρνο λυγίζονται σε σπείρες ή σε σχήμα U ή W (Skoog et al., 2002).

Τα πλεονεκτήματα των πληρωμένων στήλων είναι το χαμηλό κόστος κατασκευής τους, η μεγάλη τους χωρητικότητα, ο μεγάλος χρόνος ζωής τους και οι καταλληλότητά τους για δύσκολους διαχωρισμούς (Pecsok et al., 1980).

Υλικό στήριξης

Το υλικό στήριξης της πληρωμένης στήλης συγκρατεί τη στατική φάση με τέτοιο τρόπο ώστε να εκτίθεται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνειά της στην κινητή φάση. Το υλικό στήριξης θεωρείται ιδανικό όταν αποτελείται από μικρά, ομοιόμορφα και σφαιρικά σωματίδια τα οποία διαθέτουν ειδική επιφάνεια τουλάχιστον $1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, μέγεθος από 149 ως 260 μm και παρουσιάζουν καλή μηχανική αντοχή. Επιπλέον θα πρέπει το υλικό να είναι θερμικά σταθερό, χημικά αδρανές και να διαβρέχεται από την υγρή φάση ώστε η τελευταία να διασκορπίζεται σε λεπτή στοιβάδα με ομοιόμορφο πάχος. Επειδή δεν υπάρχει κάποια ουσία που να διαθέτει ταυτόχρονα όλες τις παραπάνω ιδιότητες, σήμερα το υλικό στήριξης παρασκευάζεται από *γη των διατόμων* (υαλώδεις θήκες νεκρών διατόμων που αποθέτονται στο βυθό σχηματίζοντας πυριτικό ίζημα) (Skoog et al., 2002).

Υγρή στατική φάση

Η ακινητοποιημένη υγρή φάση σε μια χρωματογραφική στήλη για να είναι επιθυμητή θα πρέπει να παρουσιάζει χαμηλή πτητικότητα, χημική αδράνεια και χαρακτηριστικά διαλύτη τα οποία οδηγούν σε ικανοποιητικό διαχωρισμό. Οι υπό εξέταση ουσίες θα πρέπει να παρουσιάζουν διαφορετικές σταθερές κατανομής ως προς το ακινητοποιούμενο υγρό ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός τους, ενώ παράλληλα θα πρέπει η πολικότητά τους να είναι συμβατή με αυτή του ακινητοποιούμενου υγρού (Skoog et al., 2002). Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες υγρές φάσεις, κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας, για πληρωμένες (αλλά και ανοικτές) χρωματογραφικές στήλες και είναι ικανές για την ανάλυση του 90 % (ή και περισσότερο) των πιθανών δειγμάτων που θα πρέπει να αναλυθούν με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας.

Πίνακας 3.2 Ευρέως χρησιμοποιούμενες υγρές φάσεις στηλών αεριοχρωματογραφίας.

Υγρή φάση	Μέγιστη θερμοκρασία (°C)	Κύριες εφαρμογές
Πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο	350	Μη πολική φάση γενικής χρήσης, υδρογονάνθρακες, πολυαρωματικά, φάρμακα, στεροειδή, PCB's
Πολυ(φαινυλομεθυλοδιμεθυλο)σιλοξάνιο (10 % σε φαινύλια)	350	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, αλκαλοειδή, φάρμακα, αλογονούχες ενώσεις
Πολυ(φαινυλομεθυλο)σιλοξάνιο (50 % σε φαινύλια)	250	Φάρμακα, στεροειδή, φυτοφάρμακα, γλυκόλες
Πολυ(τριφθοροπροπυλοδιμεθυλο)σιλοξάνιο	200	χλωριωμένες αρωματικές ενώσεις, νίτροαρωματικές ενώσεις, αλκυλοπαράγωγα βενζολίου
Πολυ(αιθυλενογλυκόλη)	250	Ελεύθερα οξέα, αλκοόλες, αιθέρες, αιθέρια έλαια, γλυκόλες
Πολυ(διακυανοαλλυλοδιμεθυλο)σιλοξάνιο	240	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ρητινικά οξέα, ελεύθερα οξέα, αλκοόλες

Στο πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο όλες οι δραστικές ομάδες είναι μεθύλια (-CH₃) για αυτό είναι και το λιγότερο πολικό υγρό από όλα όσα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2. Αντικαθιστώντας τις μεθυλομάδες με άλλες δραστικές ομάδες όπως το φαινύλιο (-C₆H₅), το κυανοπροπύλιο (-C₃H₆CN) και το τριφθοροπροπύλιο (-C₂H₄CF₃) αυξάνεται και η πολικότητα της στατικής φάσης.

Οι χρωματογραφικές στήλες όταν είναι ανεπεξέργαστες με τη χρήση, χάνουν σταδιακά τη στατική τους φάση με βραδεία διαρροή (bleeding). Αυτό συμβαίνει κατά τη διάρκεια της έκλουσης ή την έκπλυση της στήλης με έναν οργανικό διαλύτη ώστε να απομακρυνθούν διάφορες ανεπιθύμητες προσμίξεις. Το πρόβλημα λύνεται με τη χημική δέσμευση (bonded) ή διασταύρωση (cross-linked) της στατικής φάσης (Skoog et al., 2002).

Κατά τη δέσμευση μια μονομοριακή στιβάδα της στατικής φάσης συνδέεται χημικά με την επιφάνεια της πυριτικής πηκτής ενώ κατά τη διασταύρωση η στήλη καλύπτεται με μια υγρή φάση όπως αυτές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Ανοικτές στήλες

Οι ανοικτές ή τριχοειδείς στήλες διακρίνονται σε:

- *Στήλες ανοικτού σωλήνα με επικάλυψη τοιχωμάτων (wall-coated open tubular columns, WCOT)*. Πρόκειται για τριχοειδείς σωλήνες των οποίων το εσωτερικό τοίχωμα είναι επικαλυμμένο με λεπτό στρώμα στατικής φάσης.
- *Στήλες ανοικτού σωλήνα με επικάλυψη υλικού στήριξης (support-coated open tubular columns, SCOT)*. Στην περίπτωση αυτή το εσωτερικό του σωλήνα καλύπτεται με πολύ λεπτό υλικό στήριξης ($\approx 30\mu\text{m}$).
- *Στήλες ανοικτού σωλήνα τηγμένης πυριτίας (fused-silica open tubular columns, FSOT)*. Οι στήλες αυτές κατασκευάζονται με εφελκυσμό τήγματος πυριτίας ειδικής καθαρότητας που περιέχει ελάχιστα ποσά μεταλλικών οξειδίων (Skoog et al., 2002).

Οι ανοικτές στήλες δεν περιέχουν υλικό πλήρωσης και το λεπτό στρώμα της υγρή φάσης σχηματίζεται με τη δίοδο ενός αραιού διαλύματος μέσα από τη στήλη με μικρή ταχύτητα. Παρουσιάζουν μικρότερη πτώση πίεσης σε σχέση με τις πληρωμένες στήλες, οπότε μπορούν να κατασκευαστούν με μεγαλύτερο μήκος. Στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζονται οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των τυπικών στηλών που χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία (Skoog et al., 2002).

Πίνακας 3.3 Ιδιότητες και χαρακτηριστικά τυπικών στηλών αεριοχρωματογραφίας.

	Τύπος στήλης			
	FSOT	WCOT	SCOT	Πληρωμένη
Μήκος (m)	10-100	10-100	10-100	1-6
Εσωτερική διάμετρος (mm)	0,1-0,53	0,25-0,75	0,5	2-4
Απόδοση (πλάκες/mm)	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Ολικές πλάκες	(20-400)x10 ³	(10-400)x10 ³	(6-120)x10 ³	(1-10)x10 ³
Μέγεθος δείγματος (ng)	10-75	10-1000	10-1000	10-10 ⁶
Σχετική οπισθοπίεση	Χαμηλή	Χαμηλή	Χαμηλή	Υψηλή
Σχετική ταχύτητα	Ταχεία	Ταχεία	Ταχεία	Βραδεία
Χημική αδράνεια	Καλύτερη \longrightarrow			Χειρότερη
Ευκαμψία	Ναι	όχι	όχι	όχι

3.7.1.4 Φούρνος στήλης

Η θερμοκρασία της στήλης αποτελεί έναν βασικό παράγοντα για τον προσδιορισμό της συγκράτησης και του διαχωρισμού. Σε υψηλές θερμοκρασίες τα συστατικά του δείγματος έχουν την τάση να βρίσκονται περισσότερο χρόνο στην αέρια φάση οπότε εκλύονται γρήγορα και σχεδόν ταυτόχρονα με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός να μην είναι ικανοποιητικός. Αντίθετα σε χαμηλές θερμοκρασίες τα συστατικά βρίσκονται περισσότερο στην υγρή φάση και επειδή εκλύονται αργά διαχωρίζονται καλύτερα (Pecsok et al., 1980). Για το λόγο αυτό, η στήλη πάντα τοποθετείται μέσα σε θερμοστατούμενο φούρνο ώστε η θερμοκρασία της να ελέγχεται με ακρίβεια μερικών δεκάτων του βαθμού (Skoog et al., 2002).

3.7.1.5 Ανιχνευτές

Στην αεριοχρωματογραφία, όπως συμβαίνει και στην υγροχρωματογραφία, ένας ανιχνευτής για να θεωρείται ιδανικός θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από (Skoog et al., 2002) :

- Ικανοποιητική ευαισθησία
- Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα
- Γραμμική απόκριση για μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων

- Περιοχή θερμοκρασιών λειτουργίας μεγάλου εύρους
- Μικρούς χρόνους απόκρισης
- Εξαιρετική αξιοπιστία και εύκολους χειρισμούς
- Ομοιόμορφη απόκριση για όλες της ουσίες

Προφανώς δεν έχει κατασκευαστεί ακόμη ανιχνευτής που να πληρεί όλες τις παραπάνω απαιτήσεις. Σήμερα οι ανιχνευτές που κυκλοφορούν είναι οι εξής (Skoog et al., 2002):

- *Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (flame ionization detector, FID)*. Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και γραμμική περιοχή, χαμηλό θόρυβο, ανθεκτικότητα και εύκολους χειρισμούς είναι όμως καταστρεπτικός που σημαίνει ότι μετά το πέρας της ανάλυση το δείγμα δεν μπορεί να συλλεχθεί. Η αρχή λειτουργίας του στηρίζεται στην ανάφλεξη του εκλούσματος, καθώς έρχεται σε επαφή με υδρογόνο και αέρα, προς παραγωγή ιόντων. Η εφαρμογή διαφοράς δυναμικού καθιστά δυνατή τη συλλογή των παραγόμενων ιόντων και τελικά τη μέτρηση του παραγόμενου ρεύματος ιοντισμού. Επειδή το ρεύμα ιοντισμού είναι ανάλογο με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που περιέχει η οργανική ένωση για αυτό και ο ανιχνευτής θεωρείται ευαίσθητος προς τη μάζα.
- *Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (thermal conductivity detector, TCD)*. Η λειτουργία του βασίζεται στη μέτρηση των μεταβολών που προκαλεί η παρουσία μορίων μιας οργανικής ένωσης στη θερμική αγωγιμότητα του φέροντος αερίου. Το φέρον αέριο μπορεί να είναι ήλιο ή υδρογόνο. Τα αέρια αυτά παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη θερμική αγωγιμότητα σε σχέση με τις οργανικές ουσίες οπότε ακόμη και παρουσία μικρών ποσοτήτων ουσιών προκαλεί έντονη μείωση της θερμικής αγωγιμότητας του αερίου γεγονός που συνεπάγεται αύξηση της θερμοκρασίας του ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής TCD είναι απλός, μη καταστρεπτικός, με μεγάλη δυναμική περιοχή αλλά περιορισμένη ευαισθησία.
- *Ανιχνευτής χημειοφωταύγειας θείου (sulfur chemiluminescence detector, SCD)*. Η αρχή λειτουργίας του ανιχνευτή SCD στηρίζεται στην αντίδραση των ενώσεων του θείου με το όζον. Αρχικά το εκλούσμα αναφλέγεται παρουσία υδρογόνου και αέρα. Στη συνέχεια τα παραγόμενα αέρια αναμιγνύονται με όζον και μετράται η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του θείου που υπήρχε στην ένωση.

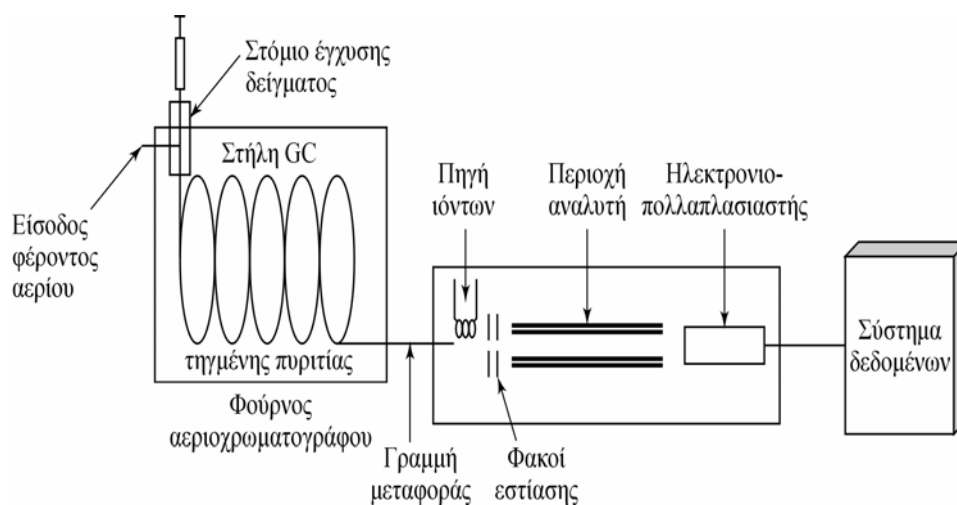
- *Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (electron-capture detector, ECD)*. Στην περίπτωση αυτού του ανιχνευτή το έκλουσμα μετά την έξοδό του από τη στήλη διέρχεται πάνω από ένα β-ραδιενεργό υλικό (^3H ή ^{63}Ni). Το φέρον αέριο, που είναι συνήθως άζωτο, ιονίζεται εξαιτίας ενός ηλεκτρονίου από τη ραδιενεργό πηγή παράγοντας ένα πλήθος ηλεκτρονίων που μπορούν να μετρηθούν με τη μορφή σταθερού ρεύματος μεταξύ ενός ζεύγους φορτισμένων ηλεκτροδίων. Παρουσία οργανικών μορίων το ρεύμα αυτό διαταράσσεται καθώς τα μόρια τείνουν να «συλλάβουν» τα ελεύθερα ηλεκτρόνια μειώνοντας έτσι την ένταση του ρεύματος. Ο ανιχνευτής ECD είναι ελάχιστα καταστρεπτικός, ιδιαίτερα ευαίσθητος και εκλεκτικός ως προς τις αλογονούχες ενώσεις όπως είναι πολλά φυτοφάρμακα και τα πολυχλωριωμένα διφαινόλια. Το μειονέκτημά του είναι η περιορισμένη γραμμική του περιοχή.
- *Ανιχνευτής ατομικής εκπομπής (atomic emission detector, AED)*. Εδώ το έκλουσμα εισάγεται σε πλάσμα ηλίου το οποίο ενεργοποιείται με μικροκύματα και είναι συζευγμένο με συστοιχία διόδων φασματόμετρου οπτικής εκπομπής. Η ενέργεια του πλάσματος είναι τέτοια που επιτρέπει την ατομοποίηση όλων των συστατικών ενός δείγματος και την εκπομπή των χαρακτηριστικών φασμάτων ατομικής εκπομπής. Τα εκπεμπόμενα φάσματα λαμβάνονται με ένα φασματόμετρο που διαθέτει ένα κινητό επίπεδο με συστοιχία διόδων (ανίχνευση στην περιοχή από 170 ως 780 nm).
- *Θερμιονικός ανιχνευτής (thermionic detector, TID)*. Πρόκειται για εκλεκτικό ανιχνευτή ως προς τις φωσφορούχες και αζωτούχες οργανικές ενώσεις. Αρχικά το έκλουσμα μετά την έξοδό του από τη στήλη έρχεται σε επαφή με υδρογόνο και αναφλέγεται. Στη συνέχεια το παραγόμενο θερμό αέριο έρχεται σε επαφή με ένα ηλεκτρικά θερμαινόμενο σφαιρίδιο πυριτικού ρουβιδίου το οποίο σχηματίζει πλάσμα θερμοκρασίας 600 - 800 °C με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας πλήθος από φωσφορούχα και αζωτούχα μόρια.
- *Φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής (flame photometric detector, FPD)*. Αυτός ο τύπος ανιχνευτή ανταποκρίνεται κυρίως σε ενώσεις φωσφόρου και θείου. Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στην ανάφλεξη του εκλούσματος με φλόγα υδρογόνου/αέρα χαμηλής θερμοκρασίας οπότε μέρος του φωσφόρου μετατρέπεται σε σωματίδια HPO , ενώ το θείο μετατρέπεται σε S_2 . Οι ζώνες ακτινοβολίας που εκπέμπονται από τα παραγόμενα μόρια έχουν κορυφές στα μήκη κύματος 510 και 526, για τα σωματίδια HPO , και 394 για το S_2 . Κατάλληλα φίλτρα απομονώνουν τις ζώνες αυτές και η έντασή τους μετράται

φωτομετρικά. Ο FPD μπορεί να ανιχνεύσει και άλλα στοιχεία, εκτός από το φώσφορο και το θείο, όπως αλογόνα, άζωτο και μέταλλα (κασσίτερος, χρώμιο, σελήνιο, γερμάνιο). Ο φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στον προσδιορισμό των οργανοκασσιτερικών ενώσεων.

- *Ανιχνευτής φωτοϊοντισμού (photoionization detector)*. Εδώ το έκλουσμα της στήλης βομβαρδίζεται με υπεριώδη ακτινοβολία η οποία ιονίζει τα μόρια. Κατά μήκος της κυβελίδας μέσα στην οποία δημιουργούνται τα ιόντα, εφαρμόζεται δυναμικό οπότε διέρχεται ιοντικό ρεύμα του οποίου η ένταση μετράται.

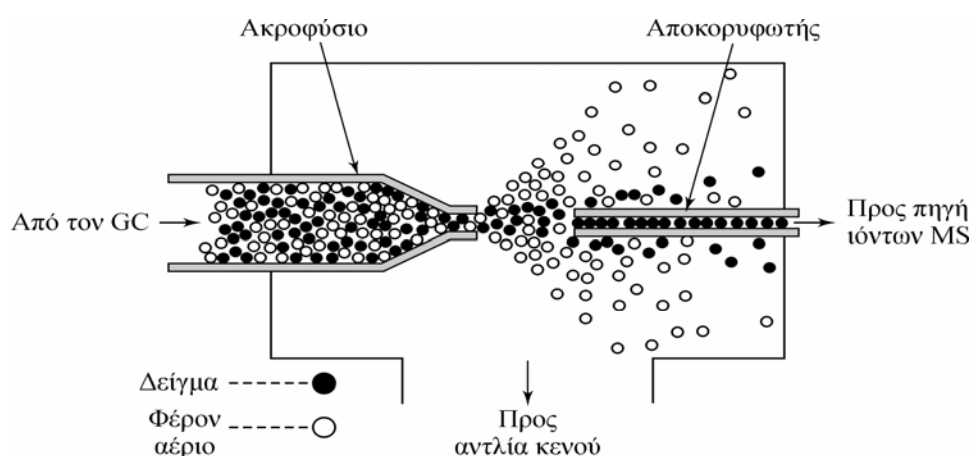
Εκτός από τη χρήση των παραπάνω ανιχνευτών, συμβαίνει συχνά ο αεριοχρωματογράφος να συνδυάζεται με εκλεκτικές φασματοσκοπικές και ηλεκτροχημικές τεχνικές παρέχοντας έτσι τις λεγόμενες συζευγμένες τεχνικές (hyphenated techniques) οι οποίες αποτελούν πανίσχυρα αναλυτικά εργαλεία κατάλληλα για την ποιοτική και ποσοστική ανάλυση πολυσύνθετων δειγμάτων. Σήμερα η σύζευξη του αεριοχρωματογράφου γίνεται συνήθως με:

- *Φασματόμετρο υπερόθρου με μετασχηματισμό Fourier*. Στην περίπτωση αυτή η σύζευξη μεταξύ αεριοχρωματογράφου και ανιχνευτή πραγματοποιείται μέσω ενός φωταγωγού (light pipe) μήκους 10-40 cm ο οποίος συνδέεται με τη στήλη μέσω ενός στενού σωλήνα. Ο φωταγωγός αποτελείται από επιχρυσωμένο εσωτερικά Pyrex σωλήνα και συχνά θερμένεται προς αποφυγήν συμπύκνωσης των συστατικών του δείγματος.
- *Φασματογράφος μαζών (mass spectrometer)*. Ένα τυπικό σύστημα φασματογράφου μαζών παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.9. Η ταχύτητα ροής μέσω των τριχοειδών στηλών είναι γενικά αρκετά μικρή, οπότε το έκλουσμα είναι δυνατόν να εισαχθεί απευθείας στο θάλαμο ιοντισμού του φασματογράφου μαζών. Για πληρωμένες στήλες ή στήλες megabore συχνά απαιτείται ένας *διαχωριστήρας πίδακα* ώστε να απομακρυνθεί το μεγαλύτερη ποσότητα του φέροντος αερίου από την προσδιοριζόμενη ουσία.



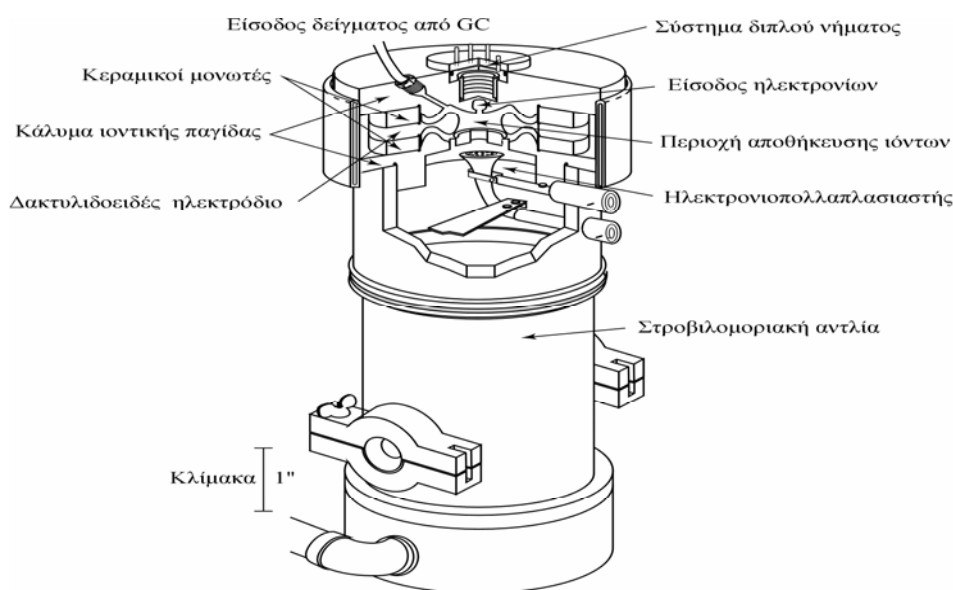
Σχήμα 3.9 Διάγραμμα ενός τυπικού αεριοχρωματογράφου τριχοειδούς στήλης συζευγμένου με φασματογράφο μαζών (GS/MS).

Στο διαχωριστή πίδακα, το έκλουσμα από την έξοδο της στήλης οδηγείται μέσω του ακροφυσίου του υάλινου διαχωριστήρα πίδακα όπου αυξάνει η ορμή των μορίων των προσδιοριζόμενων ουσιών με αποτέλεσμα το 50 % (ή και περισσότερο) των μορίων να εισέρχεται κατευθείαν στον αποκορυφωτή (skimmer) (Σχήμα 3.10). Αντίθετα τα ελαφρύτερα άτομα του φέροντος αερίου υπό την επίδραση κενού αποκλίνουν και με άντληση απομακρύνονται μάζα προς φορτίο (m/z).



Σχήμα 3.10 Σχηματικό διάγραμμα διαχωριστή πίδακα.

Ο απλούστερος ανιχνευτής μαζών είναι ο *ανιχνευτής ιοντικής παγίδας* (ion trap detector) (Σχήμα 3.11). Στον ανιχνευτή αυτού του τύπου τα ιόντα από τις εκλούμενες ουσίες που δημιουργούνται με πρόσκρουση ηλεκτρονίων ή με χημικό ιοντισμό παγιδεύονται σε ένα πεδίο ραδιοσυχνότητας. Η μεταφορά των ιόντων από το χώρο αποθήκευσης στον ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή γίνεται με ελεγχόμενη εκτίναξη ώστε να είναι δυνατή η σάρωσή τους ως προς το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z).



Σχήμα 3.11 Ανιχνευτής ιοντικής παγίδας.

Σημαντικό πλεονέκτημα των ανιχνευτών ιοντικής παγίδας είναι η ικανότητά τους να λειτουργήσουν ως συζευγμένο (tandem) σύστημα φασματομετρίας μαζών. Αυτό σημαίνει ότι κάθε θραύσμα της προσδιοριζόμενης ουσίας, μετά το διαχωρισμό της από τα υπόλοιπα θραύσματα, είναι δυνατόν να υποστεί νέα θραυσματοποίηση, διαχωρισμό των παραγόμενων θραυσμάτων κατά m/z και ανάλυση (March and Todds, 1995).

Ένας άλλος τύπος ανιχνευτή μαζών είναι ο *ανιχνευτής τετραπόλου* (quadrupole detector). Ο ανιχνευτής αυτός αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ράβδους οι οποίες συνδέονται με πηγή συνεχούς και εναλλασσόμενου ρεύματος. Όταν τα ιόντα εισέρχονται στο πεδίο που δημιουργείται ανάμεσα στις ράβδους, πραγματοποιείται εκτροπή από την τροχιά τους με

εξάιρεση τα ιόντα κατάλληλου m/z των οποίων η τροχιά παραμένει ευθεία και είναι αυτά τα οποία τελικά ανιχνεύονται (Dawson, 1995).

3.7.2 Χρωματογραφία αερίου-στερεού

Η χρωματογραφία αερίου-στερεού βασίζεται στη μερική και εκλεκτική προσρόφηση των υπό εξέταση ουσιών πάνω σε μια στερεή επιφάνεια στα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης.

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι πληρωμένες ή ανοικτού σωλήνα.. Στην περίπτωση των στηλών ανοικτού σωλήνα μια λεπτή στοιβάδα προσροφητή προσφύεται στα εσωτερικά τοιχώματα του τριχοειδούς και οι στήλες καλούνται πλέον στήλες ανοικτού σωλήνα με πορώδη στοιβάδα (porous layer open tubular columns, PLOT). Οι προσροφητές που χρησιμοποιούνται είναι τα μοριακά κόσκινα (αργιλλοπυριτικοί ιονταλλάκτες) και τα πορώδη πολυμερή (στυρένιο-διβινυλοβενζολιο) (Skoog et al., 2002).

3.8 Προσδιορισμός βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων σε περιβαλλοντικά δείγματα

Σύμφωνα με την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας διάφορες μέθοδοι απομόνωσης και προσδιορισμού των εξεταζόμενων ουσιών σε περιβαλλοντικά δείγματα έχουν κατά καιρούς αναπτυχθεί.

Από τα υδατικά δείγματα οι ουσίες έχουν απομονωθεί σε ποσοστό > 90% είτε με υγρή/υγρή εκχύλιση (Voulvoulis et al., 1999b; Hall et al., 2004) είτε με εκχύλιση στερεής φάσης (Thomas, 1998; Ferrer and Barcelo 1999; Bowman et al., 2003). Ο διαλύτης που κατά κόρον χρησιμοποιείται στην υγρή/υγρή εκχύλιση είναι το διχλωρομεθάνιο (Liu et al., 1999; Sargent et al., 2000; Hall et Gardinali et al., 2004) ενώ οι φύσιγγες C18 αποτελούν το πιο διαδεδομένο προσροφητικό υλικό κατά την εκχύλιση στερεής φάσης. Από τις δύο τεχνικές η ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η εκχύλιση στερεής φάσης χάρις τα πλεονεκτήματα που εμφανίζει σε σχέση με την υγρή/υγρή εκχύλιση, ενώ και η μικροεκχύλιση στερεής φάσης έχει αναφερθεί για την απομόνωση του irgarol 1051 από υδατικά δείγματα (Peñalver et al., 1999; Lambropoulou et al., 2002).

Ανοσοχημικές μέθοδοι επίσης έχουν εφαρμοστεί για την εκχύλιση του irgarol 1051 από το θαλασσινό νερό, με περισσότερο χρησιμοποιούμενη την τεχνική ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Ballesteros et al., 1997; Penalva et al., 1999; Carrasco et al., 2001). Αυτές οι μέθοδοι μπορεί να χαρακτηρίζονται από χαμηλό κόστος, ευαισθησία και

εκλεκτικότητα, να επιτρέπουν την ταυτόχρονη, άμεση και γρήγορη ανάλυση πολλών ανεπεξέργαστων δειγμάτων χωρίς καν ρύθμιση της τιμής του pH (συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 7,5 και 8) (Sherry, 1992; Gonzalez-Martinez et al., 1998; Ballesteros et al., 1998) όμως δεν έχουν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ ουσιών της ίδιας χημικής κατηγορίας. Στην περίπτωση που ένα δείγμα βρεθεί θετικό ως προς μια χημική ουσία με την μέθοδο ELISA, θα πρέπει να γίνει επιβεβαίωση της παρουσίας της με κάποια χρωματογραφική μέθοδο (Penalva et al., 1999).

Όσον αφορά την απομόνωση των εξεταζόμενων ουσιών από το ίζημα μέθοδοι έχουν κυρίως αναπτυχθεί για το irgarol 1051 και κάποιες για το diuron και οι τεχνικές που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η εκχύλιση με μηχανική ανάδευση (Tóth et al., 1996; Voulvoulis et al., 1999b) και η εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Martinez and Barceló, 2001; Ferrer and Barceló, 2001), ενώ συχνά αναφέρεται και συνδυασμός των δύο παραπάνω (Albanis et al., 2002; Thomas, 2002). Το irgarol 1051 έχει επίσης απομονωθεί και με τεχνικές όπως είναι η εκχύλιση υπερκρίσιμου υγρού (Carrasco et al., 2003) και η Soxhlet εκχύλιση (Biselli et al., 2000). Η απομόνωση των ουσιών με μηχανική ανάδευση και χρήση υπερήχων πλεονεκτούν έναντι των άλλων τεχνικών διότι εκτός των άλλων μπορούν να επιτευχθούν ικανοποιητικές ανακτήσεις (> 85 %) εκχυλίζοντας μικρή ποσότητα ιζήματος (έως και 2 g). Σε κάθε περίπτωση όμως οι ποσότητες των οργανικών διαλυτών που απαιτούνται είναι αρκετά μεγάλες έως και 100 mL για κάθε δείγμα.

Ο ποιοτικός και ποσοστικός προσδιορισμός των ουσιών στα δείγματα πραγματοποιείται χρωματογραφικά είτε με αεριοχρωματογραφία (Lambropoulou et al., 2002; Carrasco et al., 2003; Hall et al., 2004) είτε με υγροχρωματογραφία (Boxall et al., 2000; Thomas et al., 2002; Okamura et al., 2003). Η χρήση αεριοχρωματογραφίας πλεονεκτεί καθώς χαμηλότερα όρια ανίχνευσης των ουσιών μπορούν να επιτευχθούν, ακόμα και μια τάξη μεγέθους μικρότερα (Toth et al., 1996) σε σχέση με την υγροχρωματογραφία, όμως μειωνεκτούν διότι συχνά απαιτείται παραγωγοποίηση των ουσιών όπως είναι οι ουρίες (Voulvoulis et al., 1999b) διότι είναι ασταθείς στις υψηλές θερμοκρασίες (Liska and Slobodnik, 1996).

Η ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας έδειξε ότι οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί αφορούν κυρίως στον προσδιορισμό των αρχικών ουσιών (irgarol 1051 και diuron), ενώ κάποιες αναφέρονται και στο μεταβολίτη του irgarol 1051, M1. Τα δεδομένα για τους μεταβολίτες του diuron DCPMU και DCPU είναι πολύ περιορισμένα, ενώ για τη DCA τα στοιχεία που αφορούν στον προσδιορισμό της ουσίας στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι ελλιπή. Παρ' όλες τις μελέτες που

έχουν γίνει πουθενά στη βιβλιογραφία δεν αναφέρεται μια μέθοδος ανάλυσης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των παραπάνω έξι ουσιών τόσο στο νερό όσο και στο ίζημα, η οποία θα μείωνε και το συνολικό χρόνο ανάλυσης. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι ουσίες αυτές είναι επίσης τοξικές αναδεικνύεται η ανάγκη για συνεχή έρευνα ώστε νέες, απλές, γρήγορες και αποτελεσματικές μέθοδοι να αναπτυχθούν για τον προσδιορισμό των ουσιών στο περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΡΧΕΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

4.1 Εισαγωγή

Υδατική τοξικολογία καλείται η ποιοτική και ποσοτική μελέτη των δυσμενών επιπτώσεων των χημικών ουσιών, αλλά και άλλων ανθρωπογενών υλικών, πάνω στους υδρόβιους οργανισμούς ενώ παράλληλα προβλέπει και τις συγκεντρώσεις των ρύπων που αναμένονται στο υδατικό περιβάλλον (νερό, ίζημα, οργανισμοί). Επομένως περιλαμβάνει και τη μελέτη της τύχης και συμπεριφοράς των ουσιών στο περιβάλλον (Rand and Petrocelli, 1985).

Η τοξική επίδραση μιας ουσίας πάνω σε έναν οργανισμό μπορεί να είναι θανατηφόρα ή σχεδόν θανατηφόρα που σημαίνει ότι στον εκτιθέμενο οργανισμό συμβαίνουν αλλαγές που επηρεάζουν την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, τη φυσιολογία, τη βιοχημεία και τη συμπεριφορά του γενικότερα (Rand and Petrocelli, 1985). Η μελέτη τοξικότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί σε επίπεδο κυττάρου ενός οργανισμού, μεμονωμένου οργανισμού, πληθυσμού ακόμα και ολόκληρης κοινωνίας οργανισμών (Adams and Rowland, 2003).

4.2 Επιλογή κατάλληλου οργανισμού

Η επιλογή του κατάλληλου οργανισμού για τη διεξαγωγή μιας δοκιμής τοξικότητας αποτελεί τη βασικότερη παράμετρο του πειράματος. Η επιλογή θα πρέπει να γίνεται με γνώμονα την οικολογική σημασία και την αφθονία του οργανισμού καθώς και την ευκολία και την ταχύτητα ανάπτυξής του στο εργαστήριο.

Γενικότερα ένας οργανισμός για να χρησιμοποιηθεί σε δοκιμές τοξικότητας θα πρέπει να πληρεί όσο το δυνατόν περισσότερα από τα παρακάτω κριτήρια (Rand and Petrocelli, 1985; Walsh, 1988):

- Ευρεία γεωγραφική κατανομή και ευρύ φάσμα ευαισθησίας
- Να βρίσκεται σε αφθονία
- οι θρεπτικές απαιτήσεις για τη σωστή ανάπτυξη του να είναι πλήρως γνωστές
- να είναι γνωστή η ταξινόμική του ταυτότητα
- να παρουσιάζει μικρή γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία

- να αναπτύσσεται γρήγορα
- να είναι εύκολος στους χειρισμούς
- αν είναι δυνατόν να είναι ενδογενής και να χαρακτηρίζει το οικοσύστημα της περιοχής που δέχεται την επίδραση της τοξικής ουσίας
- να είναι σημαντικός από οικολογική, οικονομική ή άλλη άποψη

Σε διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα προτείνονται διαφορετικά είδη οργανισμών είτε του γλυκού είτε του θαλασσινού νερού τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις δοκιμές τοξικότητας (OECD 1981; ASTM 1993).

4.3 Δοκιμές τοξικότητας

Η θεμελιώδης αρχή πάνω στην οποία βασίζονται όλες οι δοκιμές τοξικότητας είναι η διαπίστωση ότι καμία χημική ουσία δεν είναι απολύτως επικίνδυνη και καμία χημική ουσία δεν είναι απολύτως ασφαλής. Αν μια ουσία είναι επιβλαβής ή ασφαλής για έναν οργανισμό, αυτό εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας στην οποία εκτίθεται ο οργανισμός και από τη διάρκεια της έκθεσης σε αυτή (Rand and Petrocelli, 1985; Adams and Rowland, 2003).

Μια δοκιμή τοξικότητας για να θεωρηθεί κατάλληλη και να γίνει αποδεκτή ευρύτερα θα πρέπει να πληρεί τα εξής κριτήρια (Rand and Petrocelli, 1985):

- Ευρεία αποδοχή από την επιστημονική κοινότητα
- Μικρό κόστος και ευκολία χειρισμών
- Μεγάλη ευαισθησία και απήχηση σε όσο το δυνατόν πραγματικές συνθήκες
- Όσο το δυνατόν πιο ρεαλιστικό σχεδιασμό
- Ικανότητα πρόβλεψης των επιπτώσεων ευρέου φάσματος ουσιών σε διαφορετικούς οργανισμούς
- Περιγραφή επιπτώσεων ευρέου φάσματος συγκεντρώσεων για ρεαλιστικούς χρόνους έκθεσης
- Δυνατότητα επανάληψης σε διαφορετικά εργαστήρια με παρόμοια αποτελέσματα
- Παροχή αποτελεσμάτων τα οποία μπορούν να ποσοτικοποιηθούν (π.χ. μέσω στατιστικής ανάλυσης ή γραφικών παρεμβολών)
- Παροχή αποτελεσμάτων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της επικινδυνότητας (risk assessment)

Γενικότερα η διεξαγωγή των δοκιμών τοξικότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί, είτε στο εργαστήριο κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, είτε στο πεδίο (in situ).

Στο εργαστήριο η διεξαγωγή των δοκιμών πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση ενός μόνο είδους. Τα πειράματα αυτά προσφέρουν σημαντική πληροφορία για τις συγκεντρώσεις και τους χρόνους έκθεσης που προκαλούν θνησιμότητα, μεταβολές στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, τη συμπεριφορά, τη φυσιολογία και τη βιοχημεία των οργανισμών. Είναι εύκολο να εδραιωθούν σχέσεις αιτίας-αποτελέσματος, επειδή οι συνθήκες είναι ελεγχόμενες και επιπλέον τα πειράματα πραγματοποιούνται εύκολα και δίνουν επαναλήψιμα αποτελέσματα. Το σημαντικότερο μειονέκτημά τους είναι ότι οι τοξικές δράσεις που παρατηρούνται στο εργαστήριο, μπορεί να μην συμβαίνουν κατά τον ίδιο τρόπο και στον ίδιο βαθμό στο φυσικό περιβάλλον διότι δεν λαμβάνονται υπόψη οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων των φυσικών οικοσυστημάτων (Rand and Petrocelli, 1985).

Όταν για τη μελέτη της επίδρασης μιας χημικής ουσίας χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα πολλά διαφορετικά είδη τότε τα συστήματα καλούνται *εργαστηριακοί μικρόκοσμοι*. Για τη δημιουργία τους μεταφέρεται μέσα σε περικλειστα γυάλινα ή πλαστικά δοχεία μέρος ενός φυσικού οικοσυστήματος (νερό, ίζημα, ασπόνδυλα ή/ και ψάρια) και εκεί αναπτύσσεται. Το πλεονέκτημα της χρήσης εργαστηριακών μικρόκοσμων είναι ότι παρέχουν πληροφορία που μπορεί να συνδεθεί με τις οικολογικές επιδράσεις μιας χημικής ουσίας. Αν οι συνθήκες είναι ομογενείς, μπορεί να πιστοποιηθούν και να επαναληφθούν. Οι σχέσεις αιτίας-αποτελέσματος είναι σχετικά εύκολο να αναλυθούν διότι οι περιβαλλοντικές επιδράσεις ελέγχονται. Το μειονέκτημα τους είναι ότι δεν λαμβάνουν υπόψη τις μεταβαλλόμενες συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος, ενώ δεν περιλαμβάνουν σημαντικά βιοτικά στοιχεία του φυσικού περιβάλλοντος όπως οι εισβολείς (Rand and Petrocelli, 1985).

Τέλος, οι δοκιμές τοξικότητας που διεξάγονται *στο πεδίο*, μπορεί να περιλαμβάνουν τεχνητές μικρές λίμνες ή χείμαρρους. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση των εργαστηριακών πειραμάτων και των μαθηματικών μοντέλων. Επειδή όμως οι συνθήκες στο πεδίο δεν ελέγχονται είναι δύσκολο να αποδοθούν σχέσεις αιτίας-αποτελέσματος και να υπάρξουν επαναλήψεις των πειραμάτων (Rand and Petrocelli, 1985).

Ανάλογα με το χρόνο έκθεσης οι δοκιμές τοξικότητας ταξινομούνται σε δοκιμές βραχυπρόθεσμες ή οξείες και μακροπρόθεσμες ή χρόνιες δοκιμές. Στην πρώτη περίπτωση γίνεται προσπάθεια εκτίμησης της βιωσιμότητας ενός οργανισμού ανάλογα με τη συγκέντρωση της

ουσίας στην οποία εκτίθεται και το χρόνο έκθεσης, ενώ στη δεύτερη μελετώνται οι επιπτώσεις της ουσίας πάνω στην ανάπτυξη του οργανισμού, τις λειτουργίες του και τη συμπεριφορά του γενικότερα.

4.3.1 Δοκιμές οξείας τοξικότητας (acute toxicity tests)

Πρόκειται για βραχυπρόθεσμες δοκιμές που στοχεύουν στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μιας ουσίας ή του επιπέδου ενός παράγοντα (π.χ. θερμοκρασία ή pH) που προκαλεί επιβλαβή επίπτωση σε μια ομάδα οργανισμών κατά τη διάρκεια μικρής έκθεσής τους στην ουσία (ή τον παράγοντα) και κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (Rand and Petrocelli, 1985).

Το κριτήριο ώστε να θεωρηθεί η επίπτωση της εξεταζόμενης ουσίας πάνω στον εκτιθέμενο οργανισμό επιβλαβής εξαρτάται από τον ίδιο τον οργανισμό και μπορεί να είναι στην περίπτωση των ψαριών η πρόκληση θανάτου, στην περίπτωση των ασπόνδυλων η πρόκληση ακινησίας ή η απώλεια ισορροπίας και στην περίπτωση των φυκών η μείωση της ανάπτυξής τους (Rand and Petrocelli, 1985).

Οι δοκιμές οξείας τοξικότητας μπορεί να διεξαχθούν για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ώστε να εκτιμηθεί η 24- ή 96- h LC₅₀ ή η 48- h EC₅₀. Στην περίπτωση αυτή η δοκιμή είναι χρονοεξαρτώμενη (time-dependent test). Όταν όμως η δοκιμή συνεχίζεται μέχρις ότου οικονομικοί ή άλλοι παράμετροι επιβάλλουν τη διακοπή της τότε καλείται χρονοανεξάρτητη (time-independent test) και διαρκεί συνήθως 7-14 ημέρες (Rand and Petrocelli, 1985).

4.3.2 Δοκιμές υποχρόνιας τοξικότητας (sub-chronic ή early life stage toxicity tests)

Πρόκειται για δοκιμές των οποίων η διάρκεια κυμαίνεται συνήθως μερικούς μήνες και στις οποίες εξετάζονται οι δυσμενείς επιπτώσεις μιας χημικής ουσίας πάνω σε έναν οργανισμό όταν αυτός βρίσκεται στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του. Στις υποχρόνιες δοκιμές ο εκτιθέμενος οργανισμός ποτέ δεν συμπληρώνει έναν πλήρη αναπαραγωγικό κύκλο ζωής (Rand and Petrocelli, 1985).

4.3.3 Δοκιμές χρόνιας τοξικότητας (chronic toxicity tests)

Οι δοκιμές αυτές έχουν ως στόχο την εκτίμηση των επιπτώσεων της συγκέντρωσης μιας ουσίας ή του επιπέδου ενός παράγοντα κατά τη διάρκεια ενός σημαντικού σταδίου της ζωής του

εκτιθέμενου οργανισμού. Συνήθως έχουν διάρκεια ίση με το 1/10 του κύκλου ζωής του οργανισμού και με τη βοήθειά τους εκτιμώνται οι επιπτώσεις της εξεταζόμενης ουσίας στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και τη συμπεριφορά του οργανισμού (Adams and Rowland, 2003).

Στις δοκιμές χρόνιας τοξικότητας όλα τα στάδια της ζωής ενός οργανισμού (π.χ. έμβρυα στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους, πρόσφατα εκκολαπτόμενες προνύμφες) εκτείνονται σε διάφορα επίπεδα της εξεταζόμενης ουσίας (Petrocelli, 1985).

Η διάρκεια των δοκιμών χρόνιας τοξικότητας είναι τόση όση χρειάζεται ώστε ο οργανισμός αναφοράς (οργανισμός ο οποίος δεν εκτίθεται στην εξεταζόμενη ουσία και χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισης) να μεγαλώσει, να αναπτυχθεί, να ωριμάσει και να δώσει απογόνους για πρώτη φορά (First filial generation, F1) (Petrocelli, 1985).

Το κριτήριο για την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με τη χρόνια τοξικότητα μιας ουσίας εξαρτάται και εδώ από το είδος του εκτιθέμενου οργανισμού και μπορεί να περιλαμβάνει τον αριθμό των εμβρύων που φυσιολογικά και πλήρως αναπτύσσονται, τον αριθμό των προνυμφών (larvae) και των ανήλικων ατόμων (juveniles) που επιβιώνουν και αναπτύσσονται φυσιολογικά, τον αριθμό των αυγών που επιβιώνουν και κατά συνέπεια τον αριθμό των ατόμων πρώτης γενιάς (F1) που παράγονται, επιβιώνουν και αναπτύσσονται για καθορισμένο χρονικό διάστημα (Petrocelli, 1985).

4.3.4 Δοκιμές βιοσυγκέντρωσης

Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιούνται ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωση της χημικής ουσίας που μπορεί να συσσωρευτεί σε έναν οργανισμό και είναι δυνατόν, μέσω της τροφικής αλυσίδας, να καταλήξει σε ανώτερους οργανισμούς ακόμα και στον άνθρωπο. Η μέτρηση του βαθμού βιοσυγκέντρωσης μιας ουσίας επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης (BCF). Στην περίπτωση των μη πολικών ουσιών ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης μπορεί να υπολογιστεί βάσει του συντελεστή οκτανόλης/νερού (K_{ow}) της ουσίας αφού η οκτανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο των λιπιδιακών ιστών ενός οργανισμού (Adams and Rowland, 2003). Οι Veinith et al. (1979) βρήκαν ότι για 84 ουσίες υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης σε ψάρι και του συντελεστή οκτανόλης/ νερού των ουσιών. Η εξίσωση που συνδέει τους δύο συντελεστές είναι:

$$\log BCF = 0,76 \log K_{ow} - 0,23 \quad (4.1)$$

Με την παραπάνω σχέση μπορεί να εκτιμηθεί με μεγάλη ακρίβεια ο συντελεστής βιοσυγκέντρωσης των δύσκολα βιοαποδομίσιμων ουσιών όχι όμως και αυτών που διασπώνται εύκολα καθώς οι τελευταίες εξαιτίας του αυξημένου ρυθμού εξάλειψής τους παρουσιάζουν μικρότερο BCF από αυτόν που υπολογίζεται βάσει της σχέσης 4.1 (Spacie and Hamelink, 1985).

Η διάρκεια των δοκιμών βιοσυγκέντρωσης για ουσίες με μικρό συντελεστή οκτανόλης/νερού είναι 28 ημέρες διότι το διάστημα αυτό είναι για τις περισσότερες ουσίες αρκετό ώστε να φτάσουν σε σταθερή κατάσταση (steady state), όπου δεν αυξάνεται πλέον το επίπεδο συγκέντρωσης της ουσίας στους ιστούς του οργανισμού και ο ρυθμός πρόσληψης (uptake) της ουσίας ισούται με το ρυθμό εξάλειψής (depuration) της. Για ουσίες με μεγάλο συντελεστή οκτανόλης / νερού η ακριβής διάρκεια της δοκιμής βιοσυγκέντρωσης προσδιορίζεται με βάση την παρακάτω σχέση (Adams and Rowland, 2003):

$$S = \frac{\{\ln[1/(1,00 - 0,95)]\}}{k_2} \quad (4.2)$$

ή

$$S = \frac{3,0}{k_2} \quad (4.3)$$

όπου:

S = διάρκεια σε ημέρες

k_2 = σταθερά εξάλειψης πρώτης τάξης (ημέρες⁻¹)

Η σταθερά k_2 στην περίπτωση που ο εξεταζόμενος οργανισμός είναι ψάρι υπολογίζεται ως αντιλογάριθμος σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$k_2 = 1,47 - 0,414 \log K_{ow} \quad (4.4)$$

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο συντελεστής οκτανόλης/νερού δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του συντελεστή βιοσυγκέντρωσης των μετάλλων, των πολικών

και των ιοντικών ουσιών διότι δεν υφίσταται συσσώρευση των ουσιών αυτών στην οκτανόλη (Adams and Rowland, 2003).

4.3.5 Δοκιμές τοξικότητας ίζηματος

Κατά τις δοκιμές αυτές εξετάζεται η τοξικότητα των ουσιών οι οποίες είναι συνδεδεμένες (προσροφημένες ή απορροφημένες) με το ίζημα. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ο χρόνος παραμονής των ουσιών στο περιβάλλον αυξάνεται όταν αυτές είναι προσροφημένες στο ίζημα αλλά και ότι το ρυπασμένο ίζημα αποτελεί σημαντική, μακράς διάρκειας πηγή ρύπανσης εξαιτίας της απελευθέρωσης των ουσιών ξανά στο περιβάλλον (Fent, 2004; Thomas et al., 2003) τότε καθίσταται σαφές ότι οι δοκιμές αυτού του είδους είναι άκρως αναγκαίες για την ολοκληρωμένη μελέτη της τοξικής συμπεριφοράς μιας ουσίας στο περιβάλλον.

4.4 Συστήματα έκθεσης

Κατά τη διάρκεια των δοκιμών τοξικότητας η έκθεση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τέσσερις διαφορετικές τεχνικές (Adams and Rowland, 2003; Rand and Petrocelli, 1985):

- *Στατική δοκιμή τοξικότητας* όπου το νερό στο θάλαμο της δοκιμής φορτίζεται με την επιθυμητή συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας και στη συνέχεια τοποθετούνται οι οργανισμοί. Καθόλη τη διάρκεια της δοκιμής το νερό παραμένει ακίνητο δηλαδή δεν πραγματοποιείται καμία απολύτως ανανέωση.
- *Δοκιμή ανακυκλοφορίας*. Η δοκιμή αυτή είναι παρόμοια με τη στατική δοκιμή τοξικότητας με τη διαφορά ότι το νερό αντλείται από το θάλαμο, διηθείται και επιστρέφεται σε αυτόν χωρίς να μεταβληθεί η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας.
- *Ανανεώσιμη δοκιμή τοξικότητας*. Επίσης είναι παρόμοια με τη στατική δοκιμή τοξικότητας, διότι πραγματοποιείται σε ακίνητο νερό, όμως σε τακτά χρονικά διαστήματα ανανεώνεται η συγκέντρωση της εξεταζόμενης ουσίας
- *Δοκιμή τοξικότητας συνεχούς ροής*. Στην περίπτωση αυτή ενώ οι οργανισμοί παραμένουν μέσα στο θάλαμο δοκιμής το νερό διαρκώς ανανεώνεται με την εισαγωγή φρέσκου νερού και την απομάκρυνση του παλιού. Η ανανέωση μπορεί να είναι είτε διακοπτόμενη, είτε συνεχής.

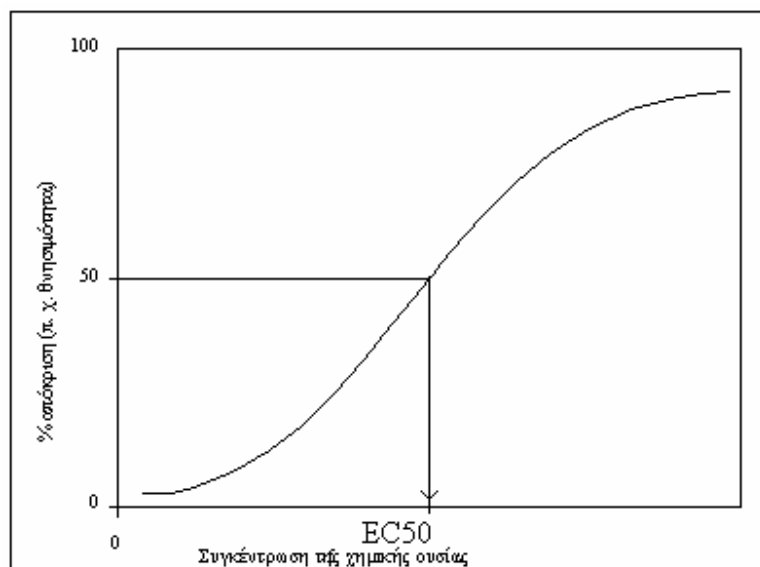
Οι περισσότερες χρησιμοποιούμενες δοκιμές είναι η στατική και η συνεχούς ροής και κυρίως η στατική η οποία όμως παρόλο το χαμηλό κόστος και τους εύκολους χειρισμούς της μειονεκτεί διότι (Rand and Petrocelli, 1985):

- Η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να είναι πτητική, να αποδομείται ή να προσροφάται στα τοιχώματα του θαλάμου δοκιμής με αποτέλεσμα οι οργανισμοί με την πάροδο του χρόνου να εκτίθενται σε χαμηλότερη συγκέντρωση της ουσίας από την επιθυμητή,
- Η εξεταζόμενη ουσία μπορεί να έχει υψηλή βιοχημική απαίτηση σε οξυγόνο (BOD). Αυτό συνεπάγεται μείωση του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό γεγονός που από μόνο του επηρεάζει τους οργανισμούς. Στην περίπτωση αυτή δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα για την τοξικότητα της ουσίας,
- Τυχόν μεταβολισμός της εξεταζόμενης ουσίας από τους ίδιους τους οργανισμούς επίσης είναι δυνατόν να αλλοιώσει τα αποτελέσματα καθώς μπορεί να παραχθούν ουσίες οι οποίες σε συνδυασμό με την αρχική να έχουν εντελώς διαφορετική δράση από ότι θα είχε η εξεταζόμενη ουσία από μόνη της.

4.5 Καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης

Η τοξική δράση μιας ουσίας, περιγράφεται με την σχέση *συγκέντρωσης-απόκρισης*, στην οποία συσχετίζεται η συγκέντρωση της χημικής ουσίας με την προκαλούμενη απόκριση (ποσοστό θανάτου, μείωσης στον ρυθμό ανάπτυξης κλπ). Για κάποιο εύρος συγκεντρώσεων, όσο η συγκέντρωση της χημικής ουσίας αυξάνει, τόσο αυξάνει η τοξική της δράση. Η καμπύλη (Σχήμα 4.1) που περιγράφει τη σχέση συγκέντρωσης-απόκρισης είναι γενικά ασυμπτωτική στον άξονα των συγκεντρώσεων (σιγμοειδής), καθώς κάτω από κάποιο κατώφλι συγκέντρωσης η ουσία δεν εμφανίζει μετρήσιμη τοξική δράση, ενώ πάνω από κάποια τιμή, οι περισσότεροι ή όλοι οι οργανισμοί έχουν υποστεί την δυσμενή επίδραση της ουσίας. Το μεσαίο τμήμα της καμπύλης, στην περιοχή μεταξύ 16 % και 84 %, είναι γραμμικό. Όσο μεγαλύτερη είναι η κλίση του κεντρικού τμήματος της καμπύλης τόσο εντονότερη είναι η απόκριση για το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων.

Η σχέση συγκέντρωσης - απόκρισης είναι μια βασική έννοια που υποδηλώνει ότι υπάρχει ένα συγκεκριμένο κατώφλι συγκέντρωσης κάτω από το οποίο, υπό καθορισμένες συνθήκες, δεν υπάρχει δυσμενής επίδραση της ουσίας στον οργανισμό. Η σχέση αυτή είναι απαραίτητο να συνοδεύεται και από τη διάρκεια έκθεσης του οργανισμού.



Σχήμα 4.1 Τυπική μορφή της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης.

4.6 Σημεία λήξης δοκιμών (End points)

Στις δοκιμές τοξικότητας τα σημεία λήξης αφορούν τιμές οι οποίες προκύπτουν από τα αποτελέσματα ή από συγκεκριμένες μετρήσεις που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της δοκιμής και σηματοδοτούν τη λήξη της δοκιμής. Γενικότερα υπάρχουν δύο ευρέως χρησιμοποιούμενες κατηγορίες σημείων λήξης: τα σημεία λήξης που σχετίζονται με την εκτίμηση της τοξικότητας μιας ουσίας (assessment endpoints) και τα σημεία λήξης που στηρίζονται στη μέτρηση της επίδρασης (measures of effect) της ουσίας. Τα σημεία λήξης που σχετίζονται με την εκτίμηση της τοξικότητας, αναφέρονται σε παραμέτρους που σχετίζονται με έναν ολόκληρο πληθυσμό, μια κοινωνία ή ολόκληρο το οικοσύστημα (π.χ. ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού), το οποίο επιθυμείται να προστατευτεί. Αντίθετα η μέτρηση της επίδρασης της ουσίας αναφέρεται σε μέτρηση κάποιων μεταβλητών, οι οποίες στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των εκτίμησης σημείων λήξης. Συνήθως επιλέγονται και μετρώνται μεταβλητές οι οποίες περιγράφουν την τοξική επίδραση μιας ουσίας πάνω στην επιβίωση, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή μεμονωμένων ειδών. Στην περίπτωση που οι μετρήσεις είναι πολύ συγκεκριμένες επιτρέπεται η περιγραφή δυσμενών επιπτώσεων της ουσίας πάνω σε

συγκεκριμένες βασικές λειτουργίες των οργανισμών όπως είναι η αναπνοή και η φωτοσύνθεση (Adams and Rowland, 2003).

Τόσο στις δοκιμές οξείας τοξικότητας όσο και στις δοκιμές χρόνιας τοξικότητας τα σημεία λήξης περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό της LC_{50} και της EC_{50} . LC_{50} (Median Lethal Concentration) είναι η συγκέντρωση της χημικής ουσίας η οποία θανατώνει το 50% των εκτιθέμενων οργανισμών, ενώ EC_{50} (Median Effective Concentration), ή αλλιώς IC_{50} (inhibition concentration) (Walsh, 1988), είναι η συγκέντρωση της χημικής ουσίας που μειώνει ή αναχαιτίζει κατά 50 % τη μετρούμενη παράμετρο (ανάπτυξη, αναπνοή, κ.ο.κ.). Οι LC_{50} και EC_{50} εκτιμώνται γραφικά από την καμπύλη συγκέντρωσης-απόκρισης (Σχήμα 4.1) ή με χρήση στατιστικών μεθόδων για το κεντρικό τμήμα της καμπύλης συγκέντρωσης-απόκρισης.

Άλλα σημεία λήξης αναφέρονται στον προσδιορισμό της υψηλότερης συγκέντρωσης της χημικής ουσίας η οποία δεν είναι επιβλαβής σε σχέση με την καλλιέργεια αναφοράς (NOEC - no observed effect concentration) ή στον προσδιορισμό της χαμηλότερης συγκέντρωσης της χημικής ουσίας η οποία επιφέρει δυσμενή επίπτωση σε σχέση με την καλλιέργεια αναφοράς (LOEC - lowest observed effect concentration) (Adams and Rowland, 2003).

Επίσης μπορεί να υπολογιστεί η φυκοστατική (algistatic) συγκέντρωση, η οποία προκαλεί στασιμότητα στους κυτταρικούς αριθμούς κατά την διάρκεια της έκθεσης, αλλά επανέρχονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης όταν μεταφερθούν σε μέσο ανάπτυξης χωρίς την τοξική ουσία ή η φυκοκτόνος (algicidal) συγκέντρωση η οποία σκοτώνει τα κύτταρα χωρίς να μπορούν να επανέλθουν στην προηγούμενη κατάσταση (Rand and Petrocelli, 1985).

4.7 Πρότυπες μέθοδοι δοκιμών

Οι πρότυπες μέθοδοι δοκιμών που χρησιμοποιούνται σήμερα έχουν αναπτυχθεί από διάφορους οργανισμούς όπως:

- την Αμερικάνικη Ένωση Δημόσιας Υγείας (American Public Health Association-APHA),
- τη Διεύθυνση Περιβαλλοντικής Προστασίας των ΗΠΑ (U.S. Environmental Protection Agency-U.S.EPA),
- την Αμερικάνικη Εταιρεία Δοκιμών και Υλικών (American Society for Testing and Materials-ASTM),

- τον Οργανισμό για Οικονομική Συνεργασία και Ανάπτυξη (Organization for Economic Cooperation and Development-OECD) από το Διεθνή Οργανισμό για Πιστοποίηση (International Organization for Standardization – ISO)
- το Πρόγραμμα για το Περιβάλλον των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environment Program-UNEP).

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης πρότυπων μεθόδων για την εκτίμηση των δυσμενών επιπτώσεων των διαφόρων ουσιών στους οργανισμούς είναι (Rand and Petrocelli, 1985):

- Η δυνατότητα χρήσης μιας συγκεκριμένης μεθόδου από διάφορα εργαστήρια
- Η ευκολότερη σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων
- Η μεγαλύτερη αποδοχή των δημοσιευμένων αποτελεσμάτων
- Η αύξηση της ακρίβειας των αποτελεσμάτων
- Η δυνατότητα επανάληψης μιας δοκιμής
- Η νομική αποδοχή της μεθόδου

Παρόλο που η χρήση πρότυπων μεθόδων με πρότυπες χημικές ουσίες και οργανισμούς θεωρητικά μεγιστοποιεί την αξιοπιστία, την επαναληψιμότητα και τη δυνατότητα σύγκρισης, υπάρχει ο κίνδυνος της «υπερ-πιστοποίησης» διότι με τη χρήση τους κάποιες φορές *«αποθαρρύνεται η καινοτομία»*. Αυτό συμβαίνει στις περιπτώσεις εκείνες όπου η χρήση μιας πρότυπης μεθόδου είναι υποχρεωτική αλλά συγχρόνως ακατάλληλη όταν εφαρμόζεται χωρίς να λαμβάνονται υπόψη τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος όπου ζει ο υπό εξέταση οργανισμός ή όταν ο πρότυπος οργανισμός που χρησιμοποιείται για τη διεξαγωγή των πειραμάτων δεν ζει στο εξεταζόμενο περιβάλλον (Rand and Petrocelli, 1985). Οι δοκιμές τοξικότητας με θαλάσσιους οργανισμούς αποτελούν την πιο συνηθισμένη μορφή «υπερ-πιστοποίησης». Αυτό συμβαίνει γιατί τα περισσότερα πρωτόκολλα που έχουν μέχρι σήμερα αναπτυχθεί βασίζονται σε οργανισμούς του γλυκού νερού με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται συχνά για την εκτίμηση της τοξικότητας σε θαλάσσιους οργανισμούς με την παραδοχή ότι τα δύο είδη οργανισμών συμπεριφέρονται ανάλογα, προσέγγιση όμως που δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένη (Leung et al., 2001).

4.8 Τοξικότητα μιγμάτων χημικών ουσιών

Η χρήση μιγμάτων χημικών ουσιών ορισμένες φορές πλεονεκτεί έναντι των ουσιών που εφαρμόζονται μεμονωμένα διότι τα μίγματα παρουσιάζουν: (1) αυξημένη αποτελεσματικότητα

εναντίον των οργανισμών-στόχων, (2) αυξημένη ασφάλεια για οργανισμούς μη-στόχους, (3) απαίτηση μικρότερων ποσοτήτων των ουσιών για το ίδιο αποτέλεσμα, και (4) μειωμένο κόστος (Marking 1985). Επιπλέον δίνεται η δυνατότητα εξέτασης της τοξικής συμπεριφοράς μιας ουσίας σε περισσότερο πραγματικές συνθήκες αφού ως γνωστόν ποτέ μια ουσία δεν υπάρχει μόνη της στο περιβάλλον.

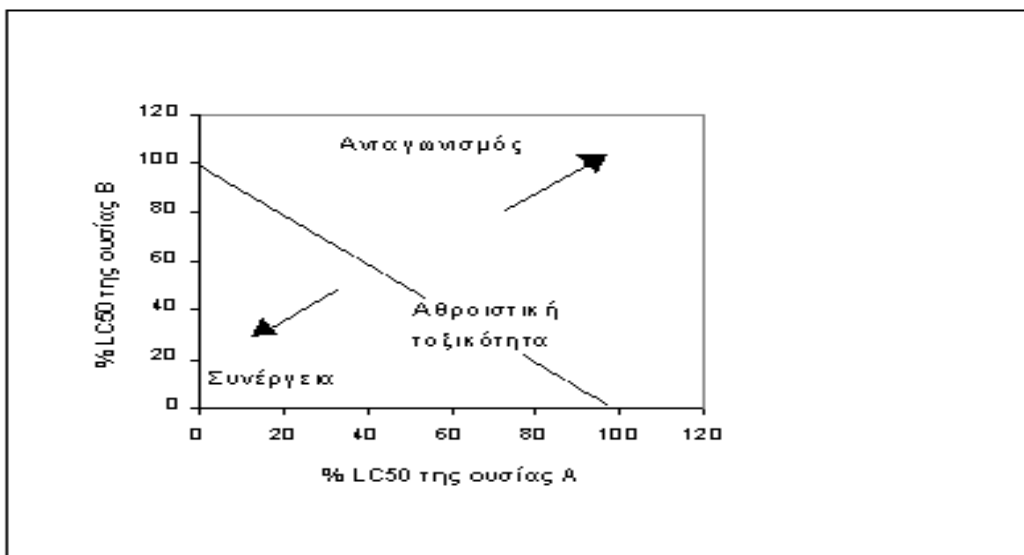
Η τοξικότητα ενός μίγματος χημικών ουσιών, μπορεί να είναι μικρότερη (*ανταγωνισμός*), ίση (*αθροιστικότητα*) ή μεγαλύτερη (*συνέργεια*) από το άθροισμα της τοξικής δράσης των συστατικών του, όταν αυτά ενεργούν ξεχωριστά. Οι όροι «*μικρότερη της αθροιστικής*» (*ανταγωνισμός*), «*αθροιστική*» και «*μεγαλύτερη της αθροιστικής*» (*συνέργεια*) τοξική δράση επίσης χρησιμοποιούνται (Marking, 1985).

Οι μελέτες τοξικότητας μιγμάτων συχνά ονομάζονται *μελέτες αλληλεπίδρασης* (interaction studies). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές γενικά λαμβάνουν χώρα μεταξύ των χημικών ουσιών και των βιοχημικών συστημάτων των οργανισμών, παρά μεταξύ των χημικών ουσιών του μίγματος (Marking, 1985). Οι αλληλεπιδράσεις τις περισσότερες φορές, είναι πολύπλοκες βιοχημικές διεργασίες με αποτέλεσμα δύσκολα να αναγνωρίζονται και να ερμηνεύονται οι μηχανισμοί τους. Για παράδειγμα η *συνέργεια*, μπορεί να προκληθεί εξ' αιτίας της αύξησης του ρυθμού πρόσληψης της χημικής ουσίας από τον οργανισμό, το σχηματισμό τοξικών μεταβολιτών, της μείωσης των ρυθμών απέκκρισης, της μεταβολής στην κατανομή της ουσίας ή της παρεμπόδισης των μηχανισμών αποτοξίνωσης (Marking, 1985).

4.9 Μέθοδοι ανάλυσης των αποτελεσμάτων των πειραμάτων τοξικότητας μιγμάτων

Τα γραφήματα των ισοβόλων είναι ένας απλός τρόπος απεικόνισης της τοξικότητας μιγμάτων χημικών ουσιών που επινοήθηκε το 1870 για συνδυασμούς φαρμάκων και για μίγματα μέχρι και τριών χημικών ουσιών.

Το γράφημα των ισοβόλων (Σχήμα 4.2), για μίγμα δύο ουσιών, αποτελεί την προβολή της επιφάνειας απόκρισης-συγκέντρωσης στο επίπεδο xy των συγκεντρώσεων, για μια συγκεκριμένη τιμή της απόκρισης, για παράδειγμα 50 % θνησιμότητα του πληθυσμού που εκτίθεται. Οι συγκεντρώσεις των δύο ουσιών στο μίγμα, μπορεί να εκφραστούν ως ποσοστά των αντιστοίχων συγκεντρώσεων κάθε ουσίας μόνης της που προκαλούν 50 % θνησιμότητα, δηλ. των αντίστοιχων LC₅₀.



Σχήμα 4.2 Διάγραμμα ισοβόλων για τις LC₅₀ δύο ουσιών A και B. Η αθροιστική δράση παριστάνεται με τη διαγώνιο.

Όλα τα σημεία του επιπέδου xy του γραφήματος αντιστοιχούν σε τοξικότητα ίση με αυτή της LC₅₀. Τα σημεία της διαγωνίου, αντιστοιχούν στην αθροιστική δράση, διότι προκύπτει ότι αν συγκέντρωση της χημικής ουσίας A ίση με το 50% της αντίστοιχης LC₅₀ και συγκέντρωση της ουσίας B ίση με το 50% της αντίστοιχης LC₅₀ (σημείο πάνω στην διαγώνιο) βρεθούν σε ένα μίγμα, θα προκαλέσουν τοξικό αποτέλεσμα ίσο με αυτό της LC₅₀. Η αθροιστικότητα είναι η συνηθέστερη απόκριση των βιολογικών συστημάτων στη δράση των μιγμάτων. Η συνέργεια και ο ανταγωνισμός αποτελούν εξαιρέσεις (Marking, 1985). Τα σημεία του επιπέδου που βρίσκονται κάτω και αριστερά της γραμμής αθροιστικότητας, αντιστοιχούν σε συνέργεια, διότι προκύπτει για παράδειγμα ότι τοξικότητα ίση με αυτή της LC₅₀ μπορεί να εμφανίσει μίγμα συγκεντρώσεων 50%LC_{50A} και 20%LC_{50B}. Δηλ. παρουσία της χημικής ουσίας A, μικρότερη συγκέντρωση της χημικής ουσίας B απαιτείται για να προκύψει το ίδιο αποτέλεσμα. Τα σημεία του επιπέδου που βρίσκονται δεξιά και πάνω της ευθείας αθροιστικής δράσης αντιστοιχούν σε ανταγωνισμό, πράγματι μίγμα συγκεντρώσεων 50%LC_{50A} και 80%LC_{50B}, εμφανίζει τοξικότητα ίση με την EC₅₀. Δηλαδή παρουσία της ουσίας A, μεγαλύτερη συγκέντρωση της ουσίας B απαιτείται για να προκύψει το ίδιο αποτέλεσμα.

Το γράφημα των ισοβόλων, παρουσιάζει αδυναμίες στην περιγραφή της τοξικότητας μιγμάτων. Οι επιφάνειες απόκρισης-συγκέντρωσης, προκύπτουν από πειραματικά δεδομένα, τα οποία εμπεριέχουν ενδογενή μεταβλητότητα. Έτσι θα πρέπει να υπάρχει ένα κριτήριο που να ορίζει ποιες αποκλίσεις από την γραμμή αθροιστικότητας σχετίζονται με πραγματική αλληλεπίδραση (ανταγωνισμό ή συνέργεια) ή οφείλονται στην ενδογενή μεταβλητότητα των βιολογικών συστημάτων. Επιπλέον, επειδή η μέθοδος είναι γραφική, περιορίζεται στην μελέτη της αλληλεπίδρασης το πολύ τριών χημικών ουσιών. Αυτό συμβαίνει γιατί για τον συνδυασμό k χημικών ουσιών, οι επιφάνειες απόκρισης-συγκέντρωσης έχουν διαστάσεις $k+1$ και το γράφημα των ισοβόλων έχει διαστάσεις k . Δεν είναι δυνατό να κατασκευαστεί γράφημα ισοβόλων σε ορθοκανονικό σύστημα συντεταγμένων, όταν $k>3$, παρά μόνο εάν διατηρούνται όλες οι μεταβλητές, εκτός τριών, σταθερές.

Με σκοπό να δημιουργηθούν ποσοτικές εκφράσεις της τοξικότητας μιγμάτων, για απεριόριστο αριθμό συστατικών αναπτύχθηκε ο δείκτης αλληλεπίδρασης (interaction index) I . Θεωρώντας μίγμα k χημικών ουσιών, έστω ότι D_i , ($i=1,2,\dots,k$) είναι η συγκέντρωση μιας εκ των χημικών ουσιών που μόνη της έχει την επιθυμητή δράση, και d_i , ($i=1,2,\dots,k$) είναι η συγκέντρωση της ίδιας ουσίας που σε ένα μίγμα με τις υπόλοιπες $k-1$ ουσίες, δίνει το ίδιο αποτέλεσμα. Τότε ο δείκτης αλληλεπίδρασης ισούται με:

$$I = \sum_{i=1}^k \frac{d_i}{D_i} \quad (4.5)$$

Για μίγματα δύο χημικών ουσιών, η σχέση αυτή παίρνει την μορφή:

$$I = \frac{d_1}{D_1} + \frac{d_2}{D_2} \quad (4.6)$$

Όταν $I=1$, η δράση των δύο ουσιών είναι αθροιστική, όταν $I<1$, υπάρχει συνέργεια, ενώ όταν $I>1$ υπάρχει ανταγωνισμός. Ο δείκτης αλληλεπίδρασης, κατά τον τρόπο αυτό, συνδέεται άμεσα με το γράφημα των ισοβόλων.

Ο δείκτης αλληλεπίδρασης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει την τοξικότητα συνδυασμού περισσότερων των τριών χημικών ουσιών, αλλά παρόλο που έχουν γίνει προσπάθειες, η χρήση του δεν λύνει το πρόβλημα της εκτίμησης της σημαντικότητας της αλληλεπίδρασης.

Το πρόβλημα αυτό λύνεται με τη συσχέτιση του δείκτη αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια συγκέντρωσης-απόκρισης (Carter and Gennings, 1994).

Ας υποθεθεί ότι μίγμα δύο χημικών ουσιών χορηγείται σε οργανισμούς που όταν εκτίθενται σε αυτό αντιδρούν δυαδικά (π.χ. πεθαίνουν ή όχι). Στην περίπτωση αυτή, η σχέση μεταξύ της πιθανότητας p για έναν οργανισμό να αντιδράσει και των συγκεντρώσεων των χημικών ουσιών στο μίγμα d_1 και d_2 είναι της μορφής:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 d_1 + \beta_2 d_2 + \beta_{12} d_1 d_2)}} \quad (4.7)$$

όπου β_0 είναι μια σταθερά που συνδέεται με την απόκριση του συστήματος απουσία των δύο χημικών ουσιών, β_1 μια σταθερά που συνδέεται με την πρώτη χημική ουσία, β_2 μια σταθερά που συνδέεται με την δεύτερη χημική ουσία και β_{12} μια σταθερά που συνδέεται με την δράση του μίγματος.

Η εξίσωση (4.7) μπορεί να γραφτεί ως εξής:

$$\frac{d_1}{\left[\frac{\ln\left(\frac{p_0}{1-p_0}\right) - \beta_0}{\beta_1} \right]} + \frac{d_2}{\left[\frac{\ln\left(\frac{p_0}{1-p_0}\right) - \beta_0}{\beta_2} \right]} = 1 - \frac{\beta_{12} d_1 d_2}{\left[\ln\left(\frac{p_0}{1-p_0}\right) - \beta_0 \right]} \quad (4.8)$$

Οι δύο παρονομαστές του αριστερού μέλους της (4.8) αποδεικνύεται ότι είναι ίσοι με τις αντίστοιχες ED_{100p_0} ή τις Di των δύο χημικών ουσιών. Άρα το αριστερό μέλος της (4.8) είναι ο δείκτης αλληλεπίδρασης I . Το δεξιό μέλος γίνεται ίσο με 1, όταν $\beta_{12}=0$ και τότε η τοξική δράση είναι αθροιστική και γίνεται $\neq 1$, όταν $\beta_{12} \neq 0$ και τότε υπάρχει αλληλεπίδραση. Με τον τρόπο αυτόν, είναι δυνατόν να ελεγχθεί με γνωστές στατιστικές μεθόδους αν η εξίσωση (4.8)

περιγράφει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα και κατόπιν να ελεγχθεί αν ο όρος β_{12} είναι στατιστικά διαφορετικός από το 0, οπότε υπάρχει αλληλεπίδραση. Το είδος της αλληλεπίδρασης

εξαρτάται από το πρόσημο του όρου β_{12} . Ο όρος $\ln\left(\frac{p_0}{1-p_0}\right) - \beta_0$ αποδεικνύεται ότι είναι θετικός

με την προϋπόθεση ότι το ποσοστό των οργανισμών που αντιδρούν παρουσία του μίγματος είναι μεγαλύτερο από το ποσοστό αυτών που αντιδρούν απουσία του. Άρα αν $\beta_{12} < 0$, τότε το δεύτερο μέλος της (4.8) είναι > 1 , και αυτό αντιστοιχεί σε ανταγωνισμό, ενώ αν $\beta_{12} > 0$, τότε το δεύτερο μέλος της (4.8) είναι < 1 και αυτό αντιστοιχεί σε συνέργεια.

Αυτή η προσέγγιση μπορεί να γενικευτεί και να εφαρμοστεί όχι μόνο σε συστήματα δυαδικής απόκρισης αλλά και σε συνεχή δεδομένα, όπως για παράδειγμα τη μεταβολή του βάρους οργανισμών ή του ρυθμού ανάπτυξής τους, μετά από έκθεση σε τοξικές ουσίες. Η βασική παραδοχή είναι ότι υπάρχει μια πολυωνυμική συνάρτηση μιας εξαρτημένης μεταβλητής που μετρά την απόκριση του συστήματος και των συγκεντρώσεων του μίγματος. Η συνάρτηση αυτή πρέπει να είναι πρώτου βαθμού ως προς τις συγκεντρώσεις του μίγματος χωριστά, ενώ μπορεί να είναι οποιουδήποτε βαθμού ως προς τις συγκεντρώσεις του όρου της αλληλεπίδρασης. Για το παράδειγμα που μόλις συζητήθηκε, η συνάρτηση αυτή είναι:

$$\ln\left(\frac{p_0}{1-p_0}\right) = \beta_0 + \beta_1 d_1 + \beta_2 d_2 + \beta_{12} d_1 d_2 \quad (4.9)$$

Για πειράματα αλληλεπίδρασης μιγμάτων χημικών ουσιών σε συστήματα όπου μετρώνται συνεχείς αποκρίσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συνάρτηση:

$$\ln \frac{\lambda(t)}{\lambda_0(t)} = \beta_0 + \beta_1 d_1 + \beta_2 d_2 + \beta_{12} d_1 d_2 \quad (4.10)$$

όπου $\lambda(t)$ είναι η μετρούμενη μεταβλητή για τους οργανισμούς που εκτίθεται στο μίγμα και λ_0 για αυτούς που δεν εκτίθενται, την χρονική στιγμή t . Η ερμηνεία του συντελεστή του όρου αλληλεπίδρασης β_{12} , γίνεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με τα δυαδικά δεδομένα.

Ο γνωστότερος πειραματικός σχεδιασμός που επιτρέπει τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων που αναφέρθηκαν είναι ο *παραγοντικός σχεδιασμός* (Cox, 1958). Στα πειράματα

αυτά, "παράγοντας" (factor), ονομάζεται κάθε μεταβλητή που επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα. "Επίπεδα" (levels) του παράγοντα, ονομάζονται οι διαφορετικές τιμές ή μορφές που μπορεί να πάρει ένας παράγοντας. Κάθε συνδυασμός διαφορετικών επιπέδων κάποιων παραγόντων, ονομάζεται *επέμβαση* (treatment). Όταν πραγματοποιούνται όλοι ή σχεδόν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί των παραγόντων το πείραμα συνολικά ονομάζεται *παραγοντικό πείραμα*. Ένα παραγοντικό πείραμα, όπου υπάρχουν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί των παραγόντων, ονομάζεται *πλήρες* (complete) παραγοντικό πείραμα.

Γενικά, όταν μελετώνται οι αλληλεπιδράσεις k χημικών ουσιών σε m επίπεδα (συγκεντρώσεις) η καθεμιά, τότε απαιτούνται m^k επεμβάσεις σε ένα πλήρες παραγοντικό πείραμα. Καθώς ο αριθμός των χημικών ουσιών k αυξάνει, αυξάνει σημαντικά ο αριθμός των δυνατών συνδυασμών. Για να είναι δυνατή η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, θα πρέπει ο αριθμός των συγκεντρώσεων κάθε ουσίας στο πείραμα να είναι κατά ένα μεγαλύτερος από τον μέγιστο εκθέτη της συγκέντρωσης της ουσίας αυτής, στην εξίσωση που περιγράφει καλύτερα την τοξική δράση του μίγματος. Για την εξίσωση (4.10), κάθε ουσία θα πρέπει να ελεγχθεί σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, δηλ. θα πρέπει να διεξαχθεί ένα παραγοντικό πείραμα με $2^2=4$ επεμβάσεις. Όσο πιο πολύπλοκη είναι η εξίσωση που ανταποκρίνεται στα δεδομένα του πειράματος, τόσο μεγαλύτερος γίνεται ο αναγκαίος αριθμός των επεμβάσεων, ώστε τελικά το πείραμα μπορεί να γίνει τόσο μεγάλο που να είναι αδύνατο να διεξαχθεί. Για την μείωση του αριθμού των πειραματικών μονάδων που ελέγχονται ταυτόχρονα, υπάρχουν τεχνικές διεξαγωγής των πειραμάτων σε τμήματα (blocks).

4.10 Παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα

Η τύχη και η συμπεριφορά μιας ουσίας αμέσως μετά την εισαγωγή της στο περιβάλλον ελέγχεται από παράγοντες οι οποίοι εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ίδιας της ουσίας, από τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες του οικοσυστήματος καθώς και από τις πηγές και το ρυθμό εισροής της ουσίας στο περιβάλλον.

Η μοριακή δομή, η υδατοδιαλυτότητα, η τάση ατμών, οι σταθερές ταχύτητας των διαδικασιών υδρόλυσης, φωτόλυσης, βιολογικής αποδόμησης, εξάτμισης, ρόφησης, πρόσληψης και απέκκρισης από τους οργανισμούς καθώς και οι συντελεστές κατανομής μεταξύ των διαφόρων φάσεων είναι οι κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες μιας ουσίας που καθορίζουν την τύχη της στο περιβάλλον. Η γνώση αυτών των ιδιοτήτων επιτρέπει στον εκάστοτε ερευνητή να

εκτιμήσει πιο από τα «διαμερίσματα» του περιβάλλοντος θα εκτεθεί περισσότερο στην συγκεκριμένη ουσία και να προβλέψει την ικανότητα της ουσίας να μετακινηθεί μεταξύ αυτών των διαφορετικών «διαμερισμάτων» (Rand and Petrocelli, 1985).

Οι ιδιότητες του οικοσυστήματος που μπορεί να επηρεάσουν τη μεταφορά, το μετασχηματισμό και γενικότερα την τύχη των ουσιών είναι η θερμοκρασία, η αλατότητα, το pH, η ροή, το βάθος, η ποσότητα των αιωρούμενων στερεών, το μέγεθος των κόκκων του ιζήματος και η περιεκτικότητά του σε άνθρακα (Rand and Petrocelli, 1985).

4.10.1 Παράγοντες που σχετίζονται με την ουσία

Όπως προαναφέρθηκε οι φυσικοχημικές ιδιότητες είναι εκείνες που καθορίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα, την παραμονή, το μετασχηματισμό και την τελική τύχη της ουσίας στο υδατικό περιβάλλον. Συχνά όμως η τοξικότητα μιας ουσίας επηρεάζεται από την παρουσία προσμίξεων στα διάφορα σκευάσματα οι οποίες συμβαίνει κάποιες φορές να είναι τοξικότερες από την δραστική χημική ουσία (Rand and Petrocelli, 1985).

Ο τρόπος δράσης της ουσίας επίσης επηρεάζει την τοξικότητά της. Έτσι όταν μια ουσία είναι μη-εκλεκτική τότε μπορεί να προκαλεί ανεπιθύμητα αποτελέσματα για τους οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο. Στην περίπτωση αυτή μια ουσία μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Στην αντίθετη περίπτωση, μια ουσία μπορεί να παρουσιάζει τόσο εκλεκτική δράση ώστε να βλάπτει μόνο έναν συγκεκριμένο τύπο ιστού ή κυττάρου αφήνοντας ανεπηρέαστα τα υπόλοιπα κύτταρα (ή ιστούς) ακόμα και αυτά που είναι σε στενή επαφή με τα κύτταρα (ή ιστούς) στόχους. Έτσι τυχόν αλλαγές που μπορεί να συμβούν εξαιτίας χημικών και βιολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ουσίας και στόχου μπορεί να μεταβάλλουν τη δράση της άρα και την τοξικότητά της (Rand and Petrocelli, 1985).

4.10.2 Παράγοντες που σχετίζονται με τον εκτιθέμενο οργανισμό

Μια τοξική ουσία όπως είναι γνωστό δεν επηρεάζει το ίδιο όλους του οργανισμούς διότι οι εκτιθέμενοι οργανισμοί παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία. Έτσι ο ρυθμός και ο τρόπος μεταβολισμού της ουσίας καθώς και ο ρυθμός απέκκρισής της διαφοροποιείται μεταξύ των οργανισμών επομένως μεταβάλλεται και η τοξικότητά της (Rand and Petrocelli, 1985).

Ένας άλλος παράγοντας που σχετίζεται με τον οργανισμό και επηρεάζει την τοξικότητα είναι η ηλικία και οι διατροφικές συνήθειες. Τα νεαρά άτομα είναι πιο ευπαθή στη δράση των

χημικών ουσιών σε σχέση με τα ενήλικα, ενώ οι διαιτητικές συνήθειες επηρεάζουν την τοξικότητα, διότι επηρεάζουν τη φυσιολογία και τις βιοχημικές λειτουργίες ενός οργανισμού (Rand and Petrocelli, 1985).

4.10.3 Παράγοντες που σχετίζονται με το χρόνο έκθεσης

Οι παράγοντες που σχετίζονται με την έκθεση ενός οργανισμού σε μια τοξική ουσία έχουν να κάνουν με το είδος της έκθεσης, τη διάρκεια, τη συχνότητα της έκθεσης αλλά και τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας.

Οι υδρόβιοι οργανισμοί εκτίθενται διαρκώς σε ουσίες που είναι διαλυμένες στο νερό, προσροφημένες στο ίζημα ή υπάρχουν στην τροφή τους. Οι υδατοδιαλυτές ουσίες είναι περισσότερο διαθέσιμες στους υδατικούς οργανισμούς σε σχέση με αυτές που είναι προσροφημένες στο ίζημα ή τα αιωρούμενα σωματίδια. Εισέρχονται στον οργανισμό απευθείας μέσω των βραγχίων, του στόματος και του δέρματος ενώ μέσω του φαγητού εισέρχονται στον οργανισμό διαμέσου του γαστρεντερικού συστήματος. Αντίθετα οι προσροφημένες ουσίες είναι «διαθέσιμες» στους οργανισμούς μόνο μετά την αποδέσμευσή τους. Επομένως ανάλογα με τη μορφή στην οποία βρίσκεται μια ουσία (διαλυμένη στο νερό ή δεσμευμένη στο ίζημα ή τα αιωρούμενα) οι οργανισμοί εκτίθενται σε υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις, άρα η τοξικότητα είναι διαφορετική κάθε φορά (Rand and Petrocelli, 1985).

Το είδος της έκθεσης (οξεία ή χρόνια) επηρεάζει ουσιαστικά τους μηχανισμούς της προσρόφησης, της διανομής, του βιομετασχηματισμού και της απέκκρισης καθορίζοντας τελικά την τοξικότητα της ουσίας (Rand and Petrocelli, 1985).

Κατά την οξεία έκθεση, ο οργανισμός έρχεται σε επαφή με μια χημική ουσία ή έναν τοξικό παράγοντα για διάστημα μερικών ωρών ή ημερών και τα αποτελέσματα είναι συνήθως άμεσα. Κατά τη χρόνια έκθεση ο οργανισμός εκτίθεται σε χαμηλό επίπεδο μιας χημικής ουσίας ή ενός τοξικού παράγοντα συνεχώς ή σε καθορισμένα διαστήματα για αρκετό καιρό που κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες μέχρι και χρόνια. Τα αποτελέσματα της χρόνιας έκθεσης μπορεί να είναι γρήγορα και άμεσα, όπως συμβαίνει κατά την οξεία έκθεση, ή να γίνονται εμφανή με αργούς ρυθμούς (Rand and Petrocelli, 1985).

Η συχνότητα της έκθεσης επίσης επηρεάζει την τοξικότητα μιας ουσίας. Αν ο οργανισμός εκτεθεί μια μόνο φορά σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση της ουσίας, τότε θα υποστεί μια δυσμενή επίπτωση όμως αν εκτεθεί και δεύτερη φορά αυτό δε σημαίνει απαραίτητα ότι το τοξικό

αποτέλεσμα θα είναι χειρότερο. Αυτό συμβαίνει γιατί στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ των δύο εκθέσεων, ο οργανισμός μπορεί να μεταβολίσει (αν αυτό είναι εφικτό) την ουσία ή να εγκλιματιστεί, οπότε η τοξικότητα της ουσίας επηρεάζεται. Σαφώς όταν η ουσία δεν μεταβολίζεται (ή μεταβολίζεται σε μικρό ποσοστό) συσσωρεύεται στον οργανισμό και προκαλεί χρόνια αποτελέσματα (Rand and Petrocelli, 1985).

4.10.4 Παράγοντες που σχετίζονται με το εξωτερικό περιβάλλον

Οι κύριοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που μπορούν να μεταβάλλουν την τοξικότητα μιας ουσίας είναι αυτοί που επηρεάζουν τη διαθεσιμότητά της από τη στήλη του νερού στους οργανισμούς και είναι η θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο, το pH και η αλατότητα.

4.10.4.1 Θερμοκρασία

Δεν υπάρχει ένας γενικός κανόνας για τον τρόπο που οι μεταβολές της θερμοκρασίας επηρεάζουν την τοξικότητα μιας ουσίας. Επομένως ανάλογα με το είδος του εκτιθέμενου οργανισμού και ανάλογα με την ίδια τη χημική ουσία οι αλλαγές της θερμοκρασίας μπορεί να αυξήσουν, να μειώσουν ή να μην επηρεάσουν καθόλου την τοξικότητα.

Είναι γνωστό ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τη διαλυτότητα πολλών ουσιών και επομένως τη διαθεσιμότητά τους, επηρεάζει τη χημική δομή ορισμένων ουσιών και μεταβάλλει τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου. Οι επιπτώσεις αυτές καθίστανται περισσότερο επιβλαβείς καθώς αλληλεπιδρούν με τις άμεσες επιπτώσεις που επιφέρει η αύξηση της θερμοκρασίας στους οργανισμούς (Sprague, 1985).

4.10.4.2 Διαλυμένο οξυγόνο

Η μείωση των συγκεντρώσεων του διαλυμένου οξυγόνου εξαιτίας της ρύπανσης κάτω των φυσιολογικών ορίων, αποτελεί από μόνη της γεγονός που προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στους οργανισμούς, καθώς σχετίζεται άμεσα με τη βιωσιμότητά τους. Υποστηρίζεται ότι η μείωση των επιπέδων του διαλυμένου οξυγόνου είναι δυνατόν να αυξήσει σημαντικά την τοξικότητα μιας ουσίας, διότι επηρεάζεται αρνητικά ο ρυθμός αναπνοής του οργανισμού και επομένως γίνεται πιο ευάλωτος, με αποτέλεσμα χαμηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας να επιφέρουν την ίδια δυσμενή επίπτωση (Sprague, 1985).

4.10.4.3 pH

Οι μεταβολές του pH του νερού επηρεάζουν κυρίως την τοξικότητα των ουσιών που μπορούν να ιονιστούν και των οποίων η αδιάστατη μορφή, η οποία μπορεί και πιο εύκολα να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, είναι περισσότερο τοξική. Κλασσικό παράδειγμα αποτελούν τα ιόντα αμμωνίου τα οποία είναι ελάχιστα τοξικά από μόνα τους, όμως η αύξηση του pH συνεπάγεται τη μετατροπή τους σε αμμωνία, η οποία είναι πολύ πιο τοξική. Μάλιστα έχει βρεθεί ότι αύξηση του pH των επιφανειακών νερών κατά μία μονάδα οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας κατά έξι φορές. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των μετάλλων συμβαίνει ακριβώς το αντίστροφο καθώς η ελεύθερη μορφή του μετάλλου είναι και η πιο τοξική και αυτή είναι που εμφανίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε χαμηλές τιμές του pH (Sprague, 1985).

4.10.4.4 Αλατότητα

Η επίδραση της αλατότητας στην τοξικότητα δεν είναι τόσο σημαντική. Τόσο οι θαλάσσιοι οργανισμοί όσο και οι οργανισμοί του γλυκού νερού όταν βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον φαίνεται να παρουσιάζουν αντίστοιχη ανθεκτικότητα στην επίδραση μιας δεδομένης τοξικής ουσίας. Αντίθετα οι ευρύαλοι οργανισμοί παρουσιάζουν τη μέγιστη δυνατή ανθεκτικότητα σε ισοσμωτικά περιβάλλοντα (30-40% θαλασσινό νερό) (Sprague, 1985).

4.11 Τοξικότητα των βιοκτόνων ουσιών των υφαλοχρωμάτων στο θαλάσσιο περιβάλλον

4.11.1 Irgarol 1051 και M1

Η τοξικότητα του irgarol 1051 μελετήθηκε σε ποικίλους οργανισμούς (φύκη, μακρόφυτα, οστρακοειδή και ψάρια), όπως ενδεικτικά φαίνεται στον Πίνακα 4.1 (Toth et al., 1996; Dahl and Blank, 1996; Scarlett et al., 1997, 1999b; Hall et al., 1999; Ranke and Jarstoff, 2000). Όπως αναμένεται από το βιοχημικό τρόπο δράσης της ουσίας, σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι πολύ τοξική στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς.

Μελέτες σε επτά είδη φυκών έδειξαν ότι η συγκέντρωση που μειώνει την ανάπτυξη κατά 50 %, κυμαίνεται από 136 ng L⁻¹ για τη *Navicula pelliculosa* (διάτομο του γλυκού νερού) μέχρι 2075 ng L⁻¹ για τη *Anabaena flos-aquae* (μπλε-πράσινο φύκος του γλυκού νερού) έπειτα από

πέντε μέρες έκθεση (Hughes and Alexander, 1993; Hoberg, 1998). Οι Bard et al. (1994) επίσης προσδιόρισαν τιμές EC₅₀ της τάξεως των ng (450 ng L⁻¹) για διάφορα είδη φυκών, ενώ και οι Dahl and Blanck (1996) που μελέτησαν την επίδραση της ουσίας πάνω σε κοινωνίες *Periphyton* διαπίστωσαν ότι η φωτοσυνθετική δραστηριότητα αναστέλλεται σημαντικά μετά από χρόνια έκθεση σε συγκεντρώσεις μεταξύ 60 και 250 ng L⁻¹. Οι Okamura et al. (2000b) βρήκαν ότι το irgarol 1051 έχει φυτοτοξική δράση σε διάφορα θαλάσσια ζιζάνια σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 10 μg L⁻¹ (0,6 – 5,9 μg L⁻¹), ενώ σύμφωνα με τους Rogers et al. (1996) αναστολή της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των φυκών διαπιστώθηκε σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 10 ως 100 μg L⁻¹ ανάλογα με το είδος του εκτιθέμενου οργανισμού. Οι Scarlett et al. (1997) για το φύκος του γλυκού νερού *Enteromorpha intestinalis* προσδιόρισαν EC₅₀ ίση με 10 μg L⁻¹. Σε άλλη έρευνα βρέθηκε ότι συγκεντρώσεις του irgarol 1051 μεγαλύτερες από 1000 ng L⁻¹ πλήρως αναστέλλουν την ανάπτυξη των *Thalassiosira pseudonama* και *Thalassiosira* sp. (διάτομα του γλυκού νερού) (Sun et al., 1997).

Οι ζωικοί οργανισμοί αντίθετα είναι λιγότερο ευαίσθητοι σε σχέση με τους φυτικούς στην παρουσία του irgarol 1051. Σύμφωνα με τους Hall et al. (1999) σε έρευνα της EPA σε τρία είδη ασπόνδυλων και τέσσερα είδη ψαριών οι τιμές της LC₅₀ κυμάνθηκαν από 0,4 mg L⁻¹ για το *Mysidopsis bahia* (Mysid) μέχρι 5,3 mg L⁻¹ για τη *Daphnia magna*. Οι Scarlett et al. (1997) επίσης μελέτησαν την οξεία τοξικότητα του irgarol 1051 σε οστρακοειδή και οι τιμές της LC₅₀ που προσδιόρισαν βρέθηκαν ίσες με 0,4 mg L⁻¹ (mysid shrimp) και 8,1 mg L⁻¹ (*Daphnia magna*) μετά από 96 και 48 h έκθεσης αντίστοιχα. Όσον αφορά την τοξικότητα του irgarol 1051 στα ψάρια, οι Okamura et al. (2001) αναφέρουν ότι συγκέντρωση 0,88 mg L⁻¹ της ουσίας θανατώνει το 50 % της πέστροφας (rainbow trout) μετά από 28 μέρες έκθεσης.

Συγκριτικά με άλλες ουσίες της ίδιας χημικής κατηγορίας όπως είναι η atrazine, το irgarol 1051 εμφανίζει πολύ υψηλότερη τοξικότητα. Σύμφωνα με τους Dahl and Blanck (1996) το irgarol 1051 είναι 70 φορές πιο τοξική ουσία σε σχέση με την atrazine, γεγονός που αποδίδεται στην ύπαρξη μεθυλοθειομάδας στο μόριο της. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Berard et al. (2003) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι τα είδη διατόμων που εξετάστηκαν, ενώ ήταν ανθεκτικά στην atrazine εμφάνισαν πολύ μεγάλη ευαισθησία στο irgarol 1051. Η τοξικότητα του irgarol 1051 πάνω σε οργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο είναι επίσης υψηλή. Σύμφωνα με τους Liu et al. (1999), η ουσία μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη θαλάσσιων φυκών σε συγκεντρώσεις της τάξης των 50 ng L⁻¹.

Πίνακας 4.1 Τοξικότητα του irgarol 1051 πάνω σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς.

Τάξη	Εκτιθέμενος Οργανισμός	Δείκτης τοξικότητας	EC ₅₀ ή LC ₅₀ (μg L ⁻¹)	NOEC ή LOEC (μg L ⁻¹)	Αναφορά
Θαλάσσια φύκη	<i>Porphyra yezoensis</i>	4-day EC ₅₀	0,60	≤0,3	Okamura et al. (2000b)
	<i>Eisenia bicyclis</i>	4-day EC ₅₀	2,6–7,4	3,2	Okamura et al. (2000b)
Θαλάσσιο γρασίδι	<i>Zostera marina</i>	10-day EC ₅₀	2,5	10	Scarlett et al. (1999a)
Φύκη	<i>Closterium ehrenbergii</i>	5-day EC ₅₀	2,5		Okamura et al. (2000b)
	<i>Selenastrum capricornotum</i>	3-day EC ₅₀	10,8 ± 1,7	5 ± 0,9	Fernandez-Alba et al. (2002)
Μακρόφυτα	<i>Elodea canadensis</i>	EC ₂₀	17–52	2,5–25,3	Nystrom et al. (2002)
	<i>Potamogeton pectinatus</i>	EC ₅₀	10	2,5	Nystrom et al. (2002)
Φυτοπλαγκτόν	<i>various species</i>	EC ₅₀	0,441– 0,647	0,025– 0,647	Nystrom et al. (2002)
Ζιζάνια	<i>Lemna gibba G3</i>	7-day EC ₅₀	11 – 12	-	Okamura et al. (2000b)
	<i>Lemna minor</i>	7-day EC ₅₀	7,3–8,9	–	Okamura et al. (2000b)
Βακτήρια	<i>Vibrio fischeri</i>	15-min EC ₅₀	50800±7800	10000±1900	Fernandez-Alba et al. (2002)
Αρθρόποδα	<i>Daphnia magna</i>	48-h EC ₅₀	7300±1200	2400±300	Fernandez-Alba et al. (2002)
	<i>Daphnia magna</i>	48-h LC ₅₀	6700– 10000	-	Okamura et al. (2000a)
	<i>Daphnia pulex</i>	24-h LC ₅₀	5100– 6300		Okamura et al. (2000a)
	<i>Thamnocepharus platvurus</i>	24-h LC ₅₀	11000–13000	-	Okamura et al. (2000a)
	<i>Artemia salina</i>	24-h LC ₅₀	>4x10 ⁴		Okamura et al. (2000a)
Κοράλλια	<i>Madracis mirabilis</i>			0,063	Owen et al. (2002)
Ψάρι (Chinook salmon)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	24-h EC ₅₀	10 ⁵ <	-	Okamura et al. (2002)
Ψάρι (Rainbow trout)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7-day LC ₅₀	25000		Okamura et al. (2002)
Αχινός	<i>Anthocidaris crassispira</i>	Pluteus formation 32 h		10	Kobayashi and Okamura (2002)

Πηγή: Konstantinou and Albanis, 2004.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν ανιχνευτεί στο θαλάσσιο περιβάλλον συγκεντρώσεις της ουσίας ικανές να θέσουν σε κίνδυνο την υδρόβια ζωή (Thomas et al., 2001), να βλάψουν κοινωνίες μικροφυκών (Dahl and Blanck, 1996), μακροφύκη (Scarlett et al., 1997), κοράλλια (Owen et al., 2002), είδη θαλάσσιου γρασιδιού (Macinnis-Ng and Ralph, 2003) και μέσω της τροφικής αλυσίδας να επηρεάσουν έμμεσα και άλλους ανώτερους οργανισμούς.

Παρουσία άλλων οργανικών ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών όπως είναι το diuron, το sea nine 211, το chlorothalonil, το dichlofluanid και το TCMTB, η τοξική δράση του irgarol 1051

μπορεί να είναι είτε συνεργιστική, είτε ανταγωνιστική είτε αθροιστική και φυσικά εξαρτάται και από τον εκτιθέμενο οργανισμό όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2 Τοξική δράση του irgarol 1051 παρουσία άλλων ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών.

Μίγμα ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών	Εκτιθέμενος Οργανισμός		
	<i>V. fisheri</i>	<i>S. capricornotum</i>	<i>D. magna</i>
Irgarol 1051-diuron	Συνέργεια	Συνέργεια	Συνέργεια
Irgarol 1051-sea nine 211	Ανταγωνισμός	Αθροιστικότητα	Αθροιστικότητα
Irgarol 1051-chlorothalonil	Συνέργεια	Συνέργεια	Ανταγωνισμός
Irgarol 1051-dichlofluanid	Αθροιστικότητα	Αθροιστικότητα	Συνέργεια
Irgarol 1051-TCMTB	Συνέργεια	Συνέργεια	Συνέργεια
Irgarol 1051-diuron-sea nine 211	Ανταγωνισμός	Αθροιστικότητα	Αθροιστικότητα
Irgarol 1051-TCMTB-dichlofluanid	Αθροιστικότητα	Συνέργεια	Συνέργεια
Irgarol 1051-TCMTB-dichlofluanid-sea nine 211	Ανταγωνισμός	Ανταγωνισμός	Αθροιστικότητα

Πηγή: Fernandez-Alba et al., 2002.

Η τοξικότητα του κύριου μεταβολίτη του irgarol 1051, M1, έχει μελετηθεί για διάφορους οργανισμούς, όπως βακτήρια (*Vibrio fisheri*), μικροφύκη (*Selenastrum capricornotum*) και οστρακοειδή (*Daphnia magna*) και έχει βρεθεί ότι είναι χαμηλότερη από την τοξικότητα της αρχικής ουσίας (Fernandez- Alba et al., 2002). Ανάλογα με το χρόνο έκθεσης και τον εκτιθέμενο οργανισμό, η EC₅₀ προσδιορίστηκε για το *Vibrio fisheri* σε 7,3 και 6,5 mg L⁻¹ για 5 και 15 min αντίστοιχα, για το *Selenastrum capricornotum* σε 4,7 και 0,018 mg L⁻¹ για 30 και 72 h αντίστοιχα και για τη *Daphnia magna* σε 18,9 μετά από 24 ή 48 h (Fernandez- Alba et al., 2002). Όμως και οι Hoberg et al. (1998) οι οποίοι πραγματοποίησαν πειράματα τοξικότητας πάνω στο θαλάσσιο διάτομο *Skeletonema costatum*, διαπίστωσαν ότι ο M1 μετά από 5 μέρες έκθεσης ήταν περίπου 40 φορές λιγότερο τοξικός από την αρχική ουσία.

4.11.2 Diuron και κύριοι μεταβολίτες του

Το diuron, όπως και το irgarol 1051, επίσης εμφανίζει υψηλή τοξικότητα στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Μελέτη της τοξικότητάς του σε τρία είδη οργανισμών το βακτήριο *Vibrio fischeri*, το μικροσκοπικό οστακόδερμο *Daphnia magna* και το μικροφύκος *Selenastrum capricornotum*, έδειξε ότι το diuron δεν επηρεάζει καθόλου το *Vibrio fischeri*, σε

συγκέντρωση $8,6 \text{ mg L}^{-1}$ μειώνει κατά 50% τον πληθυσμό της *Daphnia magna* μετά από 48 ώρες έκθεσης, ενώ η EC_{50} για το μικροφύκος μετά από 72 ώρες προσδιορίστηκε στα $0,045 \text{ mg L}^{-1}$ (Fernandez-Alba 2002). Στην έρευνα των Chesworth et al. (2004) αποδείχθηκε ότι συγκέντρωση 5 mg L^{-1} του diuron μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη του θαλάσσιου φυτού *Zostera marina*.

Το diuron είναι μέτρια τοξικό στα ψάρια και ελαφρώς τοξικό στα ασπόνδυλα. Σύμφωνα με την έρευνα των Nebeker and Schuyetema (1998), μετά από 48 h έκθεσης, η LC_{50} του diuron κυμάνθηκε μεταξύ $4,3$ και 42 mg L^{-1} και 1 και $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ για τα ψάρια και τα ασπόνδυλα αντίστοιχα ενώ μετά από 96 h έκθεσης η LC_{50} για το ψάρι rainbow trout ήταν $3,5 \text{ mg L}^{-1}$. Η τοξικότητα του diuron σε άλλους οργανισμούς όπως κάμπιες, σαλιγκάρια, βατράχους και χρυσόψαρα επίσης έχει μελετηθεί. Το diuron επιδρά αρνητικά στο σωματικό βάρος και την ανάπτυξη γενικότερα των *Lumbriculus variegates* (κάμπια) και *Physa gyrina* (σαλιγκάρι) σε συγκεντρώσεις $29,1$ και $15,3 \text{ mg L}^{-1}$ αντίστοιχα (Nebeker and Schuyetema, 1998). Ο προσδιορισμός της LC_{50} για αυτά τα είδη δεν ήταν δυνατός στην παραπάνω μελέτη όμως σε προηγούμενη έρευνα των Christian and Tate (1983) η LC_{50} για το σαλιγκάρι *Lymnea* spp. μετά από 96 h έκθεσης υπολογίστηκε σε $15,3 \text{ mg L}^{-1}$. Η έκθεση βατράχων σε diuron προκαλεί προβλήματα στην επιβίωση και την ανάπτυξη καθώς και δυσμορφία στους οργανισμούς όταν όμως η έκθεση γίνεται σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από αυτές που ανιχνεύονται συνήθως στο περιβάλλον (Nebeker and Schuyetema, 1998). Οι Saglio and Trijasse (1998) διαπίστωσαν ότι η έκθεση του χρυσόψαρου σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλές της τάξεως των 5 mg L^{-1} , που συνήθως ανιχνεύονται στο περιβάλλον (Okamura et al., 2003), επηρέασε τη συμπεριφορά του χρυσόψαρου και συγκεκριμένα ο οργανισμός συνάντησε δυσκολίες στην ανεύρεση τροφής. Τέλος οι Call et al. (1987) διαπίστωσαν ότι συγκεντρώσεις του diuron μεγαλύτερες από 78 mg L^{-1} προκαλούν προβλήματα στην επιβίωση, ακόμα και το θάνατο του ψαριού *Pimephales promelas*. Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζεται ενδεικτικά η τοξικότητα του diuron σε ορισμένους υδρόβιους οργανισμούς.

Πίνακας 4.3 Τοξικότητα του diuron πάνω σε διάφορους υδρόβιους οργανισμούς.

Τάξη	Εκτιθέμενος Οργανισμός	Δείκτης τοξικότητας	EC ₅₀ ή LC ₅₀ (μg L ⁻¹)	NOEC ή LOEC (μg L ⁻¹)	Αναφορά
Φύκη	<i>Selenastrum capricornotum</i>	3-day EC ₅₀	45 ± 7,9	15 ± 2,6	Fernandez-Alba et al. (2002)
Αρθρόποδα	<i>Daphnia magna</i>	48-h EC ₅₀	8600±1300	3500±690	Fernandez-Alba et al. (2002)
Ψάρι (Chinook salmon)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	24-h EC ₅₀	52000	-	Okamura et al. (2002)
Ψάρι (Rainbow trout)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	7-day LC ₅₀	74000	-	Okamura et al. (2002)
Αχινός	<i>Anthocidaris crassispina</i>	Pluteus formation 32 h	-	1000	Kobayashi and Okamura (2002)

Αναφορικά με την τοξική δράση των μεταβολιτών του diuron στο θαλάσσιο περιβάλλον, έχει βρεθεί ότι η DCPMU είναι 215 φορές πιο τοξική από την αρχική ουσία για τη *Daphnia magna*, ενώ η DCPU για τον ίδιο οργανισμό παρουσιάζει χαμηλότερη τοξικότητα από το diuron (Fernandez-Alba et al., 2002). Η τοξική δράση της DCA έχει μελετηθεί για διάφορους οργανισμούς του γλυκού νερού όπως ψάρια (200 μg L⁻¹) (Ensenbach et al., 1996), μικροφύκη (700 – 4400 μg L⁻¹) (Girling et al., 2000), πρωτόζωα (1,5 mg L⁻¹), φυτοπλαγκτονικούς (100 μg L⁻¹) οργανισμούς και δάφνια (<100 μg L⁻¹) (Sosak-Swidarska et al., 1998).

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία οι μελέτες τοξικότητας που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα αφορούν κυρίως στις δυσμενείς επιπτώσεις του irgarol 1051 πάνω σε οργανισμούς του γλυκού νερού, ενώ οι λίγες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αναφορικά με τον κύριο μεταβολίτη της ουσίας M1, επίσης σχετίζονται με οργανισμούς που ζουν σε αντίστοιχα περιβάλλοντα. Η τοξικότητα του diuron έχει μελετηθεί εκτενώς πάνω σε χερσαίους οργανισμούς όμως τα στοιχεία είναι ελλιπή αναφορικά με τους θαλάσσιους οργανισμούς. Αν και στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι γενικά οι μεταβολίτες είναι περισσότερο τοξικοί από τις αρχικές ουσίες, τα ελάχιστα και συχνά αντικρουόμενα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί για τα προϊόντα αποδόμησης του diuron καθιστούν αδύνατη την εξαγωγή συμπερασμάτων σε ότι αφορά την τοξικότητα αυτών των ουσιών. Λόγω των ελλείψεων λοιπόν που παρατηρούνται στη βιβλιογραφία και δεδομένης της παρουσίας και των μεταβολιτών πάντα στο θαλάσσιο περιβάλλον, η μελέτη της τοξικής τους δράσης πάνω σε θαλάσσιους οργανισμούς είναι αναγκαία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

5.1 Κύριος Εξοπλισμός

5.1.1 Υγροχρωματογράφος

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών irgarol 1051 και diuron, καθώς και των μεταβολιτών τους M1, DCPMU, DCPU και DCA σε δείγματα θαλασσινού νερού και θαλάσσιου ιζήματος, χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογράφος υψηλής απόδοσης της Varian (USA) με αντλία 9012 η οποία ήταν συνδεδεμένη με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων Polychrom 9065 (Varian, USA) και εισαγωγή βρόγχου 100 μ L Rheodyne 7161 (Rheodyne, USA). Ο διαχωρισμός των εξεταζόμενων ουσιών πραγματοποιήθηκε πάνω σε στήλη υγροχρωματογραφίας Zorbax SB-C18, 4,6 mm x 15 cm (5 μ m). Η προστασία της στήλης επιτεύχθηκε με χρήση προστήλης Zorbax SB - C18, 4,6 mm x 1,25 cm (5 μ m) (Hewlett Packard, USA). Για τη θερμοστάτηση της στήλης στους 30 °C, χρησιμοποιήθηκε κλίβανος με πλάκες θερμοστάτησης στήλης υγροχρωματογραφίας (Jones Chromatography, England), ενώ το ρεύμα των διαλυτών προθερμαινόταν με θερμαινόμενη αντίσταση που τυλίχθηκε γύρω από το σωλήνα εισαγωγής της κινητής φάσης στη χρωματογραφική στήλη. Η απαέρωση της κινητής φάσης πραγματοποιούνταν με ρεύμα ηλίου. Ο υγροχρωματογράφος ήταν συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είχε εγκατασταθεί το πρόγραμμα επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων και ολοκλήρωσης των χρωματογραφικών κορυφών Star Chromatography Workstation 4.5 (1989-1996, Varian Associates Inc.). Ο υγροχρωματογράφος χρησιμοποιήθηκε στα κεφάλαια 6,7 και 9.

5. 1.2 Αεριοχρωματογράφος

Για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ουσιών irgarol 1051 και M1 χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογράφος Trace GC 2000 συνδεδεμένος με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών Polaris Q (ThermoQuest CE Instruments, Texas, USA). Το σύστημα υποστηριζόταν από αυτόματο δειγματολήπτη AS 2000. Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση

τριχοειδούς στήλης ZB-5 (5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane), 30 m x 0,25 i.d. x 0,25 μm (Phenomenex, UK). Το φέρον αέριο ήταν ήλιο και η ροή του ήταν σταθερή (1 mL min^{-1}) καθόλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Ο όγκος του εισαγόμενου δείγματος ήταν 1 μL . Η τεχνική εισαγωγής ήταν splitless και πραγματοποιούνταν στους 220°C . Η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε ως εξής: από τους 70 στους 175°C με ρυθμό $20^\circ\text{C min}^{-1}$, από τους 175 στους 185°C με ρυθμό 2°C min^{-1} , από τους 185 στους 300°C με ρυθμό $10^\circ\text{C min}^{-1}$ και διατήρηση της τελικής θερμοκρασίας για 2 min. Η θερμοκρασία μεταφοράς διατηρήθηκε σταθερή στους 280°C , ενώ η θερμοκρασία της πηγής ιόντων ήταν 220°C . Ο ιοντισμός και η θραυσματοποίηση των ουσιών πραγματοποιούνταν με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact), ενώ η ενέργεια ιοντισμού ήταν 70 eV. Ο αεριοχρωματογράφος ήταν συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είχε εγκατασταθεί το πρόγραμμα επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων και ολοκλήρωσης των χρωματογραφικών κορυφών Xcalibur 1.2 (1998 - 2000, Thermoquest Corporation). Ο αεριοχρωματογράφος χρησιμοποιήθηκε στα κεφάλαια 8 και 9.

5.2. Βοηθητικός Εξοπλισμός

5.2.1 Φούρνος μικροκυμάτων

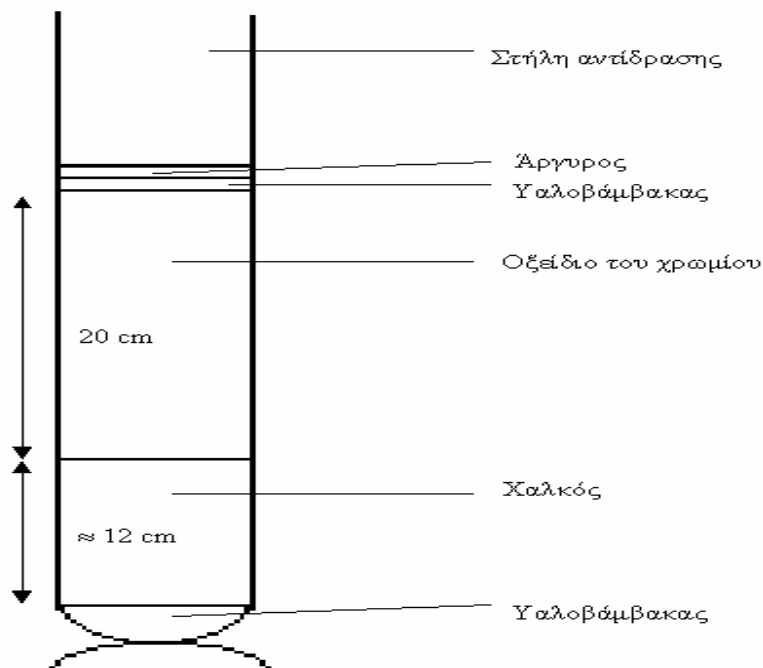
Η εκχύλιση των ουσιών irgarol 1051 και M1 από δείγματα ιζήματος με χρήση μικροκυμάτων πραγματοποιήθηκε με κλειστού τύπου σύστημα εκχύλισης με μικροκύματα MARS-X, με μέγιστη ισχύ 1200 W της CEM (Matthews, NC, USA). Το όργανο διαθέτει περιστροφικό δίσκο 14 θέσεων και η εκχύλιση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία είτε υπό ελεγχόμενη πίεση. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης η θερμοκρασία και η πίεση παρακολουθούνται σε ένα από τα δοχεία (δοχείο αναφοράς) μέσω ενός αισθητήρα, ενώ συγχρόνως ένας δεύτερος αισθητήρας ελέγχει το εσωτερικό του φούρνου μικροκυμάτων για τυχόν διαρροές του διαλύτη εκχύλισης. Στην παρούσα διατριβή η εκχύλιση έγινε υπό σταθερή πίεση 200 psi. Η ισχύς του οργάνου ήταν πάντοτε 100 % η οποία αντιστοιχούσε σε 600 ή 1200 W, ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων που ταυτόχρονα εκχυλιζόταν. Ο χρόνος που χρειαζόταν το όργανο για να φτάσει στις επιθυμητές συνθήκες ήταν 7 min. Ο φούρνος μικροκυμάτων χρησιμοποιήθηκε στα κεφάλαια 8 και 9.

5.2.2 Λουτρό Υπερήχων

Για την απομόνωση των ουσιών irgarol 1051, diuron M1, DCPMU, DCPU και DCA από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με χρήση υπερήχων, χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων της Branson (USA) ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και χρόνου. Το λουτρό υπερήχων χρησιμοποιήθηκε στα κεφάλαια 7 και 9.

5.2.3 Αναλυτής οργανικού άνθρακα

Ο προσδιορισμός της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα των δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος πραγματοποιήθηκε με αναλυτή οργανικού άνθρακα Carlo Erba NA-1500 (Thermoquest, Italy) συνδεδεμένου με αυτόματο δειγματολήπτη (Thermoquest, Italy). Στο εσωτερικό του αναλυτή υπήρχαν η στήλη αντίδρασης (Σχήμα 5.1) και μια στήλη πληρωμένη με υπερχλωρικό μαγνήσιο. Τα δείγματα οδηγούνταν με ρεύμα καθαρού οξυγόνου στο θάλαμο αντίδρασης του οργάνου για την πλήρη καύση τους, ενώ τα παραγόμενα αέρια οδηγούνταν στη συνέχεια στη στήλη αντίδρασης.



Σχήμα 5.1 Στήλη αντίδρασης για τον προσδιορισμό του οργανικού άνθρακα (οι διαστάσεις δεν ανταποκρίνονται σε κανονική κλίμακα).

Στη στήλη αντίδρασης χάρις το στρώμα αργύρου, αρχικά απομακρύνονταν τα αλογόνα και στη συνέχεια με τη βοήθεια του οξυγόνου και του οξειδίου του χρωμίου (καταλυτική δράση) πραγματοποιούνταν οξείδωση η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διοξειδίου του άνθρακα, οξειδίων του αζώτου και νερού. Έπειτα τα αέρια με τη βοήθεια ρεύματος ηλίου περνούσαν πάνω από στρώμα χαλκού. Εκεί απομακρύνονταν η περίσσεια οξυγόνου, τα οξείδια του αζώτου μετατρέπονταν σε άζωτο ενώ το διοξείδιο του άνθρακα παρέμενε ως είχε. Το μίγμα αζώτου, διοξειδίου του άνθρακα και νερού περνούσε στη συνέχεια μέσα από τη στήλη υπερχλωρικού μαγνησίου ώστε να συγκρατηθεί το νερό. Τελικά κατέληγαν σε χρωματογραφική στήλη όπου γινόταν ο διαχωρισμός τους, ενώ η ανίχνευσή τους πραγματοποιούνταν με θερμική αγωγιμότητα. Ο αναλυτής οργανικού άνθρακα ήταν συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή στον οποίο είχε εγκατασταθεί το πρόγραμμα εξεργασίας των αποτελεσμάτων Eager 300 (1990-2001, Thermofinnegan Italy). Ο αναλυτής οργανικού άνθρακα χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 9.

5.2.4 Συσκευή υποδοχής φυσιγγων

Για την απομόνωση των ουσιών irgarol 1051, diuron M1, DCPMU, DCPU και DCA από δείγματα θαλασσινού νερού με την τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης (κεφ. 6), αλλά και για τον καθαρισμό των εκλουσμάτων ιζήματος, χρησιμοποιήθηκε συσκευή υποδοχής φυσιγγων εκχύλισης στερεής φάσης 12 θέσεων και διάταξη εξάτμισης με ρεύμα αζώτου (Alltech, USA). Η συσκευή ήταν συνδεδεμένη με αντλία κενού (Barnant Co, USA ή Bóchi Labortechnik AG, Switzerland) ώστε να δημιουργείται υποπίεση στο εσωτερικό της συσκευής και να είναι έτσι δυνατή η διέλευση των δειγμάτων μέσα από τις φύσσιγγες. Μεταξύ της συσκευής υποδοχής φυσιγγων και της αντλίας συνδεόταν γυάλινο δοχείο 5L για τη συλλογή των αποβλήτων. Η συσκευή υποδοχής φυσιγγων χρησιμοποιήθηκε στα κεφάλαια 6, 7, 8 και 9.

5.2.5 Περιστροφικός εξατμιστήρας

Για τη συμπύκνωση των εκλουσμάτων τους ιζήματος, που προέκυψαν από την εκχύλιση των δειγμάτων με χρήση υπερήχων για τον προσδιορισμό του diuron και των κύριων μεταβολιτών του), χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας Heidolph VV 2000 (Heidolph, Germany) με δυνατότητα ρύθμισης θερμοκρασίας και αριθμού στροφών. Η συμπύκνωση γινόταν με 90 στροφές min^{-1} στους 50 °C. Ο περιστροφικός εξατμιστήρας χρησιμοποιήθηκε στα κεφάλαια 7 και 9.

5.2.6 Φυγόκεντρος

Για το διαχωρισμό των εκλουσμάτων, που προέκυψαν από την εκχύλιση των δειγμάτων με χρήση μικροκυμάτων, από τα αιωρούμενα σωματίδια χρησιμοποιήθηκε φυγόκεντρος B4I (Societe Jouan, UK) τεσσάρων θέσεων με δυνατότητα ρύθμισης του χρόνου φυγοκέντρισης και του αριθμού περιστροφών. Στην παρούσα διατριβή η φυγοκέντριση των εκλουσμάτων γινόταν με 2500 rpm για 5 min. Η φυγόκεντρος χρησιμοποιήθηκε στα κεφάλαια 8 και 9.

5.2.7 Μηχανικός αναδευτήρας

Η ανάδευση των δειγμάτων ιζήματος κατά το στάδιο ανάπτυξης της μεθοδολογίας για την απομόνωση των εξεταζόμενων ουσιών από το στερεό υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μηχανικού αναδευτήρα Unimax 2010 (Heidolph, Germany) με δυνατότητα ρύθμισης του χρόνου ανάδευσης και της ταχύτητας ανάδευσης (αναδεύσεις min⁻¹). Στην παρούσα διατριβή η μηχανική ανάδευση γινόταν για 10 min με ταχύτητα 200 αναδεύσεις min⁻¹. Ο μηχανικός αναδευτήρας χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 7.

5.2.8 Κλίβανος αποστείρωσης

Για την αποστείρωση του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των φυτοπλακτονικών μικροοργανισμών *Dunaliella tertiolecta* και *Navicula forcipata* χρησιμοποιήθηκε κλίβανος αποστείρωσης (Καϊμακέλης, Αθήνα) υπό συνθήκες σταθερής πίεσης (1 atm) και θερμοκρασίας (120 °C), με δυνατότητα ρύθμισης του χρόνου αποστείρωσης. Ο κλίβανος αποστείρωσης χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 10.

5.2.9 Επωαστικός θάλαμος

Η ανάπτυξη των καλλιεργειών των δύο φυτοπλακτονικών μικροοργανισμών *Dunaliella tertiolecta* και *Navicula forcipata* γινόταν μέσα σε επωαστικό θάλαμο (Forma Scientific, USA) υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (20 °C) και συνεχούς φωτισμού (3000 Lux). Ο επωαστικός θάλαμος χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 10.

5.2.10 Μικροσκόπιο

Η καθημερινή μέτρηση του κυτταρικού αριθμού στις καλλιέργειες των δύο φυτοπλαγκτονικών μικροοργανισμών *Dunaliella tertiolecta* και *Navicula forcipata* πραγματοποιούνταν με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου LEITZ Fluovert το οποίο ήταν εφοδιασμένο με πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας και σύστημα φακών μέγιστης μεγέθυνσης 1000X. Το μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 10.

5.2.11 Σταθερό και φορητό pHμετρο

Ο έλεγχος της τιμής του pH του θρεπτικού μέσου των καλλιεργειών των δύο μικροοργανισμών γινόταν με τη βοήθεια σταθερού pHμετρου Crison (Spain). Το σταθερό pHμετρο χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 10.

Το φορητό pHμετρο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των δειγμάτων θαλασσινού νερού στο πεδίο, ήταν τύπου WTW Multiline P4 (Universal meter, UK) και διαθέτει ηλεκτρόδιο SenTix 41-3 για τη μέτρηση της τιμής του pH, ενώ παράλληλα ήταν συνδεδεμένο με ένα δεύτερο ηλεκτρόδιο Tetra Con 325 για τη μέτρηση της αλατότητας και της αγωγιμότητας στα δείγματα. Το ίδιο pHμετρο χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό της τιμής του pH των δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος. Το φορητό pHμετρο χρησιμοποιήθηκε στο κεφάλαιο 9.

5.2.12 Συσκευή παραγωγής υπερκαθαρού νερού

Για την παρασκευή υπερκαθαρού νερού στο Εργαστήριο Ποιότητας Υδάτων και Αέρα χρησιμοποιήθηκε συσκευή MilliQ/MilliRO (Millipore, USA), ενώ στο εργαστήριο του Κέντρου Φυσικής, Περιβάλλοντος και Χημείας χρησιμοποιήθηκε συσκευή Maxima HPLC/LS (ELGA UK). Το υπερκαθαρό νερό τύπου I που παράχθηκε από τη συσκευή MilliQ/MilliRO χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή κινητής φάσης και των διαλυμάτων που εισάγονταν στον υδροχρωματογράφο στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα κεφάλαια 6, 7, 9 (προσδιορισμός diuron και κύριων μεταβολιτών του) καθώς και στο κεφάλαιο 10 για την παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης των διαφόρων αλάτων και βιταμινών. Για τις αναλύσεις του έλαβαν χώρα στα κεφάλαια 8 και 9 (προσδιορισμός irgarol 1051 και κύριου μεταβολίτη του

M1) χρησιμοποιήθηκε νερό που παράχθηκε από συσκευή Maxima HPLC/LS. Και στις δύο περιπτώσεις η ειδική αντίσταση του νερού ήταν 18,2 MΩ·cm.

5.2.13 Ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός

Η ζύγιση των πρότυπων ουσιών για την παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ποιότητας Υδάτων και Αέρα με τη βοήθεια ηλεκτρονικού αναλυτικού ζυγού Mettler AT261 (USA), ενώ εργαστήριο του Κέντρου Φυσικής, Περιβάλλοντος και Χημείας χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός αναλυτικός ζυγός NA 164 (Oertling, UK). Οι περιοχές ζύγισης και των δύο ζυγών ήταν 0 - 205 g και 0 - 62 g με ακρίβεια ζύγισης $\pm 0,1$ mg και $\pm 0,01$ mg αντίστοιχα.

5.2.14 Συσκευή διήθησης

Η συσκευή διήθησης που χρησιμοποιήθηκε για τη διήθηση των δειγμάτων θαλασσινού νερού στα κεφάλαια 6 και 9, για τη διήθηση των εκχυλισμάτων θαλάσσιου ιζήματος στα κεφάλαια 7 και 9 (προσδιορισμός *diuron* και κύριων μεταβολιτών του) καθώς και για τη διήθηση του γηρασμένου θαλασσινού νερού για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου στο κεφάλαιο 10, ήταν της Millipore (USA). Τα φίλτρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν GF/F 0,7 μm από υαλονήματα (Whatman, England).

5.2.15 Πιπέττες μεταβλητού όγκου

Για την παρασκευή των διαφόρων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν πιπέττες μεταβλητού όγκου της Gilson (France) διαφορετικού εύρους όγκων αναρρόφησης η καθεμιά: M-25 (3 – 25 μL και ακρίβεια $\pm 0,15$ - $\pm 0,25$ μL), M-50 (20 – 50 μL και ακρίβεια $\pm 0,34$ έως $\pm 0,50$ μL), M-250 (50 – 250 μL και ακρίβεια $\pm 1,50$ έως $\pm 2,50$ μL) και M-1000 (200 – 1000 μL και ακρίβεια από $\pm 3,00$ έως $\pm 8,00$ μL).

Για την προετοιμασία των καλλιιεργειών των δύο μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε Transferpette πιπέτα της Brand (Germany), εύρους όγκου αναρρόφησης 0,5 – 5 mL και ακρίβειας 0,01 mL.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IRGAROL 1051, ΤΟΥ DIURON ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ

6.1 Εισαγωγή

Η ανάπτυξη γρήγορων και χαμηλού κόστους μεθόδων ανάλυσης των οργανικών ουσιών, είναι επιτακτική τόσο για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεών τους στο περιβάλλον όσο και για την εκτίμηση της τοξικότητάς τους. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις που συχνά ανιχνεύονται στο περιβάλλον, επιβάλλουν την προσυγκέντρωση των δειγμάτων ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός τους με κάποια χρωματογραφική μέθοδο.

Η πιο διαδεδομένη τεχνική απομόνωσης οργανικών ουσιών από περιβαλλοντικά δείγματα είναι η εκχύλιση στερεής φάσης. Η τεχνική αυτή υπερτερεί έναντι των πιο παραδοσιακών μεθόδων όπως αυτή της υγρής-υγρής εκχύλισης, εξαιτίας της ταχύτητάς της, των εύκολων χειρισμών της, την απαίτηση μικρών όγκων οργανικών διαλυτών, τον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό των διαφόρων προσμίξεων από τις προς ανάλυση ουσίες και των μεγαλύτερων συντελεστών προσυγκέντρωσης που μπορούν να επιτευχθούν (Snyder 1997; Fritz, 1999).

Οι δύο πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης στερεής φάσης είναι το είδος του προσροφητικού υλικού που χρησιμοποιείται και ο διαλύτης έκλουσης (Fritz, 1999). Για το λόγο αυτό απαιτείται εκτενής διερεύνηση αυτών των παραμέτρων ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη απόδοση της διαδικασίας της εκχύλισης ενώ ταυτόχρονα θα πρέπει να εξετάζονται και τα διάφορα βήματα που ακολουθούνται κατά τη διαδικασία, ώστε να διασφαλίζεται ότι δεν υπάρχουν απώλειες των εξεταζόμενων ουσιών (Henion and Scribe, 1993).

Μια αναλυτική μέθοδος για να θεωρηθεί βέλτιστη θα πρέπει εκτός των άλλων να παραμένει ανεπηρέαστη κάτω από διαφορετικές συνθήκες χωρίς να παρατηρούνται διαφορές στα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό βασικό στάδιο κατά την ανάπτυξη της μεθοδολογίας αποτελεί ο έλεγχος της ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης σε μικρές μεταβολές των διαφόρων παραμέτρων που σχετίζονται με αυτή (ICH, 1995).

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μεθόδου για την ταυτόχρονη απομόνωση του irgarol 1051, του diuron και των κύριων μεταβολιτών τους από δείγματα θαλασσινού νερού, με την τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης, καθώς και η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση χρωματογραφικής ανάλυσης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ουσιών αυτών με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή τόξου διόδων. Για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας της εκχύλισης, εξετάστηκαν συνολικά τρεις τύποι φυσίγγων εκχύλισης (δύο πολυμερή προσροφητικά υλικά και ένα C18) και τρεις διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες έκλουσης, ενώ συγχρόνως ελέγχθηκαν τα διάφορα στάδια της διαδικασίας για τον προσδιορισμό τυχόν απωλειών των εξεταζόμενων ουσιών. Για τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής ανάλυσης διερευνήθηκαν η επίδραση της θερμοκρασίας της στήλης, του χρόνου ανάλυσης, της αναλογίας των διαλυτών της αρχικής κινητής φάσης και της ροής της κινητής φάσης στο χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η ανθεκτικότητα της μεθόδου ανάλυσης σε μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας της στήλης, της ροής της κινητής φάσης και της αρχικής αναλογίας των διαλυτών της κινητής φάσης. Η βέλτιστη μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε σε φυσικά δείγματα θαλασσινού νερού.

Σύμφωνα με την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας, μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό όλων των παραπάνω ουσιών με εκχύλιση στερεής φάσης και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων. Διάφοροι ερευνητές μάλιστα αναφέρουν ότι στα ίδια δείγματα ο προσδιορισμός των τριαζινών (irgarol 1051 και M1) πραγματοποιείται με τη βοήθεια αεριοχρωματογραφίας, ενώ αντίθετα οι ουρίες αναλύονται με χρήση υγροχρωματογραφίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αύξηση του χρόνου ανάλυσης των δειγμάτων. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής για πρώτη φορά γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό των έξι irgarol1051, M1, diuron, DCPMU, DCPU και DCA σε μίγμα. Επιπλέον θα πρέπει να τονιστεί ότι στις έρευνες που κατά καιρούς έχουν δημοσιευτεί και αφορούν τόσο στην ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού αυτών των ουσιών σε δείγματα θαλασσινού νερού όσο και στην παρακολούθηση των συγκεντρώσεών τους στο θαλάσσιο περιβάλλον, το τελικό προϊόν μεταβολισμού του diuron (DCA) δεν έχει μέχρι τώρα μελετηθεί. Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου που αναπτύχθηκε επίσης πραγματοποιείται για πρώτη φορά. Στοιχεία αναφορικά με τη συντήρηση δειγμάτων θαλασσινού νερού που πρόκειται να αναλυθούν για τις παραπάνω ουσίες επίσης δεν υπάρχουν.

6.2 Δειγματοληψία

Για την ανάπτυξη της μεθόδου προσδιορισμού των έξι ουσιών, δείγματα θαλασσινού νερού συλλέχθηκαν από το Αιγαίο Πέλαγος, ανοιχτά της πόλης της Μυτιλήνης (Λέσβος). Πριν την έναρξη των διαφόρων πειραμάτων το θαλασσινό νερό αναλύθηκε ώστε να επιβεβαιωθεί ότι δεν είναι επιβαρυνμένο με τις προς εξέταση ουσίες.

Επιπλέον, δείγματα θαλασσινού νερού συλλέχθηκαν από βάθος 30 cm (ένα σημείο δειγματοληψίας) από τις μαρίνες της Καλαμάτας και της Πάτρας καθώς και από τα λιμάνια της Ρόδου και της Μυτιλήνης. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από το Μάρτιο ως τον Ιούλιο του 2002. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε σκουρόχρωμα γυάλινα μπουκάλια τα οποία τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι, στους 4 °C μέχρι την ανάλυση.

6.3 Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός (κύριος και βοηθητικός) που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτού του κεφαλαίου περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.

6.4 Αντιδραστήρια

Ακετονιτρίλιο για HPLC (Merck, Germany)

Μεθανόλη για HPLC (Merck, Germany)

Διχλωρομεθάνιο για ανάλυση φυτοφαρμάκων (BDH, England)

Υπερκαθαρό νερό που παράχθηκε στο εργαστήριο

Πρότυπες ουσίες irgarol 1051, diuron, DCPMU, DCPU, DCA (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Germany)

Πρότυπη ουσία M1 (Additive Hellas, Ελλάδα)

Διαλύματα παρακαταθήκης των έξι ουσιών σε μεθανόλη, 1000 mg L⁻¹

Άζωτο καθαρότητας 99,999 % (Messer, Austria)

Ήλιο καθαρότητας 99,999 % (Messer, Austria)

Οξικό οξύ για HPLC (BDH, England)

NH₄OH (Sigma, USA)

6.5 Μεθοδολογία

6.5.1 Διαδικασία της εκχύλισης

Όγκος δείγματος θαλασσινού νερού ίσος με 500 mL διηθήθηκε χρησιμοποιώντας φίλτρα GF/F 0,7 μm από υαλονήματα (Whatman, England) και επιφορτίστηκε με πρότυπο διάλυμα των εξεταζόμενων ουσιών, σε μεθανόλη, σε συγκέντρωση 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Τα επιφορτισμένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 10 min ώστε να διασφαλιστεί η ομοιόμορφη κατανομή των ουσιών στο διάλυμα και στη συνέχεια αφέθηκαν σε ηρεμία επί 10 min ώστε να επέλθει ισορροπία. Η απομόνωση των έξι ουσιών από τα επιφορτισμένα δείγματα του θαλασσινού νερού πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της μη αυτοματοποιημένης (off-line) εκχύλισης στερεής φάσης. Για το σκοπό αυτό φύσιγγες προσαρμόστηκαν σε συσκευή υποδοχής φυσιγγών εκχύλισης στερεής φάσης. Οι φύσιγγες αρχικά καθαρίστηκαν με 10 mL ακετονιτριλίου (ροή $\approx 0,5 \text{ mL min}^{-1}$) και κατόπιν ενεργοποιήθηκαν με 10 mL μεθανόλης και 10 mL υπερκαθαρού νερού (ροή $\approx 0,5 \text{ mL min}^{-1}$). Τα δείγματα αναρροφήθηκαν μέσω των φυσιγγών με ροή 10 mL min^{-1} . Οι φύσιγγες καθαρίστηκαν με 4 x 2,5 mL υπερκαθαρού νερού και ξηράθηκαν με ρεύμα αέρα για 3 min. Η έκλυση των προσροφημένων ουσιών στις φύσιγγες πραγματοποιήθηκε με 3 x 2 mL μεθανόλης. Η μεθανόλη εξατμίστηκε προσεκτικά μέχρις όγκου 500 μL με ρεύμα αζώτου, στους 35 °C. Ο τελικός όγκος των δειγμάτων πριν την ανάλυση αυξήθηκε σε 1 mL, με προσθήκη 500 μL αρχικής κινητής φάσης (20 % ακετονιτρίλιο – 80 % νερό).

6.5.2 Διερεύνηση δυνητικών απωλειών κατά την εκχύλιση

Για να διασφαλιστεί ότι δεν υπάρχουν απώλειες των έξι ουσιών κατά την εκχύλιση στερεής φάσης και κατά την εξάτμιση με ρεύμα αζώτου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα, ένα για τον έλεγχο κάθε σταδίου που ακολουθείται κατά την προεπεξεργασία, χρησιμοποιώντας 50 mL πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ της κάθε ουσίας σε μίγμα μεθανόλης – νερού (αναλογία 3:1). Επειδή η ποσότητα της μεθανόλης ήταν μεγάλη, αρχικά χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστής ώστε να εκδιωχθεί ο οργανικός διαλύτης. Όμως και η εξάτμιση με περιστροφικό εξατμιστή ελέγχθηκε ώστε να εξασφαλιστεί ότι οι ουσίες δεν εξατμίζονται μεταβάλλοντας έτσι τη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα και αλλοιώνοντας τα τελικά αποτελέσματα..

6.5.2.1 Έλεγχος εξάτμισης με περιστροφικό εξατμιστή

Κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος 50 mL πρότυπου διαλύματος εξατμίστηκαν στους 50 °C, με περιστροφικό εξατμιστή μέχρι όγκου 10 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 40 mL διαλύματος μεθανόλης – νερού (3:1) και ακολούθησε ανάλυση του δείγματος με HPLC-DAD.

6.5.2.2 Έλεγχος εκχύλισης στερεής φάσης

Κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος 50 mL διαλύματος εξατμίστηκαν στους 50 °C, με περιστροφικό εξατμιστή μέχρι όγκου 10 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 mL υπερκαθαρού νερού και το δείγμα εκχυλίστηκε με εκχύλιση στερεής φάσης με τη χρήση φυσιγγών C18 (500 mg, 6 mL, Sep-Pak Vac, Waters, Ireland). Ακολούθησε έκλουση των ουσιών από της φυσιγγες με 6 ml μεθανόλης. Στο έκλουσμα προστέθηκαν 44 mL διαλύματος μεθανόλης – νερού (3:1) και το δείγμα αναλύθηκε με HPLC-DAD.

6.5.2.3 Έλεγχος εξάτμισης με ρεύμα αζώτου

Κατά τη διάρκεια αυτού του πειράματος 50 mL διαλύματος εξατμίστηκαν στους 50 °C, με περιστροφικό εξατμιστή μέχρι όγκου 10 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 mL υπερκαθαρού νερού και το δείγμα εκχυλίστηκε με εκχύλιση στερεής φάσης με τη χρήση φυσιγγών C18. Ακολούθησε έκλουση των ουσιών από της φυσιγγες με 6 mL μεθανόλης και το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι όγκου 500 μ L με ρεύμα αζώτου στους 35 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 49,5 mL μίγματος μεθανόλης – νερού και το δείγμα αναλύθηκε με HPLC-DAD.

6.5.3 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης

Για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας της εκχύλισης εξετάστηκαν δύο παράμετροι: το είδος του προσροφητικού υλικού των φυσιγγών και ο τύπος του οργανικού διαλύτη έκλουσης. Στα πειράματα που έλαβαν χώρα ελέγχθηκε η αποδοτικότητα εκχύλισης δύο ειδών προσροφητικού υλικού: του χημικά προσδεδεμένου δεκαοκτυλίου σε πυριτικά σωματίδια (C18) και της μη ιοντικής ρητίνης πολυμερούς στυρενίου- διβινυλ-βενζολίου (SDVB) (500 mg, 6 mL Envichrom-P, Supelco, USA) και υδροξυλιωμένου πολυστυρενίου – διβινυλοβενζολίου (500 mg, 6 mL, Isolute ENV+, IST, UK). Οι οργανικοί διαλύτες που εξετάστηκαν για την ικανότητα έκλουσης των ουσιών από τα προσροφητικά υλικά ήταν το

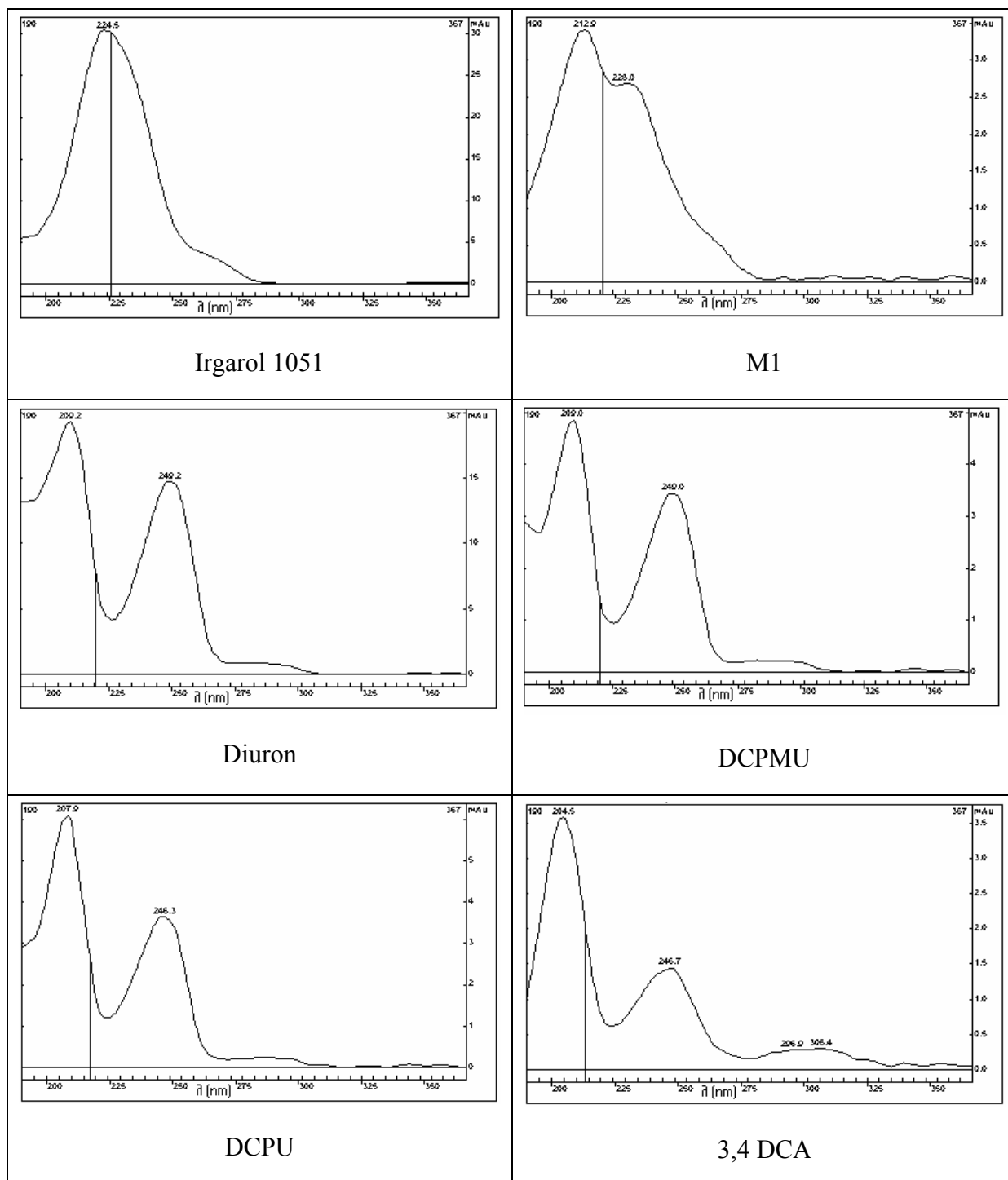
διχλωρομεθάνιο, το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη. Το διχλωρομεθάνιο και το ακετονιτρίλιο εξετάστηκαν από κοινού ως μίγμα σε αναλογία 5:1 (διχλωρομεθάνιο:ακετονιτρίλιο). Η μεθανόλη ελέγχθηκε και με τη μορφή όξινης και βασικής μεθανόλης. Η όξινη μεθανόλη ήταν μίγμα οξικού οξέος 20 % v/v σε μεθανόλη, ενώ η βασική ήταν μίγμα NH_4OH επίσης 20 % v/v σε μεθανόλη. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Statgraphics (version 4.0 STSC Inc. and statistical graphics corporation, 1989). Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Least Significant Difference (LSD) για επίπεδο σημαντικότητας 0,05 διερευνήθηκε αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ανακτήσεων.

6.5.4 Ανάλυση με HPLC-DAD

Για την ανάλυση των δειγμάτων θαλασσινού νερού χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση η οποία αποτελούνταν από ακετονιτρίλιο / νερό. Η σύσταση των διαλυτών μεταβαλλόταν από 20/80 % ακετονιτρίλιο / νερό σε 100 % ακετονιτρίλιο σε 25 min. Η κινητή φάση απαερωνόταν για 10 min με ήλιο πριν την έναρξη της ανάλυσης. Η ροή της κινητής φάσης ήταν $1,7 \text{ ml min}^{-1}$ ενώ η θερμοκρασία της στήλης ήταν $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Ο όγκος του εγχυόμενου δείγματος ήταν 100 μL . Η διήθηση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν με φίλτρα Millex, $0,45 \mu\text{m}$ (Milipore, USA). Το μήκος κύματος του ανιχνευτή ήταν 220 nm για το irgarol 1051 και το M1 και 244 nm για το diuron και τους μεταβολίτες του.

Η αναγνώριση των εξεταζόμενων ουσιών στα δείγματα θαλασσινού νερού πραγματοποιήθηκε βάσει των χρόνων συγκράτησης των ουσιών και της σύγκρισης μεταξύ των φασμάτων απορρόφησης UV των ουσιών σε πρότυπα διαλύματα (τα οποία παρασκευάστηκαν από τα διαλύματα παρακαταθήκης με κατάλληλες αραιώσεις) (Σχήμα 6.1) και των φασμάτων απορρόφησης των κορυφών που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα. Για την αποδοχή των αποτελεσμάτων η ομοιότητα μεταξύ των φασμάτων έπρεπε να είναι ίση ή μεγαλύτερη από 99 %.



Σχήμα 6.1 Φάσματα απορρόφησης των έξι ουσιών σε πρότυπο διάλυμα.

6.5.5 Βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης

Για τη βελτιστοποίηση της ανάλυσης των δειγμάτων με HPLC-DAD εξετάστηκε ο διαχωρισμός των έξι ουσιών με ταυτόχρονη μεταβολή της θερμοκρασίας και της ισχύος του

διαλύτη ώστε εξευρεθούν η βέλτιστη θερμοκρασία της στήλης και ο βέλτιστος χρόνος ανάλυσης.

Κριτήριο για τον βέλτιστο διαχωρισμό μεταξύ των ουσιών ήταν ο συντελεστής διαχωρισμού R_s , ο οποίος υπολογίστηκε αυτόματα από το λογισμικό πρόγραμμα του υδροχρωματογράφου του συστήματος (το οποίο περιγράφεται στο κεφ. 5).

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τέσσερα βαθμωτά πειράματα οι συνθήκες των οποίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.2.

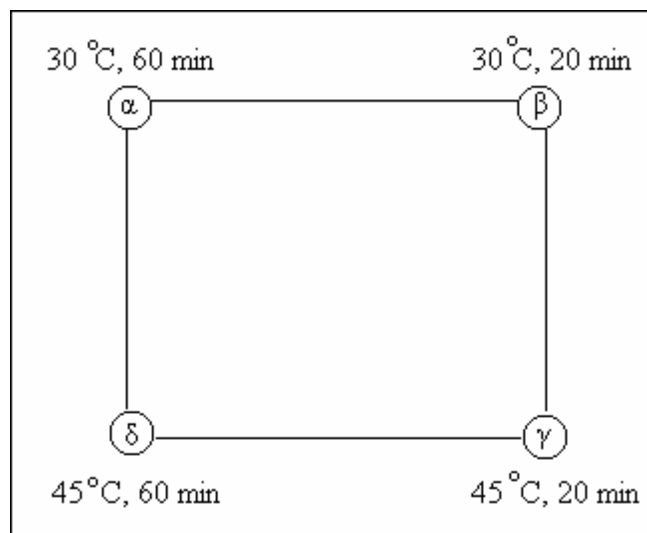
Εξετάστηκαν δύο επίπεδα θερμοκρασιών της στήλης: 30 και 45 °C. Κατά την θέρμανση της στήλης, το ρεύμα των διαλυτών προθερμαινόταν με θερμαινόμενη αντίσταση που τυλίχθηκε γύρω από το σωλήνα εισαγωγής της κινητής φάσης στη στήλη. Το περιεχόμενο της κινητής φάσης σε ακετονιτρίλιο μεταβαλλόταν από 20 % σε 100 % μέσα σε 20 ή 60 min. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 2 mL min⁻¹. Η συγκέντρωση για κάθε ουσία του μίγματος ήταν 500 μg L⁻¹.

Για την επιλογή της καλύτερης αρχικής αναλογίας μεταξύ ακετονιτρίλιου και νερού πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα. Εξετάστηκε η αναλογία 20 % ακετονιτρίλιο – 80 % νερό και η αναλογία 30 % ακετονιτρίλιο – 70 % νερό.

Η ροή της κινητής φάσης επίσης ελέγχθηκε. Τα επίπεδα που εξετάστηκαν ήταν τέσσερα: 1,3, 1,5, 1,7 και 2,0 mL min⁻¹.

Τελικά λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού ($R_s > 1,5$) του *irgarol* 1051 του *diuron* και των μεταβολιτών οι οποίες ήταν:

- θερμοκρασία στήλης: 30 °C
- ροή κινητής φάσης: 1,7 mL min⁻¹
- αρχική αναλογία ακετονιτρίλιου – νερού: 20 % - 80 %



Σχήμα 6.2 Πειραματικές συνθήκες βελτιστοποίησης του διαχωρισμού με ταυτόχρονη μεταβολή της ισχύος του διαλύτη και της θερμοκρασίας.

6.5.6 Έλεγχος της ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης

Η ανθεκτικότητα της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης που αναπτύχθηκε, εξετάστηκε χρησιμοποιώντας πρότυπο διάλυμα μίγματος των έξι ουσιών, συγκέντρωσης $500 \mu\text{g L}^{-1}$, σε αρχική κινητή φάση. Μελετήθηκε η επίδραση τριών παραγόντων που σχετίζονται με τη χρωματογραφική ανάλυση και οι οποίοι είναι δυνατόν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητά της όταν μεταβάλλονται κατά ± 1 επίπεδο. Οι παράγοντες αυτοί ήταν η θερμοκρασία της στήλης, η ροή της κινητής φάσης και η αρχική ισχύς του ακετονιτριλίου (Πίνακας 6.1). Το πείραμα ελέγχου της ανθεκτικότητας, επικεντρώθηκε στην επίδραση που έχουν οι λειτουργικοί αυτοί παράγοντες πάνω στην ευαισθησία του προσδιορισμού των εξεταζόμενων ουσιών (εμβαδόν κορυφής), καθώς και πάνω σε χρωματογραφικές παραμέτρους όπως είναι ο χρόνος συγκράτησης των ουσιών πάνω στη στήλη (t_R) και ο διαχωρισμός μεταξύ των ουσιών (R_s).

Πίνακας 6.1 Επίπεδα των παραγόντων που εξετάστηκαν κατά τον έλεγχο ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου.

Παράγοντας	Επίπεδο (-1)	Ονομαστικό επίπεδο	Επίπεδο (+1)
Θερμοκρασία στήλης (°C)	29	30	31
Ροή κινητής φάσης (mL min ⁻¹)	1,6	1,7	1,8
Αρχική ισχύς του ακετονιτριλίου (%)	19	20	21

Η επίδραση κάθε παράγοντα πάνω στην απόκριση της κάθε παραμέτρου υπολογίστηκε σύμφωνα με τη σχέση:

$$E_x = Y_i(+)-Y_i(-) \quad (6.1)$$

Όπου E_x είναι η επίδραση του εκάστοτε παράγοντα X (θερμοκρασία στήλης, ροή κινητής φάσης και % ακετονιτρίλιο) πάνω στην απόκριση Y της κάθε παραμέτρου (t_R , R_s , εμβαδόν κορυφής) όταν ο παράγοντας αυτός μεταβάλλεται κατά ± 1 επίπεδο. Διαιρώντας την επίδραση E_x του παράγοντα X , με την απόκριση που παρατηρείται στο ονομαστικό επίπεδο Y_n της κάθε παραμέτρου και πολλαπλασιάζοντας το πηλίκο επί 100, υπολογίστηκε η κανονικοποιημένη τιμή της επίδρασης E_x όπως φαίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\%E_x = \frac{E_x}{Y_n} \times 100 \quad (6.2)$$

Ονομαστική απόκριση καλείται η απόκριση κάθε παραμέτρου όταν το πείραμα λαμβάνει χώρα σε συνθήκες όπου όλοι οι παράγοντες βρίσκονται στο ονομαστικό βέλτιστο επίπεδο (Morgan, 1991).

Για να εξεταστεί κατά πόσο ένας παράγοντας επηρεάζει σημαντικά τις αποκρίσεις των παραμέτρων, υπολογίστηκε η κρίσιμη τιμή E_{crit} της επίδρασης E_x και συγκρίθηκε με την επίδραση του παράγοντα. Ένας παράγοντας θεωρείται ότι επηρεάζει σημαντικά την απόκριση μιας παραμέτρου αν η απόλυτη κανονικοποιημένη τιμή της επίδρασης του παράγοντα (E_x) είναι μεγαλύτερη από την κανονικοποιημένη κρίσιμη τιμή της επίδρασης, δηλαδή θα πρέπει να ισχύει ότι $|\%E_x| \geq \%E_{crit}$ (Morgan, 1991). Η τιμή E_{crit} υπολογίστηκε σύμφωνα με τη σχέση:

$$E_{\text{crit}} = t_{\text{crit}} \times (SE)_e \quad (6.3)$$

Όπου t_{crit} είναι η τιμή t που υπολογίζεται βάσει στατιστικών πικάνων για αριθμό βαθμών ελευθερίας ανάλογα με τον τρόπο που υπολογίζεται το τυπικό σφάλμα $(SE)_e$. Αν η μηδενική υπόθεση είναι ότι ο παράγοντας δεν επηρεάζει την απόκριση των παραμέτρων ($H_0: E_x = 0$), τότε το τυπικό σφάλμα υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{2s^2}{N}} \quad (6.4)$$

Όπου s είναι η τυπική απόκλιση της απόκρισης στις ονομαστικές βέλτιστες τιμές κάθε παράγοντα και N είναι ο αριθμός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν. Ο αριθμός των βαθμών ελευθερίας για την τιμή t_{crit} (για διάστημα εμπιστοσύνης 95 %) είναι ίσος με $N-1$. Με τα πειράματα αυτά εκτιμήθηκε η επίδραση του κάθε παράγοντα (θερμοκρασία στήλης (T), ροή κινητής φάσης (F) και % ακετονιτρίλιο (S)) πάνω στην απόκριση της κάθε παραμέτρου (t_R , R_s και εμβαδόν κορυφής).

Αν η μηδενική υπόθεση είναι ότι οι αποκρίσεις του κάθε παράγοντα στο επίπεδο -1 και στο επίπεδο $+1$ είναι ίσες μεταξύ τους ($H_0: Y_{(+)} = Y_{(-)}$), τότε το τυπικό σφάλμα $(SE)_e$ υπολογίζεται σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$(SE)_e = \sqrt{\frac{2(s_{(+)}^2 + s_{(-)}^2)}{N}} \quad (6.5)$$

Όπου $s_{(+)}$ και $s_{(-)}$ είναι οι τυπικές αποκλίσεις της απόκρισης της κάθε παραμέτρου στο επίπεδο $+1$ και -1 αντίστοιχα (Morgan, 1991, Vander-Heyden et al., 1995). N είναι ο αριθμός των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε καθένα από τα δύο επίπεδα, ενώ οι βαθμοί ελευθερίας για την τιμή t_{crit} είναι $N-2$. Με τα πειράματα που έλαβαν χώρα στην ενότητα αυτή, εξετάστηκε η επίδραση του κάθε παράγοντα, στο χαμηλότερο και στο υψηλότερο επίπεδο, πάνω στην απόκριση της κάθε παραμέτρου.

6.5.7 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας

Η βαθμονόμηση του οργάνου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα των έξι ουσιών σε εννέα διαφορετικές συγκεντρώσεις (10, 25, 40, 60, 120, 250, 500, 1250 και

2500 $\mu\text{g L}^{-1}$), στην αρχική κινητή φάση, τα οποία αναλύθηκαν αμέσως χωρίς καμία προεπεξεργασία. Για κάθε συγκέντρωση υπήρξαν τρεις διαφορετικές επαναλήψεις.

Το όριο ανίχνευσης (LOD) της κάθε ουσίας προσδιορίστηκε ως τρεις φορές η τυπική απόκλιση του θορύβου (S_b) δέκα διαφορετικών τυφλών δειγμάτων θαλασσινού νερού, τα οποία υπέστησαν την ίδια ακριβώς προεπεξεργασία όπως και τα επιφορτισμένα με τις έξι ουσίες δείγματα. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{LOQ} = 3,3 \times \text{LOD} \quad (6.6)$$

Η πιστότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε πραγματοποιώντας πειράματα επαναληψιμότητας (πιστότητα την ίδια μέρα) και αναπαραγωγιμότητας (πιστότητα μεταξύ διαφορετικών ημερών). Για την εκτίμηση της πιστότητας της μεθόδου την ίδια μέρα ($n=5$) πέντε διαφορετικά δείγματα θαλασσινού νερού επιφορτίστηκαν με συγκέντρωση 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ των εξεταζόμενων ουσιών και αναλύθηκαν την ίδια μέρα. Για την εκτίμηση της πιστότητας της μεθόδου μεταξύ διαφορετικών ημερών, δύο δείγματα θαλασσινού νερού επιφορτίστηκαν με συγκέντρωση 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ των εξεταζόμενων ουσιών και αναλύθηκαν σε τρεις διαφορετικές ημέρες ($k=3$).

Για την εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου, εκτελέστηκαν πειράματα ανάκτησης. Δείγματα θαλασσινού νερού επιφορτίστηκαν με τις έξι ουσίες σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (0,1, 0,2 και 1 $\mu\text{g L}^{-1}$) και αναλύθηκαν.

6.5.8 Σταθερότητα των ουσιών υπό εργαστηριακές συνθήκες

Για τη μελέτη της σταθερότητας των έξι ουσιών υπό εργαστηριακές συνθήκες, δείγματα θαλασσινού νερού επιφορτίστηκαν με συγκέντρωση 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ των ουσιών και εκχυλίστηκαν πάνω σε φύσιγγες C18 σύμφωνα με την παράγραφο 6.5.1. Μέρος των δειγμάτων αναλύθηκε τη μηδενική ημέρα, ενώ οι υπόλοιπες φύσιγγες τοποθετήθηκαν στους $-18\text{ }^\circ\text{C}$ και αναλύθηκαν την 30^η, την 60^η και την 90^η ημέρα. Μια άλλη σειρά δειγμάτων αρχικά οξινίστηκαν, με τη χρήση HCl ($\text{pH} = 2$), και στη συνέχεια επιφορτίστηκαν πάλι με την ίδια συγκέντρωση των ουσιών και τοποθετήθηκαν στους $4\text{ }^\circ\text{C}$. Τα δείγματα αυτά αναλύθηκαν επίσης την 30^η, την 60^η και την 90^η μέρα χρησιμοποιώντας φύσιγγες C18 και ακολουθώντας την ίδια διαδικασία όπως και κατά τη μηδενική ημέρα. Δεδομένου ότι ουσίες που ανήκουν στην ίδια χημική κατηγορία συμπεριφέρονται παρόμοια, εξετάστηκαν μόνο οι ουσίες irgarol 1051 και diuron. Η εξέταση μόνο των αρχικών ουσιών πραγματοποιήθηκε και για έναν ακόμη λόγο: για να

διερευνηθούν τυχόν προϊόντα αποδόμησης των δύο ουσιών κατά τη συντήρηση των δειγμάτων.

6.6 Αποτελέσματα και συζήτηση

6.6.1 Προσδιορισμός δυνητικών απωλειών κατά την εκχύλιση

Η εξέταση των διαφόρων σταδίων που ακολουθούνται κατά την προεπεξεργασία των δειγμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχουν απώλειες των εξεταζόμενων ουσιών λόγω εξάτμισής τους ή ανεπαρκούς εκχύλισής τους στις φύσιγγες C18. Οι ανακτήσεις των ουσιών κυμάνθηκαν από 106 ως 120 % ενώ οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις ήταν ≤ 13 % όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2 Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) του irgarol 1051, του diuron και των μεταβολιτών τους κατά τον έλεγχο των σταδίων προεπεξεργασίας του δείγματος.

Ουσία	Εξάτμιση με περιστροφικό εξατμιστή		Διαδικασία της SPE		Εξάτμιση με ρεύμα αζώτου	
	Ανάκτηση (%)	R.S.D. (%)	Ανάκτηση (%)	R.S.D. (%)	Ανάκτηση (%)	R.S.D. (%)
DCPU	108	8,18	107	11,2	111	3,10
DCPMU	107	6,10	108	11,9	111	1,99
M1	108	9,22	106	9,94	103	5,84
Diuron	111	8,78	107	9,86	111	3,06
DCA	116	11,9	120	13,0	107	11,8
Irgarol 1051	107	8,74	107	10,4	107	6,06

Οι υψηλές ανακτήσεις (> 100 %) πιθανότατα οφείλονται στη διαφορετική σύνθεση των διαλυτών των δειγμάτων (75 % μεθανόλη – 25 % νερό) που εισήχθησαν στην HPLC και της κινητής φάσης του συστήματος (20 % ακετονικρίλιο – 80 % νερό) που είχε ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση του πλάτους των χρωματογραφικών κορυφών των έξι ουσιών.

6.6.2 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης της διαδικασίας εκχύλισης (Πίνακες 6.3 - 6.5), οι ανακτήσεις των έξι ουσιών κυμάνθηκαν από 20 ως 111 % για τις φύσιγγες Sep-Pak ενώ τα RSDs ήταν χαμηλότερα από 10 % για όλες τις ουσίες εκτός από τη DCA για την οποία παρατηρήθηκαν RSDs 15 και 32 % όταν χρησιμοποιήθηκε διαλύτης έκλουσης μίγμα διχλωρομεθανίου-ακετονιτριλίου και βασική μεθανόλη αντίστοιχα. Οι πιο ικανοποιητικές ανακτήσεις για όλες τις ουσίες παρατηρήθηκαν όταν η έκλουση έγινε με ουδέτερη μεθανόλη. Το μίγμα διχλωρομεθανίου-ακετονιτριλίου έδωσε ελαφρώς χαμηλότερες ανακτήσεις για το irgarol 1051. Η όξινη μεθανόλη έδωσε ικανοποιητικές ανακτήσεις για τις περισσότερες ουσίες αλλά για το irgarol 1051 και τη DCPU οι τιμές ήταν ελαφρώς χαμηλότερες. Παρόμοια συμπεριφορά των ουσιών παρατηρήθηκε και όταν η έκλουση έγινε με βασική μεθανόλη αλλά όπως αποδείχθηκε, ο διαλύτης αυτός είναι ακατάλληλος για την εκρόφιση της DCA από τις φύσιγγες, με αποτέλεσμα η παρατηρούμενη σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων της ουσίας σε αυτή την περίπτωση να είναι πολύ υψηλή (32 %). Οι ελαφρώς χαμηλότερες ανακτήσεις του irgarol 1051 και της DCPU που παρατηρήθηκαν κατά την έκλουση με όξινη ή βασική μεθανόλη, πιθανόν να οφείλονται στο γεγονός ότι και οι δύο ουσίες είναι ενδιάμεσης πολικότητας. Επομένως απαιτείται για την έκλουσή τους ένας πολικός διαλύτης όπως είναι η ουδέτερη μεθανόλη αλλά όχι διαλύτες περισσότερο (όπως η όξινη ή η βασική μεθανόλη) ή λιγότερο πολικοί (όπως το μίγμα διχλωρομεθανίου-ακετονιτριλίου) από την ουδέτερη μεθανόλη ή μη πολικοί διαλύτες (όπως το εξάνιο).

Πίνακας 6.3 Μέση ανάκτηση και τυπικές αποκλίσεις, RSDs (% , n=3) των έξι ουσιών κατά τη βελτιστοποίηση του διαλύτη έκλουσης. Φύσιγγες εκχύλισης C18 (Sep-Pak).

Ουσία	Έκλουση με μίγμα διγλωρομεθανίου – ακετονιτριλίου		Έκλουση με ουδέτερη μεθανόλη		Έκλουση με όξινη μεθανόλη		Έκλουση με βασική μεθανόλη	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
DCPU	91,5 ^{αβ}	3,98	98,7 ^β	1,33	86,8 ^α	8,10	86 ^α	6,04
DCPMU	99,4 ^α	2,05	91,4 ^β	1,71	95,4 ^{αβ}	6,84	98,8 ^{αβ}	3,67
M1	87,1 ^{αβ}	3,24	79,4 ^α	8,64	101 ^γ	10,6	94,4 ^{βγ}	4,56
Diuron	111 ^α	10,5	102 ^{αβ}	2,72	98,2 ^{αβ}	8,34	96,8 ^β	4,40
DCA	19,9 ^α	15,2	30,3 ^β	2,29	34,6 ^β	3,63	27,1 ^{αβ}	32,0
Irgarol 1051	89,8 ^α	2,32	107 ^β	5,99	80,6 ^α	9,97	87,8 ^α	5,51

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα (γράμματα) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

Η χαμηλή ανάκτηση της DCA ίσως να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ουσίας και διαφόρων προσμίξεων που υπάρχουν στο θαλασσινό νερό και πιθανότατα στη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα στη DCA και στις ομάδες κινόνης (quinone groups) των χουμικών ενώσεων που είναι παρούσες στα δείγματα (Di Corcia et al., 1999). Σε καμία περίπτωση όμως δεν μπορεί να αποδοθεί σε απώλειες της ουσίας λόγω εξάτμισης, παρόλο που η DCA εμφανίζει σχετικά υψηλή τάση ατμών (0,00632 mm Hg), ούτε και σε ανεπαρκή προσρόφησή της πάνω στις φύσιγγες εκχύλισης όπως αναφέρεται στην ενότητα 6.6.1.

Η εκχύλιση πάνω σε φύσιγγες SDVB (Envi-Chrom P) παρουσίασε επίσης ικανοποιητικές ανακτήσεις για όλες τις ουσίες, οι οποίες κυμάνθηκαν από 71 ως 104 % όταν η έκλουση πραγματοποιήθηκε με ουδέτερη μεθανόλη (Πίνακας 6.4). Εντούτοις όμως οι τυπικές αποκλίσεις των ανακτήσεων των εξεταζόμενων ουσιών ήταν υψηλότερες σε σχέση με αυτές των φύσιγγων C18 (διακύμανση του RSD από 7,4 % ως 21 %).

Πίνακας 6.4 Μέση ανάκτηση και τυπικές αποκλίσεις, RSDs (% , n=3) των έξι ουσιών κατά τη βελτιστοποίηση του διαλύτη έκλουσης. Φύσιγγες εκχύλισης SDVB (Envi-Chrom P).

Ουσία	Έκλουση με μίγμα διχλωρομεθανίου – ακετονιτριλίου		Έκλουση με ουδέτερη μεθανόλη	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
DCPU	94,7 ^a	7,70	89,0 ^a	7,54
DCPMU	97,0 ^a	9,30	104 ^a	7,76
M1	110 ^a	4,39	71,2 ^b	11,6
Diuron	107 ^a	8,30	88,1 ^b	7,44
DCA	46,5 ^a	18,7	74,1 ^a	21,1
Irgarol 1051	85,0 ^a	9,17	70,9 ^a	13,9

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα (γράμματα) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

Οι ανακτήσεις των εξεταζόμενων ουσιών μετά από εκχύλιση δειγμάτων θαλασσινού νερού πάνω σε φύσιγγες Isolute ENV+ (Πίνακας 6.5), κυμάνθηκαν από 69 ως 94% όταν η έκλουση πραγματοποιήθηκε με μεθανόλη και από 60 ως 110 %, όταν η έκλουση πραγματοποιήθηκε με μίγμα διχλωρομεθανίου-ακετονιτριλίου. Για τις ουσίες DCPU, diuron και irgarol 1051 οι ανακτήσεις ήταν ελαφρώς χαμηλότερες σε σχέση με αυτές που παρατηρήθηκαν όταν η εκχύλιση έγινε με φύσιγγες C18. Αντίθετα οι ανακτήσεις της DCA βελτιώθηκαν (69,2 %), ενώ και η σχετική τυπική απόκλιση ήταν ικανοποιητική (11,3 %). Οι υψηλές ανακτήσεις της DCA πιθανόν να οφείλονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ουσίας και των αρωματικών δακτυλίων του προσροφητικού υλικού. Οι τυπικές αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν για τις υπόλοιπες πέντε ουσίες ήταν μικρότερες από 10 % αλλά ελαφρώς υψηλότερες από τις αντίστοιχες τυπικές αποκλίσεις που ελήφθησαν με τη χρήση φυσιγγών C18.

Η επίτευξη υψηλών ανακτήσεων για τις εξεταζόμενες ουσίες χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο τύπο φυσιγγών ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι τα πολυμερή προσροφητικά υλικά περιέχουν πολλές θέσεις σύζευξης με αποτέλεσμα να λαμβάνουν χώρα διάφοροι μηχανισμοί προσρόφησης της ουσίας πάνω στο προσροφητικό υλικό (ιοντοανταλλαγή, π-π αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου). Οι ιδιότητες αυτές σε συνδυασμό με τη μεγάλη ειδική επιφάνεια των υλικών αυτών είναι υπεύθυνα για την καλύτερη προσροφητική τους ικανότητα (Martinez et al., 2000) συγκριτικά με τα C18.

Η έκλυση των ουσιών από τις φύσιγγες Isolute ENV+ με ουδέτερη μεθανόλη, επέφερε στατιστικά σημαντική αύξηση των ανακτήσεων όλων σχεδόν των ουσιών, εκτός από τις ουσίες M1 και diuron, σε σχέση με την έκλυση τους με μίγμα διχλωρομεθανίου-ακετονιτριλίου. Η χρήση διαφορετικών διαλυτών για την έκλυση των φυσιγγών C18 δεν κατέδειξε κάποια σαφή, στατιστικά σημαντική τάση αναφορικά με τις ανακτήσεις των ουσιών.

Πίνακας 6.5 Μέση ανάκτηση και τυπικές αποκλίσεις, RSDs (% , n=3) των έξι ουσιών κατά τη βελτιστοποίηση του διαλύτη έκλυσης. Φύσιγγες εκχύλισης υδροξυλειωμένου SDVB (Isolute ENV+).

Ουσία	Έκλυση με μίγμα διχλωρομεθανίου – ακετονιτριλίου		Έκλυση με ουδέτερη μεθανόλη	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση %)	RSD (%)
DCPU	66,5 ^a	4,81	87,7 ^b	4,28
DCPMU	80,3 ^a	7,02	91,8 ^b	4,57
M1	110 ^a	2,36	77,3 ^b	2,72
Diuron	100 ^a	4,88	89,4 ^b	4,72
DCA	60,0 ^a	23,7	69,2 ^a	11,3
Irgarol 1051	95,9 ^a	5,17	93,5 ^a	8,84

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα (γράμματα) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD)

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης της διαδικασίας της εκχύλισης, διαπιστώθηκε ότι και τα δύο είδη προσροφητικών υλικών (C18 και πολυμερή) είναι ισοδύναμα για τον προσδιορισμό των περισσότερων ουσιών χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλυσης ουδέτερη μεθανόλη. Αν η ανάλυση των δειγμάτων επικεντρώνεται μόνο στη DCA, τότε θα πρέπει να προτιμηθούν τα πολυμερή προσροφητικά υλικά αφού όπως αποδείχθηκε δίνουν τις υψηλότερες ανακτήσεις για τη συγκεκριμένη ουσία.

6.6.3 Βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση του διαχωρισμού, προτείνεται από τους Snyder et al (1997). Έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού, ιδιαίτερα σε μίγματα σχετικά

πολικών ουσιών που τα συστατικά τους διαφέρουν σημαντικά ως προς την χημική δομή (Kotrikla and Lekkas, 2001).

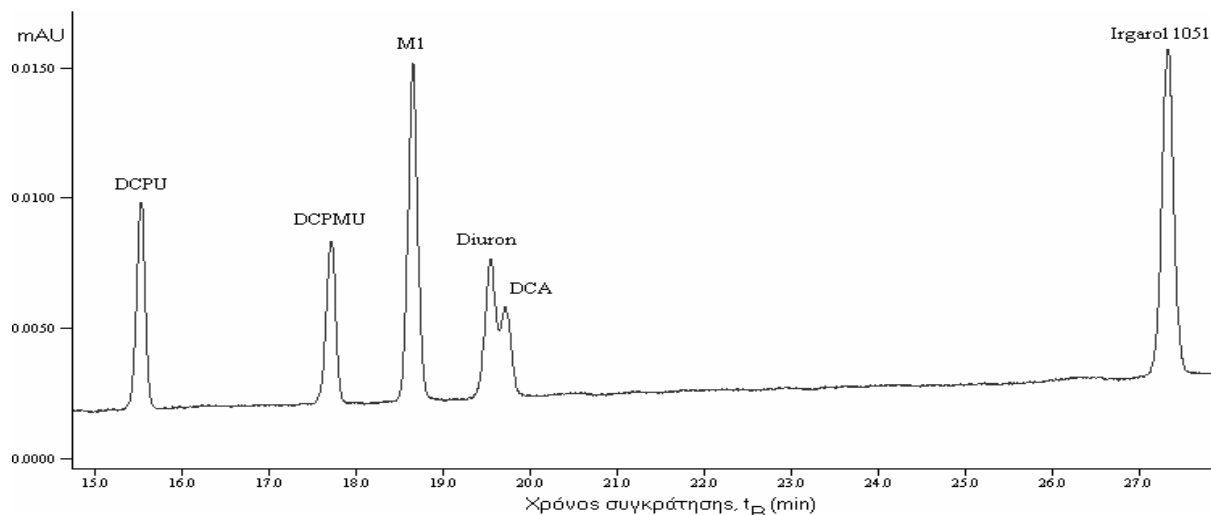
Ως κριτήρια για την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκαν ο συντελεστής διαχωρισμού, ο παράγοντας ασυμμετρίας των κορυφών και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης της χρωματογραφικής μεθόδου, παρατηρήθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός των εξεταζόμενων ουσιών για όλες σχεδόν τις συνθήκες που εξετάστηκαν. Ο συντελεστής διαχωρισμού ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερος του 2 (Πίνακας 6.6).

Πίνακας 6.6 Συντελεστές διαχωρισμού κατά τη βαθμωτή έκλυση των έξι ουσιών με ταυτόχρονη μεταβολή της θερμοκρασίας και της ισχύος του διαλύτη.

Ουσία	Συνθήκες πειράματος			
	30°C – 60 min	30°C – 20 min	45°C – 20 min	45°C – 60 min
-	-	-	-	-
DCPU -DCPMU	6,5	6,7	10	11
DCPMU-M1	2,1	2,4	4,1	4,7
M1-Diuron	3,1	2,8	3,9	4,0
Diuron-DCA	2,3	3,7	3,3	0,7
DCA-Irgarol 1051	17	13	23	46

Ο διαχωρισμός δεν ήταν ικανοποιητικός ($R_s < 1$) μόνο για τις ουσίες diuron και DCA, όταν η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 45 °C και η βαθμωτή έκλυση ήταν διάρκειας 60 min (Σχήμα 6.3).

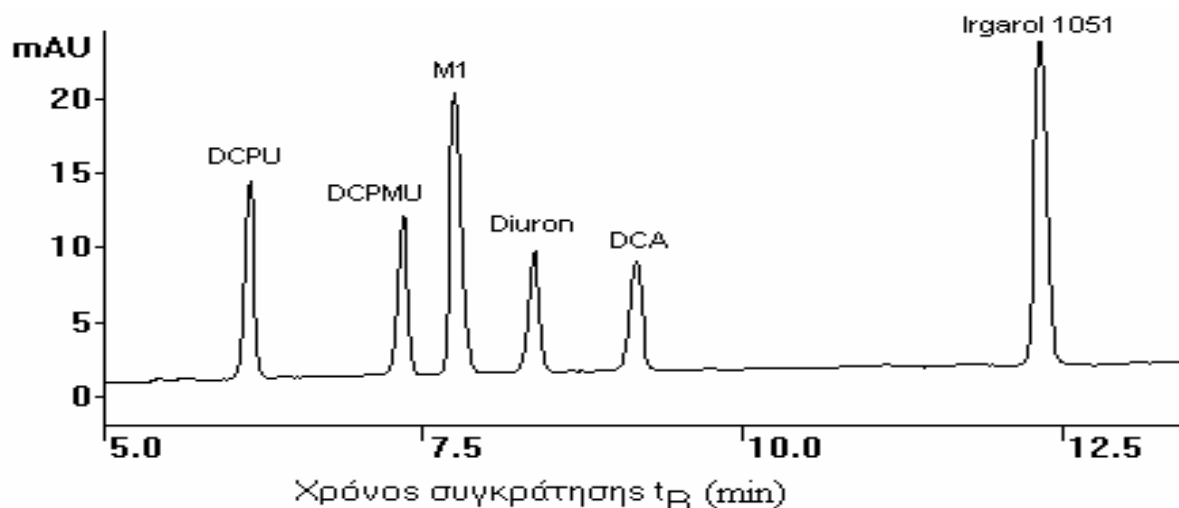


Σχήμα 6.3 Διαχωρισμός των έξι ουσιών για θερμοκρασία στήλης 45 °C και χρόνο βαθμωτής έκλουσης 60 min. Μήκος κύματος ανιχνευτή $\lambda=234$ nm.

Επειδή η ουσία DCPU είναι χρονικά η πρώτη από τις έξι ουσίες που εκλύεται, για να αποφευχθεί τυχόν παρεμπόδιση της από προσμίξεις που συνεκλούνται μαζί με τις εξεταζόμενες ουσίες κατά την προεπεξεργασία του δείγματος, επιλέχθηκε χρόνος για τη βαθμωτή έκλουση ίσος με 25 min.

Ως θερμοκρασία στήλης για την ανάλυση των δειγμάτων επιλέχθηκαν οι 30 °C, θερμοκρασία η οποία δεν καταπονεί τη στήλη και εύκολα μπορεί να διατηρηθεί από τον κλίβανο. Έχει διαπιστωθεί ότι όταν μια στήλη λειτουργεί σε υψηλές θερμοκρασίες άνω των 50 °C, τότε γρήγορα παρατηρείται απώλεια της χημικά συζευγμένης φάσης (Hancock et al., 1994).

Η ροή της κινητής φάσης επιλέχθηκε να είναι $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ ως η βέλτιστη ροή για το διαχωρισμό των έξι ουσιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάλυση των δειγμάτων με ροή κινητής φάσης $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ έχει ως αποτέλεσμα ελαφρώς μικρότερα εμβαδά κορυφών σε σχέση με αυτά που επιτυγχάνονται όταν η ροή είναι χαμηλότερη ($1,3 \text{ mL min}^{-1}$) αλλά ο χρόνος ανάλυσης είναι σημαντικά μικρότερος. Αυτός ήταν ένας άλλος επίσης σημαντικός λόγος για την επιλογή της παραπάνω ροής κατά την ανάπτυξη της μέθοδο αφού όπως είναι γνωστό όσο λιγότερο χρονοβόρα είναι μια μέθοδος τόσο πιο πρακτική και προσφιλής είναι. Στο Σχήμα 6.4 δίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα των έξι ουσιών στις βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης.



Σχήμα 6.4 Τυπικό χρωματογράφημα των έξι ουσιών ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) στις βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης (θερμοκρασία στήλης: 30°C , ροή κινητής φάσης: $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, αρχική κινητή φάση: 20% ACN – 80% H_2O).

6.6.4 Έλεγχος της ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης

Όπως προαναφέρθηκε, μετά την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθόδου ακολουθεί έλεγχος της ανθεκτικότητάς της ώστε να εξεταστεί η απόδοση της αναλυτικής διαδικασίας όταν συμβαίνουν μικρές αλλαγές στις πειραματικές συνθήκες (EURACHEM Guide, 1998). Οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση μιας μεθόδου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: σε αυτούς που σχετίζονται με την ίδια τη διαδικασία (π.χ. pH της κινητής φάσης, θερμοκρασία της στήλης, συγκέντρωση του χημικού αντιδραστηρίου ή του διαλύτη σε ένα μίγμα) και σε αυτούς που δε σχετίζονται με την διαδικασία αυτή καθ' αυτή (π.χ. τα αντιδραστήρια, η κατασκευάστρια εταιρεία της στήλης ή του μηχανήματος) (Hund et al., 2000). Στην παρούσα εργασία τα κριτήρια που επιλέχθηκαν για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας της αναλυτικής μεθόδου ήταν ο χρόνος συγκράτησης των ουσιών πάνω στη στήλη (t_R), ο διαχωρισμός μεταξύ των ουσιών (R_s) και η ευαισθησία του οργάνου κατά τον προσδιορισμό των ουσιών (εμβαδόν κορυφής). Στους Πίνακες 6.7- 6.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έλαβαν χώρα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 6.7 όλοι οι παράγοντες επηρέασαν το χρόνο συγκράτησης των έξι ουσιών. Μεταξύ των τριών παραγόντων, η ροή της κινητής φάσης ήταν αυτή που επέφερε υψηλότερες τιμές % Ex. Οι χρόνοι συγκράτησης των ουσιών φάνηκαν να είναι πιο ευαίσθητοι όταν οι παράγοντες θερμοκρασία και ροή, μεταβλήθηκαν κατά -1 (Πίνακας 6.7, τιμές d (%)) για επίπεδο -1). Αντίθετα, όσον αφορά την αρχική ισχύ

του ακετονιτριλίου διαπιστώθηκε ότι και τα δύο επίπεδα μεταβολής (-1 και +1) επιφέρουν την ίδια μεταβολή πάνω στο χρόνο συγκράτησης των ουσιών.

Το εμβαδόν των κορυφών των εξεταζόμενων ουσιών (Πίνακας 6.8) επηρεάστηκε κυρίως από τις μεταβολές της ροής. Όταν η ροή ρυθμίστηκε στη χαμηλότερή της τιμή (επίπεδο -1), η παράμετρος (εμβαδόν κορυφής) επηρεάστηκε σε όλες τις περιπτώσεις κατά το μέγιστο, δίνοντας πάλι τις υψηλότερες τιμές % Ex σε σχέση με τους άλλους δύο παράγοντες. Η θερμοκρασία επηρέασε μόνο την απόκριση της κορυφής της ουσίας DCA ανεξάρτητα από το εξεταζόμενο επίπεδο. Η αρχική ισχύς του ακετονιτριλίου επηρέασε μόνο το εμβαδόν των κορυφών του diuron και των μεταβολιτών του ενώ οι τριαζίνες παρέμειναν ανεπηρέαστες.

Τα αποτελέσματα που αφορούν στο διαχωρισμό των ουσιών μεταξύ τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.9. Όπως παρατηρήθηκε, οι ουσίες irgarol 1051 και DCA ήταν οι μόνες για τις οποίες οι τρεις παράγοντες δεν είχαν επίπτωση πάνω στο διαχωρισμό τους. Αντίθετα ο διαχωρισμός των υπόλοιπων ουσιών επηρεάστηκε τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από την αρχική ισχύ του ακετονιτριλίου και μάλιστα η επίδραση ήταν μεγαλύτερη όταν οι παράγοντες εξετάστηκαν στο υψηλότερο επίπεδο (+1). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίπτωση της ροής, η οποία εκτός από την περίπτωση της ουσίας M1, για όλες τις άλλες ουσίες επέδρασε σημαντικά πάνω στο διαχωρισμό τους όταν ρυθμίστηκε στη χαμηλότερη τιμή της ($1,6 \text{ mL min}^{-1}$).

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανθεκτικότητας, διαπιστώνεται ότι οι μικρές μεταβολές των παραγόντων (κατά ± 1) επιδρούν σημαντικά πάνω στο χρόνο συγκράτησης όλων των ουσιών, καθιστώντας τη χρήση ενός επιβεβαιωτικού ανιχνευτή, όπως είναι ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων, υποχρεωτική για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των ουσιών. Επιπλέον, μικρές μεταβολές της ροής και κυρίως χαμηλότερες αναφορικά με την ονομαστική τιμή της, επηρεάζουν την ευαισθησία του οργάνου κατά τον προσδιορισμό των ουσιών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η διαπίστωση ότι οι μεταβολές της αρχικής ισχύος του διαλύτη επηρεάζουν την απόκριση μόνο του diuron και των μεταβολιτών του και όχι των τριαζινών.

Τελικά λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανθεκτικότητας για τον προσδιορισμό του irgarol 1051, του diuron και των μεταβολιτών τους, με την τεχνική της υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων, επιλέχθηκε ως βέλτιστη μέθοδος διαχωρισμού των ουσιών αυτή κατά την οποία η ροή της κινητής φάσης είναι $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, η θερμοκρασία της στήλης είναι $30 \text{ }^\circ\text{C}$ και η αρχική ισχύς του ακετονιτριλίου είναι 20 %. Οι παραπάνω συνθήκες ευνοούν τη γρήγορη έκλουση και επιταχύνουν τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των ουσιών.

Πίνακας 6.7 Κανονικοποιημένη επίδραση και κρίσιμες επιδράσεις των τριών παραγόντων πάνω στο χρόνο συγκράτησης της κάθε ουσίας καθώς και οι % διαφορές (d) του χρόνου συγκράτησης από τον αντίστοιχο χρόνο συγκράτησης που παρατηρείται στις ονομαστικές τιμές του κάθε παράγοντα.

Παράγοντας													
Ουσία	Θερμοκρασία στήλης (T)					Ροή κινητής φάσης (F)				Αρχική ισχύς ακετονιτριλίου (S)			
	% E _{crit} ^α	% E _{crit} ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)	% E _{crit} ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)	% E _{crit} ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)
DCPU	0,28	0,92	-0,84	1,47	0,62	2,22	-7,57	4,05	-3,51	-7,70	0,95	1,65	-6,05
DCPMU	0,24	0,62	-0,66	1,25	0,58	1,95	-6,89	3,63	-3,25	-6,41	0,79	1,25	-5,16
M1	0,40	0,62	-0,68	1,32	0,64	1,83	-6,80	3,50	-3,30	-6,14	0,70	1,21	-4,93
Diuron	0,21	0,46	-0,55	1,10	0,55	1,73	-6,41	3,38	-3,03	-5,60	0,69	1,04	-4,55
DCA	0,19	0,42	-0,84	1,27	0,43	1,59	-6,55	3,41	-3,14	-4,63	0,82	0,58	-4,05
Irgarol 1051	0,13	0,22	-0,46	0,68	0,22	0,49	-4,46	2,23	-2,23	-3,47	0,53	1,14	-2,33

α: Κανονικοποιημένη κρίσιμη τιμή της επίδρασης όταν H₀: E_x = 0

β: Κανονικοποιημένη κρίσιμη τιμή της επίδρασης όταν H₀: Y₍₊₎ = Y₍₋₎

Πίνακας 6.8 Κανονικοποιημένη επίδραση και κρίσιμες επιδράσεις των τριών παραγόντων πάνω στο εμβαδόν της κορυφής της κάθε ουσίας καθώς και οι % διαφορές (d) του εμβαδού της κάθε κορυφής από το αντίστοιχο εμβαδό που παρατηρείται στις ονομαστικές τιμές του κάθε παράγοντα.

Παράγοντας													
Ουσία	Θερμοκρασία στήλης (T)				Ροή κινητής φάσης (F)				Αρχική ισχύς ακετονιτριλίου (S)				
	% E _{crit} ^α	% E _{crit_T} ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)	% E _{crit_F} ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)	% E _{crit_S} ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)
DCPU	0,99	0,96	0,24	7,44	7,68	0,91	-12,5	13,3	0,80	-0,08	2,25	7,27	7,19
DCPMU	1,50	1,52	0,96	1,91	2,86	0,81	-11,7	8,02	-3,72	1,63	2,09	1,21	2,84
M1	0,99	1,22	-0,41	5,91	5,49	2,09	-13,1	11,6	-1,43	-0,19	0,38	6,34	6,15
Diuron	1,17	2,05	0,57	0,04	0,61	1,06	-11,7	6,27	-5,44	-0,56	2,21	1,18	0,62
DCA	1,14	8,31	6,22	-10,5	-4,26	3,34	-9,16	5,57	-3,59	2,84	1,70	3,07	5,90
Irgarol 1051	1,91	2,68	-0,56	2,27	1,72	1,07	-12,1	7,82	-4,24	0,24	0,80	1,99	2,23

α: Κανονικοποιημένη κρίσιμη τιμή της επίδρασης όταν H₀: E_x = 0

β: Κανονικοποιημένη κρίσιμη τιμή της επίδρασης όταν H₀: Y₍₊₎ = Y₍₋₎

Πίνακας 6.9 Κανονικοποιημένη επίδραση και κρίσιμες επιδράσεις των τριών παραγόντων πάνω στο διαχωρισμό μεταξύ των έξι ουσιών καθώς και οι % διαφορές (d) του συντελεστή διαχωρισμού από τον αντίστοιχο συντελεστή που παρατηρείται στις ονομαστικές τιμές του κάθε παράγοντα.

Παράγοντας													
Ουσία	Θερμοκρασία στήλης (T)					Ροή κινητής φάσης (F)				Αρχική ισχύς ακετονιτριλίου (S)			
	% E _{crit} ^α	% E _{crit} _T ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)	% E _{crit} _F ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)	% E _{crit} _S ^β	% E _x	d (%) για (-)	d (%) για (+)
DCPU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCPMU	1,30	3,89	-5,69	-3,28	-8,97	3,09	3,00	-4,24	-1,24	-5,68	5,67	1,46	-4,23
M1	4,03	2,75	-6,46	0,41	-6,05	4,51	0,54	-3,73	-3,19	-7,62	7,11	3,75	-3,87
Diuron	1,72	2,69	-3,41	-5,66	-9,07	0,61	5,05	-4,10	0,96	-5,28	3,80	1,01	-4,27
DCA	12,9	1,86	-9,92	2,82	-7,10	2,88	0,01	1,00	1,00	-3,40	3,99	3,28	-0,12
Irgarol 1051	12,0	2,28	-5,43	0,23	-5,20	3,61	8,11	-3,50	4,61	-9,44	7,21	9,92	0,47

α: Κανονικοποιημένη κρίσιμη τιμή της επίδρασης όταν H₀: E_x = 0

β: Κανονικοποιημένη κρίσιμη τιμή της επίδρασης όταν H₀: Y₍₊₎ = Y₍₋₎

6.6.5 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας

Στον Πίνακα 6.10 παρουσιάζονται η εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης που εφαρμόστηκε στην καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου για κάθε ουσία, οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των έξι ουσιών. Η καμπύλη βαθμονόμησης προσδιορίστηκε με δύο τρόπους: με βάση το εμβαδόν της κορυφής και με βάση το ύψος της κορυφής για κάθε ουσία. Όπως προέκυψε, το όριο ανίχνευσης του οργάνου για κάθε ουσία, δεν επηρεάστηκε από τη διαφορετική ευαισθησία στις δύο περιπτώσεις.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας της αναλυτικής μεθόδου επιβεβαίωσαν ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή είναι επαναλήψιμη και αναπαραγωγίμη (Πίνακας 6.11) και για τα δύο είδη προσροφητικών υλικών. Οι τυπικές αποκλίσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 1,54 και 10,8 % για τις φύσιγγες C18 ενώ για τις πολυμερείς φύσιγγες Isolute ENV+ η διακύμανση ήταν από 4,09 έως 13,9 %.

Οι ανακτήσεις των έξι ουσιών για τα επίπεδα συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν (από 0,1 ως 1 $\mu\text{g L}^{-1}$) παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.12. Οι τιμές κυμάνθηκαν από 82,4 % ως 106 % για τις πέντε από τις έξι ουσίες με αντίστοιχες σχετικές τυπικές αποκλίσεις, σε όλες τις περιπτώσεις, χαμηλότερες από 10 %. Η μοναδική ουσία που ανακτήθηκε από τις φύσιγγες σε πολύ μικρό βαθμό, ήταν η DCA της οποίας η ανάκτηση δεν ξεπέρασε το 30,5 %. Χαμηλή ανάκτηση της DCA μετά από εκχύλιση σε φύσιγγες C18 αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (Boti et al., 2004). Όπως προαναφέρθηκε, ο λόγος για την τόσο χαμηλή ανάκτηση της ουσίας αυτής, είναι πιθανές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να συμβούν μεταξύ της DCA και του σωματιδιακού οργανικού φορτίου που περιέχεται στο θαλασσινό νερό σε συνδυασμό με τον μεγάλο όγκο δείγματος που εκχυλίστηκε. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Pichon 2000), για να εκχυλιστούν οι πολικές ενώσεις ικανοποιητικά, ο όγκος του δείγματος που πρόκειται να προσυγκεντρωθεί θα πρέπει να είναι μικρός, διαφορετικά οι ουσίες εκχυλίζονται ασθενώς. Εντούτοις όμως, στην περιβαλλοντική ανάλυση προτιμούνται οι μεγάλοι όγκοι δειγμάτων ώστε να επιτευχθούν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης. Τα όρια ανίχνευσης καθώς και οι ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου συμφωνούν με τη βιβλιογραφία (Thomas, 1998; Ferrer and Barceló, 1999; Martinez et al., 2000; Piedra et al., 2000; Lambropoulou et al. 2002; Konstantinou et al., 2002).

Πίνακας 6.10 Καμπύλες βαθμονόμησης, συντελεστές συσχέτισης (R^2) και όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης των έξι ουσιών σε θαλασσινό νερό.

Ουσία	Καμπύλη βαθμονόμησης με βάση το εμβαδόν της κορυφής	R^2	Καμπύλη βαθμονόμησης με βάση το ύψος της κορυφής	R^2	LOD ^α ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^α ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ^β ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ^β ($\mu\text{g L}^{-1}$)
DCPU	$y = 26,8x - 86,4$	0,9999	$y = 6,53x - 2,24$	0,9997	0,009	0,030	0,010	0,033
DCPMU	$y = 27,1x - 80,4$	0,9999	$y = 6,09x - 19,6$	0,9999	0,005	0,017	0,006	0,020
M1	$y = 29,9x - 56,3$	0,9999	$y = 5,70x - 14,1$	0,9998	0,026	0,086	0,026	0,086
Diuron	$y = 25,1x - 124$	0,9999	$y = 5,16x - 24,3$	0,9998	0,007	0,023	0,007	0,023
DCA	$y = 17,5x - 211$	0,9995	$y = 3,36x - 39,1$	0,9993	0,008	0,026	0,007	0,023
Irgarol 1051	$y = 44,6x - 276$	0,9998	$y = 7,70x - 23,6$	0,9999	0,011	0,036	0,011	0,036

α : προσδιορισμός βάσει εμβαδού κορυφής, β: προσδιορισμός βάσει ύψους κορυφής

Πίνακας 6.11 Πιστότητα της διαδικασίας εκχύλισης πάνω σε φύσιγγες C18 (Sep-Pak) και υδροξυλειωμένου SDVB (Isolute ENV+), για επίπεδο συγκέντρωσης των εξεταζόμενων ουσιών $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$.

	Φύσιγγες Sep-Pak		Φύσιγγες Isolute ENV+	
	Πιστότητα την ίδια μέρα	Πιστότητα μεταξύ διαφορετικών ημερών	Πιστότητα την ίδια μέρα	Πιστότητα μεταξύ διαφορετικών ημερών
Ουσία	RSD (%) n=5	RSD (%) n=2, k=3	RSD (%) n=5	RSD (%) n=2, k=3
DCPU	1,60	3,22	4,40	4,49
DCPMU	1,54	8,41	4,09	5,52
M1	8,93	8,75	9,33	10,6
Diuron	6,19	5,42	6,42	5,60
DCA	8,75	10,8	10,1	13,9
Irgarol 1051	4,89	10,2	9,24	8,84

Πίνακας 6.12 Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, R.S.D. (n=4) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 500 mL θαλασσινού νερού επιφορτισμένο σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης των έξι ουσιών.

Ουσία	$0,1 \mu\text{g L}^{-1}$		$0,2 \mu\text{g L}^{-1}$		$1 \mu\text{g L}^{-1}$	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
DCPU	96,0 ^a	3,38	89,9 ^a	5,11	94,2 ^a	10,0
DCPMU	85,0 ^a	6,89	88,2 ^{ab}	7,84	96,2 ^b	8,66
M1	82,4 ^a	7,10	106 ^b	7,65	103 ^b	9,01
Diuron	99,2 ^a	6,22	93,0 ^a	3,87	98,0 ^a	9,80
DCA	30,5 ^a	3,33	28,9 ^b	2,04	29,4 ^{ab}	2,02
Irgarol 1051	102 ^a	5,27	83,3 ^b	9,17	89,4 ^b	10,0

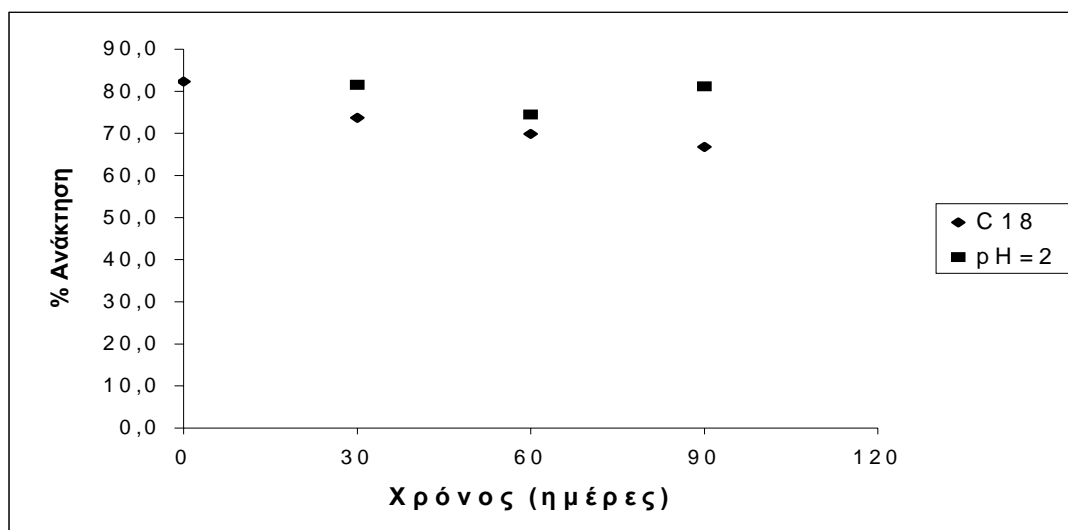
Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα (γράμματα) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD)

6.6.6 Σταθερότητα των ουσιών υπό εργαστηριακές συνθήκες

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (Munch and Frebis, 1992; Senseman et al., 1993; Lartiges and Garrigues, 1995; Liska and Bilikova, 1998) τόσο οι τριαζίνες όσο και

αντιπρόσωποι των υποκατεστημένων ουριών, δεν εμφανίζουν πρόβλημα σταθερότητας για σχετικά μεγάλα χρονικά διαστήματα, στις συνθήκες που έχουν ελεγχθεί.

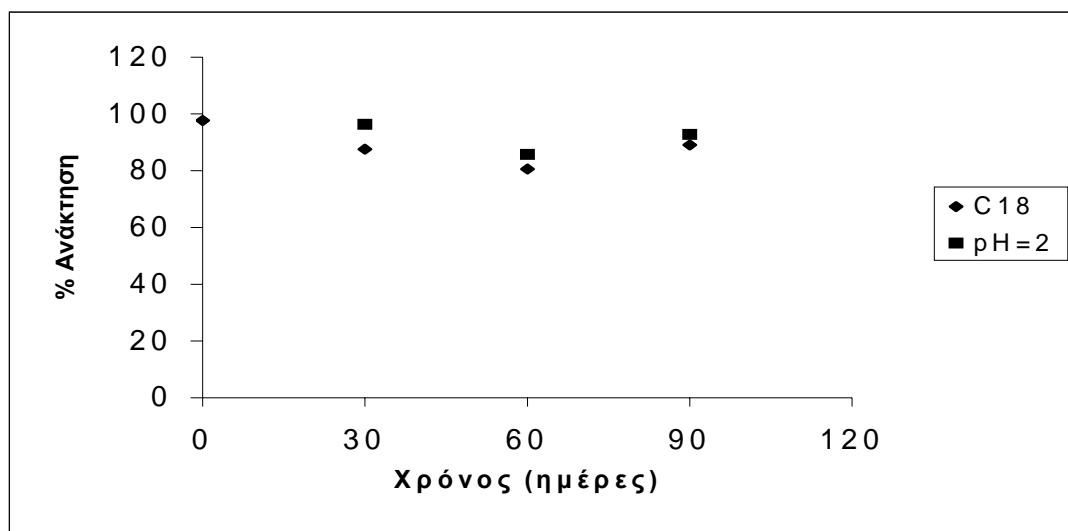
Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τη μελέτη της σταθερότητας των αρχικών ουσιών (Σχήματα 6.5 και 6.6), παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της ανάκτησης σε σχέση με το χρόνο, μέχρι την 60^η ημέρα, και για τις δύο ουσίες ανεξάρτητα από τον τρόπο συντήρησης των δειγμάτων. Κατά την 90^η ημέρα όμως η ανάκτηση και των δύο ουσιών αυξήθηκε και για τους δύο τρόπους συντήρησης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται πιθανόν σε διάφορες ουσίες που υπήρχαν εξ αρχής στα δείγματα. Οι ουσίες αυτές δεν δημιούργησαν προβλήματα στην ανάλυση από την αρχή ίσως όμως, μετά την παρέλευση των τριών μηνών να διασπάστηκαν ή να υδρολύθηκαν με αποτέλεσμα τα προϊόντα αποδόμησης τους να συνεκλούνται με τις εξεταζόμενες ουσίες αυξάνοντας έτσι την ανάκτησή τους κατά την 90^η ημέρα. Σε καμιά περίπτωση δεν ανιχνεύθηκαν προϊόντα διάσπασης των εξεταζόμενων ουσιών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ανακτήσεων των δύο ουσιών για τους διάφορους τρόπους συντήρησης των δειγμάτων σε σχέση με το χρόνο. Η σχετική τυπική απόκλιση ήταν σε όλες τις περιπτώσεις χαμηλότερη από 10 %.



Σχήμα 6.5 Μέση ανάκτηση (%) του irgarol 1051 σε σχέση με το χρόνο για τους δύο τρόπους συντήρησης.

Έχοντας υπόψη ότι ουσίες της ίδιας χημικής κατηγορίας εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά, δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν για την παρουσία του irgarol 1051, του

diuron και των μεταβολιτών τους μπορούν, μετά από εκχύλιση πάνω σε φύσιγγες C18, να συντηρηθούν στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ χωρίς απώλειες των ουσιών. Διάστημα μεγαλύτερο των 60 ημερών πιθανόν να αλλοιώσει τα αποτελέσματα τόσο γιατί όπως αποδείχθηκε δημιουργούνται προβλήματα στην ανάλυση όσο και γιατί ο χρόνος ημίσειας ζωής του irgarol 1051 στο θαλασσινό νερό είναι εκατό ημέρες (Liu et al., 1997) οπότε πιθανόν να υπάρξουν απώλειες τις ουσίας.



Σχήμα 6.6 Μέση ανάκτηση (%) του diuron σε σχέση με το χρόνο για τους δύο τρόπους συντήρησης.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε καμία περίπτωση η συντήρηση των δειγμάτων δεν θα πρέπει να γίνεται με τη χρήση HgCl_2 , διότι όπως αποδείχθηκε σε έρευνα των Liu et al. (1999a), ο HgCl_2 δρα ως καταλύτης επιταχύνοντας την υδρόλυση του irgarol 1051.

6.6.7 Ανάλυση φυσικών δειγμάτων

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των έξι ουσιών σε φυσικά δείγματα προερχόμενα από τέσσερις περιοχές της Ελλάδας (μαρίνες Καλαμάτας και Πάτρας, λιμάνια Ρόδου και Μυτιλήνης). Τα δείγματα συλλέχθηκαν τη χρονική περίοδο μεταξύ Μαρτίου και Ιουλίου του 2002. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.13, τρεις από τις έξι ουσίες (DCPMU, diuron και irgarol 1051) ανιχνεύθηκαν τουλάχιστον μία φορά.

Το diuron ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα και οι συγκεντρώσεις του κυμάνθηκαν από $0,03$ ως $0,56\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Η υψηλότερη συγκέντρωση της ουσίας ($0,56\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) παρατηρήθηκε στα δείγματα από μαρίνες τα οποία συλλέχθηκαν κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Το γεγονός

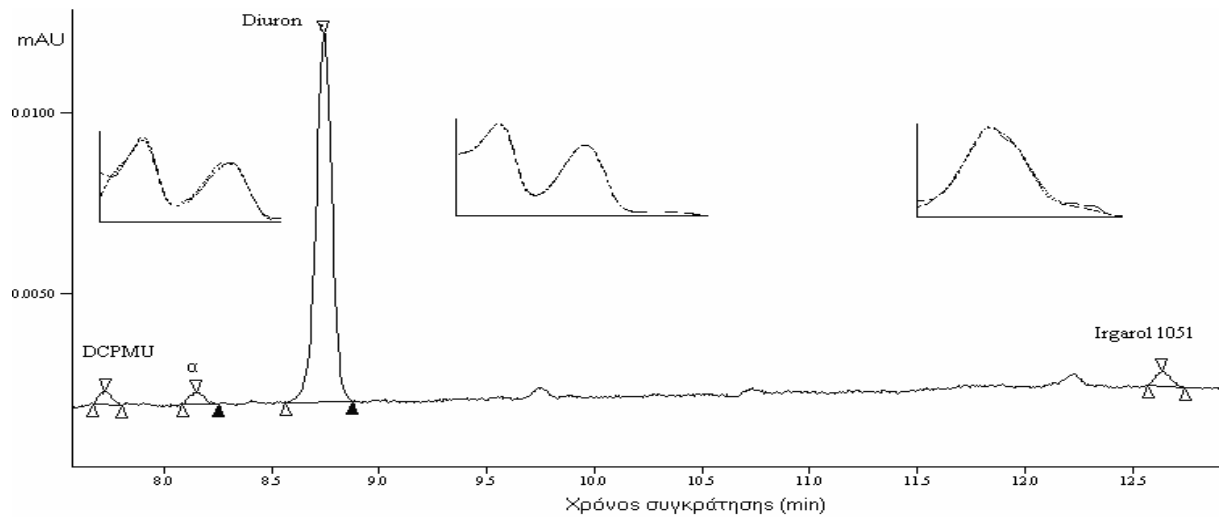
αυτό οφείλεται προφανώς στο ότι η δραστηριότητα και η πυκνότητα των σκαφών είναι πιο έντονη στις μαρίνες από ότι στα λιμάνια και αυξάνεται κατά την περίοδο του καλοκαιριού. Το Irgarol 1051 ανιχνεύτηκε μόνο στα δείγματα από τις δύο μαρίνες και η υψηλότερη συγκέντρωσή του (0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$) παρατηρήθηκε επίσης κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Ιούλιος 2002). Η DCPMU ανιχνεύτηκε μόνο στη μαρίνα της Καλαμάτας και η παρουσία της πιθανόν να οφείλεται στη διάσπαση του diuron (Σχήμα 6.8).

Πίνακας 6.13 Συγκεντρώσεις των εξεταζόμενων ουσιών που ανιχνεύτηκαν σε φυσικά δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από διάφορες ελληνικές περιοχές.

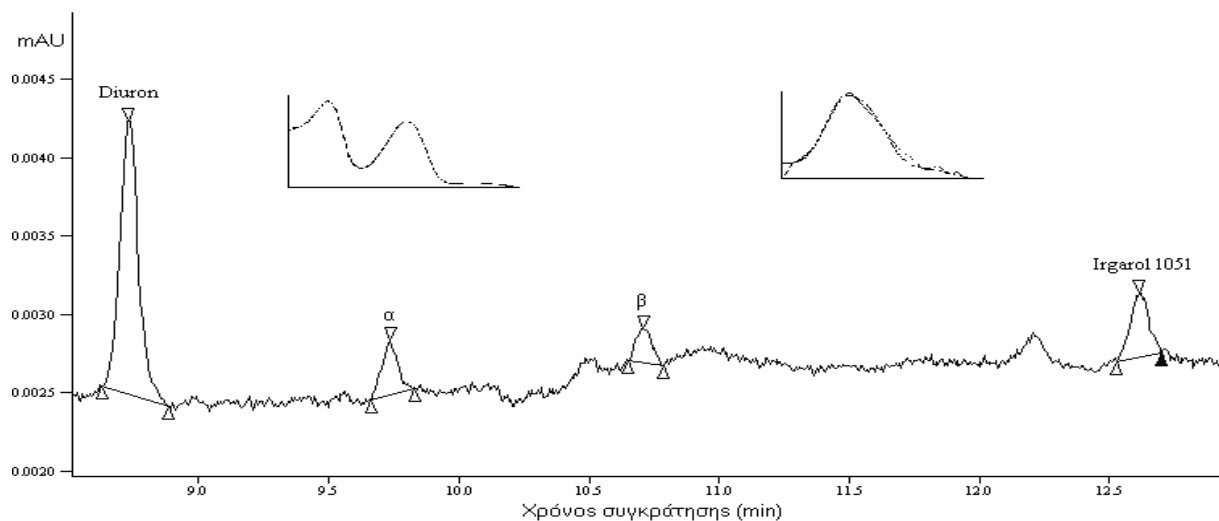
Ουσία	Σημείο δειγματοληψίας						
	Καλαμάτα		Μυτιλήνη			Πάτρα	Μόλυβος
	Ημερομηνία δειγματοληψίας						
	5/02	6/02	3/02	5/02	6/02	7/02	7/02
	Συγκέντρωση ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
DCPU	-	-	-	-	-	-	-
DCPMU	-	0,02	-	-	-	-	-
M1	-	-	-	-	-	-	-
Diuron	0,13	0,56	0,03	0,03	0,18	0,22	0,18
DCA	-	-	-	-	-	-	-
Irgarol 1051	0,04	0,05	-	-	-	0,12	-

- : η ουσία δεν ανιχνεύτηκε.

Οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα εργασία είναι σε συμφωνία με αυτές που αναφέρονται από άλλους ερευνητές (Mezcua et al., 2002; Lamoree et al., 2002; Comber et al., 2002). Στα Σχήματα 6.7 και 6.8 δίνονται χρωματογραφήματα δειγμάτων θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη μαρίνα της Καλαμάτας και το λιμάνι της Μυτιλήνης καθώς και τα φάσματα απορρόφησης των ουσιών που ανιχνεύτηκαν.



Σχήμα. 6.7 Χρωματογράφημα δείγματος θαλασσινού νερού προερχόμενο από τη μαρίνα της Καλαμάτας (α: άγνωστη κορυφή).



Σχήμα 6.8 Χρωματογράφημα δείγματος θαλασσινού νερού προερχόμενο από τη λιμάνι της Μυτιλήνης (α, β: άγνωστες κορυφές).

6.7 Συμπεράσματα

Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή για την απομόνωση του irgarol 1051, του diuron και των μεταβολιτών τους από δείγματα θαλασσινού νερού με την τεχνική της μη αυτοματοποιημένης εκχύλισης στερεής φάσης, καθώς και ο ταυτόχρονος προσδιορισμός τους με υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων είναι αποτελεσματική και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και απλότητα.

Αναφορικά με τη χρωματογραφική μέθοδο ανάλυσης, αυτή αποδείχθηκε γενικότερα ανθεκτική παρόλες τις επιπτώσεις των τριών παραγόντων (θερμοκρασία στήλης, ροή κινητής φάσης, αρχική ισχύς του ακετονιτριλίου) πάνω στο χρόνο συγκράτησης των ουσιών γεγονός άλλωστε που ήταν αναμενόμενο.

Οι φύσιγγες C18 αποδείχθηκαν αποτελεσματικές για την απομόνωση των τριαζινών και των υποκατεστημένων ουριών αλλά όχι για την DCA παρόλο που οι χαμηλές ανακτήσεις της ήταν επαναλήψιμες. Υψηλές ανακτήσεις της DCA παρατηρήθηκαν με τη χρήση πολυμερών φυσιγγίων. Επομένως τα πολυμερή προσροφητικά υλικά θα πρέπει να προτιμούνται αν η ανάλυση των δειγμάτων επικεντρώνεται μόνο σε αυτή την ουσία.

Οι ουσίες μπορούν να συντηρηθούν είτε προσροφημένες πάνω σε φύσιγγες C18 στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, είτε σε οξινισμένο θαλασσινό νερό στο σκοτάδι στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για διάστημα δύο μηνών χωρίς απώλειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IRGAROL 1051, ΤΟΥ DIURON ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΙΖΗΜΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ

7.1 Εισαγωγή

Η απομόνωση του irgarol 1051, του diuron και των κύριων μεταβολιτών τους M1, DCPMU και DCPU από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος πραγματοποιείται με διάφορες τεχνικές. Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση τους είναι η εκχύλιση Soxhlet (Biselli et al., 2000), η εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών (Haglund et al., 2001), η μηχανική ανάδευση (Toth et al., 1996), η εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Gough et al., 1994; Okamura et al., 2000; Martinez and Barcelo, 2001a; Ferrer and Barcelo, 2001) καθώς και συνδυασμός μηχανικής ανάδευσης και υπερήχων (Albanis et al., 2002; Thomas et al., 2000) ή υπερήχων και SPME (Lambropoulou et al., 2003).

Ο καθαρισμός των δειγμάτων ιζήματος αμέσως μετά την εκχύλιση γίνεται είτε με τη χρήση στηλών florasil (Toth et al., 1996; Albanis et al., 2002) και alumina (Biselli et al., 2000; Bowman et al., 2003) είτε με εκχύλιση στερεής φάσης πάνω σε φύσιγγες C18 (Biselli et al., 2000; Ferrer and Barcelo, 2001).

Ο διαχωρισμός και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των παραπάνω ουσιών στα δείγματα πραγματοποιείται με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών (Gough et al., 1994; Toth et al., 1996; Okamura et al., 2000; Biselli et al., 2000) υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (Ferrer et al., 1997; Penuela et al., 2000) ή με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης με φασματομετρία μαζών (Thomas et al., 2000; Martinez and Barcelo, 2001a; Ferrer and Barcelo, 2001).

Σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μεθόδου εκχύλισης του irgarol 1051 του diuron και των κύριων μεταβολιτών τους από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με τη χρήση υπερήχων καθώς και ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των ουσιών αυτών με την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων. Για το σκοπό αυτό, βελτιστοποιήθηκαν προσεκτικά όλα τα βήματα και οι παράμετροι που περιλαμβάνει η αναλυτική διαδικασία όπως είναι η ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος, ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, η

διάρκεια της εκχύλισης και η θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η εκχύλιση. Επιπλέον ελέγχθηκε βήμα προς βήμα η διαδικασία προεπεξεργασίας του ιζήματος ώστε να προσδιοριστούν οι τυχόν απώλειες των ουσιών κατά τα διάφορα στάδια. Τέλος η μέθοδος που αναπτύχθηκε επικυρώθηκε επαρκώς.

Σύμφωνα με την ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας μέχρι σήμερα δεν αναφέρεται μέθοδος εκχύλισης για την ταυτόχρονη απομόνωση των ουσιών irgarol 1051, diuron, M1, DCPMU, DCPU και DCA από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με τη χρήση υπερήχων και προσδιορισμός του μίγματος των παραπάνω έξι ουσιών με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων. Η ανάγκη όμως για μείωση του χρόνου και του κόστους ανάλυσης των δειγμάτων, επιβάλλει τη συνεχή προσπάθεια για την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός μιγμάτων των ουσιών.

7.2 Δειγματοληψία

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων ανάπτυξης της μεθόδου, δείγματα επιφανειακού ιζήματος ελήφθησαν από περιοχή ανοιχτά της πόλης της Μυτιλήνης (Λέσβος) μακριά από το λιμάνι καθώς και από περιοχές όπου υπάρχουν σκάφη αναψυχής ή βάρκες ψαρέματος. Για τη δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης τύπου παγίδας (grab sampler). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε γυάλινα δοχεία με τη χρήση ατσάλινης σπάτουλας και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Αμέσως μετά τη συλλογή τους πραγματοποιήθηκε υγρή κοσκινίση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας κόσκινο με άνοιγμα πόρων 1 mm. Ακολούθησε ξήρανση των δειγμάτων για 5 ημέρες στους 60 °C μέχρι σταθερού βάρους. Τελικά τα ξηρά δείγματα ιζήματος κονιοροποιήθηκαν με τη χρήση γουδιού από αχάτι. Πριν την επιφόρτιση των δειγμάτων με τις εξεταζόμενες ουσίες το ίζημα αναλύθηκε ώστε να διασφαλιστεί η απουσία των υπό εξέταση ουσιών.

7.3 Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός (κύριος και βοηθητικός) που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτού του κεφαλαίου περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.

7.4 Αντιδραστήρια

Ακετονιτρίλιο για HPLC (Merck, Germany)

Μεθανόλη για HPLC (Merck, Germany)

Υπερκαθαρό νερό που παράχθηκε στο εργαστήριο

Πρότυπες ουσίες irgarol 1051, diuron, DCPMU, DCPU, DCA (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Germany)

Πρότυπη ουσία M1 (Additive Hellas, Ελλάδα)

Διαλύματα παρακαταθήκης των έξι ουσιών σε μεθανόλη, 1000 mg L⁻¹

Άζωτο καθαρότητας 99,999 % (Messer, Austria)

Ήλιο καθαρότητας 99,999 % (Messer, Austria)

7.5 Μεθοδολογία

7.5.1 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης

Η αποδοτικότητα της διαδικασίας της εκχύλισης εξετάστηκε με πειράματα ανάκτησης. Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν ήταν η ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος, ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, η διάρκεια της εκχύλισης και η θερμοκρασία στην οποία έλαβε χώρα η εκχύλιση. Οι παραπάνω παράμετροι εξετάστηκαν σε τέσσερα επίπεδα.

7.5.1.1 Ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος

Κατά τη διάρκεια αυτών των πειραμάτων προσδιορίστηκε η βέλτιστη ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος. Εκχυλίστηκε ποσότητα ιζήματος 2, 5, 10 και 15 g. Αρχικά το ίζημα ομογενοποιήθηκε για μία ώρα με 10 mL υπερκαθαρού νερού. Έπειτα επιφορτίστηκε με 50 μl μίγματος των εξεταζόμενων ουσιών, συγκέντρωσης 10 mg L⁻¹ και αναδεύτηκε μηχανικά για 10 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 20 mL μεθανόλης και το δείγμα εκχυλίστηκε στους 50 °C για 30 min με χρήση υπερήχων. Η παραπάνω διαδικασία έλαβε χώρα εις διπλούν. Τα εκχυλίσματα συνδυάστηκαν και διηθήθηκαν χρησιμοποιώντας φίλτρα GF/F 0,7 μm από υαλονήματα (Whatman, England). Μετά τη διήθηση ακολούθησε συμπύκνωση του συνολικού εκχυλίσματος με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστή μέχρι όγκου 10 mL. Κατόπιν προστέθηκαν στο δείγμα 20 mL υπερκαθαρού νερού και ακολούθησε καθαρισμός του δείγματος με τη χρήση εκχύλισης στερεής φάσης.

Για τον καθαρισμό του δείγματος ιζήματος χρησιμοποιήθηκαν φύσιγγες C18 (500 mg, 6 mL, Sep-Pak Vac, Waters, Ireland). Οι φύσιγγες αρχικά καθαρίστηκαν με 10 mL ακετονιτριλίου (ροή ≈ 0,5 mL min⁻¹). Κατόπιν ενεργοποιήθηκαν με 10 mL μεθανόλης και 10 mL υπερκαθαρού νερού (ροή ≈ 0,5 mL min⁻¹). Το δείγμα αναρροφήθηκε μέσω των

φύσιγγων με ροή 10 ml min^{-1} . Οι φύσιγγες καθαρίστηκαν με $4 \times 2,5 \text{ mL}$ υπερκαθαρού νερού και ξηράθηκαν με ρεύμα αέρα για 3 min. Η έκλουση των προσροφημένων ουσιών στις φύσιγγες πραγματοποιήθηκε με $3 \times 2 \text{ mL}$ μεθανόλης. Η μεθανόλη εξατμίστηκε προσεκτικά μέχρις όγκου $500 \mu\text{L}$ με χρήση ρεύματος αζώτου, στους $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Ο τελικός όγκος των δειγμάτων πριν την ανάλυση αυξήθηκε σε 1 mL , με προσθήκη $500 \mu\text{L}$ αρχικής κινητής φάσης (20 % ακετονιτρίλιο – 80 % νερό).

7.5.1.2 Όγκος διαλύτη εκχύλισης

Για τον προσδιορισμό του βέλτιστου όγκου της μεθανόλης που απαιτείται για την εκχύλιση του ιζήματος εξετάστηκαν τρία επιπλέον επίπεδα ($10, 30$ και 40 mL μεθανόλης) εκτός από αυτό των 20 mL . Ποσότητα ιζήματος 2 g ομογενοποιήθηκε για μία ώρα με 10 mL υπερκαθαρού νερού και κατόπιν επιφορτίστηκε με $50 \mu\text{L}$ μίγματος των εξεταζόμενων ουσιών, συγκέντρωσης 10 mg L^{-1} . Το δείγμα ιζήματος αναδεύτηκε μηχανικά για 10 min. Έπειτα προστέθηκε ο κατάλληλος όγκος του διαλύτη εκχύλισης και το δείγμα εκχυλίστηκε στους $50 \text{ }^\circ\text{C}$ για 30 min με τη χρήση υπερήχων. Η μετέπειτα διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 7.5.1.1. Όλα τα πειράματα για τον προσδιορισμό του βέλτιστου όγκου της μεθανόλης έλαβαν χώρα εις διπλούν.

7.5.1.3 Διάρκεια της εκχύλισης

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης διάρκειας της εκχύλισης, ποσότητα ιζήματος 2 g αρχικά ομογενοποιήθηκε για μία ώρα με 10 mL υπερκαθαρού νερού και κατόπιν επιφορτίστηκε με $50 \mu\text{L}$ μίγματος των εξεταζόμενων ουσιών, συγκέντρωσης 10 mg L^{-1} . Το δείγμα ιζήματος αναδεύτηκε μηχανικά για 10 min. Έπειτα προστέθηκαν 20 ml μεθανόλης και το δείγμα εκχυλίστηκε στους $50 \text{ }^\circ\text{C}$ για $10, 20$ και 40 min με χρήση υπερήχων. Η μετέπειτα διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 7.5.1.1. Όλα τα πειράματα για τον προσδιορισμό της βέλτιστης διάρκειας της εκχύλισης έλαβαν χώρα εις διπλούν.

7.5.1.4 Θερμοκρασία της εκχύλισης

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας στην οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση του ιζήματος, ώστε η εκρόφιση των εξεταζόμενων ουσιών από αυτό να είναι η μέγιστη δυνατή, εξετάστηκαν τρία επίπεδα: η θερμοκρασία των $40, 60$ και των $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Όπως περιγράφηκε και στις προηγούμενες παραγράφους, 2 g ιζήματος ομογενοποιήθηκαν

για μία ώρα με 10 mL υπερκαθαρού νερού, επιφορτίστηκαν με 50 μL μίγματος των εξεταζόμενων ουσιών, συγκέντρωσης 10 mg L^{-1} και στη συνέχεια αναδεύτηκαν μηχανικά για 10 min. Ποσότητα μεθανόλης 20 mL προστέθηκε και το δείγμα εκχυλίστηκε στους 40, 60 και 70 °C για 30 min με χρήση υπερήχων. Η μετέπειτα διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 7.5.1.1. Όλα τα πειράματα για τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας της εκχύλισης έλαβαν χώρα εις διπλούν.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Statgraphics (version 4.0 STSC Inc. and Statistical graphics corporation, 1989). Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Least Significant Difference (LSD) για επίπεδο σημαντικότητας 0,05 διερευνήθηκε αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ανακτήσεων στις διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης.

7.5.2 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας

Η βαθμονόμηση του οργάνου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα των έξι ουσιών σε εννέα διαφορετικές συγκεντρώσεις (10, 25, 40, 60, 120, 250, 500, 1250 και 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$) στην αρχική κινητή φάση, τα οποία αναλύθηκαν αμέσως χωρίς καμία προεπεξεργασία. Για κάθε συγκέντρωση υπήρξαν τρεις διαφορετικές επαναλήψεις.

Το όριο ανίχνευσης της κάθε ουσίας προσδιορίστηκε ως τρεις φορές η τυπική απόκλιση του θορύβου έξι διαφορετικών τυφλών δειγμάτων ιζήματος, τα οποία υπέστησαν την ίδια ακριβώς προεπεξεργασία όπως και τα επιφορτισμένα με τις έξι ουσίες δείγματα. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη σχέση (6.6).

Η πιστότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε πραγματοποιώντας πειράματα επαναληψιμότητας (πιστότητα την ίδια μέρα, $n=5$) και αναπαραγωγιμότητας (πιστότητα μεταξύ διαφορετικών ημερών, $n=3$). Για τα παραπάνω πειράματα τρία διαφορετικά δείγματα ιζήματος επιφορτίστηκαν με συγκέντρωση 25 ng g^{-1} των εξεταζόμενων ουσιών και αναλύθηκαν τρεις διαφορετικές ημέρες ($k=3$) σε διάστημα μιας εβδομάδας.

Για την εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης. Δείγματα ιζήματος επιφορτίστηκαν με τέσσερις διαφορετικές περιεκτικότητες (10, 25, 50 και 100 ng g^{-1}) και αναλύθηκαν ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ανάκτηση της μεθόδου.

7.6 Ανάλυση με HPLC-DAD

Η χρωματογραφική ανάλυση των εξεταζόμενων ουσιών HPLC-DAD πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την 6.5.4.

Η ταυτοποίηση των εξεταζόμενων ουσιών στα δείγματα θαλάσσιου ιζήματος πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 6.5.4.

7.7 Αποτελέσματα και συζήτηση

7.7.1 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης

Σε όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν οι ανακτήσεις όλων των ουσιών εκτός αυτή της DCA ήταν υψηλές και κυμάνθηκαν από 70 έως 110 % (Πίνακες 7.1-7.4). Για τη DCA παρατηρήθηκαν χαμηλές ανακτήσεις περίπου 50 % σε όλες τις περιπτώσεις. Η διαπίστωση αυτή εκ πρώτης όψεως είναι σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των πειραμάτων προσδιορισμού των δυνητικών απωλειών στα διάφορα στάδια της εκχύλισης (παρ. 6.6.1), σύμφωνα με τα οποία δεν υπήρξαν απώλειες της ουσίας λόγω εξάτμισης ή ανεπαρκούς εκχύλισης της πάνω στις φύσιγγες C18 κατά το στάδιο του καθαρισμού. Λαμβάνοντας υπόψη όμως το γεγονός ότι στα παραπάνω πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα υπερκαθαρό νερό, προκύπτει ότι για τη χαμηλή ανάκτηση της DCA ευθύνονται προφανώς ισχυρές αλληλεπιδράσεις της ουσίας με το ίδιο το ιζήμα οι οποίες είναι δύσκολο να διαταραχθούν. Οι Dicorcia et al. (1999) αναφέρουν ότι μεταξύ των αρωματικών αμινών και των ομάδων κινόνης (quinone) των χουμικών ουσιών που υπάρχουν φυσικά στο ιζήμα αναπτύσσονται ομοιοπολικοί δεσμοί με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η πλήρης απομόνωσή τους από αυτό.

Οι μηχανισμοί ενσωμάτωσης των ανιλινών στα χουμικά οξέα του εκάστοτε υποστρώματος σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι δύο (Cranwell and Haworth, 1971; Hsu and Bartha, 1974). Κατά τον πρώτο, δημιουργούνται δεσμοί μεταξύ των ανιλινών και της καρβονλικής ομάδας της κινόνης που οδηγούν στο σχηματισμό ιμινών (βάσεις Schiff) ενώ κατά τον δεύτερο πραγματοποιείται 1,4 προσθήκη (προσθήκη Michael) στο μόριο της κινόνης που συνεπάγεται τη δημιουργία αμινοϋδροκινόνης, αμινοκινόνης καθώς και άλλων ετεροκυκλικών ενώσεων του αζώτου. Ο πρώτος μηχανισμός είναι γρήγορος και αναστρέψιμος ενώ ο δεύτερος είναι αργός και μη αναστρέψιμος.

7.7.1.1 Ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος

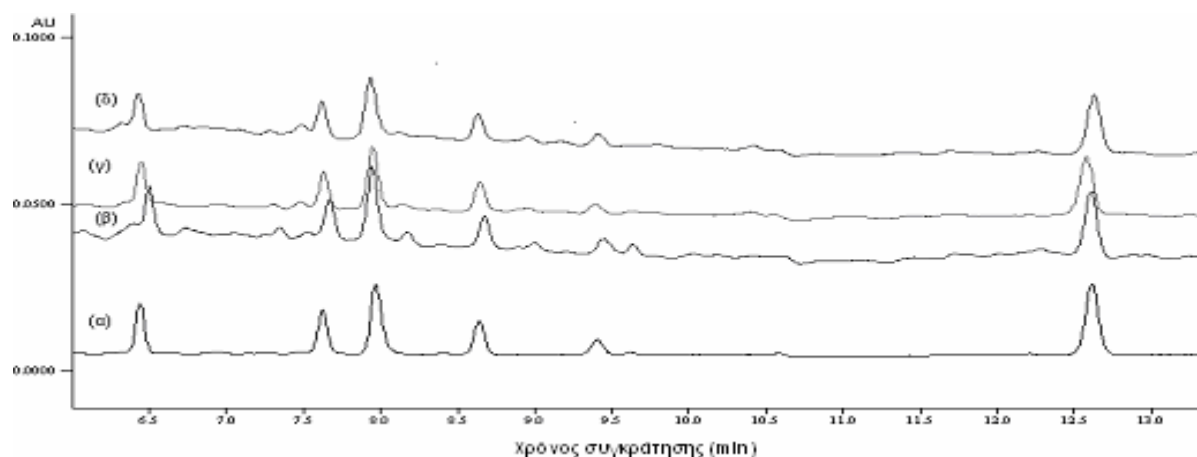
Η αύξηση της ποσότητας του εκχυλιζόμενου ιζήματος επέφερε στις περισσότερες περιπτώσεις στατιστικά σημαντική μείωση της ανάκτησης των εξεταζόμενων ουσιών (Πίνακας 7.1). Η σταδιακή μείωση της ανάκτησης καθώς αυξάνεται η ποσότητα του ιζήματος, από τα 2 στα 15 g, ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι ο όγκος της μεθανόλης παρέμεινε σταθερός (20 mL) κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων. Όπως αποδείχθηκε όμως ο όγκος αυτός του διαλύτη προφανώς δεν ήταν αρκετός ώστε να εκχυλιστούν πλήρως οι ουσίες από ποσότητα ιζήματος μεγαλύτερη των 5 g.

Πίνακας 7.1 Ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση διαφορετικών ποσοτήτων ιζήματος εις διπλούν με 20 mL μεθανόλης για 30 min στους 50 °C με χρήση υπερήχων.

Ουσία	2 g		5 g		10 g		15 g	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
DCPU	98,5 ^a	0,50	99,9 ^a	5,48	82,0 ^b	1,86	70,0 ^γ	7,21
DCPMU	99,0 ^a	1,75	90,8 ^b	3,67	84,5 ^γ	3,65	69,4 ^δ	6,05
M1	99,9 ^a	4,49	102,0 ^a	1,21	93,1 ^a	8,13	80,7 ^b	10,5
Diuron	98,9 ^a	0,88	92,5 ^{αβ}	2,33	87,3 ^b	2,75	74,8 ^γ	8,00
DCA	55,9 ^a	11,3	50,3 ^{αβ}	3,95	42,4 ^b	10,3	26,1 ^γ	23,4
Irgarol 1051	90,3 ^a	6,44	95,4 ^{αβ}	3,49	79,5 ^b	9,43	65,8 ^γ	14,7

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα (γράμματα) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

Επιπλέον η αύξηση της ποσότητας του εκχυλιζόμενου ιζήματος είχε ως αποτέλεσμα και αύξηση των εκχυλιζόμενων προσμίξεων (Σχήμα 7.1) οι οποίες συνεκλούνται μαζί με τις εξεταζόμενες ουσίες και παρεμποδίζουν την ανάλυση δημιουργώντας συχνά σοβαρά προβλήματα. Ποσότητα ιζήματος 2 g ως βέλτιστη για την εκχύλιση του irgarol 1051, του diuron και των μεταβολιτών τους από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (Thomas et al., 2002; Carrasco et al., 2003).



Σχήμα 7.1 Χρωματογραφήματα των έξι ουσιών κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης της ποσότητας του εκχυλιζόμενου ιζήματος. (α) 2 g, (β) 5 g, (γ) 10 g, (δ) 15 g; $\lambda = 234$ nm. Κορυφές (από αριστερά προς τα δεξιά): 1- DCPU; 2- DCPMU; 3- M1; 4- diuron; 5- DCA; 6- irgarol 1051.

7.7.1.2 Όγκος διαλύτη εκχύλισης

Κατά την αύξηση του όγκου της μεθανόλης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Πίνακας 7.2), δεν παρατηρήθηκε καμία τάση βελτίωσης των ανακτήσεων των εξεταζόμενων ουσιών. Καθώς ο όγκος αυξήθηκε από 10 σε 40 mL η ανάκτηση παρέμεινε σχεδόν σταθερή, με μικρές αυξομειώσεις οι οποίες όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Για την εκχύλιση των ουσιών από το ίζημα επιλέχθηκε τελικά όγκος διαλύτη ίσος με 20 mL. Αυτή η σχετικά μικρή ποσότητα του διαλύτη συμβιβάζεται με τις σύγχρονες τάσεις στην περιβαλλοντική ανάλυση οι οποίες επιβάλλουν τη χρήση όσο το δυνατόν χαμηλότερων ποσοτήτων τοξικών αντιδραστηρίων (Wan 1996).

Πίνακας 7.2 Ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 2 g ιζήματος εις διπλούν με διαφορετικούς όγκους μεθανόλης για 30 min στους 50 °C με χρήση υπερήχων.

Ουσία	10 mL		20 mL		30 mL		40 mL	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
DCPU	87,1 ^a	6,83	99,9 ^β	5,48	85,7 ^a	10,8	91,0 ^{αβ}	4,78
DCPMU	84,5 ^a	6,40	90,8 ^a	3,67	86,1 ^a	11,3	89,2 ^a	1,85
M1	97,8 ^a	5,38	102,0 ^a	1,21	93,7 ^a	11,8	97,4 ^a	3,90
Diuron	90,9 ^a	7,42	92,5 ^a	2,33	89,3 ^a	10,2	92,0 ^a	1,66
DCA	62,9 ^a	11,3	50,3 ^a	3,95	51,0 ^a	10,4	57,8 ^a	10,5
Irgarol 1051	84,0 ^a	7,58	95,4 ^β	3,49	84,0 ^{αβ}	6,8	89,2 ^{αβ}	8,85

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα (γράμματα) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

7.7.1 3 Διάρκεια της εκχύλισης

Η αύξηση του χρόνου εκχύλισης δεν φάνηκε να επηρέασε σημαντικά την ανάκτηση των εξεταζόμενων ουσιών. Οι αυξομειώσεις που παρατηρήθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε διάρκεια εκχύλισης 30 min η οποία συνεπάγεται ανακτήσεις υψηλότερες από 90 % για όλες τις ουσίες εκτός από τη DCA η οποία όπως προαναφέρθηκε είναι και η μοναδική που παρουσίασε χαμηλή ανάκτηση κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων. Χρόνος εκχύλισης 30 min προτείνεται και από άλλους ερευνητές ως βέλτιστος για την απομόνωση των εξεταζόμενων ουσιών (Martinez et al., 2001b; Ferrer et al., 2001).

Πίνακας 7.3 Ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 2 g ιζήματος εις διπλούν με 20 mL μεθανόλης στους 50 °C για διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης με χρήση υπερήχων.

Ουσία	10 min		20 min		30 min		40 min	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
DCPU	93,6 ^a	6,17	81,1 ^b	5,51	99,8 ^a	5,48	93,1 ^a	3,12
DCPMU	95,5 ^a	5,16	86,6 ^b	7,65	90,8 ^{aβ}	3,67	86,6 ^b	1,85
M1	110 ^a	5,01	94,3 ^b	9,24	102 ^a	1,21	87,5 ^b	3,66
Diuron	98,3 ^a	1,99	84,4 ^b	6,16	92,5 ^γ	2,33	89,4 ^{βγ}	3,45
DCA	58,2 ^a	10,0	51,3 ^a	3,38	50,3 ^a	3,95	39,5 ^a	15,1
Irgarol 1051	84,0 ^a	8,34	74,5 ^b	4,76	95,4 ^γ	3,49	84,6 ^a	15,3

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα (γράμματα) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

7.7.1.4 Θερμοκρασία της εκχύλισης

Η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 στους 70 °C δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της εκχύλισης (Πίνακας 7.4). Παρόλο που υπήρξαν κάποιες στατιστικά σημαντικές διαφορές στις ανακτήσεις της DCA και της DCPU με την αύξηση της θερμοκρασίας, εντούτοις δεν παρατηρήθηκε κάποια σαφής τάση. Το σημείο βρασμού της μεθανόλης είναι 65 °C (Merck index, 1989) γεγονός που υποδηλώνει ότι πολύ υψηλές θερμοκρασίες, οδηγούν σε απώλεια του διαλύτη λόγω εξάτμισης ιδίως κατά τη διάρκεια της δεύτερης εκχύλισης. Από την άλλη πλευρά όμως η ασήμαντη μείωση των ανακτήσεων των έξι ουσιών στους 70 °C, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν λαμβάνει χώρα διάσπαση ή εξάτμιση των ουσιών λόγω της υψηλής θερμοκρασίας. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω παρατηρήσεις για την διαδικασία της εκχύλισης επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 50 °C.

Πίνακας 7.4 Ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση R.S.D. (%) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 2 g ιζήματος εις διπλούν με 20 mL μεθανόλης για 30 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες με χρήση υπερήχων.

Ουσία	40 °C		50 °C		60 °C		70 °C	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
DCPU	80,0 ^α	9,94	99,9 ^β	5,48	83,2 ^{αγ}	10,5	91,6 ^{βγ}	6,55
DCPMU	83,4 ^α	4,47	90,8 ^α	3,67	86,3 ^α	7,03	89,8 ^α	7,87
M1	100 ^α	11,3	102 ^α	1,21	98,7 ^α	12,2	106 ^α	5,46
Diuron	92,4 ^α	1,04	92,5 ^α	2,33	90,7 ^α	11,2	97,4 ^α	7,28
DCA	58,5 ^α	2,41	50,3 ^{αβ}	3,95	42,9 ^β	15,4	54,5 ^α	7,28
Irgarol 1051	91,0 ^α	7,00	95,4 ^α	3,49	93,7 ^α	4,63	92,9 ^α	3,74

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα (γράμματα) δεν είναι σημαντικά διαφορετικές σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

7.7.2 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας

Η καμπύλη βαθμονόμησης του οργάνου για κάθε ουσία, οι συντελεστές συσχέτισης (R^2) καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των έξι ουσιών φαίνονται στον Πίνακα 7.5. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της κάθε ουσίας προσδιορίστηκαν για ποσότητα ιζήματος 2 g. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, η ευαισθησία του οργάνου κατά τον προσδιορισμό της DCA είναι χαμηλότερη από ότι για τις τριαζίνες και τις ουρίες. Τα προσδιοριζόμενα όρια ανίχνευσης των εξεταζόμενων ουσιών είναι αρκετά χαμηλά λαμβάνοντας υπόψη τη μικρή ποσότητα ιζήματος που εκχυλίζεται κατά τη διαδικασία. Τα όρια ανίχνευσης του irgarol 1051 και του diuron που προσδιορίστηκαν είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτά που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Toth et al., 1996; Thomas et al., 2000; Biselli et al., 2000; Martinez and Barcelo 2001a; Albanis et al., 2002) και είναι ικανοποιητικά για την παρακολούθηση των συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών στο περιβάλλον.

Πίνακας 7.5 Καμπύλες βαθμονόμησης (με το τυπικό σφάλμα της κλίσης της ευθείας βαθμονόμησης και του σταθερού όρου), συντελεστές συσχέτισης (R^2) και όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης των έξι ουσιών σε θαλάσσιο ιζημα. Ο προσδιορισμός έγινε βάσει του ύψους της κορυφής.

Ουσία	Καμπύλη βαθμονόμησης	R^2	LOD (ng g^{-1})	LOQ (ng g^{-1})
DCPU	$y = (6,53 \pm 0,01)x - (2,24 \pm 13,6)$	0,9999	1,7	5,6
DCPMU	$y = (6,09 \pm 0,02)x - (19,6 \pm 20,5)$	0,9999	4,0	13
M1	$y = (5,70 \pm 0,03)x - (14,1 \pm 25,6)$	0,9998	3,4	11
Diuron	$y = (5,16 \pm 0,02)x - (24,3 \pm 18,0)$	0,9999	3,1	10
DCA	$y = (3,36 \pm 0,03) - (39,1 \pm 29,1)$	0,9994	2,1	6,9
Irgarol 1051	$y = (7,70 \pm 0,02)x - (23,6 \pm 24,4)$	0,9999	2,8	9,2

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας της αναλυτικής μεθόδου επιβεβαιώνουν ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή είναι επαναλήψιμη και αναπαραγώγιμη (Πίνακας 7.6). Τόσο κατά την ανάλυση των δειγμάτων ιζήματος την ίδια ημέρα όσο και σε διαφορετικές ημέρες παρατηρήθηκε σχετική τυπική απόκλιση μικρότερη του 10 % για όλες τις ουσίες εκτός από τη DCA για την οποία παρατηρήθηκαν σχετικές τυπικές αποκλίσεις έως και 15 %.

Πίνακας 7.6 Πιστότητα της διαδικασίας εκχύλισης για επίπεδο συγκέντρωσης των εξεταζόμενων ουσιών 25 ng g^{-1} .

Ουσία	Πιστότητα την ίδια μέρα	Πιστότητα μεταξύ διαφορετικών ημερών
	RSD (%), $n=5$	RSD (%), $n=3, k=3$
DCPU	4,81	5,79
DCPMU	5,42	6,17
M1	3,78	4,98
Diuron	5,08	5,92
DCA	10,0	14,6
Irgarol 1051	4,72	8,18

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανάκτησης που έλαβαν χώρα για επίπεδα συγκεντρώσεων των έξι ουσιών από 10 έως 100 ng g⁻¹ φαίνονται στον Πίνακα 7.7. Όπως προέκυψε, η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην εργασία αυτή παρέχει ικανοποιητικές ανακτήσεις, για τις πέντε από τις έξι ουσίες, οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 86 και 106 %, ενώ και η αναπαραγωγικότητα είναι αποδεκτή αφού η σχετική τυπική απόκλιση των ανακτήσεων είναι μικρότερη από 11 %. Η μόνη ουσία για την οποία παρατηρήθηκαν χαμηλές ανακτήσεις, μεταξύ 35 και 50 %, ήταν η DCA.

Πίνακας 7.7 % Ανάκτηση και σχετική τυπική απόκλιση, R.S.D. (n=3) των έξι ουσιών έπειτα από εκχύλιση 2 g θαλάσσιου ιζήματος επιφορτισμένο σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης των ουσιών.

Ουσία	10 ng g ⁻¹		25 ng g ⁻¹		50 ng g ⁻¹		100 ng g ⁻¹	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
DCPU	100,7	10,3	86,1	5,08	90,7	5,03	99,8	5,48
DCPMU	106,4	6,47	99,0	5,35	92,6	3,99	90,8	3,67
M1	95,9	8,28	87,5	6,52	90,2	6,81	95,1	1,21
Diuron	96,6	5,28	91,3	1,21	93,4	6,49	92,5	2,33
DCA	44,6	11,1	34,6	4,10	35,0	8,66	50,3	3,95
Irgarol 1051	102,6	8,80	86,4	9,94	87,7	10,2	95,4	3,49

7.8 Συμπεράσματα

Η βελτιστοποίηση των βασικών παραμέτρων της διαδικασίας εκχύλισης του ιζήματος (ποσότητα εκχυλιζόμενου ιζήματος, όγκος διαλύτη εκχύλισης, διάρκεια της εκχύλισης και θερμοκρασία της εκχύλισης) απέδειξε ότι η μόνη παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας είναι η ποσότητα του ιζήματος. Διατηρώντας την ποσότητα του διαλύτη εκχύλισης σταθερή, η % ανάκτηση των ουσιών μειώθηκε καθώς αυξήθηκε η μάζα του ιζήματος.

Βέλτιστη απομόνωση των περισσότερων ουσιών από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος, με ανακτήσεις μεγαλύτερες από 86,1 %, επιτυγχάνεται όταν 2 g δείγματος εκχυλίζονται εις διπλούν με 20 mL μεθανόλης στους 50 °C για 30 min. Η DCA είναι η μοναδική ουσία για την

οποία παρατηρούνται χαμηλές ανακτήσεις γεγονός που αποδίδεται στην αλληλεπίδραση της ουσίας αυτής με τις χουμικές ενώσεις που είναι παρούσες στο ίζημα. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι επαναλήψιμη και αναπαραγώγιμη και τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που επιτεύχθηκαν είναι αποδεκτά για την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων και συμφωνούν με τη διεθνή βιβλιογραφία.

Η χρήση της μεθόδου μπορεί να επεκταθεί για την ανάλυση και άλλων ουσιών που ανήκουν στις χημικές κατηγορίες των τριαζινών και των υποκατεστημένων ουσιών από δείγματα ιζήματος ακόμα και εδάφους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ IRGAROL 1051 ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΡΙΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΤΟΥ Μ1 ΣΕ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΙΖΗΜΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ

8.1 Εισαγωγή

Η έρευνα στην περιβαλλοντική ανάλυση, για την ανεύρεση μεθόδων εκχύλισης οι οποίες είναι απλές, γρήγορες και αποτελεσματικές αποτελεί πάντα πρόκληση. Τα τελευταία χρόνια η μέθοδος εκχύλισης με τη χρήση μικροκυμάτων (Microwave Assisted Extraction - MAE) κερδίζει συνεχώς έδαφος έναντι των παραδοσιακών τεχνικών εκχύλισης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην προσρόφηση της ενέργειας μικροκυμάτων από τους διαλύτες έκλουσης, Το γεγονός αυτό συνεπάγεται αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η διάχυση των ουσιών από το υπόστρωμα στο διαλύτη (Hoogerbrugge et al., 1997).

Η εκχύλιση δειγμάτων με τη χρήση μικροκυμάτων πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες μεθόδους όπως αυτή της εκχύλισης με χρήση υπερήχων διότι απαιτούνται μικρότεροι όγκοι οργανικών διαλυτών, ο χρόνος εκχύλισης είναι μικρότερος εξαιτίας της άμεσης θέρμανσης των διαλυτών από τα μικροκύματα και επιπλέον είναι δυνατή η ταυτόχρονη εκχύλιση πολλών δειγμάτων (μέχρι και 14) (Eskilsson and Björklund, 2000). Επιπρόσθετα, η παρουσία νερού στα δείγματα (% υγρασία) μπορεί να αποβεί ευεργετική για τη εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων (Xiong et al., 1999). Το νερό έχει βρεθεί ότι βελτιώνει την ανάκτηση των εκχυλιζόμενων ουσιών (Lopez-Avila et al., 1994; Barnabas et al., 1995; Xiong et al., 1999) και βοηθά στην απορρόφηση της ενέργειας μικροκυμάτων από τους μη πολικούς διαλύτες (Pastor et al., 1997).

Η απομόνωση ορισμένων οργανικών ουσιών όπως είναι οι τριαζίνες χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη εκχύλισης αναφέρεται από διάφορους ερευνητές (Steinheimer et al., 1993; Stout et al., 1996; Xiong et al., 1998; Xiong et al., 1999; Shen and Lee, 2003). Σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες το νερό είναι ασφαλές, φιλικό προς το περιβάλλον και πιο οικονομικό. Επιπλέον με τη χρήση νερού μειώνεται σημαντικά ο χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση, διότι τα υδατικά εκχυλίσματα μπορούν κατευθείαν να προσυγκεντρωθούν με τις τεχνικές

εκχύλισης στερεής φάσης και μικροεκχύλισης στερεής φάσης. Συγχρόνως τα δείγματα μπορούν απευθείας να αναλυθούν με την τεχνική της υδροχρωματογραφίας, εφόσον δεν απαιτείται προσυγκένρωσή τους (αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις ουσιών στο δείγμα), αφού το νερό είναι συμβατός διαλύτης με αυτή την τεχνική.

Η εκχύλιση με χρήση μικροκυμάτων πέρα από τα πλεονεκτήματα, εμφανίζει και μειονεκτήματα όπως όλες οι μέθοδοι. Το πιο βασικό είναι ότι ο διαλύτης έκλουσης θα πρέπει να έχει την ικανότητα να απορροφά την ενέργεια μικροκυμάτων ενώ και εδώ απαιτείται καθαρισμός των εκλουσμάτων για την απομάκρυνση προσμίξεων που εκχυλίζονται ταυτόχρονα με τις υπό εξέταση ουσίες και μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα στη χρωματογραφική ανάλυση (Eskilsson and Björklund, 2000; Shen and Lee, 2003). Τέλος, αν η ανάλυση πρόκειται να πραγματοποιηθεί με αεριοχρωματογραφία, οι ουσίες θα πρέπει να μεταφερθούν σε οργανικό διαλύτη πριν την ανάλυση.

Σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μεθόδου εκχύλισης του irgarol 1051 και του κύριου μεταβολίτη του M1, με χρήση μικροκυμάτων από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος, καθώς και ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των ουσιών αυτών με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκε η χρήση του νερού ως διαλύτη έκλουσης. Μελετήθηκαν προσεκτικά η ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος, ο όγκος του νερού, η διάρκεια της εκχύλισης και η θερμοκρασία της εκχύλισης. Επιπλέον η μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε σε φυσικά δείγματα θαλάσσιου ιζήματος.

Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία μέθοδος εκχύλισης του irgarol 1051 και του κύριου μεταβολίτη του M1 από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με χρήση μικροκυμάτων. Επιπλέον για πρώτη φορά χρησιμοποιείται ένας περιβαλλοντικά φιλικός διαλύτης εκχύλισης για την απομόνωση αυτών των ουσιών από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος.

8.2 Δειγματοληψία

Για την ανάπτυξη της μεθόδου, επιφανειακά δείγματα θαλάσσιου ιζήματος (30 cm) συλλέχθηκαν με τη βοήθεια αρπάγης (Van Veen grab) από την περιοχή Seven Sisters, η οποία βρίσκεται περίπου 26 Km ανατολικά της πόλης του Brighton & Hove (Ηνωμένο Βασίλειο). Τα δείγματα ιζήματος μεταφέρθηκαν με ατσάλινη λαβίδα σε γυάλινα δοχεία και αποθηκεύτηκαν στους -18

°C. Πριν την έναρξη οποιουδήποτε πειράματος τα δείγματα αναλύθηκαν ώστε να επιβεβαιωθεί η απουσία του irgarol 1051 και του M1 από αυτά.

Τα φυσικά δείγματα θαλάσσιου ιζήματος συλλέχθηκαν από το εμπορικό λιμάνι Shoreham Harbour (Νότια Αγγλία) το Μάιο του 2003 και αποθηκεύτηκαν στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την ανάλυση.

8.3 Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός (κύριος και βοηθητικός) που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτού του κεφαλαίου περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.

8.4 Αντιδραστήρια

Ακετονιτρίλιο (Rathburns, Germany)

Μεθανόλη (Rathburns, Germany)

Οξικός αιθυλεστέρας (Rathburns, Germany)

Ακετόνη (Rathburns, Germany)

Υπερκαθαρό νερό που παράχθηκε στο εργαστήριο

Πρότυπη ουσία irgarol 1051 (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Germany)

Πρότυπη ουσία M1 (Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Essex, UK και Ciba-Geigy, NY, USA)

Πρότυπη ουσία atrazine- d_5 (QMX Laboratories, UK)

Διαλύματα παρακαταθήκης των εξεταζόμενων ουσιών (irgarol 1051 και M1) σε μεθανόλη, 1000 mg L^{-1}

Διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου (atrazine- d_5) σε μεθανόλη, 500 mg L^{-1}

Άζωτο καθαρότητας 99,999 % (Messer, Austria)

8.5 Μεθοδολογία

8.5.1 Επιλογή των βέλτιστων παραμέτρων εκχύλισης

Στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν να εξεταστούν λεπτομερώς οι διάφοροι παράμετροι που επηρεάζουν την διαδικασία της εκχύλισης, ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες τιμές τους οι οποίες

συνεπάγονται μέγιστη απόδοση της εκχύλισης με χρήση μικροκυμάτων. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν καθώς και τα επίπεδα που ελέγχθηκαν ήταν τα εξής:

- Ποσότητα ιζήματος: 1, 2, 3, 5 και 10 g (ξηρό βάρος)
- Όγκος διαλύτη εκχύλισης: 10, 15, 25, 30 και 40 mL νερού
- Διάρκεια της εκχύλισης: 3, 5, 10, 15 και 20 min
- Θερμοκρασία της εκχύλισης: 100, 105, 115, 120 και 130°C

Η πρώτη παράμετρος που εξετάστηκε ήταν η ποσότητα του εκχυλιζόμενου ιζήματος. Αρχικά το ίζημα αποψύχθηκε, ομογενοποιήθηκε και ζυγίστηκε κατευθείαν στα ειδικά δοχεία PTFE της συσκευής εκχύλισης με μικροκύματα. Τα δείγματα επιφορτίστηκαν με 2 mL διαλύματος των εξεταζόμενων ουσιών και του εσωτερικού προτύπου (atrazine – d₅), συγκέντρωσης 100 ng σε ακετόνη. Στη συνέχεια, τα δοχεία τοποθετήθηκαν στον απαγωγό για 24 h ώστε να εκδιωχθεί η ακετόνη. Μετά την εξάτμιση της ακετόνης, προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 30 mL νερού, τα δοχεία τοποθετήθηκαν συμμετρικά στον περιστρεφόμενο δίσκο της συσκευής MAE και εκχυλίστηκαν για 3 min στους 105 °C. Τα δείγματα αφέθηκαν να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία συλλέχθηκε η υπερκείμενη φάση. Το ίζημα ξεπλύθηκε τρεις φορές με 10 mL υπερκαθαρού νερό και όλες οι υπερκείμενες φάσεις συνδυάστηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 2500 rpm ώστε να διαχωριστούν τα αιωρούμενα σωματίδια από το έκλουσμα.

Για τον καθαρισμό των εκλουσμάτων χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση στερεής φάσης πάνω σε φύσιγγες C18 (1 g, 6 mL, Isolute ENV+, IST, Ireland). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 6. Όμως σε αυτά τα πειράματα τα δείγματα μετά την έκλουση από τις φύσιγγες C18 εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκαν σε 300 μL οξικού αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων ανάκτησης που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν καταλληλότητα της μεθόδου στερεής εκχύλισης που αναπτύχθηκε στο κεφάλαιο 6 και για αυτές τις φύσιγγες παρόλο που περιέχουν διπλάσια ποσότητα πληρωτικού υλικού από αυτή των Sep-Pak (500 mg).

Η ίδια διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω χρησιμοποιήθηκε ώστε να προσδιοριστούν οι βέλτιστες τιμές του διαλύτη εκχύλισης καθώς και της διάρκειας και της θερμοκρασίας της εκχύλισης. Τελικά λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων για κάθε παράμετρο επιλέχθηκε η βέλτιστη, από τις εξεταζόμενες, τιμή και η

μέθοδος εφαρμόστηκε σε επιφορτισμένα δείγματα θαλάσσιου ιζήματος ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα των επιλεγμένων τιμών.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS (SPSS for Windows, version 11.0, SPSS Inc., 2001). Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Least Significant Difference (LSD) για επίπεδο σημαντικότητας 0,05 διερευνήθηκε αν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μέσων όρων των ανακτήσεων.

8.5.2 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας

Η βαθμονόμηση του οργάνου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα των εξεταζόμενων ουσιών σε οκτώ διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,02, 0,05, 0,10, 0,30, 0,50, 0,80, 1,0 και 2,5 mg L⁻¹) σε οξικό αιθυλεστέρα. Για κάθε συγκέντρωση υπήρχαν τρεις επαναλήψεις. Η συγκέντρωση της atrazine-d₅ ήταν η ίδια σε όλα τα πρότυπα διαλύματα και ίση με 0,5 mg L⁻¹. Για τη διερεύνηση τυχόν διαφορών στην ευαισθησία του οργάνου για τις δύο ουσίες, πραγματοποιήθηκε επίσης στις ίδιες συγκεντρώσεις βαθμονόμηση βασισμένη στη μήτρα του δείγματος. Σε αυτή την περίπτωση τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε εκχύλισμα τυφλού δείγματος. Για την επικύρωση της μεθόδου και την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη καμπύλη βαθμονόμησης.

Το όριο ανίχνευσης της κάθε ουσίας προσδιορίστηκε ως τρεις φορές η τυπική απόκλιση δέκα διαφορετικών μετρήσεων τυφλού δείγματος επιφορτισμένο με 100 ng εσωτερικού προτύπου, ενώ το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη σχέση 6.6.

Η πιστότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε πραγματοποιώντας πειράματα επαναληψιμότητας (πιστότητα την ίδια ημέρα) και αναπαραγωγιμότητας (πιστότητα μεταξύ διαφορετικών ημερών). Για την εκτίμηση της πιστότητας της μεθόδου την ίδια μέρα (n=6), έξι διαφορετικά δείγματα θαλάσσιου ιζήματος επιφορτίστηκαν με ποσότητα 100 ng των εξεταζόμενων ουσιών και του εσωτερικού προτύπου και αναλύθηκαν την ίδια μέρα. Για την εκτίμηση της πιστότητας της μεθόδου μεταξύ διαφορετικών ημερών, δύο δείγματα θαλάσσιου ιζήματος (n=2) επιφορτίστηκαν επίσης με ποσότητα 100 ng των τριών ουσιών και αναλύθηκαν σε τρεις διαφορετικές ημέρες (k=3) κατά τη διάρκεια μιας εβδομάδας.

Για την εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης. Δείγματα θαλάσσιου ιζήματος (3 g) επιφορτίστηκαν με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (10,

100 και 1000 ng) των δύο ουσιών και 100 ng του εσωτερικού προτύπου και αναλύθηκαν. Τα πειράματα έλαβαν χώρα εις τριπλούν.

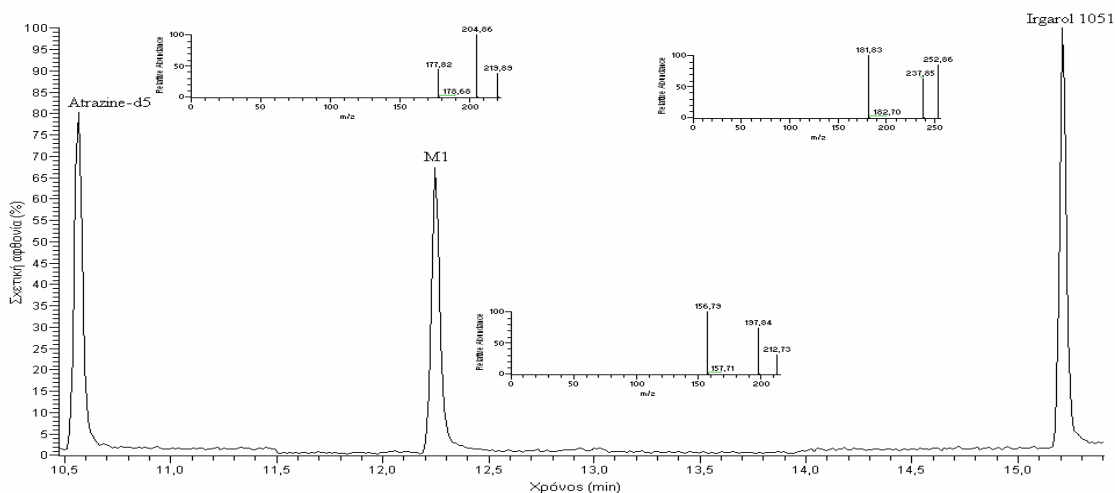
8.6 Χρωματογραφική ανάλυση

Ο αεριοχρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των εκλουσμάτων των δειγμάτων περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.

Για την ποιοτική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε πλήρης σάρωση (full scan mode) για εύρος μαζών από 50 ως 650. Η ποσοτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με παρακολούθηση συγκεκριμένων μόνο ιόντων (selected ion monitoring– SIM mode). Για κάθε ουσία επιλέχθηκαν από το φάσμα της τα τρία ιόντα που βρίσκονταν σε μεγαλύτερη αφθονία. Τα επιλεγμένα ιόντα καθώς και η σχετική αφθονία για καθένα από αυτά ήταν:

- Atrazine – d₅: 205 (100), 178 (41) και 220 (38)
- Irgarol 1051: 182 (100), 253 (61) and 238 (56)
- M1: 157 (100), 198 (77) και 213 (32)

Το EI-MS φάσμα του irgarol 1051 συμφωνεί με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Gough et al., 1994; Biselli et al. 2000; Thomas et al., 2000). Στο Σχήμα 8.1 παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα των εξεταζόμενων ουσιών σε SIM, καθώς και τα φάσματα μαζών της κάθε ουσίας.



Σχήμα 8.1 Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης $500 \mu\text{g L}^{-1}$ των εξεταζόμενων ουσιών (irgarol 1051 και M1) και του εσωτερικού προτύπου (atrazine- d_5) σε SIM καθώς και τα φάσματα μαζών τους.

8.7 Αποτελέσματα και συζήτηση

8.7.1 Επιλογή των βέλτιστων παραμέτρων εκχύλισης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν (Πίνακες 8.1-8.4), οι ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν για όλες τις εξεταζόμενες συνθήκες ήταν ικανοποιητικές και για τις δύο ουσίες. Το εύρος των ανακτήσεων κυμάνθηκε από 69 ως 121 %. Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με άλλες έρευνες οι οποίες αναφέρονται στην εκχύλιση τριαζινών από το έδαφος χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE (Steinheimer, 1993; Molins et al., 1996; Xiong et al., 1998; Xiong et al., 1999).

Η αύξηση της ποσότητας του εκχυλιζόμενου ιζήματος μέχρι τα 5 g δεν επηρέασε την ανάκτηση του M1 (Πίνακας 8.1). Η ανάκτηση της ουσίας μειώθηκε μόνο όταν εκχυλίστηκαν 10 g ιζήματος. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι ο όγκος του νερού παρέμεινε σταθερός (30 mL) σε όλες τις περιπτώσεις, παρόλο που η ποσότητα του ιζήματος αυξήθηκε. Έτσι η διαβρέξη του ιζήματος δεν ήταν ικανοποιητική και επομένως και οι ουσίες δεν ήταν δυνατόν να εκχυλιστούν σε μεγαλύτερο βαθμό. Όσον αφορά το irgarol 1051, κατά την εκχύλιση 3 g ιζήματος παρατηρήθηκε μέγιστη ανάκτηση της ουσίας (107 %). Σε όλες τις υπόλοιπες

περιπτώσεις οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 82 και 87 % χωρίς να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Από αυτή την ομάδα των πειραμάτων προέκυψε ότι η ποσότητα ιζήματος που παρέχει τις καλύτερες ανακτήσεις και για τις δύο ουσίες είναι τα 3 g.

Πίνακας 8.1 Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, RSD (%), $n = 3$) του M1 και του irgarol 1051 μετά την εκχύλιση διαφορετικών ποσοτήτων θαλάσσιου ιζήματος με 30 mL για 3 min στους 105 °C χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE.

Ουσία				
M1			irgarol 1051	
Ποσότητα ιζήματος (g)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
1	98,6*	7,66	86,8	7,35
2	121	8,64	87,1	2,60
3	112	8,30	107*	4,31
5	117	2,17	82,0	15,6
10	86,6*	7,09	85,6	10,3

*Τιμή (τιμές) για την οποία η εξεταζόμενη παράμετρος επηρέασε στατιστικά σημαντικά την ανάκτηση των ουσιών σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

Η αύξηση του όγκου του νερού επηρέασε την ανάκτηση του M1 μόνο όταν χρησιμοποιήθηκαν 40 mL διαλύτη για την εκχύλιση (Πίνακας 8.2). Η ανάκτηση ήταν χαμηλότερη (78,7 %) σε σχέση με τις ανακτήσεις της ουσίας που παρατηρήθηκαν όταν η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με μικρότερους όγκους νερού. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε ανεπαρκή ανάδευση του διαλύτη κατά την εκχύλιση. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία και από άλλους ερευνητές (Chee et al., 1996a). Η ανάκτηση του irgarol 1051 σύμφωνα με τα αποτελέσματα, δε φάνηκε να επηρεάζεται από την αύξηση του όγκου του νερού. Σε όλες τις περιπτώσεις οι ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν ήταν μεγαλύτερες από 79,5 %. Από αυτή την ομάδα των πειραμάτων, επιλέχθηκαν τα 30 mL νερού ως ο βέλτιστος όγκος για την ικανοποιητική εκχύλιση και των δύο ουσιών από το ίζημα με την τεχνική MAE.

Πίνακας 8.2 Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, RSD (% , $n = 3$) του M1 και του irgarol 1051 μετά την εκχύλιση 1 g θαλάσσιου ιζήματος με διαφορετικούς όγκους νερού για 3 min στους 105 °C χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE.

Ουσία				
M1			irgarol 1051	
Όγκος νερού (mL)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
10	115	8,46	95,4	12,6
15	89,2	6,12	79,5	14,8
25	94,4	10,5	80,5	16,7
30	98,6	7,66	86,8	7,35
40	78,7*	8,70	84,9	7,97

*Τιμή (τιμές) για την οποία η εξεταζόμενη παράμετρος επηρέασε στατιστικά σημαντικά την ανάκτηση των ουσιών σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

Αναφορικά με τη διάρκεια της διαδικασίας της εκχύλισης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της ανάκτησης του M1 όταν ο χρόνος εκχύλισης ήταν μεγαλύτερος από 10 min (Πίνακας 8.3). Η ανάκτηση της ουσίας μειώθηκε από 92,1 % (10 min) σε περίπου 70 % όταν τα δείγματα εκχυλίστηκαν για 15 και 20 min. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όταν η εκχύλιση διαρκεί μεγάλο χρονικό διάστημα τότε είναι δυνατόν να παρατηρηθεί διάσπαση των ουσιών οι οποίες είναι ασταθείς κατά τη θέρμανση (Chee et al., 1996b). Η ουσία M1, παρόλο που δεν χαρακτηρίζεται ως ασταθής στις υψηλές θερμοκρασίες, εντούτοις σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται ότι πιθανόν να διασπάται σε κάποιο βαθμό κάτω από τις συνθήκες της εκχύλισης με μικροκύματα. Η ανάκτηση του irgarol 1051 φάνηκε ότι βελτιώθηκε όταν η χρόνος της εκχύλισης αυξήθηκε από 3 σε 15 min. Όμως μεγαλύτερη αύξηση της διάρκειας της εκχύλισης (20 min) μείωσε την ανάκτηση της ουσίας από 96,3 % σε 86,1 %. Από αυτή την ομάδα των πειραμάτων, χρόνος 10 min επιλέχθηκε ως η βέλτιστη διάρκεια της διαδικασίας της εκχύλισης. Διάρκεια εκχύλισης 10 min αναφέρεται και από άλλους ερευνητές, ως καλύτερος χρόνος για την ικανοποιητική εκχύλιση οργανικών και οργανομεταλλικών ενώσεων με χρήση μικροκυμάτων (Lopez-Avila et al., 1994; Donard et al., 1995).

Πίνακας 8.3 Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, RSD (% , $n = 3$) του M1 και του irgarol 1051 μετά την εκχύλιση 1 g θαλάσσιου ιζήματος με 30 mL νερού στους 105 °C για διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE.

Ουσία				
M1			irgarol 1051	
Χρόνος (min)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
3	98,6	7,66	86,8	7,35
5	110	13,6	110*	10,5
10	92,1	3,25	93,2	2,59
15	71,4*	15,0	96,3	7,56
20	68,8*	18,3	86,1	15,1

*Τιμή (τιμές) για την οποία η εξεταζόμενη παράμετρος επηρέασε στατιστικά σημαντικά την ανάκτηση των ουσιών σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

Η αύξηση της θερμοκρασίας δεν φάνηκε να έχει καμιά επίδραση πάνω στην ανάκτηση του M1 (Πίνακας 8.4). Καθώς η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 100 στους 130 °C, η ανάκτηση της ουσίας παρέμεινε υψηλή (> 97 %). Αντίθετα, η ανάκτηση του irgarol 1051 φάνηκε να επηρεάζεται από την αύξηση της θερμοκρασίας της εκχύλισης. Όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 100 στους 115 °C, η ανάκτηση της ουσίας αυξήθηκε και μάλιστα στους 115 °C παρατηρήθηκε η υψηλότερη τιμή της (106 %) από όλα τα επίπεδα θερμοκρασιών που εξετάστηκαν. Η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας μείωσε την ανάκτηση του irgarol 1051. Από 106 % που ήταν στους 115 °C η ανάκτηση μειώθηκε σε 80,1 % στους 130 °C. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό της ανάκτησης που παρατηρήθηκε ήταν το ίδιο για τη χαμηλότερη και την υψηλότερη θερμοκρασία (100 και 130 °C) ενώ ίδιο ήταν και για τις θερμοκρασίες 105 και 120 °C. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τελικά υπάρχει μόνο μια ενδιάμεση τιμή της θερμοκρασίας από τους 100 μέχρι τους 130 °C, για την οποία η απόδοση της εκχύλισης είναι η βέλτιστη.

Πίνακας 8.4 Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, RSD (%), $n = 3$) του M1 και του irgarol 1051 μετά την εκχύλιση 1 g θαλάσσιου ιζήματος με 30 mL νερού για 3 min σε διαφορετικές θερμοκρασίες χρησιμοποιώντας την τεχνική MAE.

Ουσία				
M1			irgarol 1051	
Θερμοκρασία (°C)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
100	97,3	9,08	81,2	1,10
105	98,6	7,66	86,8	7,35
115	103	12,6	106*	3,42
120	97,3	19,4	86,3	0,79
130	105	5,36	80,1	9,77

*Τιμή (τιμές) για την οποία η εξεταζόμενη παράμετρος επηρέασε στατιστικά σημαντικά την ανάκτηση των ουσιών σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 (δοκιμασία LSD).

Για την επιβεβαίωση της ορθότητας της επιλογής των βέλτιστων τιμών των τεσσάρων παραμέτρων, 3 g θαλάσσιου ιζήματος, επιφορτισμένα με 100 ng από κάθε ουσία, εκχυλίστηκαν με 30 ml νερού στους 115 °C για 10 min (τρεις επαναλήψεις). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν ικανοποιητικές ανακτήσεις και για τις δύο ουσίες. Το ποσοστό της ανάκτησης βρέθηκε να είναι 93,1 και 94,1 % για το M1 και το irgarol 1051 αντίστοιχα ενώ η σχετική τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 10 % και για τις δύο ουσίες (2,70 % για το M1 και 7,09 % για το irgarol 1051). Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με άλλες έρευνες οι οποίες αναφέρονται στην εκχύλιση τριαζινών από το έδαφος με την τεχνική MAE χρησιμοποιώντας ως διαλύτη εκχύλισης νερό (Steinheimer, 1993; Xiong et al., 1999).

Για να διαπιστωθεί αν η επιλογή χρήσης εσωτερικού προτύπου κατά την ανάλυση ήταν ορθή, οι ανακτήσεις των δύο ουσιών υπολογίστηκαν και με τη βοήθεια εξωτερικού προτύπου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι ανακτήσεις του M1 κυμάνθηκαν από 33,5 ως 102 % με σχετική τυπική απόκλιση από 3,59 ως 46,1 % ενώ του irgarol 1051 κυμάνθηκαν από 34,1 ως 100 % με σχετική τυπική απόκλιση από 0,50 ως 43,3 %. Η μεγάλη αυτή διακύμανση στις ανακτήσεις καθώς και οι υψηλές τιμές τυπικών αποκλίσεων που παρατηρούνται όταν χρησιμοποιείται

εξωτερικό πρότυπο, προφανώς οφείλονται σε απώλειες των δύο ουσιών κατά την προεπεξεργασία των δειγμάτων εξαιτίας των πολλών σταδίων που λαμβάνουν χώρα. Για αυτό το λόγο ενδείκνυται η χρήση εσωτερικού προτύπου ώστε να είναι δυνατή η διόρθωση των απωλειών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η atrazine-d₅ είναι η ουσία που κατά κόρον χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο κατά την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, λόγω της μεγάλης ομοιότητας που παρουσιάζει η συμπεριφορά της με αυτή του M1 και του irgarol 1051 (Zhou et al., 1996; Thomas et al., 2002; Bowman et al., 2003).

8.7.2 Επικύρωση της αναλυτικής πορείας

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων επικύρωσης της μεθόδου (εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης, συντελεστές συσχέτισης (R^2), όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης) που αναπτύχθηκε για τις δύο ουσίες φαίνονται στον Πίνακα 8.5. Παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της απόκρισης (εμβαδόν κορυφής) και των δύο ουσιών κατά τη βαθμονόμηση χρησιμοποιώντας έκλουσμα τυφλού δείγματος συγκριτικά με τον καθαρό οργανικό διαλύτη, ενώ η απόκριση της atrazine – d₅ δεν επηρεάστηκε. Για το λόγο αυτό τα πρότυπα διαλύματα για τη βαθμονόμηση του οργάνου θα πρέπει να παρασκευάζονται σε έκλουσμα τυφλού δείγματος και όχι σε καθαρό οργανικό διαλύτη. Οι συγκεντρώσεις και των δύο ουσιών ήταν γραμμικές μέχρι το επίπεδο των 2,5 mg L⁻¹ στο πρότυπο διάλυμα, γεγονός που σημαίνει ότι στο ίζημα είναι γραμμικές μέχρι το επίπεδο των 0,25 μg g⁻¹. Τα όρια ανίχνευσης των ουσιών ήταν αρκετά χαμηλά λαμβάνοντας υπόψη τη μικρή ποσότητα ιζήματος που εκχυλίστηκε και σαφώς είναι αποδεκτά και ικανοποιητικά για την παρακολούθηση των συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών στο περιβάλλον.

Τα όρια ανίχνευσης του irgarol 1051 και του M1 που προσδιορίστηκαν, είναι της ίδιας τάξης μεγέθους ή και ελαφρώς καλύτερα σε σχέση με αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία για την εκχύλιση με την τεχνική MAE τριαζινών και μεταβολιτών τους από δείγματα εδάφους (Hoogerbrugge et al., 1997; Vryzas et al., 2002; Shen and Lee, 2003). Επιπλέον, είναι ελαφρώς καλύτερα από τα όρια ανίχνευσης των συγκεκριμένων ουσιών που προσδιορίστηκαν με τη χρήση HPLC-DAD σύμφωνα με την παράγραφο 6.6.5, ενώ γενικώς είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με τα όρια ανίχνευσης που αναφέρονται για τον προσδιορισμό των ουσιών με υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (Thomas et al., 2000; Martinez and Barceló, 2001a). Όσον αφορά τα όρια ανίχνευσης των ουσιών κατά τον προσδιορισμό τους με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών, η σύγκριση

με τη διεθνή βιβλιογραφία έδειξε ότι είναι σε συμφωνία παρόλο που στην παρούσα διατριβή η ποσότητα του εκχυλιζόμενου δείγματος είναι μικρότερη από ότι σε άλλες έρευνες (Tóth et al. 1996; Biselli et al., 2000; Albanis et al., 2002; Carrasco et al., 2003; Lambropoulou et al., 2003).

Πίνακας 8.5 Καμπύλες βαθμονόμησης, συντελεστές συσχέτισης (R^2) και όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης του M1 και του irgarol 1051 σε θαλάσσιο ιζήμα.

Ουσία	Κανονική καμπύλη βαθμονόμησης	R^2	Καμπύλη βαθμονόμησης βασισμένη στη μήτρα του δείγματος		LOD / LOQ (ng g ⁻¹ ξηρό βάρος)
				R^2	
M1	$y = 2,30x - 0,036$	0,9995	$y = 2,67x - 0,044$	0,9995	0,9 / 3,0
Irgarol 1051	$y = 2,87x - 0,048$	0,9991	$y = 3,79x - 0,064$	0,9990	1,7 / 5,6

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου, φάνηκε ότι η μέθοδος παρουσιάζει ικανοποιητική πιστότητα τόσο την ίδια μέρα όσο και μεταξύ διαφορετικών ημερών (Πίνακας 8.6). Η σχετική τυπική απόκλιση ήταν μικρότερη από 10 % και για τις δύο ουσίες υποδηλώνοντας καλή πιστότητα της μεθόδου που αναπτύχθηκε αλλά και το πλεονέκτημα της χρήσης εσωτερικού προτύπου στην ανάλυση. Η επαναληψιμότητα κατά την εισαγωγή (τρεις επαναλήψεις) πρότυπου διαλύματος των δύο ουσιών συγκέντρωσης 100 μg L⁻¹, εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση, ήταν 2,3 % για το M1 και 1,0 % για το irgarol 1051, ενώ κατά την εισαγωγή δείγματος ιζήματος επιφορτισμένο με τις δύο ουσίες σε συγκέντρωση 33 ng g⁻¹ (τελική συγκέντρωση των ουσιών κατά την εισαγωγή 100 μg L⁻¹) ήταν 5,7 % για το M1 και 4,2 % για το irgarol 1051.

Πίνακας 8.6 Πιστότητα της διαδικασίας εκχύλισης για επίπεδο των εξεταζόμενων ουσιών 100 ng.

Ουσία	Πιστότητα την ίδια, RSD (%), n=6	Πιστότητα μεταξύ διαφορετικών ημερών, RSD (%), n=2, k=3
M1	5,13	9,80
Irgarol 1051	6,51	8,00

Για την εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν, όπως προαναφέρθηκε, πειράματα ανάκτησης για τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δύο ουσιών. Οι ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν ήταν ικανοποιητικές και για τις δύο ουσίες σε όλα τα εξεταζόμενα επίπεδα (Πίνακας 8.7). Τα ποσοστά των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 85,4 ως 114 % με ικανοποιητική επαναληψιμότητα ($RSD \leq 14\%$) υποδεικνύοντας ικανοποιητική απομόνωση των εξεταζόμενων ουσιών από το θαλάσσιο ίζημα με την MAE μέθοδο που αναπτύχθηκε.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των πειραμάτων τόσο κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου όσο και κατά την επικύρωσή της, αποδεικνύεται ότι το νερό είναι αποτελεσματικός διαλύτης για την εκχύλιση του irgarol 1051 και του M1 από δείγματα ιζήματος αφού είναι ικανό να απορροφά την ενέργεια μικροκυμάτων και να τη μετατρέπει σε θερμική ενέργεια αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητα των ουσιών στο νερό. Επιπρόσθετα το νερό ως πολικός διαλύτης που είναι μπορεί να αλληλεπιδράσει αποτελεσματικότερα με της ενεργές θέσεις που υπάρχουν στην επιφάνεια του ιζήματος και στις οποίες προσροφούνται οι ουσίες, επιταχύνοντας την εκρόφησή τους και τη διέλευσή τους στην υδάτινη φάση.

Πίνακας 8.7 Μέση ανάκτηση (%) και σχετική τυπική απόκλιση, R.S.D. (n=3) του M1 και του irgarol 1051 έπειτα από εκχύλιση 3 g θαλάσσιου ιζήματος επιφορτισμένο σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης.

Ουσία	10 ng (n=5)		100 ng (n=4)		1000 ng (n=3)	
	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
M1	85,4	8,08	95,7	11,2	103	5,73
Irgarol 1051	104	9,13	101	14,0	114	6,69

Στον Πίνακα 8.8 δίνονται συγκεντρωτικά οι υπάρχουσες μέθοδοι εκχύλισης καθώς και η αποδοτικότητα της κάθε μιας (εκφρασμένη ως % ανάκτηση του irgarol 1051 και του M1) σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία. Στις περισσότερες από τις έρευνες αυτές, αναφέρονται ικανοποιητικές ανακτήσεις για το irgarol 1051 παρόλο που ο τρόπος εκχύλισης και καθαρισμού των δειγμάτων ποικίλουν. Μια άλλη σημαντική διαπίστωση είναι η τάση μείωσης της χρήσης οργανικών διαλυτών στις πιο πρόσφατες έρευνες (Martinez and Barceló, 2001a; Ferrer and Barceló, 2001; Carrasco et al., 2003; Lambropoulou et al., 2003), ενώ η μέθοδος με τη χρήση μικροκυμάτων που αναπτύχθηκε είναι η μοναδική στην οποία χρησιμοποιείται καθαρό νερό ως διαλύτης εκχύλισης. Επιπλέον, η εκχύλιση με μικροκύματα είναι γρηγορότερη από όλες τις υπάρχουσες μεθόδους. Μόνο σε τρεις έρευνες αναφέρονται ανακτήσεις του M1, σε δύο από αυτές η εκχύλιση γίνεται με υπερήχους (Ferrer and Barceló, 2001; Martinez and Barceló, 2001a) ενώ στην τρίτη συνδυάζεται η μηχανική ανάδευση με τους υπερήχους (Thomas et al., 2000) υποδεικνύοντας παρόμοια απόδοση των μεθόδων εκχύλισης με την μέθοδο που αναπτύχθηκε κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Πίνακας 8.8 Σύγκριση της απόδοσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό του irgarol 1051. Οι ανακτήσεις του M1 επίσης αναφέρονται στις περιπτώσεις που η ουσία μελετήθηκε.

Μέθοδος εκχύλισης	Μάζα ιζήματος	Διαλύτης εκχύλισης	Χρόνος εκχύλισης	Προσυγκέντρωση / καθαρισμός	Ανάκτηση (%)	Αναφορά
Soxhlet	40 g ww	Ακετόνη*	8 h	SPE (C18) + alumina + GPC	61	Biselli et al., 2000
Μηχανική ανάδευση	20 g dw	3×50 ml εξάνιο- ακετόνη (85:15)	60 min	Florisil	103	Tóth et al., 1996
Μηχανική ανάδευση	25 g dw	60 ml ακετόνη+ 50 ml διχλωρομεθάνιο	overnight	LLE: 3×30 ml πετρελαϊκός αιθέρας	88	Voulvoulis et al., 1999b
Υπέρηχοι	5-10 g dw	3×10 ml διχλωρομεθάνιο	n.s.*	-	95	Gough et al., 1994
Υπέρηχοι	10 g ww	15 ml μεθανόλη + 5 ml H ₂ O	30 min	SPE (C18)	90 80 (M1)	Ferrer and Barceló, 2001
Υπέρηχοι	5 g dw	20 ml μεθανόλη	30 min	SPE (Isolute ENV+)	69 86 (M1)	Martinezand Barceló, 2001a
Υπέρηχοι	2 g dw	20 ml μεθανόλη	30 min	SPE (C18)	86-103 88-96 (M1)	Κεφ. 7 παρούσας διατριβής
Μηχανική ανάδευση + υπέρηχοι	2 g dw	2×(50+50) ml μεθανόλη + οξικός αιθυλεστέρας	1 h + 10 min	-	99 123 (M1)	Thomas et al., 2000

Συνέχεια Πίνακα 8.8

Μέθοδος εκχύλισης	Μάζα ιζήματος	Διαλύτης εκχύλισης	Χρόνος εκχύλισης	Προσυγκέντρωση / καθαρισμός	Ανάκτηση (%)	Αναφορά
Μηχανική ανάδευση + υπέρηχοι	10 g ww	50 ml ακετόνη	30 min + 30 min	LLE: 50+2×25 ml DCM + Florisil	82	Albanis et al., 2002
Μηχανική ανάδευση + υπέρηχοι	5 g dw	30 ml H ₂ O – ακετόνη (5%)	30 min + 30 min	SPME	67	Lambropoulou et al., 2003
Μηχανική ανάδευση + υπέρηχοι	5 g dw	5 ml ακετόνη	30 min + 30 min	SPME	92	Lambropoulou et al., 2003
SFE	4 g dw	CO ₂ / (20%) μεθανόλη, TFA	30 min	Στήλη ανοσοσυγγένειας	87	Carrasco et al., 2003
MAE	3 g dw	30 ml H ₂ O	10 min	SPE (C18)	94-114 85-103 (M1)	Μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή

* Δεν διευκρινίζεται πόσος είναι ο όγκος της ακετόνης που χρησιμοποιείται.

8.7.3 Εφαρμογή της μεθόδου σε φυσικά δείγματα

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων φυσικών δειγμάτων με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.9. Οι ουσίες ανιχνεύθηκαν στα περισσότερα από τα δείγματα και οι συγκεντρώσεις τους κυμάνθηκαν από μη ανιχνεύσιμες έως 8,7 και 12 ng g⁻¹ για το M1 και το irgarol 1051 αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν συμφωνούν με τα επίπεδα των δύο ουσιών που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Haglund et al., 2001; Ferrer and Barceló 2001; Albanis et al., 2002; Carrasco et al., 2003).

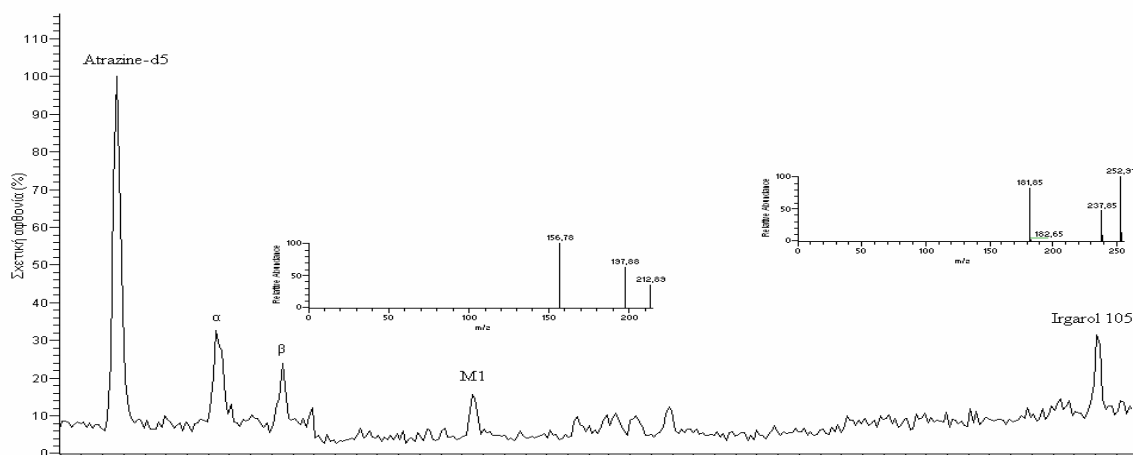
Πίνακας 8.9 Συγκεντρώσεις του M1 και του irgarol 1051 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour (Ηνωμένο Βασίλειο).

Σημείο δειγματοληψίας	Συγκέντρωση ουσίας (ng g ⁻¹ ξηρό βάρος)	
	M1	irgarol 1051
Aldrington Wharf	7,4	9,2
The Canal	8,7	9,9
Lady Bee Marina	4,4	12
Surry Boat Yard	-	2,5
Emerald Quay	4,1	3,2
Soldier Point	1,6	1,9

-: η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (LOD=0,9 ng g⁻¹).

Στο Σχήμα 8.2 παρουσιάζεται ένα τυπικό χρωματογράφημα δείγματος ιζήματος προερχόμενο από το σημείο δειγματοληψίας Lady Bee Marina. Είναι φανερό ότι το SIM-EI-MS φάσμα του M1 στο δείγμα είναι ταυτόσημο με το φάσμα μάζας της ουσίας στο πρότυπο διάλυμα (Σχήμα 8.1), με κυρίαρχο το λόγο m/z 157. Παρόμοιο EI-MS φάσμα της ουσίας αναφέρεται και από τους Peñuela et al. (2000). Αναφορικά με το irgarol 1051, στο SIM φάσμα που λαμβάνεται όταν αναλύεται φυσικό δείγμα, κυρίαρχος είναι ο λόγος m/z 253 και ακολουθείται από τους λόγους m/z 182 (85 %) και 238 (48 %). Το φάσμα αυτό είναι διαφοροποιημένο από αντίστοιχο φάσμα που λαμβάνεται όταν αναλύεται πρότυπο διάλυμα της ουσίας. Η διαφορά αυτή μεταξύ των φασμάτων μάζας του irgarol 1051 σε πρότυπο διάλυμα και σε φυσικό δείγμα, αναφέρθηκε και από τους Steen et al. (1997) και προφανώς

οφείλεται στο γεγονός ότι τα SIM-EI-MS φάσματα λαμβάνονται από διαλύματα διαφορετικού υποστρώματος.



Σχήμα 8.2 Χρωματογράφημα δείγματος θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενο από το σημείο δειγματοληψίας Lady Bee marina καθώς και τα φάσματα μαζών του M1 και του irgarol 1051 σε SIM mode (α, β: άγνωστες κορυφές).

8.8 Συμπεράσματα

Η απομόνωση του irgarol 1051 και του κύριου μεταβολίτη του M1 με τη χρήση μικροκυμάτων από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος είναι γρήγορη, αποτελεσματική και ακριβής. Οι παρεμποδίσεις από τη μήτρα του δείγματος που παρατηρήθηκαν κατά τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών σε φυσικά δείγματα καθιστούν αναγκαία τη χρήση εσωτερικού προτύπου, ενώ και βαθμονόμηση της αναλυτικής διαδικασίας θα πρέπει να γίνεται με πρότυπα διαλύματα προσαρμοσμένα στη μήτρα του δείγματος.

Το νερό αποδείχθηκε ικανοποιητικός διαλύτης εκχύλισης, ενώ χάρις τον απευθείας καθαρισμό των εκχυλισμάτων με την τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης μειώθηκε σημαντικά. Επομένως η χρήση του θα πρέπει να προτιμάται έναντι των οργανικών διαλυτών διότι, πέραν όλων των άλλων πλεονεκτημάτων που προαναφέρθηκαν, παρακάμπτεται το χρονοβόρο στάδιο εξάτμισης των μεγάλων όγκων τοξικών οργανικών διαλυτών που συνήθως χρησιμοποιούνται και οι οποίοι θέτουν σε κίνδυνο και την υγεία του ίδιου του αναλυτή.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον γρήγορο προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του irgarol 1051 και του M1 σε φυσικά

δείγματα ιζήματος αλλά μπορεί να εφαρμοστεί περαιτέρω, για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων άλλων ουσιών της ίδιας χημικής κατηγορίας με αυτές που εξετάστηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ IRGAROL 1051 ΤΟΥ DIURON ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΘΑΛΑΣΣΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

9.1 Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί προηγούμενα (Παράγραφος 1.8) τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προέκυψαν από την εκτεταμένη χρήση του TBT στα υφαλοχρώματα οδήγησαν στην εισαγωγή νέων ενναλακτικών ουσιών για την προστασία των υφάλων των μικρών σκαφών. Το irgarol 1051 και το diuron είναι δύο από τις ουσίες οι οποίες ευρέως έχουν χρησιμοποιηθεί στα υφαλοχρώματα τα τελευταία χρόνια σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (Readman, 1999).

Μέχρι το Σεπτέμβριο του 2000 η Υπηρεσία Υγείας και Ασφάλειας (Health and Safety Executive - HSE) του Ηνωμένου Βασιλείου επέτρεπε τη χρήση στα υφαλοχρώματα οκτώ οργανικών ενισχυτικών βιοκόνων ουσιών μεταξύ των οποίων το irgarol 1051 και το diuron (Thomas et al., 2002). Μετά το Σεπτέμβριο του 2000 όμως, και ως αποτέλεσμα της εναρμόνισης της νομοθεσίας της χώρας με την Ευρωπαϊκή Οδηγία που αφορά στα βιοκτόνα προϊόντα (98/8/EE), επιβλήθηκαν περιορισμοί στη χρήση των ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα υφαλοχρώματα για μικρά σκάφη (<25 m). Σύμφωνα με τους περιορισμούς αυτούς τα υφαλοχρώματα για τα μικρά σκάφη επιτρέπεται να περιέχουν μόνο τις ουσίες dichlofluanid, zineb και zinc pyrithione (HSE, 2000). Η χρήση του irgarol 1051 παρατάθηκε μέχρι τον Ιούλιο του 2003 αλλά μόνο για μεγαλύτερα σκάφη (> 25 m) (Bowman et al., 2003), ενώ το diuron απαγορεύτηκε εντελώς.

Επειδή στη βιομηχανία των υφαλοχρωμάτων οι προσφιλείς ουσίες είναι εκείνες οι οποίες αποδομούνται με αργούς ρυθμούς, ώστε τα χρώματα να είναι όσο το δυνατόν πιο αποτελεσματικά, μια ουσία ακόμα και μετά την απαγόρευση της χρήσης της είναι δυνατόν να ανιχνεύεται στο περιβάλλον καθώς η μεγάλη σταθερότητά της συνεπάγεται τη συσσώρευσή της.

Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας που περιγράφεται στο κεφάλαιο αυτό ήταν η καταγραφή της κατάστασης της ρύπανσης στο θαλάσσιο περιβάλλον του Ηνωμένου Βασιλείου μετά τους περιορισμούς της χρήσης των ουσιών irgarol 1051 και diuron στα υφαλοχρώματα. Για το σκοπό αυτό δείγματα τόσο θαλασσινού νερού όσο και θαλάσσιου ιζήματος συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικά περιβάλλοντα, μια μαρίνα στην οποία υπάρχουν κατεξοχήν σκάφη αναψυχής και ένα εμπορικό λιμάνι στο οποίο καθημερινά καταφθάνουν

μεγάλα σκάφη από διάφορες χώρες. Η επιλογή των σταθμών δειγματοληψίας, αλλά και ο σχεδιασμός των δειγματοληψιών, και στις δύο περιπτώσεις, έγινε με τρόπο που να είναι δυνατή η λήψη αντιπροσωπευτικών δειγμάτων από όλη τη μελετούμενη περιοχή κατά τη διάρκεια ενός έτους ώστε να είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων που σχετίζονται με τη χωρική και χρονική κατανομή των παρατηρούμενων συγκεντρώσεων. Τα δείγματα αναλύθηκαν και για την παρουσία προϊόντων μεταβολισμού των δύο ουσιών, ώστε να διαπιστωθεί η σταθερότητά τους στο περιβάλλον. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το irgarol 1051 και diuron έχουν απαγορευτεί στο Ηνωμένο Βασίλειο. Όμως οι περιορισμοί αυτοί δεν ισχύουν σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες με αποτέλεσμα να καθίσταται αναγκαία η συνεχής παρακολούθηση της κατάστασης της ρύπανσης, διότι εξαιτίας της θαλάσσιας συγκοινωνίας οι ουσίες εξακολουθούν να ανιχνεύονται στο περιβάλλον.

9.2 Δειγματοληψία

Τα δείγματα επιφανειακού θαλασσινού νερού (0,5 m) συλλέχθηκαν σε Winchester μπουκάλια 2,5 L. Κατά τη δειγματοληψία τα μπουκάλια προσαρμόζονταν σε ατσάλινο σκελετό στο πάνω μέρος του οποίου υπήρχε πώμα από PTFE με το οποίο σφράγιζε το μπουκάλι. Το πώμα ανοιγόταν όταν ο σκελετός (μαζί με το μπουκάλι) βρισκόταν κάτω από την επιφάνεια του νερού. Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιήθηκε η επιμόλυνση των δειγμάτων από διάφορες προσμίξεις που υπήρχαν στην επιφάνεια του νερού. Αμέσως μετά τη συλλογή και πριν τη μεταφορά στο εργαστήριο, προσδιορίστηκε η τιμή του pH, της αλατότητας και της αγωγιμότητας στα δείγματα.

Τα επιφανειακά δείγματα θαλάσσιου ιζήματος συλλέχθηκαν με τη βοήθεια αρπάγης (Van Veen grab). Τα δείγματα ιζήματος μεταφέρθηκαν με ατσάλινη λαβίδα σε γυάλινα δοχεία και αποθηκεύτηκαν στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την ανάλυση.

Οι περιοχές δειγματοληψίας που επιλέχθηκαν ήταν η Brighton marina και το Shoreham Harbour. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε από το Μάρτιο του 2003 ως το Φεβρουάριο του 2004. Στη Brighton marina πραγματοποιήθηκαν τρεις εποχιακές δειγματοληψίες (03/2003, 12/2003 και 02/2004), ενώ στο Shoreham Harbour η συχνότητα των δειγματοληψιών ήταν μεγαλύτερη. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν εννέα δειγματοληψίες (03/2003, 05/2003, 07/2003, 08/2003, 10/2003, 11/2003, 12/2003, 01/2004, 02/2004).

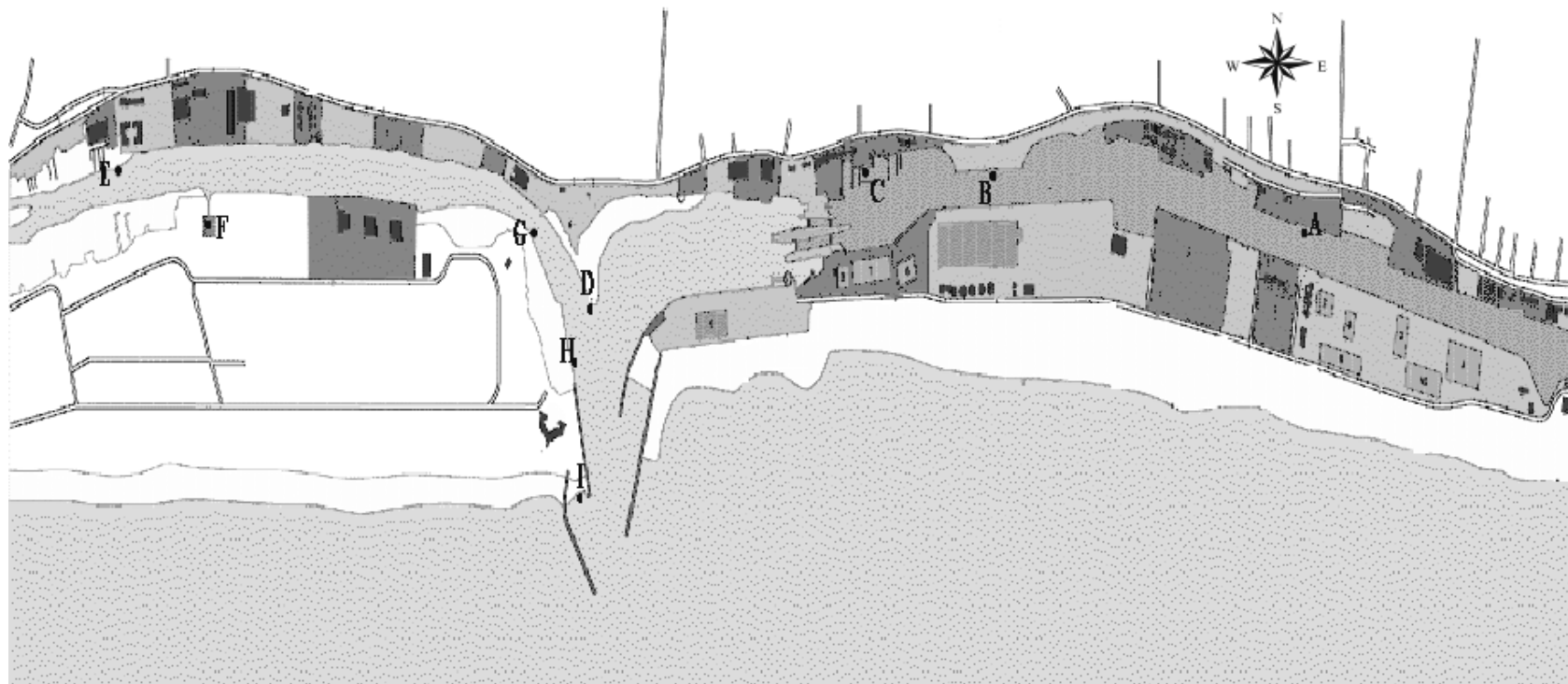
9.3 Περιοχές δειγματοληψίας

9.3.1 Shoreham Harbour

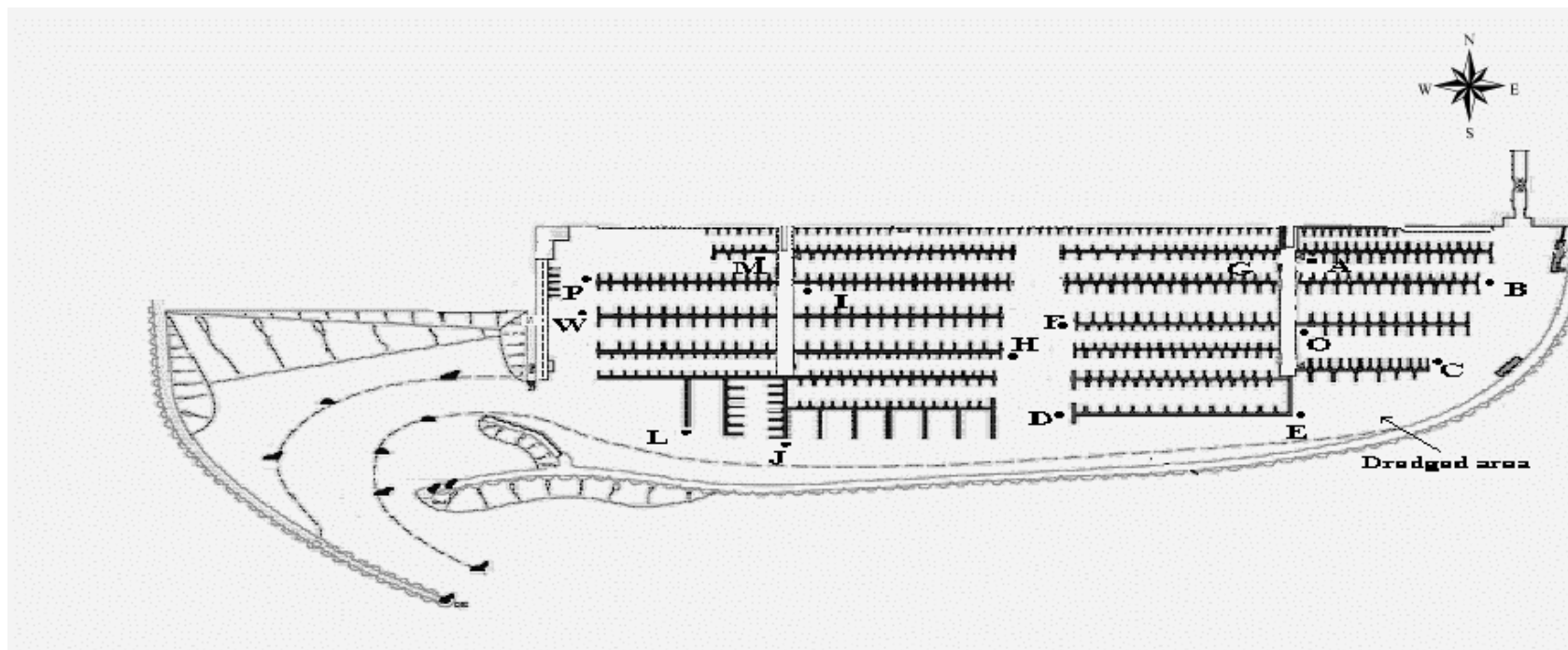
Το Shoreham Harbour (Σχήμα 9.1) βρίσκεται 8 Km δυτικά της πόλης Brighton & Hove, (Ανατολικό Sussex, Νότια Αγγλία). Το λιμάνι είναι κατά κύριο λόγο εμπορικό με πιο σημαντικές δραστηριότητες τη μεταφορά χόματος, ξυλείας, δημητριακών, ατσαλιού και μετάλλων προς ανακύκλωση. Στο εσωτερικό του, ακριβώς πάνω στο κύριο κανάλι του λιμανιού βρίσκεται η μαρίνα Lady Bee με χωρητικότητα 120 σκάφη ενώ μια δεύτερη μικρότερη σε μέγεθος μαρίνα, η Emerald Quay βρίσκεται στη δυτική πλευρά του λιμανιού.

9.3.2 Brighton Marina

Η Brighton Marina (Σχήμα 9.2) βρίσκεται 0,8 Km νότια από το κέντρο της πόλης του Brighton & Hove στη νότια ακτή του Ηνωμένου Βασιλείου. Είναι η μεγαλύτερη μαρίνα του HB με έκταση περίπου 504 Km² και χωρητικότητα 1300 σκαφών. Η μαρίνα προστατεύεται από δύο τοιχώματα ύψους πάνω από 10 m το καθένα, ενώ η είσοδός της έχει μήκος 80 m. Οι άνεμοι που συχνά φυσούν στην περιοχή έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση άμμου στον πυθμένα της μαρίνας για αυτό το λόγο πραγματοποιείται κάθε χρόνο απομάκρυνση ιζήματος από το βυθό (dredging).



Σχήμα 9.1 Σημεία δειγματοληψίας στο Shorham Harbour. A: Aldrington Wharf, B: The Canal, C: Lady Bee Marina, D: Middle Pier, E: Surry Boat Yard, F: Emerald Quay, G: Soldier Point, H: Old Fort και I: West Pier.



Σχήμα 9.2 Σημεία δειγματοληψίας στη Brighton Marina. Είσοδος μαρίνας : M,P,W,L,J,I,H, εσωτερικά : A,B,C,E,O,G,F,D.

9.4 Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός (κύριος και βοηθητικός) που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αυτού του κεφαλαίου περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.

9.5 Αντιδραστήρια

Ακετονιτρίλιο (Rathburns, Germany)

Μεθανόλη (Rathburns, Germany)

Οξικός αιθυλεστεράς (Rathburns, Germany)

Ακετόνη (Rathburns, Germany)

Ακετονιτρίλιο για HPLC (Merck, Germany)

Μεθανόλη για HPLC (Merck, Germany)

Υπερκαθαρό νερό που παράχθηκε στο εργαστήριο

Πρότυπες ουσίες irgarol 1051, diuron, DCPMU, DCPU, DCA (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Germany)

Πρότυπη ουσία M1 (Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Essex, UK και Ciba-Geigy, NY, USA)

Πρότυπη ουσία atrazine-d₅ (QMX Laboratories, UK)

Διαλύματα παρακαταθήκης των εξεταζόμενων ουσιών σε μεθανόλη, 1000 mg L⁻¹

Πρότυπη ουσία acetinilide (Thermoquest, Italy)

Πιστοποιημένο υλικό αναφοράς θαλάσσιου ιζήματος CRM Mess-2 (National Research Council, Canada)

Διάλυμα παρακαταθήκης του εσωτερικού προτύπου (atrazine-d₅) σε μεθανόλη, 500 mg L⁻¹

Άζωτο καθαρότητας 99,999 % (Messer, Austria)

Ήλιο καθαρότητας 99,999 % (Messer, Austria)

9.6 Μεθοδολογία

9.6.1 Μέτρηση φυσικοχημικών ιδιοτήτων δειγμάτων νερού

Η μέτρηση των φυσικοχημικών παραμέτρων των δειγμάτων θαλασσινού νερού πραγματοποιήθηκε στο πεδίο κατά τη διάρκεια της κάθε δειγματοληψίας. Αμέσως μετά τη

συλλογή των δειγμάτων με τη βοήθεια φορητού pHμετρου-αλατόμετρου-αγωγιμόμετρου μετρούνταν το pH, η αλατότητα και η αγωγιμότητα των δειγμάτων.

9.6.2 Μέτρηση φυσικοχημικών ιδιοτήτων δειγμάτων ιζήματος

Για τη μέτρηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του ιζήματος, τα δείγματα αρχικά αποψύχθηκαν και ομογενοποιήθηκαν. Στη συνέχεια κατάλληλη ποσότητα από το καθένα τοποθετήθηκε πάνω σε αλουμινένιο δίσκο και ξηράθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι σταθερού βάρους. Μετά την ξήρανσή τους τα δείγματα λειοτριβήθηκαν χρησιμοποιώντας γουδί από αχάτη. Τα λειοτριβημένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του pH, του οργανικού άνθρακα και της % σύστασης των δειγμάτων σε ιλύ, άργιλο και άμμο.

9.6.2.1 Μέτρηση pH θαλάσσιου ιζήματος

Για τη μέτρηση του pH των δειγμάτων ιζήματος, ποσότητα ξηρού ιζήματος 4 g τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα όγκου 15 mL. Ακολούθησε προσθήκη 5 mL υπερκαθαρού νερού. Οι σωλήνες σφραγίστηκαν και ανακινήθηκαν έντονα για 5 min ώστε να διασκορπιστεί πλήρως το ίζημα στο νερό. Στη συνέχεια προστέθηκαν άλλα 5 mL υπερκαθαρού νερού και τα δείγματα αναδεύτηκαν μηχανικά για 15 min. Ακολούθησε μέτρηση του pH στο υπερκείμενο στρώμα.

9.6.2.2 Κοκκομετρική ανάλυση ιζήματος

Για τον προσδιορισμό της % περιεκτικότητας των δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος σε ιλύ, άργιλο και άμμο, ποσότητα ιζήματος ίση με 10 g περίπου πέρασε διαδοχικά από δύο κόσκινα με κατάλληλο άνοιγμα οπών ώστε να διαχωριστεί το δείγμα σε τρία κλάσματα: αδρομερή, άμμο, ιλύ και άργιλλο. Το πρώτο κόσκινο με άνοιγμα οπών μεγαλύτερο των 180 μm συγκρατούσε τα αδρομερή υλικά (πέτρες, κοχύλια, φυτικά υπολείμματα) ενώ το δεύτερο με άνοιγμα οπών μεταξύ 180 μm και 63 μm συγκρατούσε την άμμο και άφηνε να περάσουν η ιλύς και η άργιλος (διάμετρος κόκκων μικρότερη των 63 μm).

Το % περιεχόμενο του δείγματος σε κάθε κλάσμα υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$\text{Υγρασία \%} = \frac{\alpha}{\beta} \times 100 \quad (9.1)$$

όπου:

α = ξηρό βάρος κλάσματος (g)

β = Σ ξηρού βάρους όλων των κλασμάτων (g)

9.6.2.3 Προσδιορισμός οργανικού άνθρακα θαλάσσιου ιζήματος

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων ιζήματος σε οργανικό άνθρακα πραγματοποιήθηκε με στοιχειακή ανάλυση χρησιμοποιώντας αναλυτή οργανικού άνθρακα. Για το σκοπό αυτό, αλουμινένια σκεύη (διαστάσεων 8x5 mm) καθαρίστηκαν πρώτα με χλωροφόρμιο, μετά με ακετόνη και τελικά ξεπλύθηκαν με υπερκαθαρό νερό. Τα σκεύη αφέθηκαν να στεγνώσουν και στη συνέχεια ποσότητα ιζήματος 10 ng περίπου ζυγίστηκε απευθείας σε αυτά.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε όξινο περιβάλλον (πυκνόθειικό οξύ) για 24 h ώστε να διαχωριστεί ο ανόργανος άνθρακας από τον οργανικό. Για να διαπιστωθεί ότι απομακρύνθηκε πλήρως ο ανόργανος άνθρακας μετά τις 24 h, σε δείγματα ιζήματος που επιπλέον προετοιμάστηκαν, προστέθηκαν 25 μ L υπερκαθαρού νερού και 25 μ L υδροχλωρικού οξέος 1M. Η έλλειψη αναβρασμού των δειγμάτων ήταν δηλωτική της πλήρους απουσίας ανόργανου άνθρακα (Gustafsson et al., 1997). Για κάθε δείγμα υπήρχαν τρεις επαναλήψεις.

Μετά την απομάκρυνση του ανόργανου άνθρακα χρησιμοποιώντας ειδικές λαβίδες, τα αλουμινένια σκεύη κλείστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίσουν «μπάλα» (διαμέτρου περίπου 0,5 cm) και τοποθετήθηκαν στον αυτόματο δειγματολήπτη του αναλυτή οργανικού άνθρακα.

Για τη βαθμονόμηση του οργάνου χρησιμοποιήθηκε ως εξωτερικό πρότυπο το acetanilide (C_8H_9NO) του οποίου η σύσταση είναι: 71,09 % άνθρακας, 6,71 % υδρογόνο, 10,36 % άζωτο και 11,84 % οξυγόνο. Ως πρότυπο υλικό αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Mess-2. Πρόκειται για θαλάσσιο ίζημα περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα 2,14 % \pm 0,03 %.

9.6.3 Εκχύλιση θαλασσινού νερού

Τα δείγματα θαλασσινού νερού εκχυλίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και η οποία αναλυτικά περιγράφεται στο κεφάλαιο 6.

Για την απομόνωση του irgarol 1051 και του κύριου μεταβολίτη του M1 με στόχο να αυξηθεί ο συντελεστής προσυγκέντρωσης εκχυλίστηκε μεγαλύτερος όγκος νερού (2 L), ενώ οι

φύσιγγες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πάλι C18 αλλά μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε πληρωτικό υλικό (1 g, 6 mL, Isolute ENV+, IST, Ireland). Εξαιτίας αυτών των τροποποιήσεων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και ελέγχου της πιστότητας της μεθόδου ώστε να διασφαλιστεί ότι εξακολουθεί να είναι αποτελεσματική για την εκχύλιση των ουσιών παρ' όλες τις αλλαγές. Πράγματι τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος εκχύλισης στερεής φάσης που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή, δεν επηρεάστηκε από τις τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν. Οι ανακτήσεις των ουσιών που επιτεύχθηκαν για τα επίπεδα συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν (10, 100, 1000 ng L⁻¹) κυμάνθηκαν από 82,0 έως 96,4 για το M1 και από 94,6 έως 116 για το irgarol. Η μέθοδος εξακολούθησε να είναι επαναλήψιμη με σχετική τυπική απόκλιση $\leq 2,5$ % τόσο την ίδια μέρα (n=6) όσο και μεταξύ διαφορετικών ημερών (k=3, n=20), ενώ τα όρια ανίχνευσης που προσδιορίστηκαν για τις δύο ουσίες ήταν 0,5 και 3,1 ng L⁻¹ για το M1 και το irgarol 1051 αντίστοιχα.

Η απομόνωση των ουσιών diuron, DCPMU, DCPU και DCA πραγματοποιήθηκε όπως ακριβώς περιγράφεται στο κεφάλαιο 6 χωρίς καμία απολύτως τροποποίηση στην αναλυτική μέθοδο. Τα εκλούσματα αποθηκεύτηκαν στους -18 °C και αναλύθηκαν με την επιστροφή στην Ελλάδα.

9.6.4 Εκχύλιση θαλάσσιου ιζήματος

Η εκχύλιση των δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος για των προσδιορισμό των ουσιών irgarol 1051 και M1 πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μικροκυμάτων σύμφωνα με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε στο κεφάλαιο 8 της παρούσας διατριβής.

Για την απομόνωση του diuron και των κύριων μεταβολίτων του DCPMU, DCPU και DCA χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης με χρήση υπερήχων που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής (κεφάλαιο 7).

9.7 Ανάλυση

Η ανάλυση τόσο των δειγμάτων θαλασσινού νερού όσο και των δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του irgarol 1051 και του κύριου μεταβολίτη του M1 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αεριοχρωματογράφου συσδεδεμένου με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 8.

Ο προσδιορισμός του diuron και κύριων μεταβολιτών του πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια υδροχρωματογραφίας, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 6.

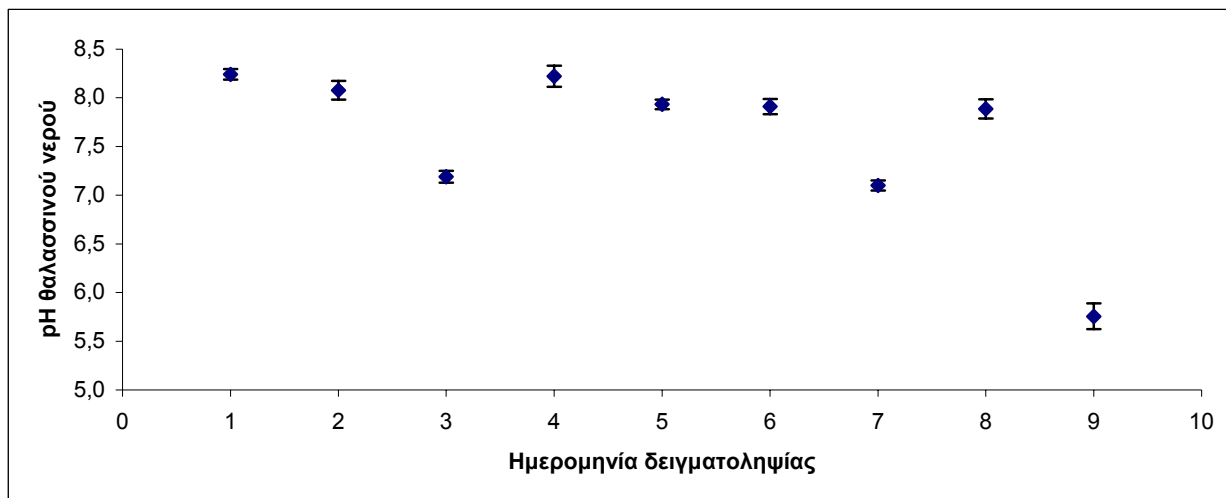
9.8 Αποτελέσματα και συζήτηση

9.8.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων νερού

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού των φυσικοχημικών ιδιοτήτων (pH, αλατότητα, αγωγιμότητα) των δειγμάτων θαλασσινού νερού παρουσιάζονται στους Πίνακες I.1 – I.6 του Παραρτήματος I.

9.8.1.1 pH

Το pH του νερού των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από το Shoreham Harbor (Πίνακας I, Παράρτημα I) κυμάνθηκε σε φυσιολογικά για το θαλασσινό νερό επίπεδα (7,0 ως 8,4) για όλα σχεδόν τα δείγματα (Σχήμα 9.3). Εξαιρέση αποτέλεσαν τα δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν το Φεβρουάριο του 2004 (9^η δειγματοληψία). Στα δείγματα αυτά η τιμή του pH ήταν $\leq 5,8$. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το Shoreham Harbour είναι εμπορικό λιμάνι και επιπλέον το σημείο όπου ο ποταμός Adur εκβάλλει στη θάλασσα, πιθανότατα το επίπεδο του pH του νερού τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή να μεταβλήθηκε εξαιτίας αυξημένου επιπέδου ρύπανσης η οποία σε συνδυασμό με τις δυσμενείς καιρικές συνθήκες (απώλεια ηλιοφάνειας) οδήγησε στη δημιουργία ίσως ανοξικών συνθηκών και άρα στη μείωση της τιμής του.



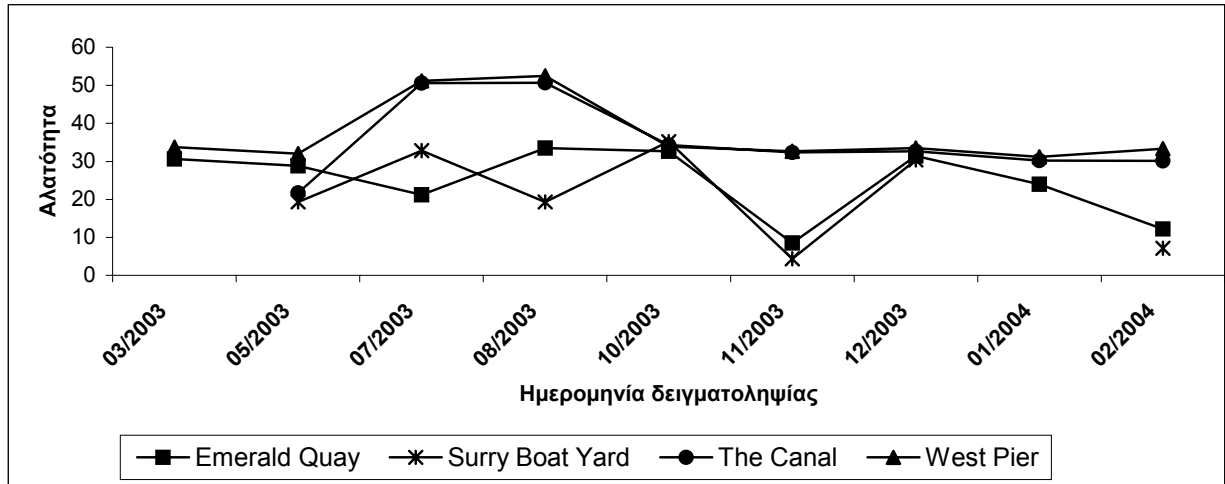
Σχήμα 9.3 Διακύμανση της μέσης τιμής του pH σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour κατά τη διάρκεια των εννέα δειγματοληψιών (1: 03/2003, 2: 05/2003, 3: 07/2003, 4: 08/2003, 5: 10/2003, 6: 11/2003, 7: 12/2003, 8: 01/2004, 9: 02/2004).

Η τιμή του pH των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τη Brighton marina βρέθηκε να είναι μεταξύ 5,3 και 8,1. Οι χαμηλές τιμές ($\leq 6,1$) και εδώ παρατηρήθηκαν το Φεβρουάριο του 2004 (3^η δειγματοληψία) και πιθανόν να οφείλονται στη δημιουργία ανοξικών συνθηκών λόγω μειωμένης ανανέωσης του νερού στη μαρίνα.

9.8.1.2 Αλατότητα

Η αλατότητα των δειγμάτων θαλασσινού νερού που συλλέχθηκαν από το Shoreham Harbour γενικότερα κυμάνθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα (Πίνακας I, Παράρτημα I). Υπήρξαν όμως και περιπτώσεις όπου οι τιμές της αλατότητας ήταν πολύ χαμηλές, ως και 4,3 ‰ (σημείο Soldier Point κατά την 6^η δειγματοληψία). Αυτό παρατηρήθηκε όταν κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας επικρατούσε άμπωτη με αποτέλεσμα το θαλασσίνο νερό να είναι αραιωμένο με το γλυκό νερό του ποταμού Adur. Υψηλές τιμές αλατότητας παρατηρήθηκαν κατά τον Ιούλιο και τον Αύγουστο (3^η και 4^η δειγματοληψία αντίστοιχα) και ίσως να οφείλονται σε αυξημένο ποσοστό εξάτμισης, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούσαν τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Ας σημειωθεί ότι το καλοκαίρι του 2003 ήταν ένα από τα θερμότερα των τελευταίων ετών για τα δεδομένα του Ηνωμένου Βασιλείου. Στο Σχήμα 9.4 φαίνεται η

διακύμανση της αλατότητας με το χρόνο για τα σημεία (Emerald Quay, Surry Boat Yard, The Canal, West Pier) στα οποία παρατηρήθηκαν οι πιο ακραίες υψηλές και χαμηλές τιμές.



Σχήμα 9.4 Διακύμανση της αλατότητας του θαλασσινού νερού στα δείγματα που συλλέχθηκαν από 03/2003 ως 02/2004 από το Shoreham Harbour.

Στη Brighton marina η τιμή της αλατότητας των δειγμάτων κυμάνθηκε σε φυσιολογικά επίπεδα, μεταξύ 33,5 και 35,9 ‰.

9.8.1.3 Αγωγιμότητα

Η αγωγιμότητα τόσο των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από το Shoreham Harbour (Πίνακας I, Παράρτημα I) όσο και αυτών που προήλθαν από τη Brighton marina (Πίνακας I.2, Παράρτημα I), όπως ήταν φυσικό, κυμάνθηκε ανάλογα με τη διακύμανση της αλατότητας.

9.8.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων ιζήματος

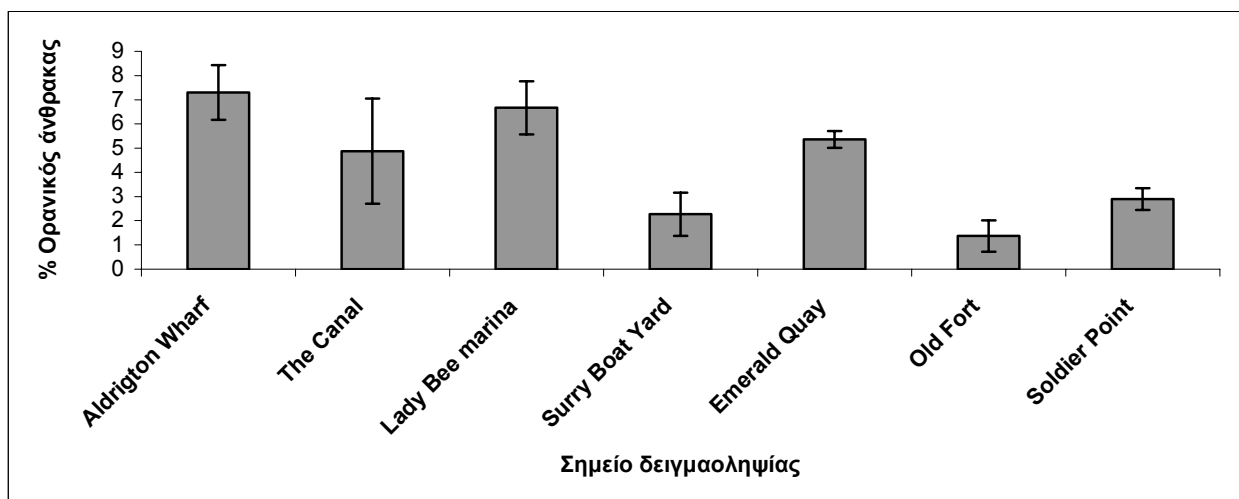
9.8.2.1 pH

Το pH των δειγμάτων του ιζήματος κυμάνθηκε από 7,0 ως 8,6 για το Shoreham Harbour (Πίνακας I.3, Παράρτημα I) και από 7,1-8,1 για τη Brighton marina (Πίνακας I.4, Παράρτημα I). Οι τιμές αυτές θεωρούνται φυσιολογικές.

9.8.2.2 Οργανικός άνθρακας

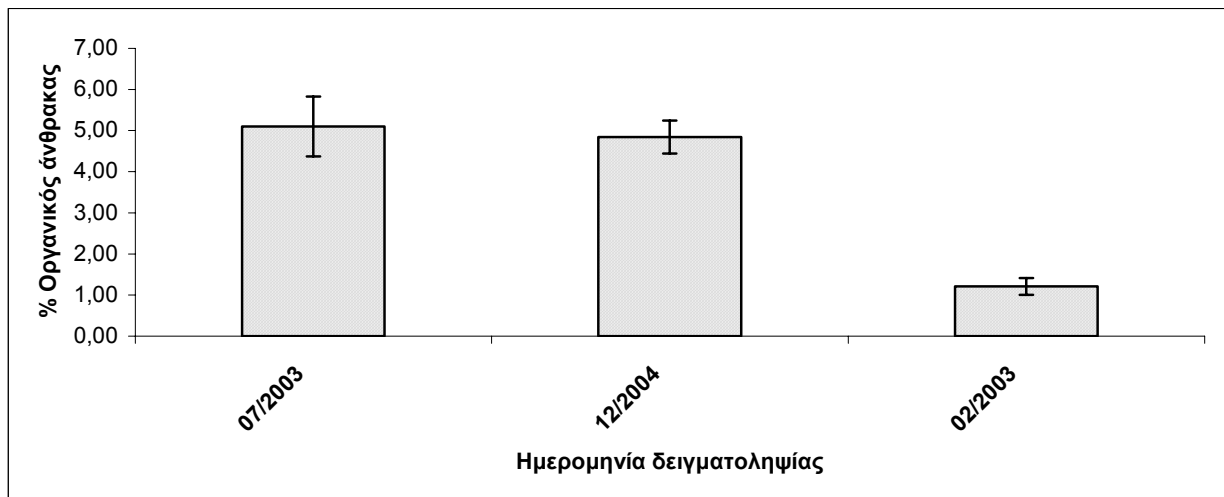
Η % περιεκτικότητα των δειγμάτων ιζήματος σε οργανικό άνθρακα ήταν μεταξύ 0,28 και 7,46 % για το Shoreham Harbour (Πίνακας I, Παράρτημα I) και μεταξύ 0,78 και 6,30 % για τη Brighton marina (Πίνακας I.4, Παράρτημα I).

Στο Shoreham Harbour οι υψηλές τιμές παρατηρήθηκαν στους σταθμούς που βρίσκονται στο εσωτερικό του λιμανιού (Aldrington Wharf και The Canal) καθώς και στις δύο μαρίνες (Lady Bee marina και Emerald Quay), ενώ η πιο χαμηλή τιμή προσδιορίστηκε για το σταθμό Old Fort, ο οποίος βρίσκεται πολύ κοντά στο άνοιγμα του λιμανιού προς τη θάλασσα όπως φαίνεται στο Σχήμα 9.5. Από το γράφημα απουσιάζουν οι τιμές των σταθμών West Pier (διότι δεν λήφθηκε κανένα δείγμα) και Middle Pier, διότι λήφθηκε μόνο μια φορά δείγμα.



Σχήμα 9.5 Διακύμανση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα (μέσες τιμές) στα δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

Στη Brighton marina κατά την πρώτη και δεύτερη δειγματοληψία η μέση τιμή της % περιεκτικότητας των δειγμάτων σε οργανικό άνθρακα ήταν παρόμοια, ενώ κατά την τρίτη δειγματοληψία η περιεκτικότητα μειώθηκε αισθητά (Σχήμα 9.6). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην εναπόθεση φρέσκου ιζήματος στον πυθμένα ως αποτέλεσμα της εκβάθυνσης, στο οποίο πιθανόν η οργανική ύλη να μην είχε πλήρως αποδομηθεί.



Σχήμα 9.6 Διακύμανση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα (μέσες τιμές) των δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.

9.8.2.3 Κοκκομετρική ανάλυση

Η κοκκομετρική ανάλυση των δειγμάτων (Πίνακας I.-I.6, Παράρτημα I) έδειξε, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο, ότι όλα τα δείγματα που προέρχονται από τις μαρίνες (Brighton marina, Lady Bee marina, Emerald Quay) είναι λεπτόκκοκα με ποσοστό αργίλου και ιλύος σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις πάνω από 70 %, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα το μέγεθος των κόκκων κυμάνθηκε κυρίως μεταξύ 63 και 180 μm (άμμος).

9.8.3 Επίπεδα των συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών στο νερό

9.8.3.1 Irgarol 1051

Οι συγκεντρώσεις του irgarol 1051 στα δείγματα θαλασσινού νερού κυμάνθηκαν από πολύ χαμηλές, κάτω του ορίου ανίχνευσης ($3,1 \text{ ng L}^{-1}$), ως 136 και 102 ng L^{-1} για το Shoreham

Harbour και τη Brighton marina, αντίστοιχα (Πίνακες II.1 και II.4, Παράρτημα II) και είναι σε συμφωνία με τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της ουσίας που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία για παρόμοια περιβάλλοντα, τόσο στο Ηνωμένο Βασίλειο όσο και σε άλλες ευρωπαϊκές και μη χώρες (Readman et al., 1993; Gough et al., 1994; Zhou et al., 1996; Dahl and Blanck, 1996; Tolosa et al., 1996; Steen et al., 1997; Scarlett et al., 1997; Sargent et al., 2000; Biselli et al. 2000; Connelly et al., 2001; Thomas et al., 2001b; Owen et al., 2002; Bowman et al., 2003; Gardinali et al., 2004).

Η μέση συγκέντρωση της ουσίας που παρατηρήθηκε στο Shoreham Harbour ($18,3 \pm 29,5$) ήταν ελαφρώς υψηλότερη σε σχέση με αυτή στη Brighton marina ($14,1 \pm 19,8$) (Πίνακας 9.1). Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στους περιορισμούς που ισχύουν στο Ηνωμένο Βασίλειο για τη χρήση του irgarol 1051 στα σκάφη αναψυχής σύμφωνα με τους οποίους δεν επιτρέπεται η χρήση του στα υφαλοχρώματα που εφαρμόζονται στα μικρά σκάφη (μήκος < 25 m) όπως αυτά που κατεξοχήν υπάρχουν στη συγκεκριμένη μαρίνα (Thomas et al; 2002). Επιπλέον, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις στο Shoreham Harbour είναι φυσικό επακόλουθο της εισόδου στο λιμάνι διαρκώς μεγάλων εμπορικών πλοίων για τη βαφή των οποίων δεν υπάρχει κάποια νομοθετική ρύθμιση αναφορικά με τη χρήση του irgarol 1051.

Πίνακας 9.1 Εύρος συγκεντρώσεων, διάμεση τιμή, αριθμητικός και γεωμετρικός μέσος των συγκεντρώσεων (ng L^{-1}) των ουσιών irgarol 1051 και M1 σε δείγματα θαλασσινού νερού.

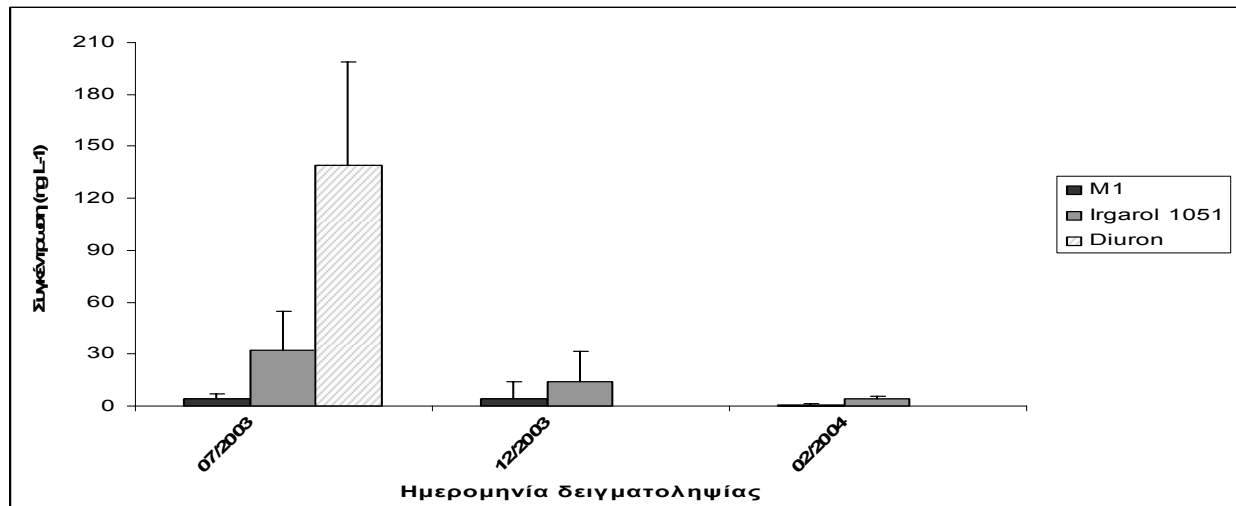
	Brighton marina		Shoreham Harbour	
	Irgarol 1051	M1	Irgarol 1051	M1
Εύρος συγκεντρώσεων (ng L^{-1})	* - 102	*- 36,9	* - 136	* - 58,9
Διάμεση τιμή (ng L^{-1})	5,1	1,2	6,3	2,1
Αριθμητικός μέσος (ng L^{-1})	14,1	2,9	18,3	6,4
Γεωμετρικός μέσος (ng L^{-1})	6,0	1,3	6,7	2,0
Τυπική απόκλιση	$\pm 19,8$	$\pm 5,8$	$\pm 29,5$	$\pm 11,8$

* : η ουσία δεν ανιχνεύτηκε ($\text{LOD}_{\text{irgarol 1051}} = 3,1 \text{ ng L}^{-1}$, $\text{LOD}_{\text{M1}} = 0,7 \text{ ng L}^{-1}$).

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του irgarol 1051 στη Brighton marina παρατηρήθηκαν τον Ιούλιο του 2003 (Σχήμα 9.7), ενώ στο Shoreham Harbour παρατηρήθηκαν το Μάιο (Σχήμα 9.8) του ίδιου έτους. Αυτό προφανώς σχετίζεται με την έντονη δραστηριότητα των σκαφών τους μήνες αυτούς. Υψηλές συγκεντρώσεις του irgarol 1051 την περίοδο αυτή αναφέρονται και από

άλλους συγγραφείς (Ferrer and Barcelo, 1999; Voulvoulis et al., 2000; Biselli et al., 2001; Gimeno et al., 2001; Lamoree et al., 2002; Hall et al., 2004). Κατά τους φθινοπωρινούς και χειμερινούς μήνες τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της ουσίας στα περισσότερα δείγματα ήταν χαμηλές.

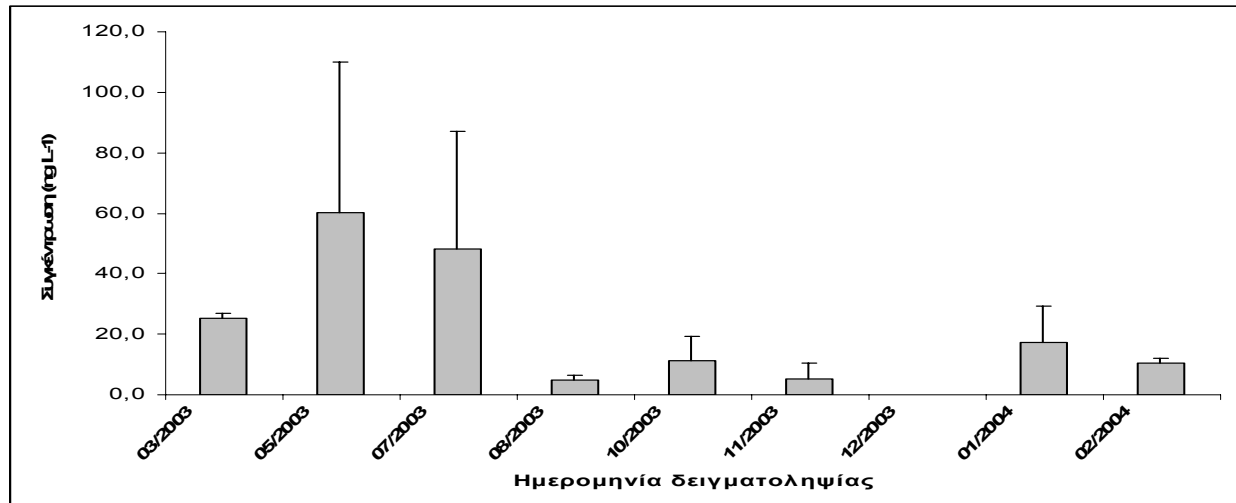
Στη Brighton marina, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 9.7, τα επίπεδα των συγκεντρώσεων ακολούθησαν πτωτική τάση από τον Ιούλιο μέχρι το Φεβρουάριο.



Σχήμα 9.7 Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης των τριών ουσιών (M1, irgarol 1051 και diuron) που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina με το χρόνο.

Αντίθετα στο Shoreham Harbour φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις αυξομειώνονται ανάλογα με την εποχή. Πτωτική τάση παρατηρήθηκε από τον Μάιο ως τον Αύγουστο, από τον Οκτώβριο ως το Δεκέμβριο και επίσης από τον Ιανουάριο ως το Φεβρουάριο. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις του irgarol 1051 τους μήνες αυτούς οφείλονται κυρίως στις υψηλές συγκεντρώσεις της ουσίας που παρατηρήθηκαν στη Lady Bee marina (Πίνακας Π.1, Παράρτημα Π) και οι οποίες αύξησαν τη μέση συγκέντρωση του irgarol 1051 στο Σχήμα 9.8. Όπως αναφέρεται και από άλλους συγγραφείς (Bowman et al., 2003) συνήθως αυτούς τους μήνες τα σκάφη προετοιμάζονται για την επόμενη χρονιά οπότε καθαρίζονται και ξαναβάφονται. Επειδή λοιπόν υψηλότεροι ρυθμοί

απελευθέρωσης της ουσίας παρατηρούνται αμέσως μετά την εφαρμογή της στα ύφαλα (Hall et al., 1999) η κατανομή αυτή των συγκεντρώσεων θα μπορούσε να θεωρηθεί αναμενόμενη.

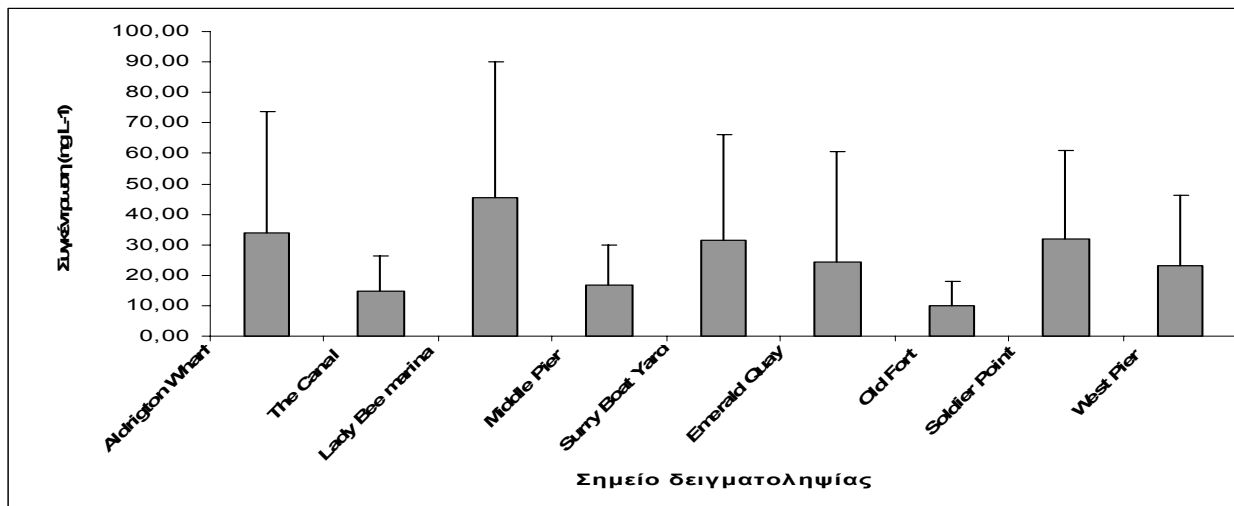


Σχήμα 9.8 Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του irgarol 1051 με το χρόνο στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

Η παρουσία του irgarol 1051 στη Brighton marina έχει μελετηθεί προηγουμένα (Bowman et al., 2003). Οι συγκεντρώσεις της ουσίας που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με εκείνες που ανιχνεύτηκαν από τους Bowman et al. (2003) τον Ιούλιο του 2000, όμως η πλειοψηφία των συγκεντρώσεων για τα διάφορα σημεία δειγματοληψίας ήταν χαμηλότερες το 2000. Πιο συγκεκριμένα τον Ιούλιο του 2000 (Bowman et al., 2003) συγκεντρώσεις πάνω από 16 ng L^{-1} ανιχνεύτηκαν στο 39 % των δειγμάτων ενώ τον Ιούλιο του 2003 συγκεντρώσεις πάνω από $17,3 \text{ ng L}^{-1}$ ανιχνεύτηκαν στο 93 % των δειγμάτων (Πίνακας II.4, Παράρτημα II). Αντίθετα κατά τους χειμερινούς μήνες (Δεκέμβριο και Φεβρουάριο) σχεδόν στο 50 % των δειγμάτων η ουσία δεν ανιχνεύτηκε σε αντίθεση με τους Bowman et al. (2003) οι οποίοι προσδιόρισαν τιμές της ουσίας την ίδια εποχή (1999 και 2000) ως και 330 ng L^{-1} . Παρόλο που η παρακολούθηση των επιπέδων της ουσίας χρονικά έλαβε χώρα μετά τους περιορισμούς στη χρήση του irgarol 1051, εντούτοις όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύτηκαν παρέμειναν σχεδόν στα ίδια επίπεδα. Αυτό ίσως οφείλεται σε προσρόφιση στο ίζημα κατά τα προηγούμενα έτη, σε κομμάτια

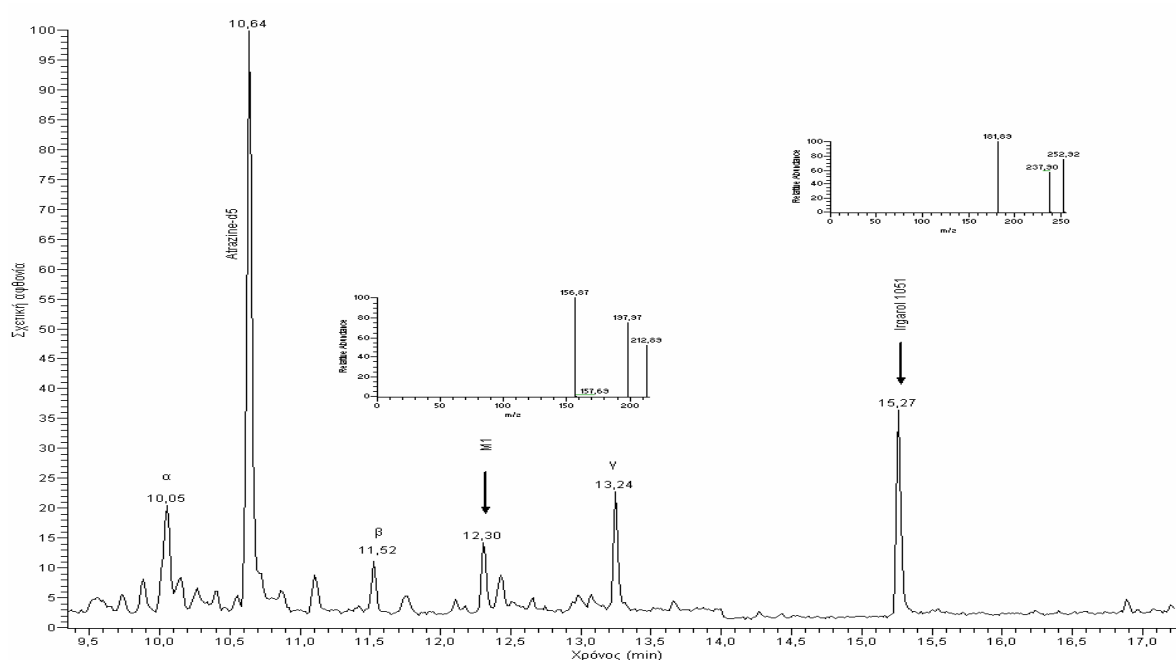
υφαλοχρώματων που περιείχαν irgarol 1051 με αποτέλεσμα να αυξηθεί ο χρόνος παραμονής και στη σταθερότητα της ουσίας στο περιβάλλον (Thomas et al., 2003).

Όσον αφορά τη χωρική κατανομή των συγκεντρώσεων του irgarol 1051 στο Shoreham Harbour (Σχήμα 9.9) δεν υπάρχει σαφής τάση από το εσωτερικό του λιμανιού προς τα έξω. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στο σταθμό Lady Bee marina, ο οποίος βρίσκεται στην αρχή του λιμανιού, όμως εξίσου υψηλές τιμές παρατηρήθηκαν και σε άλλους σταθμούς κοντά στη θάλασσα όπως τον Soldier Point. Οι συγκεντρώσεις στο σταθμό Lady Bee marina ήταν οι υψηλότερες όλων γεγονός που επιβεβαιώνει, όπως υποστηρίζουν και άλλοι συγγραφείς (Tolosa et al., 1996; Scarlet et al., 1997; Hall et al., 1999), ότι πάντα υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρούνται εκεί όπου υπάρχει μεγάλος αριθμός σκαφών αναψυχής. Για το σταθμό West Pier, ο οποίος βρίσκεται στο σημείο εκείνο που το λιμάνι ενώνεται με την ανοιχτή θάλασσα (Σχήμα 9,1) θα πρέπει να σημειωθεί ότι η υψηλή μέση συγκέντρωση που φαίνεται στο Σχήμα 9.9 οφείλεται αποκλειστικά στην υψηλή συγκέντρωση της ουσίας ($60,2 \text{ ng L}^{-1}$) που παρατηρήθηκε το Μάιο (Πίνακας II.1, Παράρτημα II) και που μπορεί να οφείλεται σε σημειακή πηγή ρύπανσης όπως την είσοδο στο λιμάνι ενός φρεσκοβαμμένου σκάφους.



Σχήμα 9.9 Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του irgarol 1051 με το χώρο στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

Στη Brighton marina κατά μέσο όρο στους περισσότερους σταθμούς που βρίσκονται NA (σταθμοί: A,B,C,E,O,G,F,D) οι συγκεντρώσεις ήταν ελαφρώς υψηλότερες από εκείνες που ανιχνεύτηκαν στους σταθμούς που βρίσκονται NΔ (σταθμοί: M,P,W,L,J,I,H) στην είσοδο της μαρίνας προς τη θάλασσα όμως τα συμπεράσματα βασίζονται μόνο στα αποτελέσματα της πρώτης δειγματοληψίας καθώς η ουσία ανιχνεύτηκε σε πολύ λίγους σταθμούς κατά τις δύο άλλες δειγματοληψίες (Πίνακας II.4, Παράρτημα II). Στο Σχήμα 9.10 δίνεται ένα ενδεικτικό χρωματογράφημα του irgarol 1051 (αλλά και του κύριου μεταβολίτη του) σε δείγμα θαλασσινού νερού.



Σχήμα 9.10 Χρωματογράφημα δείγματος θαλασσινού νερού προερχόμενο από το σημείο δειγματοληψίας Lady Bee marina στο Shoreham Harbour καθώς και τα φάσματα του M1 και του irgarol 1051 σε SIM (α, β, γ: άγνωστες κορυφές).

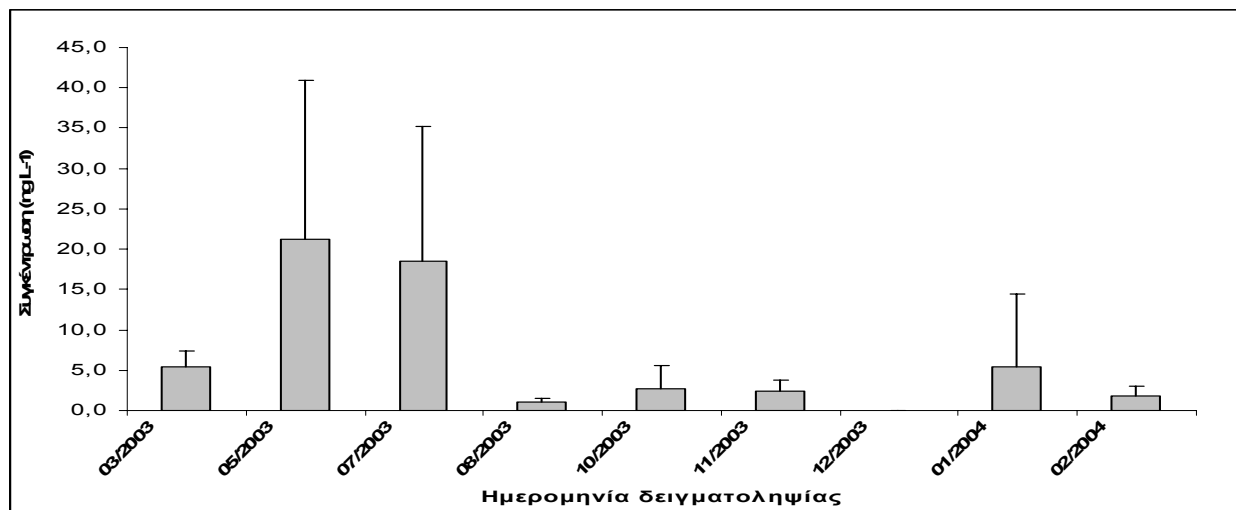
9.8.3.2 M1

Ο κύριος μεταβολίτης του irgarol 1051 ανιχνεύτηκε σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από πολύ χαμηλές, κάτω του ορίου ανίχνευσης ($0,5 \text{ ng L}^{-1}$), ως $58,9$ και $36,9 \text{ ng L}^{-1}$ για το Shoreham Harbour και τη Brighton marina αντίστοιχα (Πίνακες II.2 και II.4, Παράρτημα II) και είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Thomas et al., 2000;

Martinez and Barceló, 2001a; Thomas et al., 2002; Okamura et al., 2003). Στη Brighton marina η ουσία ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά.

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων γενικότερα ήταν χαμηλότερα από εκείνα του irgarol 1051. Υπήρξαν όμως και περιπτώσεις κατά τις οποίες ο M1 ανιχνεύτηκε σε πιο υψηλές συγκεντρώσεις από το irgarol 1051, όπως στο σταθμό Surrly Boad Yard κατά την 3^η δειγματοληψία όπου οι παρατηρούμενες συγκεντρώσεις για τις δύο ουσίες ήταν 58,9 και 32,4 ng L⁻¹ αντίστοιχα, ή ανιχνεύτηκε σε πολύ χαμηλό επίπεδο μόνο ο μεταβολίτης (π.χ. σταθμός Middle Pier κατά την 9^η δειγματοληψία). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται σε πλήρη μεταβολισμό, λόγω κατάλληλων συνθηκών, των χαμηλών συγκεντρώσεων του irgarol 1051 στα συγκεκριμένα σημεία τη δεδομένη χρονική στιγμή.

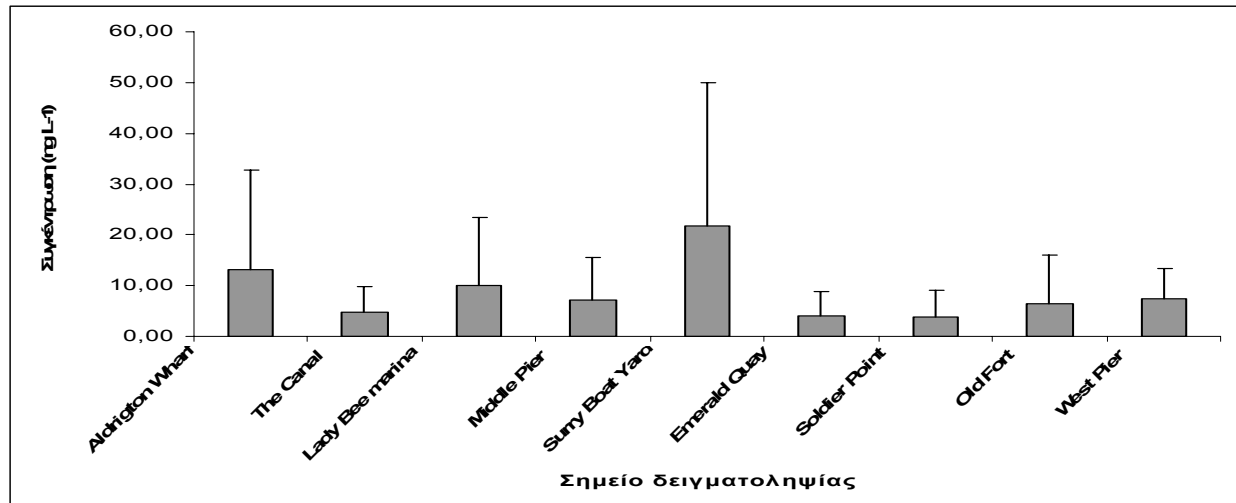
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 9.11, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις του M1 στο Shoreham Harbour παρατηρήθηκαν το Μάιο και τον Ιούλιο. Γενικά η χρονική διακύμανση της ουσίας ήταν αντίστοιχη με αυτή της αρχικής.



Σχήμα 9.11 Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του M1 με το χρόνο στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

Αναφορικά με τη χωρική κατανομή της ουσίας στο Shoreham Harbour, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν στους σταθμούς Aldrington Wharf και Surrly Boad Yard οι οποίοι όμως δεν χαρακτηρίζονται από μεγάλη πυκνότητα σκαφών. Επομένως η μόνη πιθανή εξήγηση είναι ο μεταβολισμός της αρχικής ουσίας σε μεγαλύτερο βαθμό στα συγκεκριμένα σημεία σε

συνδυασμό με τη μεγαλύτερη σταθερότητα της ουσίας στην ηλιακή ακτινοβολία (Okamura, 2002).



Σχήμα 9.12 Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του M1 με το χώρο στα δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour

9.8.3.3 Diuron

Το diuron ανιχνεύτηκε στο Shoreham Harbour μόνο την περίοδο από το Μάιο ως τον Οκτώβριο του 2003 και οι συγκεντρώσεις του κυμάνθηκαν από πολύ χαμηλές, κάτω του ορίου ανίχνευσης (7 ng L^{-1}), ως και 366 ng L^{-1} (Πίνακας II.3, Παράρτημα II). Στη Brighton marina, το diuron ανιχνεύτηκε μόνο τον Ιούλιο του 2003 σε ορισμένους σταθμούς δειγματοληψίας σε συγκεντρώσεις από $69,7$ ως 236 ng L^{-1} (Πίνακας II.4, Παράρτημα II). Οι συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στην παρούσα έρευνα είναι σε συμφωνία με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία για παρόμοια περιβάλλοντα (Dahl and Blanck, 1996; Ferrer and Barcelo, 1999; Boxall et al., 2000; Okamura et al., 2003) όμως είναι αδικαιολόγητες αφού όπως προαναφέρθηκε η χρήση της ουσίας στα υφαλοχρώματα έχει απαγορευτεί στο Ηνωμένο Βασίλειο από το 2000 για όλα τα σκάφη. Επομένως η πιο πιθανή εξήγηση είναι η είσοδος στο λιμάνι και στη μαρίνα πλοίων που προέρχονται από χώρες στις οποίες δεν υπάρχει περιορισμός στη χρήση της ουσίας. Αξίζει πάντως να σημειωθεί ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας που παρατηρήθηκαν είναι μεγαλύτερες από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν για το irgarol 1051 και τον M1.

Αναφορικά με τη χρονική και χωρική κατανομή του diuron στις δύο περιοχές που μελετήθηκαν δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα εξαιτίας του μικρού αριθμού των περιπτώσεων στις οποίες ανιχνεύτηκε η ουσία.

Κανένας από τους τρεις εξεταζόμενους μεταβολίτες της ουσίας (DCPMU, DCPU, DCA) δεν ανιχνεύτηκε στην παρούσα έρευνα σε κανένα δείγμα θαλασσινού νερού.

9.8.4 Επίπεδα των συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών στο ίζημα

9.8.4.1 Irgarol 1051

Οι συγκεντρώσεις του irgarol 1051 που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα ιζήματος κυμάνθηκαν στο Shoreham Harbour από <1,7 ως 40 ng g⁻¹ (Πίνακας II.5, Παράρτημα II) και στη Brighton marina από <1,7 ως 49,3 ng g⁻¹ (Πίνακας II.8, Παράρτημα II) και είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Biselli et al., 2000; Owen et al., 2002; Albanis et al., 2002; Bowman et al., 2003). Στο ίζημα, όπως και στο νερό, η μέση τιμή της συγκέντρωσης της ουσίας στο Shoreham Harbour ήταν μεγαλύτερη από αυτή στη Brighton marina (Πίνακας 9.2).

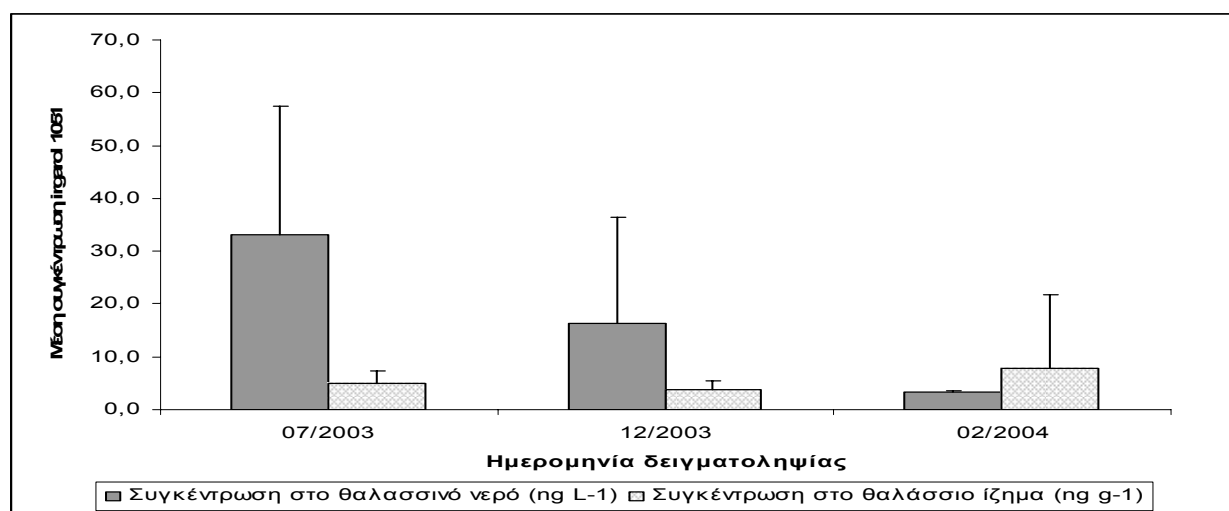
Στο Shoreham Harbour οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν στο σταθμό Lady Bee marina όμως εξαιτίας της αδυναμίας συλλογής δειγμάτων από όλους του σταθμούς λόγω των δυσμενών καιρικών συνθηκών που επικρατούσαν κατά τη διάρκεια ορισμένων δειγματοληπιών, δεν ήταν δυνατόν να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για τη χρονική και χωρική κατανομή της ουσίας σε αυτή την περιοχή.

Πίνακας 9.2 Εύρος συγκεντρώσεων (ng g⁻¹), διάμεση τιμή (ng g⁻¹), αριθμητικός και γεωμετρικός μέσος των συγκεντρώσεων των ουσιών irgarol 1051 και M1 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος.

	Brighton marina		Shoreham Harbour	
	Irgarol 1051	M1	Irgarol 1051	M1
Εύρος συγκεντρώσεων (ng g ⁻¹)	* - 49,3	* - 5,6	* - 40,0	* - 22,7
Διάμεση τιμή (ng g ⁻¹)	2,7	0,5	3,0	0,6
Αριθμητικός μέσος (ng g ⁻¹)	4,6	1,3	7,1	2,9
Γεωμετρικός μέσος (ng g ⁻¹)	2,7	0,9	3,5	1,3
Τυπική απόκλιση	± 8,1	± 1,4	± 9,8	± 22,7

* : η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (LOD_{irgarol 1051} = 1,7 ng g⁻¹, LOD_{M1} = 0,9 ng g⁻¹).

Κατά τη διάρκεια της 1^η δειγματοληψίας στη Brighton marina πραγματοποιούνταν εκβάθυνση της μαρίνας. Επομένως στις επόμενες δειγματοληψίες αναμένονταν υψηλότερες συγκεντρώσεις στο νερό και χαμηλότερες στο ίζημα, εξαιτίας φαινομένων εκρόφησης της ουσίας από το ίζημα. Όπως φαίνεται όμως στο Σχήμα 9.13, τα επίπεδα των συγκεντρώσεων στο νερό φαίνεται ότι μειώθηκαν από τον Ιούλιο ως το Φεβρουάριο. Αντίθετα στο ίζημα κατά τη 2^η δειγματοληψία η μέση συγκέντρωση του irgarol 1051 μειώθηκε ελάχιστα (οι συγκεντρώσεις μειώθηκαν μόνο στους σταθμούς G, H, J, O, P, Πίνακας Π. 7, Παράρτημα Π) ενώ κατά την 3^η δειγματοληψία αυξήθηκε. Λόγω αδυναμίας συλλογής δειγμάτων πριν την εκβάθυνση της μαρίνας, δεν μπορεί να εξαχθεί σαφές συμπέρασμα για το κατά πόσο η διαδικασία αυτή επηρέασε τις συγκεντρώσεις της ουσίας στο ίζημα. Πάντως οι μέσες συγκεντρώσεις του irgarol 1051 που ανιχνεύτηκαν στην παρούσα έρευνα είναι χαμηλότερες από εκείνες που αναφέρονται από τους Bowman et al. (2003) για την ίδια περιοχή το 2000. Όπως και στην περίπτωση του Shoreham Harbour, έτσι και στη Brighton marina δεν υπάρχει κάποια ένδειξη για ιδιαίτερη χωρική κατανομή της ουσίας.



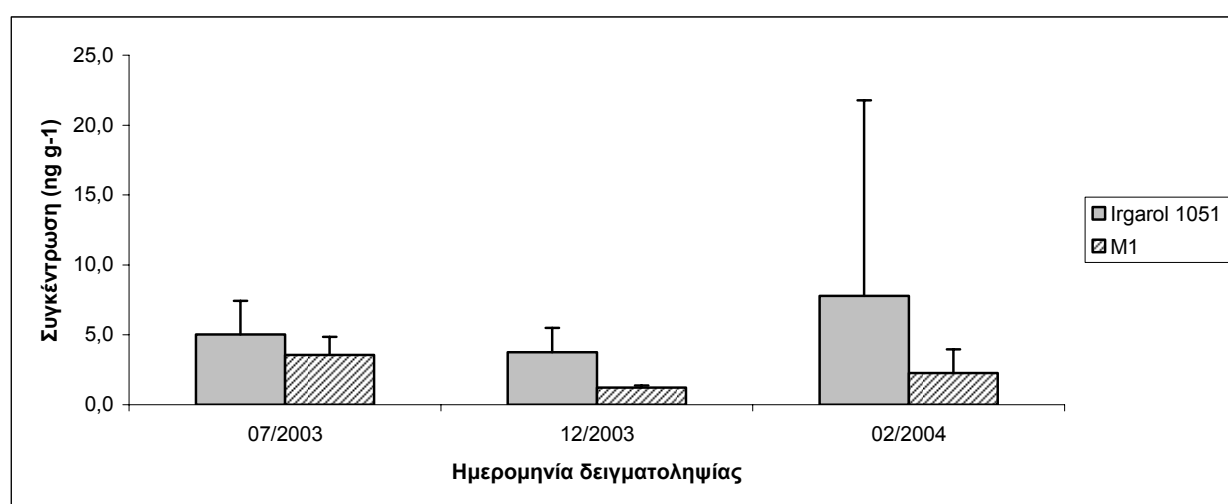
Σχήμα 9.13 Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του irgarol 1051 με το χρόνο στα δείγματα θαλασσινού νερού και θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.

9.8.4.2 M1

Τα επίπεδα των συγκεντρώσεων του M1 που ανιχνεύτηκαν κυμάνθηκαν στο Shoreham Harbour από <math><0,9</math> ως $22,7$ ng g⁻¹ (Πίνακας Π. 6, Παράρτημα Π) και στη Brighton marina από <math><0,9</math> ως $5,6$

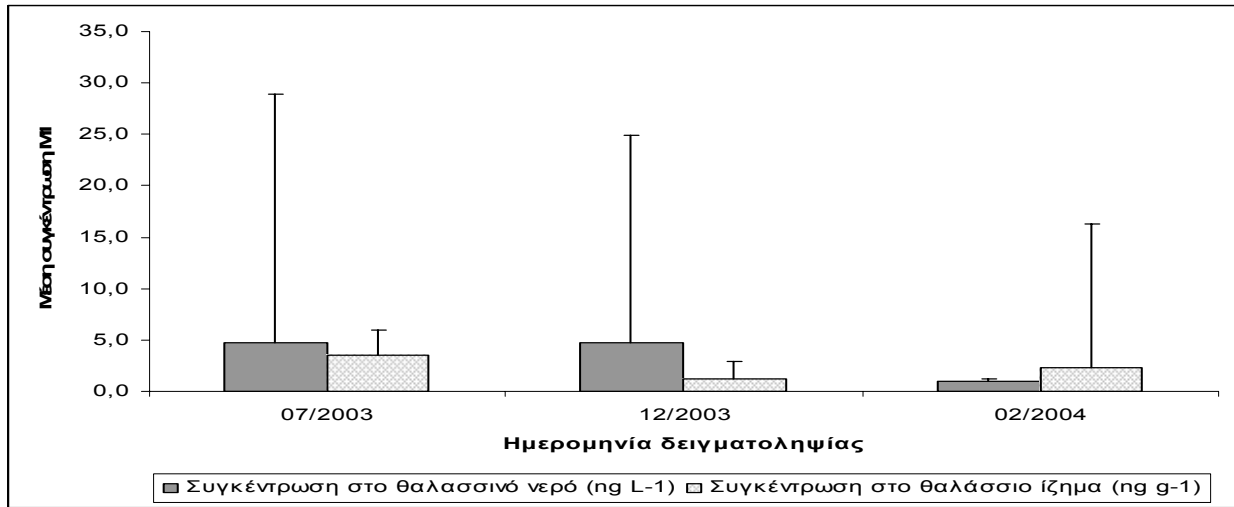
ng g⁻¹ (Πίνακας Π.8, Παράρτημα Π) και είναι σε αντιστοιχία με τις αναφερόμενες συγκεντρώσεις της ουσίας από άλλους συγγραφείς (Thomas et al., 2000; Martinez and Barceló, 2001a; Okamura et al., 2003). Η ουσία για πρώτη φορά ανιχνεύτηκε σε δείγματα ιζήματος στη συγκεκριμένη περιοχή.

Οι μέσες συγκεντρώσεις της ουσίας σε όλες τις δειγματοληψίες ήταν χαμηλότερες από αυτές του irgarol 1051 και για τις δύο περιοχές που εξετάστηκαν. Στο Σχήμα 9.14 φαίνονται οι μέσες συγκεντρώσεις του M1 και του irgarol 1051 για την Brighton marina.



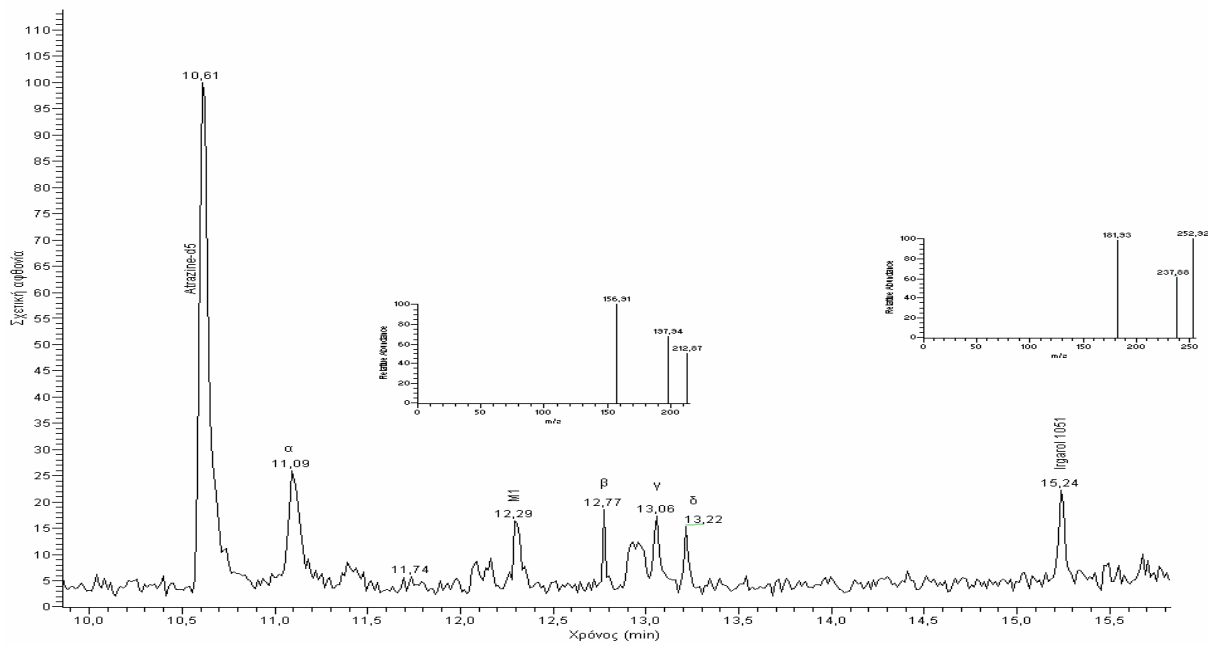
Σχήμα 9.14 Μέση τιμή των συγκεντρώσεων του M1 και του irgarol 1051 κατά τη διάρκεια των τριών δειγματοληψιών στα δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.

Αναφορικά με την εκβάθυνση της μαρίνας δεν είναι εμφανής η επίδρασή της στις συγκεντρώσεις του M1, διότι η συγκέντρωση στο ίζημα μειώθηκε το Δεκέμβριο, όμως τα επίπεδα της ουσίας στη στήλη του νερού παρέμειναν στα ίδια επίπεδα την ίδια περίοδο (Σχήμα 9.15).



Σχήμα 9.15 Διακύμανση της μέσης συγκέντρωσης του M1 με το χρόνο στα δείγματα θαλασσινού νερού και θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.

Χρωματογράφημα του M1 αλλά και της αρχικής ουσίας irgarol 1051 σε δείγμα θαλάσσιου ιζήματος παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.16.



Σχήμα 9.16 Χρωματογράφημα δείγματος θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενο από το σημείο δειγματοληψίας Ο στη Brighton marina καθώς και τα φάσματα του M1 και του irgarol 1051 σε SIM (α, β, γ, δ: άγνωστες κορυφές).

9.8.4.3 Diuron

Το diuron ανιχνεύτηκε σε δύο μόνο δείγματα από το Shoreham Harbour. Συγκεκριμένα συγκεντρώσεις της ουσίας ίσες με 66,4 ng g⁻¹ και 59,7 ng g⁻¹ προσδιορίστηκαν στους σταθμούς Lady Bee marina (6^η δειγματοληψία) και Old Fort (8^η δειγματοληψία). Αντίστοιχες συγκεντρώσεις της ουσίας στο ίζημα έχουν αναφερθεί και από άλλους συγγραφείς (Boxall et al., 2000; Martinez and Barceló, 2001a).

Η απουσία του diuron από τα δείγματα ιζήματος ήταν αναμενόμενη διότι ως υδρόφιλη ουσία που είναι (LogK_{ow} = 2,68) εμφανίζει μικρή τάση προσρόφησης στο ίζημα (Thomas et al., 2000). Η παρουσία της ουσίας στους δύο σταθμούς πιθανότατα συνδέεται με την προσρόφηση στο ίζημα κομματιών υφαλοχρώματος που περιείχε diuron από όπου και απελευθερώθηκε. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία να συμβαίνει (Thomas et al., 2000).

9.8.4.4 DCPMU

Η DCPMU ήταν ο μοναδικός μεταβολίτης του diuron που ανιχνεύτηκε στην παρούσα έρευνα. Η συγκεντρώσεις στο Shoreham Harbour κυμάνθηκαν από <4 ως 122 ng g⁻¹ (Πίνακας II.7, Παράτημα II) ενώ στη Brighton marina προσδιορίστηκαν συγκεντρώσεις ως και 56,5 ng g⁻¹ (Πίνακας II.8, Παράτημα II). Η παρουσία της DCPMU στο ίζημα αλλά σε συγκεντρώσεις <25 ng g⁻¹ αναφέρεται μόνο από τους Martinez and Barceló (2001a).

9.8.5 Επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του νερού

Η επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του νερού (αλατότητας και pH) πάνω στις συγκεντρώσεις των ουσιών, εξετάστηκε μόνο για τις ουσίες irgarol 1051 και M1 επειδή ήταν οι μοναδικές, από τις έξι συνολικά που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή, οι οποίες ανιχνεύτηκαν στα περισσότερα δείγματα που συνολικά αναλύθηκαν. Για να διαπιστωθεί αν υπάρχει λοιπόν συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του νερού, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Statistica 5.5 (1984-1999, StatSoft Inc.). Στα πειραματικά δεδομένα εφαρμόστηκε μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη στατιστική ανάλυση, στα δείγματα εκείνα στα οποία δεν ανιχνεύτηκαν οι ουσίες, ως συγκέντρωση των ουσιών χρησιμοποιήθηκε η τιμή LOD/2. Τα αποτελέσματα της στατιστικής

επεξεργασίας των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στους Πίνακες 9.3 και 9.4 για τις δύο περιοχές δειγματοληψίας που εξετάστηκαν.

Πίνακας 9.3 Μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού για το Shoreham Harbour.

	Irgarol 1051	M1	pH	Αλατότητα
Irgarol 1051		0,825	-0,026	-0,099
M1	0,825		0,136	-0,210
pH	-0,026	0,136		-0,462
Αλατότητα	-0,099	-0,210	-0,462	

τιμές με έντονη γραφή : υπάρχει συσχέτιση σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95 % ($p < 0,05$).

Πίνακας 9.4 Μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού για τη Brighton marina.

	Irgarol 1051	M1	pH	Αλατότητα
Irgarol 1051		0,799	-0,026	-0,099
M1	0,799		0,718	0,221
pH	-0,026	0,718		0,393
Αλατότητα	-0,099	0,221	0,393	

τιμές με έντονη γραφή : υπάρχει συσχέτιση σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95 % ($p < 0,05$).

Η στατιστική ανάλυση επιβεβαίωσε την αναμενόμενη συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ αρχικής ουσίας και του κύριου μεταβολίτη της, αφού η παρουσία της δεύτερης στο περιβάλλον εξαρτάται πάντα από την παρουσία της πρώτης.

Μεταξύ της αλατότητας και των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση σε καμία από τις δύο περιοχές που εξετάστηκαν. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά των Sargent et al. (2000) και των Bowman et al. (2003) οι οποίοι επίσης βρήκαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του irgarol 1051 και της αλατότητας του νερού, όμως είναι σε αντίθεση με τους Steen et al., (1997) η οποίοι αναφέρουν γραμμική σχέση μεταξύ συγκέντρωσης του irgarol 1051 και της αλατότητας.

Αναφορικά με το pH του νερού, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παράμετρος συσχετίζεται μόνο με τη συγκέντρωση του M1 στα δείγματα που ελήφθησαν από τη Brighton marina. Εξαιτίας όμως της μικρής διακύμανσης των τιμών του pH στα διάφορα δείγματα, δεν είναι δυνατή η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Καμία συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων του irgarol 1051 και του pH αναφέρεται και από άλλους συγγραφείς (Sargent et al., 2000; Bowman et al., 2003).

9.8.6 Επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του ιζήματος

Τα αποτελέσματα της μη παραμετρικής συσχέτισης κατά Spearman των συγκεντρώσεων των ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιζήματος παρουσιάζονται στους Πίνακες 9.5 και 9.6. Από τα τρία κλάσματα του ιζήματος εξετάστηκε μόνο η συσχέτιση του μικρότερου κλασματος (<63 μm) καθώς αυτό το κλάσμα είναι που συνδέεται με υψηλές τιμές οργανικού άνθρακα όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Kan et al., 1994).

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στην περίπτωση τους ιζήματος, επιβεβαίωσε τη συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ των συγκεντρώσεων του irgarol 1051 και του M1.

Τόσο το pH όσο και ο οργανικός άνθρακας φάνηκε ότι συσχετίζονται με τις συγκεντρώσεις και των δύο ουσιών στο Shoreham Harbour, ενώ το μικρό κλάσμα των κόκκων του ιζήματος συσχετίστηκε μόνο με τη συγκέντρωση του M1 στα δείγματα που προήλθαν από το λιμάνι. Αναφορικά με τη Brighton marina, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μόνο μεταξύ του pH και της συγκέντρωσης του M1.

Η συσχέτιση μεταξύ του οργανικού άνθρακα και του μικρού κλασματος των κόκκων του ιζήματος ήταν αναμενόμενη.

Πίνακας 9.5 Μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιζήματος για το Shoreham Harbour.

	Irgarol 1051	M1	pH	%C	<63 μm
Irgarol 1051		0,701	-0,620	0,619	0,440
M1	0,701		-0,508	0,564	0,294
pH	-0,620	-0,508		-0,608	-0,407
% C	0,619	0,564	-0,608		0,714
<63 μm	0,440	0,294	-0,407	0,714	

τιμές με έντονη γραφή : υπάρχει συσχέτιση σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95 % ($p < 0,05$).

Πίνακας 9.6 Μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών irgarol 1051 και M1 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιζήματος για τη Brighton marina.

	Irgarol 1051	M1	pH	%C	<63 μm
Irgarol 1051		0,547	0,197	0,221	0,331
M1	0,547		0,440	0,286	0,624
pH	0,197	0,440		0,322	0,275
% C	0,221	0,286	0,322		0,499
<63 μm	0,331	0,624	0,275	0,499	

τιμές με έντονη γραφή : υπάρχει συσχέτιση σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95 % ($p < 0,05$).

Η διαφορετική επίδραση των φυσικοχημικών παραμέτρων του ιζήματος πάνω στις συγκεντρώσεις των δύο ουσιών που παρατηρήθηκε, πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική ηλικία και σύσταση του ιζήματος από τις δύο περιοχές οι οποίες σχετίζονται άμεσα με το πολύπλοκο φαινόμενο της προσρόφησης των ουσιών που λαμβάνει χώρα στο περιβάλλον. Οι εκβολές του ποταμού Adur στο Shoreham Harbur έχουν ως αποτέλεσμα την τροφοδότηση του ιζήματος του λιμανιού με οργανική ύλη διαφορετικής φύσεως από αυτή στη Brighton marina. Σύμφωνα με διάφορους ερευνητές η φύση της οργανικής ύλης επηρεάζει σημαντικά την προσροφητική της ικανότητα (Chiou and Kile, 1998; Kleineidam et al., 1999; Karapanagioti et al., 2000). Από την άλλη, η εκβάθυνση της μαρίνας σε ετήσια βάση έχει ως αποτέλεσμα την ανανέωση του επιφανειακού στρώματος του ιζήματος και την εναπόθεση φρέσκου ιζήματος στο

οποίο πιθανόν η οργανική ύλη να μην έχει πλήρως αποδομηθεί, επομένως τα φαινόμενα προσρόφησης - εκρόφησης ίσως να μην είναι τόσο έντονα.

Όσον αφορά το pH, η τιμή του μπορεί να επηρεάσει την προσρόφηση των ουσιών που ανήκουν κυρίως στην κατηγορία των τριαζινών όταν οι τιμές είναι πολύ χαμηλές κοντά στην τιμή της pKa (1,7 – 2,6) των ουσιών, διότι τότε οι ουσίες υφίστανται πρωτονίωση και επομένως ως ιόντα εμφανίζουν μεγαλύτερη τάση προσρόφησης (Gao et al., 1998). Στην παρούσα έρευνα σε κανένα από τα δείγματα η τιμή του pH δεν ήταν τόσο χαμηλή ($\leq 7,0$ σε όλες τις περιπτώσεις). Από την άλλη, η απουσία στοιχείων στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με τις σταθερές ιοντισμού των ουσιών καθιστά αδύνατη την εξαγωγή συμπερασμάτων. Πιθανόν όμως το pH, ανάλογα με τις διακυμάνσεις του, να δημιουργεί κατάλληλες συνθήκες οι οποίες ευνοούν την προσρόφηση των συγκεκριμένων ουσιών στο ιζήμα σε σχέση με άλλες που υπάρχουν στο περιβάλλον. Αυτό όμως είναι ένα θέμα που χρειάζεται διερεύνηση καθώς δεν υπάρχουν στοιχεία στη διεθνή βιβλιογραφία που να αφορούν στην ανταγωνιστική προσρόφηση του irgarol 1051 και του M1 με άλλες ουσίες.

9.9 Συμπεράσματα

Όπως προέκυψε από την παρούσα έρευνα οι περισσότερες από της εξεταζόμενες ουσίες ανιχνεύτηκαν έστω και μια φορά είτε στα δείγματα θαλασσινού νερού είτε στα δείγματα θαλάσσιου ιζήματος που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια ενός έτους από τις δύο περιοχές δειγματοληψίας.

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν κατά την περίοδο που η δραστηριότητα των σκαφών αναψυχής ήταν έντονη και κατά τις περιόδους προετοιμασίας των σκαφών για τη νέα περίοδο. Στο λιμάνι Shoreham Harbour οι υψηλές συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν στα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις δύο μαρίνες που υπάρχουν στο εσωτερικό του λιμανιού επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι η παρουσία των υπό εξέταση ουσιών στο περιβάλλον σχετίζεται με τη χρήση τους στα υφαλοχρώματα.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των δύο ουσιών και της αλατότητας, ενώ το pH συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του M1 μόνο στη Brighton marina χωρίς όμως να είναι δυνατή η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Οι φυσικοχημικές παράμετροι του ιζήματος φάνηκε ότι συσχετίζονται με τις συγκεντρώσεις του irgarol 1051 και του M1 στα δείγματα ιζήματος από το Shoreham Harbour,

ενώ στη Brighton marina συσχέτιση παρατηρήθηκε μόνο μεταξύ του pH και της συγκέντρωσης του M1.

Η παρουσία των εξεταζόμενων ουσιών στο θαλάσσιο περιβάλλον του Ηνωμένου Βασιλείου, λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς που όπως προαναφέρθηκε ισχύουν για αυτές, δικαιολογείται εν μέρει από φαινόμενα προσρόφησης κομματιών υφαλοχρώματος στο ίζημα στα οποία οι ουσίες είναι ενσωματωμένες και από όπου εξακολουθούν να απελευθερώνονται στο περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ IRGAROL 1051 ΚΑΙ DIURON ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥΣ M1 ΚΑΙ DCA ΣΕ ΦΥΤΟΠΛΑΓΚΤΟΝΙΚΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

10.1 Εισαγωγή

Το φυτοπλαγκτόν αποτελεί πολύ σημαντική πηγή ενέργειας για τα περισσότερα υδατικά οικοσυστήματα. Επομένως τυχόν αλλαγές στην πυκνότητα και τη σύνθεσή του μπορεί να επηρεάσουν τη χημική και βιολογική ποιότητα ολόκληρου του εκάστοτε ενδιαιτήματος. Επιβάλλεται λοιπόν η εκτίμηση του οικολογικού κινδύνου που μπορεί να προκαλέσουν οι διάφορες χημικές ενώσεις που εισέρχονται στο περιβάλλον (Klaine et al., 2003).

Εδώ και αρκετές δεκαετίες οι δοκιμές οξείας τοξικότητας χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για τον προσδιορισμό των επιπτώσεων των διαφόρων ουσιών πάνω στους υδρόβιους οργανισμούς κατά τη διάρκεια μικρής έκθεσής τους σε αυτές. Τα μονοκύτταρα φύκη χρησιμοποιούνται συχνά στις δοκιμές τοξικότητας ειδικά για χημικές ουσίες που είναι ύποπτες για φυτοτοξική δράση.

Οι τοξικές επιπτώσεις μιας χημικής ουσίας σε έναν μικροοργανισμό είναι αποτέλεσμα της επίδρασης όχι μόνο της ίδιας της ουσίας αλλά και των προϊόντων μεταβολισμού της που μπορεί να προκύψουν εξαιτίας βιοτικών και αβιοτικών διαδικασιών που συμβαίνουν στο υδατικό περιβάλλον. Οι μεταβολίτες μιας ουσίας μπορεί να είναι λιγότερο ή περισσότερο τοξικοί από την αρχική, επομένως για την πλήρη εκτίμηση της τοξικότητας μιας ουσίας θα πρέπει να είναι γνωστές και οι επιπτώσεις των πιθανών μεταβολιτών της.

Στόχος των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν η εκτίμηση της οξείας τοξικότητας τεσσάρων από τις έξι συνολικά ουσίες που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, πάνω σε δύο θαλάσσιους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς, τη *Dunaliella tertiolecta* και τη *Navicula forcipata*. Οι συγκεκριμένοι οργανισμοί επιλέχθηκαν λόγω της εύκολης ανάπτυξής τους στο εργαστήριο. Οι ουσίες που επιλέχθηκαν για τις δοκιμές τοξικότητας ήταν το irgarol 1051, το diuron και οι μεταβολίτες τους M1 και DCA, αντίστοιχα. Λόγω της μικρής διαλυτότητας των εξεταζόμενων ουσιών στο νερό, εξετάστηκε αρχικά η τοξικότητα της ακετόνης, καθώς αυτός ο οργανικός διαλύτης επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή των ουσιών στις

καλλιέργειες κατά τη διάρκεια των δοκιμών. Πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων που αφορούσε στον προσδιορισμό του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων των ουσιών πάνω στους δύο μικροοργανισμούς και μια δεύτερη σειρά πειραμάτων που αφορούσε στη μελέτη της τοξικότητας των τεσσάρων ουσιών σε συγκεντρώσεις μέσα στο εύρος που προσδιορίστηκε από τα προηγούμενα πειράματα. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίστηκαν οι τιμές της EC₅₀ των εξεταζόμενων ουσιών για τη *Dunaliella tertiolecta* και τη *Navicula forcipata*.

10.2 Εξοπλισμός

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τα συγκεκριμένα πειράματα περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.

10.3 Αντιδραστήρια

Ακετόνη για υγρή χρωματογραφία (Merck, Germany)

Πρότυπες ουσίες irgarol 1051, diuron, DCA (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schäfers, Germany)

Πρότυπη ουσία M1 (Additive Hellas, Ελλάδα, Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, Essex, UK και Ciba-Geigy, NY, USA)

Διαλύματα παρακαταθήκης των τεσσάρων ουσιών σε ακετόνη, 20000 mg L⁻¹

NH₄OH (Sigma, USA)

NaNO₃ (Merck, Germany)

NaH₂PO₄•H₂O (Merck, Germany)

EDTA (Fe) (Merck, Germany)

Na₂SiO₃•5H₂O (Merck, Germany)

MnCl₂•4H₂O (Merck, Germany)

CuSO₄•5H₂O (Merck, Germany)

ZnSO₄•7H₂O (Merck, Germany)

CoC₁₂•6H₂O (Merck, Germany)

Na₂MoO₄•2H₂O (Merck, Germany)

I₂ (Merck, Germany)

KI (Merck, Germany)

Παγόμορφο οξικό οξύ (Merck, Germany)

Βιοτίνη (Serva, USA)

Υδροχλωρική θειαμίνη (Fluka, Germany)

B₁₂ (Serva, USA)

Υπερκαθαρό νερό που παράχθηκε στο εργαστήριο

10.4 Καλλιέργειες μικροοργανισμών

Καλλιέργεια του μικροφύκου *Dunaliella teriolecta* (Εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας και Οικολογίας, Τμήμα Επιστήμης της Θάλασσας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου)

Καλλιέργεια του μικροφύκου *Naviculla forcipata* (Εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας και Οικολογίας, Τμήμα Επιστήμης της Θάλασσας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου)

10.5 Μεθοδολογία

10.5.1 Παρασκευή θρεπτικού μέσου medium f/2

Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε γηρασμένο θαλασσινό νερό. Η συλλογή του θαλασσινού νερού γινόταν με τη βοήθεια σκάφους από μη ρυπασμένη περιοχή ανοιχτά της πόλης της Μυτιλήνης. Με την επιστροφή στο εργαστήριο γινόταν διήθηση του νερού με τη χρήση φίλτρων GF/F 0,7 μm από υαλονήματα (Whatman, England) και αποθήκευσή του σε σκουρόχρωμα πλαστικά μπιτόνια (50 L) για τουλάχιστον έξι μήνες.

Το θρεπτικό μέσο medium f/2 μέσα στο οποίο γινόταν η ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποτελούνταν από 2,5 mL μίγματος αλάτων και 997,5 mL διηθημένου γηρασμένου θαλασσινού νερού. Η τιμή του pH του medium f/2 ήταν 7,2. Για την παρασκευή του μίγματος αλάτων κατάλληλοι όγκοι από κάθε άλας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.1, προστέθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL στην οποία προστέθηκαν επίσης 15 mL υπερκαθαρού νερού, ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 100 mL. Το διάλυμα μίγματος των αλάτων αποτελεί το medium f (McLachlan, 1973).

Πίνακας 10.1 Σύσταση θρεπτικού μέσου medium f.

Άλας	Συγκέντρωση	Παρασκευή medium f
	Θρεπτικά στοιχεία	
NaNO ₃	15 g/100 mL	20 mL
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	1,77g/100 mL	10 mL
EDTA	2 g/100 mL	10 mL
Na ₂ SiO ₃ •5H ₂ O	2,3 g/100 mL	20 mL
	Ιχνοστοιχεία	
MnCl ₂ •4H ₂ O	0,144g/100 mL	5 mL
CuSO ₄ 5•H ₂ O	0,0078g/100 mL	5 mL
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,0176g/100 mL	5 mL
CoC ₁₂ •6H ₂ O	0,008g/100 mL	5 mL
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,005g/100 mL	5 mL

Τουλάχιστον 24 h πριν την έναρξη του πειράματος, σε σφαιρικές φιάλες όγκου 250 mL τοποθετούνταν 95 mL θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια αποστειρωνόταν στους 120 °C για 20 min. Καθ' όλη τη διάρκεια της αποστείρωσης η πίεση στο εσωτερικό του κλιβάνου ήταν 1 atm.

Πριν την έναρξη του πειράματος το αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο επιφορτιζόταν με μια σταγόνα μίγματος βιταμινών.

Το μίγμα των βιταμινών αποτελούνταν από βιοτίνη, υδροχλωρική θειαμίνη και βιταμίνη B₁₂ (Πίνακας 10.2). Για την παρασκευή του μίγματος, κατάλληλος όγκος από κάθε βιταμίνη αραιώθηκε σε 100 mL υπερκαθαρού νερού.

Πίνακας 10.2 Σύσταση μίγματος βιταμινών.

Βιταμίνη	Συγκέντρωση	Παρασκευή μίγματος
Βιοτίνη	0,05 g/200 mL	2 mL
Υδροχλωρική θειαμίνη	1 g/100 mL	10 mL
Βιταμίνη B ₁₂	0,05 g/100 mL	1 mL

10.5.2 Παρασκευή lugol

Η ακινητοποίηση των μικροοργανισμών ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση του κυτταρικού αριθμού πραγματοποιούνταν με τη χρήση διαλύματος «lugol», αραιωμένου σε γηρασμένο θαλασσινό νερό σε αναλογία 1: 200 (lugol : γηρασμένο θαλασσινό νερό). Το διάλυμα lugol παρασκευάστηκε ως εξής: σε 200 mL υπερκαθαρού νερού διαλύθηκαν 10 g καθαρού ιωδίου, 20 g ιωδιούχου καλίου και 20 g παγόμορφου οξικό οξέος (Guillard, 1973).

10.5.3 Παρασκευή προκαλλιεργειών των μικροοργανισμών

Για την παρασκευή των προκαλλιεργειών των δύο μικροοργανισμών, 5 mL καλλιέργειας λαμβανόταν με αποστειρωμένα ρύγγη από τις καλλιέργειες παρακαταθήκης, τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο επιφορτισμένο με βιταμίνες και στη συνέχεια τοποθετούνταν στον επωαστικό θάλαμο. Η προετοιμασία γινόταν τέσσερις μέρες πριν την έναρξη του πειράματος έτσι ώστε την ημέρα του πειράματος οι μικροοργανισμοί στις προκαλλιεργειες να βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους. Από προκαταρκτικά πειράματα προέκυψε ότι οι εν λόγω μικροοργανισμοί βρίσκονται στην εκθετική φάση της ανάπτυξής τους μετά από 96 h.

10.5.4 Παρασκευή των διαλυμάτων των εξεταζόμενων ουσιών για την εκτίμηση της τοξικότητας

Τόσο τα διαλύματα παρακαταθήκης όσο και τα διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν σε οργανικό διαλύτη εξαιτίας της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας των ουσιών. Ο οργανικός διαλύτης που επιλέχθηκε ήταν η ακετόνη, η οποία αναμιγνύεται με το νερό και ενδύκνεται για χρήση σε δοκιμές τοξικότητας (ASTM, 1993). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του OECD (1989) όταν μια ουσία έχει διαλυτότητα <math> <1000 \text{ mg L}^{-1}</math> τότε για την εισαγωγή της στις καλλιέργειες χρησιμοποιείται κατάλληλος οργανικός διαλύτης. Τα διαλύματα παρακαταθήκης

παρασκευάστηκαν ζυγίζοντας κατάλληλη ποσότητα της κάθε ουσίας απευθείας σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL η οποία στη συνέχεια διαλυόταν σε ακετόνη. Από τα διαλύματα αυτά, την ημέρα του πειράματος παρασκευάζονταν τα διαλύματα εργασίας με κατάλληλες αραιώσεις. Τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονταν στους $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ και πριν τη χρήση τους αφήνονταν να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου.

10.5.5 Πειράματα οξείας τοξικότητας

Για τη διεξαγωγή των δοκιμών τοξικότητας, σε σφαιρικές φιάλες των 250 mL τοποθετούνταν 95 mL θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια το στόμιο των φιαλών σφραγιζόταν με υδρόφοβο βαμβάκι το οποίο εξωτερικά καλύπτονταν από αλουμινόχαρτο. Ακολουθούσε αποστείρωση του θρεπτικού μέσου όπως περιγράφεται στην παράγραφο 10.5.1. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιούνταν τουλάχιστον 24 h πριν την έναρξη του πειράματος ώστε να υπάρχει η δυνατότητα εξισορρόπησης του CO_2 στο εσωτερικό των φιαλών μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα.

Στο αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο αρχικά γινόταν προσθήκη των βιταμινών (1 σταγόνα) και ακολουθούσε η προσθήκη των 5 mL της προκαλλιέργειας των μικροοργανισμών. Εξαιτίας της ανάγκης παρασκευής του θρεπτικού μέσου νωρίτερα, δεν ήταν δυνατή η εισαγωγή του ίδιου αριθμού κυττάρων κάθε φορά. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ο αριθμός των κυττάρων κυμάνθηκε από 30000 έως 40000 κύτταρα mL^{-1} . Αμέσως μετά την εισαγωγή των μικροοργανισμών γινόταν η προσθήκη των κατάλληλων όγκων των διαλυμάτων των τοξικών ουσιών. Οι σφαιρικές φιάλες ανακινούνταν έντονα και τοποθετούνταν στον ειδικό θάλαμο επώασης. Η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν 96 h. Καθημερινά γινόταν χειρωνακτική ανάδευση των φιαλών και στη συνέχεια λαμβανόταν με αποστειρωμένα ρύγχη δείγμα (1 mL) από κάθε φιάλη για τη μέτρηση του κυτταρικού αριθμού. Σε κάθε πείραμα υπήρχαν τρεις καλλιέργειες αναφοράς, ενώ οι επαναλήψεις για τα επτά επίπεδα των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν ήταν δύο.

10.5.6 Επώαση

Η επώαση των προκαλλιιεργειών και των καλλιιεργειών γινόταν σε ειδικό επωαστικό θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) και συνεχούς φωτισμού (3000 Lux). Όπως προαναφέρθηκε

καθημερινά γινόταν χειρωνακτική ανάδευση των σφαιρικών φιαλών ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση κυττάρων στον πυθμένα των φιαλών.

10.5.7 Μέτρηση κυτταρικού αριθμού

Η καταμέτρηση του κυτταρικού αριθμού των μικροοργανισμών πραγματοποιούνταν σε εννιά περιοχές του μικροσκοπίου (Πίνακας 10.3) ώστε το σφάλμα της μέτρησης να είναι $< \pm 5\%$. Ο υπολογισμός του κυτταρικού αριθμού N (κύτταρα mL^{-1}) γινόταν σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$N = \frac{Mxf(n)}{0,1} \quad (10.1)$$

όπου:

M = ο αριθμός των κυττάρων που συνολικά μετριέται σε n περιοχές του μικροσκοπίου

$f(n)$ = ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας για τις n περιοχές όπου μετριέται ο κυτταρικός αριθμός.

Ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας για κάθε μία από τις εννιά περιοχές υπολογίστηκε σύμφωνα με τη σχέση:

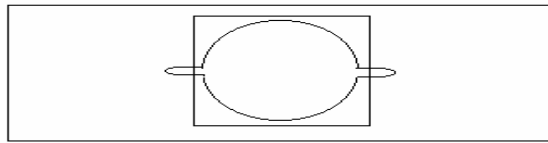
$$f(n) = \frac{\pi r^2}{n_{1-9} \alpha^2} \quad (10.2)$$

όπου:

r = ακτίνα της κυβέτας Palmer-Maloney (9 mm)

n = αριθμός περιοχών μικροσκοπίου στις οποίες γίνεται μέτρηση των κυττάρων

α = μήκος πλευράς κανάβου του μικροσκοπίου (0,47 mm σύμφωνα με το φακό που χρησιμοποιήθηκε).



κυβέτα Palmer-Maloney

Σχήμα 10.1 Χαρακτηριστικά κυβέτας Palmer-Maloney: διάμετρος = 18 mm, βάθος = 0,45 mm, όγκος = 0,1 mL.

Πίνακας 10.3 Συντεταγμένες των εννιά περιοχών του μικροσκοπίου καθώς και ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας $f(n)$ για κάθε περιοχή.

Συντεταγμένες		Περιοχή (n)	f(n)
135	57	1	1151
135	52	2	576
135	47	3	384
140	57	4	288
140	52	5	230
140	47	6	192
145	57	7	165
145	52	8	144
145	47	9	128

10.5.8 Υπολογισμός του ρυθμού ανάπτυξης

Ο υπολογισμός του ρυθμού ανάπτυξης k πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τη σχέση (Guillard, 1973):

$$k = 3,322 \times \frac{\text{Log} \left(\frac{N_2}{N_1} \right)}{t_2 - t_1} \quad (10.3)$$

Όπου:

N_1 και N_2 ο κυτταρικός αριθμός του μικροοργανισμού στην αρχή και στο τέλος του πειράματος αντίστοιχα

t_1 και t_2 χρόνος 0 και 4 ημερών αντίστοιχα.

10.5.9 Υπολογισμός της % αναχαίτισης της ανάπτυξης

Ο υπολογισμός της % αναχαίτισης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών έγινε με βάση την παρακάτω σχέση:

$$\% \text{ αναχαίτιση} = \left(\frac{k_c - k_{tox}}{k_c} \right) \times 100 \quad (10.4)$$

όπου:

k_c = ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας αναφοράς

k_{tox} = ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας που είναι επιφορτισμένη με τοξική ουσία.

10.5.10 Τοξικότητα του οργανικού διαλύτη

Η τοξικότητα της ακετόνης εξετάστηκε για τους δύο μικροοργανισμούς *Dunaliella tertiolecta* και *Navicula forcipata* πριν από την έναρξη οποιουδήποτε άλλου πειράματος ώστε να διαπιστωθεί η μέγιστη ποσότητα του διαλύτη που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και η οποία δεν δημιουργεί κανένα πρόβλημα στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Τα πειράματα για τον προσδιορισμό του μέγιστου επιτρεπτού όγκου της ακετόνης πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και τα επίπεδα που εξετάστηκαν ήταν 20, 50, 80, 100 και 120 μL διαλύτη.

10.5.11 Προσδιορισμός του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων

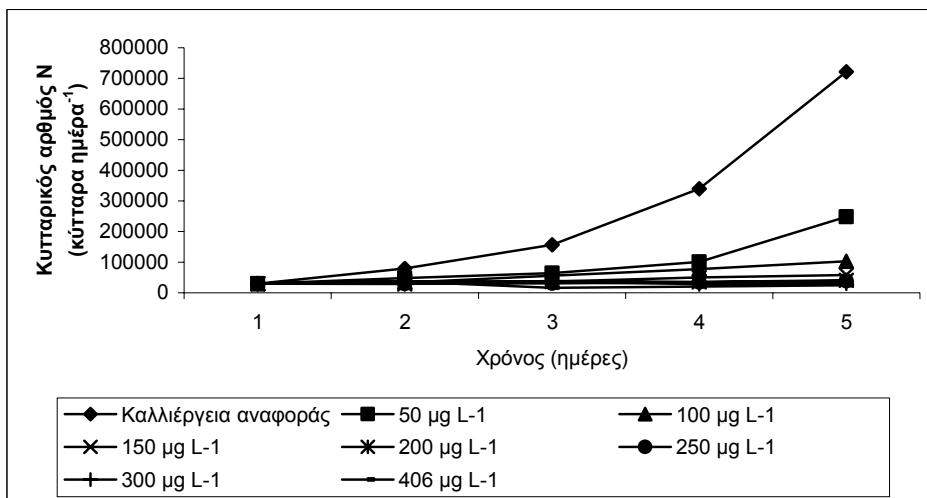
Πριν την έναρξη των πειραμάτων για την εκτίμηση της τοξικότητας των εξεταζόμενων ουσιών, εξετάστηκε η επίπτωση των τεσσάρων ουσιών σε διάφορες συγκεντρώσεις με διαφορά τάξης μεγέθους ώστε να προσδιοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων που στη συνέχεια έπρεπε να

εξεταστεί ώστε να προσδιοριστεί η τιμή της EC_{50} για κάθε ουσία. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του OECD (1989) για την εκτίμηση της τοξικότητας μιας ουσίας θα πρέπει το εύρος των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων να κυμαίνεται μεταξύ μιας συγκέντρωσης η οποία να μην επιφέρει καμία απολύτως αναχαίτιση στην ανάπτυξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών και μιας άλλης η οποία να αναχαιτίζει τους μικροοργανισμούς σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50 %. Στην παρούσα έρευνα για την εύρεση του εύρους αυτών των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων εξετάστηκαν για τις ουσίες irgarol 1051, M1 και diuron τα επίπεδα από 0,01 έως 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ ενώ για την DCA εξετάστηκαν τα επίπεδα από 0,1 έως 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Όλα τα πειράματα για τον προσδιορισμό του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων των τεσσάρων ουσιών πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

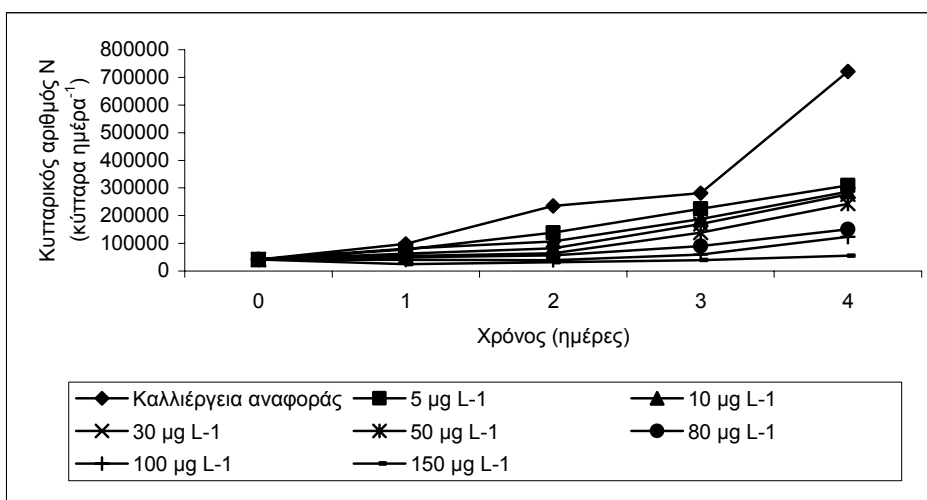
10.5.12 Εκτίμηση της οξείας τοξικότητας των εξεταζόμενων ουσιών

Ο προσδιορισμός της EC_{50} της κάθε ουσίας για τους δύο μικροοργανισμούς πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της καμπύλης αναχαίτισης (%) – συγκέντρωσης. Για την κατασκευή της καμπύλης αυτής, καθημερινά λαμβάνονταν δείγμα (1 mL) από τις επιφορτισμένες με τοξική ουσία καλλιέργειες και τις καλλιέργειες αναφοράς και τοποθετούνταν σε φιαλίδιο στο οποίο προστίθονταν 3 σταγόνες lugol ώστε να σταθεροποιηθούν τα κύτταρα. Τα δείγματα αναδεύονταν και αφήνονταν σε ηρεμία για 10 min περίπου. Με πιπέττα Pauster, ποσότητα δείγματος ίση με 0,1 mL τοποθετούνταν πάνω σε κυβέτα Palmer- Maloney (Σχήμα 10.1), αφήνονταν σε ηρεμία για 2 min περίπου ώστε να κατακαθίσουν όλα τα κύτταρα και ακολουθούσε καταμέτρηση του κυτταρικού αριθμού στις εννιά περιοχές του μικροσκοπίου.

Στα Σχήματα 10.2 και 10.3 παρουσιάζονται ενδεικτικά ο κυτταρικός αριθμός N των δύο μικροοργανισμών σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1.



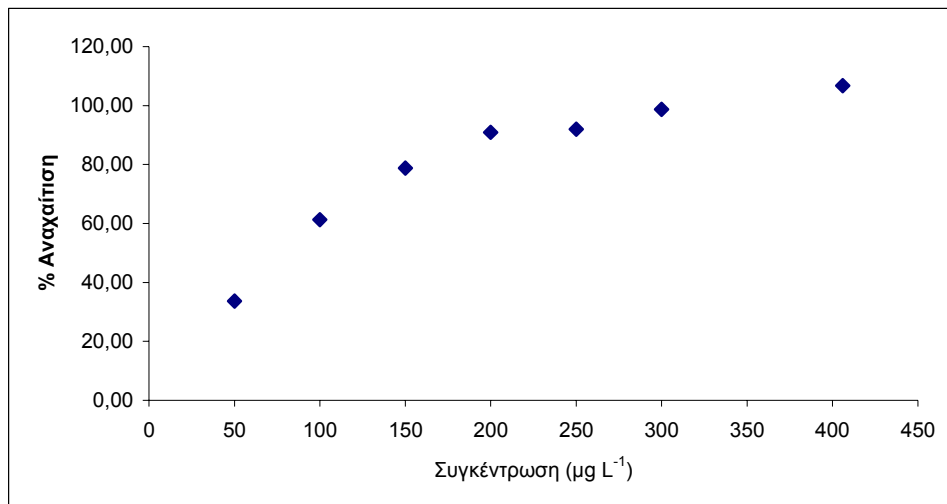
Σχήμα 10.2 Ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta* (κύτταρα ημέρα⁻¹) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1.



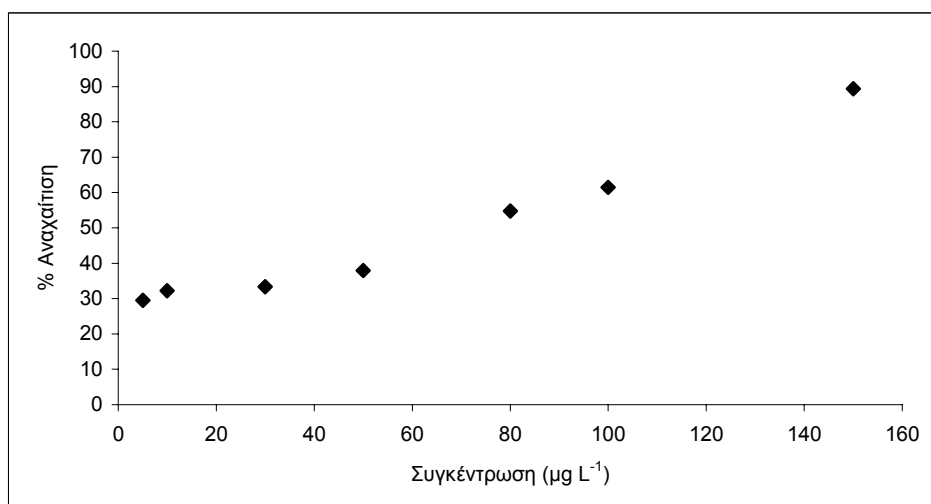
Σχήμα 10.3 Ανάπτυξη της *Navicula forcipata* (κύτταρα ημέρα⁻¹) σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1.

Γνωρίζοντας τον κυτταρικό αριθμό N προσδιορίστηκε η % αναχαίτιση του ρυθμού ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης των εξεταζόμενων ουσιών. Η γραφική παράσταση της % αναχαίτισης του ρυθμού ανάπτυξης σε συνάρτηση με τη

συγκέντρωση της τοξικής ουσίας ήταν σιγμοειδούς μορφής για όλες τις εξεταζόμενες ουσίες. Το φαινόμενο αυτό ήταν αναμενόμενο αφού πάντα η καμπύλη απόκρισης – συγκέντρωσης είναι αυτής της μορφής (Rand and Petrocelli, 1985). Στα σχήματα 10.4 και 10.5 παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες αναχαίτισης (%) – συγκέντρωση της ουσίας M1 για τους δύο μικροοργανισμούς.

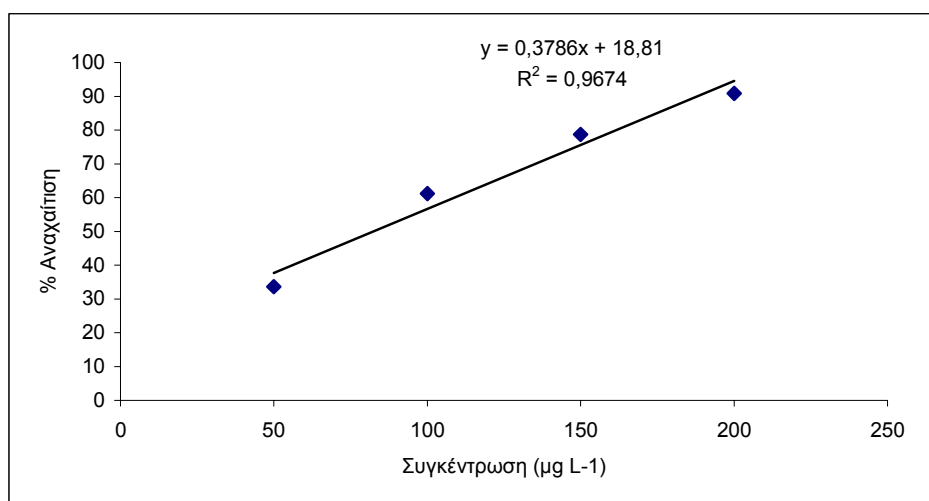


Σχήμα 10.4 Αναχαίτιση (%) του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* εξαιτίας της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1.

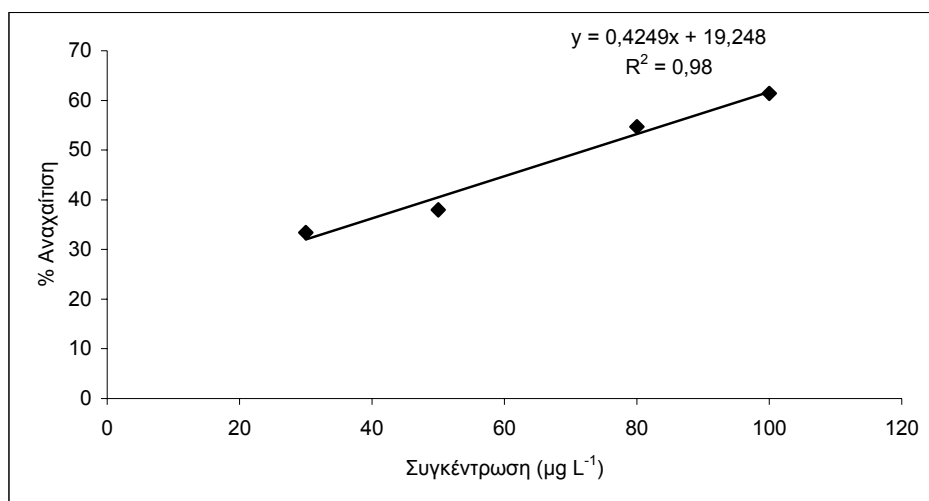


Σχήμα 10.5 Αναχαίτιση (%) του ρυθμού ανάπτυξης της *Naviculla forcipata* εξαιτίας της επίδρασης διαφορετικών συγκεντρώσεων του M1.

Από την καμπύλη αναχαίτισης (%) – συγκέντρωσης της κάθε ουσίας, για κάθε μικροοργανισμό, δημιουργήθηκε μια δεύτερη καμπύλη η οποία περιλάμβαναι μόνο τις συγκεντρώσεις εκείνες οι οποίες προκάλεσαν αναχαίτιση (%) του ρυθμού ανάπτυξης της *Dunaliella tertiolecta* και της *Navicula forcipata* σε ποσοστό που κυμάνθηκε από 16 έως 84 %. Με τον τρόπο αυτό από τη σιγμοειδή καμπύλη απομονώθηκε το ευθύγραμμο τμήμα της (Rand and Petroceli, 1985). Η τιμή της EC₅₀ της κάθε ουσίας πάνω στους δύο μικροοργανισμούς προσδιορίστηκε από την εξίσωση της γραμμικής παλινδρόμησης του ευθύγραμμου αυτού τμήματος της καμπύλης αναχαίτισης (%) – συγκέντρωσης. Στα Σχήματα 10.6 και 10.7 παρουσιάζονται οι καμπύλες αναχαίτισης (%) - συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των τιμών της EC₅₀ του M1 πάνω στη *Dunaliella tertiolecta* και τη *Navicula forcipata*.



Σχήμα 10.6 Εκτίμηση της EC₅₀ για 96 h έκθεσης της *Dunaliella tertiolecta* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του M1.

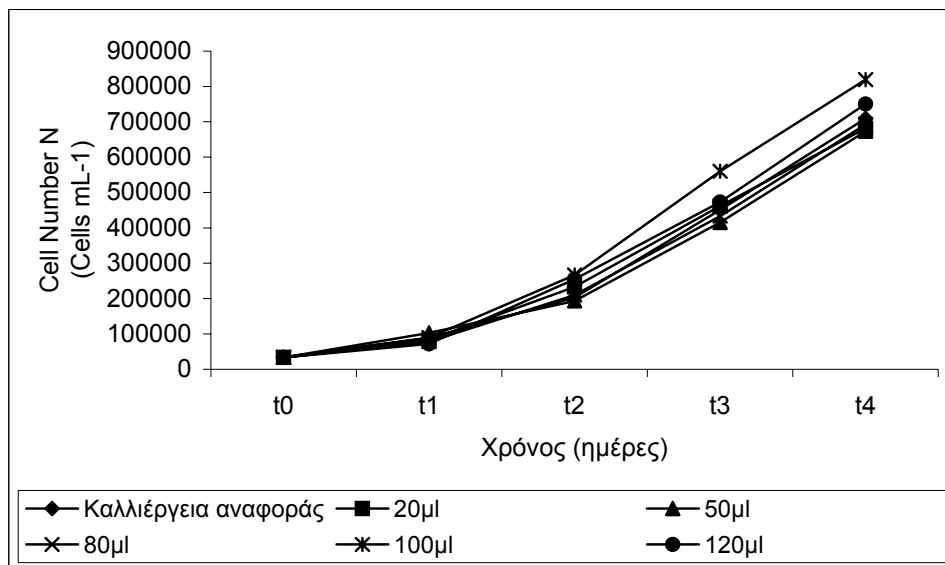


Σχήμα 10.7 Εκτίμηση της EC_{50} για 96 h έκθεσης της *Navicula forcipata* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του M1.

10.6 Αποτελέσματα και συζήτηση

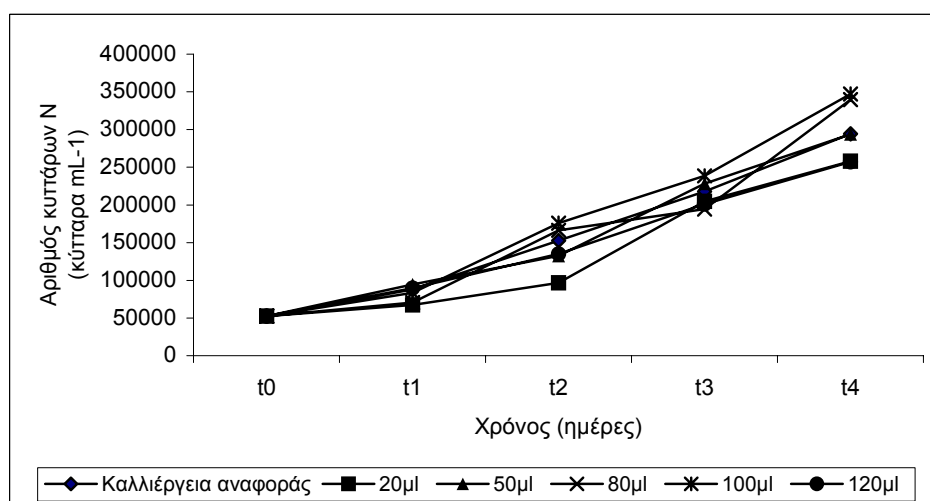
10.6.1 Επίδραση της ακετόνης στην ανάπτυξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών

Η ανάπτυξη των δύο μικροοργανισμών δεν επηρεάστηκε από την επίδραση της ακετόνης για τα επίπεδα του οργανικού διαλύτη που εξετάστηκαν (Σχήματα 10.8 - 10.9). Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, αλλά αναγκαίο να επιβεβαιωθεί, αφού οι συγκεντρώσεις της ακετόνης που εξετάστηκαν (μέγιστη συγκέντρωση 1200 mg L^{-1}) είναι κατά πολύ μικρότερες από αυτές που, όπως αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία, αναχαιτίζουν την ανάπτυξη φυτοπλαγκτονικών οργανισμών. Συγκεκριμένα οι Okamura et al., (2001) αναφέρουν ότι η ακετόνη δεν επηρεάζει την ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta* σε συγκέντρωση πάνω από 10.000 mg L^{-1} .



Σχήμα 10.8 Επίδραση των διαφορετικών όγκων της ακετόνης στην ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*.

Από αυτή τη σειρά πειραμάτων όγκος ίσος με 50 μL επιλέχθηκε ως ο μέγιστος επιτρεπτός όγκος της ακετόνης για την εισαγωγή των εξεταζόμενων ουσιών στις καλλιέργειες των μικροοργανισμών. Η ποσότητα αυτή του οργανικού διαλύτη συμμορφώνεται με το πρωτόκολλο της ASTM σύμφωνα με το οποίο κατά τη διεξαγωγή πειραμάτων τοξικότητας η παρουσία οργανικού διαλύτη δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα $0,5 \text{ ml L}^{-1}$ (ASTM, 1993).



Σχήμα 10.9 Επίδραση των διαφορετικών όγκων της ακετόνης στην ανάπτυξη της *Navicula forcipata*.

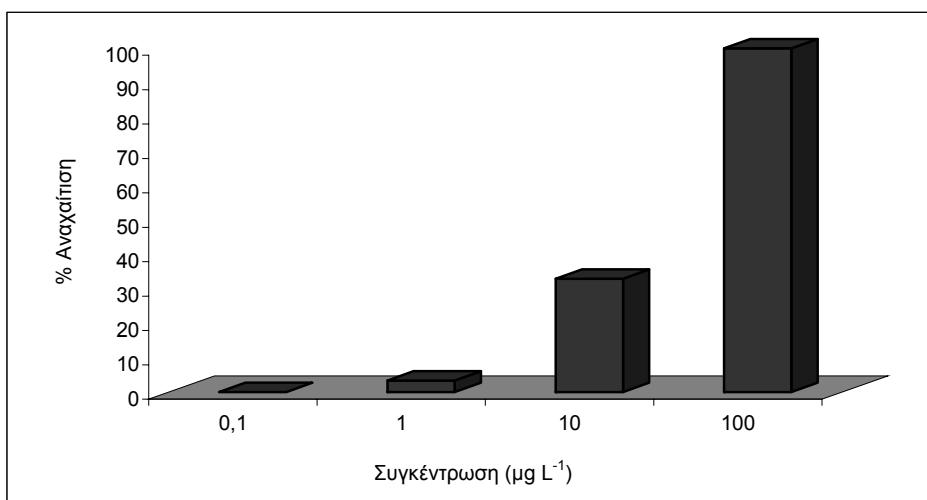
10.6.2 Προσδιορισμός εύρους αποτελεσματικών συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών

Όπως φάνηκε από τα πειράματα για τον προσδιορισμό του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών, το irgarol 1051 ήταν η ουσία για την οποία το εύρος των συγκεντρώσεων ήταν μικρότερο και συγκεκριμένα από 0,01 ως 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, ακολούθησαν ο M1 και το diuron με εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ 0,1 και 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ και τέλος η DCA για την οποία απαιτήθηκαν πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις για την αναστολή του ρυθμού ανάπτυξης των δύο μικροοργανισμών (Πίνακας 10.4). Από τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων επιλέχθηκε το εύρος των συγκεντρώσεων της κάθε ουσίας, στις οποίες εν συνεχεία εκτέθηκαν οι δύο μικροοργανισμοί ώστε να εκτιμηθεί η τοξικότητα εκφρασμένη ως EC_{50} των τεσσάρων ουσιών. Γεγονός είναι πάντως ότι με τον προσδιορισμό του εύρους των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων ήταν δυνατή μια πρώτη εκτίμηση της αναμενόμενης τοξικότητας των υπό εξέταση ουσιών πάνω στη *Dunaliella tertiolecta* και τη *Navicula forcipata*. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων το irgarol 1051 αναμένεται να είναι η πιο τοξική ουσία για τους δύο εξεταζόμενους οργανισμούς, ο M1 και το diuron αναμένεται να εμφανίσουν παρόμοια τοξικότητα, ενώ η DCA προβλέπεται να είναι η λιγότερο τοξική ουσία.

Πίνακας 10.4 Εύρος των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων ουσιών στα δύο είδη μικροοργανισμών.

Ουσία	Μικροοργανισμός	
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Navicula forcipata</i>
	Συγκέντρωση ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
Irgarol 1051	0,01-10	0,01-10
M1	0,1-1000	0,1-1000
Diuron	0,1-100	0,1-100
DCA	1000-10000	1000-10000

Στο Σχήμα 10.10 παρουσιάζεται ενδεικτικά η επίδραση των διαφορετικών επιπέδων των συγκεντρώσεων του diuron πάνω στην ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*. Η συγκέντρωση 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ δεν επηρέασε καθόλου τον μικροοργανισμό, ενώ η συγκέντρωση 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ αναχαίτησε πλήρως το ρυθμό ανάπτυξης (100 % αναχαίτιση).



Σχήμα 10.10 Εύρος των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων (µg L⁻¹) του diuron στην ανάπτυξη της *Dunaliella tertiolecta*.

10.6.3 Εκτίμηση της οξείας τοξικότητας των εξεταζόμενων ουσιών

Όπως προέκυψε από τις δοκιμές τοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν, η σειρά μειούμενης τοξικότητας των τεσσάρων ουσιών και για τους δύο μικροοργανισμούς ήταν: irgarol 1051 > diuron > M1 > DCA. Οι τιμές της EC₅₀ κυμάνθηκαν μεταξύ 1,1 και 6381 µg L⁻¹ και 0,6 και 6269 µg L⁻¹ για τη *Dunaliella tertiolecta* και τη *Navicula forcipata* αντίστοιχα. Οι αρχικές ουσίες διαπιστώθηκε ότι είναι περισσότερο τοξικές σε σχέση με τους μεταβολίτες τους και για τους δύο μικροοργανισμούς. Στον Πίνακα 10.5 παρουσιάζονται οι τοξικότητες των ουσιών που εξετάστηκαν εκφρασμένες ως μέση τιμή EC₅₀ των δύο επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 10.5 Οξεία τοξικότητα των εξεταζόμενων ουσιών στα δύο είδη μικροοργανισμών εκφρασμένη ως μέση τιμή EC₅₀ (μg L⁻¹) των δύο επαναλήψεων. Στις παρενθέσεις αναφέρονται οι τιμές της EC₅₀ που προσδιορίστηκαν για τις δύο επαναλήψεις.

Ουσία	Μικροοργανισμός	
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Navicula forcipata</i>
	EC ₅₀ (μg L ⁻¹)	
Irgarol 1051	1,1 (1,4 και 0,9)	0,6 (0,5 και 0,7)
M1	83 (82 και 83)	73 (72 και 73)
Diuron	5,9 (4,9 και 6,9)	27 (25 και 28)
DCA	6381 (6348 και 6414)	6269 (6302 και 6236)

Το irgarol 1051, ως η πιο τοξική ουσία από τις εξεταζόμενες, επηρέασε περισσότερο την ανάπτυξη της *Navicula forcipata*. Η τιμή της EC₅₀ για αυτόν τον μικροοργανισμό βρέθηκε ότι ήταν 0,6 μg L⁻¹ και είναι σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα της έρευνας των Berard et al. (2003) στην οποία η τιμή της EC₅₀ για τη *Navicula accomoda* (διάτομο του γλυκού νερού) ήταν 0,5 μg L⁻¹ ενώ και οι Nyström et al. (2002) αναφέρουν παρόμοιες τιμές EC₅₀ του irgarol 1051 (0,441–0,647 μg L⁻¹) για διάφορους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς. Η τιμή της EC₅₀ που προσδιορίστηκε για το πράσινο φύκος *Dunaliella tertiolecta* (1,1 μg L⁻¹) είναι σε συμφωνία με τις τιμές της EC₅₀ που αναφέρονται από την παρασκευάστρια εταιρεία του irgarol 1051. Σύμφωνα με τη Ciba-Geigy (1999) η EC₅₀ της ουσίας για τα μικροφύκη γενικότερα αναμένεται να είναι γύρω στο 1 μg L⁻¹.

Όπως αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία το irgarol 1051 πιθανόν οφείλει την υψηλή του τοξικότητα στην ύπαρξη της μεθυλθείο-ομάδας στο μόριό του (Dahl and Blanck, 1994). Σύμφωνα με τους Dahl and Blanck (1994) συγκριτικά με άλλες ουσίες της χημικής κατηγορίας των τριαζινών, όπως είναι η atrazine, το irgarol 1051 είναι 70 φορές πιο τοξική ουσία, ενώ και οι Berard et al. (2003), για τα είδη διατόμων που εξέτασαν, αναφέρουν ότι, ενώ οι μικροοργανισμοί είναι πολύ ευαίσθητοι στην παρουσία του irgarol 1051, είναι αρκετά ανθεκτικοί στην atrazine.

Ο Μ1 διαπιστώθηκε ότι ήταν λιγότερο τοξικός σε σχέση με την αρχική ουσία με τιμές EC_{50} 83 και 73 $\mu\text{g L}^{-1}$ για τη *Dunaliella tertiolecta* και τη *Navicula forcipata*, αντίστοιχα. Η *Navicula forcipata* επίσης αποδείχθηκε περισσότερο ευαίσθητος οργανισμός στην παρουσία της ουσίας σε σχέση με τη *Dunaliella tertiolecta*. Η τιμές της EC_{50} που προσδιορίστηκαν στην παρούσα έρευνα είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για άλλους μικροοργανισμούς, αλλά ως απόλυτες τιμές είναι υψηλότερες. Από τον Hoberg (1998) αναφέρεται ότι ο Μ1 ανέστειλλε την ανάπτυξη του διατόμου του γλυκού νερού *Skeletonema costatum* κατά 50 % σε συγκέντρωση 17,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, ενώ οι Fernandez-Alba et al. (2002) διαπίστωσαν ότι μετά από 72 h έκθεσης σε συγκέντρωση 18 $\mu\text{g L}^{-1}$ του Μ1, η ανάπτυξη του πράσινου φύκου του γλυκού νερού *Selenastrum capricornutum* αναχαιτίστηκε σε ποσοστό 50%. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα τοξικολογικά δεδομένα στη διεθνή βιβλιογραφία ειδικά για τον Μ1 είναι πολύ περιορισμένα.

Χαμηλότερη τοξικότητα του Μ1 σε σχέση με το irgarol 1051 αναφέρεται επίσης στην έρευνα των Okamura et al. (2000) για το πράσινο φύκος του γλυκού νερού *C. ehrenbergii* Meneghini. Σε αντίστοιχα συμπεράσματα κατέληξε και ο Hoberg (1998) ο οποίος πραγματοποίησε πειράματα τοξικότητας πάνω στο θαλάσσιο διάτομο *Skeletonema costatum*. Μετά από 5 ημέρες έκθεσης ο Μ1 αποδείχθηκε περίπου 40 φορές λιγότερο τοξικός από την αρχική ουσία. Αντίθετα οι Fernandez-Alba et al. (2002) αναφέρουν ότι οι τοξικότητες των δύο ουσιών πάνω στο διάτομο *Selenastrum capricornutum* είναι παρόμοιες. Η μειωμένη τοξικότητα των μεταβολιτών σε σχέση με τις αρχικές ουσίες αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία και για άλλες τριαζίνες (Kotrikla et al., 1997; 1999). Η συμπεριφορά αυτή του Μ1 είναι μεγάλης περιβαλλοντικής σημασίας καθώς είναι περισσότερο ανθεκτική ουσία στο υδατικό περιβάλλον από ότι το irgarol 1051 (Okamura et al., 2000).

Το diuron, όπως προέκυψε από τις δοκιμές τοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν, είναι περίπου 4,5 φορές πιο τοξικό για τη *Dunaliella tertiolecta* από ότι για τη *Navicula forcipata* με τιμές EC_{50} 5,9 και 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ για τους δύο μικροοργανισμούς αντίστοιχα. Η τιμή της EC_{50} που προσδιορίστηκε για τη *Navicula forcipata* είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με τα αποτελέσματα της έρευνας των Fernandez-Alba et al. (2002) σύμφωνα με τα οποία η ανάπτυξη του διατόμου *Selenastrum capricornutum* αναχαιτίστηκε κατά 50 % σε συγκέντρωση 45 $\mu\text{g L}^{-1}$ μετά όμως από 72 h έκθεσης. Σε σχέση με το irgarol 1051 το diuron ήταν περίπου 5 και 45 φορές λιγότερο τοξικό για τη *Dunaliella tertiolecta* και για τη *Navicula forcipata*, αντίστοιχα. Χαμηλότερη

τοξικότητα του diuron συγκριτικά με το irgarol 1051 αναφέρεται και από τους Dahl and Blanck (1996). Η τοξικότητα του diuron πάνω σε φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί ελάχιστα με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη διεθνή βιβλιογραφία. Αν και πρόκειται για ουσία γνωστή εδώ και αρκετές δεκαετίες, εξαιτίας της εκτεταμένης χρήσης της στη γεωργία, οι μελέτες τοξικότητας που έχουν μέχρι σήμερα διεξαχθεί αφορούν ως επί το πλείστον τη μελέτη της τοξικότητας της ουσίας σε χερσαίους οργανισμούς και λίγους ανώτερους οργανισμούς του γλυκού νερού (Giacomazzi et al., 2004).

Η DCA για τους δύο μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν αποδείχθηκε ότι ήταν η λιγότερο τοξική ουσία σε σχέση με την αρχική, αν και γενικότερα στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι όλοι οι μεταβολίτες του diuron είναι περισσότερο τοξικοί από το ίδιο (Giacomazzi et al., 2004). Οι Fernandez-Alba et al. (2002) για παράδειγμα αναφέρουν ότι η DCPMU είναι 215 φορές πιο τοξική από την αρχική ουσία για το οστρακόδερμο *Daphnia magna*. Στην παρούσα έρευνα διαπιστώθηκε ότι η DCA ήταν περίπου 1081 και 232 φορές λιγότερο τοξική σε σχέση με το diuron, για τη *Dunaliella tertiolecta* και για τη *Navicula forcipata*. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι συγκεντρώσεις της ουσίας μεταξύ 700 και 4400 $\mu\text{g L}^{-1}$ δεν επιφέρουν καμία επίπτωση (NOEC) πάνω σε είδη μικροφυκών (Girling et al., 2000). Επομένως η υψηλή τιμή της EC_{50} της DCA συγκριτικά με τις υπόλοιπες ουσίες που εξετάστηκαν επιβεβαιώσε το γεγονός αυτό.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η DCA φωτοδιασπάται (Othmen and Boule, 1999). Πιθανόν λοιπόν κάτω από τις συνθήκες του πειράματος εξαιτίας του συνεχούς φωτισμού που απαιτείται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών η ουσία να διασπάστηκε και τα προϊόντα μεταβολισμού της τελικά να ευθύνονται για τη χαμηλή τοξικότητα που εμφάνισε. Γενικά αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι οι διχλωροανιλίνες υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας μετατρέπονται αρχικά σε φαινολικές ενώσεις και στη συνέχεια σε αμινοφαινοξυαζόνες για τις οποίες όμως δεν υπάρχουν τοξικολογικά δεδομένα (Othmen and Boule, 1999), επομένως απαιτείται περαιτέρω έρευνα της τοξικότητας της ουσίας ώστε να διερευνηθεί τι ακριβώς συμβαίνει. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η DCA αποτελεί προϊόν μεταβολισμού και άλλων φυτοφαρμάκων πέραν του diuron, όπως είναι το linuron και το propanil (Wolf and Crossland, 1985) ή ουσιών που χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά ως αντιβακτηριδιακοί παράγοντες όπως συμβαίνει με το triclocarbam (Rasmussen et al., 1996), αυτό

σημαίνει ότι μπορεί να εισέλθει στο υδατικό περιβάλλον από διαφορετικές πηγές οπότε η μειωμένη τοξικότητά της είναι μεγάλης περιβαλλοντικής σημασίας.

Σε σχέση με άλλες οργανικές ενισχυτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στα υφαλοχρώματα, το irgarol 1051 και το diuron σε έρευνα των Fernandez-Alba et al. (2002) για το διάτομο *Selenastrum capricornotum*, διαπιστώθηκε ότι ήταν λιγότερο τοξικά από το Kathon 5287, αλλά και από το TBT, ενώ εμφάνισαν μεγαλύτερη τοξικότητα από το dichlofluanid και το TCMTB. Λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι τόσο οι αρχικές ουσίες όσο και οι μεταβολίτες τους είναι αρκετά σταθερές ουσίες στο περιβάλλον συγκριτικά με άλλα βιοκτόνα, καθίσταται σαφές ότι δεν πρόκειται για «περιβαλλοντικά φιλικές» οργανικές ενισχυτικές ενώσεις (Omae, 2003b).

Μέχρι σήμερα έχουν κατά καιρούς προσδιοριστεί στο περιβάλλον συγκεντρώσεις του irgarol 1051 οι οποίες είναι αντίστοιχες ή και υψηλότερες από τις τιμές των EC_{50} που προσδιορίστηκαν για τους δύο μικροοργανισμούς στην παρούσα έρευνα (Readman et al., 1993; Zhou et al., 1996; Voulvoulis et al., 2000; Thomas et al., 2001; Hernando et al., 2001; Bowman et al., 2003). Το diuron μέχρι σήμερα ανιχνεύτηκε μόνο μια φορά σε συγκέντρωση υψηλότερη ($6,7 \mu\text{g L}^{-1}$) από την EC_{50} που προσδιορίστηκε για τη *Dunaliella tertiolecta* (Thomas et al., 2001b). Για τις υπόλοιπες δύο ουσίες (M1 και DCA) οι συγκεντρώσεις που έχουν ανιχνευτεί έως τώρα είναι κατά πολύ χαμηλότερες από την οξεία τοξικότητα των ουσιών πάνω στους δύο μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν.

Όσον αφορά τα επίπεδα των εξεταζόμενων ουσιών που προσδιορίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής στο θαλάσσιο περιβάλλον του Ηνωμένου Βασιλείου, αυτά είναι αρκετά χαμηλότερα από τις αντίστοιχες τιμές των EC_{50} που προσδιορίστηκαν. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η παρακολούθηση των συγκεντρώσεων του irgarol 1051, του diuron και των μεταβολιτών τους πραγματοποιήθηκε σε μια χώρα όπου εδώ και τρία χρόνια ισχύουν νομοθετικοί περιορισμοί αναφορικά με τη χρήση τους στα υφαλοχρώματα. Σε άλλες χώρες, συμπεριλαμβανομένου και της Ελλάδας, η χρήση αυτών των ουσιών είναι ελεύθερη και μάλιστα με ελλιπή στοιχεία για τα επίπεδα των συγκεντρώσεών τους στο περιβάλλον. Επομένως δεν είναι δυνατή η εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου των ουσιών αυτών εξαιτίας της ανεξέλεγκτης χρήσης τους στα υφαλοχρώματα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα ελάχιστα στοιχεία που αφορούν στη συνδυασμένη τοξική δράση τόσο μεταξύ αρχικών ουσιών και μεταβολιτών τους

όσο και μεταξύ άλλων ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών καταδεικνύει τα κενά της διεθνούς βιβλιογραφίας και την ανάγκη για εκτενή έρευνα προς την κατεύθυνση αυτή.

10.7 Συμπεράσματα

Η εκτίμηση της τοξικότητας των ουσιών irgarol 1051, diuron, M1 και DCA πάνω στους δύο θαλάσσιους μικροοργανισμούς *Dunaliella teriolecta* και *Navicula forcipata* έδειξε ότι η σειρά μειούμενης τοξικότητας των τεσσέρων ουσιών και για τους δύο μικροοργανισμούς ήταν: irgarol 1051 > diuron > M1 > DCA. Οι αρχικές ουσίες διαπιστώθηκε ότι είναι πολύ πιο τοξικές από τους μεταβολίτες τους. Από τους δύο μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν το διάτομο εμφανίστηκε πολύ πιο ευαίσθητο στην παρουσία των ουσιών εκτός από την περίπτωση της DCA για την οποία οι τιμές της EC₅₀ που προσδιορίστηκαν ήταν παρόμοιες και για τους δύο μικροοργανισμούς.

Κατά καιρούς έχουν ανιχνευτεί στο θαλάσσιο περιβάλλον σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες συγκεντρώσεις αντίστοιχες με τις τιμές των EC₅₀ που προσδιορίστηκαν για τις αρχικές ουσίες. Γεγονός είναι πάντως ότι στη διεθνή βιβλιογραφία τα τοξικολογικά δεδομένα που αφορούν στις επιπτώσεις των συγκεκριμένων ουσιών πάνω στους θαλάσσιους οργανισμούς είναι πολύ περιορισμένα. Περισσότερη έρευνα χρειάζεται ώστε να κατανοηθούν οι επιδράσεις των ουσιών τόσο παρουσία των μεταβολιτών τους όσο και παρουσία άλλων ενισχυτικών βιοκτόνων ουσιών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη διατριβή αναφέρονται επιγραμματικά παρακάτω.

1. Η ταυτόχρονη απομόνωση των ουσιών irgarol 1051, diuron και των κύριων μεταβολιτών τους από δείγματα θαλασσινού νερού με την τεχνική της μη αυτοματοποιημένης εκχύλισης στερεής φάσης σε φύσιγγες C18 και διαλύτη έκλουσης ουδέτερη μεθανόλη, αποδείχθηκε ικανοποιητική για όλες τις ουσίες (ανάκτηση > 82 %) εκτός από τη DCA (39,5 %) για την οποία υψηλότερες ανακτήσεις παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν πολυμερή προσροφητικά υλικά. Ο βέλτιστος διαχωρισμός των έξι ουσιών με υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοση με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (LC-DAD) επιτεύχθηκε σε χρόνο 25 min όταν η θερμοκρασία της στήλης ρυθμίστηκε στους 30 °C, η ροή της κινητής φάσης στα 1,7 mL min⁻¹ και η αρχική κινητή φάση σε 20 % ακετονιτρίλιο – 80 % νερό. Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας της χρωματογραφικής μεθόδου ανάλυσης απέδειξε ότι μικρές μεταβολές των τριών λειτουργικών παραγόντων της όπως θερμοκρασία στήλης, ροή κινητής φάσης και αρχική ισχύς του ακετονιτριλίου, μπορούν να επιδράσουν σημαντικά πάνω στο χρόνο συγκράτησης, το διαχωρισμό και το εμβαδόν κορυφής των ουσιών που εξετάστηκαν. Τα πειράματα επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου απέδειξαν ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή είναι επαναλήψιμη και αναπαραγωγίμη με σχετικές τυπικές αποκλίσεις < 14 % για όλες τις ουσίες. Τα όρια ανίχνευσης των έξι ουσιών που επιτεύχθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 0,005 (DCPMU) και 0,026 (M1) μg L⁻¹.
2. Η ταυτόχρονη απομόνωση των ουσιών irgarol 1051, diuron και των κύριων μεταβολιτών τους από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με χρήση υπερήχων αποδείχθηκε ότι είναι βέλτιστη όταν 2 g ξηρού ιζήματος εκχυλίζονται εις διπλούν με 20 mL μεθανόλης για 30 min στους 50 °C για όλες τις ουσίες εκτός από τη DCA. Ο καθαρισμός των εκχυλισμάτων με χρήση φυσίγγων C18 ήταν ικανοποιητικός. Οι ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν κυμάνθηκαν από 86 έως 106 % για τις πέντε από τις έξι ουσίες, ενώ για τη DCA οι ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν κυμάνθηκαν μεταξύ 35 και 50 %. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν αναπαραγωγίμη και επαναλήψιμη με σχετικές τυπικές αποκλίσεις < 10 % για όλες τις ουσίες εκτός από τη DCA (< 15 %). Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που αναπτύχθηκε κυμάνθηκαν μεταξύ 1,7 (DCPU) και 4,0 (DCPMU) ng g⁻¹ ξηρού βάρους ιζήματος.

3. Η απομόνωση των ουσιών irgarol 1051 και M1 από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος με χρήση μικροκυμάτων και προσδιορισμό με αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (GC-MS) αποδείχθηκε βέλτιστη όταν 3 g ιζήματος εκχυλίστηκαν με 30 mL διαλύτη για 10 min στους 115 °C. Το νερό αποδείχθηκε πολύ ικανός διαλύτης εκχύλισης των ουσιών. Η χρήση εσωτερικού προτύπου για τον προσδιορισμό των ουσιών είναι αναγκαία καθώς παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα. Επιτεύχθηκαν ανακτήσεις μεγαλύτερες από 85 % και για τις δύο ουσίες, ενώ τα όρια ανίχνευσης που προσδιορίστηκαν ήταν 0,9 και 1,7 ng g⁻¹ (ξηρού βάρους ιζήματος) για το M1 και το irgarol 1051, αντίστοιχα. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν επαναλήψιμη και αναπαραγώγιμη με σχετικές τυπικές αποκλίσεις < 10 % και για τις δύο ουσίες.
4. Η μελέτη των επιπέδων της ρύπανσης από τις έξι ουσίες για χρονικό διάστημα ενός έτους σε δύο θαλάσσιες περιοχές του Ηνωμένου Βασιλείου (Shoreham Harbour και Brighton marina) έδειξε παρουσία των ουσιών παρ' όλες τις νομικές απαγορεύσεις που αφορούν στη χρήση του irgarol 1051 και του diuron στα υφαλοχρώματα στη συγκεκριμένη χώρα. Το irgarol 1051 και ο κύριος μεταβολίτης του M1 ήταν οι ουσίες που ανιχνεύτηκαν στα περισσότερα δείγματα σε συγκεντρώσεις που έφτασαν στο νερό τα 136 και 59 ng L⁻¹ και στο ίζημα τα 49 και 23 ng g⁻¹ (ξηρό βάρος), αντίστοιχα. Το diuron ανιχνεύτηκε κυρίως στο νερό (σε ποσοστό 25,4 % των συνολικών δειγμάτων που αναλύθηκαν) σε συγκεντρώσεις έως και 366 ng L⁻¹. Στο ίζημα η ουσία προσδιορίστηκε μόνο σε δύο από τα 75 δείγματα σε συγκέντρωση < 67 ng g⁻¹ (ξηρό βάρος). Η ουσία DCPMU ανιχνεύτηκε μόνο στο ίζημα σε συγκεντρώσεις έως 122 ng g⁻¹ (ξηρό βάρος). Οι υπόλοιποι δύο μεταβολίτες του diuron (DCPU και DCA) δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα από τα δείγματα, ούτε στο νερό ούτε στο ίζημα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν και στις δύο περιοχές την περίοδο που η δραστηριότητα των σκαφών αναψυχής είναι έντονη (Μάιος – Ιούλιος) καθώς και κατά την περίοδο προετοιμασίας των σκαφών (Ιανουάριος – Φεβρουάριος). Οι υψηλές συγκεντρώσεις των ουσιών παρατηρήθηκαν στα σημεία εκείνα τα οποία εμφανίζουν μεγάλη πυκνότητα σκαφών αναψυχής. Η μη παραμετρική συσχέτιση κατά Spearman έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων του M1 και του pH του νερού αλλά όχι του pH του ιζήματος στη Brighton marina. Το αντίθετο ακριβώς φαινόμενο παρατηρήθηκε στο Shoreham Harbour. Αναφορικά με το irgarol 1051 παρατηρήθηκε συσχέτιση των συγκεντρώσεων της ουσίας μόνο με το pH των δειγμάτων ιζήματος από το Shoreham Harbour. Στο Shoreham harbour επίσης παρατηρήθηκε ότι υπάρχει

συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων και των δύο ουσιών και της % περιεκτικότητας των δειγμάτων σε οργανικό άνθρακα.

5. Η μελέτη της τοξικότητας των ουσιών irgarol 1051, diuron, M1 και DCA σε δύο θαλάσσιους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς, τη *Dunaliella tertiolecta* και τη *Navicula forcipata*, έδειξε ότι το irgarol 1051 είναι η περισσότερο τοξική ουσία από τις εξεταζόμενες. Σε σχέση με τους μεταβολίτες τους και οι δύο ουσίες αποδείχθηκαν περισσότερο τοξικές και για τους δύο μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν. Η σειρά μειούμενης τοξικότητας των ουσιών βρέθηκε ότι ήταν irgarol 1051 > diuron > M1 > DCA. Η *Navicula forcipata* αποδείχθηκε ότι είναι περισσότερο ευαίσθητη στην παρουσία όλων των ουσιών εκτός από το diuron, το οποίο επηρέασε περισσότερο τη *Dunaliella tertiolecta*. Οι τιμές της EC_{50} που προσδιορίστηκαν για τους δύο μικροοργανισμούς κυμάνθηκαν από 1,1 έως 6381 $\mu\text{g L}^{-1}$ για τη *Dunaliella tertiolecta* και από 0,6 έως 6269 $\mu\text{g L}^{-1}$ για τη *Navicula forcipata*.

Βασιζόμενοι στα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή και τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, ορισμένες προτάσεις για μελλοντική έρευνα αναφέρονται παρακάτω.

Οι μέθοδοι απομόνωσης και προσδιορισμού των ουσιών που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή θα μπορούσαν να βελτιστοποιηθούν ώστε εφαρμοστούν για την παρακολούθηση των συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών και σε άλλα υποστρώματα, όπως ψάρια.

Λόγω της έλλειψης στοιχείων στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με τα επίπεδα των συγκεντρώσεων αυτών των ουσιών στους υδρόβιους οργανισμούς, θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθούν μελέτες σχετικά με τον προσδιορισμό τους πέρα από το νερό και το ίζημα και στους οργανισμούς.

Εξαιτίας των περιορισμένων τοξικολογικών δεδομένων που αφορούν στις επιπτώσεις των ουσιών που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή πάνω σε θαλάσσιους οργανισμούς, θα ήταν χρήσιμο να πραγματοποιηθούν έρευνες που να αφορούν στη συνδυασμένη δράση των ουσιών αυτών τόσο με τους μεταβολίτες με τους οποίους συνυπάρχουν στο περιβάλλον, όσο και με διάφορα μέταλλα όπως είναι ο χαλκός με τον οποίο επίσης συνυπάρχουν πάντα αφού το οξείδιο του χαλκού αποτελεί τη βάση των υφαλοχρωμάτων στα οποία χρησιμοποιούνται οι ουσίες αυτές.

Επιπλέον η τοξικότητα των ουσιών θα ήταν χρήσιμο να μελετηθεί όταν οι ουσίες αυτές είναι προσδεμένες στο ίζημα αφού ανιχνεύονται συχνά σε αυτό αλλά δεν υπάρχουν

στοιχεία που να αφορούν στις επιπτώσεις τους στους διάφορους οργανισμούς όταν είναι προσροφημένα στη στερεή φάση.

Επίσης ο προσδιορισμός τυχόν προϊόντων βιοαποδόμησης από τους εκάστοτε εξεταζόμενους οργανισμούς των ουσιών κατά τη διεξαγωγή δοκιμών τοξικότητας, θα βοηθούσε στην καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς αυτών των ουσιών και στην ακριβέστερη εκτίμηση του περιβαλλοντικού κινδύνου που εγκυμονεί η χρήση τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ACE (MAS3-CT98-0178) project (2002) *Assessment of antifouling agents in coastal environments*. Final scientific and technical report.
- Adams W.J. and Rowland C.D. (2003) Aquatic toxicology test methods. In Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A., Cairns J. (eds) *Handbook of Ecotoxicology* pp. 19-43, Lewis Publishers.
- Agüera A., Piedra L., Hernando M.D. and Fernandez-Alba A.R. (2000) Multiresidue method for the analysis of five antifouling agents in marine and coastal waters by gas-chromatography-mass spectrometry with large-volume injection. *J. Chromatogr. A* **889**, 261–269.
- Aguilar C., Borrull R. M., Marce R. M. (1996) On-line and Off-Line Solid Phase Extraction with Styrene-Divinylbenzene Extraction Discs for Determining Pesticides in Water by Reversed-Phase Liquid Chromatography-Diode-Array Detection, *J. Chromatogr. A*, **754**, 77-84.
- Aguilar C., Ferrer I., Borrull F., Marce R. M., Barcelo D. (1999) Monitoring of Pesticides in River Water Based on Samples Previously Stored in Polymeric Cartridges Followed by On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Diode Array Detection and Confirmation by Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **386**, 237-248.
- Albanis T.A., Danis T.G. and Kourgia M.K. (1994) Transportation of pesticides in Estuaries of the Axios, Loudias and Aliakmon rivers (Thermaikos Gulf), Greece. *Sci. Total Environ.* **156**, 11–22.
- Albanis T.A., Lambropoulou D.A., Sakkas V.A. and Konstantinou I.K. (2002) Antifouling paint booster biocide contamination in Greek marine sediments. *Chemosphere* **48**, 475–485
- Alzieu C. (1991) Environmental Problems Caused by TBT in France: Assessment, Regulations, Prospects. *Mar. Environ. Res.* **32**, 7-17.
- Arjmand M. and Sandermann H. (1985) Mineralization of chloroaniline/lignine conjugates and of free chloroanilines by white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 1055–1060.

- ASTM (1989) Standard practice for determination of Hydrolysis rate constants of organic chemicals in aqueous solutions. Designation: E 895-83, 485-488.
- ASTM (1993) *ASTM standards on aquatic toxicology and hazard evaluation*. ASTM Philadelphia.
- Ballesteros B., Barcelo D., Camps F. and Marco M.P. (1997) Preparation of Antisera and Development of a Direct Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1051, *Anal. Chim. Acta*, **347**, 139-147.
- Ballesteros B., Barcelo D., Sanchez-Baeza F., Camps F. and Marco M.P. (1998) Influence of the Hapten Design on the Development of a Competitive ELISA for the Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1051 at Trace Levels. *Anal Chem.* **70**, 4004-4014.
- Bard J. and Pedersen A. (1992) Ecotoxicological evaluation of the antifouling compound 2-(*tert*-butylamino)-4-(cyclopropylamino)-6-(methylthio)-1,3,5-triazine, Irgarol, Swedish National Chemicals Inspectorate (KEMI), Solna, Sweden.
- Bard J., Pedersen A. and Tiberg E. (1994) *Scientific documentation and research*. Solna, Sweden: KEMI National Chemicals Inspectorate.
- Barnabas I.J., Dean J.R., Fowles A.I. and Owen S.P. (1995) Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soils using microwave energy, *Analyst* **120**, 1897-1904.
- Basheer C., Tan K.S. and Lee H.K. (2002) Organotin and Irgarol 1051 contamination in Singapore coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 697-703.
- Bérard A., Dorigo U., Mercier I., Becker-van Slooten K., Grandjean D. and C. Lebouranger (2003) Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere*, **53**, 935-944
- Birks J.W. (1989) *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detectors in Chromatography*. VCH, NY
- Biselli S., Bester K., Huhnerfuss H. and Fent K. (2000) Concentrations of the antifouling compound Irgarol 1051 and of organotins in water and sediments of German North and Baltic Sea marinas. *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 233-243.
- Biziuk M., Przyjazny A., Czerwinski J. and Wiergowski M. (1996) Review: Occurrence and Determination of Pesticides in Natural and Treated Waters. *J. Chromatogr. A* **754**, 103-123

- Bouaid A., Ramos L., Gonzalez M.J., Fernández P. and Cámara C. (2001) Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. *J. Chrom. A* **939**, 13-21.
- Bowman J.C., Readman J.W. and Zhou J.L. (2003) Seasonal variability in the concentrations of Irgarol 1051 in Brighton marina, UK; including the impact of dredging. *Mar. Pollut. Bull.* **46**, 444-451.
- Boxall A.B.A., Comber S.D., Conrad A.U., Howcroft J. and Zaman N. (2000) Inputs, monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK Estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 898-905.
- Bruzzoniti M.C., Sarzanini C. and Mentasti E. (2000) Review: Preconcentration of Contaminants in Water Analysis. *J. Chromatogr. A* **902**, 289-309.
- Bryan G. and Langston W.J. (1992) Bioavailability, Accumulation and Effects of Heavy Metals in Sediments with Special Reference to the United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.* **76**, 89-131.
- Burns L.A. and Baughman G.L. (1985) *Fate modeling*. In Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, pp. 558-584, Hemisphere Publishing Corporation.
- Callow M. (1986) A world-wide survey of slime formation on antifoulant paints. In: L.V. Evans and K.D. Hoagland, Eds, *Algal Biofilm*, Studies in Environmental Studies 28, Elsevier, New York, pp. 1-20.
- Callow M.E. and Willingham G.L. (1996) Degradation of antifouling biocides. *Biofouling* **10**, 239-249.
- Camel V. (2000) Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends in analytical chemistry* **19**, 229-248.
- Carrasco P.B., Escolà R., Jiménez J. and Marco M.-P. (2001) Development and application of immunoaffinity chromatography for the determination of the triazinic biocides in seawater. *J. Chromatogr. A* **909**, 61-72.
- Carrasco P.B., Díez S., Jiménez J., Marco M.-P. and Bayona J.M. (2003) Determination of Irgarol 1051 in Western Mediterranean sediments. Development and application of supercritical fluid extraction-immunoaffinity chromatography procedure. *Water Res.* **37**, 3658-3665.

- Carter W.H.Jr. and Gennings C. (1994) Analysis of chemical combinations: Relating isobolograms to response surfaces. In: Yang R. S. H. (ed) *Toxicity of chemical mixtures*. Academic Press, San Diego, pp.643-663.
- Chen H. and Horváth Cs. (1995) High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins, *J. Chromatogr. A* **705**, 3-20.
- Chee K. K., Wong M. K. and Lee H. K. (1996a) Microwave extraction of phthalate esters from marine sediment and soil. *Chromatographia* **42**, 378-384.
- Chee K. K., Wong M. K. and Lee H. K. (1996b) Determination of organochlorine pesticides in water by membranous solid-phase extraction, and in sediment by microwave-assisted solvent extraction with gas chromatography and electron-capture and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **736**, 211-218.
- Chiou T.C. and Kile E.D. (1998) Deviations from Sorption Linearity on Soils of Polar and Nonpolar Organic Compounds at Low Relative Concentrations, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 338-343.
- Chiron S., Alba A.F. and Barcelo D. (1993) Comparison of On-Line Solid-Phase Disk Extraction to Liquid - Liquid Extraction for Monitoring Selected Pesticides in Environmental Waters. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 2352-2359.
- Christian F.A. and Tate T.M. (1983) Toxicity of fluometron and diuron on the intermediate snail host (*Lymnea* spp.) of *Fasciola hepatica*. *Bull. Environ. Toxicol.* **30**, 628-631.
- Ciba Specialty Chemicals (1997) Material safety data sheet – Irgarol 1051. Ciba Additives, 540 White Plains Road, Tarrytown, NY.
- Ciba Specialty Chemicals (1999) Irgarol 1051: General information Part I. Tech. rpt. Ciba-Geigy.
- Ciba Specialty Chemicals (2002) GS26575 (M1): Material safety data sheet MSDS No 2734. 30/04/2002, Ciba Specialty Chemicals Corporation, 540 White Plains Road, Tarrytown, NY.
- Ciba-Geigy (1985) Irgarol 1051 in Antifouling Paints. Tech. rpt. Ciba-Geigy.
- Ciba-Geigy (1995) Irgarol 1051: Material safety data sheet 638/9501. Ciba-Geigy Limited, Additives Division, Basel, Switzerland.
- Clare A.S. (1998) Towards nontoxic antifouling. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 3-6.

- Comber S.D.W., Franklin G., Gardner M.J., Watts C.D., Boxall A.B.A. and Howcroft J. (2002) Partitioning of marine antifoulants in the marine environment. *Sci. Total Environ.* **286**, 61–71
- Communaute Europeenne (1989) Directive du Conseil. Journal Officiel des Communautés Europeennes, No. L398/19, pp. 19-23.
- Connelly D.P., Readman J.W., Knap A.H. and Davies J. (2001) Contamination of the coastal waters of Bermuda by organotin and the triazine herbicide Irgarol 1051. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 409–414.
- Cooksey K.E. and Cooksey B. (1986) Adhesion of fouling diatoms to surfaces: some biochemistry. In: L.V. Evans and K.D. Hoagland, Eds, *Algal Biofilm*, Studies in Environmental Studies 28, Elsevier, New York, pp. 41-53.
- Corbett J. R. (1974) *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, Academic Press, London.
- Cox, D.R. (1958) *Planning of experiments*. Willey & Sons, N. York.
- Cranwell P.A. and Haworth R.D. (1971) Humic acid—IV The reaction of α -amino acid esters with quinines, *Tetrahedron* **27**, 1831-1837.
- Crescenzi C., Di Corcia A., Madbouly M.D. and Samperi R. (1995) Pesticide Stability Studies upon Storage in a Graphitized Carbon Extraction Cartridge. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 2185-2190.
- Crescenzi C., Di Corcia A., Passariello G., Samperi R. and Turnes-Carou M.I. (1996) Evaluation of two New Examples of Graphitized Carbon Blacks for Use in Solid-Phase Extraction Cartridges, *J. Chromatogr. A* **733**, 41-55.
- Crespin M.A., Ballesteros E., Gallego M., Valcarcel M. (1997) Trace Enrichment of Phenols by On-Line Solid Phase Extraction and Gas Chromatographic Determination. *J. Chromatogr. A* **757**, 165-172.
- Crossland N.O (1988) Prediction and assessment of side-effects of pesticides in freshwater. *Asp. Appl. Biol.* **17**, 267-274.
- Cullington J.E. and Walker A., (1999) Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 677–686.
- Dahl B. and Blanck H. (1996) Toxic effects of the antifouling agent Irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Mar. Pollut. Bull.* **32**, 342–350.

- Dalton R.L. Evans A.W. and Rhodes R.C. (1966) Disappearance of diuron from cotton fields soils. *Weeds* **14**, 14–31.
- Daubert T.E. and Danner R.P. (1991) *Physical and Thermodynamic Properties of Pure Chemicals: Data Compilation*. Suppl. 1, Design Institute for Physical Property Data, American Institute of Chemical Engineers, Hemisphere, New York.
- Dawson P.H. (1995) *Quadrupole mass spectrometry and its applications*. AIP Press Woodbury, NY.
- De Almeida Azevedo D., Lacorte S., Vinhas T., Viana P. and Barceló D. (2000) Monitoring of priority pesticides and other organic pollutants in river water from Portugal by gas-chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **879**, 13–26.
- Dean J.R. (1998) *Extraction methods for environmental analysis*. John Wiley & Sons, Inc New York.
- De-Braekeleer K., de-Juan A. and Massart D.L. (1999) Purity assessment and resolution of tetracycline hydrochloride samples analysed using high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Chromatogr. A* **832**, 67-86.
- Dejonghe W., Bertheloot E., Goris J., Boon N., Crul K., Maertens S., Höfte M., De Vos P., Verstraete W. and Top E.M. (2003) Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1532–1541.
- Di Corcia A. and Marchetti M. (1992) Method Development for Monitoring Pesticides in Environmental Waters: Liquid - Solid Extraction Followed by Liquid Chromatography. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 66-74.
- Di Corcia A., Costantino A., Crescenzi C. and Samperi R. (1999) Quantification of phenylurea herbicides and their free and humic acid-associated metabolites in natural waters. *J. Chromatogr. A* **852**, 465–474.
- Dommarco R., Santilio A., Fornarelli L and Rubbiani M. (1998) Simultaneous quantitative determination of thirteen urea pesticides at sub-ppb levels on a Zorbax SB-C₁₈ column. *J. Chromatogr. A* **825**, 200-204.
- Donard O.F.X., Lalere B., Martin F. and Lobinsk R. (1995) Microwave-Assisted Leaching of Organotin Compounds from Sediments for Speciation Analysis. *Anal. Chem.* **67**, 4250-4254

- Dupas S., Scribe P. and Dubernet J. F. (1996) On-line and Off-line Solid-Liquid Extraction and Liquid Chromatographic Analysis at Trace Levels, for Monitoring of Herbicides and their Degradation Products in River and Fluvio-Estuarine Freshwater-Seawater Interfaces. *J. Chromatogr. A* **737**, 117-126.
- Eisert R. and Pawliszyn J. (1997) Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **69**, 3140-3147.
- Ellis P.A. and Camper, N.D. (1982) Aerobic degradation of diuron by aquatic micro organisms. *J. Environ. Sci. Health B* **17**, 277–289.
- Ensenbach U., Hryk R. and Nagel R. (1996) Kinetics of 3,4-dichloroaniline in several fish species exposed to different types of water. *Chemosphere* **32**, 1643–1654.
- Eskilsson C.S. and Bjorklund E. (2000) Review: Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* **902**, 227–250.
- EURACHEM Guide (1998) *The Fitness of Purpose of Analytical Methods*, LGC, Teddington, UK.
- Fernandez-Alba A.R., Hernando M.D., Piedra L. and Chisti Y. (2002) Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Anal. Chim. Acta.* **456**, 303-312.
- Ferrer I., Ballesteros B., Marco M.P. and Barceló D. (1997) Pilot survey for the determination of the antifouling agent irgarol 1051 in enclosed seawater samples by a direct enzyme-linked immunosorbent assay and solid-phase extraction followed by liquid chromatography-diode array detection. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 3530–3535.
- Ferrer I. and Barceló D. (1999) Simultaneous determination of antifouling herbicides in marina water samples by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **854**, 197–206.
- Ferrer I. and Barceló D. (2001) Identification of a new degradation product of the antifouling agent Irgarol 1051 in natural samples. *J. Chromatogr. A* **926**, 221–228.
- Field J.A., Reed R.L., Sawyer T.E. and Martinez M. (1997) Diuron and its metabolites in Font G., Manes J., Molto J.C. and Pico Y. (1993) Review: Solid Phase Extraction in Multi-Residue Pesticide Analysis of Water. *J. Chromatogr.* **642**, 135-161.
- Fritz J.S. (1999) *Analytical Solid Phase Extraction*. Wiley-VCH, New York

- Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G. and Tatchell A.R. (1989) *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Fifth Edition, John Wiley & Sons, NY.
- Gao J.P., Maguhn J., Spitzauer P. and Kettrup A. (1998) Sorption of Pesticides in the Sediment of the Teufelsweiher Pond (Southern Germany) I: Equilibrium Assessments, Effect of Organic Carbon Content and pH, *Wat. Res.*, **32**, 1662-1672.
- Gardinali P.R., Plasencia M., Mack S. and Poppell C. (2002) Occurrence of Irgarol 1051 in coastal waters from Biscayne Bay, Florida, USA. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 781-788.
- Gardinali P.R., Plasencia M.D. and Maxey C. (2004) Occurrence and transport of Irgarol 1051 and its major metabolite in coastal waters from South Florida. *Mar. Pollut. Bull.* **49**, 1072-1083.
- Gennaro M.C., Abrigo C., Giacosa D., Rigotti L. and Liberatori A. (1995) Separation of phenylurea pesticides by ion-interaction reversed-phase high performance liquid chromatography: diuron determination in lagoon water. *J. Chromatogr. A* **718**, 81-88.
- Giacomazzi S. and Cochet N. (2004) Environmental impact of diuron transformation: a review. *Review Chemosphere* **56**, 1021-1032.
- Gimeno R.A., Aguilar C., Marce R.M. and Borrull F. (2001) Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **915**, 139-147.
- Girling A.E., Tattersfield L., Mitchell G.C., Crossland N.O., Pascoe D., Blockwell S.J., Maund S.J., Taylor E.J., Wenzel A., Janssen C.R. and Juttner I. (2000) Derivation of predicted no-effect concentrations for lindane, 3,4-dichloroaniline, atrazine, and copper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **46**, 148-162.
- Gonzalez-Martinez M.A., Penalva J., Puchades R., Maquieira A., Ballesteros B., Marco P.M. and Barcelo D. (1998) An Immunosensor for the Automatic Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1051 in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3442-3447.
- Gough M.A., Fothergill J. and Hendrie J.D. (1994) A survey of Southern England coastal waters for the s-Triazine antifouling compound Irgarol 1051. *Mar. Pollut. Bull.* **28**, 613-620.
- Gross M.L. and Caprioli R. (2000) *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*. V. 1-5, Elsevier, Oxford.
- Guan F., Watanabe K., Ishii A., Seno H., Kumazawa T., Hattori H. and Suzuki O. (1998) Headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic determination of

- dinitroaniline herbicides in human blood, urine and environmental water. *J. Chromatogr. B* **714**, 205-213.
- Guenu S. and Hennion M.C. (1996) Evaluation of new polymeric sorbents with high specific surface areas using an on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic system for the trace-level determination of polar pesticides. *J. Chromatogr. A* **737**, 15-24.
- Guillard R.L. (1973) Division rates. In: Stein (ed) *Culture methods and Growth measurements*, Cambridge University Press, pp.289-311.
- Gusev I., Huang X. and Horváth C. (1999) Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, **855**, 273-290.
- Gustafsson O., Haghseta F., Chan C., MacFarlane J. Gschwend P.M. (1997) Quantification of the Dilute Sedimentary Soot Phase: Implications for PAH Speciation and Bioavailability, *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 203-209.
- Hagen D.F., Markell C.G., Schmitt G.A. and Blevins D.D. (1990) Membrane Approach to Solid-Phase Extractions. *Anal. Chim. Acta* **236**, 157-164.
- Haglund K., Petterson A., Petterson M., Kylin H., Lord S.C. and Dollenmeier P. (2001) Seasonal distribution of the antifouling compound Irgarol 1051 outside a marina in the Stockholm Archipelago. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **66**, 50-58.
- Hall L.W., Giddings J.M., Solomon K.R. and Balcomb R. (1999) An ecological risk assessment for the use of Irgarol 1051 as an algaecide for antifoulant paints. *Crit. Rev. Toxicol.* **29**, 367-437.
- Hall L.W., Killen W.D. and Gardinali P.R. (2004) Occurrence of Irgarol 1051 and its major metabolite in Maryland waters of Chesapeake Bay. *Mar. Pollut. Bull* **48**, 554-562.
- Hancock W. S., Chloupek R. C., Kirkland J. J. and Snyder L. R. (1994) Temperature as a Variable in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Separations of Peptide and Protein Samples. I. Optimizing the Separation of a Growth Hormone Tryptic Digest. *J. Chromatogr. A* **686**, 31-43.
- Health and Safety Executive (HSE) (2000) Pesticide newsletter number 49. The Biocides and Pesticides Assessment Unit, Health and Safety Executive, Magdalen House, Stanley Precinct, Bootle, Merseyside L20 3QZ, UK.

- Hennion M.C. and Scribe P. (1993) *Sample Handling Strategies for the Analysis of Organic Compounds from Environmental Water Samples*. In: Barcelo, D. (ed.), *Environmental Analysis, Techniques, Applications and Quality Assurance*. Elsevier, Amsterdam, pp. 23-77.
- Hennion M.C. (1999) Review: Solid-Phase Extraction: Method Development, Sorbents and Coupling with Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **856**, 3-54.
- Hennion M.C. (2000) Graphitized carbons for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* **885**, 73-95.
- Hernando M.D., Piedra L., Belmonte A., Agüera A. and Fernández-Alba A.R. (2001) Determination of five antifouling agents in water by gas chromatography with positive/negative chemical ionization and tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **938**, 103-111.
- Hoberg J.R. (1998) Irgarol 1051: toxicity to a marine: green alga *Chlorococcum sp.* (Report no. 98-2-7259), dinoflagellate *Dunaliella tertiolecta* (Report no. 98-2-7260), alga *Isochrysis galbana.*, (Report no. 98-2-7261), Springborn Laboratories Inc., Wareham, MA.
- Hoch M. (2001) Organotin compounds in the environment- an overview. *Appl. Geochem.* **16**, 719-743.
- Hoogerbrugge R., Molins C. and Baumann R.A. (1997) Effects of parameters on microwave assisted extraction of triazines from soil: evaluation of an optimisation trajectory. *Anal. Chim. Acta* **348**, 247-253.
- Hornsby A. G., Wauchope R. D. and Herner A. E. (1996) *Pesticide Properties in the Environment*. Springer-Verlag, New York.
- House W.A., Leach D., Long J.L.A, Cranwell P., Smith C., Bharwaj L. and Rae J.E. (1997) Micro-organic compounds in the Humber rivers. *Sci. Total Environ.* **194-195**, 357-371.
- Howard P. H. (1991) *Handbook of Environmental and Exposure Data for Organic Chemicals. Volume III. Pesticides*, Lewis Publishers, Michigan.
- Hsu T.S. and Bartha R. (1974) Interaction of pesticide-derived chloroaniline residues with soil organic matter *Soil Sci.*, **116**, 444-452.
- Huber L. and George S.A. (1993) *Diode Array Detection in HPLC*, Dekker, NY.
- Hughes J. and Alexander M.M. (1993) The toxicity of irgarol 1051 to *Selenastrum capricornutum* (study ID B267-582-1), *Anabaena flos-aquae* (study ID B267-582-2),

Navicula pelliculosa (study ID B267-582-), *Skeletonema costatum* (study ID B267-582-4), Malcolm Pirnie Inc., Terrytown, NY.

ICH (1995) International Conference on Harmonization, Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability, *Fed. Reg.*, 60(40), 11260-11262.

Issaeva T., Kourganov A. and Unger K. (1999) Super-high-speed liquid chromatography of proteins and peptides on non-porous Micra NPS-RP packings. *J. Chromatogr. A* **846**, 13-23.

Junker-Buchheit A. and Witznbacher M. (1996) Pesticide Monitoring of Drinking Water with the Help of Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **737**, 67-74.

Kan A.T., Fu G., and Tomson M.B. (1994) Adsorption/Desorption Hysteresis in Organic Pollutant and Soil-Sediment, Interaction *Environ. Sci. Technol.* **28**, 859-867.

Karapanagioti H.K., Kleinedam S., Sabatini D.A., Grathwohl P. and Ligouis B. (2000) Impacts of Heterogeneous Organic Matter on Phenanthrene Sorption: Equilibrium and Kinetic Studies with Aquifer Material, *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 406-416.

Katz E., Eksteen R., Schoenmakers P. and Miller N. (1998) *Handbook of HPLC*. Dekker, NY.

Kaufman D.D. and Kearney P (1970) Microbial degradation of s-triazine herbicides. *Residue Review*, **32**, 235-235.

Kele M. and Guiochon G. (1999) Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns: I. Experimental protocol. *J. Chromatogr. A* **830**, 41-54.

Kenaga E.E. (1980) Correlation of bioconcentration factors of chemicals in aquatic and terrestrial organisms with their physical and chemical-properties, *Environ. Sci. Technol.*, **14**, 553-556.

Khalimonov O. (1995) TBT on the Way Out. Correspondence, *Mar. Pollut. Bull.* **30**, 171.

Kirkland J. J., Henderson J.W., DeStefano J.J., Van-Straten M.A. and Claessens H.A. (1997) Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **762**, 97-112.

- Kirkland J.J. and Henderson J.W. (1994) Reversed-phase HPLC selectivity and retention characteristics of conformationally different bonded alkyl stationary phases. *J. Chromatogr. Sci.* **32**, 473-480.
- Kissinger P.T. and Heineman W.E. (1995) *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. Dekker, NY.
- Klaine S.J., Lewis M.A. and Knuteson S.L. (2003) Phytotoxicity: In Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton G.A., Cairns J. (eds) *Handbook of Ecotoxicology*, pp. 19-43, Lewis Publishers.
- Kleineidam S., Rügner H., Ligouis B. and Grathwohl P. (1999) Organic Matter Facies and Equilibrium Sorption of Phenantrene, *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 1637-1644.
- Kobayashi N and Okamura H. (2002) Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 748– 51.
- Konstantinou I.K., Sakkas V.A. and Albanis T.A. (2001) Photocatalytic degradation of the herbicides propanil and molinate over aqueous TiO₂ suspensions: identification of intermediates and the reaction pathway. *Appl. Catalysis B: Environmental* **34**, 227-239.
- Konstantinou I.K. and Albanis T.A. (2004) Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environ. International* **30**, 235–248.
- Kotrikla A, Lekkas T.D. and Bletsas G (1997) Toxicity of the herbicide atrazine, two of its degradation products and the herbicide metolachlor on photosynthetic microorganisms, *Fres. Environ. Bull.* **6**, 502-507.
- Kotrikla A., Gatidou G. and Lekkas T.D. (1999) Toxic effects of atrazine, deethyl-atrazine, deisopropyl-atrazine and metolachlor on *Chlorella Fusca* var-*fusca* GNest, **1**, 39-45.
- Kotrikla A. and Lekkas T.D. (2001) The HPLC Separation of Two Mixtures of Neutral Pesticides: Effects of Temperature, Gradient Steepness and Flow Rate. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **24**, 543-553.
- Krutz L.J., Senseman S.A. and Sciumbato A.S. (2003) Review: Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples. *J. Chromatogr. A* **999**, 103-121.
- Lacourse W.R. (1997) *Pulsed Electrochemical Detection in High Performance Liquid Chromatography*, Wiley, NY.

- Lagana A., Fago G. and Marino A. (1998) Determination of Aryloxyphenoxypropionic Acid Herbicides in Water, using Different Solid-Phase Extraction Procedures and Liquid Chromatography - Diode Array Detection. *J. Chromatogr. A* **796**, 309-318.
- Lam K.H., Lam H.W.M., Lam P.K.S., Qian T., Cai Z., Yu H. and Cheung R.Y.H. (2004) Identification and characterization of a new degradation product of Irgarol-1051 in mercuric chloride-catalyzed hydrolysis reaction and in coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* **49**, 361-367.
- Lambropoulou D.A., Sakkas V.A. and Albanis T.A. (2002) Headspace solid phase microextraction for the analysis of the new antifouling agents Irgarol 1051 and Sea Nine 211 in natural waters. *Anal. Chim. Acta* **468**, 171-180.
- Lambropoulou D.A., Sakkas V.A. and Albanis T.A. (2003) Determination of antifouling compounds in marine sediments by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1010**, 1-8.
- Lamoree M.H., Swart S.P., Van der Horst A. and Van Hattum B. (2002) Determination of diuron and the antifouling paint biocide Irgarol 1051 in Dutch marinas and coastal waters. *J. Chromatogr. A* **970**, 183–190.
- Lartiges S.B. and Garrigues P.P. (1995) Degradation Kinetics of Organophosphorus and Organonitrogen Pesticides in Different Waters under Various Environmental Conditions. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1246-1254.
- Lee D.P. (1988) Chromatographic evaluation of large-pore and non-porous polymeric reversed phases. *J. Chromatogr. A* **443**, 143-153.
- Legrand A.P. (1998) *The Surface Properties of Silicas*, Wiley, NY.
- Leo and Hansch (1971) Partition coefficient and their uses. *Chem. Ref.* **71**, 525-616.
- Leung K.M.Y., Morrill D., Wheeler J.R., Whitehouse P., Sorokin N., Toy R., Holt M. and Crane M. (2001) Can saltwater toxicity be predicted from fresh water data? *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 1007-1013.
- Li L., Carr P.W. and Evans J.F (2000) Studies of retention and stability of a horizontally polymerized bonded phase for reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **868**, 153-167.
- Liao J.L. (2000) Continuous bed for conventional column and capillary column chromatography. *Adv. Chromatogr.* **40**, 467-502.

- Liska I. and Slobodnik J. (1996). Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples. *J. Chromatogr. A* **733**, 235-258.
- Liska I. and Bilikova K. (1998) Stability of Polar Pesticides on Disposable Solid-Phase Extraction Precolumns. *J. Chromator. A* **795**, 61-69.
- Liu D., Maguire J.R., Lau L. Y., Pacepavicius J. G., Okamura H. and Aoyama I. (1997) Transformation of the new Antifouling Compound Irgarol 1051 by Phanerochaete Chrysosporium. *Wat. Res.* **31**, 2363-2369.
- Liu D., Pacepavicius G.J., Maguire R.J., Lau Y.L., Okamura H. and Aoyama I. (1999a) Mercuric chloride-catalyzed hydrolysis of the new antifouling compound Irgarol 1051. *Water Res.* **33**, 155–163.
- Liu D., Pacepavicius G.J., Maguire R.J., Lau Y.L., Okamura H. and Aoyama I. (1999b) Survey for the occurrence of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.* **33**, 2833–2843
- Lopez-Avila V., Young R. and Beckerl W.F. (1994) Microwave-Assisted Extraction of Organic Compounds from Standard Reference Soils and Sediments. *Anal. Chem.* **66**, 1097-1106.
- Luque de Castro M.D. and García-Ayuso L.E. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta* **369**, 1-10.
- Macinnis-Ng CMO and Ralph PJ. (2003) Short term response and recovery of *Zostera capricorni* photosynthesis after herbicide exposure. *Aquat. Bot.* **76**, 1–15.
- Majors R. E. (1998) Analytical HPLC Column Technology – the Current Status. *Current Issues in HPLC Technology* Supplement to: LC-GC International, 7-21.
- March R.E. and Todds J.F.J. (1995) *Practical aspects of ion trap mass spectrometry*. CRC Press, Boca Raton, FL, v. 1-3, 1995.
- Marking L.L. (1985) Toxicity of chemical mixtures. In Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, Hemisphere Publishing Corporation, pp.164-176.
- Martin-Esteban A., Fernadez P. and Camara C. (1996) New Design for the On-Line Solid-Phase Extraction of Pesticides using Membrane Extraction Disc Material and Liquid Chromatography in Environmental Samples. *J. Chromatogr. A* **752**, 291-297.
- Martinez K., Ferrer I. and Barceló D. (2000) Part-per-trillion level determination of antifouling pesticides and their byproducts in seawater samples by off-line solid-phase

- extraction followed by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **879**, 27–37.
- Martinez K. and Barcelo D. (2001a) Determination of antifouling pesticides and their degradation products in marine sediments by means of ultrasonic extraction and HPLC-APCI-MS. *Fresen. J. Anal. Chem.* **370**, 940-945.
- Martínez K., Ferrer I., Hernando M.D., Fernández-Alba A.R., Marcé R.M., Borrull F. and Barceló D. (2001b) Occurrence of antifouling biocides in the Spanish Mediterranean marine environment. *Environ. Technol.* **22**, 543-552.
- Masque N., Galia M., Marce R. M. and Borrull F. (1998a) New Chemically Modified Resin for Solid-Phase Extraction of Pesticides and Phenolic Compounds. *J. Chromatogr. A* **803**, 147-155.
- Masque N., Marce R. M. and Borrull F. (1998b) Comparison of Different Sorbents for On-Line Solid-Phase Extraction of Pesticides and Phenolic Compounds from Natural Water, followed by Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **793**, 257-263.
- Matsui J., Fujiwara K., Ugata S., and Takeuchi T. (2000) Solid Phase Extraction with a Dibutylmelamine-Imprinted Polymer as Triazine Herbicide Selective Sorbent. *J. Chromatogr. A* **889**, 25-31.
- McLachlan J. (1973) Growth media - marine In: Stein (ed) *Culture methods and Growth measurements*, Cambridge University Press, pp.25-51.
- MER (1996) Environmental Benefits of TBT Antifoulants. *Mar. Eng. Review*, 1996, 32.
- Meyer R.V. (1994) *Practical High- Performance Liquid Chromatography*. Second Edition, John Wiley & Sons, Chichester.
- Mezcua M., Hernando M.D., Piedra, L, Aguera A and Fernandez-Alba A.R. (2002) Chromatography-mass spectrometry and toxicity evaluation of selected contaminants in seawater. *Chromatographia* **56**, 199-206.
- Montgomery J. H. (1997) *Agrochemicals Desk Reference*, 2nd Edition, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Morgan E. (1991) *Chemometrics: experimental design*. Analytical Chemistry by open Learning, Wiley, Chichester.
- Munch D.J. and Frebis C.P. (1992) Analyte Stability Studies Conducted during the National Pesticide Survey. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 921-925.

- Nakanishi K, Shikata H, Ishizuka N, Koheiya N. and Soga N. (2000) Tailoring mesopores in monolithic macroporous silica for HPLC. *J. High Resolut. Chromatogr.* **23**, 106-110.
- Navalon A., Prieto A., Araujo L. and Vilchez J.-L. (2002) Determination of oxadiazon residues by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromat. A* **946**, 239–245.
- Nebeker A.V. and Schuytema G.S. (1998) Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 441–446.
- Nystrom B., Becker-Van Slooten K., Berard A., Grandjean D., Druart J.C. and Leboulanger C. (2002) Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Geneva. *Water Res.* **36**, 2020–2028.
- OECD (1981) *Guidelines for testing of chemicals*. Organization of Economic Cooperation and Development, Publication service 2, rue Andre-Pascal 75775 Paris CEDEX 10 France.
- Ogawa N., Okamura H., Hirai H. and Nishida T. (2004) Degradation of the antifouling compound Irgarol 1051 by manganese peroxidase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, **55**, 487-491.
- Okamura H., Aoyama I., Liu D., Maguire R.J., Pacepavicius G.J. and Lau Y.L. (1999) Photodegradation of Irgarol 1051 in water. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **34**, 225–238.
- Okamura H., Aoyama I., Liu D., Maguire R.J., Pacepavicius G.J. and Lau Y.L. (2000a) Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. *Water Res.* **34**, 3523 –3530.
- Okamura H., Aoyama I., Takami T., Maruyama T., Suzuki Y. and Matsumoto M (2000b) Phytotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 and a major degradation product. *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 754–763.
- Okamura Y., Koyama J., Takaku H and Satoh H. (2001) Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. *Archives of Environ. Contam. Toxicol.* **41**, 123-128.
- Okamura H., Watanabe T., Aoyama I. and Hasobe M. (2002) Toxicity evaluation of new antifouling compounds using suspension-cultured fish cells. *Chemosphere* **46**, 945–951.
- Okamura H., Aoyama I., Ono Y. and Nishida T. (2003) Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Mar. Pollut. Bull.* **47**, 59–67.

- Omae I. (2003a) General Aspects of Tin-Free Antifouling Paints. *Chem. Rev.* **103**, 3431-3448.
- Omae I. (2003b) Organotin antifouling paints and their alternatives. *Appl. Organometal. Chem.* **17**, 81-105.
- Onnerfjord P., Barcelo D., Emneus J., Gorton L. and Marko-Varga G. (1996) On-Line Solid-Phase Extraction in Liquid Chromatography Using Restricted Access Pre-Columns for the Analysis of s-Triazines in Humic-Containing Waters. *J. Chromatogr. A* **737**, 35-45.
- Othmen K. and Boule P. (1999) Photochemical behaviour of dichloroanilines in water and formation of aminochlorophenoxazones. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **121**, 161-167.
- Owen R., Knap A., Toasperm M. and Carberry K. (2002) Inhibition of coral photosynthesis by the antifouling herbicide Irgarol 1051. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 623-632.
- Pacakova V., Stulik K. and Jiskra J. (1996) Review: High Performance Separations in the Determination of Triazine Herbicides and their Residues. *J. Chromatogr. A* **754**, 17-31.
- Papadopoulou-Mourkidou E. and Patsias J. (1996) Development of a Semi - Automated High Performance Liquid Chromatographic - Diode Array Detection System for Screening Pesticides at Trace Levels in Aquatic Systems of the Axios River Basin. *J. Chromatogr. A* **726**: 99-113.
- Parriot D. (1993) *A Practical Guide to HPLC Detection*. Academic Press, San Diego, CA.
- Pastor A., Vázquez E., Ciscar R. and de la Guardia M. (1997) Efficiency of the microwave-assisted extraction of hydrocarbons and pesticides from sediments. *Anal. Chim. Acta* **344**, 241-249.
- Pecsok R.L., Shields L.D., Cairns T. and McWilliam I.G. (1980) *Σύγχρονες Μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση*, Εκδόσεις Γ. Α. Πνευματικός, Αθήνα.
- Penalva J., Gonzalez-Martinez M.A., Puchades R., Maquieira A., Marco P.M. and Barcelo D. (1999) Immunosensor for Trace Determination of Irgarol 1051 in Seawater Using Organic Media. *Anal. Chim. Acta.* **387**, 227-233.
- Peñalver A., Pocurull E., Borrull F. and Marcé R.M. (1999) Solid-phase microextraction of the antifouling Irgarol 1051 and the fungicides dichlofluanid and 4-chloro-3-methylphenol in water samples. *J. Chromatogr. A* **839**, 253-260.

- Penuela G.A., Ferrer I. and Barcelo D. (2000) Identification of new photodegradation byproducts of the antifouling agent Irgarol in seawater samples. *Int. J. Environ. An. Chem.* **78**, 25-40.
- Pesek J.J. and Matyska M.T. (2002) Modified aluminas as chromatographic supports for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **952**, 1-11.
- Petrocelli S.R. (1985) Chronic toxicity tests. In Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, pp.96-123.
- Pichon V. (2000) Review: Solid Phase Extraction for Multiresidue Analysis of Organic Contaminants in Water *J. Chromatogr. A* **885**, 195-215.
- Pichon V., Cau Dit Coumes C., Chen L., Guenu S. and Hennion M.-C. (1996) Simple Removal of Humic and Fulvic Acid Interferences using Polymeric Sorbents for the Simultaneous Solid-Phase Extraction of Polar Acidic, Neutral and Basic Pesticides. *J. Chromatogr. A* **737**, 25-33.
- Pichon V., Charpak M. and Hennion M.C. (1998) Multiresidue Analysis of Pesticides, Using New Laminar Extraction Disks and Liquid Chromatography and Application to the French Priority List. *J. Chromatogr. A* **795**, 83-92.
- Pinto M.G.F. and Jardim I.C.S.F. (2000) Use of Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Triazine Residues in Water: Validation of the Method. *J. Chromatogr. A* **869**, 463-469.
- Pocurull E., Brossa L., Borull F. and Marcé R.M. (2000) Trace determination of antifouling compounds by on-line solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **885**, 361-368.
- Rand G.M. and Petrocelli S. R. (1985) Introduction. In Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, pp.1-28.
- Ranke J. and Jastorff B. (2000) Multidimensional risk analysis of antifouling biocides. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* **7**, 105-114.
- Ranke J.(2002) Persistence of antifouling agents in the marine biosphere. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1539-1545.
- Rasmussen H.T., Omelczenko N., Friedman S.K. and McPherson B.P. (1996) Determination of chloroanilines in antibacterial soaps using cation-exchange chromatography with UV detection, *J. Chromatogr. A*, **719**, 434-437.

- Ratnayake C.K., Oh C.S. and Henry M.P. (2000) Particle loaded monolithic sol-gel columns for capillary electrochromatography: A new dimension for high performance liquid chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.* **23**, 81-88.
- Readman J.W., Wee Knong L.L., Grondin D., Barocci J., Vileneuve L.P. and Mee L.D. (1993) Coastal water contamination from a triazine herbicide used in antifouling paints. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 1940–1942.
- Readman J.W. (1999) *Assessment of antifouling paints in coastal environments*. Progress report, EU project MAST III PL971620, EU, Brussels.
- Reubsaet J.L.E. and Vieskar R. (1999) Characterization of π - π Interactions which Determine Retention of Aromatic Compounds in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **841**, 147-154.
- Reupert R., Ploger E. and Brausen G. (1990) *HPLC Determination of 29 Controlled Herbicides in Water Supplies*. Hewlett Packard Application Note, Publication Number 12-5952-2229.
- Rogers H.R., Watts C.D. and Jonshon I. (1996) Comparative predictions of Irgarol 1051 and atrazine fate and toxicity. *Environ. Technol.* **17**, 553–556.
- Rosowski J.R., Hoagland K.D. and Aloï J.E. (1986) Structural morphology of diatom dominated stream biofilm communities under the impact of soil erosion. In: L.V. Evans and K.D. Hoagland, Eds, *Algal Biofilm*, Studies in Environmental Studies 28, Elsevier, New York, pp. 247-299.
- Ruiz J.M., Bachelet G., Caumette P. and Donard O.F.X., (1996) Three decades of tributyltin in the coastal environment with emphasis on Arcachon Bay, France. *Environ. Pollut.* **93**, 195-203.
- Sabik H., Jeannot R. and Rondeau B. (2000) Review: Multiresidue Methods Using Solid-Phase Extraction Techniques for Monitoring Priority Pesticides, Including Triazines and Degradation Products, in Ground and Surface Waters. *J. Chromatogr. A* **885**, 217-236.
- Saglio P. and Trijasse S. (1998) Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 484–491.
- Sakkas V.A., Lambropoulou D.A and Albanis T.A. (2002a) Photochemical degradation study of irgarol 1051 in natural waters: influence of humic and fulvic substances on the reaction. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **147**, 135-141.

- Sakkas V.A., Konstantinou I.K., Lambropoulou D.A. and Albanis T.A. (2002b) Survey for the occurrence of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment of Greece. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **9**, 327–332.
- Salvestrini S., Di Cerbo P. and Capasso S. (2002) Kinetics of the chemical degradation of diuron. *Chemosphere* **48**, 69–73.
- Sander L.C. and Wise S.A. (1995) Influence of Stationary Phase Chemistry on Shape Recognition in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **67**, 3284-3292.
- Sander L.C., Pursch M. and Wise S.A. (1999) Shape Selectivity for Constrained Solutes in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **71**, 4821-4830.
- Sandermann Jr.H., Heller W., Hertkorn N., Hoque E., Pieper D. and Winkler R. (1998) A new intermediate in the mineralization of 3,4-dichloroaniline by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3305-3312.
- Sargent C.J., Bowman J.C. and Zhou J.L. (2000) Levels of antifoulant irgarol 1051 in the Conwy Marina, North Wales. *Chemosphere* **41**, 1755–1760.
- Scarlett A., Donkin M.E., Fileman T.W. and Donkin P. (1997) Occurrence of the marine antifouling agent irgarol 1051 within the plymouth sound locality: implications for the Green Macroalga *Enteromorpha intestinalis*. *Mar. Pollut. Bull.* **34**, 645–651.
- Scarlett A., Donkin M.E., Fileman T.W. and Donkin P. (1999a) Risk posed by the antifouling agent Irgarol 1051 to the seagrass, *Zostera marina*. *Aquat. Toxicol.* **45**, 159–170.
- Scarlett A., Donkin P., Fileman T.W. and Morris R.J. (1999b) Occurrence of the antifouling herbicide Irgarol 1051, within coastal-water seagrasses from Queensland, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* **38**, 687– 691.
- Schmiedel U. (1997) Determination of the partition coefficient (n-octanol/water) of TK 13079 (IRGAROL 1051). Study Project no. 662275 RCC Umweltchemie AG, Itingen, Switzerland (reported in Hall et al., 1999).
- Senseman S.A., Lavy T.L., Mattice J.D., Myers B.M. and Skulman B.W. (1993) Stability of Various Pesticides on Membranous Solid-Phase Extraction Media. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 516-519.
- Shen G. and Lee H.K. (2003) Determination of triazines in soil by microwave-assisted extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **985**, 167-174.

- Sherry J.P. (1992) Environmental Chemistry – The immunoassay option. *Crit. Rev. Anal Chem.* **23**, 217-300.
- Skoog D.A., Coller S.J. and Nieman T.A. (2002) *Αρχές ενόργανης ανάλυσης* (Μετάφραση: Καραγιάννης Ν., Ευσταθίου Κ., Χανιωτάκης Ν.), 5^η Έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκης, Αθήνα.
- Smith B.S., (1971) *Sexuality of the American mud snail Nassarius obsoletus (Say)*. Proceedings of the Malacological Society of London, **39**, 377-378.
- Snyder L. R., Kirkland J. J. and Glajch J. L. (1997) *Practical HPLC Method Development*. John Willey, New York.
- Sosak-Swidarska B., Tyrawska D. and Maslikowska B. (1998) Microalgal ecotoxicity test with 3,4-dichloroaniline. *Chemosphere* **37**, 2975–2982.
- Spacie A and Hamelink J.L. (1985) Bioaccumulation. In Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, pp.495-525.
- Spancer E.Y. (1982) *Guide to chemicals used in crop protection*. (7th eds), Agriculture Canada, Ottawa.
- Sprague J.B. (1985) Factors that modify toxicity. In Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (eds) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publishing Corporation, pp.124-163.
- SRC organization: <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>. Ημερομηνία τελευταίας πρόσβασης: 15/03/2005.
- Steen R.J.C.A., Leonards P.E.G., Brinkman Th. and Cofino W.P. (1997) Ultra-trace-level determination of the antifouling agent Irgarol 1051 by gas chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **766**, 153–158.
- Steinheimer T.R. (1993) HPLC determination of atrazine and principal degradates in agricultural soils and associated surface and ground water. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 588-595.
- Stout S.J., daCunha A.R. and Allardice D.G. (1996) Microwave-Assisted Extraction Coupled with Gas Chromatography/Electron Capture Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry for the Simplified Determination of Imidazolinone Herbicides in Soil at the ppb Level. *Anal. Chem.* **68**, 653-658.
- Supelco (1997) *Chromatography Products*. Deisenhofen, Germany.
- Terlizzi A., Frascchetti S., Gianguzza P., Faimali M. and Boero F. (2001) Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* **100**, 311-317.

- The Merck Index (1989). *An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Merck & Co., Inc, 17th Edition, N.J., U.S.A.
- Thier H.P. and Zeumer H. (eds) (1987) *Manual of Pesticide Residue Analysis*. Volume I and II, VCH, Weinheim.
- Thomas K.V. (1998) Determination of selected antifouling booster biocides by high-performance liquid-chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **825**, 29–35.
- Thomas K.V., Waldock M.J., Readman J., Fileman T.W. (1999) Monitoring of antifouling paint booster biocides and tributyltin in UK marinas, estuaries and coastal waters. A final report for the Department of the Environment, Transport and the Regions and the Environment Agency (EPG, 1/5/90 and P2-118). This report also constitutes the environmental Agency's Technical Report No P313; 1999.
- Thomas K.V., Blake S.J. and Waldock M.J. (2000) Antifouling Paint Booster Biocide Contamination in UK Marine Sediments. *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 739-745.
- Thomas K.V. (2001a) The environmental fate and behaviour of antifouling paint booster biocides: a review. *Biofouling* **17**, 73-86.
- Thomas K.V., Fileman T.W., Readman J.W. and Waldock M. (2001b). Antifouling paint booster biocides in the UK coastal environment and potential risks of biological effects. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 677–688.
- Thomas K.V., McHugh M. and Waldock M. (2002) Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *Sci. Total. Environ.* **293**, 117-127.
- Thomas K.V., Mathew McHugh M., Hilton M. and Waldock M. (2003) Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. *Environ. Pollut.* **123**, 153–161.
- Thurman E.M. and Mills M.S. (1998) *Solid Phase Extraction*. John Wiley & Sons, Inc New York.
- Tixier C., Sancelme M., Bonnemoy F., Cuer A. and Veschambre H. (2001) Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1381–1389
- Tixier C., Sancelme M., Ait-Aissa S., Widehem P., Bonnemoy F., Cuer A., Truffaut N. and Veschambre H. (2002) Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain,

- Arthrobacter sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* **46**, 519–526.
- Tolosa I., Readman J.W., Blaevoet A., Ghilini S., Bartocci J. and Horvat M. (1996a) Contamination of Mediterranean (Cote d'Azur) coastal waters by organotin and Irgarol 1051 used in antifouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* **32**, 335–341.
- Tolosa I. and Readman J.W. (1996b) Simultaneous analysis of the antifouling agents: tributyltin, triphenyltin, and Irgarol 1051 in marina water samples. *Anal. Chim. Acta* **335**, 267–274.
- Toth S., Becker-van Slooten K., Spack L., Alencastro L.F. and Tarradellas J. (1996) Irgarol 1051: an antifouling compound in freshwater, sediment and biota of Lake Geneva. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 426–433.
- Townsin R.L. (1987) *Development in the calculation of rough underwater surface power penalties*. In Celena 25th Anniversary Symposium, Genoa.
- Travkin V., Baskunov B.P., Golovlev E.L., Boersma M.G., Boeren S., Vervoort J., Van Berkel W.J.H., Rietjens I.M.C.M. and Golovleva L.A. (2002) Reductive deamination as a new step in the anaerobic microbial degradation of halogenated anilines. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**, 307–312.
- Travkin V.M., Solyanikova I.P., Rietjens I.M., Vervoort J., Van Berkel W.J. and Golovleva L.A. (2003) Degradation of 3,4-dichloro- and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K. *J. Environ. Sci. Health B* **38**, 121–132.
- Turner Ch., Eskilsson C.-S. and Björklund E. (2002) Collection in analytical-scale supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A* **947**, 1-22.
- Van der Heeft E., Dijkman E., Baumann R. A. and Hogendoorn E. A. (2000) Comparison of Various Liquid Chromatographic Methods Involving UV and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometric Detection for the Efficient Trace Analysis of Phenylurea Herbicides in Various Types of Water Samples. *J. Chromatogr. A* **879**, 39-50.
- Van Horne K.C.(1990) *Sorbent Extraction Technology*. Analytichem International, A Division of Varian, Harbor City, Ca.
- Viana E., Redondo M. J., Font G. and Moltó J. C. (1996) Disks versus Columns in the Solid-Phase Extraction of Pesticides from Water, *J. Chromatogr. A*, **733**, 267-274.

- Voulvoulis N., Scrimshaw D.M. and Lester N.J. (1999a) Alternative antifouling Biocides: a Review. *Appl. Organometal Chem.* **13**, 135-143.
- Voulvoulis N, Scrimshaw MD, Lester JN (1999b). Analytical method development for the determination of four biocides used in antifouling paints in estuarine waters and sediments by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* **50**, 353-357.
- Voulvoulis N., Scrimshaw M.D. and Lester J.N. (2000) Occurrence of four biocides utilised in antifouling paints, as alternatives to organotin compounds, in waters and sediments of a commercial estuary in the UK. *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 938–946.
- Voulvoulis N., Scrimshaw M.D. and Lester J.N. (2002) Partitioning of selected antifouling biocides in the aquatic environment. *Mar. Environ. Res.* **53**, 1–16.
- Vryzas Z. and Papadopoulou-Mourkidou E. (2002) Determination of Triazine and Chloroacetanilide Herbicides in Soils by Microwave-Assisted Extraction (MAE) Coupled to Gas Chromatographic Analysis with Either GCNPD or GCMS. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5026–5033.
- Walsh G.E. (1988) Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**, 979-987.
- Wang H., Yi E.C., Ibarra C.A. and Hackett M. (2000) A remote flow cell for UV absorbance detection with capillary HPLC based on a single strand fiber optic. *Analyst* **125**, 1061-1064.
- Wauchope R.D., Buttler T.M., Augustijn-Beckers P.W.M. and Burt J.P. (1992) SCS/ARS/CES pesticides properties database for environmental decision making. *Rev. Environ. Toxicol.* **123**, 1–157.
- Wells D.E. (1993) Extraction, Clean-up and recoveries of persistent trace organic contaminants from sediment and biota samples. In: Barcelo, D. (ed.), *Environmental Analysis, Techniques. Applications and Quality Assurance*. Elsevier, Amsterdam, pp. 80-105.
- Wolcott R.G. and Dolan J.W. (1999) Column Temperature Effects in Gradient Elution. *LC – GC International* **12**, 14-18.
- Wolff C.J.M. and Crossland N.O (1985) Fate and effects of 3,4-dichloroaniline in the laboratory and in out door ponds: I. Fate. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**, 481-487.
- Xiong G., Liang J., Zou S. and Zhang Z. (1998) Microwave-assisted extraction of atrazine from soil followed by rapid detection using commercial ELISA kit. *Anal. Chim. Acta* **371**, 97-103.

- Xiong G., Tang B., He X., Zhao M., Zhang Z. and Zhang Z. (1999) Comparison of microwave-assisted extraction of triazines from soils using water and organic solvents as the extractants. *Talanta* **48**, 333–339.
- Zambonin C.G. and Palmisano F. (2000) Determination of triazines in soil leachates by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **874**, 247-255.
- Zhou J.L., Fileman T.W., Evans S., Donkin P., Mantoura R.F.C. and Rowland S.J. (1996) Seasonal distribution of dissolved pesticides and polynuclear aromatic-hydrocarbons in the Humber estuary and Humber coastal zone. *Mar. Pollut. Bull.* **32**, 599–608.
- Zhu P. L. and Dolan J. W. (1996) What is the True Temperature? *LC - GC International* **9**, 784 – 788.
- Ελευθεροχωρινός Η. Γ. (1996) *Ζιζανιολογία*, Εκδόσεις Αγροτύπος, Αθήνα.
- Μέγκουλας Ν.Χ. (2004) *Εφαρμογές Τεχνικής Χρωματογραφίας HPLC με Ανιχνευτή Σκέδασης Ακτινοβολίας στον Έλεγχο Γλυκοσιδών Αντιβιοτικών*. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

**ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ
ΙΖΗΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ SHOREHAM HARBOUR ΚΑΙ ΤΗ BRIGHTON MARINA (UK)**

Πίνακας I.1a Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

Σημείο δειγμα- τοληψίας	1 ^η δειγματοληψία			2 ^η δειγματοληψία			3 ^η δειγματοληψία			4 ^η δειγματοληψία			5 ^η δειγματοληψία		
	03/2003			05/2003			07/2003			08/2003			10/2003		
	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹
A	-	-	-	8,0	32,0	50,4	7,1	32,3	50,5	8,1	34,1	53,2	7,9	34,6	53,4
F	8,2	30,6	48,2	8,0	28,8	45,6	7,2	21,2	34,1	8,1	33,5	52,2	7,9	32,7	50,9
C	-	-	-	8,1	32,1	50,5	7,1	32,5	50,8	8,2	34,1	53,1	7,9	34,6	53,5
D	8,3	26,3	42	8,1	33,5	52,5	7,2	27,2	51,9	8,3	34,1	53,2	7,9	35,2	54,2
H	8,3	26,3	42	8,0	31,1	49,1	7,2	31,4	49,2	8,1	31,7	49,9	8,0	35,2	54,1
G	8,2	31,1	25,5	8,1	25,3	40,8	7,3	30,8	49,8	8,2	25,2	40,6	8,0	35,1	59,9
E	-	-	-	8,3	19,3	31,6	7,2	32,8	30,8	8,3	19,3	31,6	8,0	35,2	54,3
B	-	-	-	8,1	21,7	32,2	7,2	50,6	32,4	8,3	50,7	34,1	7,9	34,3	34,6
I	8,2	33,7	52,8	8,0	32,0	32,7	7,2	51,2	33,7	8,4	52,5	34,2	7,9	33,9	35,2

A: Aldrighton Wharf, F: Emerald Quay, C: Lady Bee marina, D: Middle Pier, H: Old Fort, G: Soldier Point, E: Surry Boat Yard, B: The Canal, I: West pier.

-: δεν λήφθηκε δείγμα

Πίνακας I.1β Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

Σημείο δειγμα- τοληψίας	6 ^η δειγματοληψία			7 ^η δειγματοληψία			8 ^η δειγματοληψία			9 ^η δειγματοληψία		
	11/2003			12/2003			01/2004			02/2004		
	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατό- τητα‰	Αγωγι- μότητα ms cm ⁻¹
A	7,9	32,3	50,2	7,1	32,6	51,2	7,9	29,9	47,5	5,8	29,7	47,3
F	7,8	8,5	15,0	7,1	31,4	49,6	7,9	24,0	39,0	5,9	12,2	21,0
C	7,8	32,5	50,5	7,1	32,7	51,4	8,0	30,2	47,8	5,6	30,1	47,7
D	7,9	9,1	15,7	7,1	33,1	52,0	7,8	32,9	51,7	5,7	31,3	49,4
H	8,0	29,1	45,7	7,1	32,3	50,9	7,9	30,4	48,2	5,5	28,8	46,0
G	8,0	30,7	47,9	7,2	31,3	49,4	8,0	25,4	41,0	5,8	26,0	42,0
E	7,9	4,3	7,9	7,0	30,4	48,2	-	-	-	5,9	7,1	12,7
B	7,9	32,3	50,3	7,1	32,7	51,5	7,9	30,2	47,9	5,8	30,1	47,6
I	8,0	32,7	50,8	7,1	33,5	52,5	7,7	31,2	49,2	5,8	33,3	52,3

A: Aldrington Wharf, F: Emerald Quay, C: Lady Bee marina, D: Middle Pier, H: Old Fort, G: Soldier Point, E: Surry Boat Yard, B: The Canal, I: West pier.

-: δεν λήφθηκε δείγμα

Πίνακας Ι.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina.

Σημείο δειγματοληψίας	1 ^η δειγματοληψία			2 ^η δειγματοληψία			3 ^η δειγματοληψία		
	07/2003			12/2003			02/2004		
	pH	Αλατότητα ‰	Αγωγιμότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατότητα ‰	Αγωγιμότητα ms cm ⁻¹	pH	Αλατότητα ‰	Αγωγιμότητα ms cm ⁻¹
A	8,1	34,2	53,4	7,4	34,7	54,3	6,2	34,1	53,2
B	8,2	34,7	52,9	7,4	34,7	54,3	6,2	35,9	52,8
C	8,1	34,1	52,8	7,5	34,4	54,6	5,8	34,0	53,0
D	8,1	34,5	54,1	7,5	34,7	54,6	6,1	33,8	52,9
E	7,5	34,3	53,0	7,5	34,6	54,2	6,1	33,9	53,0
F	8,1	33,8	52,9	7,4	34,7	54,3	5,9	33,9	52,9
G	7,8	33,8	53,2	7,5	34,7	54,2	6,1	34,0	53,1
H	-	-	-	7,3	34,3	53,7	6,1	33,8	52,8
I	8,1	34,2	53,7	7,2	34,6	54,1	6,2	33,8	52,9
J	8,2	34,2	53,7	7,4	34,4	53,5	5,9	33,9	53,0
L	8,1	34,4	53,9	7,5	34,8	54,4	6,2	33,9	52,9
M	8,0	34,5	54,2	7,3	34,7	54,3	6,1	33,9	52,9
O	8,2	34,1	53,4	7,4	34,7	54,3	5,8	34,0	53,0
P	8,1	34,1	53,2	7,3	34,6	54,2	5,3	33,5	52,5
W	8,1	34,3	53,7	7,1	34,5	54,0	6,2	33,5	52,4

-: δεν λήφθηκε δείγμα

Πίνακας I.3a Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

Σημείο δειγμα- τοληψίας	1 ^η δειγματοληψία		2 ^η δειγματοληψία		3 ^η δειγματοληψία		4 ^η δειγματοληψία		5 ^η δειγματοληψία	
	03/2003		05/2003		07/2003		08/2003		10/2003	
	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας
A	-	-	7,6	8,42	-	-	-	-	-	-
F	8,0	5,26	7,6	5,58	7,2	5,53	7,6	5,63	7,0	5,43
C	-	-	7,3	7,34	7,2	6,56	7,3	7,26	7,2	7,18
D	7,5	0,64	-	-	-	-	-	-	-	-
H	7,8	0,41	-	-	-	-	7,8	1,14	-	-
G	8,1	2,56	7,7	3,47	-	-	7,7	3,34	-	-
E	-	-	7,8	2,96	-	-	7,7	2,39	7,5	2,31
B	-	-	7,3	7,04	-	-	-	-	-	-
I	7,4	*	7,3	*	-	-	-	-	-	-

A: Aldrighton Wharf, F: Emerald Quay, C: Lady Bee marina, D: Middle Pier, H: Old Fort, G: Soldier Point, E: Surry Boat Yard, B: The Canal, I: West pier.

-: δεν λήφθηκε δείγμα

*: απώλεια δείγματος κατά την ανάλυση

Πίνακας I.3β Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

Σημείο δειγμα- τοληψίας	6 ^η δειγματοληψία		7 ^η δειγματοληψία		8 ^η δειγματοληψία		9 ^η δειγματοληψία	
	11/2003		12/2003		01/2004		02/2004	
	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας
A	-	-	-	-	-	-	7,3	6,17
F	7,2	5,64	7,4	5,30	8,0	4,49	7,6	*
C	7,1	7,46	7,1	7,09	7,9	6,56	7,3	3,88
D	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	7,7	1,83	8,2	2,09	-	-
G	-	-	7,7	2,80	8,6	2,29	-	-
E	7,5	2,62	7,7	2,09	8,2	3,24	7,8	0,28
B	-	-	-	-	-	-	7,5	2,70
I	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Aldrighton Wharf, F: Emerald Quay, C: Lady Bee marina, D: Middle Pier, H: Old Fort, G: Soldier Point, E: Surry Boat Yard, B: The Canal, I: West pier.

-: δεν λήφθηκε δείγμα

*: απώλεια δείγματος κατά την ανάλυση

Πίνακας Ι.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.

Σημείο δειγμα- τοληψίας	1 ^η δειγματοληψία		2 ^η δειγματοληψία		3 ^η δειγματοληψία	
	07/2003		12/2003		02/2004	
	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας	pH	% Οργανικός άνθρακας
A	-	-	7,1	5,34	7,7	1,26
B	-	-	7,2	4,88	-	-
C	7,9	4,25	7,3	4,88	7,8	1,07
D	-	-	7,3	4,83	7,7	1,02
E	-	-	7,5	4,93	7,6	1,40
F	8,0	5,70	7,6	5,00	7,9	1,13
G	7,91	6,30	7,4	5,31	7,8	1,54
H	8,0	4,99	-	-	7,7	1,47
I	7,9	5,61	7,4	4,45	7,7	1,24
J	7,9	4,43	7,1	4,05	7,7	0,78
L	8,1	3,79	7,2	4,28	-	-
M	7,5	5,48	-	-	7,43	1,16
O	7,9	5,43	7,3	5,27	7,7	1,27
P	7,9	5,22	7,3	4,91	-	-
W	7,9	4,93	-	-	7,77	1,18

-: δεν λήφθηκε δείγμα

Πίνακας I.5α Κοκκομετρική ανάλυση δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour

Σημείο δειγμα- τοληψίας	1 ^η δειγματοληψία			2 ^η δειγματοληψία			3 ^η δειγματοληψία			4 ^η δειγματοληψία			5 ^η δειγματοληψία		
	03/2003			05/2003			07/2003			08/2003			10/2003		
	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)
A	-	-	-	5,91	15,17	78,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	0,48	14,19	85,33	49,09	8,93	41,98	0,00	2,37	97,63	1,52	21,11	77,37	1,24	22,14	76,63
C	-	-	-	0,00	40,30	59,70	0,00	4,23	95,77	8,17	11,38	80,46	2,34	13,38	84,28
D	11,96	82,24	5,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	6,54	93,46	0,00	-	-	-	-	-	-	0,60	95,91	3,49	-	-	-
G	2,73	64,68	32,59	2,73	64,68	32,59	-	-	-	0,38	57,39	42,23	-	-	-
E	-	-	-	0,56	5,40	94,04	-	-	-	0,50	71,06	28,44	2,71	64,25	33,03
B	-	-	-	1,22	58,66	40,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Aldrighton Wharf, F: Emerald Quay, C: Lady Bee marina, D: Middle Pier, H: Old Fort, G: Soldier Point, E: Surry Boat Yard, B: The Canal, I: West pier.

-: δεν λήφθηκε δείγμα

*: απώλεια δείγματος κατά την ανάλυση

Πίνακας I.5β Κοκκομετρική ανάλυση δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour

Σημείο δειγμα- τοληψίας	6 ^η δειγματοληψία			7 ^η δειγματοληψία			8 ^η δειγματοληψία			9 ^η δειγματοληψία		
	11/2003			12/2003			01/2004			02/2004		
	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,54	20,29	64,17
F	1,61	18,10	80,29	0,24	61,43	38,34	0,23	26,98	72,79	0,00	21,47	78,53
C	11,57	4,31	84,12	0,55	2,03	97,43	1,36	0,00	98,64	14,31	22,21	63,48
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	0,86	80,96	18,18	0,44	75,34	24,22	-	-	-
G	-	-	-	5,03	5,53	89,44	2,82	71,05	26,12	-	-	-
E	0,48	66,66	32,86	0,61	72,77	26,62	2,59	53,40	44,01	0,00	59,01	40,99
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46,29	11,07	42,64
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A: Aldrighton Wharf, F: Emerald Quay, C: Lady Bee marina, D: Middle Pier, H: Old Fort, G: Soldier Point, E: Surry Boat Yard, B: The Canal, I: West pier.

-: δεν λήφθηκε δείγμα

Πίνακας I.6 Κοκκομετρική ανάλυση δειγμάτων θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από η Brighton marina

Σημείο δειγμα- τοληψίας	1 ^η δειγματοληψία			2 ^η δειγματοληψία			3 ^η δειγματοληψία		
	07/2003			12/2003			02/2004		
	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)	> 180 μm (%)	180-63 μm (%)	<63 μm (%)
A	-	-	-	2,13	16,75	81,12	0,62	24,30	75,07
B	-	-	-	0,45	7,85	91,70	2,76	24,82	72,42
C	0,00	16,98	83,02	3,11	18,01	78,88	0,00	11,37	88,63
D	-	-	-	0,00	19,42	80,58	0,00	24,28	75,72
E	-	-	-	0,65	12,79	86,56	0,00	16,47	83,53
F	0,00	0,00	100,00	2,08	5,77	92,16	2,12	15,97	81,92
G	0,00	0,00	100,00	0,83	2,56	96,61	16,04	4,29	79,67
H	0,00	7,19	92,81	-	-	-	0,43	6,98	92,59
I	0,00	0,00	100,00	4,45	0,22	13,51	0,00	32,78	67,22
J	0,00	22,34	77,66	4,05	0,69	31,17	*	*	*
L	0,16	34,98	64,86	1,64	46,22	52,15	-	-	-
M	0,29	4,58	95,14	-	-	-	0,00	2,38	97,62
O	0,00	2,64	97,36	0,78	3,68	95,54	0,76	7,16	92,08
P	0,78	7,27	91,94	0,48	15,96	83,56	-	-	-
W	-	-	-	-	-	-	1,05	9,88	89,07

-: δεν λήφθηκε δείγμα

*: απώλεια δείγματος κατά την ανάλυση

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

**ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΟ SHOREHAM
HARBOUR ΚΑΙ ΤΗ BRIGHTON MARINA (UK)**

Πίνακας Π.1 Συγκέντρωση του irgarol 1051 (ng L⁻¹) σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

	Ημερομηνία δειγματοληψίας								
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η	5 ^η	6 ^η	7 ^η	8 ^η	9 ^η
	03/2003	05/2003	07/2003	08/2003	10/2003	11/2003	12/2003	01/2004	02/2004
Σημείο δειγματοληψίας	Συγκέντρωση (ng L ⁻¹)								
Aldrigton Wharf	-	123	56,5	3,17	21,0	11,98	+	10,6	10,04
Emerald Quay	24,0	11,90	119	4,40	9,2	+	+	13,4	9,80
Lady Bee marina	-	136	87,3	6,70	24,1	15,00	+	35,2	12,60
Middle Pier	26,9	14,9	36,2	+	3,2	+	+	+	+
Old Fort	23,3	7,80	5,8	+	+	+	+	+	+
Soldier Point	26,6	82,2	42,3	+	4,43	3,83	+	+	+
Surry Boat Yard	-	87,8	32,4	+	5,26	+	+	-	+
The Canal	-	17,5	41,7	5,75	10,97	8,79	+	9,48	9,49
West Pier	25,0	60,2	7,1	+	+	+	+	+	+

-: δεν λήφθηκε δείγμα

+: η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (LOD = 3,1 ng L⁻¹)

Πίνακας Π.2 Συγκέντρωση του M1 (ng L⁻¹) σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

	Ημερομηνία δειγματοληψίας								
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η	5 ^η	6 ^η	7 ^η	8 ^η	9 ^η
	03/2003	05/2003	07/2003	08/2003	10/2003	11/2003	12/2003	01/2004	02/2004
Σημείο δειγματοληψίας	Συγκέντρωση (ng L ⁻¹)								
Aldrigton Wharf	-	56,1	16,9	1,1	9,6	2,5	+	1,9	3,1
Emerald Quay	5,9	3,6	15,0	0,9	1,0	1,4	+	2,7	2,0
Lady Bee marina	-	36,6	19,8	1,7	2,1	3,7	+	2,4	4,0
Middle Pier	8,5	7,0	25,0	+	3,3	4,7	+	1,1	1,4
Old Fort	4,7	2,9	3,8	+	0,9	1,0	+	25,8	+
Soldier Point	3,9	15,5	3,8	+	1,3	0,6	+	1,2	0,7
Surry Boat Yard	-	45,4	58,9	+	1,2	2,8	+	-	0,7
The Canal	-	14,6	8,6	0,7	1,9	2,7	+	2,5	2,1
West Pier	4,4	9,3	14,9	+	+	+	+	+	0,7

-: δεν λήφθηκε δείγμα

+: η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (LOD = 0,5 ng L⁻¹)

Πίνακας Π.3 Συγκέντρωση του diuron (ng L⁻¹) σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

	Ημερομηνία δειγματοληψίας								
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η	5 ^η	6 ^η	7 ^η	8 ^η	9 ^η
	03/2003	05/2003	07/2003	08/2003	10/2003	11/2003	12/2003	01/2004	02/2004
Σημείο δειγματοληψίας	Συγκέντρωση (ng L ⁻¹)								
Aldrigton Wharf	-	103	*	+	366	+	+	+	+
Emerald Quay	+	81,2	+	+	+	+	+	+	+
Lady Bee marina	-	123	107	+	250	+	+	+	+
Middle Pier	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Old Fort	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Soldier Point	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Surry Boat Yard	-	96	+	36,2	+	+	+	-	+
The Canal	-	*	62,7	*	163	+	+	+	+
West Pier	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-: δεν λήφθηκε δείγμα

+: η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (LOD = 7 ng L⁻¹)

*: το δείγμα χάθηκε κατά την ανάλυση

Πίνακας Π.4 Συγκεντρώσεις του irgarol 1051, του M1 και του diuron (ng L⁻¹) σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina.

Σημείο δειγματοληψίας	1 ^η δειγματοληψία (07/2003)			2 ^η δειγματοληψία (12/2003)			3 ^η δειγματοληψία (02/2004)		
	Συγκέντρωση (ng L ⁻¹)								
	M1	Irgarol 1051	Diuron	M1	Irgarol 1051	Diuron	M1	Irgarol 1051	Diuron
A	5,2	26,3	165	2,4	19,9	+	0,8	+	+
B	2,5	28,3	125	0,9	+	+	+	+	+
C	3,2	18,8	+	+	+	+	1,0	+	+
D	2,2	30,3	+	1,0	+	+	+	+	+
E	4,6	45,7	+	0,6	+	+	1,0	3,5	+
F	5,0	102	69,7	4,6	6,2	+	0,8	3,2	+
G	3,9	37,4	188	1,5	+	+	+	+	+
H	-	-	-	36,9	55,8	+	+	+	+
I	2,5	23,3	85,4	1,2	5,1	+	1,6	+	+
J	9,2	17,3	+	0,9	5,9	+	+	+	+
L	1,2	6,6	+	1,4	+	+	+	+	+
M	9,6	19,9	+	*	*	*	0,6	+	+
O	7,1	41,1	236	0,9	5,1	+	0,8	+	+
P	3,4	30,3	+	0,8	8,8	+	+	+	+
W	2,5	25,5	105	1,4	6,3	+	+	5,7	+

-: δεν λήφθηκε δείγμα

+: η ουσία δεν ανιχνεύτηκεν (LOD_{irgarol 1051} = 3,1 ng L⁻¹, LOD_{M1} = 0,7 ng L⁻¹, LOD_{diuron} = 7 ng L⁻¹)

*: το δείγμα χάθηκε κατά την ανάλυση

Πίνακας Π.5 Συγκέντρωση του irgarol 1051 (ng g⁻¹) σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

	Ημερομηνία δειγματοληψίας								
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η	5 ^η	6 ^η	7 ^η	8 ^η	9 ^η
	03/2003	05/2003	07/2003	08/2003	10/2003	11/2003	12/2003	01/2004	02/2004
Σημείο δειγματοληψίας	Συγκέντρωση (ng g ⁻¹)								
Aldrigton Wharf	-	9,2	-	-	-	-	-	-	+
Emerald Quay	5,5	3,2	5,7	+	2,3	2,7	8,1	2,7	3,2
Lady Bee marina	-	12,0	33,2	9,9	10,5	16,4	38,5	7,0	40,0
Middle Pier	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-
Old Fort	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Soldier Point	+	1,9	-	*	-	-	+	+	-
Surry Boat Yard	-	2,5	-	2,5	11,9	5,0	2,6	+	+
The Canal	-	9,9	-	-	-	-	-	-	+
West Pier	+	9,2	-	-	-	-	-	-	-

-: δεν λήφθηκε δείγμα

+: η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (LOD = 1,7 ng g⁻¹)

Πίνακας Π.6 Συγκέντρωση του M1 (ng g⁻¹) σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

	Ημερομηνία δειγματοληψίας								
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η	5 ^η	6 ^η	7 ^η	8 ^η	9 ^η
	03/2003	05/2003	07/2003	08/2003	10/2003	11/2003	12/2003	01/2004	02/2004
Σημείο δειγματοληψίας	Συγκέντρωση (ng g ⁻¹)								
Aldrigton Wharf	-	7,4	-	-	-	-	-	-	+
Emerald Quay	1,3	4,1	+	+	1,6	+	1,2	0,4	0,4
Lady Bee marina	-	4,4	4,8	8,8	5,7	+	22,7	1,8	12,8
Middle Pier	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Old Fort	+	-	-	+	-	-	+	0,3	-
Soldier Point	+	1,6	-	+	-	-	+	+	-
Surry Boat Yard	-	+	-	+	1,9	+	1,3	+	0,6
The Canal	-	8,7	-	-	-	-	-	-	+
West Pier	+	7,4	-	-	-	-	-	-	-

-: δεν λήφθηκε δείγμα

+: η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (LOD = 0,9 ng g⁻¹)

Πίνακας II.7 Συγκέντρωση της DCPMU (ng g⁻¹) σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.

	Ημερομηνία δειγματοληψίας								
	1 ^η	2 ^η	3 ^η	4 ^η	5 ^η	6 ^η	7 ^η	8 ^η	9 ^η
	03/2003	05/2003	07/2003	08/2003	10/2003	11/2003	12/2003	01/2004	02/2004
Σημείο δειγματοληψίας	Συγκέντρωση (ng g ⁻¹)								
Aldrigton Wharf	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Emerald Quay	+	+	42,2	+	+	+	29,5	62,1	+
Lady Bee marina	-	+	+	177	122	161	+	+	+
Middle Pier	8,26	-	-	-	-	-	-	-	-
Old Fort	+	-	-	+	-	-	+	<4	-
Soldier Point	<4	+	-	1,89	-	-	+	+	-
Surry Boat Yard	-	19,1	-	+	+	+	+	+	9,81
The Canal	-	+	-	-	-	-	-	-	+
West Pier	+	+	-	-	-	-	-	-	-

-: δεν λήφθηκε δείγμα

+: η ουσία δεν ανιχνεύτηκε (LOD = 4 ng g⁻¹)

Πίνακας Π.8 Συγκέντρωση του M1, του Irgarol 1051 και της DCPMU (ng g⁻¹) σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.

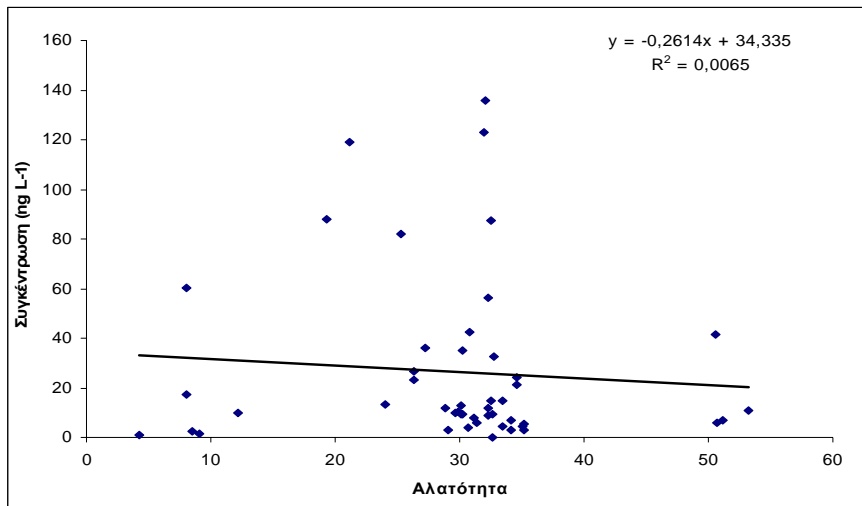
Σημείο δειγματοληψίας	1 ^η δειγματοληψία (07/2003)			2 ^η δειγματοληψία (12/2003)			3 ^η δειγματοληψία (02/2004)		
	Συγκέντρωση (ng g ⁻¹)								
	M1	Irgarol 1051	DCPMU	M1	Irgarol 1051	DCPMU	M1	1051 Irgarol 1051	DCPMU
A	-	-	-	+	+	+	+	2,8	+
B	-	-	-	+	1,7	+	-	-	-
C	3,5	3,8	+	1,2	3,4	15,4	0,9	2,5	12,2
D	-	-	-	+	+	+	+	2,1	+
E	-	-	-	+	4,5	+	+	10,1	+
F	2,3	1,8	+	+	+	29,4	+	2,0	+
G	4,6	8,0	+	1,4	3,4	+	+	4,3	56,5
H	2,5	3,6	+	-	-	-	1,0	2,7	+
I	5,6	8,7	+	+	7,0	+	3,4	5,5	15,0
J	+	3,8	5,2	+	+	9,7	+	2,0	+
L	+	+	+	+	2,2	+	-	-	-
M	+	4,0	+	-	-	-	4,7	49,3	+
O	2,9	6,5	+	1,1	4,1	+	1,3	2,5	+
P	+	+	+	+	+	+	-	-	-
W	+	+	+	-	-	-	+	+	+

-: δεν λήφθηκε δείγμα

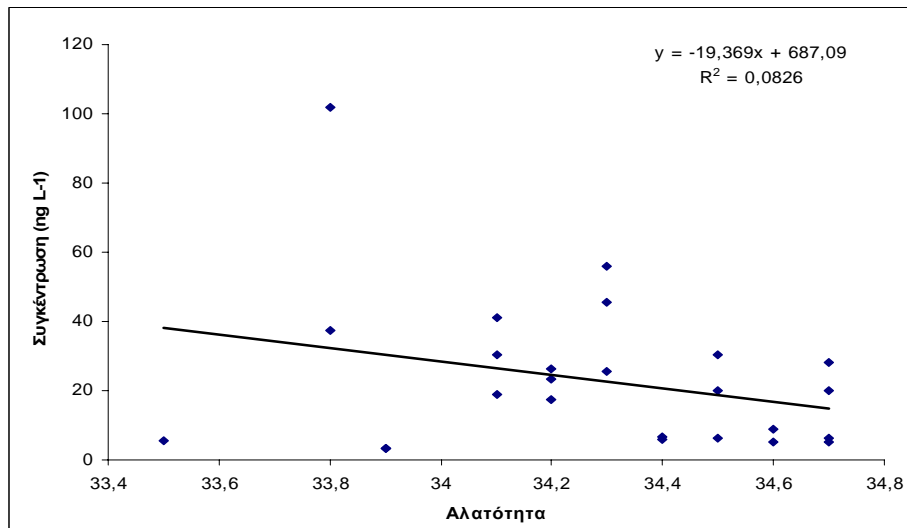
+: η ουσία δεν ανιχνεύτηκεν (LOD_{Irgarol 1051} = 1,7 ng g⁻¹, LOD_{M1} = 0,9 ng g⁻¹, LOD_{DCPMU} = 4 ng g⁻¹)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

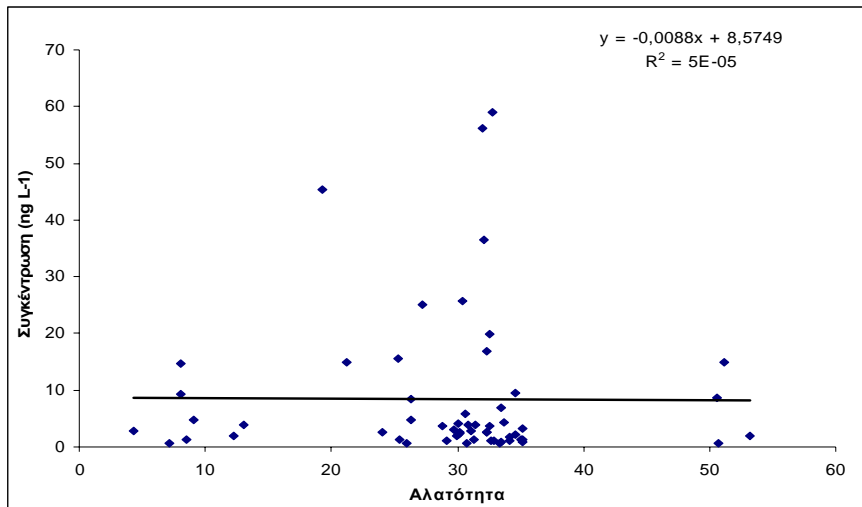
**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΝΟΜΗ
ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ**



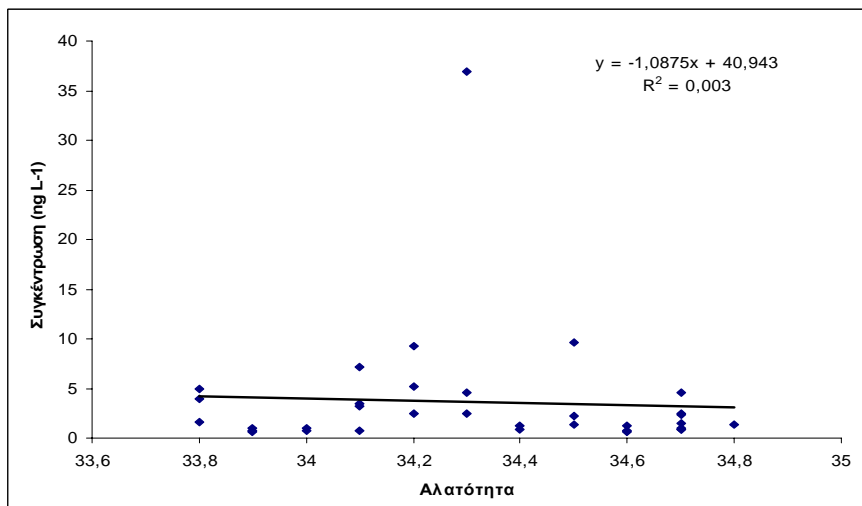
Σχήμα III.1 Επίδραση της αλατότητας στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L^{-1}) του irgarol 1051 σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



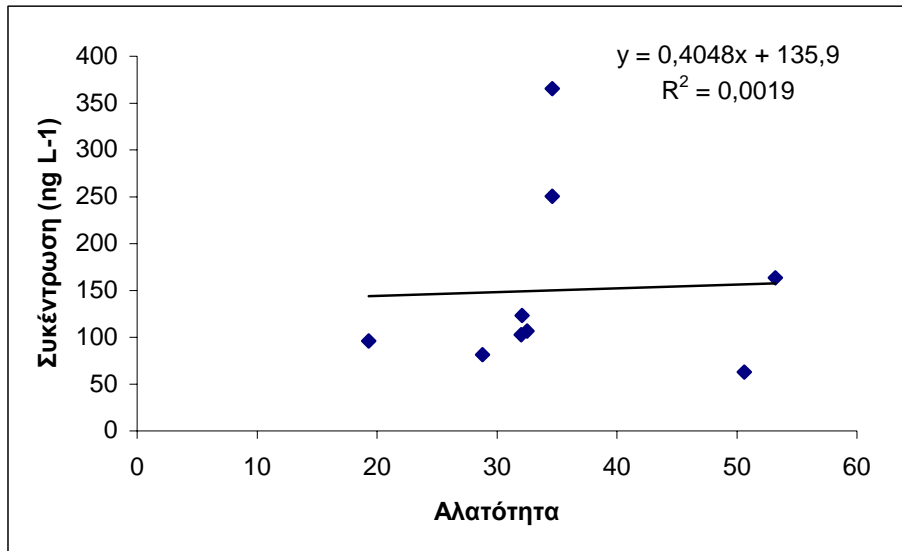
Σχήμα III.2 Επίδραση της αλατότητας στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L^{-1}) του irgarol 1051 σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina.



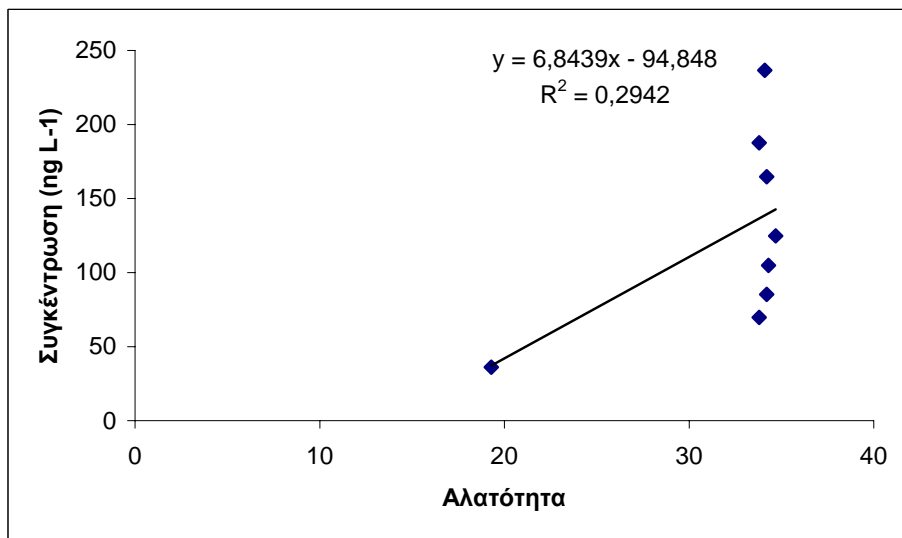
Σχήμα III.3 Επίδραση της αλατότητας στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L⁻¹) του M1 σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



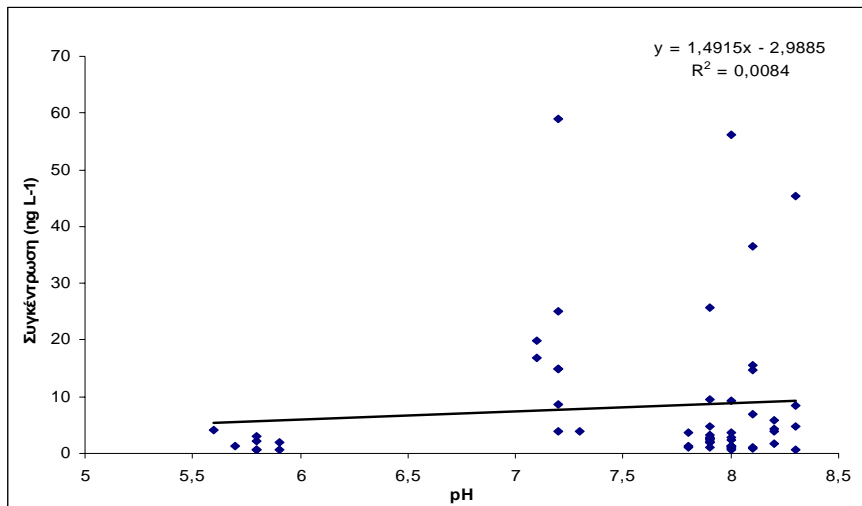
Σχήμα III.4 Επίδραση της αλατότητας στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L⁻¹) του M1 σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina.



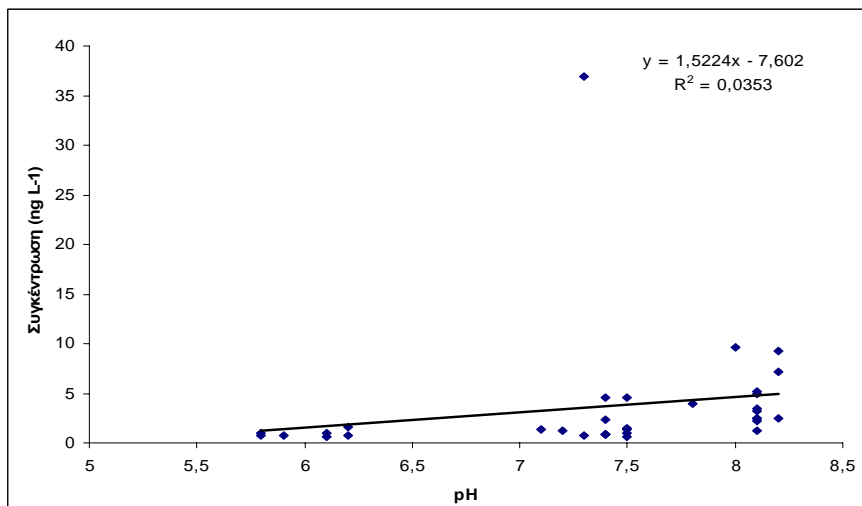
Σχήμα III.5 Επίδραση της αλατότητας στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L⁻¹) του diuron σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



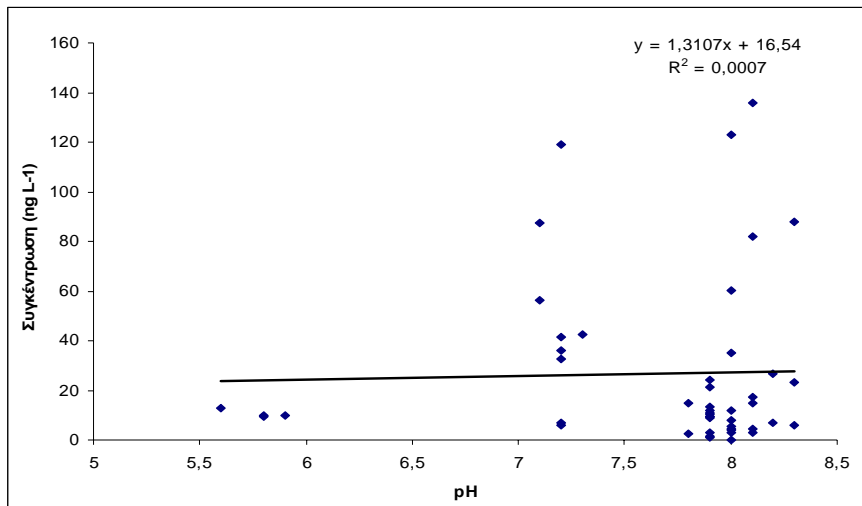
Σχήμα III.6 Επίδραση της αλατότητας στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L⁻¹) του diuron σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina.



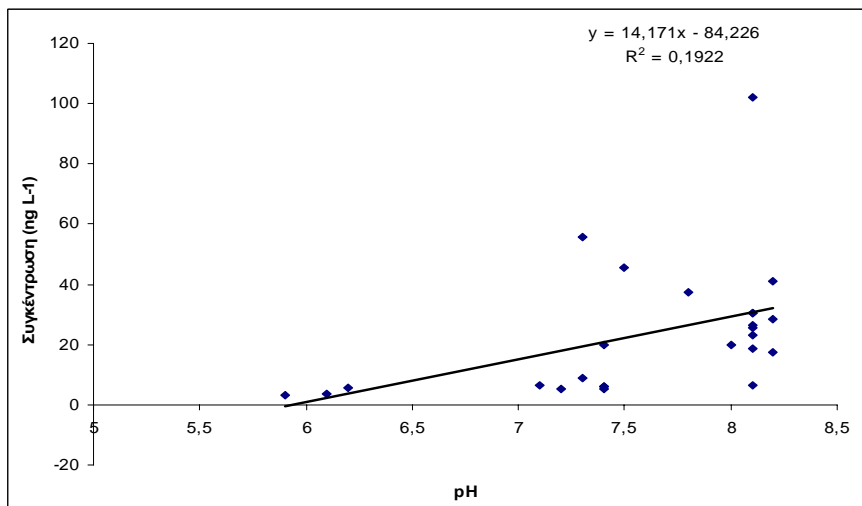
Σχήμα III.7 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L⁻¹) του M1 σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



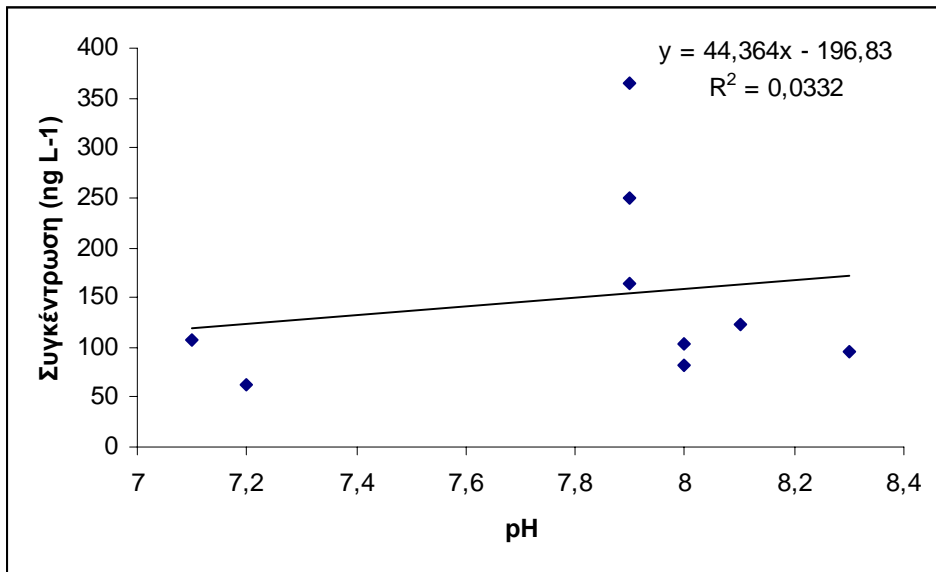
Σχήμα III.8 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L⁻¹) του M1 σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina.



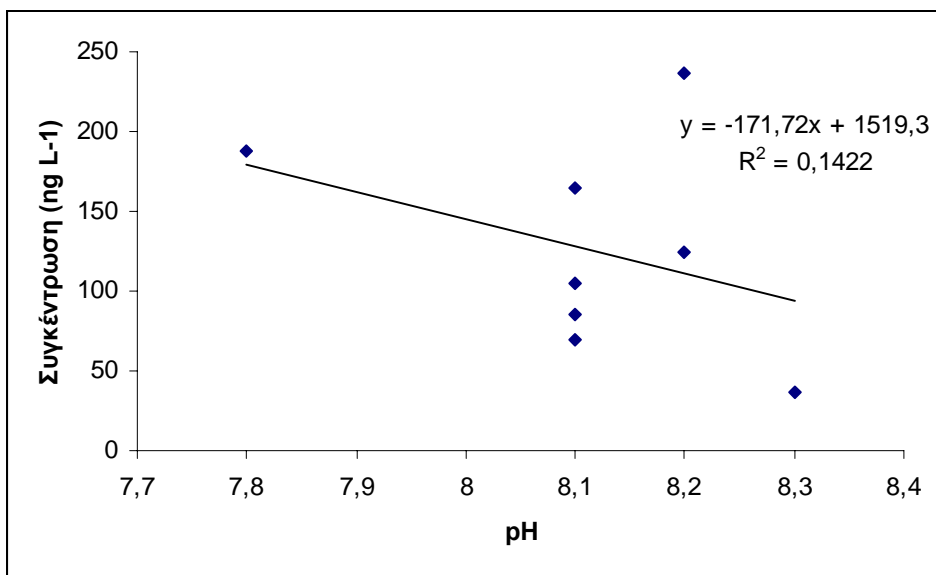
Σχήμα III.9 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L⁻¹) του irgarol 1051 σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



Σχήμα III.10 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L⁻¹) του irgarol 1051 σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina.



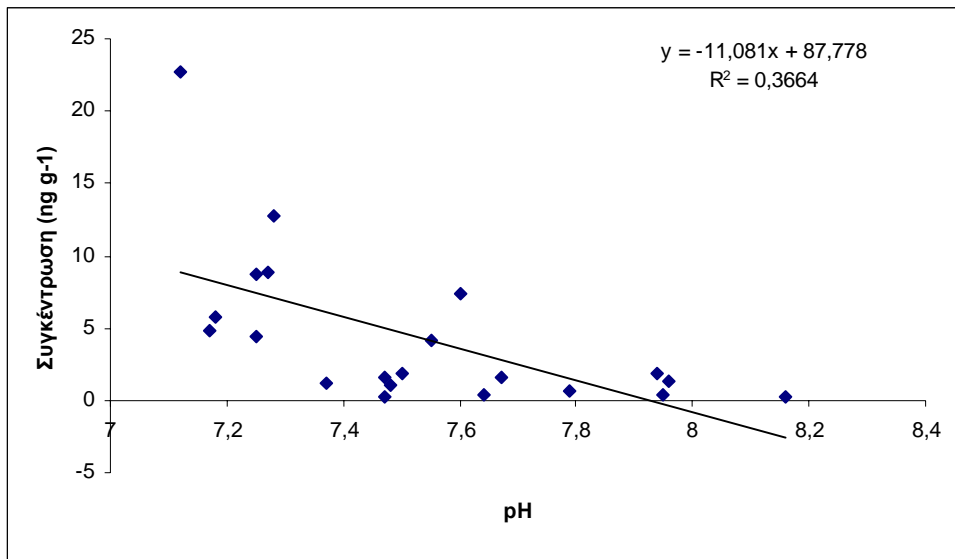
Σχήμα III.11 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L^{-1}) του diuron σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



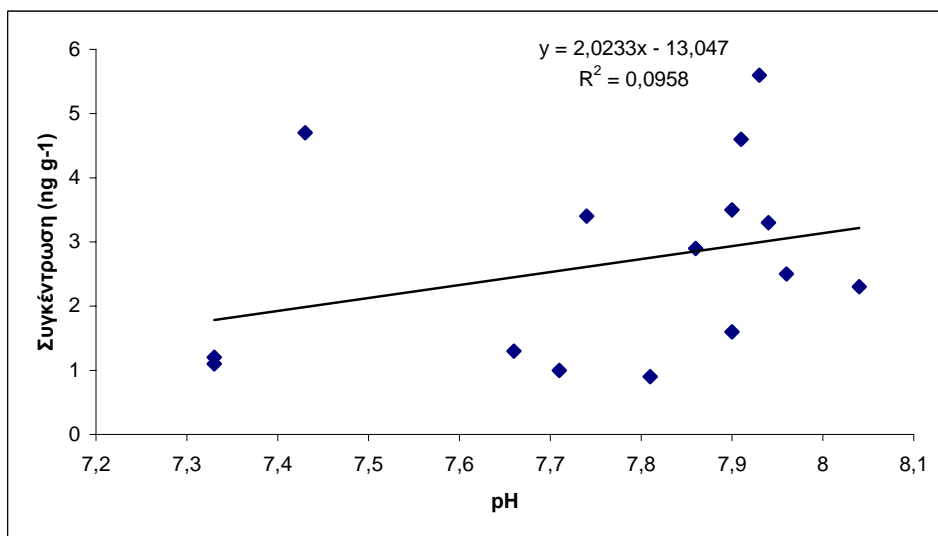
Σχήμα III.12 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng L^{-1}) του diuron σε δείγματα θαλασσινού νερού προερχόμενα από τη Brighton marina.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV

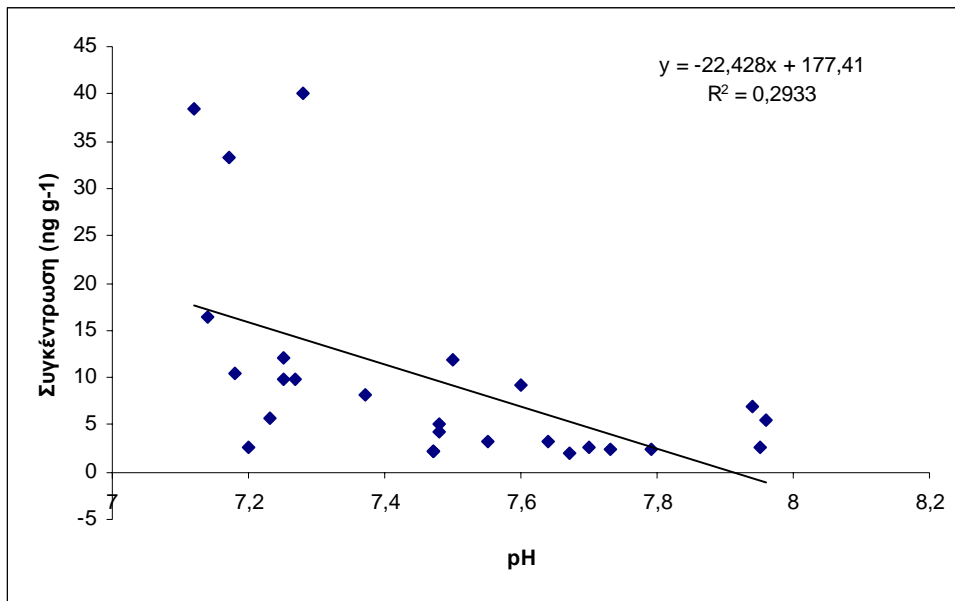
**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥ ΙΖΗΜΑΤΟΣ ΣΤΗΝ
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΟΥΣΙΩΝ**



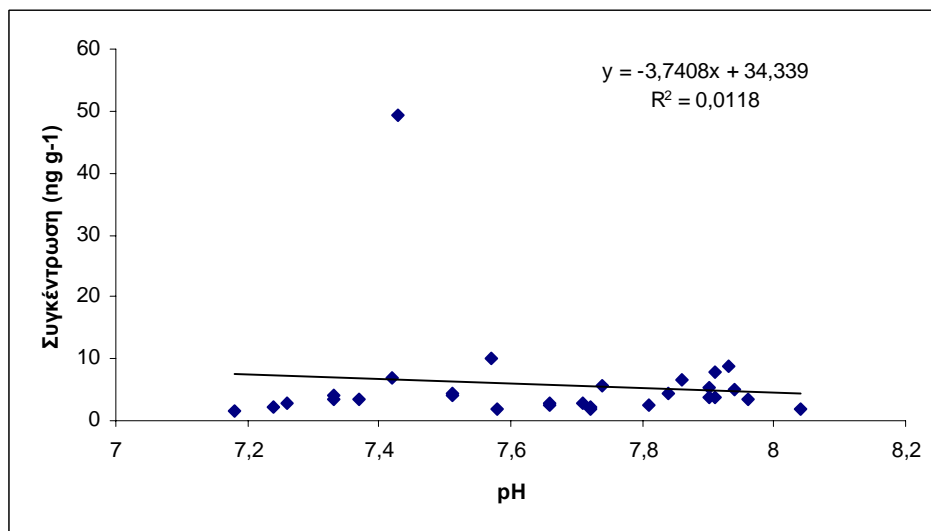
Σχήμα IV.1 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g^{-1}) του M1 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



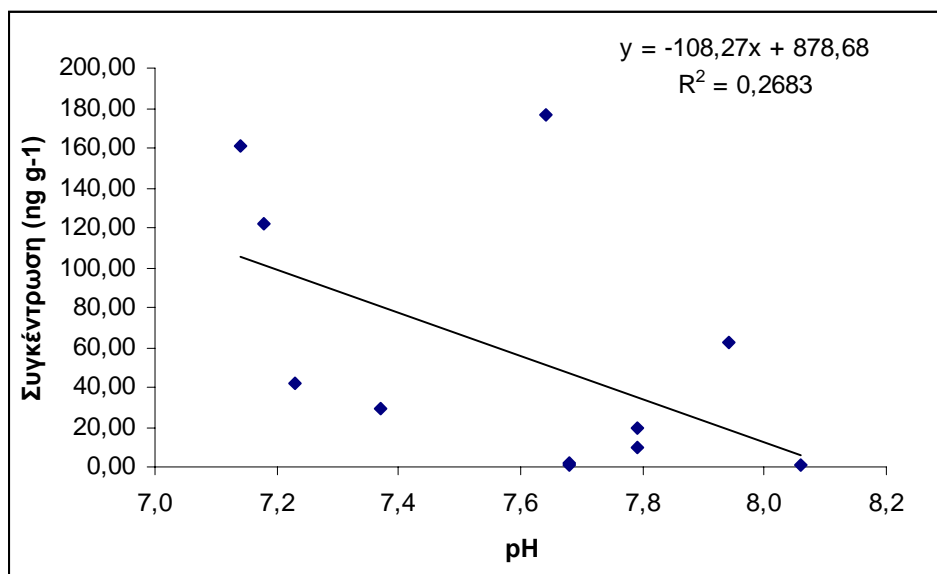
Σχήμα IV.2 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g^{-1}) του M1 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.



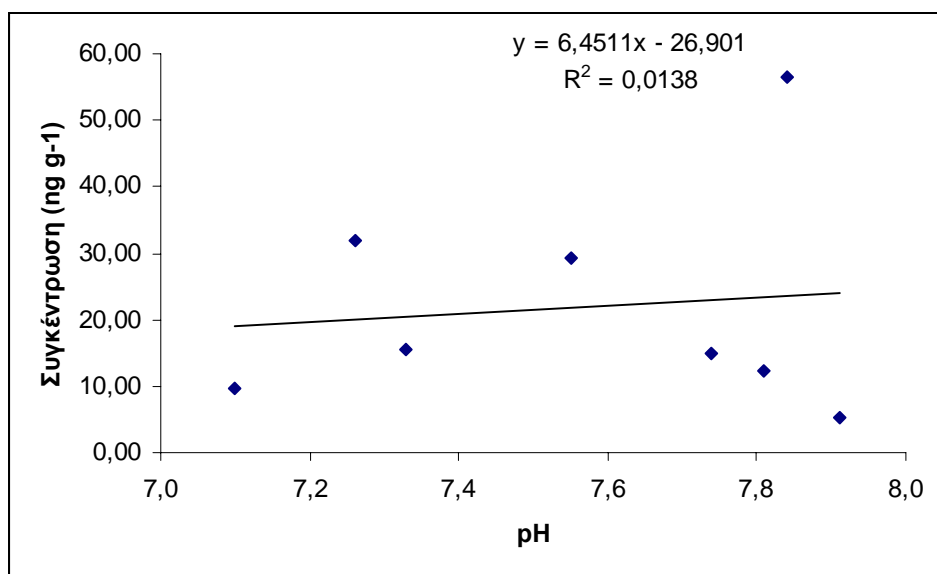
Σχήμα IV.3 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) του irgarog 1051 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



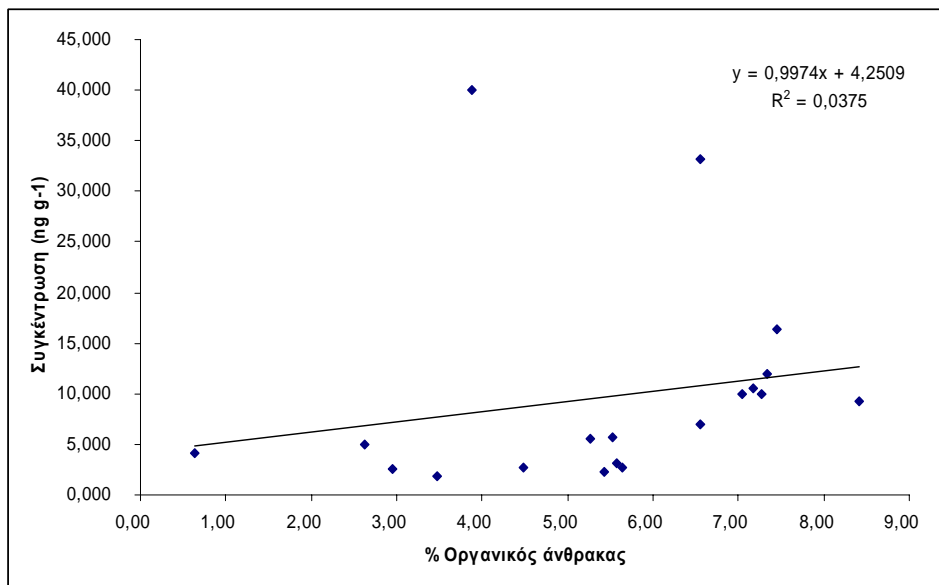
Σχήμα IV.4 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) του irgarog 1051 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.



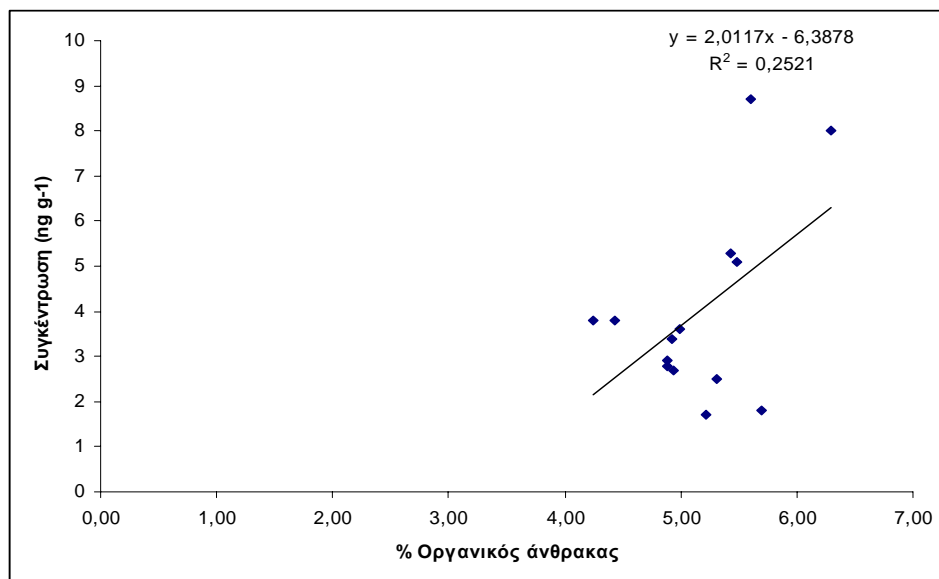
Σχήμα IV.5 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) της DCPMU σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



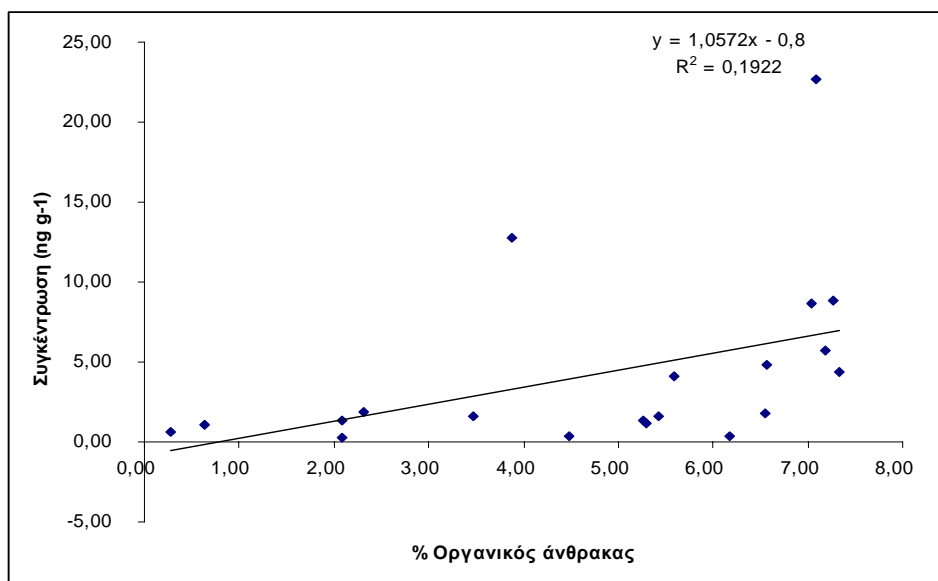
Σχήμα IV.6 Επίδραση του pH στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) της DCPMU σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.



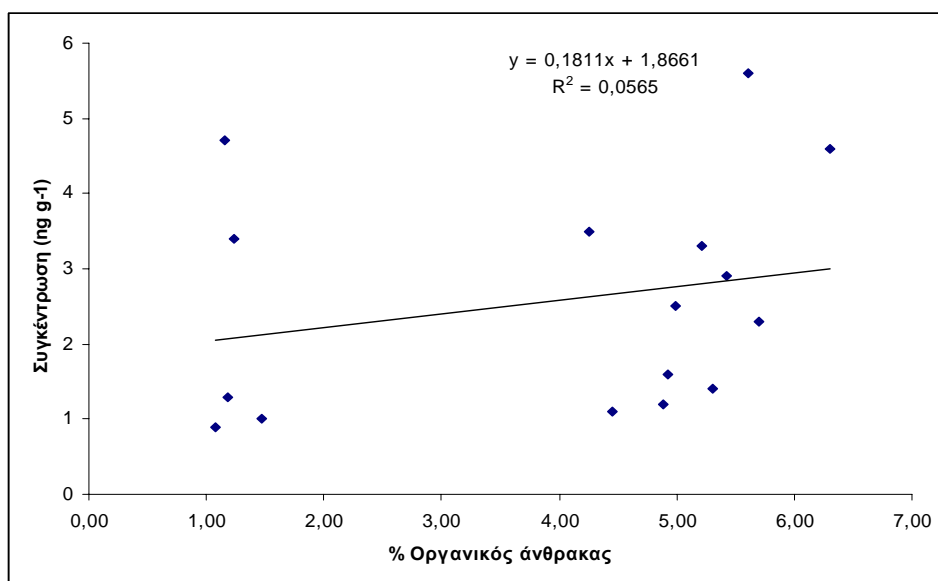
Σχήμα IV.7 Επίδραση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) του Irgarol 1051 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



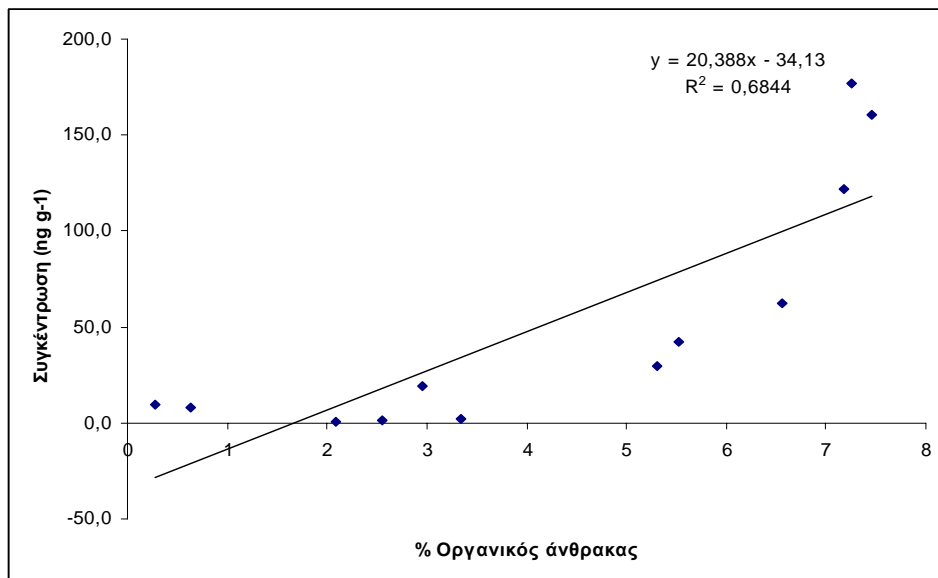
Σχήμα IV.8 Επίδραση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) του Irgarol 1051 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.



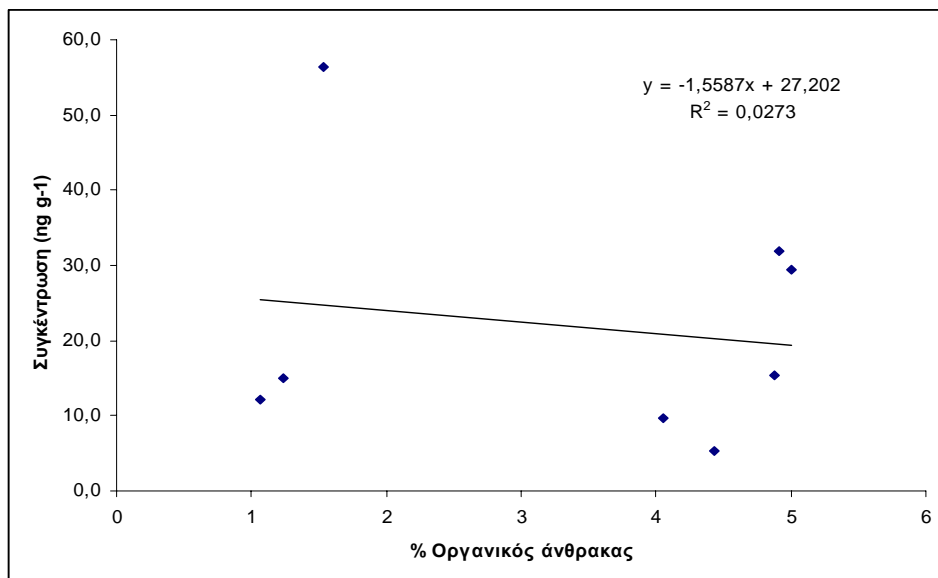
Σχήμα IV.9 Επίδραση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) του M1 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



Σχήμα IV.10 Επίδραση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) του M1 σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.



Σχήμα IV.11 Επίδραση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) της DCPMU σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από το Shoreham Harbour.



Σχήμα IV.12 Επίδραση της % περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα στην κατανομή της συγκέντρωσης (ng g⁻¹) της DCPMU σε δείγματα θαλάσσιου ιζήματος προερχόμενα από τη Brighton marina.