



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού κυανοτοξινών και
οργανικών ρύπων σε νερά με υγροχρωματογραφία-
συζευγμένη φασματομετρία μαζών**

**ΣΕΒΑΣΤΗ – ΚΥΡΙΑΚΗ ΖΕΡΒΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2018



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού κυανοτοξινών και
οργανικών ρύπων σε νερά με υγροχρωματογραφία-
συζευγμένη φασματομετρία μαζών**

**ΣΕΒΑΣΤΗ – ΚΥΡΙΑΚΗ ΖΕΡΒΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2018

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού κυανοτοξινών και οργανικών ρύπων σε νερά με υγροχρωματογραφία-συζευγμένη φασματομετρία μαζών

ΣΕΒΑΣΤΗ – ΚΥΡΙΑΚΗ ΖΕΡΒΟΥ

A.M.: 001107

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Δρ. Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Δρ. Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Δρ. Αναστασία Χισκιά, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Δρ. Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Δρ. Αναστασία Χισκιά, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Δρ. Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Δρ. Νικόλαος Θωμαΐδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Δρ. Ευάγγελος Μπακέας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Δρ. Εμμανουήλ Δασενάκης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ

Δρ. Θεόδωρος Τριάντης, Ερευνητής Β', ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 09/07/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κυανοβακτήρια αναπτύσσονται στο υδάτινο περιβάλλον και κάτω από ευνοϊκές συνθήκες πολλαπλασιάζονται σχηματίζοντας έντονες ανθίσεις (blooms) ελευθερώνοντας συχνά στο νερό τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες, τις κυανοτοξίνες που αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για τα υδάτινα οικοσυστήματα, τους ταμιευτήρες πόσιμου νερού και την δημόσια υγεία. Οι κυανοτοξίνες είναι μία μεγάλη ομάδα ενώσεων με ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες, χημικές δομές και τοξική δράση (ηπατοτοξικές, νευροτοξικές, δερματοτοξικές, κυτταροτοξικές). Οι κυανοτοξίνες κατηγοριοποιούνται κυρίως με βάση τη δομή τους σε κυκλικά πεπτίδια (όπως Microcystins, Nodularins), αλκαλοειδή (όπως Cylindrospermopsin, Anatoxin), λιποπολυσακχαρίτες και αμινοξέα. Οι περισσότερες μελέτες για την ανάλυση των κυανοτοξινών εστιάζουν στον προσδιορισμό μίας κατηγορίας κυανοτοξινών. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία γρήγορη, απλή και ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών (Cylindrospermopsin, Anatoxin-a, Nodularin, 12 Microcystins ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF), καθώς και των πολύ διαδεδομένων θαλάσσιων φυκοτοξινών Okadaic acid και Domoic acid στο νερό με μία μόνο ανάλυση. Ο προσδιορισμός των ενώσεων έγινε με υγροχρωματογραφία – συζευγμένη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS). Για την προκατεργασία του δείγματος και την αποτελεσματική εκχύλιση όλων των αναλυτών από το νερό αναπτύχθηκε μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), με διάταξη διπλού φυσιγγίου αποτελούμενη από Oasis HLB και Hyper PGC. Επιπλέον, αναπτύχθηκε μέθοδος για την ταυτόχρονη εκχύλιση διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών (Cylindrospermopsin, Anatoxin-a and Microcystins) από λυοφιλοποιημένη κυανοβακτηριακή βιομάζα, όπου μελετήθηκε η επίδραση διάφορων παραγόντων στην απόδοση της εκχύλισης. Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι εφαρμόστηκαν αποτελεσματικά στην ανάλυση δειγμάτων από λίμνες της Ελλάδας, όπου ανιχνεύθηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στον ελλαδικό χώρο η παρουσία των κυανοτοξινών Cylindrospermopsin, Anatoxin-a και ποικίλων Microcystins. Οι οργανικοί ρύποι του νερού, εκτός από φυσικής προέλευσης, είναι και επικίνδυνες ουσίες από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Στα πλαίσια της προστασίας του υδάτινου περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας εκδόθηκε η πιο πρόσφατη ευρωπαϊκή οδηγία (2013/39/EE) για τις ουσίες προτεραιότητας με αναθεωρημένα και αυστηρότερα πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος (ΠΠΠ) και με την απόφαση 2015/495/EE δημιουργήθηκε ο πρώτος κατάλογος επιτήρησης με αναδυόμενους ρύπους του νερού. Οι οδηγίες αυτές προτείνουν νέες στρατηγικές για την αντιμετώπιση της ρύπανσης του νερού και την ανάπτυξη νέων μεθόδων για την συστηματική παρακολούθηση των ρύπων του νερού. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία πολυδύναμη μέθοδος για τον προσδιορισμό 29 οργανικών ρύπων του νερού (17α-Ethinylestradiol, β-Estradiol, Diclofenac, Alachlor, Atrazine, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Diuron, Isoproturon, Simazine, Trifluralin, Pentachlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorotoluron, Cyanazine, Diazinon, Dimethoate, Ethion, Fenthion, Linuron, Malathion, Methidathion, Metribuzine, Monuron, Phosalone, Propazine και Triazophos) με LC-MS/MS, εκ των οποίων οι 13 περιλαμβάνονται είτε στις ουσίες προτεραιότητας είτε στον κατάλογο επιτήρησης και οι υπόλοιπες 16 είναι ευρέως χρησιμοποιηθέντα φυτοφάρμακα, πολλά εκ των οποίων έχουν απαγορευθεί. Για τον καθαρισμό του δείγματος και την προσυγκέντρωση των αναλυτών από το νερό, αναπτύχθηκε μέθοδος SPE επιτυγχάνοντας υψηλή ευαισθησία με LODs της τάξης των ng/L.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αναλυτική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κυανοτοξίνες, Φυκοτοξίνες, Οργανικοί ρύποι, Εκχύλιση στερεάς φάσης, Υγροχρωματογραφία – συζευγμένη φασματομετρία μαζών

ABSTRACT

Cyanobacteria, also known as blue-green algae, are present in surface waters and under favorable environmental conditions can form extensive algal blooms and release hazardous toxic compounds (cyanotoxins), posing a significant risk to aquatic ecosystems, drinking water sources and human health. Cyanotoxins comprise a large group of organic compounds, with a variety of physicochemical properties, chemical structures and toxic activity (hepatotoxicity, neurotoxicity, cytotoxicity, dermatotoxicity). Cyanotoxins are classified based on their structure on cyclic peptides (i.e. Microcystins, Nodularins), alkaloids (i.e. Cylindrospermopsin, Anatoxin), lipopolysaccharides and amino acids. Most of the studies on the occurrence of cyanotoxins have been targeted to specific compounds or to variants within a class of cyanotoxins. In this thesis, a fast, simple and sensitive analytical method was developed for the simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins in water in one run. The target compounds were: Cylindrospermopsin, Anatoxin-a, Nodularin, 12 Microcystins ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW and MC-LF), Okadaic acid and Domoic acid. Analytes were determined using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) in MRM mode. A dual Solid Phase Extraction (SPE) cartridge assembly (two tandem SPE cartridges, Oasis HLB and Hyper PGC) was applied for the efficient extraction of target compounds from water. Moreover, a method was developed for the simultaneous extraction of several cyanotoxins (Cylindrospermopsin, Anatoxin-a and Microcystins) from lyophilized cyanobacterial biomass. During method development several extraction parameters were evaluated. Detection and identification of cyanotoxins Cylindrospermopsin, Anatoxin-a and a wide range of Microcystins in Greek lakes for the first time have demonstrated the applicability and efficiency of the proposed methods.

Apart from the natural contaminants of water there are also anthropogenic contaminants with emerging concern. The latest EU Directive on Environmental Quality Standards (EQS Directive 2013/39/EU) has proposed new strategies against water pollution and novel monitoring methods for priority substances. Additionally, the EU Decision 2015/495/EE has established a watch list of emerging contaminants for Union-wide monitoring in the field of water policy. The above directives and decisions implements revised and stricter EQS and making necessary the development and validation of novel multi-residue methods for the determination of micropollutants of water. In this thesis, the development of a novel method for the simultaneous determination of various organic pollutants (i.e. pesticides, endocrine disruptors, pharmaceuticals) in water is presented. The 29 target compounds (17 α -Ethinylestradiol, β -Estradiol, Diclofenac, Alachlor, Atrazine, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Diuron, Isoproturon, Simazine, Trifluralin, Pentachlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorotoluron, Cyanazine, Diazinon, Dimethoate, Ethion, Fenthion, Linuron, Malathion, Methidathion, Metribuzine, Monuron, Phosalone, Propazine and Triazophos), 13 of which are either considered as priority substances or included in watch list and the rest 16 were widely used pesticides many of them have been banned, were determined using liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) in MRM mode. SPE method, utilizing Oasis HLB cartridges, was developed for sample clean-up and analytes preconcentration from water, enabling high sensitivity with LODs at ng/L level.

SUBJECT AREA: Analytical Chemistry

KEYWORDS: Cyanotoxins, Algal toxins, Organic pollutants, Solid Phase Extraction, Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry

*Στην οικογένειά μου
& στην μνήμη του παππού μου Αρχιμανδρίτη Κωνσταντίνου Αβδελή
που από μικρό παιδί με ενέπνευσε να γίνω επιστήμονας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών για την απόκτηση διδακτορικού διπλώματος του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ανάθεση του θέματος καθώς και η εκπόνηση του πειραματικού μέρους πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Καταλυτικών – Φωτοκαταλυτικών Διεργασιών και Περιβαλλοντικών Αναλύσεων, του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «Δημόκριτος».

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου που με στήριξαν κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Δρ. Αντώνη Καλοκαιρινό, επιβλέποντα της διδακτορικής διατριβής μου για την εξαιρετική συνεργασία, την σημαντική και καταλυτική βοήθειά του καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του από το πρώτο μου έτος ως προπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Χημείας μέχρι την ολοκλήρωση και την υποστήριξη της διατριβής μου.

Το μεγαλύτερο και θερμότερο ευχαριστώ το οφείλω στην Δρ. Αναστασία Χισκιά, Ερευνήτρια Α' του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, που με εμπιστεύτηκε αναθέτοντάς μου το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, για την επιστημονική στήριξη, την καθοδήγηση και την ουσιαστική βοήθειά της στην υλοποίηση της διατριβής. Την ευχαριστώ θερμά που μου έδωσε τη δυνατότητα να γίνω μέλος στην ερευνητική της ομάδα, για τις ευκαιρίες που μου έδωσε και συνεχίζει να μου δίνει, για την εμπιστοσύνη της και την αμέριστη υποστήριξη όλα τα χρόνια της συνεργασίας μας. Από την συνεργασία μας διδάχτηκα πάρα πολλά πράγματα τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο και κυρίως με βοήθησε με τις συμβουλές της ώστε κάθε μέρα να γίνομαι καλύτερη. Επίσης, την ευχαριστώ για την πολύτιμη συμβολή της στην συγγραφή και την παρουσίαση της διατριβής μου.

Θερμά ευχαριστώ τον Δρ. Θεόδωρο Τριάντη, Ερευνητή Β' του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» και μέλος της επταμελούς επιτροπής μου, για την πολύτιμη βοήθειά του όποτε και αν την χρειάστηκα, για τις επικοινωνιακές συζητήσεις καθώς και για όλα όσα διδάχτηκα μέσα από την συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον Δρ. Τριαντάφυλλο Καλούδη για την επιστημονική υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια, την πολύτιμη βοήθειά του και τις επικοινωνιακές ιδέες του που τον καθιστούν από μηχανής θεό.

Ευλικρινά θέλω να ευχαριστήσω και τον συνεργάτη μου Δρ. Χριστόφορο Χριστοφορίδη για την επιστημονική υποστήριξή του στα ερευνητικά θέματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια της παρούσας διατριβής, την σημαντική βοήθειά του, τις συμβουλές του, την εξαιρετική συνεργασία και την συναδελφικότητά του.

Ευχαριστώ πολύ το ερευνητικό πρόγραμμα ΑΡΙΣΤΕΙΑ "CYANOWATER" με τίτλο: "Κυανοτοξίνες στο νερό. Εξελιξείς στην ανάλυση, την παρουσία τους και σε επεξεργασίες του νερού για την απομάκρυνσή τους" με επιστημονική υπεύθυνο την Δρ. Αναστασία Χισκιά για την χρηματοδότηση των πειραμάτων της παρούσας διατριβής αλλά και για την προσωπική μου χρηματοδότηση ως υποψήφια διδάκτωρ. Επίσης, ευχαριστώ την δράση COST Action ES 1105 «CYANOCOST -

Cyanobacterial blooms and toxins in water resources: Occurrence, impacts and management» με πρόεδρο τον Δρ. Τριαντάφυλλο Καλούδη για την βοήθεια δικτύωσης και την δυνατότητα ανταλλαγής απόψεων με ειδήμονες στον τομέα των κυανοβακτηρίων και κυανοτοξινών αλλά και για την βοήθεια ανάπτυξης συνεργασιών μέσα από το δίκτυο που αναπτύχθηκε.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους καλούς φίλους που απέκτησα κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου, τον Δρ. Νίκο Μουστάκα, τον Δρ. Μάριο Κροκίδη και τον οσονούπω Δρ. Μιχάλη Αρφάνη. Η καθημερινή βόλτα στο κυλικείο για τον πρωινό μας καφέ, οι μπίρες που πίναμε μαζί κάποια απογεύματα στο μαγαζί έξω από τον Δημόκριτο και τα σουβλάκια στα σκαλάκια του Ινστιτούτου στο Δημόκριτο αργά το βράδυ μετά από πολύωρα πειράματα είναι πράγματα που μου φόρτιζαν τις μπαταρίες και με βοηθούσαν να συνεχίζω ακάθεκτη. Όποτε χρειάστηκε ήσασταν εκεί για εμένα και χωρίς εσάς δεν θα είχα τόσες ωραίες αναμνήσεις από την εκπόνηση της διατριβής μου.

Τέλος, με όλη μου την ψυχή ευχαριστώ πάρα πολύ την οικογένειά μου, τους γονείς μου Ευάγγελο και Ευαγγελία και την αδερφή μου Άννα, για την αμέριστη συμπαράσταση, την υπομονή τους, την εμπιστοσύνη τους και την ακούραστη υποστήριξη που μου δίνουν όλα αυτά τα χρόνια ώστε να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT.....	vi
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	xvi
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
Κεφάλαιο 1 : Κυανοτοξίνες.....	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Κυανοβακτήρια.....	2
1.3 Κατηγορίες κυανοτοξινών.....	4
1.4 Φυκοτοξίνες.....	9
1.5 Κανονισμοί, οδηγίες & νομοθετικά όρια.....	11
1.6 Μέθοδοι προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών.....	12
1.7 Παρουσία κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στην Ελλάδα.....	20
Κεφάλαιο 2 : Οργανικοί ρύποι.....	24
2.1 Εισαγωγή.....	24
2.2 Φυτοφάρμακα.....	25
2.3 Ενδοκρινικοί διαταράκτες.....	32
2.4 Υπολείμματα φαρμακευτικών προϊόντων (Pharmaceuticals).....	34
2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό.....	35
Κεφάλαιο 3 : Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	37
3.1 Προετοιμασία δειγμάτων για μέτρηση.....	37
3.2 Προκατεργασία δείγματος με SPE.....	37
3.3 Οργανολογία SPE.....	40
3.4 Προσροφητικά υλικά SPE.....	41
Κεφάλαιο 4 : Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών.....	44
4.1 Υγροχρωματογραφία.....	44
4.2 Φασματομετρία μαζών.....	44
4.3 Οργανολογία συστήματος MS.....	45
4.4 Συζευγμένη φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS).....	54
4.5 Τεχνικές σάρωσης MS/MS.....	55
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	56
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	58
Κεφάλαιο 5 : Αντιδραστήρια – Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	58
5.1 Αντιδραστήρια.....	58

5.2 Συσκευές – Υλικά	60
5.3 Όργανα.....	61
5.4 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κυανοτοξινών και φυκοτοξινών	62
5.5 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων οργανικών ρύπων	62
Κεφάλαιο 6 : Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό και κυανοβακτηριακή μάζα	64
6.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών με LC-ESI-MS/MS.....	64
6.2 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό	65
6.3 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό ..	65
6.4 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή μάζα ..	68
6.5 Μελέτη παρουσίας κυανοτοξινών σε λίμνες της Ελλάδας.....	69
Κεφάλαιο 7 : Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό	73
7.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων με LC-APCI-MS/MS	73
7.2 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό.....	74
7.3 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό	76
7.4 Εφαρμογή της μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων σε δείγματα νερού.....	77
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	78
Κεφάλαιο 8 : Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών με την τεχνική LC-MS/MS.....	78
8.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο σύστημα ESI-MS/MS	78
8.2 Ανάπτυξη μεθόδου χρωματογραφικού διαχωρισμού κυανοτοξινών	83
8.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών ιοντισμού των κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο σύστημα LC-ESI-MS/MS.....	84
Κεφάλαιο 9 : Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό	86
9.1 Ανάπτυξη εκχύλισης στερεάς φάσης.....	86
9.2 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό .	92
Κεφάλαιο 10 : Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή βιομάζα	97
Κεφάλαιο 11 : Μελέτη παρουσίας κυανοτοξινών σε λίμνες της Ελλάδας	107
11.1 Παρουσία κυανοτοξινών στην κυανοβακτηριακή βιομάζα.....	107
11.2 Παρουσία κυανοτοξινών στο νερό	117

1.3 Κυανοτοξίνες στη λίμνη Καστοριά.....	121
Κεφάλαιο 12 : Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό	124
12.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων στο σύστημα APCI-MS/MS.....	124
12.2 Ανάπτυξη μεθόδων χρωματογραφικού διαχωρισμού οργανικών ρύπων	131
12.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών ιοντισμού οργανικών ρύπων στο σύστημα LC-APCI-MS/MS.....	133
12.4 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)	135
12.5 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων	142
12.6 Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα νερού	146
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	150
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	153

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο πλαίσιο του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών για την απόκτηση διδακτορικού διπλώματος του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το ερευνητικό μέρος της διατριβής διεξήχθη στο Εργαστήριο Καταλυτικών – Φωτοκαταλυτικών Διεργασιών και Περιβαλλοντικών Αναλύσεων, του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών (ΕΚΕΦΕ) «Δημόκριτος». Το εργαστήριο έχει πολυετή εμπειρία στην ανάπτυξη σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό ποικίλων οργανικών ρύπων όπως κυανοτοξίνες, φυτοφάρμακα, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) και πολυχλωριωμένα δυφαινύλια (PCBs) σε ποικίλα υποστρώματα όπως νερό, τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι το εργαστήριο αποτελεί ένα από τα πρωτοπόρα εργαστήρια στην ανάλυση κυανοτοξινών σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η ποιότητα των υδάτων τόσο επιφανειακών όσο και πόσιμων είναι ζωτικής σημασίας για τους ανθρώπους και επηρεάζει σημαντικά όλα τα οικοσυστήματα. Ο συστηματικός έλεγχος των υδάτων είναι απαραίτητος για την προστασία των υδάτινων πόρων, των οικοσυστημάτων και της δημόσιας υγείας. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η ύπαρξη σύγχρονων, αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των ενώσεων που είναι επιβλαβείς για το υδάτινο περιβάλλον και την δημόσια υγεία.

Οι κυανοτοξίνες είναι τοξικοί ρύποι βιογενοούς προέλευσης και αποτελούν αναδυόμενους ρύπους (emerging contaminants) του νερού που δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Είναι πολύ τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς, τα ζώα αλλά και τους ανθρώπους. Από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί πολλά περιστατικά δηλητηριάσεων από κυανοτοξίνες, και υπάρχουν περιπτώσεις που οι κυανοτοξίνες έχουν προκαλέσει τον θάνατο ανθρώπων. Οι κυανοτοξίνες κατατάσσονται σε πολλές κατηγορίες ανάλογα με την δομή τους, με την κάθε κατηγορία να έχει ποικίλες δομικές παραλλαγές ενώ ακόμα ανακαλύπτονται νέες κυανοτοξίνες. Πολλά περιστατικά δηλητηριάσεων ανθρώπων έχουν προκληθεί και από θαλάσσιες φυκοτοξίνες που παράγονται από άλλα είδη φυτοπλαγκτόν. Παρά το μεγάλο αριθμό τους δεν υπάρχουν αναλυτικές μέθοδοι που να προσδιορίζουν ταυτόχρονα τόσο τις διαφορετικές κατηγορίες όσο και πλήθος δομικών παραλλαγών των τοξινών αυτών. Συνεπώς, χρειάζεται η ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων που να προσδιορίζουν όσο το δυνατόν περισσότερες κυανοτοξίνες. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκε μια γρήγορη, απλή και ευαίσθητη αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών (microcystins, nodularins, cylindrospermopsins, anatoxins) και δομικών τους παραλλαγών μαζί με τις θαλάσσιες φυκοτοξίνες Okadaic acid και Domoic acid, στο νερό με μία μόνο ανάλυση. Για την αύξηση της ευαισθησίας και την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων του υποστρώματος αναπτύχθηκε μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) με διάταξη διπλού φυσιγγίου. Για τον προσδιορισμό των τοξινών αναπτύχθηκε κατάλληλη μέθοδος υδροχρωματογραφίας συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS), τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου. Στόχος είναι η παρούσα μέθοδος να αποτελέσει βάση για την ανάλυση και άλλων τοξινών που παράγονται από κυανοβακτήρια και μικροφύκη και για τις οποίες προς το παρόν δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα αναλυτικά πρότυπα καθώς και να υιοθετηθεί από τα διάφορα εργαστήρια για την ανάλυση των κυανοτοξινών και φυκοτοξινών. Παράλληλα,

αναπτύχθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή βιομάζα όπου μελετήθηκαν ποικίλα εκχυλιστικά συστήματα για την αποτελεσματική εκχύλιση των τοξινών microcystins, cylindrospermopsin & anatoxin από τα κυανοβακτηριακά κύτταρα. Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι εφαρμόστηκαν για την μελέτη της παρουσίας κυανοτοξινών σε δεκατέσσερις λίμνες της Ελλάδας. Κατά την μελέτη ανιχνεύθηκε πλήθος κυανοτοξινών από ποικίλες κατηγορίες και είναι η πρώτη φορά που προσδιορίζονται και ταυτοποιούνται τόσες πολλές κυανοτοξίνες στις ελληνικές λίμνες με την αξιόπιστη τεχνική LC-MS/MS.

Οι οργανικοί ρύποι του νερού εκτός από βιογενούς προέλευσης (όπως οι κυανοτοξίνες και γενικότερα οι φυκοτοξίνες) είναι και ανθρωπογενούς προέλευσης. Οι δημόσιες αρχές, συμπεριλαμβανομένης της ευρωπαϊκής ένωσης) έχουν θεσπίσει αυστηρά όρια για πλήθος ρύπων με στόχο την προστασία του υδάτινου περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας. Στην παρούσα διατριβή, επιπρόσθετα αναπτύχθηκε πολυδύναμη μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών οργανικών ρύπων του νερού όπως φυτοφάρμακα διαφορετικών κατηγοριών, ενδοκρινικοί διαταράκτες και φαρμακευτικά προϊόντα που συμπεριλαμβάνονται στις ουσίες προτεραιότητας της οδηγίας 2000/60/EE και των τροποποιήσεων της (2008/105/EK & 2013/39/EE) και στον κατάλογο επιτήρησης (απόφαση 2015/495/EE). Για την προκατεργασία του δείγματος νερού αναπτύχθηκε SPE μέθοδος και για τον αξιόπιστο προσδιορισμό τους αναπτύχθηκε μέθοδος ανάλυσης με LC-MS/MS, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου. Στόχος είναι η αναπτυχθείσα μέθοδος να εφαρμοσθεί για την παρακολούθηση της παρουσίας των οργανικών ρύπων στο νερό.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 : Κυανοτοξίνες

1.1 Εισαγωγή

Τα κυανοβακτήρια (blue-green algae) ή αλλιώς κυανοφύκη είναι αρχαίοι προκαρυωτικοί αυτότροφοι μικροοργανισμοί που συναντούνται σε όλο τον κόσμο. Τα κυανοβακτήρια είναι αυτά στα οποία αποδίδεται η δημιουργία της αερόβιας ατμόσφαιρας στην Γη πριν από 2200-2400 εκατομμύρια χρόνια, καθώς μέσω της φωτοσύνθεσης τους παράγουν οξυγόνο [1, 2] και ακόμα και σήμερα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες στον βιολογικό κύκλο του άνθρακα, του αζώτου και των μεταλλικών στοιχείων. Η ονομασία τους “blue-green” algae (κυανοφύκη) είναι απόρροια του γεγονότος ότι τα πρώτα είδη που αναγνωρίστηκαν είχαν κυανό-πράσινο χρώμα [3], διότι μέσω της φωτοσύνθεσης παράγουν την μπλε (κυανή) χρωστική φυκοκυανίνη και περιέχουν χλωροφύλλη που τους προσδίδει πράσινο χρώμα [4]. Πλέον είναι γνωστό ότι τα κυανοβακτήρια δεν έχουν μόνο κυανό-πράσινο χρώμα, καθώς μπορεί να είναι και γκρι-πράσινα, κίτρινο-καφέ ή πορφυρα έως κόκκινα λόγω της χρωστικής φυκοερυθρίνης [4, 5].

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν την βάση της τροφικής αλυσίδας ενός μεγάλου αριθμού οργανισμών (υδρόβιων και χερσαίων) και βρίσκουν πολλές εφαρμογές στην βιοτεχνολογία από την παραγωγή βιολογικών λιπασμάτων έως και την χρήση τους ως πιθανά φαρμακευτικά προϊόντα. Αρκετά υποσχόμενες προοπτικές για το μέλλον είναι επίσης η χρήση τους στην παραγωγή τροφίμων και την μετατροπή της ηλιακής ενέργειας [4, 6]. Στο υδάτινο περιβάλλον τα κυανοβακτήρια παρατηρούνται σε ποικίλους οικότοπους: ως εναιώρημα σε διασκορπισμένη μορφή ή ως συσσωματώματα στο νερό, ως ίζημα στο βυθό ή προσκολλημένα σε βράχια, παράκτια βότσαλα και φυτά [6]. Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες πολλαπλασιάζονται ταχύτατα σχηματίζοντας κυανοβακτηριακές ανθίσεις. Η μεγάλη αύξηση του πληθυσμού τους έχει επιβλαβείς επιπτώσεις στην βιοποικιλότητα του οικοσυστήματος αλλά και υποβαθμίζει την ποιότητα των υδάτινων πόρων. Συνεπακόλουθα, επηρεάζονται αρνητικά οι ανθρώπινες δραστηριότητες που σχετίζονται με το νερό, όπως η άρδευση των καλλιεργειών, οι υδατοκαλλιέργειες, οι βιομηχανικές επεξεργασίες και ο τουρισμός [7]. Ειδικότερες συνέπειες είναι η αύξηση του κόστους για την επεξεργασία του πόσιμου νερού (καθώς παρατηρείται φράξιμο των φίλτρων και δημιουργείται ανάγκη για περισσότερα στάδια επεξεργασίας) αλλά και ο κίνδυνος της δημόσιας υγείας (ανθρώπων και ζώων) λόγω της πιθανής παραγωγής και ελευθέρωσης τοξινών από τα κυανοβακτήρια, οι οποίες ονομάζονται κυανοτοξίνες [6, 7].

Συγκεκριμένα, οι κυανοτοξίνες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των κυανοβακτηρίων, με ποικίλες χημικές δομές και φυσικοχημικές ιδιότητες, και είναι τοξικοί ή βιοδραστικοί για άλλους οργανισμούς, ιδιαίτερα για τα θηλαστικά [8]. Στην βιβλιογραφία έχουν καταγραφεί αρκετά περιστατικά δηλητηριάσεων από κυανοτοξίνες. Πιθανότατα ένα από τα πιο παλιά περιστατικά δηλητηρίασης έγινε στην Κίνα κατά την περίοδο της δυναστείας του Χαν. Πριν από περίπου 1.000 χρόνια, κατά την διάρκεια στρατιωτικής εκστρατείας στην νότια Κίνα, ο στρατηγός Zhu Ge-Ling ανέφερε ότι έχασε πολλούς στρατιώτες του από δηλητηρίαση καθώς διέσχιζαν ένα ποταμό. Σύμφωνα με την περιγραφή, ο ποταμός είχε πράσινο χρώμα και οι στρατιώτες ήπιαν από το «πράσινο νερό» [9]. Η πρώτη σαφής αναφορά των τοξικών επιπτώσεων των κυανοτοξινών σε ανθρώπινους οργανισμούς, σύμφωνα με τον Geoffrey A. Codd, έγινε το 12^ο αιώνα στο Μοναστήρι

της Πράσινης Λίμνης – “*Monasterium Viridis Stagni*” στη νοτιοδυτική Σκωτία [10]. Η πρώτη οξεία δηλητηρίαση από κυανοτοξίνες τεκμηριώνεται στην επιστημονική βιβλιογραφία το 1878, όπου αναφέρεται η δηλητηρίαση ζώων που ήπιαν νερό από τον ποταμό Murray στην Αυστραλία, που έμοιαζε με «στρώμα από πράσινη λαδομπογιά και είχε δύο με έξι ίντσες πάχος» [11]. Η σοβαρότερη δηλητηρίαση από κυανοτοξίνες καταγράφηκε το 1996 στο Caruaru της Βραζιλίας όπου 100 από τους 131 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε νεφρική αιμοκάθαρση παρουσίασαν οξεία ηπατική ανεπάρκεια και οι 52 από αυτούς πέθαναν. Από μετέπειτα μελέτη διαπιστώθηκε ότι το πόσιμο νερό της κλινικής δεν είχε επεξεργασθεί επαρκώς και περιείχε τις ηπατοτοξικές κυανοτοξίνες microcystins και cylindrospermopsin [12]. Επίσης, σε άρθρο που δημοσιεύθηκε πρόσφατα στο Science αναφέρεται ότι οι «μυστήριοι» μαζικοί θάνατοι δεινόσαυρων και πτηνών στην βορειοδυτική Μαδαγασκάρη, που χρονολογούνται 70 εκατομμύρια έτη πριν, πιθανότατα οφείλονται σε τοξικές κυανοβακτηριακές ανθίσεις (harmful algal blooms, HABs) [13]. Σε πιο πρόσφατες εποχές πολλοί ερευνητές κατέγραψαν ότι οι αυτόχθονες στην Κίνα, την Αφρική, την Αμερική και την Αυστραλία, οι οποίοι χρησιμοποιούν νερό από ταμειυήρες, όταν παρατηρείται το πράσινο στρώμα σκάβουν τρύπες κοντά στην άκρη του νερού ώστε να φιλτραριστεί το νερό μέσω του εδάφους και να αποφευχθεί η επιμόλυνση του πόσιμου νερού από το “πράσινο υλικό” [9].

1.2 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια είναι φωτοσυνθετικοί προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που απαντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα, τόσο υδάτινα όσο και χερσαία, αλλά και σε ακραίες οικολογικές συνθήκες από ψυχρές πολικές περιοχές μέχρι ερήμους και θερμοπηγές σε όλο τον κόσμο, όπως και ως συμβιωτικοί με άλλους οργανισμούς [4, 14, 15]. Επίσης, ποσοτικά είναι ανάμεσα στους σημαντικότερους οργανισμούς στην Γη καθώς η εκτιμώμενη βιομάζα τους παγκοσμίως ισούται με 3×10^{14} g C ή χίλια εκατομμύρια τόνους (10^{15} g) υγρής βιομάζας [16]. Δυνητικά, τα κυανοβακτήρια είναι οργανισμοί που μπορούν πρώτοι να αποικίσουν ένα περιβάλλον καθώς 1) αναπτύσσονται μέσω της φωτοσύνθεσης, 2) πολλά είδη τους έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) σε αμμωνία και αμινοξέα, και 3) αντέχουν σε δυσμενείς και ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Σε περιόδους που υπάρχουν άφθονοι πόροι, τα κυανοβακτήρια αποθηκεύουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά (φωσφόρο, άζωτο, άνθρακα, σίδηρο) ώστε να μπορούν να αναπτύσσονται και σε συνθήκες όπου είναι περιορισμένα τα θρεπτικά συστατικά. Κάποια είδη από αυτά έχουν αναπτύξει στρατηγικές ώστε να αντέχουν, να επιβιώνουν αλλά και να μεγαλώνουν κάτω από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως υψηλή αλατότητα, υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες και δυνατή ηλιακή ακτινοβολία [6].

Τα κυανοβακτήρια απαντώνται σε ποικίλους υδάτινους οικότοπους, όπως λίμνες και ποτάμια αλλά και σε υφάλμυρα και αλμυρά νερά, όπως θάλασσες και ωκεανοί. Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, τα κυανοβακτήρια πολλαπλασιάζονται εκθετικά. Η μεγάλη αύξηση του πληθυσμού τους, λόγω της υπερβολικής ανάπτυξης τους, δημιουργεί κυανοβακτηριακές ανθήσεις (blooms) που παρουσιάζονται ως στρώμα κυανοβακτηρίων στην επιφάνεια του νερού (scum / biofilm) ή ως επικάλυψη στα βράχια και τα φυτά (mats) [17].

Τα κυανοβακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν σε συνθήκες χαμηλού φωτός λόγω των βοηθητικών χρωστικών ουσιών τους (φυκοκυανίνη και φυκοερυθρίνη). Πρόσθετα, τα κυανοβακτήρια που σχηματίζουν στρώματα διαθέτουν κενοτόπια που πληρούνται με αέριο (gas vesicles) και τα οποία τα βοηθούν στη πλευστότητα τους, επιτρέποντας τους να κινούνται μέσα στο νερό και να

καταλαμβάνουν τα πρώτα εκατοστά της υδάτινης στήλης [18]. Παράλληλα, αυτά τα κυανοβακτήρια που εκτίθενται σε πολύ υψηλά ποσοστά φωτός και υπερϊώδους ακτινοβολίας (UV) διαθέτουν προστατευτικούς μηχανισμούς που βασίζονται σε καροτενοειδείς χρωστικές και σκυτονεμίνη οι οποίες φιλτράρουν την ακτινοβολία, αποτρέποντας τις καταστρεπτικές συνέπειες της. Τέλος, μια πολύ σημαντική ικανότητα των κυανοβακτηριακών ειδών είναι η αζωτοδέσμευση, καθώς μπορούν να δεσμεύουν το ελεύθερο άζωτο και να ανταγωνίζονται τα άλλα είδη που δεν έχουν αυτή την ικανότητα. Έτσι μπορούν κι επικρατούν σε συνθήκες που είναι περιορισμένο το άζωτο [19].



Εικόνα 1.1 : Σχηματισμός έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης – bloom (α) στον ποταμό Chao Hu, Κίνα ^[20] (β) OC Fisher Reservoir, San Angelo State Park - Τέξας, USA, Απρίλιος 2013 ^[21] (γ) Λίμνη Παμβώτιδα, Ιωάννινα – Ελλάδα, Σεπτέμβριος 2014 (δ) Lake Erie, Βόρεια Αμερική, δορυφορική λήψη στις 12 Απριλίου 2003 ^[22]. (ε) Τεχνικός της USGS συλλέγει στρώμα κυανοβακτηρίων (scum) από λίμνη, Iowa, USA ^[23]. (στ) Κάλυψη από κυανοβακτήρια (mats) της όχθης στην εκβολή του ποταμού Ythan, Σκωτία ^[24].

Γενικότερα οι συνθήκες που επηρεάζουν ευνοϊκά την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων είναι το ηλιακό φως, οι μέτριες έως υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών (ιδιαίτερα του φωσφόρου και του αζώτου / ευτροφικές συνθήκες), η ήπια θερμοκρασία νερού (15 - 30°C) και το pH μεταξύ 6 με 9 [25] καθώς και η θερμική διαστρωμάτωση και η σταθερότητα της στήλης του νερού που ευνοούν την άνωση και συσώρευσή τους στην επιφάνεια του νερού [26]. Οι κυανοβακτηριακές ανθίσεις συνήθως σχηματίζονται αργά το καλοκαίρι ή νωρίς το φθινόπωρο και είναι πιο συχνές σε ευτροφικά ή υπερευτροφικά υδατικά συστήματα [25]. Θετική συμβολή στον πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηρίων και στο σχηματισμό ανθίσεων έχει και ο εμπλουτισμός με θρεπτικά συστατικά πολλών υδάτινων συστημάτων από τις ανθρώπινες δραστηριότητες (ευτροφισμός). Επίσης, η παρουσία ζωοπλαγκτόν που τρέφεται με κυανοβακτήρια παίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό κυανοβακτηριακών ανθίσεων [19]. Ο σχηματισμός κυανοβακτηριακών ανθίσεων και η δημιουργία στρώματος στην επιφάνεια του νερού εμποδίζουν το φως να διεισδύσει μέσα στην υδάτινη στήλη και παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των άλλων ειδών. Παράλληλα, οι έντονες κυανοβακτηριακές ανθίσεις μπορεί να είναι περαιτέρω επιβλαβείς (τοξικές κυανοβακτηριακές ανθίσεις, harmful algal

blooms, HABs) για τους υπόλοιπους οργανισμούς καθώς υπάρχει αυξημένη πιθανότητα ελευθέρωσης κυανοτοξινών .

Επίσης, η εμφάνιση κυανοβακτηριακών ειδών σε περιοχές πολύ μακριά από τις περιοχές και τα περιβάλλοντα που συνήθως ευδοκιμούν, παρουσιάζει αυξανόμενο ενδιαφέρον. Αυτά τα κυανοβακτηριακά είδη αποκαλούνται «εισβολείς» (invasive species) καθώς εγκαθίστανται στα νέα περιβάλλοντα και επικρατούν των «ντόπιων» κυανοβακτηριακών ειδών. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία ένας μεγάλος αριθμός μη ιθαγενών κυανοβακτηρίων σε λίμνες και ταμειυτήρες νερού [27]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα «εισβολέα» στην Ευρώπη είναι το *Cylindrospermopsis raciborskii*, γνωστό και ως *Anabaena raciborskii*, που είναι τυπικό τροπικό είδος και παράγει την κυανοτοξίνη Cylindrospermopsin [28]. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ως κυρίαρχο είδος σε κυανοβακτηριακές ανθίσεις στην Ουγγαρία και την Βουλγαρία ενώ τις προηγούμενες δεκαετίες έχει πολύ μικρή συνεισφορά στον σχηματισμό τους [29-31]. Επίσης έχει καταγραφεί ως εισβολέας στα Βαλκάνια σε ποταμό στην Σερβία [32] αλλά και σε Μεσογειακές χώρες, στη νότια Ιταλία (Lake Biviere di Gela, Sicilia) [33], στην Ελλάδα (Λίμνη Καστοριά) [34, 35] και στην Ισπανία (Lake Albufera) [36]. Το *C. raciborskii* έχει καταγραφεί και σε πιο βόρειες περιοχές, στη δυτική Ρωσία, στη μεγάλη και υπερτροφική λίμνη Lake Nero [37] και σε λίμνες της Πολωνίας [38]. Γενικότερα, η επέκταση του συγκεκριμένου κυανοβακτηριακού είδους σε υποτροπικές και εύκρατες ζώνες αποτελεί παγκόσμιο φαινόμενο, καθώς εκτός από την Ευρώπη έχει εξαπλωθεί σε Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, Νότια και Βόρεια Αμερική, Νότια και Ανατολική Ασία, Μέση Ανατολή και μερικές χώρες της Αφρικής [39]. Ένα άλλο παράδειγμα κυανοβακτηριακού είδους – εισβολέα αποτελεί το *Nodularia spumigena* το οποίο ευδοκίμει σε αλμυρά και υφάλμυρα ύδατα. Το είδος αυτό καταγράφηκε τις τελευταίες δεκαετίες ως επικρατές είδος σε κυανοβακτηριακές ανθίσεις σε λίμνες με πόσιμο νερό στην Τουρκία (Lake Inzik, Hazar Lake και Lake Bafa). Σε αυτές τις ανθίσεις ανιχνεύθηκε και η κυανοτοξίνη Nodularin [27, 40].

1.3 Κατηγορίες κυανοτοξινών

Τα κυανοβακτήρια παράγουν ένα ευρύ φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών που είναι τοξικές ενώσεις. Οι τοξικοί μεταβολίτες δεν χρησιμοποιούνται από τον οργανισμό κατά το βασικό μεταβολισμό αλλά παράγονται για κάποιον βοηθητικό σκοπό [41]. Οι τοξίνες των κυανοβακτηρίων είναι είτε συνδεδεμένες στην μεμβράνη, είτε βρίσκονται ελεύθερες μέσα στα κύτταρα. Σε εργαστηριακές μελέτες παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος των τοξινών ελευθερώνεται καθώς τα κύτταρα γερνάνε και πεθαίνουν με αποτέλεσμα να εκλύουν (passively leak) το κυτταρικό τους περιεχόμενο. Όμως, έχει παρατηρηθεί και έκκριση (active release) τοξινών από νεαρά αναπτυσσόμενα κύτταρα [42]. Οι Watanabe & Oishi μελέτησαν την τοξικότητα του γένους *Microcystis Aeruginosa* κατά τις τρεις φάσεις της ανάπτυξης (υστέρηση, εκθετική και στατική). Η μέγιστη τοξικότητά (με βιολογική δοκιμή σε ποντίκια) παρατηρήθηκε μεταξύ της εκθετικής και της στατικής φάσης ανάπτυξης [43]. Σε επόμενη μελέτη που έγινε με HPLC, η μέγιστη συγκέντρωση κυανοτοξινών στα κύτταρα του γένους *M. Aeruginosa* παρατηρήθηκε προς το τέλος της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης του [44].

Οι κυανοτοξίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάση της χημικής τους δομής σε κυκλικά πεπτίδια, αλκαλοειδή, διαμινοξέα και λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Στον Πίνακα 1.1 συνοψίζονται οι κατηγορίες των κυανοτοξινών, τα κυανοβακτήρια που τις παράγουν και η τοξική τους δράση. Οι κατηγορίες των κυανοτοξινών που είναι γνωστές σήμερα πιθανότατα δεν καλύπτουν όλο το εύρος των τοξικών

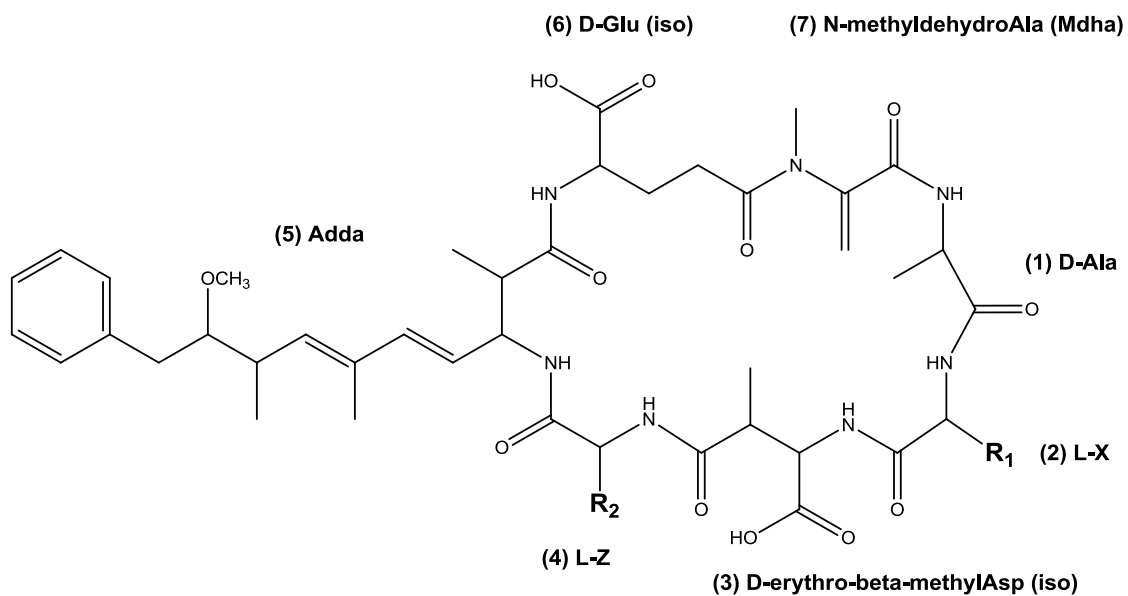
μεταβολιτών που παράγουν τα κυανοβακτήρια. Από δοκιμές τοξικότητας που έχουν γίνει σε κυανοβακτηριακά κύτταρα και στο εκχύλισμα τους, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, προκύπτει ότι υπάρχουν και τοξικές ενώσεις που δεν συμπεριλαμβάνονται στις γνωστές κυανοτοξίνες [45, 46]. Οι άνθρωποι εκτίθενται σε κίνδυνο λόγω της παρουσίας των κυανοτοξινών στο νερό μέσω δερματικής επαφής, εισπνοής αερολυμάτων, κατάποσης ποσότητας νερού κατά την κολύμβηση καθώς και μέσω της κατανάλωσης πόσιμου νερού και τροφίμων όπως ψάρια και συμπληρώματα διατροφής (π.χ. Σπιρουλίνα). Στην παρούσα διατριβή, το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάστηκε στις κυανοτοξίνες Microcystins, Nodularin, Cylindrospermopsin και Anatoxin-a που αποτελούν τις πιο συχνά ανιχνευόμενες τοξίνες στα επιφανειακά ύδατα (λίμνες και ταμιευτήρες νερού) και κατ' επακόλουθα στο πόσιμο νερό.

Πίνακας 1.1: Κατηγορίες κυανοτοξινών, κυανοβακτήρια που τις παράγουν και τοξική δράση

Κυανοτοξίνες	Κατηγορία / δομή	Γένη κυανοβακτηρίων που τις παράγουν ^[47]	Τοξική δράση
Microcystins	Κυκλικά επταπεπτίδια	<i>Microcystis, Anabaena, Nostoc, Planktothrix, Phormidium, Oscillatoria, Radiocystis, Gloeotrichia, Anabaenopsis, Rivularia, Tolypothrix, Halalosiphon, Plectonema</i>	Ηπατοτοξικές, ευνοούν την δημιουργία όγκων – ογκογένεση, αναστολείς της ευκαρυωτικής πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP1 & PP2A και της φωσφοπρωτεϊνικής φωσφατάσης PPP4 & PPP5
Nodularins	Κυκλικά πενταπεπτίδια	<i>Nodularia spumigena, Nostoc (συμβιωτικό)</i>	Ίδια δράση με microcystins και επιπρόσθετα καρκινογενής
Cylindrospermopsins	Τρικυκλικά αλκαλοειδή γουανιδίνης	<i>Cylindrospermopsis, Umezakia, Anabaena, Oscillatoria, Raphidiopsis, Aphanizomenon</i>	Τοξικότητα σε πολλαπλά όργανα, νευροτοξικές, γενετοξικές, αναστολείς σύνθεσης πρωτεϊνών
Anatoxin-a	Δικυκλικά αλκαλοειδή	<i>Anabaena, Phormidium, Aphanizomenon</i>	Νευροτοξική, δεσμεύεται ανταγωνιστικά στους υποδοχείς ακετυλοχολίνης
Anatoxin-a(S)	Φωσφορυλιωμένη κυκλική N-υδροξυγουανίνη	<i>Anabaena</i>	Νευροτοξική, αναστολέας της εστεράσης της ακετυλοχολίνης
Saxitoxins	Αλκαλοειδή	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cylindrospermopsis, Planktothrix</i>	Νευροτοξικές, εμποδίζουν του διαύλου νατρίου
Lyngbyatoxins, Aplysiatoxins	Αλκαλοειδή	<i>Lyngbya, Oscillatoria, Schizothrix</i>	Ευνοούν την δημιουργία όγκων – ογκογένεση, συνδέονται με την ευκαρυωτική πρωτεϊνική κινάση C
BMAA, DAB	Διαμινοξέα	Πολλά γένη	Νευροτοξικές, αναπτυξιακή τοξίνη, εισαγωγή στις πρωτεΐνες στη θέση των αμινοξέων αλανίνη & σερίνη
LPS	Λιποπολυσακχαρίτες	Τα περισσότερα γένη	Φλεγμονώδη, προαγωγή της έκκρισης κυτοκίνης

1.3.1 *Microcystins* και *Nodularins*

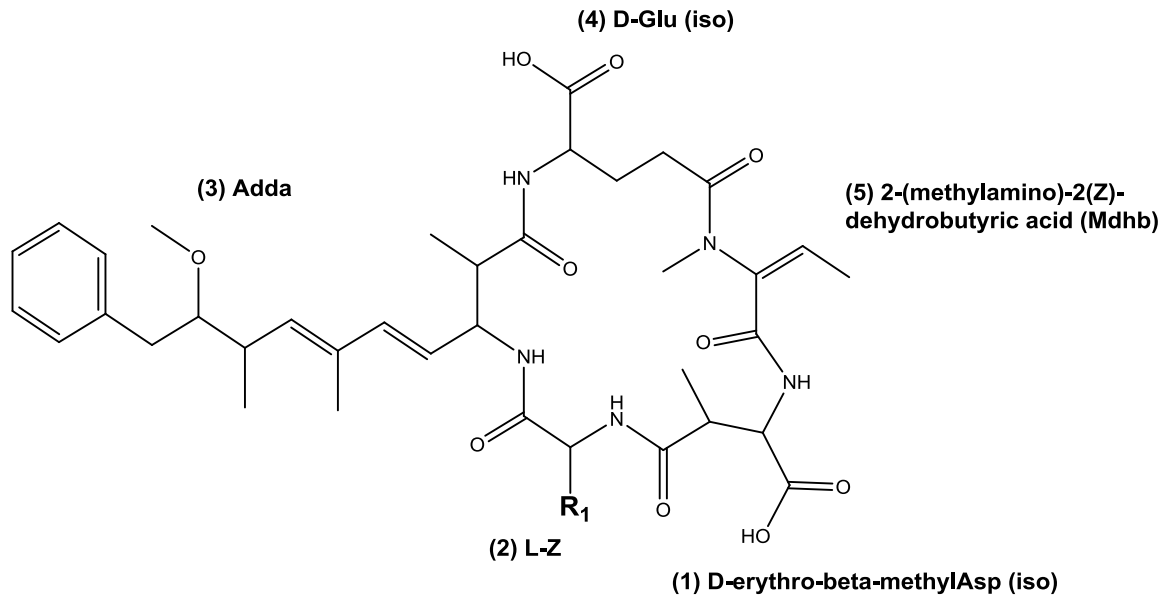
Οι *Microcystins* (MCs) και οι *Nodularins* (NODs) είναι τοξικά κυκλικά πεπτιδία των κυανοβακτηρίων. Οι πρώτες χημικές δομές των κυανοβακτηριακών πεπτιδικών τοξινών προσδιορίστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1980 και ο αριθμός των διαφόρων τοξινών που χαρακτηρίστηκαν πλήρως, αυξήθηκε σημαντικά κατά την δεκαετία του 1990. Οι MCs είναι από τις πιο διαδεδομένες και συχνά συναντώμενες ομάδες κυανοτοξινών. Οι MCs είναι κυκλικές επταπεπτιδικές ηπατοτοξίνες (δηλαδή κυκλικά πεπτιδία που αποτελούνται από επτά αμινοξέα). Απομονώθηκαν για πρώτη φορά ως ολικό εκχύλισμα από το γένος *NRC-1 Microcystis Aeruginosa* (από το οποίο πήραν το όνομα τους) το 1959 από τους Bishop, Anet & Gorham [48]. Κατά καιρούς τους έχουν δοθεί διάφορα ονόματα όπως Γρήγορος Παράγοντας Θανάτου (Fast Death Factor), cyanoginosins και cyanoviridins όμως η ονομασία *microcystins* είναι αυτή που επικράτησε [49]. Η δομή των μικροκυστίνων διεκρινίστηκε πρώτη φορά το 1982 από τους Botes, Kruger & Viljoen [50]. Η γενική δομή των μικροκυστίνων είναι: *cyclo-(D-alanine¹-X²-D-MeAsp³-Z⁴-Adda⁵-D-glutamate⁶-Mdha⁷)* (Σχήμα 1.1) όπου τα X και Z είναι ποικίλα L-αμινοξέα, το D-Me Asp είναι D-ερυθρό-β-Μεθυλασπαρτικό οξύ, το Mdha είναι N-μεθυλδεϋδροαλανίνη και το Adda είναι το αμινοξύ (2S, 3S, 8S, 9S) - 3 - άμινο - 9 - μέθοξυ - 2,6,8 - τριμέθυλ - 10 - φένυλδεκα - 4,6 - διενοϊκό οξύ και είναι χαρακτηριστικό της δομής αυτής της ομάδας των κυκλικών πεπτιδικών τοξινών [9].



Σχήμα 1.1: Γενική χημική δομή των *Microcystins*

Τα δύο L-αμινοξέα (X και Z) αποτελούν το κύριο μεταβλητό κομμάτι της δομής των MCs και το αντίστοιχο όνομα τις κάθε MC υποδηλώνεται με το επίθεμα των δύο γραμμάτων που αντιστοιχούν στα αμινοξέα που βρίσκονται στις θέσεις 2 και 4. Για παράδειγμα, η MC-LR περιέχει τα αμινοξέα λευκίνη (L) και αργινίνη (R) στις θέσεις 2 και 4 αντίστοιχα. Οι διάφορες MCs, μπορούν να έχουν διαφοροποιήσεις και σε άλλα κομμάτια της δομής τους, οι οποίες υποδηλώνονται με πρόθεμα. Από τις συχνές διαφοροποιήσεις είναι απομεθυλώσεις στις θέσεις 3 και 7, καθώς και αλλαγές στην στερεοχημεία του Adda. Μέχρι σήμερα έχει προσδιορισθεί η δομή 246 διαφορετικών MCs [51, 52]. Γενικότερα, οι MCs είναι υδρόφιλες / πολικές με βάση τη δομή τους λόγω του ότι έχουν τα καρβοξυλικά οξέα στις θέσεις 3 και 6 και πολύ συχνά απαντάται το αμινοξύ αργινίνη στις θέσεις 2 και 4 [53].

Οι NODs είναι κυκλικές πενταπεπτιδικές ηπατοτοξίνες (δηλαδή κυκλικά πεπτίδια που αποτελούνται από πέντε αμινοξέα). Η γενική δομή των NODs είναι: cyclo-(D-MeAsp¹-Z²-Adda³-D-glutamate⁴-Mdhb⁵) όπου το Mdhb είναι 2-(μεθυλαμινο)-2-δεϋδροβουτυρικό οξύ (Σχήμα 1.2). Η πιο συχνά συναντώμενη NOD στη φύση είναι η Nodularin-R ή απλά Nodularin (χωρίς επίθεμα) όπου στη μεταβλητή θέση Z υπάρχει το αμινοξύ αργινίνη (R) [54]. Σήμερα είναι γνωστές 10 διαφορετικές δομές NODs [51].



Σχήμα 1.2: Γενική χημική δομή των Nodularins

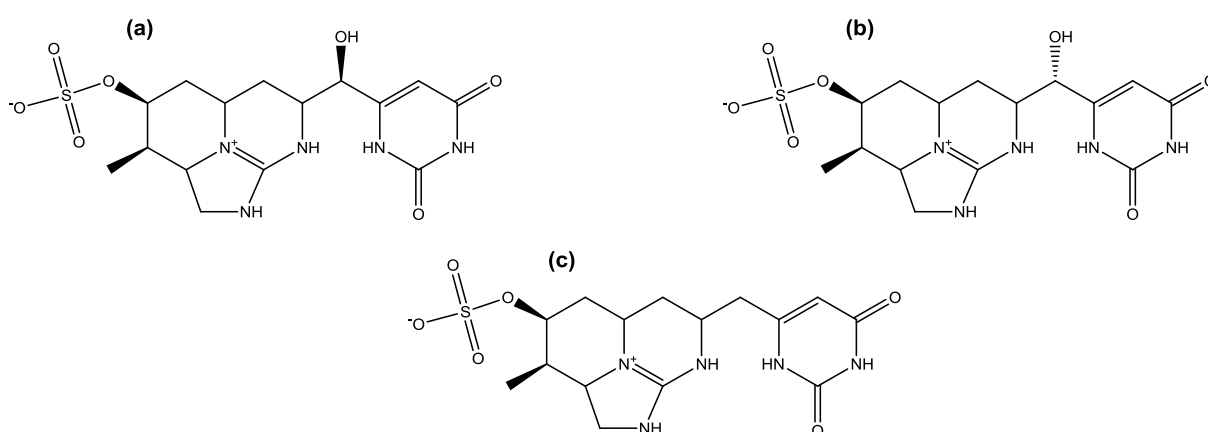
Οι MCs και οι NODs έχουν πολλές κοινές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες. Και οι δύο ομάδες είναι πεπτίδια που παράγονται μη ριβοσωμικά και οι βιοσυνθετικές οδοί τους έχουν πολλές ομοιότητες. Τα γονίδια για την βιοσύνθεση των NOD (*nda*) και MC (*mcy*) εικάζεται ότι έχουν κοινή εξελικτική προέλευση και η NOD συνθετάση πιθανότατα είναι εξέλιξη από μία MC συνθετάση [55].

Οι MCs και οι NODs είναι ηπατοτοξίνες και δρουν ως ειδικοί αναστολείς των πρωτεϊνικών φωσφατασών (PPs) [56-58]. Οι MCs αναστέλλουν τις PPs τύπου 1, 2A, 3, 4 και 5 [59] και σε μικρότερη έκταση την 2B [60] ενώ οι NODs αναστέλλουν τις PPs τύπου 1, 2A και 3 [61, 62]. Η πρωτεϊνική φωσφατάση απο-φωσφορυλιώνει την θρεονίνη και την σερίνη στα ζώα και στα φυτά. Η αναστολή των PP1 και PP2A έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών στα ηπατικά κύτταρα επηρεάζοντας πολλές διαδικασίες όπως τις μεταβολικές οδούς, κυτταρική συσταλτικότητα, μεμβρανική μεταφορά, έκκριση, κυτταρική διαίρεση, γονιδιακή μεταγραφή και μετάφραση [63]. Επίσης, οι MCs προάγουν την δημιουργία όγκων [64, 65], είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες [66-68] και ανοσοτοξικές [69]. Ακόμα, προκαλούν οξειδωτική βλάβη στο DNA [70], γονιδοτοξικότητα [71] και ενεργοποιούν τα πρωτο-ογκογονίδια *c-jun*, *c-fos* και *c-myc* [72]. Οι NODs έχουν πιο ισχυρή ικανότητα δημιουργίας και προαγωγής όγκων σε σύγκριση με τις MCs. Αυτό πιθανόν οφείλετε στο ότι έχουν μικρότερο μέγεθος δακτυλίου και μπορούν να προσλαμβάνονται ευκολότερα από τα ηπατικά κύτταρα [73]. Επίσης, οι NODs όπως και οι MCs προάγουν την ενδοκυττάρια δημιουργία αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) οι οποίες προκαλούν υπεροξείδωση σε λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA [74].

Η MC-LR είναι η πρώτη κυανοτοξίνη που μελετήθηκε από την ομάδα των MCs και θεωρείται η πιο τοξική από τις άλλες MCs. Όμως, σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες προκύπτει ότι οι MC-LW και MC-LF έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα στα ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα [75]. Το LD₅₀ της MC-LR μέσω ενδοτραχειακής χορήγησης (100 μg/kg) είναι αντίστοιχο με το LD₅₀ μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση (100 μg/kg) και προκαλούν παρόμοιες ηπατικές και πνευμονικές βλάβες [76]. Αντίστοιχα, το LD₅₀ της NOD μέσω ενδοτραχειακής χορήγησης κυμαίνεται από 30 έως 70 μg/kg [77].

1.3.2 *Cylindrospermopsin*

Η Cylindrospermopsin (CYN) είναι κυκλικό αλκαλοειδές της γουανιδίνης, η οποία παράγεται από ποικίλα γένη κυανοβακτηρίων (Πίνακας 1.1) αλλά κυρίως από το *Cylindrospermopsis raciborskii* [4]. Η δομή της CYN αποσαφηνίστηκε το 1992, από τους Ohtani & Moore από καλλιέργεια του *C. raciborskii* [78] καθώς το 1979 είχε ξεσπάσει μια μυστήρια ασθένεια με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας στο Palm Island, Queensland στην Αυστραλία [79]. Σήμερα είναι γνωστά 5 ανάλογα CYNs, η CYN, η deoxycylindrospermopsin [80], η 7-epi-cylindrospermopsin [81] (Σχήμα 1.3) και πιο πρόσφατα προσδιορίστηκαν η 7-deoxydesulfo-CYN και η 7-deoxydesulfo-12-acetyl-CYN [82].



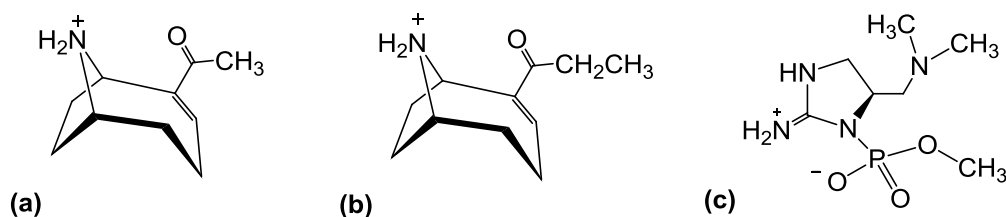
Σχήμα 1.3: Χημική δομή των (α) Cylindrospermopsin, (b) 7-epicylindrospermopsin και (c) 7-deoxycylindrospermopsin

Η CYN είναι τοξική για το ήπαρ, τα νεφρά, τη σπλήνα, το θύμο αδένα και την καρδιά. Το ήπαρ είναι το είναι πιο ευαίσθητο όργανο στην τοξικότητα της CYN, για αυτό και χαρακτηρίζεται και ως ηπατοτοξική. Σε αντίθεση με την CYN, η deoxycylindrospermopsin είναι σχεδόν μη τοξική ενώ η 7-epicylindrospermopsin είναι τοξική. Συνεπώς, το τμήμα της ουρακίλης παίζει σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα των CYNs. Επιπρόσθετα, η CYN είναι αναστολέας της πρωτεϊνικής σύνθεσης και είναι γενοτοξική καθώς τροποποιεί το DNA ή/και το RNA. Το LD₅₀ της CYN μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε ποντίκι είναι 2,1 mg/kg για 24 h και 0,2 mg/kg για 5-6 μέρες [83].

1.3.3 *Anatoxin-a*

Την Anatoxin-a (ANA) αρχικά την αποκαλούσαν very fast death factor (VFDF) λόγω του ταχύτατου θανάτου των ζώων που κατανάωναν τοξικά κυανοβακτήρια. Η ANA είναι μια μικρή αλκαλοειδής δικυκλική δευτεροταγής αμίνη (2-acetyl-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene). Η ANA αποτελεί την πρώτη κυανοτοξίνη της οποία προσδιορίστηκε πλήρως η δομή, το 1977 από τους Devlin et al από το

Anabaena flos-aquae NRC-44h [84] (Σχήμα 1.4). Οι δομικές παραλλαγές της ANA είναι σπάνιες. Εκτός από την Homoanatoxin-a που προσδιορίστηκε το 1992 από τους Skulberg et al από το στέλεχος *Planktothrix (Oscillatoria) formosa* [85], το 2003 οι Namikoshi et al ταυτοποίησαν την 4-hydroxyhomoanatoxin-a από το κυανοβακτήριο *Raphidiopsis mediterranea* [86] και το 2007 οι Selwood et al ανακάλυψαν την 11-carboxyl anatoxin-a στο στέλεχος *Aphanizomenon issatschenkoii* (CAWBG02), η οποία πιστεύεται ότι είναι βιοσυνθετικό πρόδρομο της ANA [87]. Να σημειωθεί πως υπάρχει και η Anatoxin-a (S), "Salivary", η οποία δεν πρέπει να συγχέεται με την ANA καθώς έχει διαφορετική δομή (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4: Χημική δομή των (α) Anatoxin-a, (b) Homoanatoxin-a και (c) Anatoxin-a(S)

Η ANA αποσυντίθενται ταχέως με την ηλιακή ακτινοβολία, έχοντας χρόνο ημιζωής 100 min [88]. Παρόλα αυτά, η ANA είναι νευροτοξική και μιμείται την δράση της ακετυλοχολίνης και προκαλεί γρήγορο θάνατο από αναπνευστική ανακοπή [89]. Το LD₅₀ της ANA μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε ποντίκι είναι 0,20 - 0,25 mg/kg με χρόνο επιβίωσης συνήθως λιγότερο από 30 min [84, 90].

1.4 Φυκοτοξίνες

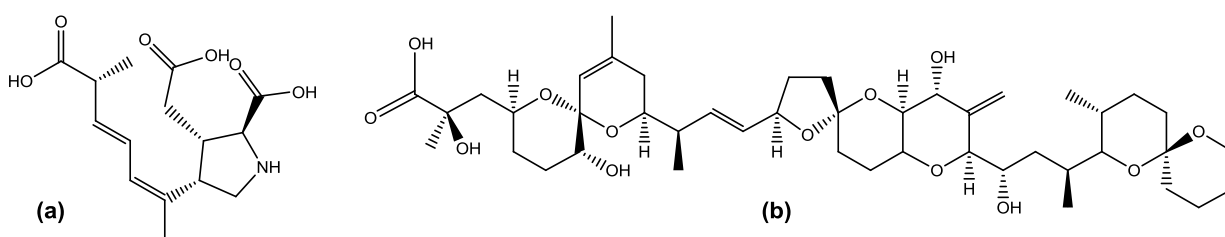
Οι φυκοτοξίνες είναι οργανικές ενώσεις που παράγονται από ποικίλα είδη φυτοπλακτόν, όπως δινομαστιγωτά, διάτομα, απτόφυτα και κυανοβακτήρια που ζουν σε θαλάσσια, υφάλμυρα ή επιφανειακά νερά ή εδάφη. Εκτός από τις κυανοτοξίνες, που αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο, μία άλλη μεγάλη κατηγορία τοξινών είναι οι θαλάσσιες φυκοτοξίνες (marine algal toxins) που παράγονται από μικροφύκη [91]. Οι θαλάσσιες φυκοτοξίνες έχουν ποικίλες τοξικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία και οι άνθρωποι εκτίθενται σε αυτές μέσω του νερού ή των αερολυμάτων και μέσω της κατανάλωσης οστρακοειδών και ψαριών [92]. Ειδικότερα, μπορεί να γίνει απευθείας επαφή των τοξινών που περιέχονται στο νερό ή σε αερόλυμα με το δέρμα, το λαιμό και τα εντερικά τοιχώματα προκαλώντας ερεθισμό του αναπνευστικού συστήματος και σοβαρή δερματίτιδα. Σε περίπτωση κατάποσης, κάποιες φυκοτοξίνες μπορούν να επιδράσουν σε συγκεκριμένα όργανα του οργανισμού. Τα περισσότερα περιστατικά δηλητηριάσεων είναι κυρίως μέσω της κατανάλωσης θαλασσινών όπου έχουν βιοσυσσωρευτεί οι φυκοτοξίνες [91, 93, 94]. Οι θαλάσσιες φυκοτοξίνες μπορεί να έχουν επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό και μέσω της κατανάλωσης πόσιμου νερού σε περίπτωση που δεν απομακρυνθούν πλήρως κατά την αφαλάτωση του νερού [95]. Στην παρούσα εργασία, το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάστηκε επιπρόσθετα στις πιο διαδεδομένες θαλάσσιες φυκοτοξίνες Domoic acid και Okadaic acid, που είναι οι κύριοι εκπρόσωποι των κατηγοριών που προκαλούν αμνησιακή δηλητηρίαση (amnesic shellfish poisoning, ASP) και διαρροϊκή δηλητηρίαση (diarrhetic shellfish poisoning, DSP), αντίστοιχα.

1.4.1 Domoic acid

Το Domoic acid (DA) απομονώθηκε πρώτη φορά το 1958 από τον K. Diago από το *Chondria armata*, θεωρώντας το ως ανθελμινθικό [96] και το 1975 από τους Impellizzeri et al από το *Alsidium*

corallinum [97]. Η δομή και η στερεοχημεία του προσδιορίσθηκαν το 1966 από τους Takemoto *et al* ως (2S,3S,4S)-2-carboxy-4-1-methyl-5(R)-carboxyl-1(Z)-3(E)-hexadienyl pyrrolidine-3-acetic acid [98] (Σχήμα 1.5 a). Είναι όξινο αμινοξύ με δευτεροταγή αμίνη και αποτελεί ανάλογο του L-γλουταμικού οξέος όπου ισοπρένια συνδέονται ως πλευρική αλυσίδα και κυκλοποιούνται με το σκελετό του αμινοξέος. Το DA παράγεται από κόκκινα μικροφύκη και διάτομα και κυρίως από τα γένη *Pseudonitzschia*, *Chondria armata*, *Alsidium corallinum*, *Chondria baileyana*, *Amansia glomerata*, *Digenea simplex* και *Vidalia obtusiloba* [99].

Το DA είναι νευροτοξικό αμινοξύ το οποίο επηρεάζει τις νευρικές οδούς των θηλαστικών, αναστέλλει τις νευροχημικές διεργασίες και προκαλεί αμνησιακή δηλητηρίαση από οστρακοειδή (amnesic shellfish poisoning, ASP) [100]. Το DA συνδέεται στον γλουταμικό υποδοχέα του κεντρικού νευρικού συστήματος των ανθρώπων και προκαλεί αποπόλωση των νευρώνων και αύξηση του κυτταρικού ασβεστίου. Έχει καταγραφεί ότι προκαλεί γαστρεντερίτιδα, νεφρική ανεπάρκεια, σύγχυση και απώλεια μνήμης στους ανθρώπους, καθώς επηρεάζει τον ιππόκαμπο του εγκεφάλου. Το LD₅₀ του DA μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε ποντίκι είναι 2,5 - 3,6 mg/kg το οποίο είναι 31 φορές μεγαλύτερο σε σχέση με το LD₅₀ του μετά από πρόσληψη από το στόμα (68 -80 mg/kg) [99, 101].



Σχήμα 1.5: Χημική δομή των (a) Domoic acid και (b) Okadaic acid

1.4.2 *Okadaic acid*

Το Okadaic acid (OA) αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο των θαλάσσιων λιπόφιλων τοξινών, της κατηγορίας Dinophysistoxins (DTXs). Απομονώθηκε πρώτη φορά το 1981 από τους Tachibana *et al* από το μαύρο σπόγγο *Halichondria okadaic* και το σπόγγο της Καραϊβικής *Halichondria melanodocia* και χαρακτηρίστηκε η δομή και η στερεοχημεία του (Σχήμα 1.5 b) [102]. Το OA είναι κυτταροτοξικός πολυαιθέρας, που μπορεί να χαρακτηριστεί ως σύνθετο παράγωγο ενός C₃₈ λιπαρού οξέος, ενώ τα δομικά του χαρακτηριστικά υποδηλώνουν ότι ανήκει στην κατηγορία των ιονοφόρων ενώσεων [102]. Παράγεται κυρίως από τα δινομαστιγιωτά του γένους *Prorocentrum* (κυρίως *P. lima* και *P. concavum*) και *Dynophysis* (κυρίως *D. acuta*, *D. Acuminate* και *D. Fortii*) [103].

Το OA προκαλεί κυρίως τροφική δηλητηρίαση από οστρακοειδή (diarrhetic shellfish poisoning, DSP) στους ανθρώπους με συμπτώματα όπως ναυτία, έμετο, διάρροια και κοιλιακό άλγος [104]. Επίσης αναστέλλει την λειτουργία των πρωτεϊνικών φωσφατασών (PPs) τύπου 1 (PP1) και 2A (PP2A) [105], όπως και άλλους τύπους συμπεριλαμβανομένων των 4, 5, και 2B (PP4, PP5, PP2B) [106]. Ακόμα έχουν καταγραφεί και άλλες τοξικές επιδράσεις του, όπως κυτταροτοξικότητα, γονιδοτοξικότητα, ανοσοτοξικότητα, εμβρυοτοξικότητα, νευροτοξικότητα και καρκινογένεση [107]. Το LD₅₀ του OA μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε ποντίκι έχει αναφερθεί ότι είναι 204 και 225 μg/kg [108, 109].

1.5 Κανονισμοί, οδηγίες & νομοθετικά όρια

Τα τοξικά κυανοβακτήρια και οι κυανοτοξίνες αναγνωρίστηκαν ευρύτερα ως πιθανός κίνδυνος για τη δημόσια υγεία κατά τη δεκαετία του 1990, και το 1998 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) δημοσίευσε για πρώτη φορά το προσωρινό όριο του 1 μg/L για την MC-LR στο πόσιμο νερό [25]. Προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια του πόσιμου νερού ως προς τις MCs, αρκετές χώρες σε όλο τον κόσμο έχουν υιοθετήσει το προσωρινό όριο του WHO.

Ειδικότερα, το νομοθετικό όριο του WHO έχουν υιοθετήσει οι Αργεντινή, Τσεχία, Δανία, Ιταλία, Ολλανδία, Πολωνία, Νορβηγία, Σιγκαπούρη, Κίνα, Ιαπωνία, Κορέα και Νότια Αφρική για την συγκέντρωση της MC-LR, ενώ οι Βραζιλία, Γαλλία, Φιλανδία, Ισπανία και Τουρκία έχουν το όριο του 1 μg/L για το άθροισμα της συγκέντρωσης των MCs ή για το άθροισμα των MCs εκφρασμένο ως ισοδύναμα της MC-LR [110, 111]. Ειδικότερες οδηγίες και κανονισμούς για τις MCs έχουν θεσπίσει η Αυστραλία με ανώτατο όριο συγκέντρωσης το 1,3 μg/L [112], η Νέα Ζηλανδία με όριο το 1,0 μg/L [113] και ο Καναδάς με όριο το 1,5 μg/L για το σύνολο των MCs εκφρασμένο ως τοξικά ισοδύναμα της MC-LR [114]. Στην Αμερική, το 2015 το United States Environmental Protection Agency (USEPA), EPA των Ηνωμένων Πολιτειών για την προστασία των καταναλωτών πρότεινε ως συμβουλή υγείας (Health Advisories) η συγκέντρωση των MCs στο πόσιμο νερό να μην υπερβαίνει το όριο του 1,6 μg/L για τους ενήλικες και το όριο του 0,3 μg/L για τα νήπια [115]. Επιπρόσθετα, τέσσερις πολιτείες έχουν ορίσει δικά τους όρια ασφαλείας: η Μινεσότα το 0,1 μg/L για την MC-LR, το Βερμόντ το 0,16 μg/L για την MC-LR, το Όρεγκον και το Οχάιο που έχουν υιοθετήσει τα όρια της USEPA και επιπρόσθετα στο Οχάιο ορίζεται το νερό ακατάλληλο για οποιαδήποτε χρήση όταν η συγκέντρωση των MCs είναι μεγαλύτερη από 20 μg/L [115, 116]. Τέλος, η Ευρωπαϊκή ένωση συμπεριέλαβε την MC-LR στην πρόταση για την τροποποίησης της νομοθεσίας για το πόσιμο νερό, με νομοθετικό όριο το 1μg/L [117].

Ωστόσο, δεν έχουν θεσπιστεί όρια και οδηγίες για ένα ευρύ φάσμα κυανοτοξινών και βιοδραστικών ουσιών λόγω ανεπαρκών τοξικολογικών δεδομένων. Συγκεκριμένα, ο WHO δεν έχει εκδώσει μέχρι σήμερα κάποια άλλη οδηγία που να ορίζει όρια και για τις υπόλοιπες κυανοτοξίνες στο πόσιμο νερό, όμως κάποιες χώρες αναγνωρίζοντας τον κίνδυνο που αποτελούν οι κυανοτοξίνες για την δημόσια υγεία έχουν θεσπίσει τα δικά τους όρια.

Για την CYN στο πόσιμο νερό η Αυστραλία και η Νέα Ζηλανδία έχουν θεσπίσει το όριο του 1,0 μg/L, η USEPA πρότεινε ως συμβουλή υγείας η συγκέντρωση της να μην υπερβαίνει το όριο του 3 μg/L για τους ενήλικες και το όριο του 0,7 μg/L για τα νήπια, το οποίο έχουν υιοθετήσει και οι πολιτείες Όρεγκον και Οχάιο, ενώ η πολιτεία Βερμόντ έχει θεσπίσει το όριο του 0,5 μg/L. Επιπλέον, στην πολιτεία του Οχάιο ορίζεται το νερό ακατάλληλο για οποιαδήποτε χρήση όταν η συγκέντρωση της CYN είναι μεγαλύτερη από 20 μg/L και στην Νότια Αμερική (Βραζιλία) έχει προταθεί ως όριο για το πόσιμο νερό τα 15 μg/L [111-113, 115, 116].

Σχετικά με την ANA στο πόσιμο νερό έχουν θεσπιστεί ελάχιστα όρια. Συγκεκριμένα, η Νέα Ζηλανδία έχει θεσπίσει το όριο των 6 μg/L, η επαρχία του Quebec στον Καναδά το όριο των 3,7 μg/L και οι πολιτείες των ΗΠΑ: Βερμόντ το όριο του 0,5 μg/L, Όρεγκον το όριο του 3 μg/L για τους ενήλικες και το όριο του 0,7 μg/L για τα νήπια, και Οχάιο το όριο των 20 μg/L ενώ ορίζει το νερό ακατάλληλο για χρήση όταν η συγκέντρωση της ANA υπερβαίνει τα 300 μg/L [111, 112, 115, 116].

Για την NOD μόνο η Νέα Ζηλανδία έχει θεσπίσει το όριο του 1 µg/L στο πόσιμο νερό [113], καθώς οι καταγραφές της παρουσία των κυανοβακτηρίων που την παράγουν όπως και της ίδιας της τοξίνης σε ταμειυτήρες πόσιμου νερού είναι ελάχιστες [40, 118, 119].

Αναφορικά με το DA και OA, δεδομένου ότι είναι τοξίνες από μικροφύκη σε θαλασσινά ύδατα, δεν υπάρχει ακόμα κάποια οδηγία από τον WHO ή την νομοθεσία της ευρωπαϊκής ένωσης για την παρουσία τους στο πόσιμο νερό. Αναγνωρίζοντας όμως τον κίνδυνο που αποτελούν για την δημόσια υγεία κυρίως μέσω της κατανάλωσης οστρακοειδών, η ευρωπαϊκή ένωση εξέδωσε το 2004 κανονισμό για την συστηματική παρακολούθηση των οστρακοειδών που προορίζονται για κατανάλωση και ορίζει η συγκέντρωση του DA να μην υπερβαίνει τα 20 mg/kg shellfish meat (SM) και η συγκέντρωση του OA να μην υπερβαίνει τα 160 mg/kg SM [120]. Μεταγενέστερα, το 2009, με βάση τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) πρότεινε να επανακαθοριστούν το όρια σε 4,5 mg/kg SM για το DA και σε 45 mg/kg SM για το OA [121].

1.6 Μέθοδοι προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών

Η παρουσία κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε επιφανειακά και πόσιμα νερά αποτελεί σημαντικό θέμα σε παγκόσμια κλίμακα λόγω των αρνητικών επιπτώσεων τους στην δημόσια υγεία και τα οικοσυστήματα. Με στόχο την πρόληψη και τον έλεγχο αυτού του προβλήματος οι δημόσιες αρχές σε όλο τον κόσμο εκδίδουν νέους κανονισμούς (βλέπε §1.5) καθιστώντας την ανάγκη ύπαρξης αξιόπιστων και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό τους. Μεγάλη πρόκληση για την ανάλυση τους αποτελεί το γεγονός ότι είναι ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων με ποικίλες χημικές δομές και διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, με συνέπεια να χρειάζονται περισσότερες από μία αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό τους. Ειδικότερα στις κυανοτοξίνες συγκαταλέγονται μικρές ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος, όπως αλκαλοειδή και αμινοξέα αλλά και μεγαλομόρια με υψηλό μοριακό βάρος, όπως κυκλικά πεπτίδια και λιποπολυσακχαρίτες. Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας τους, οι διάφορες κυανοτοξίνες έχουν ποικίλες πολικότητες, με κάποιες τοξίνες να είναι περισσότερο λιπόφιλες και άλλες να είναι περισσότερο υδατοδιαλυτές. Επίσης, έχουν διαφορετικές τοξικές δράσεις καθώς μπορεί να είναι νευροτοξικές, κυτταροτοξικές, ηπατοτοξικές, δερματοτοξικές αλλά και διαφορετικές τοξικότητες (LD₅₀: 10 έως 2100 µg/kg σωματικού βάρους). Ακόμα και μια μόνο κατηγορία κυανοτοξινών (π.χ. MCs) αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό δομικών παραλλαγών με ποικίλες πολικότητες και τοξικότητες. Παρομοίως οι φυκοτοξίνες που επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη, οι DA και OA, διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους καθώς η πρώτη είναι νευροτοξικό αμινοξύ, με χαμηλό μοριακό βάρος και είναι αρκετά πολική και υδατοδιαλυτή (Sw = 8 mg/ml) ενώ η δεύτερη είναι κυτταροτοξικός πολυαιθέρας, με μεγάλο μοριακό βάρος, λιγότερο πολική και κυρίως λιπόφιλη. Επίσης, κάποιες κυανοτοξίνες είναι ισοβαρείς με άλλες ενώσεις που υπάρχουν σε αφθονία στην φύση, όπως για παράδειγμα η Anatoxin-a και το φυσικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται ο αξιόπιστος προσδιορισμός τους. Επιπρόσθετα, πολλές κυανοτοξίνες δεν έχουν μελετηθεί στο παρελθόν με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα στη βιβλιογραφία καθώς επίσης αυξάνεται συνεχώς ο αριθμός τους αφού ακόμα ανακαλύπτονται νέες κυανοτοξίνες. Ένα επιπλέον τροχοπέδη στον αξιόπιστο προσδιορισμό τους είναι ο περιορισμένος αριθμός εμπορικά διαθέσιμων αναλυτικών προτύπων κυανοτοξινών και το υψηλό κόστος τους.

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των τοξινών επιτυγχάνεται με βιολογικές, βιοχημικές και χημικές μεθόδους με βάση την βιολογική τους δράση ή τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Στις βιολογικές μεθόδους συγκαταλέγονται οι *in vivo* προσδιορισμοί όπως η βιολογική δοκιμασία σε ποντίκια (Mouse BioAssay, MBA) και σε πλαγκτονικά οστρακόδερμα *Daphnia magna* (Daphnia bioassay). Πιο διαδεδομένη είναι η MBA η οποία όμως δεν αποτελεί ειδική και ευαίσθητη μέθοδο, και επειδή βασίζεται σε δοκιμές σε ζώα εγείρει σημαντικά τεχνικά και κυρίως ηθικά ζητήματα [122-125].

Οι βιοχημικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών και φυκοτοξινών είναι η μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) και η δοκιμασία αναστολής πρωτεϊνικής φωσφατάσης (Protein Phosphatase Inhibition Assay, PPIA) [122, 126]. Η ELISA είναι ανοσολογική δοκιμασία και βασίζεται στην μεγάλη εξειδίκευση της αντίδρασης αντιγόνου – αντισώμα. Για τον προσδιορισμό των τοξινών χρησιμοποιούνται πολυκλωνικά ή μονοκλωνικά αντισώματα. Αναλυτικότερα, έχουν αναπτυχθεί αντισώματα ειδικά για μεμονωμένες ενώσεις τοξινών (συγκεκριμένα έχουν αναπτυχθεί αντισώματα για τις CYN, ANA, OA, DA, MC-LA, MC-LR, MC-RR και NOD) αλλά και αντισώματα ειδικά για το αμινοξύ Adda που αποτελεί χαρακτηριστικό κομμάτι της χημικής δομής των MCs και των NODs [127]. Πλέον υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα kits για τον προσδιορισμό των MCs & NODs, CYN, ANA, OA και DA. Η PPIA είναι βιοχημική δοκιμασία και βασίζεται στην ικανότητα κάποιων τοξινών να αναστέλλουν την ενζυμική δράση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης (PP). Η PPIA εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό των MCs, NODs και OA για τις οποίες υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα kits που βασίζονται στην αναστολή της δράσης του ενζύμου PP2A. Σημαντική διαφορά της PPIA από την ELISA, είναι ότι παρέχει πληροφορίες σχετικά με την βιοδραστικότητα των τοξινών που περιέχονται στο δείγμα και δεν βασίζεται στην δομική αναγνώριση των τοξινών. Συνεπώς, η PPIA δεν μπορεί να διαφοροποιήσει τις διάφορες τοξίνες και δεν είναι ειδική για μία κατηγορία τοξινών αλλά για όλες τις ενώσεις που είναι αναστολείς του ενζύμου PP [128]. Και οι δύο μέθοδοι (ELISA & PPIA) είναι γρήγορες, εύκολες στη χρήση, δεν απαιτούν κάποια ιδιαίτερη προετοιμασία του δείγματος, έχουν χαμηλό κόστος και επιτυγχάνουν χαμηλά όρια ανίχνευσης. Μειονεκτήματα και των δύο μεθόδων είναι ότι τα αποτελέσματα επηρεάζονται σημαντικά από τις επιδράσεις μήτρας (matrix effects), παρατηρείται διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (cross reactivity), δίνουν ψευδώς θετικά (false positive) ή ψευδώς αρνητικά (false negative) αποτελέσματα και δεν μπορούν να ταυτοποιήσουν και να ποσοτικοποιήσουν την κάθε τοξίνη ξεχωριστά [122-126].

Οι χημικές μέθοδοι προσδιορισμού βασίζονται στον διαχωρισμό και την ανίχνευσή των τοξινών βάσει των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Ο διαχωρισμός τους επιτυγχάνεται κυρίως με υγροχρωματογραφία (LC) [99, 124-126] αλλά υπάρχουν και λιγότερο χρησιμοποιούμενες μέθοδοι με αεριοχρωματογραφία (GC) για τον διαχωρισμό των ANA, DA και OA [124, 125, 129] και με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE) για τον διαχωρισμό των DA, MCs, ANA και CYN [129, 130]. Η ανίχνευσή τους μπορεί να γίνει με ανιχνευτή UV, στην περίπτωση που τοξίνες έχουν χρωμοφόρο ομάδα στο μόριο τους (όπως οι MCs, NODs, CYN, ANA, DA και OA), με φθορισμομετρικό ανιχνευτή (FL) συνήθως μετά από παραγωγοποίηση και με τους πιο εξελιγμένους ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών (MS) και συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) [124-126, 129]. Οι χημικές μέθοδοι απαιτούν ειδική οργανολογία, έχουν υψηλότερο κόστος και χρειάζεται συνήθως περισσότερος χρόνος για την ανάλυση καθώς προηγείται κάποιο στάδιο επεξεργασίας του δείγματος. Πλεονεκτήματα τους είναι τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης που επιτυγχάνονται και το ότι μπορεί να ταυτοποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί κάθε τοξίνη ξεχωριστά, αρκεί να υπάρχει εμπορικά διαθέσιμο

πρότυπο. Τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και η υψηλότερη εκλεκτικότητα, ειδικότητα και αξιόπιστη ταυτοποίηση επιτυγχάνονται με την τεχνική της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS).

1.6.1 Μέθοδοι προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο νερό

Ειδικότερα, για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών, το 2005 αναπτύχθηκε το πρότυπο ISO 20179:2005 που αναφέρεται στον προσδιορισμό 3 MCs (MC-RR, MC-YR & MC-LR) σε νερό και κυανοβακτηριακή βιομάζα με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και ανίχνευση με HPLC-UV [131] ενώ είναι υπό ανάπτυξη η νέα μέθοδος ISO/CD 22104 που αφορά τον προσδιορισμό MCs με LC-MS/MS [132]. Πρόσφατα, το 2015, η USEPA δημοσίευσε δύο μεθόδους, την USEPA Method 544 για τον προσδιορισμό 6 MCs (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LY, MC-LF & MC-LA) και της NOD-R σε πόσιμο νερό με SPE και LC-MS/MS [133] και την USEPA Method 545 για τον προσδιορισμό των CYN και ANA σε πόσιμο νερό με LC-ESI-MS/MS [134]. Επίσης, το 2017 εκδόθηκε το Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis το οποίο περιέχει τυποποιημένες οδηγίες (standard operating procedures, SOPs) για τον προσδιορισμό MCs & NOD, CYN, ANA και άλλων κυανοτοξινών σε νερό αλλά και κυανοβακτηριακή βιομάζα [126].

Για να επιτευχθεί η αξιόπιστη ανίχνευσή των κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο νερό απαιτείται συνήθως κατάλληλη προκατεργασία του δείγματος με SPE όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικά είδη προσροφητικού υλικού και ποικίλα εκλουστικά συστήματα για κάθε κατηγορία τοξινών. Επίσης, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός για τον προσδιορισμό κάθε κατηγορίας τοξινών επιτυγχάνεται με διαφορετικές συνθήκες [126]. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός κάθε κατηγορίας τοξινών ξεχωριστά αποτελεί επίπονη, δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία. Παράλληλα, εκδίδονται νέοι κανονισμοί από τις δημόσιες αρχές για τον έλεγχο της παρουσίας τοξινών που παράγονται από μικροφύκη στο νερό. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η ύπαρξη αναλυτικών μεθόδων που να προσδιορίζουν πολλαπλές κατηγορίες τοξινών και των δομικών παραλλαγών τους ταυτόχρονα, σε μία ανάλυση με αξιοπιστία, υψηλό βαθμό εμπιστοσύνης και χαμηλά όρια ανίχνευσης.

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών και φυκοτοξινών αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση καθώς δεν υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες πληροφορίες αφού πρόκειται για έναν μεγάλο αριθμό ενώσεων που συνεχώς ανακαλύπτονται νέες δομές τους. Με στόχο την ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων που να προσδιορίζουν ταυτόχρονα διαφορετικές κατηγορίες κυανοτοξινών αλλά και θαλάσσιων φυκοτοξινών έχουν γίνει κάποιες προκαταρκτικές μελέτες, οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 1.2. Οι μελέτες αυτές είναι περιορισμένες σε αριθμό και έχουν αρκετούς περιορισμούς καθώς σε καμία από προτεινόμενες μεθόδους δεν επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη προσυγκέντρωση από το νερό και ο προσδιορισμός ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών τοξινών με μία μόνο ανάλυση.

Πίνακας 1.2: Σύνοψη αναλυτικών μεθόδων ταυτόχρονου προσδιορισμού διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών και φυκοτοξινών με LC-MS και LC-MS/MS

Αναλύτες	Υπόστρωμα	Τεχνική προσδιορισμού	Απόδοση μεθόδου	Αναφορά
anatoxin-A, domoic acid, nodularin, MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA, MC-LW, MC-LF, okadaic acid, dinophysistoxin-1, saxitoxin	φυτοπλαγκτόν (βιομάζα)	<u>LC-ESI-MS</u> Εκχυλιστικό διάλυμα βιομάζας: νερό – μεθανόλη 50:50, v/v και λύση κυττάρων σε λουτρό υπέρηχων Στήλη RP: Aqua 5μm, C18, 250 x 4.60 mm I.D. Κινητή Φάση: Ακετονιτρίλιο & Νερό με 0,01M trifluoroacetic acid (TFA) και 0,01% heptafluorobutyric acid (HFBA)	<u>Ανακτήσεις:</u> 93-113% <u>LOD:</u> 0,5 - 1,5 ng (abs)	Dahlmann <i>et al</i> [135]
anatoxin-a, MC-LR, MC- RR, MC-YR, nodularin	νερό	<u>SPE, LC-MS (TOF)</u> SPE: Empore 47mm C-18 extraction disks, 100ml δείγματος νερού με pH>10, έκλουση με 5-10ml μεθανόλη Στήλη RP: C18 LUNA 3μm, 150 x 1.0 mm I.D. Κινητή Φάση: Μεθανόλη & Νερό και τα δύο με 0,006% οξικό οξύ	<u>Ανακτήσεις:</u> 68% anatoxin έως 98% MC-YR <u>LOD:</u> estimated 1μg/L	Maizels & Budde [136]
anatoxin-A, cylindrospermopsin, deoxycylindrospermopsin MC-LR, MC-RR, saxitoxin και 17 ανάλογά της	κυανοβακτηριακά κύτταρα (βιομάζα)	<u>HILIC- MS & MS/MS</u> Εκχυλιστικό διάλυμα βιομάζας: νερό και ακετονιτρίλιο : νερό : μυρμηγκικό οξύ 80:19.9:0.1 και λύση κυττάρων σε λουτρό υπέρηχων Στήλη HILIC: 5μm TSK gel Amide-80, 250 x 2 mm I.D. Κινητή Φάση: Νερό & Ακετονιτρίλιο-Νερό (95:5) και τα δύο με 2,0 mM μυρμηγκικό αμμώνιο και 3,6 mM μυρμηγκικό οξύ (pH 3.5)	Τα όρια ανίχνευσης δεν αναφέρονται	Dell' Aversano <i>et al</i> [137]
MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA, MC-LW, cylindrospermopsin	Νερό λίμνης	<u>SPE, LC-ESI-MS/MS</u> SPE για MCs: 0.5 g Carbograph 4 extraction cartridges, 500ml δείγματος, έκλουση με 1ml μεθανόλη και 4mL 10mmol/L TFA σε CH ₂ Cl ₂ -CH ₃ OH (80:20, v/v) CYN -> απευθείας ανάλυση νερού	<u>Ανακτήσεις:</u> 96-102% (MCs) <u>LOQ:</u> MCs 2-9 ng/L CYN 300ng/L	Bogialli <i>et al</i> [138]

		<p>Στήλη RP: HP 5μm C-18, 250 x 4.6 mm I.D. Κινητή Φάση: Ακετονιτρίλιο & Νερό και τα δύο με 10 mmol/L μυρμηγκικό οξύ</p>		
<p>anatoxin-A, cylindrospermopsin, MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR, MC-YR, nodularin, (& 10 PSP toxins με άλλη χρωματογραφική μέθοδο)</p>	<p>φυτοπλαγκτόν (βιομάζα) & νερό</p>	<p><u>LC-ESI-MS/MS</u> Εκχυλιστικό διάλυμα βιομάζας: 0,1M οξικό οξύ – μεθανόλη 50:50, v/v και λύση κυττάρων σε λουτρό υπέρηχων</p> <p>Στήλη RP: Luna 5μm, C18, 250 x 4.60 mm I.D. Κινητή Φάση: Ακετονιτρίλιο & Νερό με 5 mM μυρμηγκικό αμμώνιο και 53 mM μυρμηγκικό οξύ</p>	<p><u>LOD:</u> MCs 15-100 pg (abs) NOD 6 pg (abs) CYN 9 pg (abs) ANA 700 pg (abs)</p>	<p>Hiller <i>et al</i> [139]</p>
<p>cylindrospermopsin, anatoxin-a, MC-RR,MC-YR, M-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LW, MC-LF, nodularin</p>	<p>επιφανειακό νερό</p>	<p><u>UPLC-ESI-MS/MS</u> Προετοιμασία δείγματος νερού: 3 κύκλοι ψύξης-απόψυξης (freeze-thaw) ακολουθούμενο από λουτρό υπέρηχων και φιλτράρισμα</p> <p>Στήλη RP: Acquity UPLC HSS T3 1,8 μm, 100 x 2.1 mm I.D. Κινητή Φάση: Ακετονιτρίλιο & Νερό και τα δύο με 0,1% μυρμηγκικό οξύ</p>	<p><u>LOD:</u> 0,10 – 0,21 μg/L</p>	<p>Oehrle <i>et al</i> [140]</p>
<p>anatoxin-a, cylindrospermopsin, deoxycylindrospermopsin, lyngbyatoxin-a, MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-LY, MC-RR, MC-YR, nodularin</p>	<p>φυτοπλαγκτόν (βιομάζα) & νερό λίμνης / ταμειυτήρα</p>	<p><u>LC-ESI-MS/MS</u> Λύση κυττάρων βιομάζας: 3 κύκλοι ψύξης-απόψυξης (freeze-thaw) Δείγμα νερού -> απευθείας ανάλυση</p> <p>Στήλη RP: Atlantis dC18 3 μm, 150 x 3.0 mm I.D. Κινητή Φάση: Μεθανόλη & Νερό και τα δύο με 0,1% οξικό οξύ</p>	<p>Τα όρια ανίχνευσης δεν αναφέρονται</p>	<p>Graham <i>et al</i> [118]</p>
<p>anatoxin-a, cylindrospermopsin, MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LW, MC-LF, MC-LA, nodularin</p>	<p>νερό λίμνης, ταμειυτήρα και πόσιμο</p>	<p><u>SPE, LC-ESI-MS</u> SPE dual cartridge assembly: 2000 mg Supelclean LC-18 + 500 mg Supelclean ENVI-Carb extraction cartridges, 1,5 – 3,0 L δείγματος, έκλουση με 40 mL διαλύματος Μεθανόλη - Νερό (90:10, v/v)</p> <p>Στήλη RP: Chromolith RP-18e C-18, 100 x 4.6 mm I.D. Κινητή Φάση: Ακετονιτρίλιο & Νερό και τα δύο με 0,01M TFA και 0,01% HFBA</p>	<p><u>Ανακτήσεις:</u> 83-90% <u>LOD:</u> MCs 20-31 ng/L NOD 21 ng/L CYN 500 ng/L ANA 210 ng/L</p>	<p>Yen <i>et al</i> [119]</p>

<p>anatoxin, cylindrospermopsin, dinophysistoxin-1, nodularin, okadaic acid, MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW, MC-LA, MC-LY</p>	<p>φυτοπλαγκτόν (βιομάζα) & νερό</p>	<p><u>SPE, LC-ESI-MS/MS</u> Εκχυλιστικό διάλυμα βιομάζας: νερό με 15% οξικό οξύ και λύση κυττάρων σε λουτρό υπέρηχων, εν συνεχεία SPE SPE για βιομάζα και νερό: 500 mg Sep-Pak C18 extraction cartridges, έκλουση με 10 mL διαλύματος Μεθανόλη - Νερό (90:10, v/v) Στήλη RP: Hypersil Gold C18 1,7μm, 100 x 2.1 mm I.D. Κινητή Φάση: Νερό 0.1% μυρμηγκικό οξύ & Μεθανόλη:Ακετονιτρίλιο (4:6, v/v)</p>	<p><u>Ανακτήσεις:</u> 55,5-140,9% με εξαίρεση τις ANA: 14,7-41,9% CYN: 0.1-0.6% NOD: 8.6-40.0% <u>LOQ:</u> 0,04 – 0,60 ng/mL</p>	<p>Chen <i>et al</i> [141]</p>
<p>anatoxin-a, cylindrospermopsin, saxitoxin, MC-RR, MC-LR, MC-YR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LF, MC-LW, [Dha7]MC-LR, MC-RY, [Asp3]MC-LY, [ADMAdda5]MC-LR, [ADMAdda5]MC-LHar, [Asp3, ADMAdda5]MC-LR</p>	<p>κυανοβακτηριακά κύτταρα (βιομάζα)</p>	<p>Λύση κυττάρων βιομάζας: 3 κύκλοι ψύξης-απόψυξης (freeze-thaw) και λουτρό υπερήχων <u>LC-ESI-MS/MS για MCs</u> Στήλη RP: Symmetry C18 3,5 μm, 100 x 2.1 mm I.D. Κινητή Φάση: Ακετονιτρίλιο & Νερό και τα δύο με 0,1% μυρμηγκικό οξύ <u>HILIC-ESI-MS/MS για CYN & ANA</u> Στήλη HILIC: SeQuant ZIC HILIC 3,5μm, 150 x 2.1 mm I.D. Κινητή Φάση: Νερό & Ακετονιτρίλιο και τα δύο με 5 mM οξικό αμμώνιο και 0,1% οξικό οξύ</p>	<p><u>LOQ:</u> CYN & ANA 30 μg/L MCs 0,01 μg/L</p>	<p>Ballot <i>et al</i> [142]</p>
<p>anatoxin-a, cylindrospermopsin, MC-LR, MC-YR, MC-RR</p>	<p>επιφανειακό και παράκτιο νερό</p>	<p>Προετοιμασία δείγματος νερού: 50 L συγκεντρώνονται σε 1 L με τη χρήση Hemoflow HF80S Fresenius polysulfone High-flux cartridge, μέρος του 1L δείγματος, όγκου 40 ml, κατεργάζεται με 3 κύκλους ψύξης-απόψυξης (freeze-thaw) και λουτρό υπερήχων, 10 ml από αυτά εξατμίζονται και επαναδιαλυτοποιούνται σε νερό <u>LC-ESI-MS/MS</u> Στήλη RP: Acquity UPLC HSS T3 1.8 μm, 100 x 2.1 mm I.D. Κινητή Φάση: Ακετονιτρίλιο & Νερό και τα δύο με 0,05% μυρμηγκικό οξύ</p>	<p><u>LOD:</u> 2-5 ng/mL</p>	<p>Rodriguez <i>et al</i> [143]</p>

Αναλυτικότερα, σχεδόν σε όλες τις μεθόδους που προτείνονται στον Πίνακα 1.2, ο διαχωρισμός του συνόλου των υπό μελέτη τοξινών (MCs, NOD, ANA, CYN, DA & OA) επιτυγχάνεται με υγροχρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως (Reverse Phase Chromatography, RP), με στήλη C18. Εξαίρεση αποτελεί η μέθοδος που προτείνεται από τους Ballot et al όπου χρησιμοποιείται χρωματογραφία HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) για τον προσδιορισμό των CYN και ANA, αλλά χρησιμοποιείται άλλη υγροχρωματογραφική μέθοδος (αντιστρόφου φάσεως, RP) για τον προσδιορισμό των MCs, με αποτέλεσμα να απαιτούνται δύο ξεχωριστές αναλύσεις για τον προσδιορισμό του συνόλου των τοξινών [142]. Το γεγονός ότι η HILIC δεν είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό των MCs αναφέρεται και στην εργασία των Dell' Aversano et al [137]. Ως κινητή φάση, στο σύνολο των χρωματογραφικών μεθόδων, χρησιμοποιείται νερό και ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη που περιέχουν ποσοστό ασθενούς οξέος (μυρμηγκικό ή οξικό οξύ) το οποίο λειτουργεί ως δότης πρωτονίων κατά τον ιοντισμό των ενώσεων με πηγή ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization, ESI). Επιπρόσθετα, η παρουσία ασθενούς οξέως στην κινητή φάση βελτιώνει το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών των MCs [144].

Για τον προσδιορισμό των τοξινών σε νερό, υπάρχουν μέθοδοι που δεν περιλαμβάνουν κάποιο στάδιο εκχύλισης / προσυγκέντρωσης του δείγματος νερού και απομάκρυνσης των παρεμποδίσων μήτρας (matrix interferences) με συνέπεια να μην επιτυγχάνονται χαμηλά όρια ανίχνευσης, της τάξης των ng/L [118, 139, 140]. Οι Rodriguez et al προτείνουν μια μέθοδο προκατεργασίας του δείγματος όπου γίνεται προσυγκέντρωση του νερού μέσω Hemoflow HF80S Fresenius polysulfone High-flux φυσιγγίου και στη συνέχεια εξατμισή του σε ρεύμα αζώτου με αποτέλεσμα να συγκεντρώνεται το δείγμα, χωρίς όμως να απομακρύνονται οι παρεμποδίσες και να επιτυγχάνονται υψηλά όρια ανίχνευσης, της τάξης των μg/L [143].

Ιδανική τεχνική για την προκατεργασία του δείγματος νερού αποτελεί η εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE) καθώς επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των αναλυτών και απομάκρυνση των παρεμποδίσων μήτρας. Οι Maizels & Budde ανέπτυξαν μία μέθοδο για τον προσδιορισμό των anatoxin-a, MC-LR, MC-RR, MC-YR και nodularin όπου η προσυγκέντρωσή τους γίνεται με Empore 47mm C-18 extraction disks, αφού πρώτα κάνουν ρύθμιση του pH >10 [136]. Οι Bogialli et al προτείνουν μία μέθοδο όπου η προσυγκέντρωση 5 MCs (MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA και MC-LW) γίνεται με φυσιγγία γραφίτη (Carbograph 4), όμως ο προσδιορισμός της CYN γίνεται με απ' ευθείας ανάλυση του δείγματος [138]. Οι Chen et al ανέπτυξαν μέθοδο για τον προσδιορισμό των anatoxin, cylindrospermopsin, dinophysistoxin-1, nodularin, okadaic acid, και 7 MCs (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW, MC-LA, MC-LY) όπου για την προσυγκέντρωσή τους χρησιμοποιούν σε Sep-Pak C18 φυσιγγία, όμως από τις ανακτήσεις που επιτυγχάνονται δηλώνουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των anatoxin, cylindrospermopsin και nodularin [141]. Οι κυανοτοξίνες/φυκοτοξίνες έχουν ποικίλες χημικές δομές και φυσικοχημικές ιδιότητες που διαφέρουν όχι μόνο μεταξύ των κατηγοριών αλλά και μεταξύ των δομικών παραλλαγών μίας κατηγορίας. Ως εκ τούτου και όπως αποδεικνύουν τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, η χρήση ενός μόνο είδους πληρωτικού υλικού δεν επαρκεί για την αποτελεσματική ανάκτηση ενός μεγάλου εύρους τοξινών διαφορετικών κατηγοριών. Μια πρώτη προσπάθεια για την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου με τη χρήση δύο διαφορετικών ειδών πληρωτικών υλικών (C18 και γραφίτη) για την προσυγκέντρωση και τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών anatoxin-a, cylindrospermopsin, nodularin και 6 MCs (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LW, MC-LF, MC-LA) σε νερό έγινε από τους Yen et al [119]. Όμως η προτεινόμενη μέθοδος έχει αρκετούς περιορισμούς στην εφαρμογή της από άλλα εργαστήρια καθώς δεν παρέχονται πληροφορίες σχετικά με τη σειρά σύζευξης των φυσιγγίων που

είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Ακόμα, η έκλουση πραγματοποιείται με μεγάλο όγκο εκχυλιστικού διαλύματος (40 ml) κάτι που δυσχεραίνει την επεξεργασία του εκλούσματος. Επιπλέον, στην εργασία δεν αναφέρονται σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την προετοιμασία του δείγματος όπως η ρύθμιση του pH>10, κάτι που είναι αναγκαίο για την αποτελεσματική κατακράτηση της ANA στο πληρωτικό υλικό της SPE [136, 145]. Εκτός από όλους τους παραπάνω περιορισμούς στην εφαρμογή της, η προτεινόμενη μέθοδος των Yen et al αναφέρεται στην ανάλυση μόνο των κυανοτοξινών στο νερό και δεν επεκτείνεται στον συμπροσδιορισμό τους με άλλες σημαντικές φυκοτοξίνες όπως είναι το domoic acid και το okadaic acid που μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό κίνδυνο για την δημόσια υγεία μέσω του πόσιμου νερού, στην περίπτωση που δεν έχει γίνει αποτελεσματική απομάκρυνσή τους κατά την αφαλάτωση του νερού.

1.6.2 Μέθοδοι προσδιορισμού κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή μάζα

Για τον προσδιορισμό των τοξινών σε κυανοβακτηριακή μάζα (φυτοπλακτόν ή κύτταρα από καλλιέργεια ενός είδους κυανοβακτηρίου - strain), είναι απαραίτητη η λύση (σπάσιμο) των κυττάρων για την απελευθέρωση των τοξινών από το εσωτερικό τους. Στις υπάρχουσες μεθόδους η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται κυρίως με διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης (freeze-thaw) ή/και με χρήση υπερήχων. Στις μεθόδους όπου η λύση των κυττάρων γίνεται με διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης, δεν γίνεται χρήση κάποιου εκχυλιστικού διαλύματος, απλώς το δείγμα φιλτράρεται πριν την ανάλυση του [118, 142]. Η τεχνική ψύξης-απόψυξης εφαρμόζεται επίσης για την λύση των κυττάρων σε δείγματα επιφανειακού νερού ώστε να προσδιοριστεί η συνολική συγκέντρωση (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια) των τοξινών [140, 143].

Στην περίπτωση που η λύση των κυττάρων γίνεται αποκλειστικά με την χρήση υπερήχων, συνιστάται και χρήση κατάλληλου εκχυλιστικού διαλύματος. Οι Dahlmann et al για την εκχύλιση των saxitoxin, anatoxin-A, domoic acid, nodularin, okadaic acid, dinophysistoxin-1 και 6 MCs (MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LA, MC-LW, MC-LF) χρησιμοποιούν μίγμα νερού – μεθανόλης (50:50, v/v) [135]. Παρομοίως, για τον προσδιορισμό των anatoxin-A, cylindrospermopsin, nodularin, 6 MCs (MC-LA, MC-LF, MC-LR, MC-LW, MC-RR, MC-YR) και 10 PSP τοξινών, οι Hiller et al προτείνουν την εκχύλισή τους από την κυανοβακτηριακή μάζα με μίγμα 0,1M οξικό οξύ – μεθανόλη (50:50, v/v) [139]. Οι Dell'Aversano et al προτείνουν την εκχύλιση των saxitoxin και 17 ανάλογων της, anatoxin-A, cylindrospermopsin, deoxycylindrospermopsin και 2 MCs (MC-LR, MC-RR) με νερό και στη συνέχεια με μίγμα ακετονιτρίλιο : νερό : μυρμηγκικό οξύ (80:19.9:0.1) [137]. Σε αντίθεση με τις παραπάνω μεθόδους που χρησιμοποιούν μίγματα οργανικού διαλύτη με νερό για την εκχύλιση των τοξινών από την κυανοβακτηριακή μάζα, οι Chen et al προτείνουν την εκχύλιση των anatoxin, cylindrospermopsin, dinophysistoxin-1, nodularin, okadaic acid και 7 MCs (MC-LR, MC-RR, MC-YR, MC-LF, MC-LW, MC-LA, MC-LY) με υδατικό διάλυμα 15% οξικού οξέως και στην συνέχεια προτείνουν καθαρισμό του εκχυλίσματος με SPE [141].

Κλείνοντας, να σημειωθεί ότι παρόλο που προτείνονται μέθοδοι στην βιβλιογραφία για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών/φυκοτοξινών, στις περισσότερες εργασίες δεν αναφέρεται ότι πραγματοποιείται επικύρωση της μεθόδου και δεν παρατίθενται σημαντικές παράμετροι απόδοσης των μεθόδων όπως ανακτήσεις (πιστότητα), τυπική απόκλιση και τα όρια ανίχνευσης/ποσοτικοποίησης της μεθόδου. Ιδιαίτερα στις μεθόδους προσδιορισμού των τοξινών σε κυανοβακτηριακή μάζα δεν αναφέρονται οι ανακτήσεις που

επιτυγχάνονται, λόγω τις ιδιαιτερότητας της μήτρας, με συνέπεια να μην μπορεί να γίνει σύγκριση της καταλληλότητας των μεθόδων.

1.7 Παρουσία κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στην Ελλάδα

Μέχρι την δεκαετία του 1980 δεν είχαν καταγραφεί δεδομένα σχετικά με την τοξικότητα των κυανοβακτηριακών ανθίσεων και την παρουσία κυανοτοξινών σε λίμνες της Ελλάδας. Η πρώτη μελέτη, που έγινε σε 4 λίμνες της βόρειας Ελλάδας (Κορώνεια, Βόλβη, Καστοριά και Βιστωνίδα), δημοσιεύτηκε το 1989 από τους Lanaras et al. Τα κυρίαρχα κυανοβακτηριακά είδη στα δείγματα ήταν τα *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaenopsis* και *Anabaena* ενώ η τοξικότητά τους που μελετήθηκε με βιολογική δοκιμασία σε ποντίκια μετά από ενδοπεριτοναϊκή ένεση και εκφρασμένη σε LD₅₀ κυμάνθηκε από 40 μέχρι 1500 mg ξηρής κυανοβακτηριακής μάζας/kg. Τα πιο τοξικά δείγματα ήταν από την λίμνη Καστοριά όπου κυριαρχούσαν τα κυανοβακτήρια *Microcystis aeruginosa* και *Anabaena vinguieri* [146]. Γενικότερα, με βάση τις μελέτες που έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τα κυρίαρχα είδη κυανοβακτηρίων κατά τις ανθήσεις – blooms σε ελληνικά επιφανειακά ύδατα τα είδη *Microcystis spp.* και *Anabaena spp.* (τα οποία παράγουν MCs σε υψηλές συγκεντρώσεις) είναι από τα πιο συχνά απαντώμενα [146-168].

Παρά το γεγονός ότι έχουν καταγραφεί τοξικά είδη κυανοβακτηρίων στις ελληνικές λίμνες και ταμιευτήρες, οι μελέτες για την παρουσία κυανοτοξινών στην Ελλάδα (Πίνακας 1.3) δεν είναι εκτεταμένες και στις περισσότερες περιπτώσεις οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό τους δεν είναι εκλεκτικές, αλλά μέθοδοι διαλογής - screening (συγκεκριμένα βιολογική δοκιμασία σε ποντίκια και ELISA – βλέπε Πίνακα 1.3).

Με την τεχνική ELISA στην λίμνη Καστοριά ανιχνεύθηκαν MCs με μέγιστη συγκέντρωση στο νερό ~70μg ισοδύναμα MC-LR/L [151, 158, 166] και CYN σε συγκεντρώσεις ~1 μg/L [166]. Επίσης, με την τεχνική ELISA ανιχνεύθηκαν MCs στην λίμνη Παμβώτιδα με μέγιστη συγκέντρωση τα 27 μg ισοδύναμα MC-LR/L [153, 154, 158, 163, 165, 166] και saxitoxins με μέγιστη συγκέντρωση τα 2,1 μg/L [165]. Στην Λίμνη Κάρλα ανιχνεύθηκαν MCs με μέγιστη συγκέντρωση 108 μg ισοδύναμα MC-LR/L, CYN σε συγκέντρωση 2,8 μg/L και saxitoxins σε συγκέντρωση 0,4 μg/L [164, 166, 169]. Επίσης, με την τεχνική ELISA ανιχνεύτηκε η παρουσία MCs σε δείγματα νερού και κυανοβακτηριακής μάζας από όλες τις λίμνες που μελετήθηκαν από τους Papadimitriou et al (βλέπε Πίνακα 1.3) [158]. Ακόμα, σε μελέτη των Gkelis et al ανιχνεύθηκε με την τεχνική ELISA η παρουσία MCs και saxitoxins στις λίμνες Δοϊράνη και Κερκίνη ενώ στην λίμνη Βόλβη ανιχνεύθηκε η παρουσία MCs και CYN [166].

Σε εκτενή μελέτη των Cook et al που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα από το 1987 έως το 2000 παρατηρήθηκαν ηπατοτοξικές κυανοβακτηριακές ανθίσεις – blooms σε 9 από τα 33 ποτάμια και λίμνες που μελετήθηκαν. Οι λίμνες με την μεγαλύτερη τοξική κυανοβακτηριακή άνθιση ήταν η Καστοριά και η Παμβώτιδα, με βάση τα αποτελέσματα με την τεχνική HPLC. Συγκεκριμένα το άθροισμα των MCs που υπήρχαν στη βιομάζα (scum) ήταν 1.638 ± 464 μg/g στην λίμνη της Καστοριάς και 958 ± 75 μg/g στην λίμνη Παμβώτιδα. Τοξική κυανοβακτηριακή άνθιση παρουσίασαν επίσης οι λίμνες Αμβρακία, Κερκίνη, Κορώνεια, Μικρή Πρέσπα, Βιστωνίδα, Βόλβη και Ζάζαρη όπου η συνολική συγκέντρωση των MCs στην βιομάζα (scum) κυμάνθηκε από 50,3 έως 1.091 μg/g. Μεταγενέστερα, κατά την περίοδο 1999-2000 έγινε ταυτοποίηση των MCs με HPLC και HPLC-MS. Οι MCs που υπήρχαν σε μεγαλύτερη αφθονία ήταν οι MC-LR και MC-RR ενώ επίσης βρέθηκαν οι MC-LA, MC-YR και οι διμεθυλιωμένες μορφές των MC-LR και MC-RR. Μεταξύ των 33 υδάτινων συστημάτων που μελετήθηκαν ήταν και τα Δοϊράνη, Βεγορίτιδα, Πετρών, Χειμαδίτιδα, Ασωμάτων,

Πολυφίτων, Άργας, Ταυρώπος, Λούρος, Πηνειός, Πουρναρίου, Κρεμαστών, Σαλτίνη, Βουλκαρία, Καστρακίου, Οζερός, Λυσιμαχεία, Τριχωνίδα, Παραλίμνη, Στυμφαλία, Φλόκα (Αλφειός), Υλίκη, Μόρνος και Μαραθώνας στα οποία δεν ανιχνεύτηκε κάποιο τοξικό είδος κυανοβακτηρίων [148].

Πίνακας 1.3: Σύνοψη ερευνητικών εργασιών για την μελέτη παρουσίας κυανοτοξινών σε λίμνες και ταμιευτήρες της Ελλάδας

Λίμνη / Ταμιευτήρας	Μέθοδος προσδιορισμού κυανοτοξινών	Αναφορά
4 Λίμνες (Κορώνεια, Βόλβη, Καστοριά, Βιστωνίδα)	Mice bioassay – LD 50 intraperitoneal injection	[146]
Λίμνη Βιστωνίδα	TLC, HPTLC & HPLC-UV για MC-LR	[170]
33 Λίμνες και Ταμιευτήρες (σε 9 ανιχνεύθηκαν τοξίνες)	Toxicity in mice and HPLC	[148]
7 Λίμνες (Βιστωνίδα, Κερκίνη, Μικρή Πρέσπα, Ζάζαρη, Καστοριά, Παμβώτιδα, Αμβρακία)	HPLC – DAD Για 10 MCs, Anabaenopeptins A and B & anabaenopeptilide 90A	[150]
Λίμνες Λυσιμαχεία & Τριχωνίδα	HPLC – DAD Για 10 MCs, Anabaenopeptins A and B & anabaenopeptilide 90A	[171]
Λίμνη Καστοριά	ELISA για MCs	[151]
Λίμνη Παμβώτιδα	ELISA για MCs	[153] & [154]
Λίμνη Ζήρου	ELISA για MCs	[157]
13 Λίμνες (Λυσιμαχεία, Τριχωνίδα, Παμβώτιδα, Μικρή Πρέσπα, Βεγορίτιδα, Ζάζαρη, Καστοριά, Πετρών, Χειμαδίτιδα, Κορώνεια, Βόλβη, Δοϊράνη, Κερκίνη)	ELISA για MCs	[158]
4 Λίμνες (Μαραθώνας, Μόρνος, Υλίκη, Καστοριά)	SPE, HPLC-PDA & SPE, LC-MS/MS για 4 MCs & NOD σύγκριση με ELISA για MCs και PPIA	[172]
Λίμνη Παμβώτιδα	ELISA & HPLC – PDA για MC-LR	[163]
Λίμνη Κάρλα	ELISA για MCs	[164] & [169]
Λίμνη Μαραθώνα	SPE, LC-MS/MS	[173]
6 Λίμνες (Δοϊράνη, Κερκίνη, Βόλβη, Καστοριά, Παμβώτιδα, Κάρλα)	ELISA για MCs, CYN και STXs	[165, 166]
36 Λίμνες, Ταμιευτήρες και Ποτάμια	ELISA, PPIA και HPLC – DAD Για 10 MCs, Anabaenopeptins A and B & anabaenopeptilide 90A	[167]
Λίμνη Βιστωνίδα	LC-MS/MS για STX, neo-STX, CYN, ANA, 12 MCs και NOD	[174] *
Λίμνες Μαραθώνας & Καστοριά	SPE, LC-MS/MS για CYN, ANA, 12 MCs, NOD, DA & OA	[175] *
Λίμνη Κάρλα	LC-MS/MS για STX, neo-STX, CYN, ANA, 12 MCs και NOD σύγκριση με ELISA για MCs	[168] *

* Τα αποτελέσματα των εργασιών για τον προσδιορισμό των CYN, ANA, 12 MCs, NOD, DA & OA αποτελούν μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε μελέτη και από τους Gkelis et al, όπου συλλέχθηκαν δείγματα από 7 λίμνες της Ελλάδας από το 1994 έως το 2000. Στη μελέτη αυτή προσδιορίστηκε η συνολική συγκέντρωση των MCs με HPLC-DAD σε κυανοβακτηριακή μάζα, όπου προσδιορίζονταν 10 διαφορετικές MCs. Με βάση τα αποτελέσματά της μελέτης στη λίμνη Βιστωνίδα η συνολική συγκέντρωση MCs ήταν 317,2 μg/g, στην Κερκίνη 43,9 – 598,6 μg/g, στη Μικρή Πρέσπα 1153,3 μg/g, στη Ζάζαρη 50,3 μg/g, στην Καστοριά 114,5 – 2564,3 μg/g, στην Παμβώτιδα 778,1 – 1132,0 μg/g και στην Αμβρακία 42,2 – 166,9 μg/g. Ειδικότερα, στη Βιστωνίδα ανιχνεύθηκε η κυανοτοξίνη MC-LR, στην Κερκίνη οι MC-LR, MC-RR, [Dha7]MC-RR & MC-YR, στην Μικρή Πρέσπα οι MC-LR, [D-Asp3]MC-LR / [Dha7]MC-LR, MC-RR & MC-LA, στη Ζάζαρη οι MC-LR & MC-RR, στην Καστοριά οι MC-LR, [D-Asp3]MC-LR / [Dha7]MC-LR, MC-RR, [Dha7]MC-RR, MC-YR & MC-LA, στην Παμβώτιδα οι MC-LR, [D-Asp3]MC-LR / [Dha7]MC-LR & MC-RR και στην Αμβρακία MC-LR & MC-RR [150]. Σε άλλη μελέτη των Gkelis et al, εφαρμόζοντας την ίδια αναλυτική τεχνική προσδιορίστηκε στην λίμνη Λυσιμαχεία MC-LR σε συγκέντρωση 0,9 μg/L ενώ τη λίμνη Τριχωνίδα δεν ανιχνεύθηκαν κυανοτοξίνες [171]. Κλείνοντας με τις μελέτες για την παρουσία κυανοτοξινών σε επιφανειακά ύδατα της Ελλάδας που πραγματοποιήθηκαν με HPL-UV, στην λίμνη Βιστωνίδα ανιχνεύθηκε μια κορυφή που αποδίδεται πιθανότατα στην MC-LR [170] και στη λίμνη Παμβώτιδα ταυτοποίησαν την παρουσία της MC-LR [163].

Οι μόνες μελέτες για την παρουσία κυανοτοξινών σε ελληνικές λίμνες όπου εφαρμόζεται η προηγμένη αναλυτική τεχνική της φασματομετρίας μαζών και ειδικότερα LC-MS/MS για τον αξιόπιστο προσδιορισμό των κυανοτοξινών, πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Καταλυτικών – Φωτοκαταλυτικών Διεργασιών και Περιβαλλοντικών Αναλύσεων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» [168, 172-175]. Σε μελέτη που έγινε για τον προσδιορισμό 4 MCs και της NOD στη λίμνη του Μαραθώνα, ανιχνεύθηκαν MCs με συγκεντρώσεις: 0,006 - 0,060 μg/L MC-RR, 0 – 0,004 μg/L MC-YR και 0,004 – 0,015 μg/L MC-LR καθώς και στη λίμνη Καστοριά ανιχνεύθηκαν οι MC-RR (0,008 μg/L) και MC-LR (0,007 μg/L). Στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν επίσης 45 δείγματα πόσιμου νερού της Αθήνας (από το δίκτυο της ΕΥΔΑΠ) και 20 δείγματα από τις λίμνες Υλίκη και Μόρνο στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν οι υπό μελέτη κυανοτοξίνες [172]. Επίσης, σε μελέτη όπου εφαρμόστηκε πρόγραμμα παρακολούθησης (monitoring) για την παρουσία κυανοτοξινών στη λίμνη Μαραθώνα για μεγάλο χρονικό διάστημα από τον Ιούλιο 2007 έως το Δεκέμβριο του 2010, ταυτοποιήθηκε η παρουσία MCs και οι συγκεντρώσεις τους κυμάνθηκαν μεταξύ 2-174 ng/L για την MC-RR, 2-451 ng/L για την MC-LR, 2-717 ng/L για την MC-YR και 5-8 ng/L για την MC-LA. Κατά την χρονική περίοδο της μελέτης, τον Οκτώβριο του 2010, παρατηρήθηκε σε σημείο της λίμνης έντονη κυανοβακτηριακή άνθιση όπου οι προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις των κυανοτοξινών στο συγκεκριμένο δείγμα ήταν 27 μg/L MC-RR, 12 μg/L MC-LR & 26 μg/L MC-YR στο νερό και 1956 μg/g MC-RR, 382 μg/g MC-LR & 555 μg/g MC-YR στη κυανοβακτηριακή μάζα. Με βάση τα αποτελέσματα από το πρόγραμμα παρακολούθησης (monitoring) παρατηρήθηκε περιοδική διακύμανση των επίπεδων συγκέντρωσης των κυανοτοξινών στη λίμνη. Ειδικότερα τα επίπεδα συγκέντρωσης των κυανοτοξινών αυξάνονταν σημαντικά κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες (Ιούλιο με Δεκέμβριο) ενώ ήταν μηδενικά κατά τους χειμερινούς και εαρινούς μήνες (Ιανουάριο με Ιούνιο). Γενικότερα, οι κυανοβακτηριακές ανθήσεις παρατηρούνται κατά τους τελευταίους καλοκαιρινούς μήνες και τους φθινοπωρινούς λόγω των ευνοϊκών συνθηκών που επικρατούν στις περιοχές με εύκρατο κλίμα [173].

Η παρουσία των Domoic acid και Okadaic acid δεν έχει καταγραφεί σε επιφανειακά ύδατα στην Ελλάδα, αλλά έχει αναφερθεί η παρουσία τους σε οστρακοειδή (μύδια), καθώς είναι θαλασσιές τοξίνες. Στην Ελλάδα, το πρώτο bloom αποτελούμενο από *Dinophysis spp.* που παράγει το OA

καταγράφηκε τον Ιανουάριο του 2000 στο Θερμαϊκό κόλπο [176]. Εκείνη την περίοδο καταγράφηκαν επίσης κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης από οστρακοειδή (DSP). Κρούσματα DSP παρατηρήθηκαν και τα επόμενα χρόνια, και σε αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μύδια από τον Θερμαϊκό κόλπο ταυτοποιήθηκε η παρουσία του OA. Αναλυτικά, DSP κρούσματα καταγράφηκαν το Φεβρουάριο – Μάιο 2002 (με μέγιστη συγκέντρωση OA 36 µg/g σε μύδια) [177, 178], το Φεβρουάριο του 2004 (συγκεντρώσεις OA 0,10 – 0,20 µg/g σε μύδια) [179] και το Δεκέμβριο 2006 – Μάιο 2007 (με μέγιστη συγκέντρωση OA 48139,7 µg/kg σε μύδια) [180]. Ακόμα, σε μελέτη που έγινε στο Θερμαϊκό κόλπο το Μάιο του 2003 καταγράφηκε η παρουσία του OA σε κύτταρα *Dinophysis acuminata* σε συγκεντρώσεις 3,7 - 8,6 pg/cell και το Μάρτιο του 2004 σε συγκεντρώσεις 4,4 – 14,0 pg/cell [181]. Η παρουσία του OA καταγράφηκε σε μύδια και στο Σαρωνικό κόλπο το Δεκέμβριο του 2006 με την μέγιστη συγκέντρωση του OA να φθάνει τα 3408,8 µg/kg [180]. Η παρουσία του DA έχει ταυτοποιηθεί σε στελέχη *Pseudo-nitzschia* που απομονώθηκαν από τον Θερμαϊκό κόλπο και από άλλα παράκτια ελληνικά ύδατα [182, 183]. Ακόμα σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2002-2003 στην Ελλάδα όπου αναλύθηκαν 862 δείγματα οστρακοειδών ανιχνεύθηκε το DA με μέγιστες συγκεντρώσεις 14,0µg/g στα μύδια και 5,6 µg/g στις αχιβάδες [184]. Σε άλλη μελέτη όπου αναλύθηκαν μύδια από το Θερμαϊκό κόλπο, που συλλέχθηκαν τον Φεβρουάριο του 2004, δεν ανιχνεύθηκε το DA αλλά μόνο το OA [179].

Να σημειωθεί ότι η παγκόσμια κλιματική αλλαγή, όπως η αύξηση της θερμοκρασίας του νερού και οι εκτεταμένες περιόδους ξηρασίας σε συνδυασμό με την αύξηση των θρεπτικών συστατικών στα επιφανειακά ύδατα έχει ως αποτέλεσμα την μαζική και παρατεταμένη εμφάνιση κυανοβακτηριακών ανθίσεων σε πολλούς ταμιευτήρες νερού παγκοσμίως [185, 186]. Επίσης, οι υπερβολικά υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται κατά την διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού έχουν ως συνέπεια την μείωση της κάθετης ταραχώδους ανάμειξης των υδάτων, με αποτέλεσμα να ευνοείται ο ρυθμός ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων [187] καθώς και η πιθανότητα δημιουργίας τοξικής κυανοβακτηριακής άνθισης (toxic bloom / harmful algal bloom, HAB) [188]. Πρέπει να ληφθούν υπόψη οι σοβαρές επιπτώσεις που προκαλούν οι έντονες κυανοβακτηριακές ανθίσεις και ότι μπορεί να αυξηθούν σημαντικά λόγω της περαιτέρω αλλαγής του κλίματος στο μέλλον με συνέπεια να αυξάνεται η πιθανότητα έκθεσης των ανθρώπων στις κυανοτοξίνες [189]. Συνεπώς, περαιτέρω συστηματική παρακολούθηση των υδάτινων συστημάτων της χώρας μας αλλά και όλου του κόσμου με αξιόπιστες τεχνικές όπως LC-MS και LC-MS/MS και καταγραφή των κυανοτοξινών που παράγονται, θα ωφελήσει πρώτιστα την προστασία της δημόσιας υγείας και δευτερευόντως πιθανότατα θα προσθέσει επιπλέον δεδομένα για την συμπεριφορά των κυανοβακτηρίων και των κυανοτοξινών τους κατά το φαινόμενο της άνθισης-bloom.

Κεφάλαιο 2 : Οργανικοί ρύποι

2.1 Εισαγωγή

«Το νερό είναι η αρχή των πάντων» είχε πει ο Θαλής ο Μιλήσιος. Το νερό δεν είναι εμπορικό προϊόν αλλά αποτελεί κληρονομιά που πρέπει να προστατεύεται και να τυγχάνει κατάλληλης διαχείρισης καθώς είναι φυσική πηγή ζωτικής σημασίας για τους ανθρώπους και απαραίτητο για όλα τα οικοσυστήματα. Ήδη κάποιες περιοχές τους πλανήτη αντιμετωπίζουν σοβαρό πρόβλημα έλλειψης νερού (water crisis) λόγω της αυξημένης κατανάλωσής και σπατάλης του, της ακανόνιστης κατανομής του στον πλανήτη, της κλιματικής αλλαγής στη Γη και των πάρα πολλών ανθρωπογενών δραστηριοτήτων [190]. Επίσης, υπάρχουν αμέτρητες πηγές παραγωγής, χρήσης και διάθεσης πολλών χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται καθημερινά στην ιατρική, τη βιομηχανία, τη γεωργία ακόμα και στις απλές οικιακές ανάγκες που οδήγησαν στη εκτενή παρουσία των οργανικών ρύπων στο περιβάλλον [191]. Η ανεξέλεγκτη απόρριψη χημικών ουσιών, έστω αν είναι σε μικροποσότητες ή ίχνη δηλαδή σε συγκεντρώσεις της τάξης των ng/L και µg/L (μικρορύποι – micropollutants), οδηγεί στη συσσώρευσή τους στα υδάτινα συστήματα. Η χημική ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων αποτελεί απειλή για την ανθρώπινη υγεία αλλά και για το υδάτινο περιβάλλον με επιπτώσεις όπως η οξεία και η χρόνια τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς, η συσσώρευση οργανικών ρύπων στο οικοσύστημα και οι απώλειες οικοσυστημάτων και βιοποικιλότητας. Το υδάτινο περιβάλλον επιβαρύνεται από τη χημική ρύπανση τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα [192-194].

Για την πρόληψη της ρύπανσης που προκαλείται από ορισμένες επικίνδυνες ουσίες που εκχέονται στο υδάτινο περιβάλλον της Κοινότητας, η Ευρωπαϊκή Ένωση εξέδωσε την οδηγία 76/464/ΕΟΚ η οποία έχει τροποποιηθεί επανειλημμένα. Με την οδηγία 2006/11/ΕΚ, που αποτελεί κωδικοποιημένη έκδοση της 76/464/ΕΟΚ, έχει συνταχθεί ένας κατάλογος με ορισμένες ιδιαίτερες επικίνδυνες ουσίες που απορρίπτονται στο υδάτινο περιβάλλον της Ευρωπαϊκής κοινότητας και για τις οποίες πρέπει να ληφθούν κατάλληλα μέτρα με στόχο την εξάλειψη της ρύπανσης. Ανάμεσα στις ενώσεις αυτές συμπεριλαμβάνονται οι αλογονούχες οργανικές ενώσεις και οι οργανοφωσφορικές ενώσεις [195].

Επιπρόσθετα, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει εκδώσει και μία άλλη σειρά από οδηγίες σχετικά με την πολιτική των υδάτων που έχουν ως στόχο την προστασία των υδάτινων συστημάτων και της δημόσιας υγείας από την ρύπανση. Η πρώτη οδηγία εκδόθηκε το 2000 (Directive 2000/60/ΕΚ) με την οποία θεσπίστηκε το πλαίσιο κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων (Water Framework Directive, WFD) και ορίστηκε στρατηγική για την αντιμετώπιση της ρύπανσης των επιφανειακών υδάτων με στόχο την αποφυγή μακροπρόθεσμης επιδείνωσης της ποιότητας και της ποσότητας τους. Στο πλαίσιο αυτής της δράσης προσδιορίστηκαν οι ουσίες προτεραιότητας (priority substances) που παρουσιάζουν σημαντικό κίνδυνο για το υδάτινο περιβάλλον ή μέσω αυτού για τους ανθρώπους [196]. Το 2008 εκδόθηκε οδηγία 2008/105/ΕΚ, που είναι συμπληρωματική της 2000/60/ΕΚ, όπου ορίστηκαν οι πρώτες 33 ουσίες προτεραιότητας, 8 επιπλέον ρυπογόνες ουσίες και τα σχετικά με αυτές πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος, ΠΠΠ (environmental quality standards, EQS) στον τομέα της πολιτικής των υδάτων [197]. Πιο πρόσφατα η WFD τροποποιήθηκε από την οδηγία 2013/39/ΕΕ όπου προστέθηκαν 12 νέες ουσίες προτεραιότητας και αναθεωρήθηκαν τα ΠΠΠ. Η οδηγία 2013/39/ΕΕ περιλαμβάνει τα ΠΠΠ για 45 ουσίες προτεραιότητας (41 οργανικές ουσίες /

κατηγορίες και 4 μέταλλα) και ορισμένες άλλες ρυπογόνες ουσίες [198]. Η ελληνική νομοθεσία έχει εναρμονιστεί με τις ευρωπαϊκές οδηγίες [199].

Εκτός από τις ουσίες προτεραιότητας υπάρχουν και άλλες χημικές ουσίες οι οποίες αποκαλούνται αναδυόμενοι ρύποι (emerging contaminants / contaminants of emerging concern), που δεν περιλαμβάνονται στους υπάρχοντες κανονισμούς της ποιότητας των υδάτων και φαίνεται να έχουν δυνητικές αρνητικές επιδράσεις στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία. Στις ουσίες αυτές περιλαμβάνονται αρκετές υποκατηγορίες ουσιών, μεταξύ των οποίων οι «ενδοκρινικοί διαταράκτες» και τα «φάρμακα και προϊόντα προσωπικής φροντίδας». Μία από τις εισόδους των ουσιών αυτών στο περιβάλλον είναι και μέσω των αστικών αποβλήτων. Επειδή η ποιότητα των διαθέσιμων δεδομένων παρακολούθησης σχετικά με τη συγκέντρωση των αναδυόμενων ρύπων στο υδάτινο περιβάλλον δεν είναι επαρκής για την αξιολόγηση του κινδύνου τους, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή θέσπισε ένα νέο μηχανισμό. Στα πλαίσια αυτού του μηχανισμού εξέδωσε το 2015 τον πρώτο κατάλογο επιτήρησης (watch list), όπου συμπεριλαμβάνονται 10 ουσίες / κατηγορίες (17 ενώσεις) που ενδέχεται να δημιουργούν σημαντικό κίνδυνο για το υδάτινο περιβάλλον ή μέσω αυτού με στόχο την συλλογή δεδομένων για την μελλοντική ταξινόμησή τους (Decision 2015/495/EE) [200]. Στον κατάλογο αυτό συμπεριλαμβάνει και ενδεικτικές αναλυτικές μεθόδους, που είναι στις περισσότερες περιπτώσεις είναι SPE, LC-MS/MS (SPE: εκχύλιση στερεάς φάσης, LC-MS-MS: Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπλού), ώστε να διασφαλιστεί η συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων.

Ένας από τους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου SPE, LC-MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 29 οργανικών ρύπων στο νερό. Στις υπό μελέτη ουσίες συμπεριλαμβάνονται 9 ουσίες προτεραιότητας: Pentachlorophenol και 8 φυτοφάρμακα (Alachlor, Atrazine, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos ή Chlorpyrifos-ethyl, Diuron, Isoproturon, Simazine και Trifluralin), 3 ουσίες από το κατάλογο επιτήρησης: 17a Ethinyl estradiol, β-Estradiol και Diclofenac και 17 επιπλέον αναδυόμενοι ρύποι: 2,4,6-Trichlorophenol, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorotoluron, Cyanazine, Diazinon, Dimethoate, Ethion, Fenthion, Linuron, Malathion, Methidathion, Metribuzine, Monuron, Phosalone, Propazine και Triazophos των οποίων έχει απαγορευθεί η χρήση.

2.2 Φυτοφάρμακα

Η μεγάλη ανάγκη για αυξημένη παραγωγή αγροτικών προϊόντων, μετά τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, οδήγησε στην κατακόρυφη αύξηση της παραγωγής οργανικών φυτοφαρμάκων, προκειμένου να προστατευθούν οι καλλιέργειες από ασθένειες, έντομα και ζιζάνια. Τα φυτοφάρμακα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: α) Ζιζανιοκτόνα, που καταστρέφουν τα αγριόχορτα που αναπτύσσονται στις καλλιέργειες και εμποδίζουν την ανάπτυξη των καλλιεργημένων φυτών, β) Εντομοκτόνα, που καταστρέφουν τα έντομα που τρώνε τα διάφορα μέρη των φυτών και γ) Παρασιτοκτόνα ή Μυκητοκτόνα, που καταστρέφουν τα ζωικά ή φυτικά παράσιτα που ζουν στα φυτά και τρέφονται εις βάρος τους.

Η χρήση των φυτοφαρμάκων παγκοσμίως αυξήθηκε δραματικά τις δύο προηγούμενες δεκαετίες επιφέροντας αλλαγές στον τρόπο καλλιέργειας και αύξηση στους ρυθμούς καλλιέργειας (υπερκαλλιέργεια). Αυτή η διαδεδομένη χρήση φυτοφαρμάκων για αγροτικούς και μη-αγροτικούς σκοπούς έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία υπολειμμάτων τους σε ποικίλα περιβαλλοντικά δείγματα (υπόγεια και επιφανειακά ύδατα, έδαφος, φυτά). Η ρύπανση των επιφανειακών υδάτων

με φυτοφάρμακα έχει καταγραφεί παγκοσμίως και αποτελεί θέμα μείζονος σημασίας που προκαλεί ανησυχία τόσο σε τοπική, εθνική όσο και σε παγκόσμια κλίμακα. Τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων μπορεί να βρεθούν στο υδατικό σύστημα μέσω διαφόρων τρόπων. Κυρίως, μεταφέρονται μέσω της απόπλυσης του εδάφους από το νερό της βροχής (run-off) ή διαπερνούν το έδαφος και μεταναστεύουν στα υπόγεια ύδατα (leaching). Επίσης, η ρύπανση των υδάτων με φυτοφάρμακα μπορεί να γίνει εξαιτίας της απρόσεκτης απόρριψης των άδειων δοχείων τους καθώς και από τον καθαρισμό του εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή τους.

Τα περισσότερα φυτοφάρμακα είναι σταθερές ενώσεις, δηλαδή δεν διασπώνται εύκολα στο περιβάλλον. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία και στο περιβάλλον δεν είναι ακριβώς γνωστές. Τα φυτοφάρμακα συνδέονται με χρόνιες ασθένειες, καρκίνο και νευρολογικά φαινόμενα. Παρόλα αυτά η πλήρης απαγόρευσή τους θα δημιουργούσε τεράστια προβλήματα στη γεωργική παραγωγή. Για το λόγο αυτό η χρήση τους πρέπει να γίνεται με μέτρο και σύνεση.

Εκτός από τη σειρά οδηγιών που συμπεριλαμβάνουν τα φυτοφάρμακα στις ουσίες προτεραιότητας στο πλαίσιο της κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει συμπεριλάβει τα παρασιτοκτόνα στην οδηγία 98/83/EK σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης [201]. Στην οδηγία, με την οποία έχει εναρμονιστεί η ελληνική νομοθεσία, ορίζεται ότι η συγκέντρωση του κάθε παρασιτοκτόνου στο πόσιμο νερό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,10 μg/L ενώ το άθροισμά τους συνολικά δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0,50 μg/L [202].

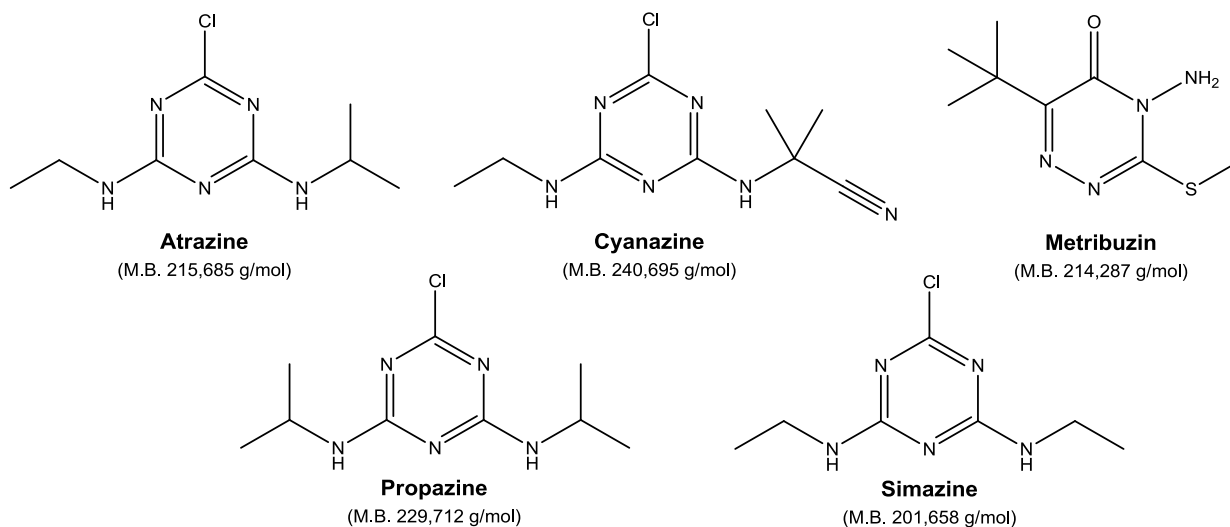
Στην παρούσα μελέτη συμπεριλαμβάνονται 26 φυτοπροστατευτικές ενώσεις από τις κατηγορίες των τριαζινών (Atrazine, Cyanazine, Metribuzin, Propazine & Simazine), φαινυλουριών (Chlorotoluron, Diuron, Linuron, Isoproturon & Monuron), οργανοφωσφορικών (Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorpyrifos, Chlorfenvinphos, Diazinon, Phosalone, Malathion, Methidathion, Triazophos, Dimethoate, Fenthion και Ethion), χλωροακετανιλιδίων (Alachlor), δινιτροανιλίνων (Trifluralin) και χλωροφαινολών (Pentachlorophenol & 2,4,6-Trichlorophenol).

2.2.1 Τριαζίνες

Οι τριαζίνες είναι μια κατηγορία ζιζανιοκτόνων και αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές κατηγορίες φυτοπροστατευτικών ενώσεων που έχουν αναπτυχθεί. Από το 1952 που ανακαλύφθηκε η πρώτη τριαζίνη στο J.R. Geigy, Ltd. στην Ελβετία, οι τριαζίνες έχουν συμβάλει σημαντικά στην γεωργία καθώς εφαρμόζονται για τον περιορισμό των αγριόχορτων και των ζιζανίων σε περισσότερες από 50 καλλιέργειες σε όλο τον κόσμο, αναστέλλοντας την φωτοσύνθεση σε ορισμένα φυτά καθώς εμποδίζουν την φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων. Εφαρμόζονται κυρίως στις καλλιέργειες καλαμποκιού, ζαχαροκάλαμου, ζαχαρόχορτου, παπάτας, σόγιας και εσπεριδοειδών [203]. Χαρακτηριστικό της δομής των τριαζινών είναι ένας ετεροκυκλικός εξαμελής δακτύλιος, τύπου βενζολίου, όπου τρεις άνθρακες έχουν αντικατασταθεί από άζωτα (Σχήμα 2.1). Στην παρούσα μελέτη το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάστηκε στις συμμετρικές χλωροτριαζίνες Atrazine, Cyanazine, Propazine & Simazine και στην ασύμμετρη τριαζιόνη Metribuzine.

Η τριαζίνες αποτελούν μια αποτελεσματική και οικονομική κατηγορία ζιζανιοκτόνων η οποία συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την μόλυνση των υπόγειων υδάτων. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη σε παγκόσμιο επίπεδο και επιστημονικά μελετημένη τριαζίνη είναι η Atrazine [203]. Η χρήση των Atrazine, Simazine, Propazine και Cyanazine έχει

απαγορευθεί στις χώρες της ΕΕ [204] και επιπρόσθετα οι Atrazine και Simazine ανήκουν στις ουσίες προτεραιότητας στο πλαίσιο της WFD [198].



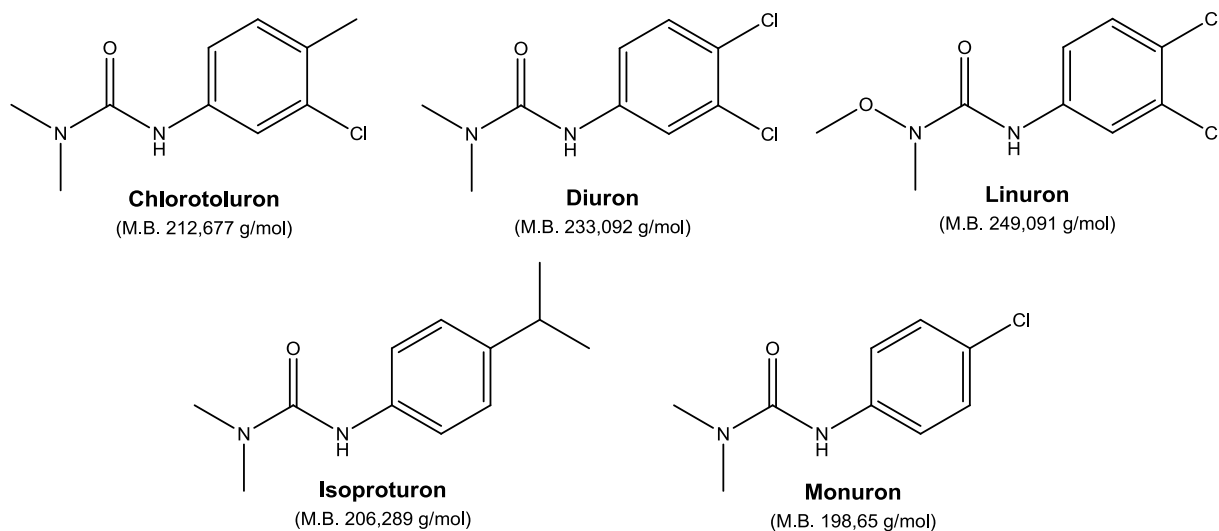
Σχήμα 2.1: Χημική δομή των τριαζινών Atrazine, Cyanazine, Metribuzin, Propazine και Simazine

Οι τριαζίνες έχει αναφερθεί ότι έχουν επιδράσεις που σχετίζονται με ενδοκρινικές διαταραχές και τοξικότητα στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη [205, 206]. Ακόμα, έχει αναφερθεί πιθανή στατιστική συσχέτιση της έκθεσης σε τριαζίνες με την ανάπτυξη καρκίνου [207] και ειδικότερα καρκίνου του μαστού [208]. Γενικά, έχουν χαμηλή τοξικότητα μετά από κατάποση (oral toxicity) και δεν αποτελούν σοβαρό κίνδυνο αν γίνετε φυσιολογική χρήση τους ούτε προκαλούν αναπτυξιακή τοξικότητα, με εξαίρεση τις Atrazine, Cyanazine και Metribuzin [209]. Επιπρόσθετα, η Atrazine που έχει μελετηθεί εκτενέστερα, έχει συσχετιστεί με την πρόκληση οξειδωτικού στρες [206], κυτταροτοξικότητα [210, 211] και με επιδράσεις στο ντοπαμινεργικό σύστημα [212, 213]. Η Cyanazine είναι επίσης νευροτοξική και προκαλεί ερεθισμό στο αναπνευστικό σύστημα. Η Simazine και η Propazine μπορούν εκτός των άλλων να προκαλέσουν δερματίτιδα και η Simazine έχει και άλλες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία όπως σπασμούς, παράλυση, κυάνωση και διάρροια [214].

2.2.2 Ουρίες – Φαινιλουρίες

Οι ουρίες επίσης αποτελούν μια πολύ σημαντική κατηγορία ζιζανιοκτόνων που αναστέλλουν την φωτοσύνθεση και εφαρμόζονται για τον έλεγχο των ζιζανίων στις αγροτικές καλλιέργειες αλλά και σε μη γεωργικές εφαρμογές. Ειδικότερα χρησιμοποιούνται για τον περιορισμό των πλατύφυλλων και χλοοτάδων ζιζανίων στις καλλιέργειες δημητριακών, ως ζιζανιοκτόνα σε αστικές περιοχές αλλά και ως αλγοκτόνα σε χρώματα και επιχρίσεις. Το πρώτο ζιζανιοκτόνο τύπου ουρίας ήταν το Monuron που εισήχθη στην αγορά από την DuPont το 1952 [215, 216]. Οι φαινιλουρίες είναι υποκατηγορία των ουριών, όπου η ουρία συνδέεται με ένα φαινύλιο. Η γενική δομή τους είναι φαινύλιο-NH-C(O)-NR₂. Ο φαινολικός δακτύλιος μπορεί να υποκαθίσταται κυρίως από άτομα χλωρίου ή βρωμίου, όμως υπάρχουν και μέθοξυ, μέθυλο, τριφθορομέθυλο και 2-πρόπυλο υποκαταστάτες. Οι περισσότερες φαινιλουρίες είναι N-διμέθυλο αλλά υπάρχουν και συνδυασμοί όπου υπάρχει ένα μόνο μεθύλιο και μία άλλη ομάδα υποκαταστάτη [217]. Στην παρούσα μελέτη το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάστηκε στις φαινιλουρίες Chlorotoluron, Diuron, Linuron, Isoproturon και Monuron (Σχήμα 2.2).

Το Diuron είναι η πιο διαδεδομένη φαινυλουρία και βρίσκεται ανάμεσα στις 10 πιο χρησιμοποιούμενες φυτοπροστατευτικές ενώσεις στις ΗΠΑ, ενώ στο Isoproturon χρησιμοποιείται ευρέως σε άλλες χώρες, όπως η Ινδία [215]. Γενικότερα, τα Linuron, Chlorotoluron, Diuron και Isoproturon αποτελούν σημαντικούς ρυπαντές του επιφανειακού και πόσιμου νερού λόγω τις ευρείας χρήσης τους σε μεγάλες ποσότητες (>50.000 kg/χρόνο) και της ικανότητάς τους να μεταναστεύουν στο νερό. Επιπλέον, η χρήση των Linuron, Isoproturon και Monuron δεν εγκρίνεται στην ΕΕ [204] και τα Diuron και Isoproturon ανήκουν στις ουσίες προτεραιότητας στο πλαίσιο της WFD [198].



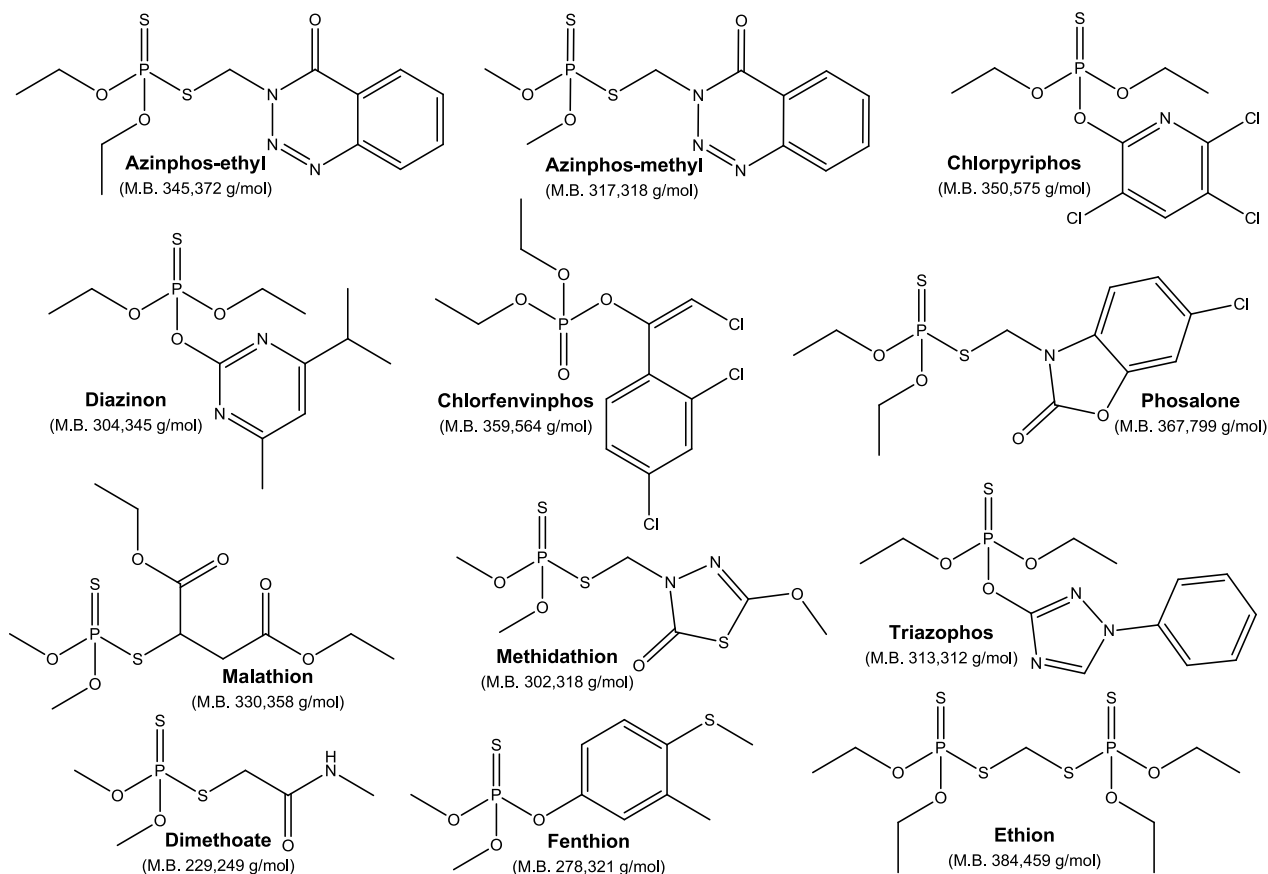
Σχήμα 2.2: Χημική δομή των φαινυλουριών Chlorotoluron, Diuron, Linuron, Isoproturon και Monuron

Παρόλο που οι φαινυλουρίες χρησιμοποιούνται εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες, δεν υπάρχουν πληροφορίες για την τοξικότητα των περισσότερων από αυτές. Η οξεία τοξικότητα των φαινυλουριών είναι χαμηλή (LD_{50} μετά από κατάποση >1g/kg), αλλά σε χρόνια έκθεση έχει αναφερθεί ότι προκαλούν νευρολογικές διαταραχές στην συμπεριφορά, μείωση του σωματικού βάρους, αιματοτοξικότητα και ηπατοτοξικότητα [216]. Γενικά, οι ουρίες δεν έχουν επιδράσεις που σχετίζονται με τοξικότητα στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη, με εξαίρεση το Linuron που προκάλεσε τερατογενείς ανωμαλίες σε πειραματόζωα [218, 219]. Τα Chlorotoluron, Isoproturon και Monuron είναι καρκινογόνα ενώ τα Linuron και Diuron είναι πιθανά καρκινογόνα. Ακόμα, προκαλούν ερεθισμό στα μάτια, το δέρμα και το αναπνευστικό σύστημα ενώ είναι πιθανό να προκαλούν και ενδοκρινικές διαταραχές [214].

2.2.3 Οργανοφωσφορικά

Οι οργανοφωσφορικές ουσίες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα συνθετικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται για πολλούς σκοπούς όπως : 1) ως εντομοκτόνα για την προστασία των καλλιεργειών, των κήπων και των κτιρίων, 2) ως χημικά όπλα σε πολέμους και τρομοκρατικές επιθέσεις (νευροτοξικά αέρια) και 3) ως φαρμακευτικές ουσίες στην ιατρική και την κτηνιατρική. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα εφαρμόζονται πάρα πολύ για τη προστασία της δημόσιας υγείας από ασθένειες όπως η ελονοσία, ο ιός του Δυτικού Νείλου, η νόσος του Lyme (βορρελίωση) και άλλες καθώς περιορίζουν τους πληθυσμούς των εντόμων που είναι φορείς τους όπως κουνούπια, τσιμπούρια κ.α.. Τα οργανοφωσφορικά αποτελούν τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα στη γεωργία και τη δασοκομία, σε όλο τον κόσμο. Η πρώτη οργανοφωσφορική ένωση συντέθηκε

στη Γαλλία το 1854 από τον Phillipe de Clermont ενώ το πρώτο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο, το Parathion που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα, ανακαλύφθηκε το 1944, κατά τη διάρκεια του Β' παγκόσμιου πόλεμου, στη Γερμανία από την ομάδα του Schrader. Σήμερα είναι εμπορικά διαθέσιμες πάνω από εκατό οργανοφωσφορικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται κυρίως ως εντομοκτόνα [220].



Σχήμα 2.3: Χημική δομή των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorpyrifos, Chlorfenvinphos, Diazinon, Phosalone, Malathion, Methidathion, Triazophos, Dimethoate, Fenthion και Ethion

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι κυρίως εστέρες, αμίδια ή ανυδρίτες του φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος. Ειδικότερα, μπορούν να διακριθούν στις ακόλουθες ομάδες: (1) Μη θειούχες ενώσεις του φωσφορικού ή του φωσφονικού οξέος όπως το Chlorfenvinphos, (2) Θειολο- και θειοενώσεις του φωσφορικού ή του φωσφονικού οξέος, όπως τα Diazinon, Chlorpyrifos, Triazophos & Fenthion, (3) Εστέρες του διθειοφωσφορικού ή του διθειοφωσφονικού οξέος, όπως τα Azinphos ethyl και methyl, Malathion, Phosalone & Methidathion, (4) Αμίδια του φωσφορικού ή φωσφονικού οξέος, όπως το Dimethoate και (5) Ανυδρίτες του φωσφορικού οξέος ή εστέρες του πυροφωσφορικού οξέος, όπως το Ethion. Στο Σχήμα 2.3 παρατίθενται οι δομές των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι η μεγαλύτερη ομάδα φυτοφαρμάκων και προωθούνται ως πιο οικολογική εναλλακτική των οργανοχλωριωμένων [221]. Το πιο διαδεδομένο οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο είναι το Malathion το οποίο χρησιμοποιείται για πάνω από μισό αιώνα. Τα οργανοφωσφορικά αναστέλλουν την δράση των ενζύμων χολινεστεράσης. Επειδή αυτή η ιδιότητα

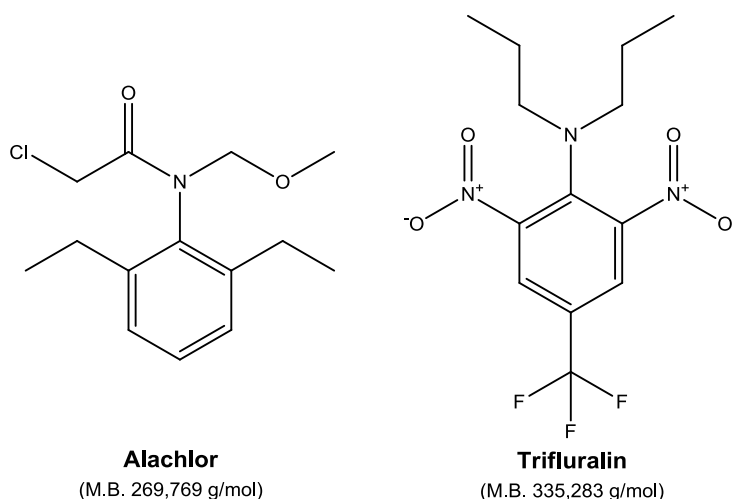
τους δεν είναι επιλεκτική ανάμεσα στα είδη, τα καθιστά εξαιρετικά τοξικά χημικά τα οποία αποτελούν σημαντική απειλή για το περιβάλλον αλλά και για την υγεία των ανθρώπων, των ζώων, της άγρια πανίδας και των υδρόβιων οργανισμών [220]. Στην ΕΕ δεν εγκρίνεται η χρήση των Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorfenvinphos, Diazinon, Phosalone, Methidathion, Triazophos, Fenthion & Ethion [204] και τα Chlorfenvinphos και Chlorpyrifos ανήκουν στις ουσίες προτεραιότητας στο πλαίσιο της WFD [198].

Η κατηγορία των οργανοφωσφορικών αποτελείται από τον μεγαλύτερο αριθμό ενώσεων και για αυτό υπάρχουν πάρα πολλές μελέτες για τις επιδράσεις τους. Γενικά, τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα μπορούν να επηρεάσουν τα οιστρογόνα και τις ορμόνες του θυρεοειδούς αδένος, ενώ ειδικότερα οι ενώσεις Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Diazinon, Dimethoate, Malathion & Metribuzine είναι γνωστό ότι προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές [214, 222, 223]. Ακόμα, η κατηγορία των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων προκαλεί αρνητικές επιδράσεις στην λειτουργία των ενζύμων χολινεστεράσης [221], μείωση της έκκρισης ινσουλίνης, διαταραχή του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπιδίων [224]. Επίσης, τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν συσχετισθεί με γενετοξικές επιδράσεις (ειδικότερα το Chlorpyrifos) [225] αλλά και με επιδράσεις στη λειτουργία των μιτοχονδρίων καθώς προκαλούν κυτταρικό οξειδωτικό στρες και προβλήματα στο νευρικό και ενδοκρινικό σύστημα [224]. Επιπρόσθετα, από μελέτες που έγιναν σε πληθυσμούς προκύπτει ότι η έκθεση σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στην υγεία όπως καρδιαγγειακές παθήσεις [226], επίδραση στο νευρικό σύστημα [221, 227, 228], άνοια [229] και αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης λεμφώματος non-Hodgkin [230]. Ακόμα, η έκθεση πριν αλλά και κατά τη διάρκεια της κύησης σε οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα έχει συσχετιστεί με μείωση της διάρκειας της κύησης [231] αλλά και με νευρολογικά προβλήματα στα παιδιά [232, 233].

2.2.4 Alachlor

Το Alachlor είναι ζιζανιοκτόνο το οποίο ανήκει στην κατηγορία των ανιλιδών και ειδικότερα στην υποκατηγορία των χλωροακετανιλιδών. Κυκλοφόρησε πρώτη φορά το 1967 και εφαρμόζεται για τον ετήσιο περιορισμό των χορταριών και των πλατύφυλλων ζιζανίων σε καλλιέργειες καλαμποκιού, βαμβακιού, λάχανου, ελαιοκράμβης, φιστικιού, ραπανιού, σόγιας και ζαχαρόχορτου [234]. Η χημική δομή του Alachlor δίνεται στο Σχήμα 2.4. Ο τρόπος δράσης του δεν είναι πλήρως κατανοητός. Πιθανά, προκαλεί αναστολή της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων και των λιπιδίων, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των χορταριών και των ζιζανίων [235].

Η χρήση του Alachlor έχει απαγορευτεί στην ΕΕ από το 2006 [204] και επίσης έχει καταταχθεί στις ουσίες προτεραιότητας της στο πλαίσιο της WFD [198]. Το Alachlor είναι ενδοκρινικός διαταράκτης καθώς δεσμεύεται ανταγωνιστικά στους υποδοχείς οιστρογόνου και προγεστερόνης. Επίσης, αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό υποδοχέα πρεγνάνης X, εμποδίζοντας την παραγωγή των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για μεταβολισμό των στεροειδών ορμονών [236, 237]. Ακόμα, βραχυπρόθεσμη η έκθεση στο Alachlor μέσω του πόσιμου νερού μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό στο δέρμα και στα μάτια ενώ η μακροπρόθεσμη έκθεση μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο ήπαρ, τα νεφρά και τη σπλήνα αλλά και καρκίνο [214, 238].



Σχήμα 2.4: Χημική δομή της χλωροακετανιλίδης Alachlor και της δινιτροανιλίνης Trifluralin

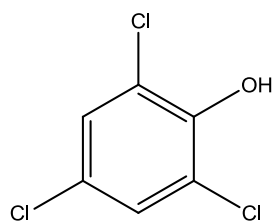
2.2.5 Trifluralin

Το Trifluralin είναι ζιζανιοκτόνο και ανήκει στην κατηγορία των δινιτροανιλίνων. Ανακαλύφθηκε το 1960 στο Eli Lilly Research Laboratories και κυκλοφόρησε πρώτη φορά στην αγορά το 1964 [239]. Η χημική δομή του Trifluralin δίνεται στο Σχήμα 2.4. Χρησιμοποιείται για τον ετήσιο έλεγχο των χορταριών και των πλατύφυλλων ζιζάνιων και εφαρμόζεται πριν την ανάπτυξή τους τόσο σε καλλιέργειες όσο και σε θάμνους και λουλούδια. Εφαρμόζεται κυρίως σε καλλιέργειες βαμβακιού, σόγιας όπως και σε μερικά φρούτα και λαχανικά [240]. Το Trifluralin εμποδίζει την ανάπτυξη των ριζών καθώς διακόπτει την μίτωση με αποτέλεσμα να καταπολεμούνται τα ζιζάνια στο στάδιο της ανάπτυξής τους [241].

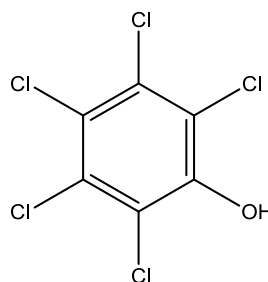
Η χρήση του Trifluralin έχει απαγορευθεί στην ΕΕ από το 2008 [204] και λόγω της υψηλής τοξικότητάς του στα ψάρια και τους άλλους υδρόβιους οργανισμούς έχει καταταχτεί στις ουσίες προτεραιότητας στο πλαίσιο της WFD [198]. Το Trifluralin είναι ενδοκρινικός διαταράκτης καθώς αλληλεπιδρά με τον κυτταρικό υποδοχέα πρεγνάνης X και παρεμβαίνει στον μεταβολισμό των στεροειδών ορμονών [237]. Επίσης είναι τοξικό για το αίμα, το ήπαρ και τα νεφρά, μπορεί να προκαλέσει αναπνευστική καταστολή και ερεθισμό στο δέρμα [214].

2.2.6 Χλωροφαινόλες

Οι χλωροφαινόλες είναι μία ομάδα χημικών ενώσεων όπου σε ένα φαινολικό δακτύλιο έχουν υποκατασταθεί τα υδρογόνα (H) με ένα έως πέντε χλώρια (Cl). Συνολικά σχηματίζονται 19 διαφορετικές χλωροφαινόλες, συμπεριλαμβανομένων των ισομερών. Οι χλωροφαινόλες χρησιμοποιούνται ευρέως ως παρασιτοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και απολυμαντικά. Στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον εστιάστηκε σε δύο χλωροφαινόλες, τη 2,4,6-Trichlorophenol και τη Pentachlorophenol (Σχήμα 2.5).



2,4,6-Trichlorophenol
(M.B. 197,439 g/mol)



Pentachlorophenol
(M.B. 266,323 g/mol)

Σχήμα 2.5: Χημική δομή της 2,4,6-Trichlorophenol και της Pentachlorophenol

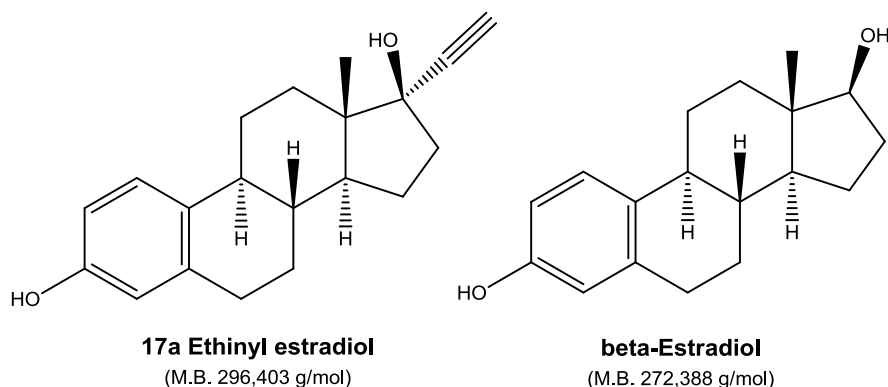
Οι χλωροφαινόλες μπορεί να καταλήξουν στο πόσιμο νερό λόγω της χλωρίωσης των φαινολών κατά την διύλιση του νερού και ως παραπροϊόντα της αντίδρασης του υποχλωριώδους με φαινολικά οξέα. Επίσης μεταναστεύουν στο πόσιμο νερό λόγω της χρήσης τους ως βιοκτόνα ή ως προϊόντα αποικοδόμησης των φαίνοξυ ζιζανιοκτόνων. Η 2,4,6-Trichlorophenol είναι το πιο πιθανό παραπροϊόν που προκύπτει κατά την χλωρίωση του νερού με συγκεντρώσεις που φτάνουν στα 719 ng/L [242]. Η 2,4,6-Trichlorophenol χρησιμοποιείται επίσης ως μικροβιοκτόνο, συντηρητικό κόλλας, συντηρητικό ξύλου και στην παραγωγή των 2,3,4,6-Tetrachlorophenol και Pentachlorophenol [243, 244]. Τα δεδομένα σχετικά με την τοξικότητα της 2,4,6-Trichlorophenol στους ανθρώπους είναι περιορισμένα. Από μελέτη για την επίδραση της μέσω εισπνοής, προκύπτει ότι επιδρά στο αναπνευστικό σύστημα προκαλώντας βήχα, χρόνια βρογχίτιδα και αλλοιώσεις στους πνεύμονες και την πνευμονική λειτουργία. Επίσης, από μελέτες που έγιναν σε ζώα προκύπτει ότι είναι καρκινογόνο, καθώς η κατάποσή της οδηγεί στην εμφάνιση λεμφωμάτων, λευχαιμίας και καρκίνου του ήπατος [243, 245].

Η Pentachlorophenol παράχθηκε πρώτη φορά την δεκαετία του 1930 και χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο, μυκητοκτόνο και ζιζανιοκτόνο. Αποτελεί έναν από τους πιο συχνά ανιχνευόμενους ρύπους στο νερό [193, 246] και είναι ανάμεσα στις ουσίες προτεραιότητας στο πλαίσιο της WFD [198]. Η χρήση της Pentachlorophenol έχει απαγορευθεί στην ΕΕ [204]. Από μελέτες προκύπτει ότι είναι ενδοκρινικός διαταράκτης καθώς έχει ασθενή οιστρογονική και αντιανδρογόνο επίδραση [236]. Ακόμα εκτός από το γεγονός ότι προκαλεί ερεθισμούς στα μάτια και το δέρμα, είναι νευροτοξική, τοξική για το ήπαρ και το θυρεοειδή, μπορεί να προκαλέσει καρδιακή ανεπάρκεια, βιοσυσσωρεύεται στο οργανισμό και είναι καρκινογόνο [214].

2.3 Ενδοκρινικοί διαταράκτες

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι τεχνητές χημικές ουσίες που μιμούνται τις ορμόνες και παρεμβαίνουν στο ορμονικό σύστημα των ανθρώπων αλλά και των ζώων, με αποτέλεσμα να προκαλούν ενδοκρινικές διαταράξεις [247]. Οι ουσίες αυτές μπορούν να διαταράξουν την γονιμότητα, να δημιουργήσουν νεοπλασίες, καρκίνο αλλά κυρίως επιδρούν κατά την διάρκεια της κύησης στο έμβρυο με αποτέλεσμα τη δημιουργία συγγενών ανωμαλιών. Ο ανθρώπινος οργανισμός είναι περισσότερο ευάλωτος στην έκθεση ενδοκρινικών διαταρακτών κατά την εμβρυϊκή ζωή και την παιδική ηλικία καθώς μπορεί να επιδράσουν στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης [247, 248]. Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες έχουν διάφορους τρόπους δράσης: (1) μπορούν να μιμηθούν ή εν μέρει να μιμηθούν τις φυσικές ορμόνες του σώματος όπως τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα και τις

θυρεοειδικές ορμόνες, (2) δρουν ως ανταγωνιστές καθώς δεσμεύονται στους υποδοχείς των ενδογενών ορμονών στο κύτταρο, με αποτέλεσμα να μην δίνεται σωστά το σήμα στον υποδοχέα της ορμόνης και να υπάρχει «αστοχία» στο σώμα, (3) παρεμποδίζουν της φυσικές ορμόνες να φθάσουν στους υποδοχείς τους με αποτέλεσμα να υπάρχει αλλαγή στο φυσικό μεταβολισμό [249]. Εκτός από κάποια φυτοφάρμακα που όπως αναφέρεται και παραπάνω, είναι γνωστό ότι είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες [222, 223] υπάρχουν και άλλοι οργανικοί ρύποι του νερού που τα τελευταία χρόνια έχουν συγκεντρώσει το ενδιαφέρον λόγω των ενδοκρινικών διαταραχών που προκαλούν. Στην παρούσα μελέτη το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάστηκε στα περιβαλλοντικά οιστρογόνα 17α Ethinylestradiol και β-Estradiol (Σχήμα 2.6). Οι ουσίες αυτές μπορεί να καταλήξουν στο πόσιμο νερό λόγω της ανεπαρκούς επεξεργασίας ή της μερικής απομάκρυνσης τους κατά την επεξεργασία των επιφανειακών νερών και των αστικών υγρών αποβλήτων.



Σχήμα 2.6: Χημική δομή των ενδοκρινικών διαταρακτών 17α Ethinylestradiol και β-estadiol

17α-Ethinylestradiol & β-Estradiol

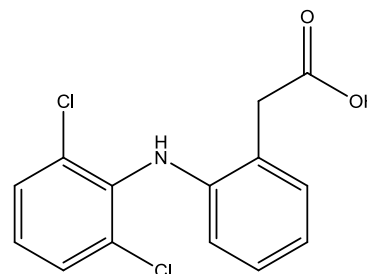
Τα περιβαλλοντικά οιστρογόνα είναι μια υποκατηγορία των ενδοκρινικών διαταρακτών. Ανάμεσα σε αυτά συγκαταλέγονται η 17α-Ethinylestradiol και β-Estradiol (Σχήμα 2.6). Η 17α-Ethinylestradiol (EE2) είναι ένα συνθετικό οιστρογόνο (γυναικεία ορμόνη) και αποτελεί δραστική ουσία των αντισυλληπτικών χαπιών. Η β-estradiol (E2) είναι φυσική ορμόνη και αποτελεί φυσικό ανάλογο της 17α-Ethinylestradiol. Η 17α-Ethinylestradiol αποτελεί ένα ευρύτατο πρόβλημα για το υδάτινο περιβάλλον επειδή είναι μια αρκετά σταθερή ένωση η οποία δεν αποικοδομείται εύκολα και έχει την τάση (1) να προσροφάται στην οργανική ύλη, (2) να συσσωρεύεται στα ιζήματα και (3) να βιοσυσσωρεύεται στους έμβιους οργανισμούς [250, 251]. Από τα αποτελέσματα μελετών προκύπτει ότι η 17α-Ethinylestradiol έχει την ικανότητα να αλλάζει τον προσδιορισμό του φύλου, να καθυστερεί την ωρίμανση του γενετικού συστήματος (σεξουαλική ωρίμανση) και να μειώνει τα δευτερογενή φυλετικά χαρακτηριστικά των έμβιων οργανισμών που εκτίθενται σε αυτήν ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ng/L) καθώς μιμείται το φυσικό της ανάλογο, β-Estradiol [252-257]. Παρά ταύτα η τοξικότητα της 17α-Ethinylestradiol ποικίλει και εξαρτάται από το μελετώμενο είδος και τη δοκιμή που εφαρμόζεται (in vivo ή in vitro) [250]. Εξίσου αρνητικές επιπτώσεις στους έμβιους οργανισμούς έχει και η υπερέκθεση στην φυσική ορμόνη β-Estradiol καθώς επιφέρει πρώιμη εμμηνόρροια και καθυστέρηση στην εμμηνόπαυση. Επίσης η χρήση της σε ορμονικές θεραπείες και τα αυξημένα επίπεδα της β-Estradiol στις γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού [258, 259].

Οι ορμόνες των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων, μπορούν να απελευθερωθούν στο περιβάλλον μέσω των αστικών αποβλήτων (ανθρωπογενής προέλευση) αλλά και από άλλες πηγές όπως τα ζώα και οι ζωοτροφές. Υπάρχει αυξημένη πιθανότητα να ανιχνευτούν βιολογικά δραστικές μορφές αυτών των ενώσεων, μαζί με φαρμακευτικά υπολείμματα, σε επιφανειακά ύδατα στις περιοχές που υπάρχει αυξημένη κτηνοτροφική δραστηριότητα και εκροές αστικών λυμάτων [250, 260-262]. Παρόλο που οι 17α-Ethinylestradiol και β-Estradiol εκκρίνονται από τον οργανισμό σε συζυγή μορφή, που τις καθιστά ανενεργές και υδατοδιαλυτές, μπορούν να αποικοδομηθούν κατά τον καθαρισμό των λυμάτων στις μονάδες επεξεργασίας και να επανέλθουν στην δραστική τους μορφή [261, 263]. Δεδομένης της σημαντικής απειλής που αποτελούν τα οιστρογόνα ως αναδυόμενοι ρύποι του νερού, η ΕΕ συμπεριέλαβε τις 17α-Ethinylestradiol και β-Estradiol στον πρώτο κατάλογο επιτήρησης (watch list) με ουσίες που ενδέχεται να αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για το υδάτινο περιβάλλον ή μέσω αυτού (Decision 2015/495/ΕΕ) [200].

2.4 Υπολείμματα φαρμακευτικών προϊόντων (Pharmaceuticals)

Τα τελευταία χρόνια, ανάμεσα στους αναδυόμενους ρύπους που ανιχνεύονται συχνά στο πόσιμο νερό συγκαταλέγονται και τα φαρμακευτικά προϊόντα. Τα φαρμακευτικά προϊόντα, όπως και τα οιστρογόνα, μεταβολίζονται εν μέρει ή πλήρως από τον ανθρώπινο οργανισμό με αποτέλεσμα να εκκρίνονται αυτούσια ή οι μεταβολίτες τους από το ανθρώπινο σώμα και να καταλήγουν μέσω των αποβλήτων στους αστικούς σταθμούς επεξεργασίας λυμάτων [192, 264]. Επίσης, μπορεί να γίνει άμεση απελευθέρωσή τους από την απευθείας απόρριψή των αχρησιμοποίητων ή ληγμένων φαρμάκων σε νεροχύτες, στη τουαλέτα ή στα σκουπίδια [246, 265]. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η φαρμακευτική ουσία Diclofenac.

Το Diclofenac ανιχνεύεται πολύ συχνά στις εισροές και τις εκροές των αστικών σταθμών επεξεργασίας λυμάτων, τα επιφανειακά και τα υπόγεια ύδατα [260]. Το Diclofenac είναι ένα μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID) που έχει αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντιπυρετικές ιδιότητες. Το όνομά του προκύπτει από σύντμηση της χημικής του ονομασίας: 2-(2,6-dichloranilino) phenylacetic acid και η δομή του παρατίθεται στο Σχήμα 2.7. Παρέχεται ως φάρμακο ή περιέχεται σε φαρμακευτικά σκευάσματα με ποικίλες εμπορικές ονομασίες. Συντέθηκε πρώτη φορά από τους Alfred Sallmann και Rudolf Pfister και κυκλοφόρησε το 1973 με την εμπορική ονομασία Voltaren από την εταιρία Ciba-Geigy (σήμερα Novartis) [266]. Το Diclofenac αναστέλλει τη λειτουργία των ενζύμων COX-1 και COX-2. Επειδή συνδέεται με τα COX ένζυμα, εμποδίζει τη σύνθεση των προστανοειδών. Τα προστανοειδή παράγονται κυρίως στη φλεγμονή και πιστεύεται η αναστολή της σύνθεσης τους αποτελεί τον κύριο μηχανισμό δράσης του NSAID για την αναλγητική και αντιφλεγμονώδη ιδιότητά του [267-269]. Κατά την επεξεργασία των λυμάτων στους σταθμούς επεξεργασίας, το Diclofenac αποικοδομείται ελάχιστα [270] με συνέπεια να καταλήγει στο περιβάλλον σε συγκεντρώσεις που είναι επιβλαβείς για πολλά είδη [260]. Ως απόρροια αυτών, το Diclofenac συγκαταλέγεται στις ουσίες του πρώτου καταλόγου επιτήρησης για το υδάτινο περιβάλλον που εξέδωσε η ΕΕ (Decision 2015/495/ΕΕ) [200].



Diclofenac
(M.B. 296,147 g/mol)

Σχήμα 2.7: Χημική δομή της φαρμακευτικής ουσίας Diclofenac

2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό

Οι οργανικοί ρύποι που καταλήγουν στα υδάτινα συστήματα αποτελούν σημαντικό κίνδυνο τόσο για την ανθρώπινη υγεία όσο και για το περιβάλλον. Συνεπώς απαιτείται συστηματική αξιολόγηση της περιβαλλοντικής ρύπανσης με την εφαρμογή σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών που επιτρέπουν την αξιόπιστη ταυτοποίηση και ακριβή ποσοτικοποίηση κάθε ουσίας που αποτελεί κίνδυνο για την χλωρίδα, την πανίδα και την δημόσια υγεία. Με στόχο την προστασία του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας, η αρχές ανά τον κόσμο, συμπεριλαμβανομένης της ΕΕ, έχουν καταρτίσει καταλόγους με τις ουσίες που πιθανότατα αποτελούν κίνδυνο για το υδάτινο περιβάλλον ή μέσω αυτού. Οι ουσίες αυτές πρέπει να παρακολουθούνται συστηματικά (monitoring) και για πολλές από αυτές έχουν οριστεί μέγιστες επιτρεπτές συγκεντρώσεις. Οι οργανικοί ρύποι του νερού είναι ουσίες από διαφορετικές χημικές ομάδες, όπως ζιζανιοκτόνα, παρασιτοκτόνα, φαινολικές ενώσεις, ενδοκρινικοί διαταράκτες και φαρμακευτικά προϊόντα, και κατά συνέπεια να έχουν ένα μεγάλο εύρος πολικότητας και ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες.

Για το προσδιορισμό των ρύπων στο νερό εφαρμόζεται πλήθος αναλυτικών τεχνικών, όπως ανοσολογικές τεχνικές (immunological techniques), βιοαισθητήρες (biosensors), και χρωματογραφικές τεχνικές. Οι ανοσολογικές τεχνικές βασίζονται στην εκλεκτική σύνδεση των αντισωμάτων με τις ουσίες «στόχους» (αναλύτες). Για τον προσδιορισμό των οργανικών ρύπων έχουν αναπτυχθεί ειδικά αντισώματα τα οποία βρίσκουν εφαρμογή στις δοκιμές ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), TRFIA (time-resolved fluoroimmunoassay), RIA (radioimmunoassay) και CI (chemiluminescence immunoassay) καθώς και σε ανοσοαισθητήρες (immunosensors) [271]. Επίσης έχουν αναπτυχθεί βιοαισθητήρες για τον προσδιορισμό των οργανικών ρύπων στο νερό οι οποίοι αναγνωρίζουν τους αναλύτες με αντισώματα (ανοσοαισθητήρες) ή ένζυμα (ενζυμικοί βιοαισθητήρες) με οπτικούς, ηλεκτροχημικούς και πιεζομετρικούς μεταλλάκτες σήματος [272]. Τόσο η ανοσολογικές τεχνικές όσο και οι βιοαισθητήρες αποτελούν γρήγορες μεθόδους, οι οποίες επιτυγχάνουν χαμηλά όρια ανίχνευσης χωρίς να απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό. Ακόμα, οι αισθητήρες μπορούν χρησιμοποιούνται επί τόπου (in situ) χωρίς να απαιτείται μεταφορά και συντήρηση του δείγματος. Σημαντικό τους όμως μειονέκτημα είναι η χαμηλή εκλεκτικότητα καθώς δεν προσδιορίζουν αποκλειστικά μία μόνο ένωση, αλλά και άλλες ενώσεις που έχουν παρόμοια δομή (cross reactivity). Για τον αξιόπιστο και ακριβή προσδιορισμό των οργανικών ρύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα εφαρμόζονται κυρίως οι τεχνικές αεριοχρωματογραφίας (gas chromatography, GC) και υγροχρωματογραφίας (liquid chromatography, LC) ανάλογα με την πολικότητα, τη πτητικότητα και την θερμική σταθερότητα των αναλυτών [273]. Η φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) αποτελεί την καταλληλότερη μέθοδο ανίχνευσης, καθώς παρέχει υψηλή ειδικότητα και εκλεκτικότητα, με αποτέλεσμα την αδιαμφισβήτητη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ουσιών επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα χαμηλά όρια ανίχνευσης [274].

Αρχικά για τον προσδιορισμό των οργανικών ρύπων χρησιμοποιούταν η τεχνική GC-MS, όμως από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 άρχισε να αυξάνεται και να γίνεται πιο διαδεδομένη η χρήση της LC-MS στην ανάλυση των περιβαλλοντικών δειγμάτων. Σε σύγκριση με το GC-MS, το LC-MS προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα καθώς (1) είναι συμβατό με την πολική φύση των περισσότερων ρύπων, (2) δεν απαιτείται παραγωγισμός για τον προσδιορισμό των μη πτητικών και θερμικά ασταθών ενώσεων και (3) μπορεί να προσδιορίσει μεγαλύτερο αριθμό χημικών ουσιών μειώνοντας το συνολικό χρόνο ανάλυσης [275]. Δεδομένης της περιπλοκότητας την μήτρας (matrix) των περιβαλλοντικών δειγμάτων και του γεγονότος ότι οι ουσίες περιέχονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις

απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο προκατεργασίας, για τη προσυγκέντρωση και την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων μήτρας (matrix interferences), πριν την χρωματογραφική ανάλυση του δείγματος. Για την προετοιμασία του δείγματος εφαρμόζεται η τεχνική της υγρό-υγρό εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) και οι πιο αποτελεσματικές, φιλικές προς το περιβάλλον και πιο διαδεδομένες τεχνικές της εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) και της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME) [276, 277]. Παρά το γεγονός ότι η SPE μειονεκτεί λόγω της χρήσης οργανικών διαλυτών, είναι σχετικά χρονοβόρα και έχει υψηλό κόστος σε σύγκριση με την SPME, είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική καθώς παρέχει υψηλή προσυγκέντρωση και υψηλές ανακτήσεις σε συνδυασμό με την αποτελεσματική μείωση των παρεμποδίσεων από την μήτρα [277-279]. Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η τεχνική SPE, LC-MS/MS είναι η καταλληλότερη τεχνική για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ποικίλων οργανικών ρύπων (όπως είναι τα φυτοφάρμακα που ανήκουν στις ουσίες προτεραιότητας και ενώσεις που ανήκουν στον κατάλογο επιτήρησης). Και η ευρωπαϊκή οδηγία 2015/495/ΕΕ, συνιστά ως κατάλληλη τεχνική την SPE, LC-MS/MS για τον προσδιορισμό των ουσιών που ανήκουν στον κατάλογο επιτήρησης καθώς και άλλων αναδυόμενων ρύπων του νερού[200].

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των οργανικών ρύπων βασίζεται κυρίως στην χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως με την χρήση C18 στηλών χρωματογραφίας σε διάφορα μήκη. Ανάμεσα στις στήλες που χρησιμοποιούνται ευρέως για τον διαχωρισμό των ενώσεων που μελετώνται στην παρούσα εργασία είναι οι Acquity C18, Zorbax Eclipse XDB-C18, Hypersil GOLD C18 και η Atlantis dC18 [274, 280-283]. Σε αυτές τις μελέτες ως κινητή φάση χρησιμοποιείται το ακετονιτρίλιο ή η μεθανόλη με νερό είτε ως έχουν είτε παρουσία οξικού οξέος (CH_3COOH) ή/και οξικού αμμωνίου ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$).

Για την προκατεργασία του δείγματος, όπως προαναφέρθηκε η SPE αποτελεί την τεχνική επιλογής. Η SPE έχει σημαντικά πλεονεκτήματά καθώς είναι σχετικά απλή, γρήγορη και ευέλικτη τεχνική, με δυνατότητα αυτοματισμού και με μεγάλη ποικιλία προσροφητικών υλικών που επιτρέπει την υψηλή προσυγκέντρωση των ενώσεων χωρίς να δημιουργούνται γαλακτώματα, όπως στην LLE [284]. Ανάμεσα στα διαθέσιμα πληρωτικά υλικά της SPE για τον προσδιορισμό των οργανικών ρύπων είναι τα πολυμερή υλικά αντιστρόφου φάσεως, υδρόφοβο-υδρόφιλο ισορροπημένα (hydrophobic-hydrophilic balanced, HLB), αλκυλο-τροποποιημένη σίλικα (C18 non-polar phase) και τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (Molecular Imprinted Polymer sorbents, MIPs) [277, 285]. Αρκετές μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα πολυμερή υλικά πλήρωσης Oasis HLB παρέχουν τις καλύτερες ανακτήσεις και τη βέλτιστη απόδοση για τους οργανικούς μικρο-ρύπους, συμπεριλαμβανομένων αυτών που μελετώνται στην παρούσα εργασία [281-283, 286-290]. Τα υλικά αυτά είναι τα καταλληλότερα δεδομένου ότι μπορούν να συγκρατήσουν ενώσεις με μεγάλο εύρος pK_a , διαφορετικές χημικές δομές και λιποφιλικότητα, διότι αποτελούνται από δύο μονομερή την υδρόφιλο N-βινυλοπυρρολιδόνη και το λιπόφιλο διβινυλοβενζόλιο και είναι λιπόφιλο – υδρόφιλο ισορροπημένα.

Παρόλο που έχει αναπτυχθεί πλήθος πολυ-υπολειμματικών (multi-residue) αναλυτικών μεθόδων που βασίζονται στην τεχνική SPE, LC-MS/MS για τον προσδιορισμό των οργανικών μικρο-ρύπων [246, 275-277, 291], η ανάλυσή των περιβαλλοντικών δειγμάτων όπως το νερό αποτελεί μία δύσκολη πρόκληση στην έρευνα του τομέα της αναλυτικής χημείας, λόγω της πολυπλοκότητας της μήτρας, των ποικίλων δομών και των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αναλυτών και του γεγονότος ότι βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις [246, 286].

Κεφάλαιο 3 : Εκχύλιση στερεάς φάσης

3.1 Προετοιμασία δειγμάτων για μέτρηση

Τα περιβαλλοντικά δείγματα δεν είναι σε όλες τις περιπτώσεις κατάλληλα για άμεση μέτρηση με ενόργανες αναλυτικές μεθόδους. Για να επιτευχθεί μεγάλη ευαισθησία, εκλεκτικότητα, ακρίβεια και επαναληψιμότητα, το δείγμα πρέπει να υποστεί κατεργασία και να απαλλαχθεί από τις πιθανές παρεμποδίσεις, όπως αιωρούμενα συστατικά και χημικές παρεμποδίσεις. Ο αναλυτικός προσδιορισμός των διάφορων οργανικών ρύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως το νερό, γίνεται συνήθως με τη χρήση εκλεκτικών μεθόδων που επιτρέπουν τη μέτρηση ενός ρύπου παρά την ταυτόχρονη παρουσία και άλλων ουσιών στο δείγμα. Όμως, είναι δυνατό οι συνυπάρχουσες ουσίες να παρεμποδίζουν την επιθυμητή μέτρηση ιδιαίτερα όταν οι ρύποι βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο δείγμα. Σε αυτή την περίπτωση είναι απαραίτητο να προηγηθεί ένα στάδιο διαχωρισμού κατά το οποίο να απομακρύνονται οι παρεμποδίζουσες ουσίες και να απομονώνονται τα υπό προσδιορισμό συστατικά. Στις περιβαλλοντικές αναλύσεις είναι πολύ σύνηθες οι υπό προσδιορισμό ουσίες να βρίσκονται σε ίχνη μέσα στο δείγμα. Με την κατάλληλη προκατεργασία – διαχωρισμό μπορεί να αυξηθεί η συγκέντρωση των υπό μελέτη ενώσεων και να προσδιορισθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια. Η εκχύλιση είναι από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους διαχωρισμού καθώς είναι απλή, γρήγορη και μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα που περιέχουν ίχνη αλλά και μεγάλες ποσότητες μίας ένωσης [292, 293].

Η προετοιμασία του δείγματος είναι βασικό στάδιο για τον προσδιορισμό των οργανικών ενώσεων με υδροχρωματογραφία (LC) και αποσκοπεί στην παραλαβή ενός εμπλουτισμένου, ομογενούς και αναπαραγωγίμου διαλύματος κατάλληλο για έγχυση στη χρωματογραφική στήλη. Με την προκατεργασία του δείγματος με εκχύλιση, παραλαμβάνεται ένα κλάσμα του δείγματος το οποίο είναι: (1) σχετικά απαλλαγμένο από παρεμποδίζουσες ουσίες, (2) ακίνδυνο για τη στήλη, διότι απομακρύνονται οι ουσίες που δεν εκλύονται με την κινητή φάση και προσκολλώνται στη στήλη καθώς και αιωρήματα που τυχόν υπάρχουν στο δείγμα και (3) συμβατό με τη μέθοδο LC, καθώς ο διαλύτης που περιέχεται το δείγμα αναμιγνύεται με την κινητή φάση χωρίς να επηρεάζει την κατακράτηση ή τη διαχωριστικότητα των συστατικών του δείγματος [294]. Η εκχύλιση υγρού – υγρού και η εκχύλιση στερεάς φάσης αποτελούν δύο κλασικές τεχνικές διαχωρισμού. Με τις τεχνικές αυτές επιτυγχάνεται εύκολα ο διαχωρισμός των αναλυτών από τις παρεμποδίσεις ενώ η πειραματική διαδικασία είναι σχετικά απλή χωρίς να απαιτούνται πολύπλοκες διατάξεις.

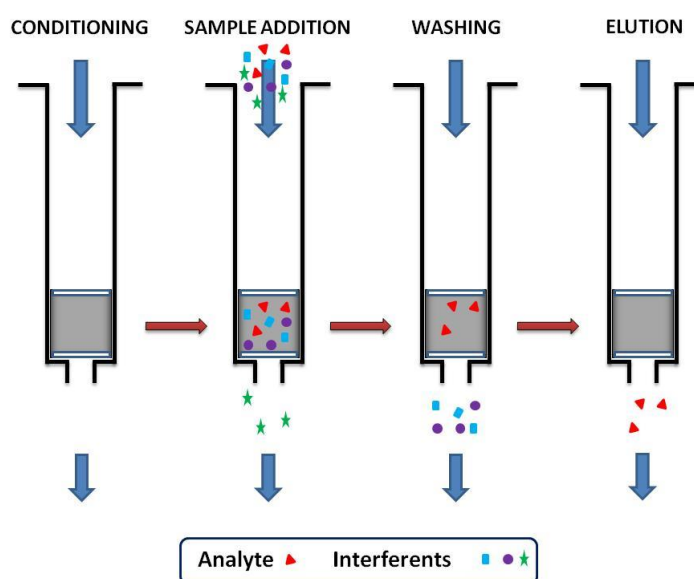
3.2 Προκατεργασία δείγματος με SPE

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) εφαρμόζεται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια ως εναλλακτική μέθοδος εκχύλισης με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η πρώτη πειραματική εφαρμογή της SPE στην ανάλυση του νερού πραγματοποιήθηκε το 1949 από τους Braus et al, οι οποίοι χρησιμοποίησαν μεταλλικό κύλινδρο πληρωμένο με κοκκώδη ενεργό άνθρακα για την απομόνωση οργανικών ενώσεων από πόσιμα και επιφανειακά νερά [295]. Από τότε μέχρι σήμερα, η SPE εξελίχθη σημαντικά και έχει γίνει η πιο διαδεδομένη τεχνική προετοιμασίας δείγματος για την ανάλυση του νερού [296].

Η αρχή της SPE είναι παρόμοια με αυτή της υγρό-υγρό εκχύλισης (LLE) όπου έχουμε κατανομή ουσιών ανάμεσα σε δύο φάσεις. Στην περίπτωση της SPE, η κατανομή και η προσρόφηση είναι οι δύο κυρίαρχοι μηχανισμοί. Η κατανομή γίνεται μεταξύ μίας υγρής φάσης, που είναι το υγρό

υπόστρωμα, στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες οι προς ανάλυση ουσίες και μίας στερεής φάσης που είναι το προσροφητικό υλικό. Ειδικότερα στην τεχνική διαχωρισμού SPE το υγρό δείγμα έρχεται σε επαφή με τροποποιημένη στερεή επιφάνεια (όπως διοξείδιο του πυριτίου και συνθετικά πολυμερή) και κάποιες ενώσεις από την υγρή φάση προσκολλώνται στο στερεό υλικό. Σε δεύτερο στάδιο, οι ενώσεις αποδεσμεύονται από το στερεό προσροφητικό υλικό. Το στερεό προσροφητικό υλικό αποτελείται συνήθως από έναν αδρανή πυρήνα καλυμμένο με ειδικά «άγκιστρα» που δεσμεύουν στοχευμένες ενώσεις που περιέχονται στο υγρό δείγμα. Οι κατασκευαστές των υλικών SPE συσκευάζουν τα στερεά σε διάφορους περιέκτες, όπως πλαστικές μικροστήλες – φυσίγγια [297, 298].

Η προκατεργασία του δείγματος με SPE διεξάγεται σε τέσσερα στάδια: 1. ενεργοποίηση (conditioning), 2. προσθήκη δείγματος (sample addition), 3. έκπλυση (washing) και 4. έκλυση (elution) (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Σχηματική παράσταση της τεχνικής διαχωρισμού SPE [299]

Αναλυτικά κατά το πρώτο στάδιο γίνεται η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσροφητικού υλικού και του αναλύτη. Η ενεργοποίηση γίνεται με πέρασμα μικρού όγκου κατάλληλου διαλύτη (π.χ. μεθανόλη) και στη συνέχεια διαλύτη ιδίου με αυτόν που περιέχεται το δείγμα. Το στάδιο αυτό είναι σημαντικό καθώς διαβρέχεται το πληρωτικό υλικό και ενεργοποιούνται οι λειτουργικές ομάδες του. Παράλληλα, απομακρύνονται πιθανές επιμολύνσεις που μπορεί να υπάρχουν στο φυσίγγιο και στο υλικό αλλά και ο αέρας που υπάρχει καθώς ο κενός όγκος πληρώνεται με διαλύτη. Γενικά πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά τα στάδια της ενεργοποίησης και της προσθήκης του δείγματος ώστε να μην στεγνώσει το προσροφητικό υλικό διότι αυτό έχει αρνητική επίδραση στην κατακράτηση των αναλυτών.

Στο δεύτερο στάδιο το δείγμα περνάει μέσα από το φυσίγγιο ώστε να κατακρατηθεί ο αναλύτης από το προσροφητικό υλικό. Ο όγκος του δείγματος που διέρχεται εξαρτάται από την χωρητικότητα του προσροφητικού υλικού και συνήθως κυμαίνεται από 1 ml έως 1 L. Σημαντικό ρόλο σε αυτό το

στάδιο παίζει και η ταχύτητα ροής καθώς θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλή ώστε να επιτρέπει την αποτελεσματική κατακράτηση των αναλυτών και παράλληλα αρκετά υψηλή ώστε να αποφεύγεται η υπερβολικά μεγάλη διάρκεια της διαδικασίας. Κατά την προσθήκη του δείγματος η στερεά φάση έχει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τον αναλύτη απ' ότι το υγρό υπόστρωμα που τον περιέχει. Καθώς διέρχεται το δείγμα από το στερεό προσροφητικό υλικό, οι αναλύτες κατακρατούνται από αυτό ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος απλώς περνάνε μέσα από αυτό και οδηγούνται στα απόβλητα. Κατά την κατακράτηση (retention) δημιουργούνται διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις λειτουργικές ομάδες του προσροφητικού υλικού και στα μόρια του αναλύτη, με αποτέλεσμα ο αναλύτης να ακινητοποιείται στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Η αποτελεσματικότητα της κατακράτησης εξαρτάται από τρεις παράγοντες: τον αναλύτη, το προσροφητικό υλικό και το υγρό υπόστρωμα.

Το τρίτο στάδιο, το οποίο είναι προαιρετικό, είναι η έκπλυση του πληρωτικού υλικού με κατάλληλο διαλύτη χαμηλής εκλουστικής ισχύος ώστε να απομακρυνθούν ενώσεις του υποστρώματος (matrix) που έχουν κατακρατηθεί χωρίς όμως να εκλουστούν οι αναλύτες. Στην περίπτωση που το υπόστρωμα είναι νερό συνιστάται ένα επιπλέον στάδιο για την ξήρανση του στερεού υποστρώματος. Με την ξήρανση απομακρύνονται τα υπολείμματα νερού από το πληρωτικό υλικό και περιορίζεται η πιθανότητα παρουσίας νερού στο τελικό έκλουσμα.

Στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η έκλυση των αναλυτών με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη έκλυσης. Οι αναλύτες πρέπει να έχουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το διαλύτη έκλυση από ότι με το προσροφητικό υλικό, ώστε να επιτευχθεί η παραλαβή τους από αυτό. Ο όγκος του διαλύτη θα πρέπει να προσαρμοστεί έτσι ώστε με μικρή ποσότητα να γίνει ποσοτική παραλαβή των αναλυτών. Επίσης, θα πρέπει να προσαρμοστεί κατάλληλα η ταχύτητα ροής του διαλύτη για να γίνει αποτελεσματικά η έκλυση [297].

Με την SPE, εκτός από τον καθαρισμό των δειγμάτων και την απομάκρυνση των παρεμποδίσσεων από το υπόστρωμα επιτυγχάνεται και προσυγκέντρωση των αναλυτών από μεγάλους όγκους δειγμάτων. Η κλασική LLE που εφαρμόζεται για την εκχύλιση ιχνοστοιχείων είναι συνήθως χρονοβόρα και επίπονη διαδικασία. Επιπλέον απαιτεί αυστηρό έλεγχο των συνθηκών εκχύλισης, όπως θερμοκρασία, pH και ιονική ισχύ. Για όλους αυτούς τους λόγους, προτιμάται η τεχνική SPE για την προκατεργασία του δείγματος. Επιπρόσθετα με την SPE μειώνεται η χρήση και απόρριψη μεγάλων ποσοτήτων δαπανηρών και κατά κανόνα εύφλεκτων ή/και τοξικών οργανικών διαλυτών καθόλου φιλικών προς τον χρήστη και το περιβάλλον καθώς μειώνεται και ο συνολικός χρόνος εκχύλισης. Ακόμα, επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις και αρκετά μεγάλοι συντελεστές προσυγκέντρωσης. Επιπρόσθετα, οι ιχνο-ποσότητες των αναλυτών που προσροφώνται σε στερεό υπόστρωμα είναι σε πιο σταθερή μορφή από ότι σε ένα διάλυμα. Επιπλέον πλεονεκτήματα της SPE έναντι της LLE είναι ότι αποφεύγεται ο ατελής διαχωρισμός των φάσεων, δεν σχηματίζονται γαλακτώματα και δεν απαιτείται η χρήση εύθραυστου εξοπλισμού (διαχωριστικές χοάνες). Δεδομένου ότι υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα πολλά διαφορετικά υλικά πλήρωσης για να διαλέξει κανείς, η SPE γίνεται πολύ εκλεκτική και μπορεί να έχει πάρα πολλές εφαρμογές διευκολύνοντας τους διαχωρισμούς και την ποσοτική ανάκτηση πολλών ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Τέλος, με την διαθέσιμη οργανολογία η SPE μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί [297, 299].

3.3 Οργανολογία SPE

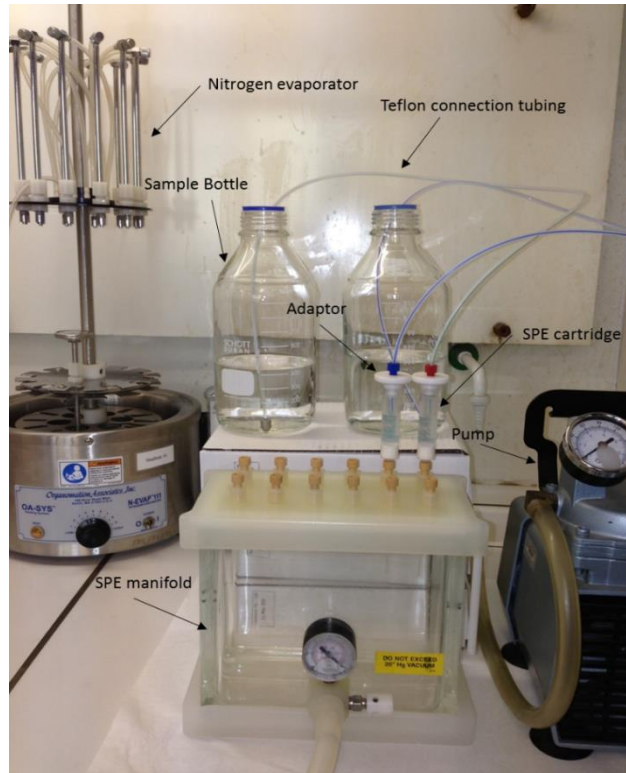
Το δείγμα διέρχεται μέσα από το στερεό προσροφητικό υλικό κυρίως λόγω της βαρύτητας. Όμως η ροή του υγρού που επιτυγχάνεται μόνο από την επίδραση της βαρύτητας είναι πάρα πολύ μικρή με αποτέλεσμα η εκχύλιση να γίνεται πολύ αργά και να καθίσταται πρακτικά ανεφάρμοστη για μεγάλους όγκους δειγμάτων. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος χρησιμοποιούνται ειδικές διατάξεις με εφαρμογή πίεσης ή κενού (Εικόνα 3.2).

Αναλυτικά, μια διάταξη SPE αποτελείται από μια συσκευή που διαθέτει πολλαπλές θέσεις (SPE manifold) για τις μικροστήλες / φυσιγγία SPE που περιέχουν το ακινητοποιημένο προσροφητικό υλικό (SPE cartridge). Το υγρό δείγμα τοποθετείται σε φιάλη και συνδέεται με το φυσιγγίο με την χρήση κατάλληλου σωλήνα από Teflon (Teflon connection tubing). Με την χρήση μηχανικής αντλίας δημιουργείται κενό το οποίο βοηθάει το υγρό δείγμα να περάσει από το σωλήνα Teflon και να διέλθει μέσα από το στερεό προσροφητικό υλικό. Το υγρό αφού διέλθει από το φυσιγγίο συλλέγεται σε ειδικό δοχείο αποβλήτων.

Το προσροφητικό υλικό μπορεί να ακινητοποιηθεί και να συσκευαστεί με διάφορους τρόπους, όπως σε επαναχρησιμοποιούμενες μικρο-στήλες, σε

πλαστικές σύριγγες – φυσιγγία μίας χρήσεως και σε δίσκους εκχύλισης. Οι επαναχρησιμοποιούμενες μικροστήλες έχουν

το μειονέκτημα ότι πρέπει να καθαρίζονται και να ξεπλένονται καλά πριν την επόμενη χρήση τους για την αποφυγή επιμόλυνσης. Αυτό το πρόβλημα δεν υπάρχει στα φυσιγγία μιας χρήσεως που είναι η πιο διαδεδομένη μορφή περιέκτη προσροφητικού υλικού της off-line SPE. Τα φυσιγγία είναι φτιαγμένα από πολυπροπυλένιο ή πολυαιθυλένιο και περιέχουν προσροφητικό υλικό που έχει διάφορες λειτουργικές ομάδες. Το στερεό προσροφητικό υλικό ακινητοποιείται ανάμεσα σε δύο ηθμούς πολυπροπυλενίου πάχους 20 μm, στο κάτω μέρος της σύριγγας [297]. Στην περίπτωση των SPE δίσκων, το στερεό προσροφητικό υλικό συνήθως ενσωματώνεται σε μία αδρανή μήτρα από μικροίνες πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE) ή γυαλιού (glass fibers) με τυπική αναλογία 90% w/w προσροφητικό υλικό 10% w/w ίνες PTFE [300]. Επειδή οι δίσκοι SPE έχουν μεγάλη ενεργό επιφάνεια, με την χρήση λιγότερης ποσότητας προσροφητικού υλικού μπορούν να εκχυλίσουν τον ίδιο όγκο δείγματος σε σύγκριση με τα φυσιγγία. Από την άλλη, οι δίσκοι μπορούν να κατακρατήσουν μικρότερη ποσότητα αναλυτών σε σύγκριση με τα φυσιγγία καθώς παρατηρείται απώλεια των αναλυτών κατά το στάδιο της εκχύλισης όταν χρησιμοποιούνται μεγάλοι όγκοι δείγματος (δηλαδή έχουν μικρό breakthrough όγκο). Ένα ακόμα πλεονέκτημα των φυσιγγίων είναι ότι παρέχουν μεγάλη εκλεκτικότητα καθώς υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι προσροφητικών



Εικόνα 3.2: Σύστημα SPE διάταξης με κενό για πολλαπλά φυσιγγία

υλικών που είναι εμπορικά διαθέσιμοι σε ποικίλες αναλογίες μάζας πληρωτικού υλικού και χωρητικότητας δείγματος.

Εκτός από την off-line SPE, τα τελευταία χρόνια κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος η εφαρμογή της on-line SPE συζευγμένη με την τεχνική LC. Κατά την on-line SPE, στο πρώτο στάδιο το δείγμα «φορτώνεται» από τον αυτόματο δειγματολήπτη σε μία προστήλη. Ο όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγαλύτερος από τον όγκο που εγχέεται σε μία αναλυτική στήλη χρωματογραφίας. Οι αναλύτες προσροφώνται στο στερεό προσροφητικό υλικό υπό την επίδραση ασθενών αλληλεπιδράσεων των διαλυτών ενώ τα λιγότερο υδρόφιλα συστατικά εκπλύνονται. Σε επόμενο στάδιο, οι βαλβίδες αλλάζουν από το στάδιο της φόρτωσης στο στάδιο της εισαγωγής δείγματος. Οι αναλύτες μεταφέρονται στη στήλη της υγρής χρωματογραφίας για διαχωρισμό και έπειτα για ανίχνευση από το σύστημα LC-MS. Με την on-line SPE μειώνεται σημαντικά ο χρόνος ανάλυσης και η πιθανότητα απώλειας των αναλυτών όμως μειονεκτεί στο ότι απαιτείται ειδικός εξοπλισμός υψηλού κόστους. Επίσης στις περιπτώσεις που το υπόστρωμα του δείγματος είναι πολύπλοκο, προτιμάται η off-line SPE διότι το έκλουσμα μπορεί να επεξεργαστεί περαιτέρω για τον καλύτερο καθαρισμό του [297, 301].

3.4 Προσροφητικά υλικά SPE

Η κατακράτηση των υπό προσδιορισμό ενώσεων από το στερεό προσροφητικό υλικό αποτελεί το βασικότερο κομμάτι για την απομόνωση και προσυγκέντρωση με την SPE. Η απόδοση της SPE εξαρτάται από την φύση του προσροφητικού υλικού και τον μηχανισμό κατακράτησης, δηλαδή τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των λειτουργικών ομάδων του στερεού υλικού και των αναλυτών. Στην ανάλυση του νερού για τον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων ως στερεά προσροφητικά χρησιμοποιούνται κυρίως 1) υλικά με βάση τη σίλικα (silica-based sorbents), 2) πολυμερή προσροφητικά υλικά, 3) πορώδης γραφίτικός άνθρακας (porous graphitic carbon, PGC) καθώς και 4) μικτά προσροφητικά υλικά. Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του προσροφητικού υλικού και των ουσιών για την κατακράτησή τους μπορεί να είναι πολικές, μη πολικές, ιοντικές ή συνδυασμός αλληλεπιδράσεων (multiple interactions).

Κατά τις πολικές κατακρατήσεις (polar extraction) αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, π-π δεσμοί καθώς και μία ποικιλία αλληλεπιδράσεων κατά τις οποίες γίνεται κατανομή των ηλεκτρονίων ανάμεσα στα άτομα των χαρακτηριστικών ομάδων του υλικού, δημιουργώντας θετική και αρνητική πόλωση. Επομένως, ένα μόριο που έχει πολική λειτουργική ομάδα αλληλεπιδρά με την πολική ομάδα του προσροφητικού υλικού. Στις πολικές κατακρατήσεις το προσροφητικό υλικό είναι πολικό όπως και οι ουσίες που κατακρατούνται, ενώ ο διαλύτης που τις περιέχει είναι μη πολικός και η έκλουση τους επιτυγχάνεται με πολικό διαλύτη [302].

Οι μη πολικές αλληλεπιδράσεις αναπτύσσονται μεταξύ των δεσμών άνθρακα – υδρογόνου των λειτουργικών ομάδων του προσροφητικού υλικού και των δεσμών άνθρακα – υδρογόνου των υπό προσδιορισμό ενώσεων, δηλαδή αναπτύσσονται δυνάμεις Van der Waals ή διασποράς. Στις μη πολικές κατακρατήσεις το υλικό πλήρωσης είναι μη πολικό όπως και οι ουσίες που κατακρατούνται, ενώ ο διαλύτης που τις περιέχει είναι πολικός και η έκλουση γίνεται με διαλύτες που έχουν μη πολικό χαρακτήρα. Γενικότερα, οι μη πολικές αλληλεπιδράσεις είναι λιγότερο εκλεκτικές από τις πολικές και τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις [302].

Οι κατακρατήσεις ιονανταλλαγής οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του μορίου της ένωσης που είναι φορτισμένο (είτε θετικά ή αρνητικά) και του υλικού πλήρωσης που έχει αντίθετο φορτίο από αυτό της ένωσης. Η ιοντική κατακράτηση επηρεάζεται σημαντικά από το pH και την ιοντική ισχύ. Οι ιοντικές κατακρατήσεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, την ανιονανταλλαγή και την κατιονανταλλαγή [302].

Από τα πιο διαδεδομένα προσροφητικά υλικά SPE είναι τα υλικά που έχουν ως βάση το διοξείδιο του πυριτίου (σίλικα). Η σίλικα μπορεί να συνδεθεί με διάφορες ομάδες δημιουργώντας ποικίλες χημικές επιφάνειες. Αναλυτικότερα, το διοξείδιο του πυριτίου συνδέεται με μία οργανική ομάδα με αποτέλεσμα να προσδίδεται υδρόφοβος χαρακτήρας στο προσροφητικό υλικό. Αυτού του είδους τα υλικά είναι πολύ διαδεδομένα διότι μοιάζουν με τα υλικά πλήρωσης των αναλυτικών στηλών της υγροχρωματογραφίας. Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι αυτά στα οποία η σίλικα συνδέεται με C8 (οκτύλιο) ή με C18 (δεκαοκτύλιο). Υπάρχουν όμως και άλλα υλικά στα οποία οι ομάδες που συνδέονται με τη σίλικα είναι C2 (αιθύλιο), C4 (βουτύλιο), NH₂ (αμινοπροπύλιο), CN (κυανοπροπύλιο) και (CHOH)₂ διόλη [298]. Όλα τα προσροφητικά υλικά που έχουν ως βάση τη σίλικα έχουν το πλεονέκτημα ότι παρουσιάζουν μηχανική, θερμική και χημική σταθερότητα κάτω από διάφορες συνθήκες. Από την άλλη τα υλικά αυτά παρουσιάζουν χημικούς περιορισμούς όπως η παρουσία υπολειμμάτων από ομάδες σιλανόλης και το μικρό εύρος τιμών pH για το οποίο είναι σταθερά (pH 2-9) [297].

Τα πολυμερή προσροφητικά υλικά αποτελούνται από οργανικά πολυμερή τα οποία έχουν πολλές ειδικές λειτουργικές ομάδες (ligands) ώστε να κατακρατούν τα μόρια του αναλύτη. Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτών των υλικών είναι ότι δεν έχουν ομάδες σίλικας που αναπτύσσουν μη επιθυμητές δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις με τις βασικές ενώσεις. Ακόμα, έχουν πολύ μεγαλύτερη ενεργό επιφάνεια σε σύγκριση τα υλικά που έχουν ως βάση τη σίλικα, που επιτρέπει την ανάπτυξη μεγαλύτερων π-π αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενώσεων και του υλικού με αποτέλεσμα να μπορούν να κατακρατήσουν μεγαλύτερη ποσότητα αναλυτών. Τα πολυμερή προσροφητικά υλικά είναι σταθερά για όλο το εύρος του pH (0-14) και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περιπτώσεις που απαιτούνται ακραίες συνθήκες για την εκχύλιση, σε αντίθεση με τα υλικά με βάση τη σίλικα τα οποία είναι ασταθή σε ακραίες τιμές pH (σε χαμηλό pH μπορεί να υδρολυθούν οι λειτουργικές ομάδες από την επιφάνεια του προσροφητικού ενώ σε υψηλό pH μπορεί να υδρολυθεί η ίδια η σίλικα). Επίσης, τα πολυμερή προσροφητικά υλικά παρουσιάζουν ταυτόχρονα υδρόφοβο και υδρόφιλο χαρακτήρα που τα καθιστά κατάλληλα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ποικίλων ουσιών (βασικές, ουδέτερες και όξινες ενώσεις) [303].

Μια νεότερη κατηγορία πολυμερών προσροφητικών υλικών είναι τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (Molecular Imprinted Polymers, MIPs) που αποτελούν τα πιο εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιούνται στην SPE. Τα προσροφητικά υλικά MIPs αποτελούνται από πολυμερή που έχουν καθορισμένη εκλεκτικότητα για μία συγκεκριμένη ένωση ή για μία ομάδα ενώσεων που έχουν παρόμοια χημική δομή. Η εκλεκτικότητά τους επιτυγχάνεται κατά την διάρκεια της σύνθεσης του υλικού καθώς χρησιμοποιούνται τα μόρια μιας συγκεκριμένης ένωσης ως εκμαγεία για τον σχηματισμό ειδικών κοιλοτήτων. Συνεπώς, τα υλικά αυτά έχουν ως βασική αρχή τη σχέση «κλειδιού – κλειδαριάς» αφού συνδέονται εκλεκτικά με την ένωση για την οποία φτιάχτηκαν. Λόγω της υψηλής εκλεκτικότητάς τους, με τα υλικά αυτά επιτυγχάνονται χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, όμως μειονεκτούν καθώς είναι κατάλληλα για μία μόνο ένωση ή για μία κατηγορία ενώσεων με παρόμοια χημική δομή [303].

Μια άλλη κατηγορία προσροφητικών υλικών που χρησιμοποιείται στην προκατεργασία του νερού με SPE είναι τα υλικά με βάση των άνθρακα και κυρίως ο πορώδης άνθρακας σε μορφή γραφίτη (PGC). Ο PGC έχει εξαιρετικά ομοιογενή και διατεταγμένη δομή και είναι υλικό αντιστρόφου φάσεως κατάλληλο για πολικές ενώσεις. Λόγω της κρυσταλλικής δομής του, που αποτελείται από μεγάλα φύλλα γραφίτη που συγκαταούνται μεταξύ τους λόγω ασθενών δυνάμεων Van der Waals, έχει μεγαλύτερη ικανότητα κατακράτησης από τη C18 σίλικα. Όμως, ο μηχανισμός κατακράτησης του PGC είναι αρκετά διαφορετικός από αυτούς της C18 σίλικα και των πολυμερών προσροφητικών υλικών. Οι ενώσεις κατακρατούνται λόγω αλληλεπιδράσεων των ηλεκτρονίων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να κατακρατούνται μη-πολικές αλλά και πολύ πολικές και υδατοδιαλυτές ενώσεις από το νερό [304].

Σε πολλές περιπτώσεις όμως η χρήση ενός μόνο είδους προσροφητικού υλικού δεν επαρκεί για την ταυτόχρονη κατακράτηση ενώσεων με διαφορετικές πολικότητες και φυσικοχημικές ιδιότητες. Με στόχο την βελτίωση της απόδοσης της ανάλυσης γίνεται η χρήση δύο διαφορετικών προσροφητικών υλικών SPE, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους σε σειρά με την βοήθεια ειδικού προσαρμογέα (adaptor). Διατάξεις διπλού φυσισιγίου έχουν εφαρμοστεί στο παρελθόν για την ανάλυση ποικίλων κατηγοριών μικρορύπων όπως φυτοφάρμακα [305], πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες [306], ενδοκρινικοί διαταράκτες [307], βενζοτριαζόλες, βενζοθειαζόλια και βενζολοσουλφοναμίδια [308].

Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία για την ανάλυση των κυανοτοξινών, η χρήση ενός μόνο υλικού πλήρωσης SPE δεν επαρκεί ώστε να επιτευχθούν ικανοποιητικές ανακτήσεις για ποικίλες κατηγορίες κυανοτοξινών [136, 138, 141]. Στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μίας μεθόδου ανάλυσης όπου χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά προσροφητικά υλικά SPE για την ταυτόχρονη προσυγκέντρωση διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών και φυκοτοξινών. Από την άλλη, η προκατεργασία δειγμάτων νερού για τον καθαρισμό και την προσυγκέντρωση ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων από διάφορες κατηγορίες οργανικών ρύπων μπορεί να επιτευχθεί με την χρήση ενός μόνο προσροφητικού υλικού. Ειδικότερα, στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές όπου η επεξεργασία νερού για τον προσδιορισμό ποικίλων κατηγοριών φυτοφαρμάκων, ενδοκρινικών διαταρακτών, φαρμακευτικών προϊόντων και άλλων μικρορύπων επιτυγχάνεται με την χρήση του πολυμερούς πληρωτικού υλικού Oasis HLB [309-312]. Στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε η ανάπτυξη μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών οργανικών ρύπων όπου η προσυγκέντρωση τους επιτυγχάνεται με την χρήση ενός μόνο προσροφητικού υλικού, συγκεκριμένα του Oasis HLB.

Κεφάλαιο 4 : Υγροχρωματογραφία – Φασματομετρία μαζών

4.1 Υγροχρωματογραφία

Η υγροχρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών αποτελούν ένα ιδανικό εργαλείο για ένα εργαστήριο αναλύσεων. Η υψηλής αποδόσεως υγροχρωματογραφία (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί την καταλληλότερη τεχνική για διαχωρισμούς, αναλύσεις και καθαρισμούς μειγμάτων οργανικών ενώσεων από τη δεκαετία του '70.

Μέχρι την αλλαγή της χιλιετίας, ο διαχωρισμός των μειγμάτων και η απόλυτη ταυτοποίηση των συστατικών του γινόταν κυρίως με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography – Mass Spectrometry, GC-MS). Ωστόσο η χρήση αυτής της τεχνικής περιορίζεται από τρεις σημαντικούς παράγοντες. Ένας παράγοντας είναι η πτητικότητα του δείγματος, διότι δεν είναι όλες οι ουσίες αρκετά πτητικές για να εισαχθούν ή να εκλουσθούν από τη στήλη της αεριοχρωματογραφίας. Ένας δεύτερος περιορισμός είναι ότι παρατηρείται θερμική αποικοδόμηση των δειγμάτων στο φούρνο του GC. Όπως είναι γνωστό αναπτύσσονται αρκετά υψηλές θερμοκρασίες στην αεριοχρωματογραφία για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των μειγμάτων. Αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα, οι θερμοευαίσθητες ενώσεις να αποικοδομούνται και κατά συνέπεια να μην μπορούν να προσδιορισθούν. Ο τελευταίος περιορισμός για την χρήση της τεχνικής GC είναι το γεγονός ότι τα υδατικά δείγματα πρέπει απαραίτητως να εκχυλισθούν πριν στην εισαγωγή τους στο σύστημα, κάτι που αυξάνει σημαντικά το κόστος και τον χρόνο ανάλυσης όπως και την πιθανότητα σφάλματος στον διαχωρισμό των κορυφών.

Τα παραπάνω προβλήματα αντιμετωπίζονται με την χρήση της υγροχρωματογραφίας σε σύζευξη με την φασματομετρία μαζών (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, LC-MS) που επιτεύχθηκε με την ανάπτυξη κατάλληλων πηγών ιοντισμού. Η τεχνική LC-MS πλεονεκτεί σημαντικά καθώς με τη χρήση της μπορεί να μελετηθεί ένα μεγάλο εύρος αναλυτών, από ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους όπως φάρμακα και μεταβολίτες (<1000 Da) μέχρι ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους όπως βιοπολυμερή (>100.000 Da). Επίσης, η υψηλή εκλεκτικότητα του ανιχνευτή MS επιτρέπει σε πολλές περιπτώσεις την ταυτοποίηση ενώσεων που δεν μπορούν να διαχωριστούν χρωματογραφικά ή διαχωρίζονται εν μέρη. Ακόμα, η εκλεκτικότητα του MS επιτρέπει την χρήση ισοτοπικά επισημασμένων αναλυτών ως εσωτερικά πρότυπα, και σε συνδυασμό με την υψηλή ευαισθησία του μπορούν να επιτευχθούν ποσοτικοί προσδιορισμοί με υψηλή ακρίβεια και πιστότητα. Ακόμα, ο ανιχνευτής MS παρέχει την πιο αξιόπιστη ταυτοποίηση σε σύγκριση με τους άλλους HPLC ανιχνευτές, αφού προσδιορίζει το μοριακό βάρος του αναλύτη. Επιπρόσθετα, με τη χρήση ανιχνευτή διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (tandem mass spectrometry MS/MS), πέραν του μοριακού του βάρους, μπορούν να εξαχθούν δομικές πληροφορίες για κάποιο μόριο, επιτρέποντας την αδιαμφισβήτητη ταυτοποίησή του [313, 314].

4.2 Φασματομετρία μαζών

Η φασματομετρία μαζών πιθανότατα είναι η τεχνική που έχει την μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, σε σχέση με τις άλλες αναλυτικές τεχνικές που είναι σήμερα διαθέσιμες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνική αυτή μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με: (1) τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, (2) τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, (3) την

ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων, (4) τη δομή και σύσταση στερεών επιφανειών και (5) την αναλογία ισότοπων ατόμων σε ένα δείγμα.

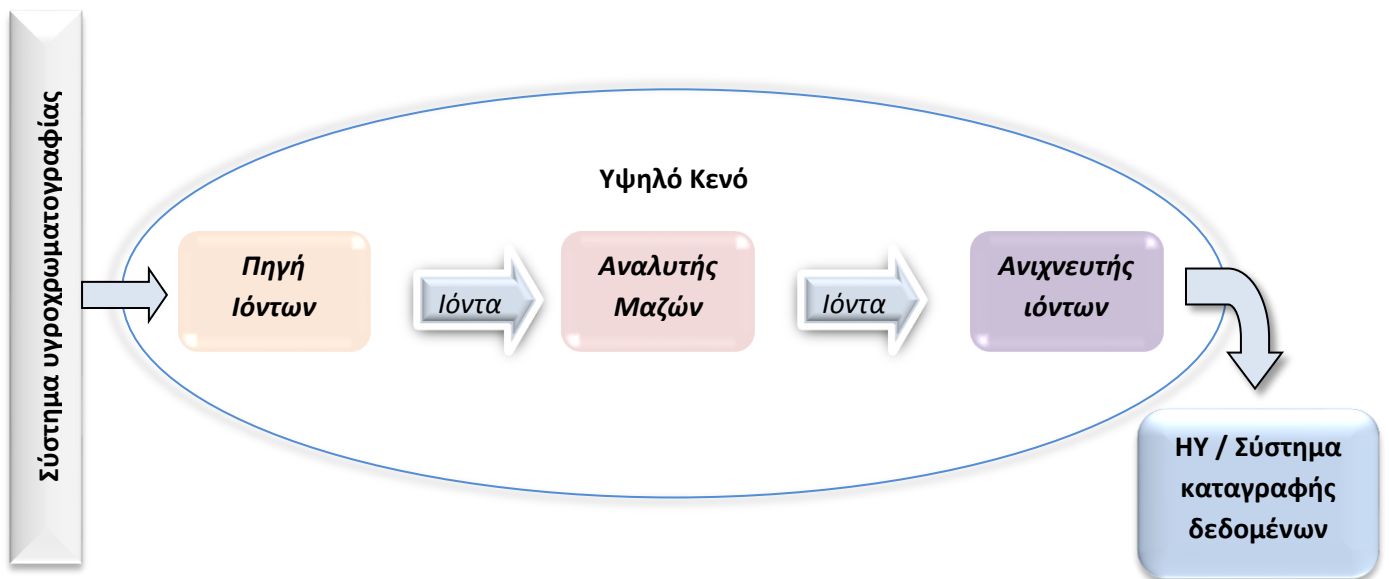
Η φασματομετρία μαζών βασίζεται στον ιοντισμό των μορίων και την παραγωγή μοριακών και/ή θυγατρικών ιόντων, τον διαχωρισμό των μαζών των ιόντων σύμφωνα με τον λόγο μάζας (m) προς το φορτίο τους (z) (mass to charge ratio m/z) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης και τέλος την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος και την αποτύπωσή τους στο φάσμα μαζών. Συγκεκριμένα το φάσμα μαζών που λαμβάνεται είναι η γραφική απεικόνιση της σχετικής έντασης (αφθονίας) των ιόντων συναρτήσει του λόγου τους m/z . Οι κορυφές μαζών αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο m/z ενώ το ύψος τους (ένταση-intensity ή αφθονία-abundance) εκφράζει το σχετικό ποσοστό του ιόντος σε σχέση με τα υπόλοιπα ιόντα που παράγονται κατά τον ιοντισμό. Η κορυφή με την μεγαλύτερη ένταση καλείται βασική κορυφή (base peak) και το φάσμα κανονικοποιείται σε σχέση με την ένταση της βασικής κορυφής η οποία παρουσιάζεται με ένταση 100%. Κατά τον ιοντισμό του μορίου, ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο ιοντισμού, παράγεται το πρόδρομο ή μοριακό ιόν και άλλα ιόντα – θραύσματα (fragment ions) τα οποία δημιουργούνται από την διάσπαση του μοριακού ιόντος με διάφορους μηχανισμούς που είναι χαρακτηριστικοί της αναλυόμενης ένωσης και επιτρέπουν την ταυτοποίηση της. Η έκταση με την οποία λαμβάνει χώρα η θραυσματοποίηση κατά τον ιοντισμό εξαρτάται από την πηγή ιοντισμού και την ποσότητα της ενέργειας που προσδίδει στην ένωση καθώς και από την δομή της ένωσης [314].

Πιο εξελιγμένη μορφή της φασματομετρίας μαζών αποτελεί η συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS) που παρέχει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και ευαισθησία. Στην τεχνική MS/MS τα ιόντα που σχηματίζονται στην πηγή ιοντισμού εισέρχονται στον αναλυτή μαζών και περνάνε από τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο απομονώνεται το ιόν ή τα ιόντα ενδιαφέροντος (συνήθως είναι τα μοριακά ιόντα). Στο δεύτερο στάδιο το ιόν ή τα ιόντα που απομονώθηκαν θραυσματοποιούνται, μέσω συγκεκριμένης διαδικασίας θραυσματοποίησης και στο τρίτο στάδιο γίνεται πάλι διαχωρισμός και απομονώνονται τα θυγατρικά ιόντα που προέκυψαν από την θραυσματοποίηση προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση [315].

Τα πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών όπως η μεγάλη εκλεκτικότητα, η δυνατότητα χρήσης της ως ένα καθολικό ανιχνευτή (απόκριση σε όλες τις ενώσεις ανεξάρτητα από τη δομή τους), και η πολύ υψηλή ευαισθησία της σε συνδυασμό με την εξέλιξη της μικροηλεκτρονικής και την ανάπτυξη κατάλληλων συστημάτων σύζευξης με την υδροχρωματογραφία (συνδυάζοντας έτσι την μεγάλη διαχωριστική ικανότητα των χρωματογραφικών μεθόδων με την σημαντική ικανότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού της ένωσης) την καθιστούν μία τεχνολογία αιχμής στην χημική ανάλυση με δυνατότητα προσδιορισμού συγκεντρώσεων σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Συνεπώς εφαρμόζεται σε ένα μεγάλο εύρος ποιοτικών και ποσοτικών προσδιορισμών χημικών ενώσεων όλων των κατηγοριών.

4.3 Οργανολογία συστήματος MS

Ένα σύστημα MS αποτελείται από τα εξής βασικά μέρη: (1) πηγή ιόντων ή πηγή ιοντισμού, (2) αναλυτή μαζών, (3) σύστημα ανίχνευσης ιόντων και (4) σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων (Σχήμα 4.1) Ο αναλυτής μαζών, ο ανιχνευτής των ιόντων και σε πολλές περιπτώσεις η πηγή ιοντισμού βρίσκονται υπό κενό που δημιουργείται από διαφραγματικές (10^{-3} - 10^{-4} Torr) και στροβιλομοριακές (έως 10^{-9} Torr) αντλίες κενού.



Σχήμα 4.1: Βασικά τμήματα οργανολογίας συστήματος MS

Στο σύστημα LC-MS οι ενώσεις του εξεταζόμενου δείγματος διαχωρίζονται σε κατάλληλη στήλη υγροχρωματογραφίας (στατική φάση) καθώς διέρχεται διαλύτης κατάλληλης σύστασης (κινητή φάση). Οι ενώσεις που εκλύονται με την κινητή φάση από την στήλη εισέρχονται μέσω σύνδεσης του ακροσωλήνιου της στήλης στην πηγή ιοντισμού. Στην πηγή ιοντισμού οι ενώσεις μετατρέπονται σε ιόντα στην αέρια μορφή μετά από τον βομβαρδισμό τους με ηλεκτρόνια, φωτόνια, ιόντα ή μόρια. Εναλλακτικά, ο ιοντισμός μπορεί να επιτευχθεί με θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια. Στο σύστημα LC-MS η απόδοση του ιοντισμού επηρεάζεται σημαντικά από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, την θερμοκρασία που εφαρμόζεται και την ταχύτητα ροής του αερίου εκνέφωσης. Από την πηγή ιόντων εξέρχεται ένα ρεύμα θετικών ή αρνητικών ιόντων σε αέρια μορφή, τα οποία επιταχύνονται προς τον αναλυτή μαζών. Στον αναλυτή μαζών πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων βάση των διαφορετικών τιμών του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) που έχουν. Τέλος, το ιόντα που έχουν διαχωριστεί κατευθύνονται στον ανιχνευτή, ο οποίος συλλαμβάνει τα προσπίπτοντα ιόντα και ενισχύει το λαμβανόμενο ασθενές ηλεκτρικό σήμα που οδηγείται στο κεντρικό σύστημα ελέγχου και καταγραφής δεδομένων [315, 316].

4.3.1 Πηγές ιόντων

Η μετατροπή των μορίων του αναλύτη σε ιόντα στην αέρια μορφή αποτελεί καθοριστική διαδικασία για την μέτρηση των ενώσεων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η μορφή του φάσματος μαζών μίας ουσίας εξαρτάται πάρα πολύ από το είδος της πηγής ιοντισμού. Οι πηγές ιοντισμού χωρίζονται σε δύο πολύ μεγάλες κατηγορίες: (1) τις πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources) όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται και (2) τις πηγές εκρόφησης (desorption sources) όπου το δείγμα από στερεή ή υγρή κατάσταση μετατρέπεται απευθείας σε αεριώδη ιόντα.

Στις πηγές αέριας φάσης συγκαταλέγονται ο χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization, CI), ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI) και ο ιοντισμός πεδίου (Field Ionization, FI). Οι πηγές αέριας φάσης συνήθως περιορίζονται σε θερμικά σταθερές ενώσεις, με σημεία ζέσεως

μικρότερα από ~ 500°C. Η προϋπόθεση αυτή περιορίζει την εφαρμογή των πηγών αυτών σε ενώσεις με μοριακά βάρη μικρότερα από ~ 1.000 Da και χρησιμοποιούνται στην αεριοχρωματογραφία. Αντίθετα, οι πηγές εκρόφησης δεν απαιτούν εξάτμιση των μορίων του αναλύτη και μπορούν να εφαρμοσθούν σε ενώσεις με μοριακά βάρη έως και 100.000 Da [317].

Οι πηγές εκρόφησης χρησιμοποιούνται για τον ιοντισμό των ενώσεων μετά τον διαχωρισμό τους με υγροχρωματογραφία και οι πιο διαδεδομένες πηγές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι ο ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI), ο ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση με θερμοψεκασμό (ThermoSpray ionization, TS), ο χημικός ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), ο φωτοϊοντισμός (Photolonization, PI) και ο βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment, FAB). Για τον ιοντισμό στερεών δειγμάτων χρησιμοποιείται κυρίως ο ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI). Βασικό πλεονέκτημα των πηγών εκρόφησης είναι το ότι μπορούν να εφαρμοσθούν σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα [316, 317].

Οι πηγές ιοντισμού μπορούν να κατηγοριοποιηθούν επίσης σε μαλακές ή ήπιες (soft) και σκληρές (hard) ανάλογα με την ενέργεια ιοντισμού και την έκταση της διάσπασης του μορίου σε μικρότερα θραύσματα. Στις σκληρές πηγές χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια με αποτέλεσμα την θραυσματοποίηση της ένωσης κατά τον ιοντισμό ενώ στις μαλακές ή ήπιες πηγές ο ιοντισμός επιτυγχάνεται με μικρή ή αμελητέα θραυσματοποίηση [315].

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, στις μεθόδους που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών – φυκοτοξινών και για τους οργανικούς ρύπους με την τεχνική LC-MS/MS χρησιμοποιήθηκαν οι πηγές ιοντισμού ESI και APCI. Αναλυτικότερα, οι κυανοτοξίνες MCs και NOD είναι ολιγοπεπτίδια αποτελούμενα από επτά και πέντε αμινοξέα, αντίστοιχα. Λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους τους και της πεπτιδικής τους φύσης η κατάλληλη πηγή για τον ιοντισμό τους, όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω είναι το ESI. Από την άλλη, οι οργανικοί ρύποι που μελετώνται στην παρούσα εργασία έχουν μικρά μοριακά βάρη και κάποιιοι από αυτούς έχουν χαμηλή πολικότητα. Σε αυτή την περίπτωση, για τον ταυτόχρονο ιοντισμό όλων των υπό μελέτη ενώσεων η πιο κατάλληλη πηγή είναι το APCI, όπως αναπτύσσεται παρακάτω.

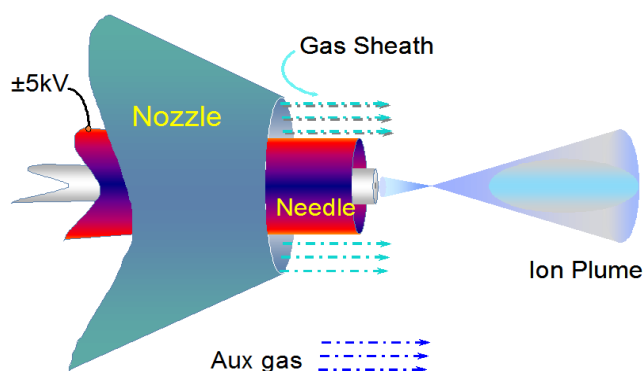
Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectronSpray Ionization, ESI)

Η φασματομετρία μαζών με ESI περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1984 και σήμερα αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις βιομορίων όπως πολυπεπτίδια, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια με μοριακά βάρη ≥ 100.000 Da. Λόγω της μεγάλης εφαρμογής της στον ιοντισμό βιομορίων ένας από τους ερευνητές που εξέλιξαν την τεχνική, ο John Fenn, βραβεύτηκε με Nobel Χημείας το 2002. Επίσης εφαρμόζεται στον χαρακτηρισμό ανόργανων ουσιών και συνθετικών πολυμερών [317]. Η ανάπτυξη της πηγής ιοντισμού ESI επέκτεινε σημαντικά τις δυνατότητες και τις εφαρμογές της τεχνικής LC-MS. Στις μέρες μας είναι η πιο διαδεδομένη πηγή ιοντισμού στο σύστημα LC-MS διότι μπορεί να εφαρμοστεί σε θερμο-ευαίσθητες και μεγάλου εύρους πολικότητας ουσίες, τόσο μικρών όσο και μεγάλων μοριακών βαρών. Επίσης είναι συμβατή σε μεγάλο ποσοστό με τις συνθήκες που εφαρμόζονται στην HPLC [314].

Ο ESI είναι ήπιος τρόπος ιοντισμού που μετατρέπει τα μόρια που υπάρχουν στην υγρή φάση σε ιόντα αέριας φάσεως. Με την συγκεκριμένη πηγή παράγονται και πολλαπλώς φορτισμένα ιόντα.

Συνεπώς το m/z ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους γίνεται μικρότερο με αποτέλεσμα να είναι μέσα στο εύρος μαζών που μπορεί να μετρήσει το MS [314].

Γενικά, στο ακροφύσιο του ESI εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού που βοηθάει στην αντιστάθμιση των ποικίλων ειδικών αγωγιμοτήτων που παρουσιάζουν οι κινητές φάσεις και σταθεροποιεί τη γραμμή βάσεως (baseline) του χρωματογραφήματος κατά την βαθμιδωτή έκλυση. Το αέριο άζωτο είναι το αέριο εκνέφωσης που βοηθάει στην απομάκρυνση του εκάστοτε διαλύτη. Στον αισθητήρα του ESI εισάγονται δύο αέρια. Το αέριο εκνέφωσης (sheath gas) και το αέριο ξήρανσης ή βοηθητικό αέριο (auxiliary gas). Το αέριο εκνέφωσης διαρρέει το κεντρικό τμήμα του ακροφυσίου αλλά εξωτερικά από τη βελόνα. Το δείγμα έρχεται σε επαφή με το αέριο στο τελικό άκρο της μεταλλικής βελόνας. Το βοηθητικό αέριο ρέει στον εξωτερικό δακτύλιο του ακροφυσίου σε παράλληλη πορεία με το αέριο εκνέφωσης (Σχήμα 4.2) [314, 315].

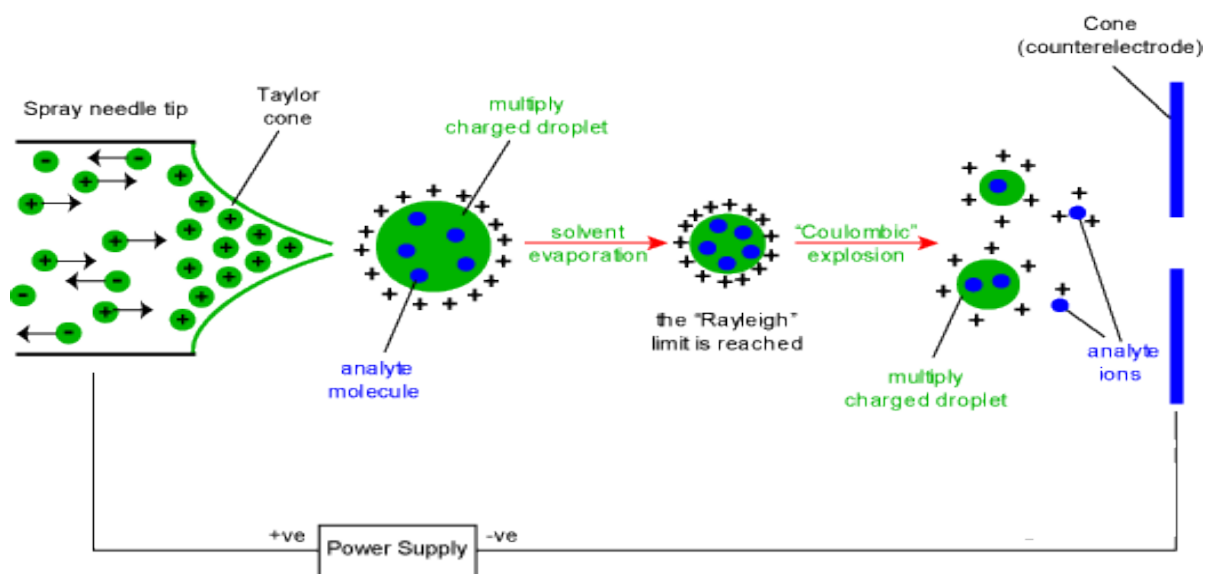


Σχήμα 4.2: Σχηματική δομή της πηγής ιοντισμού ESI [318]

Αναλυτικότερα, ο ιοντισμός με ESI πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Το υγρό διάλυμα (κινητή φάση) που περιέχει τους αναλύτες διέρχεται μέσα από μία ανοξείδωτη τριχοειδή βελόνα (ακροφύσιο) στην οποία εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό (3-5 kV). Το υγρό ψεκάζεται από την άκρη της βελόνας σχηματίζοντας τον «κώνο του Taylor». Ο ψεκασμός υποβοηθείται από έναν εξωτερικό σωλήνα (εκνεφωτή) που διαβιβάζει αέριο, το αέριο εκνέφωσης. Η υψηλή τάση που εφαρμόζεται προκαλεί τα ιόντα όμοιας πολικότητας να συναθροιστούν μέσα στην υγρή φάση. Έτσι, σχηματίζονται φορτισμένα σταγονίδια (αερόλυμα) που αποτελούνται από ιόντα και των δύο πολικότητων, αλλά κυρίως από ιόντα ίδιας πολικότητας με αυτής του εφαρμοζόμενου δυναμικού. Στη συνέχεια εξατμίζεται ο διαλύτης με την βοήθεια του αερίου ξήρανσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν τα φορτισμένα μόρια του αναλύτη τα οποία εισέρχονται στην συνέχεια στον κώνο εισαγωγής του φασματομέτρου μαζών [314, 317].

Υπάρχουν δύο θεωρίες για τον μηχανισμό που λαμβάνει χώρα κατά την απομάκρυνση του διαλύτη από τα φορτισμένα σταγονίδια. Η πρωτότυπη ιδέα αναφέρεται συνήθως ως “μοντέλο υπολειμματικού φορτίου” (charge – residue model). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο οι φορτισμένες σταγόνες που σχηματίζονται από την πνευματική εκνέφωση. Δηλαδή σχηματίζονται από την πίεση που υπάρχει για να διέλθει η κινητή φάση από την άκρη της βελόνας με το δυναμικό ώστε η κινητή φάση να μετατραπεί σε εκνέφωμα από φορτισμένες σταγόνες ίδιας πολικότητας. Ο διαλύτης εξατμίζεται, μειώνοντας αισθητά το μέγεθος της σταγόνας και ταυτόχρονα αυξάνοντας τη συγκέντρωση φορτίου στην επιφάνειά της. Κοντά στο όριο του Rayleigh, οι ηλεκτροστατικές απώσεις των φορτίων υπερνικούν την τάση συγκράτησής τους, με αποτέλεσμα την έκρηξη της σταγόνας (διάσπαση Coulomb). Η έκρηξη αυτή δημιουργεί μια σειρά μικρότερων (~10% σε σχέση με

την αρχική σταγόνα) και λιγότερο φορτισμένων σταγονιδίων. Οι διασπάσεις Coulomb (συρρίκνωση και έκρηξη σταγόνας) επαναλαμβάνονται μέχρις ότου σχηματιστούν “γυμνά” φορτισμένα ιόντα του αναλύτη στην αέρια φάση. Η δεύτερη θεωρία είναι το “μοντέλο της εξάτμισης των ιόντων” (ion – evaporation model). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, λόγω της εξάτμισης του διαλύτη τα σταγονίδια υφίστανται σχάση έως ότου οι απωστικές δυνάμεις των ιόντων στην επιφάνεια της σταγόνας αυξάνονται τόσο που τα ιόντα να απελευθερώνονται στην αέρια φάση. Ο σχηματισμός του ιόντος στην αέρια φάση είναι ακόμη υπό μελέτη. Παρόλο που η θεωρία της εξάτμισης του ιόντος είναι περισσότερο αποδεκτή, αναφέρεται περισσότερο ο μηχανισμός που σχετίζεται με το “μοντέλο υπολειμματικού φορτίου” [314]. Στο Σχήμα 4.3 αναπαριστάται ο τρόπος σχηματισμού ιόντων στο ESI.



Σχήμα 4.3: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού για την δημιουργία ιόντων με το ESI [319]

Σημαντικά πλεονεκτήματα της πηγής ESI είναι ότι (1) ο ιοντισμός γίνεται απευθείας από το διάλυμα επιτρέποντας τη μελέτη θερμοευαίσθητων ενώσεων, (2) η πηγή είναι συμβατή με ροές κινητής φάσης από nl/min έως και ροές μεγαλύτερες από 1 ml/min, με την χρήση κατάλληλου εξοπλισμού (hardware), επιτρέποντας τη χρήση τόσο αναλυτικών στηλών μικρής διατομής (microbore) όσο και συμβατικών στηλών, (3) το ESI παράγει κυρίως πολλαπλά φορτισμένα ιόντα χωρίς όμως να διασπά το αρχικό μόριο, σε αντίθεση με της άλλες πηγές ιόντων, επεκτείνοντας αποτελεσματικά το εύρος μαζών του φασματογράφου και επιτρέποντας τη μελέτη μορίων με μοριακά βάρη που υπερβαίνουν το κανονικό εύρος μαζών και (4) για τις ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους το φάσμα μαζών που προκύπτει από το ESI πολλές πληροφορίες για τα ανεξάρτητα μοριακά βάρη που προσδιορίζονται με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ακρίβεια του.

Από την άλλη η πηγή ESI έχει και κάποια μειονεκτήματα. Ειδικότερα (1) το ESI δεν μπορεί να ιοντίσει μη-πολικές ή μικρής πολικότητας ενώσεις, (2) το φάσμα μαζών που προκύπτει από μία ένωση, εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες με συνέπεια αν αλλαχθούν οι πειραματικές συνθήκες να υπάρχει δραματική αλλαγή και στην εικόνα του φάσματος μαζών, (3) υπάρχουν φαινόμενα καταστολής σήματος (suppression effects) με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η απευθείας ανάλυση δειγμάτων και (4) το ESI είναι ήπια πηγή ιοντισμού με αποτέλεσμα να παράγει ανέπαφα μοριακά

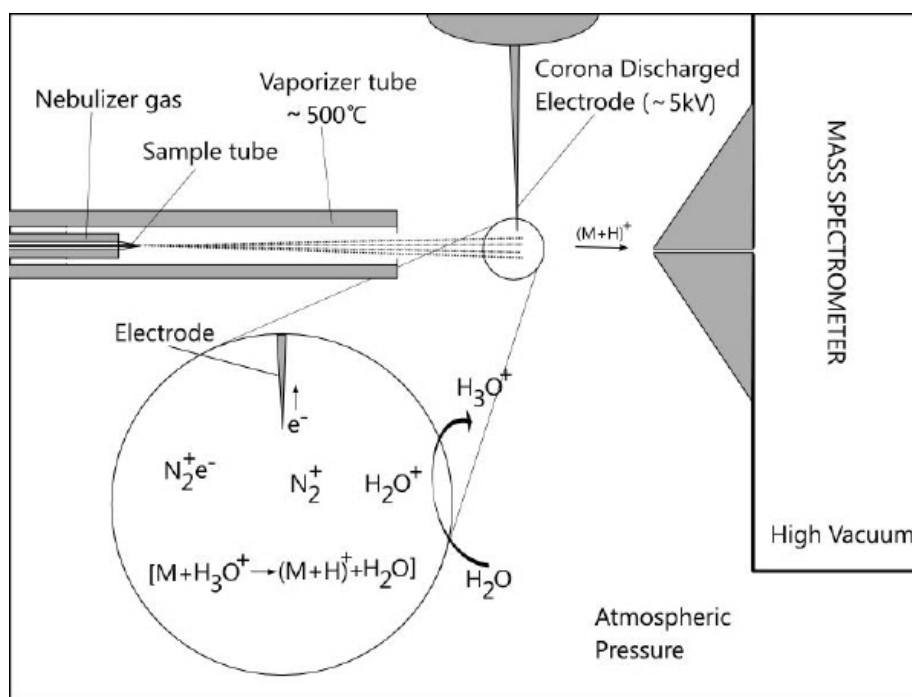
ιόντα χωρίς να τα θραυματοποιεί. Συνεπώς, δεν μπορούν να εξαχθούν δομικές πληροφορίες για την ένωση. Για να γίνει κάτι τέτοιο εφικτό πρέπει να χρησιμοποιηθεί με MS/MS [314].

Χημικός ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)

Κατά τον ιοντισμό με την πηγή APCI η κινητή φάση μετά από την στήλη της HPLC διασπείρεται σε σταγονίδια με την επίδραση της θερμότητας και του αερίου νεφελοποίησης (nebulizing gas). Λόγω των συνθηκών που εφαρμόζονται στην πηγή θα πίστευε κανείς πως το APCI χρησιμοποιείται για τον ιοντισμό πτητικών και θερμικώς σταθερών ενώσεων, όμως είναι κατάλληλο και για μόρια μεγαλύτερης πολικότητας γι' αυτό και είναι συμβατό με την τεχνική HPLC. Η πηγή APCI ιοντίζει αποτελεσματικά ενώσεις από χαμηλή έως και μέτρια υψηλή πολικότητα. Η πηγή ιοντισμού APCI είναι πιο σκληρή σε σύγκριση με την ESI με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ιοντίσει μεγάλα βιομόρια, ενώ οι μάζες που μπορούν να προσδιορισθούν με αυτή την πηγή (λόγος m/z) είναι χαμηλότερες από 2000 Da. Η πηγή APCI είναι συμπληρωματική της πηγής ESI αφού χρησιμοποιείται για να ληφθεί το φάσμα μαζών μη-πολικών έως και σχετικά υψηλής πολικότητας χημικών ενώσεων [314].

Αναλυτικά, ο ιοντισμός με APCI γίνεται σε ατμοσφαιρική πίεση και σε υψηλή θερμοκρασία (250-450°C). Το έκλουσμα από το σύστημα HPLC διέρχεται μέσα από έναν εκνεφωτή που τροφοδοτείται με αέριο N₂, με αποτέλεσμα να παράγονται σταγονίδια τα οποία ταυτοχρόνως αφυδατώνονται. Το σπρέι που σχηματίζεται περνάει από μία περιοχή με υψηλή θερμοκρασία όπου τα σταγονίδια «ξηραίνονται». Έτσι, παράγονται ουδέτερα μόρια σε αέρια φάση τα οποία στη συνέχεια περνάνε πολύ κοντά από μία ακίδα (corona discharge). Αυτή η ακίδα είναι το άκρο ενός ηλεκτροδίου όπου εφαρμόζεται αρκετά υψηλό δυναμικό ώστε να μπορεί να ιοντίσει το περιβάλλον αέριο, όχι όμως πολύ υψηλό ώστε να προκαλέσει σπινθήρα. Από το δυναμικό που εφαρμόζεται στην ακίδα ιοντίζονται τα μόρια του αερίου διαλύτη και/ή του N₂ τα οποία στη συνέχεια ιοντίζουν τα μόρια του αναλύτη. Συγκεκριμένα, λόγω της αλληλεπίδρασής του ηλεκτροδίου (corona) με το περιβάλλον αέριο παράγονται ιόντα (πλάσμα) τα οποία στη συνέχεια υπόκεινται σε μία σειρά αντιδράσεων που οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών ιόντων. Αυτά τα δραστικά ιόντα αλληλεπιδρούν με τα μόρια του αναλύτη με αποτέλεσμα να τα ιοντίζουν. Κατά το θετικό ιοντισμό πιστεύεται πως τα δραστικά ιόντα είναι πρωτονιωμένα ιόντα του διαλύτη ενώ κατά τον αρνητικό ιοντισμό είναι το O₂⁻ [314, 315]. Στο Σχήμα 4.4 αναπαριστάται ο τρόπος σχηματισμού ιόντων στο APCI.

Το APCI είναι ήπια πηγή ιοντισμού με αποτέλεσμα να σχηματίζονται μοριακά ιόντα με μικρή ή καθόλου θραυματοποίηση, δηλαδή [M+H]⁺ ή [M-H]⁻. Αυτό όμως δεν αποτελεί κανόνα διότι οι τροποποιητές της κινητής φάσης από την HPLC μπορεί να επηρεάσουν τόσο πολύ την σύσταση του πλάσματος και να οδηγήσουν στον σχηματισμό διαφορετικών ιόντων. Για παράδειγμα, η χρήση οξικού αμμωνίου μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό ιόντων [M+NH₄]⁺ στο θετικό ιοντισμό ή [M+CH₃COO]⁻ στον αρνητικό ιοντισμό. Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει τον ιοντισμό είναι η φυσικοχημεία του αναλύτη. Επίσης, στο APCI μπορεί να σχηματιστούν συστάδες ιόντων (ion clusters) που εμπεριέχουν μόρια διαλύτη. Αυτές οι συστάδες είναι πιο δύσκολο να αλληλεπιδράσουν με τα δραστικά ιόντα προς τον σχηματισμό του ιόντος του αναλύτη. Η απομάκρυνσή τους γίνεται με την χρήση ενός αερίου-κουρτίνα (curtain gas). Συνεπώς, ο ιοντισμός στο APCI γίνεται στην αέρια φάση σε αντίθεση με το ESI που ο ιοντισμός γίνεται στην υγρή φάση.



Σχήμα 4.4: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού για την δημιουργία ιόντων με το APCI [320]

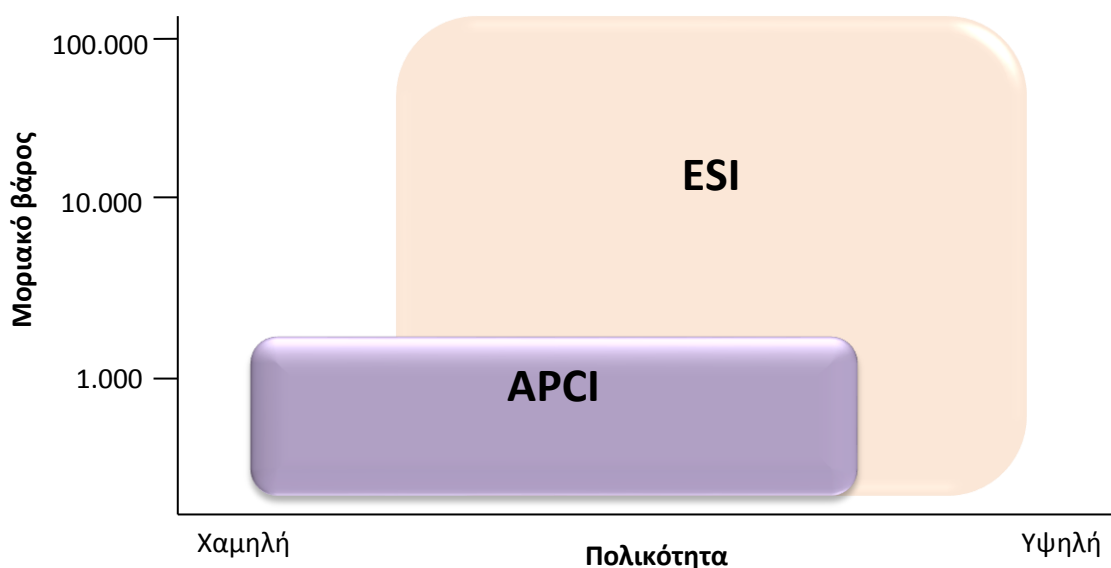
Σημαντικά πλεονεκτήματα της πηγής ιοντισμού APCI είναι ότι α) παράγει ιόντα από διάλυμα και παρόλο που εφαρμόζεται υψηλότερη θερμοκρασία στον αναλύτη σε σύγκριση με το ESI, μπορούν να ιοντιστούν και ενώσεις που έχουν κάποιο βαθμό θερμικής αστάθειας χωρίς να αποσυντίθενται, β) αποτελεί τον καταλληλότερο τρόπο ιοντισμού χημικών ενώσεων με πολύ χαμηλή έως σχετικά υψηλή πολικότητα, γ) είναι ήπια πηγή ιοντισμού με αποτέλεσμα να επιτρέπει τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της υπό προσδιορισμό ένωσης, δ) είναι συμβατή με ροές κινητές φάσης μεγαλύτερες από 2 ml/min με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιείται με στήλες υγροχρωματογραφίας με διατομή 4,6mm, ε) είναι πιο ανθεκτικό στα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση σε σύγκριση με την πηγή ESI και στ) είναι πιο ανθεκτική στις αλλαγές των πειραματικών συνθηκών σε σύγκριση με την πηγή ESI με αποτέλεσμα διάφορες κινητές φάσεις, συμπεριλαμβανομένης της βαθμιδωτής έκλυσης, να μπορούν να μελετηθούν κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Όμως, η πηγή APCI έχει και κάποια μειονεκτήματα καθώς α) το φάσμα που προκύπτει μπορεί να περιέχει ιόντα από παράγωγα του αναλύτη με την κινητή φάση της HPLC ή με τους οργανικούς τροποποιητές της κινητής φάσης, όπως το οξικό αμμώνιο, β) συνήθως δεν προκύπτουν δομικές πληροφορίες για το μόριο, εκτός κι αν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με MS/MS ή cone-voltage θραυσματοποίηση και γ) δεν μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά σε χαμηλές ταχύτητες ροής της κινητής φάσης και δεν είναι κατάλληλο για αναλύτες που είναι ήδη φορτισμένοι στο διάλυμα [314].

ESI ή APCI

Οι τεχνικές ESI και APCI αλληλοσυμπληρώνονται. Το APCI χρησιμοποιείται για μικρής έως μέτριας πολικότητας ενώσεις, ενώ το ESI για μέτριας έως υψηλής πολικότητας ενώσεις. Κατά συνέπεια είναι πολλές ενώσεις για τις οποίες η καλύτερη τεχνική ιοντισμού δεν είναι προφανής και πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω τα σχετικά τους προτερήματα [314]. Στο Σχήμα 4.5 απεικονίζεται το εύρος

των ενώσεων που μπορούν να ιοντιστούν με τις δύο πηγές, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και την πολικότητά τους.



Σχήμα 4.5: Σύγκριση των μεθόδων ιοντισμού ESI και APCI ανάλογα με την πολικότητα και το μοριακό βάρος των ενώσεων

4.3.2 Αναλυτές μαζών

Τα ιόντα που δημιουργούνται στην πηγή ιόντων διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο της μάζας τους (m) προς το φορτίο (z) m/z στον αναλυτή μαζών. Ο ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να διαχωρίσει τις μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους. Επιπλέον, πρέπει να επιτρέπει την διέλευση αρκετών ιόντων, ώστε να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό ενός αναλυτή μαζών είναι η διαχωριστική ή διακριτική ικανότητα (Resolving power, R), δηλαδή η ικανότητά του να διαχωρίζει μάζες, και δίνεται από τη σχέση:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (4.1)$$

όπου Δm η διαφορά μαζών μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών (σε Da) και m η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής (ή η μέση τιμή της μάζας των δύο κορυφών) [315, 317].

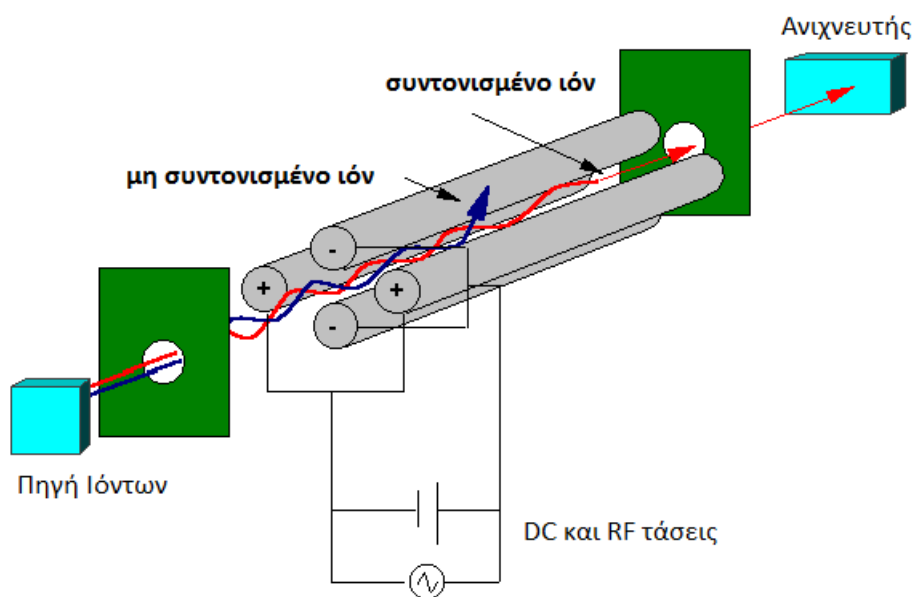
Ένα άλλο χαρακτηριστικό απόδοσης του αναλυτή μαζών είναι η ταχύτητα σάρωσης (scan rate) που αναφέρεται στην ταχύτητα με την οποία σαρώνεται ένα φάσμα μαζών. Είναι ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος για φασματογράφους σε σύζευξη με χρωματογραφικές τεχνικές όπου η ταχύτητα σάρωσης πρέπει να είναι πολύ πιο γρήγορη από τον χρόνο έκλουσης μίας χρωματογραφικής κορυφής [315, 317].

Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών που έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται είναι: α. οι αναλυτές μαγνητικού τομέα (magnetic sector analyzers) μονής και διπλής εστίασης, β. οι αναλυτές απλού τετραπόλου (single quadrupole, Q) ή τετραπολικά φίλτρα μάζας (quadrupole mass filter), γ. οι αναλυτές παγίδας ιόντων (ion trap), δ. οι αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (time of flight, TOF) και ε.

οι αναλυτές κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR) και σ. οι αναλυτές Orbitrap [293]. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε σύστημα MS/MS όπου οι αναλυτές μαζών ήταν τετράπολα και ο τρόπος λειτουργίας τους περιγράφεται στη συνέχεια.

Αναλυτής Τετραπόλου (Quadrupole)

Ο αναλυτής τετραπόλου αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ράβδους που είναι τοποθετημένες και συνδεδεμένες κατά ζεύγη η μία απέναντι από την άλλη (Σχήμα 4.6). Το ένα ζεύγος των ράβδων τροφοδοτείται με θετική τάση συνεχούς ρεύματος (+DC) και το άλλο ζεύγος με αρνητική (-DC) ενώ εφαρμόζεται και εναλλασσόμενη τάση ραδιοσυχνότητας (RF) με διαφορά φάσης 180° μεταξύ των δύο ζευγών. Έτσι δημιουργείται ένα ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο στο χώρο μεταξύ των ράβδων. Λόγω της εφαρμογής ενός χαμηλού δυναμικού (10-20 V) η δέσμη των ιόντων που εισέρχονται στο τετράπολο κινούνται κατά μήκος των αξόνων. Ο διαχωρισμός των μαζών επιτυγχάνεται με τη μεταβολή της τάσης στις ράβδους (σάρωση 0 - ± 250 V DC, 0 - ± 1500 V RF) ενώ ο λόγος RF/DC διατηρείται σταθερός (~ 6). Με συγκεκριμένες τιμές τάσεων μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένο m/z μπορούν να διατηρήσουν σταθερή πορεία κατά μήκος των ράβδων και τελικά να φτάσουν στον ανιχνευτή. Όλα τα υπόλοιπα ιόντα θα ακολουθήσουν μία παλλόμενη διαδρομή με αποτέλεσμα να προσκρουσθούν στις ράβδους, να εκφορτιστούν και να μην ανιχνευθούν [314, 315].



Σχήμα 4.6: Σχηματική αναπαράσταση τετραπολικού αναλυτή μαζών [318]

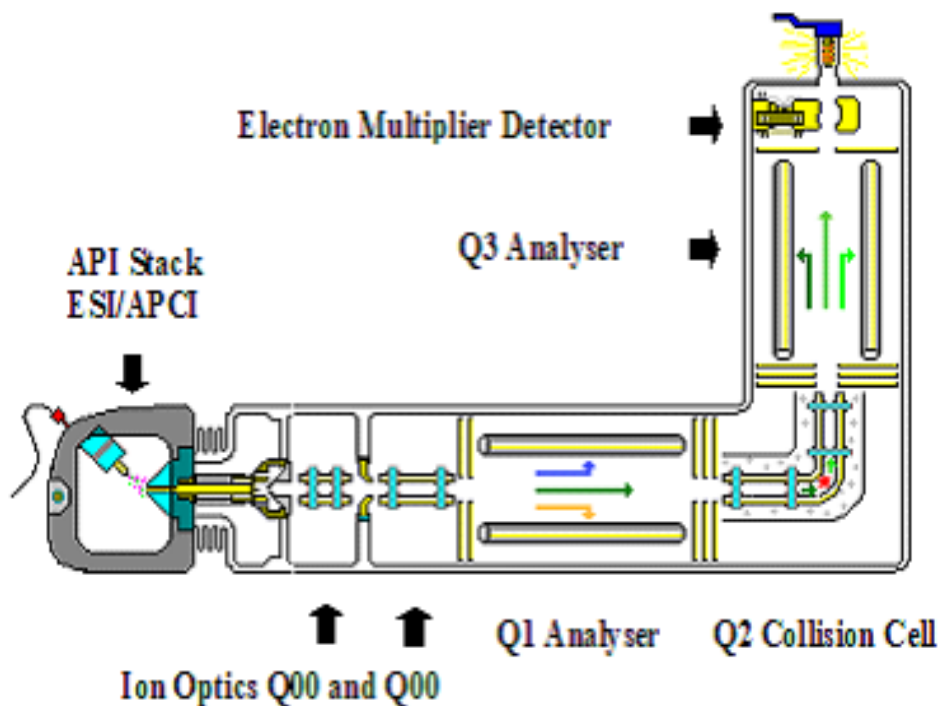
Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών είναι ένας ιδανικός ανιχνευτής για τη χρωματογραφία καθώς επιτρέπει τη γρήγορη σάρωση ακόμη και σε χαμηλά δυναμικά. Το τετράπολο ανήκει στην κατηγορία των αναλυτών με χαμηλή διακριτική ικανότητα (τυπικά $R = 1,000$), η οποία όμως κάτω από ευνοϊκές συνθήκες μπορεί να αυξηθεί και σε τιμές μεγαλύτερες από 4,000. Η ακρίβεια μάζας (mass accuracy) του τετραπόλου είναι γενικά μεταξύ 0,1 και 0,2 Da και το εύρος μαζών (mass range) συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10 με 4,000 Da [320].

4.4 Συζευγμένη φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)

Ο όρος συζευγμένη φασματομετρία μαζών - MS/MS, αναφέρεται στις τεχνικές κατά τις οποίες το ένα στάδιο MS (όχι απαραίτητα το πρώτο) εφαρμόζεται για την απομόνωση του ιόντος που μας ενδιαφέρει. Στο δεύτερο στάδιο διερευνάται η σχέση αυτού του ιόντος με άλλα, από τα οποία μπορεί να έχει παραχθεί ή μπορεί να έχει παράγει λόγω διάσπασης. Τα δύο στάδια της φασματομετρίας μαζών συσχετίζονται με συγκεκριμένους τρόπους ώστε να δώσουν την επιθυμητή αναλυτική πληροφορία [314]. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε σύστημα MS/MS τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου που περιγράφεται ακολούθως ο τρόπος λειτουργίας του.

Τριπλό Τετράπολο (Triple Quadrupole)

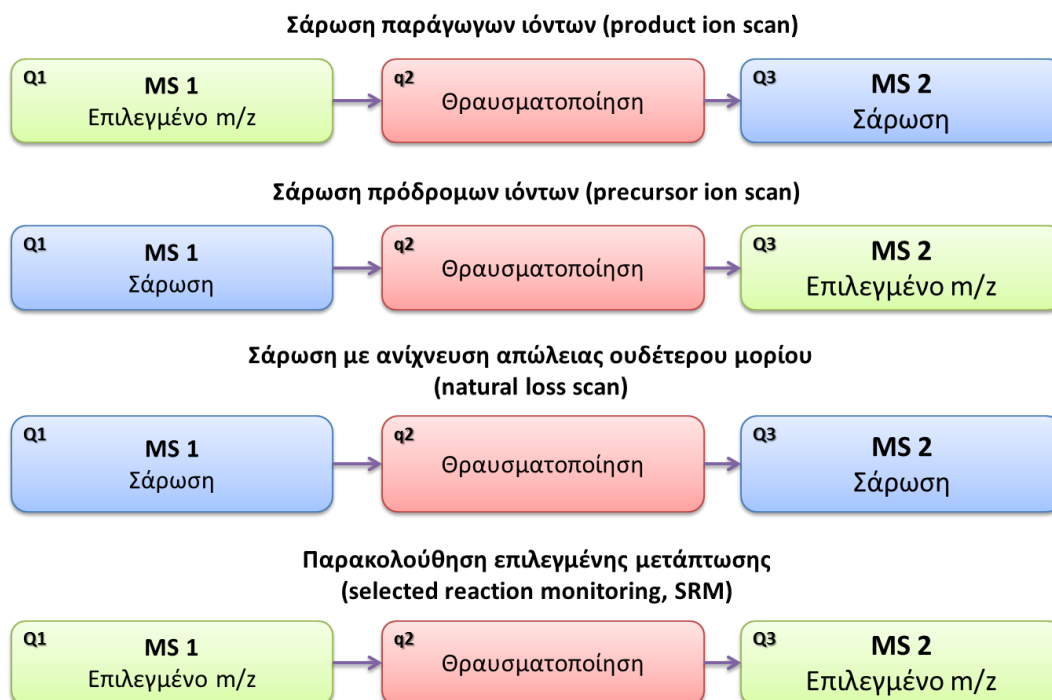
Το τριπλό τετράπολο είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα MS/MS. Αποτελείται από τρία τετράπολα σε σειρά (Σχήμα 4.7). Το δεύτερο από τα τρία τετράπολα δεν λειτουργεί σαν συσκευή διαχωρισμού μαζών αλλά σαν κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell), όπου γίνεται η θραυσματοποίηση των ιόντων που αναλύθηκαν από το πρώτο τετράπολο και η εστίαση τους για να εισέλθουν στο τρίτο τετράπολο. Στο δεύτερο τετράπολο εφαρμόζεται μόνο εναλλασσόμενη τάση ραδιοσυχνότητας (RF) και υπάρχει ένα αέριο σύγκρουσης υπό πίεση έτσι ώστε όταν τα ιόντα εισέρχονται σε αυτό το τετράπολο να υφίστανται μία ή περισσότερες συγκρούσεις. Στην περίπτωση που το αέριο σύγκρουσης είναι ανδρανές αέριο (π.χ. Αργό, Ar) η εσωτερική ενέργεια του μεταφέρεται στα ιόντα μετατρέποντας ένα μέρος της κινητικής ενέργειας σε εσωτερική ενέργεια. Έτσι τα ιόντα θραυσματοποιούνται και τα παράγωγα ιόντα αναλύονται στο τρίτο τετράπολο. Από το τρίτο τετράπολο διέρχονται και διαχωρίζονται τα παράγωγα ιόντα και τελικά φτάνουν στον ανιχνευτή. Όλα τα ζεύγη των ράβδων μπορούν να ελεγχθούν ως προς την εκπομπή τους έτσι ώστε να επιτρέπουν τη διέλευση καθορισμένων τιμών m/z [314, 315].



Σχήμα 4.7: Σχηματική αναπαράσταση φασματογράφου μαζών MS/MS τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου [318]

4.5 Τεχνικές σάρωσης MS/MS

Τα συστήματα MS/MS ανιχνεύσουν τα ιόντα με ποικίλες τεχνικές σάρωσης. Οι πιο διαδεδομένες από αυτές είναι α. η σάρωση παράγωγων ιόντων (product ion scan), β. η σάρωση πρόδρομων ιόντων (precursor ion scan), γ. η σάρωση με ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (natural loss scan) και δ. η παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης – μετάπτωσης (selected reaction monitoring, SRM) όπου μπορεί να γίνει και η ταυτόχρονη παρακολούθηση πολλαπλών μεταπτώσεων (multiple reaction monitoring, MRM). Στο Σχήμα 4.8 παρατίθενται σχηματικά ο τρόπος λειτουργίας των τετραπόλων κατά τις διάφορες τεχνικές σάρωσης.



Σχήμα 4.8: Τεχνικές σάρωσης της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών

Στην παρούσα εργασία η ανίχνευση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική MRM. Συγκεκριμένα με αυτή την τεχνική παρακολουθούνται οι αντιδράσεις θραυσματοποίησης του πρόδρομου ιόντος. Πρόκειται για μια πολύ εκλεκτική τεχνική σάρωσης κατά την οποία καταγράφονται οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις των ενώσεων που μελετώνται. Ειδικότερα, στο πρώτο τετράπολο (Q1) επιλέγεται να διέρχεται ένα συγκεκριμένο πρόδρομο ιόν. Ακολούθως λαμβάνει χώρα η θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος στη κυψελίδα συγκρούσεων (q2). Το τρίτο τετράπολο (Q3) ρυθμίζεται έτσι ώστε να διέλθει συγκεκριμένο παράγωγο ιόν και έτσι καταγράφεται μια συγκεκριμένη μετάπτωση. Με αυτή την τεχνική δύναται να μελετηθεί ταυτόχρονα μια ομάδα μεταπτώσεων για κάθε αναλυόμενη ένωση (παρακολούθηση πολλαπλών μεταπτώσεων, MRM). Η δυνατότητα επιλογής ενός τουλάχιστον ζεύγους ιόντων (πρόδρομο ιόν – παράγωγο ιόν) για κάθε ένωση που μελετάται, καθιστά τη τεχνική MRM ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανάλυση λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ακρίβειάς της [314].

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη αξιόπιστων πολυδύναμων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό αναδυόμενων οργανικών ρύπων στο νερό. Ένας στόχος ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης, γρήγορης και φιλικής προς το περιβάλλον μεθόδου LC-ESI-MS/MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών και φυκοτοξινών (ANA, CYN, NOD, [D-Asp3]MC-RR, MC-RR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-YR, MC-HtyR, MC-HilR, MC-LA, MC-LY, MC-LW, MC-LF, MC-WR, Domoic acid και Okadaic acid). Η ανάπτυξη μιας τέτοιας μεθόδου (multi-toxin method) αποτελεί καινοτομία καθώς υπάρχουν πολλές προκλήσεις. Οι υπό μελέτη τοξίνες έχουν διαφορετικές χημικές δομές και ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες, ενώ πολλές δομικές παραλλαγές των MCs μελετήθηκαν για πρώτη φορά και ως εκ τούτου δεν υπήρχαν διαθέσιμα αναλυτικά δεδομένα για αυτές. Επίσης, παρόλο που χρησιμοποιήθηκε η εκλεκτική και ειδική τεχνική MS/MS, ήταν απαραίτητος ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των τοξινών από τις ισοβαρείς ενώσεις που έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η κυανοτοξίνη ANA και το φυσικό αμινοξύ Phenylalanine, για την αποφυγή ψευδώς θετικού αποτελέσματος. Επιπρόσθετα, υπάρχει περιορισμένος αριθμός πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRM) για την εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου, τα εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα των κυανοτοξινών έχουν αρκετά υψηλό κόστος ενώ ακόμα δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες ενώσεις κατάλληλες για τη διασφάλιση των αποτελεσμάτων, όπως ισοτοπικά επισημασμένες τοξίνες για να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά πρότυπα. Τέλος, το υπόστρωμα του δείγματος είναι πολύπλοκο με συνέπεια να κρίνεται απαραίτητη η προκατεργασία του για την απομάκρυνση των παρεμποδισίων της μήτρας και για την προσυγκέντρωση των αναλυτών.

Από ένα δείγμα επιφανειακού νερού με κυανοβακτηριακή άνθιση, μετά από φιλτράρισμα, προκύπτουν δύο είδη υποστρώματος, νερό και κυανοβακτηριακή βιομάζα. Ιδανική τεχνική για την προκατεργασία δειγμάτων νερού είναι η SPE. Στην βιβλιογραφία υπάρχει ένας μικρός αριθμός μεθόδων για την ταυτόχρονη εκχύλιση και τον προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών σε νερό, οι οποίες έχουν αρκετούς περιορισμούς. Η χρήση ενός μόνο προσροφητικού υλικού SPE δεν επαρκεί για να κατακρατήσει όλο το εύρος των κυανοτοξινών που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες. Στο παρελθόν έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι όπου χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά προσροφητικά υλικά SPE συνδεδεμένα μεταξύ τους σε σειρά για την προκατεργασία δειγμάτων νερού στην ανάλυση άλλων κατηγοριών μικρορύπων. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε διάταξη διπλού φυσιγγίου SPE για την ταυτόχρονη επαρκή ανάκτηση διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών και φυκοτοξινών από το νερό, συμπεριλαμβανομένων των ποικίλων δομικών παραλλαγών των MCs που είναι εμπορικά διαθέσιμα. Επίσης, αναπτύχθηκε μέθοδος για την ταυτόχρονη ποσοτική παραλαβή διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών από την κυανοβακτηριακή βιομάζα με ένα εκχυλιστικό σύστημα. Ένας επιπλέον στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η εφαρμογή των μεθόδων που αναπτύχθηκαν για την μελέτη της παρουσίας κυανοτοξινών και τον αξιόπιστο προσδιορισμό τους σε δεκατέσσερις λίμνες της Ελλάδας, κάτι που δεν είχε ξαναγίνει στο παρελθόν με την τεχνική LC-MS/MS.

Άλλος ένας στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ποικίλων κατηγοριών οργανικών ρύπων (Alachlor, Atrazine, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorfenvinphos, Chlortoluron, Chlorpyrifos, Cyanazine, Diazinon, Dimethoate, Diuron, Ethion, Fenthion, Isoproturon, Linuron, Malathion, Methidathion, Metribuzin, Monuron, Phosalone, Propazine, Simazine, Triazophos, Trifluralin, 2,4,6-Trichlorophenol,

Pentachlorophenol, 17 α -ethinylestradiol, β -Estradiol και Diclofenac) που ανήκουν στις ουσίες προτεραιότητας και στον κατάλογο επιτήρησης που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για την προστασία των υδάτων και της δημόσιας υγείας. Για την προκατεργασία του δείγματος νερού αναπτύχθηκε μέθοδος SPE για την ανάκτηση των υπό μελέτη ενώσεων. Για τον προσδιορισμό τους αναπτύχθηκε κατάλληλη μέθοδος στο σύστημα LC-APCI-MS/MS. Σημαντικές προκλήσεις στην ανάπτυξη αυτής της μεθόδου ήταν οι διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και πολικότητες των υπό μελέτη ενώσεων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5 : Αντιδραστήρια – Εργαστηριακός εξοπλισμός

5.1 Αντιδραστήρια

5.1.1 Πρότυπες ουσίες

Οι κυανοτοξίνες και οι φυκοτοξίνες που μελετήθηκαν και προσδιορίστηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.1: Κυανοτοξίνες και φυκοτοξίνες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Όνομα	Συντομογραφία	Μοριακός Τύπος	Μοριακό Βάρος	CAS Number
Anatoxin-a	ANA	C ₁₀ H ₁₅ NO	165,23	64285-06-9
Cylindrospermopsin	CYN	C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₇ S	415,43	143545-90-8
Nodularin-R	NOD	C ₄₁ H ₆₀ N ₈ O ₁₀	824,98	118399-22-7
[D-Asp3] Microcystin-RR	[D-Asp3] MC-RR	C ₄₈ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₂	1024,17	-
Microcystin-RR	MC-RR	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂	1038,20	111755-37-4
[D-Asp3] Microcystin-LR	[D-Asp3] MC-LR	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂	981,14	-
Microcystin-LR	MC-LR	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	995,17	101043-37-2
Microcystin-YR	MC-YR	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃	1045,18	101064-48-6
Microcystin-HtyR	MC-HtyR	C ₅₃ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃	1059,21	-
Microcystin-HilR	MC-HilR	C ₅₀ H ₇₆ N ₁₀ O ₁₂	1009,20	-
Microcystin-LA	MC-LA	C ₄₆ H ₆₇ N ₇ O ₁₂	910,06	96180-79-9
Microcystin-LY	MC-LY	C ₅₂ H ₇₁ N ₇ O ₁₃	1002,16	123304-10-9
Microcystin-LW	MC-LW	C ₅₄ H ₇₂ N ₈ O ₁₂	1025,19	157622-02-1
Microcystin-LF	MC-LF	C ₅₂ H ₇₁ N ₇ O ₁₂	986,16	154037-70-4
Microcystin-WR	MC-WR	C ₅₄ H ₇₃ N ₁₁ O ₁₂	1068,22	138234-58-9
Domoic acid	DA	C ₁₅ H ₂₁ NO ₆	311,33	14277-97-5
Okadaic acid	OA	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	805,02	78111-17-8

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων κυανοτοξινών και φυκοτοξινών χρησιμοποιήθηκαν στερεές πρότυπες ουσίες. Οι στερεές πρότυπες ουσίες των τοξινών [D-Asp3]MC-LR, [D-Asp3]MC-RR, MC-WR, MC-HtyR, MC-HilR, MC-LY, MC-LW, MC-LF και OA ήταν της εταιρίας ENZO Life Science (Lausen, Switzerland), ενώ των τοξινών MC-RR, MC-LR, MC-YR, MC-LA και NOD της εταιρίας Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Η στερεή πρότυπη ουσία της CYN ήταν από την εταιρία Abraxis (Warminster, USA), της ANA fumarate από την TOCRIS Bioscience (Bristol, UK) και του DA από την CALBIOCHEM (Darmstadt, Germany). Όλες οι πρότυπες ουσίες είχαν καθαρότητα >95%, συνοδεύονταν από το πιστοποιητικό ανάλυσης.

Οι οργανικοί ρύποι που μελετήθηκαν και προσδιορίστηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή καθώς και αναλυτικότερα οι κατηγορίες στις οποίες ανήκουν, παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.2: Οργανικοί ρύποι που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Όνομα	Κατηγορία	Μοριακός Τύπος	M.B.	CAS Number
Φυτοφάρμακα				
Alachlor	Χλωροακετανιλίδη	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂	269,77	15972-60-8
Atrazine	Τριαζίνη	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,68	1912-24-9
Azinphos-ethyl	Οργανοφωσφορικό	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS ₂	345,38	2642-71-9
Azinphos-methyl	Οργανοφωσφορικό	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	317,32	86-50-0
Chlorfenvinphos	Οργανοφωσφορικό	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₃ O ₄ P	359,57	470-90-6
Chlortoluron	Φαινιλουρία	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O	212,67	15545-48-9
Chlorpyrifos	Οργανοφωσφορικό	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350,59	2921-88-2
Cyanazine	Τριαζίνη	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	240,7	21725-46-2
Diazinon	Οργανοφωσφορικό	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304,35	333-41-5
Dimethoate	Οργανοφωσφορικό	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	229,26	60-51-5
Diuron	Φαινιλουρία	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233,09	330-54-1
Ethion	Οργανοφωσφορικό	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	384,48	563-12-2
Fenthion	Οργανοφωσφορικό	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278,33	55-38-9
Isoproturon	Φαινιλουρία	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O	206,28	34123-59-6
Linuron	Φαινιλουρία	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	249,09	330-55-2
Malathion	Οργανοφωσφορικό	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,36	121-75-5
Methidathion	Οργανοφωσφορικό	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₄ PS ₃	302,30	950-37-8
Metribuzin	Τριαζιόνη	C ₈ H ₁₄ N ₄ OS	214,28	21087-64-9
Monuron	Φαινιλουρία	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O	198,65	150-68-5
Phosalone	Οργανοφωσφορικό	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	367,80	2310-17-0
Propazine	Τριαζίνη	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	229,71	139-40-2
Simazine	Τριαζίνη	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201,66	122-34-9
Triazophos	Οργανοφωσφορικό	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS	313,30	24017-47-8
Trifluralin	Δινιτροανιλίδιο	C ₁₃ H ₁₆ F ₃ N ₃ O ₄	335,28	1582-09-8
Άλλοι οργανικοί ρύποι				
2,4,6-Trichlorophenol	Χλωροφαινόλη	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	88-06-2
17α-ethinylestradiol	Οιστρογόνο	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,40	57-63-6
β-Estradiol	Στεροειδές & Οιστρογόνο	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,38	50-28-2
Diclofenac	Φαρμακευτική ουσία	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,15	15307-86-5
Pentachlorophenol	Χλωροφαινόλη	C ₆ HCl ₅ O	266,34	87-86-5

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων οργανικών ρύπων χρησιμοποιήθηκαν στερεές πρότυπες ουσίες. Οι στερεές πρότυπες ουσίες όλων των υπό μελέτη οργανικών ρύπων ήταν της εταιρίας Sigma-Aldrich (Seelze, Germany & Saint Louis, MO, USA). Όλες οι πρότυπες ουσίες είχαν καθαρότητα >96%, συνοδεύονταν από το πιστοποιητικό ανάλυσης και ήταν επισημασμένες με ημερομηνία λήξης.

5.1.2 Διαλύτες – Αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο (ACN) καθαρότητας HPLC, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Μεθανόλη (MeOH) καθαρότητας HPLC, Fischer Scientific (Leics, UK)
- Διχλωρομεθάνιο (DCM) καθαρότητας HPLC, Fischer Scientific (Leics, UK)
- Μεθυλ-tert-βουτυλ-αιθέρας (MTBE) καθαρότητας HPLC, Fischer Scientific (Leics, UK)
- n-Βουτανόλη (n-But) αναλυτικής καθαρότητας 99,5%, Penta (Praha, Czech Republic)
- Οξικός αιθυλεστέρας (EtAc) καθαρότητας HPLC, Panreac (Barcelona, Spain)
- Τολουόλιο αναλυτική καθαρότητας, MERCK (Darmstadt, Germany)
- Εξάνιο αναλυτική καθαρότητας, MERCK (Darmstadt, Germany)
- Μυρμηγκικό οξύ (HCOOH) υψηλής καθαρότητας (98-100%), Riedel-de Haën (Seelze, Germany)
- Υπερκαθαρό νερό (18.2 ΜΩ/cm) συσκευής TEMAK
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) σφαιρίδια (καθαρότητας 98%), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

5.2 Συσσκευές – Υλικά

5.2.1 Γυαλικά και σκεύη γενικής χρήσης

- Αυτόματη πιπέττα 10-100 μl, Eppendorf (διακριβωμένη)
- Αυτόματη πιπέττα 100-1000 μl, Eppendorf (διακριβωμένη)
- Αυτόματη πιπέττα 2-10 ml, Finnripipette Labsystems
- Πιπέττες Pasteur
- Ποτήρια Ζέσεως
- Ογκομετρικές φιάλες 1, 10, 50 και 100 ml, Class A
- Ογκομετρικός κύλινδρος 500 ml, Class A
- Φιάλες δειγματοληψίας: Χρησιμοποιούνται γυάλινες φιάλες του 1 L, οι οποίες καθαρίζονται προσεκτικά πριν από κάθε χρήση
- Γυάλινη συσκευή διήθησης υπό κενό με υποδοχέα για φίλτρα 47 mm, Millipore
- Φίλτρα Glass Fiber διαμέτρου 47 mm, πόροι 0,7 μm, Millipore
- Πλαστικοί σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης (microcentrifuge tube) Eppendorf 1,5 ml
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ml
- Γυάλινα φιαλίδια 16 ml με καπάκια PTFE lined, Thermo Scientific
- Γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη 1,5 ml (32 x 11,6mm) με καπάκια με διάφραγμα με εγκοπή (slit septa Silicone / blue PTFE), Kinesis
- Inserts για τα φιαλίδια 0,1 και 0,4 ml, Kinesis

5.2.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Συσκευή υπερκάθαρου νερού (18,2 ΜΩ/cm) TEMAK, Type: TSDW10
- Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια 5 δεκαδικών ψηφίων Sartorius CP225D (διακριβωμένος)
- Συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE, Supelco) αποτελούμενη από:
 - α. Διαφραγματική αντλία κενού (KNF Ladorport) και φιάλη συλλογής όγκου 10 L
 - β. Συστοιχία (manifold) SPE 12 θέσεων λειτουργίας υπό κενό, με σωληνώσεις από Teflon
 - γ. Γυάλινες φιάλες δειγμάτων 1 L, βαθμονομημένες
 - δ. Φυσιγγία (cartridges) SPE:
 1. Oasis HLB (200mg, 6cc, 25-35μm, Waters Corporation, USA)
 2. HyperSep Hypercarb PGC (porous graphitic carbon) (200mg, 3cc, 30-40μm), Thermo Scientific, UK)
 - ε. Προσαρμογείς για την σύνδεση δύο φυσιγγίων SPE
- Συσκευή εξάτμισης με άζωτο (καθαρότητας 99,9%) και υδρόλουτρο, 12 θέσεων Organomation N-VAP 111
- Συσκευή υπερήχων Bandelin sonorex super RK 106
- Συσκευή λυοφιλίωσης (Martin Christ ALPHA 1-2, Vacuubrand HV Pump)
- Φυγόκεντρος HARRIER 18/80 Refrigerated SANYO
- Πλυντήριο γυαλικών Miele Professional, Type: G7883
- Φούρνος γυαλικών Memmert UFE 400

5.2.3 Αναλυτικές στήλες υγρής χρωματογραφίας

Κατά την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων μελετήθηκε η απόδοση των κάτωθι αναλυτικών στηλών υγροχρωματογραφίας:

- Atlantis T3, 2.1 x 100mm, 3μm (Waters, Ireland)
- Atlantis dC18, 2.1 x 100mm, 3μm (Waters, Ireland)
- Zorbax eclipse XDB-C18, 4.6 x 50mm, 1.8μm (Agilent, USA)
- Poroshell 120 EC-C18, 2.1 x 100mm, 2.7μm (Agilent, USA)
- Hypersil Gold, 2.1 x 100mm, 3μm (Thermo Electron Corporation)

5.3 **Όργανα**

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) (Thermo Electron Corporation, California) αποτελούμενο από τα εξής μέρη:

- Αντλία HPLC Finnigan Surveyor LC pump Plus δύο εμβόλων βαθμιδωτής έκλυσης τεσσάρων διαλυτών
- Αυτόματος δειγματολήπτης Finnigan Surveyor Autosampler Plus με ενσωματωμένο θερμοστάτη στηλών

- Ανιχνευτής Διαδοχικής Φασματομετρίας Μαζών (MS/MS) Finnigan TSQ Quantum Discovery Max που περιλαμβάνει:
 - α) Πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ElectronSpray Ionization) ή
 - β) Πηγή χημικού ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) και
 - γ) Αναλυτή Μάζας με τρία τετράπολα (triple stage quadrupole analyzer).

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό Xcalibur.

5.4 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κυανοτοξινών και φυκοτοξινών

Για την παρασκευή των διαλυμάτων κυανοτοξινών και φυκοτοξινών χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες στερεές ουσίες. Η παρασκευή των διαλυμάτων παρακαταθήκης (stock solutions) των ουσιών έγινε με διαλυτοποίηση των στερεών προτύπων (25 ή 100 µg) σε καθορισμένο όγκο μεθανόλης και παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 5 min.

Από τα μεμονωμένα διαλύματα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 25 – 100 µg/ml παρασκευάστηκαν για κάθε ένωση μεμονωμένα διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/L σε μεθανόλη-νερό 10:90 v/v (0,1% HCOOH), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των κατάλληλων παραμέτρων ανίχνευσης στο φασματογράφο μάζας. Αναλυτικότερα, τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του πρόδρομου και των θυγατρικών ιόντων για κάθε ένωση, καθώς και της βέλτιστης ενέργειας θραυσματοποίησης κάθε MRM μετάπτωσης στο σύστημα ESI-MS/MS.

Από τα μεμονωμένα διαλύματα παρακαταθήκης των ουσιών, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα μίγμα των 17 τοξινών συγκέντρωσης 400 µg/L σε νερό. Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματα των 17 τοξινών συγκέντρωσης 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 και 250 µg/L σε μεθανόλη-νερό 5:95 v/v. Το πρότυπο διάλυμα μίγματος 17 τοξινών συγκέντρωσης 400 µg/L χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τον εμβολιασμό των δειγμάτων νερού κατά την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των 17 κυανοτοξινών σε νερό και την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κατά την ανάλυση των δειγμάτων.

Για τον εμβολιασμό της κυανοβακτηριακής βιομάζας για τις δοκιμές που έγιναν στα πλαίσια της ανάπτυξης και επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή βιομάζα, παρασκευάστηκε από τα μεμονωμένα διαλύματα παρακαταθήκης, πρότυπο διάλυμα εμβολιασμού, μίγμα των κυανοτοξινών ANA και CYN συγκέντρωσης 5 mg/L σε νερό. Όλα τα πρότυπα διαλύματα φυλάσσονταν στην κατάψυξη.

5.5 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων οργανικών ρύπων

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων οργανικών ρύπων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες στερεές ουσίες. Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων παρακαταθήκης (Stock Solutions) ζυγίστηκαν >10 mg πρότυπης στερεής ουσίας και διαλυτοποιήθηκαν σε μεθανόλη, σε ογκομετρική φιάλη 10ml, A Class. Τα μεμονωμένα διαλύματα παρακαταθήκης των οργανικών ρύπων είχαν τελική

συγκέντρωση ~1 mg/ml. Εξαιρέση αποτελούν οι ενώσεις Simazine και Propazine όπου ο τελικός όγκος του μεμονωμένου προτύπου διαλύματος ήταν 100 ml και η τελική τους συγκέντρωση ήταν ~0,1 mg/ml. Τα διαλύματα παρακαταθήκης επισημάνθηκαν με την ακριβή συγκέντρωσή τους και φυλάσσονταν στην κατάψυξη.

Από τα μεμονωμένα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν για κάθε ένωση μεμονωμένα διαλύματα συγκέντρωσης 10 mg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 50:50, v/v, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των κατάλληλων παραμέτρων ανίχνευσης στο φασματογράφο μάζας. Αναλυτικότερα, τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του πρόδρομου και των θυγατρικών ιόντων για κάθε ένωση, καθώς και της βέλτιστης ενέργειας θραυσματοποίησης κάθε MRM μετάπτωσης στο σύστημα APCI-MS/MS.

Από τα μεμονωμένα διαλύματα παρακαταθήκης των ουσιών, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα μίγμα των 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 10 mg/L σε μεθανόλη, και με αραιώση αυτό του διαλύματος παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 100 µg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v. Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματα των 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100 250 και 500 µg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v (0,1% HCOOH). Το πρότυπο διάλυμα μίγματος οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 µg/L χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τον εμβολιασμό των δειγμάτων νερού κατά την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των οργανικών ρύπων σε νερό και την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων κατά την ανάλυση των δειγμάτων. Όλα τα πρότυπα διαλύματα φυλάσσονταν στην κατάψυξη.

Κεφάλαιο 6 : Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό και κυανοβακτηριακή μάζα

6.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών με LC-ESI-MS/MS

Κατά το πρώτο στάδιο της ανάπτυξης των μεθόδων για τον προσδιορισμό κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό και κυανοβακτηριακή μάζα, αναπτύχθηκε μέθοδος για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τους με την τεχνική LC-ESI-MS/MS. Αρχικά, έγινε απ' ευθείας έγχυση (infusion) μεμονωμένου πρότυπου διαλύματος της κάθε υπό μελέτη τοξίνης, συγκέντρωσης 1 mg/L σε μεθανόλη-νερό 10:90 v/v (0,1% HCOOH), στο MS με ταχύτητα ροής 20 μl/min για να βρεθούν τα πρόδρομα ιόντα των ενώσεων που σχηματίζονται με θετικό ιοντισμό στην πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο (ESI). Στη συνέχεια, επιλέχθηκε για κάθε τοξίνη το πρόδρομο ιόν με την μεγαλύτερη ένταση στο MS φάσμα και θραυσματοποιήθηκε στο 2^ο τετράπολο, παρουσία Αργού (1,5 mTorr). Με την βοήθεια αυτόματου προγράμματος λήφθηκαν οι καμπύλες θραυσματοποίησης κάθε ένωσης και επιλέχθηκαν τα τρία (3) πιο ισχυρά θραύσματα τους. Η ανίχνευση των 17 τοξινών στο ESI-MS/MS, επιτεύχθηκε με τη μέθοδο σάρωσης πολλαπλών αντιδράσεων (multiple reaction monitoring, MRM) όπου γινόταν παρακολούθηση τριών μεταπτώσεων από το πρόδρομο σε θυγατρικό ιόν για κάθε ένωση.

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων αναπτύχθηκε μέθοδος με υγροχρωματογραφία (LC). Η κινητή φάση αποτελούταν από (Α) Νερό (0,5% HCOOH) και (Β) ACN (0.5% HCOOH), η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 0,2 ml/min, ο όγκος ένεσης 20 μl και η θερμοκρασία της στήλης τέθηκε στους 30 °C, σε όλες τις δοκιμές. Για την επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού των αναλυτών δοκιμάστηκαν οι ακόλουθες τέσσερις στήλες υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως:

- Atlantis T3, 2.1 mm x 100 mm, 3 μm (Waters, Ireland)
- Atlantis dC18, 2.1 mm x 100 mm, 3 μm (Waters, Ireland)
- Zorbax eclipse XDB-C18, 4.6 mm x 50 mm, 1.8 μm (Agilent, USA)
- Poroshell 120 EC-C18, 2.1 mm x 100 mm, 2.7 μm (Agilent, USA)

Ποικίλα προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης εφαρμόστηκαν ώστε να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός των υπό μελέτη ενώσεων.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι η σύσταση που διαλύτη που περιέχεται το δείγμα επηρεάζει σημαντικά την χρωματογραφία των CYN και ANA. Για την μελέτη της επίδρασης αυτής, αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα των 17 τοξινών συγκέντρωσης 100 μg/L που περιέχονταν σε καθαρό νερό και σε μίγματα μεθανόλης-νερού 5:95, 7:93, 8:92 και 10:90 v/v.

Για την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες ιοντισμού παρουσία κινητής φάσης. Η βελτιστοποίηση, έγινε μονοπαραμετρικά, δηλαδή μελετιόνταν η επίδραση μίας παραμέτρου κάθε φορά. Για την μελέτη, έγιναν ενέσεις πρότυπου διαλύματος 17 τοξινών συγκέντρωσης 50 μg/L σε νερό στο σύστημα LC-ESI-MS/MS όπου άλλαζαν διαδοχικά οι συνθήκες ιοντισμού. Οι τιμές των παραμέτρων ιοντισμού που μελετήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

- Capillary temperature (°C): 300, 325, 350, 375, 400

- Spray Voltage (V): 3000, 3500, 4000, 4250, 4500
- Sheath gas (arbitrary units, a.u.) : 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60
- Auxiliary gas (arbitrary units, a.u.): 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40
- Θέση Probe: A, B, C, D

6.2 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό

Αναπτύχθηκε μέθοδος SPE για την προσυγκέντρωση των υπό μελέτη κυανοτοξινών και φυκοτοξινών και για την απομάκρυνση των παρεμποδίσσεων μήτρας του δείγματος νερού πριν από την ανάλυση με LC-ESI-MS/MS. Κατά την ανάπτυξη της SPE μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα φυσιγγία (cartridges) Oasis HLB (200 mg, 6 cc, 25-35 μm , Waters Corporation, USA) και HyperSep Hypercarb PGC (porous graphitic carbon, 200 mg, 3 cc, 30-40 μm , Thermo Scientific, UK) τα οποία μελετήθηκαν αρχικά μεμονωμένα και στην συνέχεια ενώθηκαν σε διάταξη διπλού φυσιγγίου. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν για την ταυτόχρονη εκχύλιση των υπό μελέτη τοξινών ήταν οι εξής:

- ✓ το αρχικό pH του δείγματος (ουδέτερο και pH 11)
- ✓ η σειρά σύνδεσης των φυσιγγίων κατά τα στάδια της ενεργοποίησης και έκλουσης
- ✓ η σύσταση του διαλύτη έκλουσης (MeOH (0,1% HCOOH), MeOH (0,5% HCOOH), MeOH (1% HCOOH), MeOH (2% HCOOH), MeOH (5% HCOOH) και MeOH:DCM 60:40 v/v (0,5% HCOOH)).
- ✓ ο όγκος του διαλύτη έκλουσης (6 και 10 ml)
- ✓ η σύσταση του διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης (100% H₂O και μίγματα MeOH:H₂O 5:95, 10:90, 20:80 και 50:50 v/v)
- ✓ ο χρόνος παραμονής του τελικού εκχυλίσματος σε λουτρό υπερήχων (0, 0.5, 1, 5, 10 και 15 min)

Για τις δοκιμές της ανάπτυξης της SPE μεθόδου αναλύθηκαν εμβολιασμένα δείγματα νερού τελικής συγκέντρωσης 100 ng/L για κάθε τοξίνη (σε 400 ml νερού είχαν προστεθεί 100 μl πρότυπου διαλύματος μίγματος 17 τοξινών συγκέντρωσης 400 $\mu\text{g/L}$). Σε όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν 400 ml εμβολιασμένου δείγματος νερού στα οποία είχαν προστεθεί 4 ml MeOH. Τα έκλουσμα της SPE εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού με ελαφρύ ρεύμα αζώτου, επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 400 μl διαλύτη και αφέθηκαν σε λουτρό υπερήχων. Τα τελικά εκχυλίσματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη για την ανάλυση με το LC-ESI-MS/MS.

6.3 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό

Για να εξεταστεί η καταλληλότητα της αναπτυχθείσας SPE, LC-ESI-MS/MS μεθόδου για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό έγιναν δοκιμές για την επικύρωση της. Η επικύρωση της μεθόδου βασίστηκε στη διαδικασία επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025. Κατά την επικύρωση πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων προκειμένου να εκτιμηθούν οι κυριότερες παράμετροι απόδοσής της. Οι παράμετροι απόδοσης που εκτιμήθηκαν ήταν οι εξής: ειδικότητα (specificity), γραμμικότητα (linearity) - εύρος μετρήσεων (range of measurement), πιστότητα (precision), ακρίβεια (trueness), όρια ανίχνευσης (LOD) και

ποσοτικοποίησης (LOQ) (limits of detection / quantification) και λόγοι θυγατρικών ιόντων (ion ratios).

6.3.1 Εκλεκτικότητα μεθόδου - παρεμποδίσεις

Η ειδικότητα (εκλεκτικότητα) μιας μεθόδου εκφράζει την έλλειψη παρεμπόδισης στον προσδιορισμό των ουσιών σε ένα δείγμα από άλλα συστατικά του δείγματος. Για την εκτίμηση της ειδικότητας της μεθόδου αναλύθηκαν δύο λευκά / τυφλά (blank) δείγματα νερού (που δεν ήταν εμβολιασμένα με τοξίνες).

6.3.2 Γραμμικότητα – Εύρος μετρήσεων

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους μετρήσεων της αναπτυχθείσας μεθόδου αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματα των 17 τοξινών συγκέντρωσης 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 και 250 µg/L σε μεθανόλη-νερό 5:95 v/v. Το κάθε πρότυπο αναλύθηκε τρεις φορές στο σύστημα LC-ESI-MS/MS. Η γραμμικότητα της μεθόδου αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος αναλυτικό σήμα προς συγκέντρωση ή περιεκτικότητα του αναλυτή και αξιολογείται με στατιστικές μεθόδους όπως ο υπολογισμός της εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η πρότυπη καμπύλη για κάθε τοξίνη προέκυψε μετά από γραμμική συσχέτιση του εμβαδού της κορυφής (y) για κάθε συγκέντρωση κυανοτοξίνης/φυκοτοξίνης και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων (x) (η γραμμική συσχέτιση γίνεται με όλα τα σημεία). Προσδιορίστηκε η κλίση (b) και η τέμνουσα (a) της ευθείας που προκύπτει για κάθε ένωση. Με βάση τα αποτελέσματα έγινε εκτίμηση της γραμμικότητας και υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) της ευθείας που προκύπτει.

6.3.3 Πιστότητα (precision) μεθόδου

Η πιστότητα μίας αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται με την τυπική απόκλιση μιας σειράς αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από ένα δείγμα υπό καθορισμένες συνθήκες. Οι όροι που εμπεριέχονται στην έννοια της πιστότητας είναι η επαναληψιμότητα (repeatability) και η αναπαραγωγιμότητα (reproducibility). Η επαναληψιμότητα είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων ελέγχων στο ίδιο δείγμα που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες ενώ η αναπαραγωγιμότητα είναι το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων ελέγχων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο δείγμα, όμως κάτω από διαφορετικές συνθήκες (π.χ. διαφορετική ημέρα).

Για την εκτίμηση της πιστότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα / ενισχυμένα (spiked) δείγματα νερού συγκέντρωσης 100 ng/L για κάθε υπό μελέτη τοξίνη. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πέντε επαναλήψεις για δύο διαφορετικές ημέρες (n=10). Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για κάθε αναλύτη με βάση τον τύπο 6.1.

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{x}} \quad (6.1)$$

Όπου,

SD η τυπική απόκλιση των μετρήσεων και

\bar{x} η μέση τιμή των μετρήσεων

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των αναλύσεων και από τις δύο ημέρες και υπολογίστηκε η διευρυμένη τυπική απόκλιση (SD pooled) από τον τύπο 6.2. Με βάση το SD pooled υπολογίστηκε η διευρυμένη σχετική τυπική απόκλιση της επαναληψιμότητας (%RSD_r pooled).

$$SD \text{ pooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)SD_{r1}^2 + (n_2 - 1)SD_{r2}^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (6.2)$$

Η εκτίμηση της αναπαραγωγιμότητας έγινε από τα αποτελέσματα όλων των προσδιορισμών. Για τον υπολογισμό της σχετικής τυπικής απόκλισης της αναπαραγωγιμότητας (%RSD_R) υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση από τον τύπο 6.3.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (6.3)$$

6.3.4 Ακρίβεια (accuracy) μεθόδου

Η ακρίβεια (accuracy) αφορά τη διαφορά μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής που γίνεται αποδεκτή ως αληθής ή ορθή τιμή της μετρούμενης ποσότητας. Η ακρίβεια της μεθόδου εξαρτάται από την ορθότητα (trueness) και την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Η ορθότητα της μεθόδου εκφρασμένη ως % ανάκτηση (% recovery, R) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα από τα πειράματα εκτίμησης της πιστότητας της μεθόδου. Ο υπολογισμός της % ανάκτησης για κάθε αναλύτη έγινε με τον τύπο 6.4 και στη συνέχεια υπολογίστηκε η % μέση ανάκτηση.

$$\% \text{ Ανάκτηση, } R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad (6.4)$$

Όπου:

C₁= η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο εμβολιασμένο δείγμα

C₂= η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο λευκό δείγμα

C₃= η συγκέντρωση εμβολιασμού

6.3.5 Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου

Στην περίπτωση που ένα δείγμα περιέχει έναν αναλύτη σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση, το αναλυτικό σήμα θα είναι πολύ μικρό κατά τον προσδιορισμό του με μια μέθοδο. Επομένως είναι δύσκολο να αποφασισθεί εάν αυτό το πολύ μικρό αναλυτικό σήμα προέρχεται από τον αναλύτη ή οφείλεται στο σήμα υποβάθρου από τη μέθοδο ή το όργανο. Η αβεβαιότητα αυτή δημιούργησε την ανάγκη καθιέρωσης του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης που εκφράζουν την ανιχνευσιμότητα (detectability) της μεθόδου, δηλαδή την ικανότητα της να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη.

Ως όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να ανιχνευτεί αξιόπιστα. Ως όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά

αξιόπιστα. Τα LODs της μεθόδου υπολογίστηκαν από οκτώ αναλύσεις (n=8) προτύπου διαλύματος των 17 τοξινών συγκέντρωσης 10 µg/L με βάση τον τύπο 6.5 [321].

$$LOD = t_{(n-1, 0.95)} \times SD \quad (6.5)$$

Όπου,

SD η τυπική απόκλιση των μετρήσεων και

$t_{(n-1, 0.95)}$ η τιμή t-test για n-1 βαθμούς ελευθερίας σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (1,895 για n=8)

Για την επιβεβαίωση των θεωρητικά υπολογισμένων LODs αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο εμβολιασμένα (spiked) δείγματα νερού στο επίπεδο συγκέντρωσης των LODs. Τα LOQs της μεθόδου υπολογίστηκαν ως 3 x LOD.

6.3.6 Λόγοι έντασης θυγατρικών ιόντων

Οι λόγοι έντασης των θυγατρικών ιόντων των ουσιών που προσδιορίζονται με την αναπτυχθείσα LC-ESI-MS/MS μέθοδο υπολογίστηκαν με χρήση των δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση (6 επαναλήψεις) πρότυπου διαλύματος μίγματος των 17 τοξινών συγκέντρωσης 100 µg/L σε μεθανόλη-νερό 5:95 (v/v). Ο λόγος έντασης των ιόντων για κάθε ουσία υπολογίστηκε από την διαίρεση της έντασης (εμβαδόν) της μετάπτωσης του πρόδρομου ιόντος στο ιόν ταυτοποίησης προς την ένταση (εμβαδόν) της μετάπτωσης του πρόδρομου ιόντος στο ιόν ποσοτικοποίησης. Επίσης, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση και για τους δύο λόγους ιόντων κάθε τοξίνης.

6.4 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή μάζα

Αναπτύχθηκε μέθοδος για την εκχύλιση των κυανοτοξινών από τα κύτταρα των κυανοβακτηρίων, πριν την LC-ESI-MS/MS ανάλυση. Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε λυοφιλιωμένη κυανοβακτηριακή μάζα που είχε συλλεχθεί από την λίμνη Ορεστιάδα (Καστοριά) στις 18/09/2014 κατά την διάρκεια επεισοδίου έντονης κυανοβακτηριακής άνθησης (bloom). Το δείγμα περιείχε MCs και εμβολιάστηκε με CYN και ANA σε επίπεδο συγκέντρωσης 25 ng/mg. Στόχος της παρούσας ανάπτυξης μεθόδου ήταν να μεγιστοποιηθεί η ποσότητα των τοξινών που εκχυλίζεται από τα κυανοβακτηριακά κύτταρα. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν για την ταυτόχρονη εκχύλιση των υπό μελέτη τοξινών ήταν οι εξής:

- ✓ τεχνική επεξεργασίας με υπερήχους για την λύση των κυττάρων (λουτρό υπερήχων & probe υπερήχων)
- ✓ εκχυλιστική ικανότητα διαλυτών με διαφορετικές πολικότητες (Πίνακας 6.1)
- ✓ σύσταση του διαλύτη εκχύλισης (μίγματα 0:100, 25:75, 50:50, 75:20, 100:0% v/v MeOH:H₂O παρουσία HCOOH 0, 0.1, 0.5 & 1% και εκχυλιστικά συστήματα με n-BuOH)
- ✓ όγκος του διαλύτη εκχύλισης (1,5 και 3 ml)
- ✓ μάζα του αναλυόμενου δείγματος (5, 10, 20, 30 και 40 mg)
- ✓ είδος φίλτρων διήθησης εκχυλίσματος (Nylon 0,45µm της Whatman, PVDF 0,45µm της Whatman, PTFE 0,45µm της Valuprep και Fiber glass 0,47µm της Millipore)

Πίνακας 6.1: Διαλύτες που μελετήθηκαν για την εκχυλιστική τους ικανότητα

Διαλύτης	Δείκτης Πολικότητας (P') ^[322]
Νερό (H ₂ O)	9,0
Μεθανόλη (MeOH)	5,1
n-Βουτανόλη (n-BuOH)	4,0
Διχλωρομεθάνιο (DCM)	3,1
Μεθυλ-tert-βουτυλ-αιθέρας (MTBE)	2,5

Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν για κάθε παράμετρο που μελετήθηκε. Το γενικό πρωτόκολλο εκχύλισης των κυανοτοξινών είχε ως ακολούθως: Μικροποσότητα (mg) λυοφιλιωμένης βιομάζας ζυγίστηκε σε πλαστικό φιαλίδιο μικροφυγοκέντρησης Erpendorf 1,5 ml. Η εκχύλιση της βιομάζας πραγματοποιήθηκε με 1,5 ml διαλύτη εκχύλισης, ανάδευση με vortex, παραμονή για 15 min σε σύστημα επεξεργασία με υπερήχους και πάλι ανάδευση με vortex. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm, για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό. Η διαδικασία της εκχύλισης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Όλα τα εκχυλίσματα συλλέγονται μαζί και φιλτράρονται. 2,5 ml από το εκχύλισμα μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 1000 μl MeOH : H₂O (5:95 v/v) και παρέμειναν για 5 min σε λουτρό υπερήχων. Τα τελικά εκχυλίσματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη για την ανάλυση με το LC-ESI-MS/MS. Λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων των κυανοτοξινών στο δείγμα βιομάζας που μελετήθηκε, τα τελικά εκχυλίσματα αραιωνόταν 1:2 πριν την ανάλυσή τους στο σύστημα LC-ESI-MS/MS.

6.5 Μελέτη παρουσίας κυανοτοξινών σε λίμνες της Ελλάδας

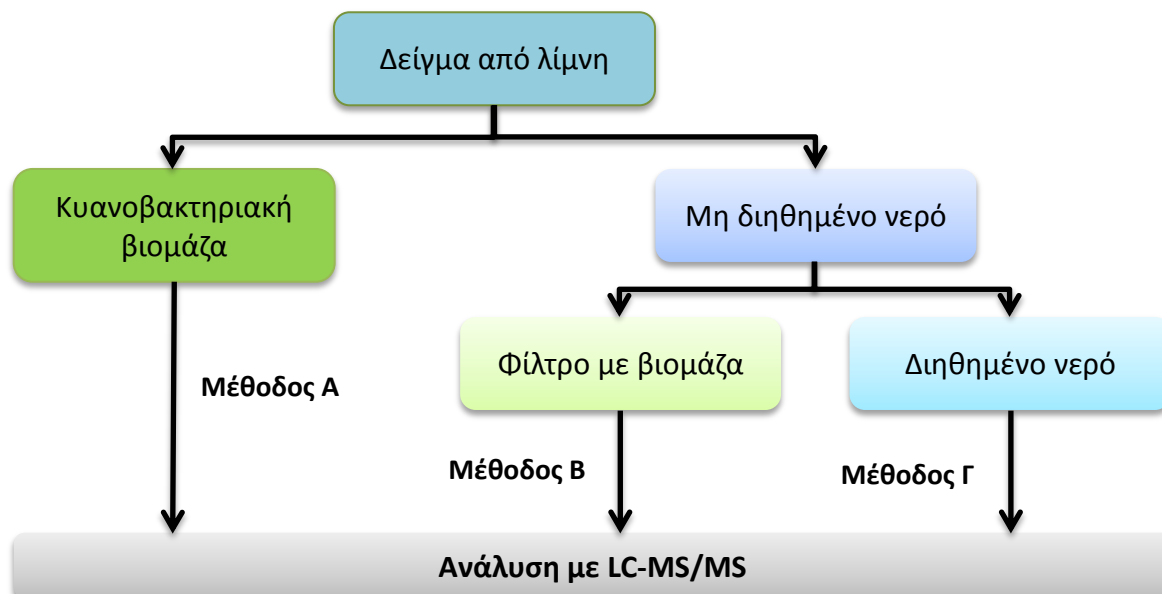
Στο πλαίσιο της μελέτης για την παρουσία κυανοτοξινών στην Ελλάδα, συλλέχθηκαν δείγματα από 14 διαφορετικές λίμνες και ταμιευτήρες πόσιμου νερού (Εικόνα 6.1) κατά την χρονικά περίοδο 2007-2016. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δείγματα από τις λίμνες Παμβώτιδα, Καστοριά (Ορεσιτιάδα), Μικρή Πρέσπα, Πετρών, Χειμαδίτιδα, Ζάζαρη, Βεγορίτιδα, Δοϊράνη, Κερκίνη, Βόλβη, Βιστωνίδα, Ισμαρίδα, Μαραθώνα και Τριχωνίδα. Η δειγματοληψία έγινε από υπεράκτια επιφανειακά σημεία με δειγματολήπτη 2L τύπου Niskin. Στην λίμνη Τριχωνίδα, εκτός από την επιφάνεια, έγινε δειγματοληψία και από μεγαλύτερο βάθος (23 - 40 m). Από την λίμνη της Καστοριάς συλλέχθηκαν επιπλέον επιφανειακά δείγματα από παράκτια σημεία, κατά την διάρκεια έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης το Σεπτέμβριο 2014, Οκτώβριο 2015 και Σεπτέμβριο 2016.

Για την ανάλυση των δειγμάτων αναπτύχθηκε ροή εργασίας (workflow), σχετικά με τον χειρισμό των δειγμάτων που περιελάμβανε τρεις μεθόδους ανάλυσης για τον προσδιορισμό των CYN, ANA, NOD και 12MCs: Α) σε λυοφιλοποιημένη κυανοβακτηριακή βιομάζα, Β) σε φίλτρα με κυανοβακτηριακή βιομάζα και Γ) σε διηθημένο νερό, καθώς ανάλογα με τον τύπο του αρχικού δείγματος προέκυπταν αυτά τα τρία διαφορετικά υποστρώματα. Η ροή εργασίας που αναπτύχθηκε (Σχήμα 6.2) αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τον χειρισμό των δειγμάτων νερού με κυανοβακτηριακή άνθιση και τον προσδιορισμό πολλών διαφορετικών κυανοτοξινών σε διαφορετικά υποστρώματα.



Εικόνα 6.1: Χάρτης της Ελλάδας όπου υποδεικνύονται οι λίμνες και οι ταμειυτήρες νερού που μελετήθηκαν για την παρουσία κυανοτοξινών: 1) Παμβώτιδα, 2) Καστοριά, 3) Μικρή Πρέσπα, 4) Πετρών, 5) Χειμαδίτιδα, 6) Ζάζαρη, 7) Βεγορίτιδα, 8) Δοϊράνη, 9) Κερκίνη, 10) Βόλβη, 11) Βιστωνίδα, 12) Ισμαρίδα, 13) Μαραθώνας, 14) Τριχωνίδα

Σύμφωνα με τη ροή εργασίας (Σχήμα 6.2), μετά την παραλαβή των δειγμάτων στο εργαστήριο, ακολουθούνται διαφορετικές διαδικασίες ανάλογα με τον τύπο του δείγματος. Στην περίπτωση που το δείγμα είχε έντονη κυανοβακτηριακή άνθιση με σχηματισμό στρώματος (scum), τα κυανοβακτηριακά κύτταρα (βιομάζα) συλλέχθηκαν με την βοήθεια γυάλινης πιπέτας pasteur. Η βιομάζα που είχε συλλεχτεί στη συνέχεια καταψύχθηκε (-25°C) και έπειτα μεταφέρθηκε σε συσκευή λυοφιλίωσης (Martin Christ ALPHA 1-2, Vacuubrand HV Pump), όπου εφαρμόστηκε κενό για 24h στους -51°C. Η λυοφιλοποιημένη βιομάζα που προέκυψε αναλύθηκε με την μέθοδο Α. Στην περίπτωση που τα δείγματα δεν είχαν κυανοβακτηριακή άνθιση με σχηματισμό στρώματος, διηθήθηκαν με φίλτρα Glass Fiber (GF/F) τα οποία είχαν ξηρανθεί και προ-ζυγιστεί. Στη συνέχεια τα φίλτρα αναλύθηκαν με τη μέθοδο Β. Τα διηθημένα δείγματα νερού φυλάχθηκαν στους 4°C και αναλύθηκαν για την παρουσία των εξωκυττάρων (extracellular) κυανοτοξινών με την μέθοδο Γ.



Σχήμα 6.2: Ροή εργασίας για τον προσδιορισμό ποικίλων κυανοτοξινών σε δείγμα νερού με κυανοβακτηριακή άνθιση

Η μέθοδος Α αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής για την εκχύλιση κυανοτοξινών από λυοφιλοποιημένη βιομάζα. Η αναλυτική πορεία της μεθόδου Α περιγράφεται στην § 10.1.7. Η μέθοδος Β που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των CYN, ANA, NOD και 12 MCs σε φίλτρα με κυανοβακτηριακή βιομάζα, αποτελεί μέθοδο που βασίστηκε στη μέθοδο ISO 20179:2005 [131] και βελτιστοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η επιτευχθείσα βελτιστοποίηση επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των κυανοτοξινών CYN, ANA, NOD και 12 MCs με την χρήση LC-MS/MS, σε αντίθεση με την ISO μέθοδο που αναφέρεται στον προσδιορισμό 3 MCs (MC-LR, MC-RR και MC-YR) με την χρήση HPLC-UV. Σύμφωνα με τη βελτιστοποιημένη μέθοδο, το κάθε φίλτρο με το δείγμα λυοφιλοποιήθηκε και ζυγίστηκε. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε σωλήνα Eppendorf, τύπου falcon, και προστέθηκαν 9 ml διαλύτη εκχύλισης, MeOH:H₂O 75:25 (v/v). Το δείγμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 15 min. Στην συνέχεια φυγοκεντρίθηκε στις 4000 rpm στους 20°C για 10 min και το υπερκείμενο υγρό φιλτραρίστηκε από φίλτρα Whatman PVDF 0.45μm. 3 ml από το φιλτραρισμένο υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκαν σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ελαφρύ ρεύμα αζώτου. Το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε με 500 μl διαλύματος MeOH:H₂O 5:95 (v/v), τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 5 min, αναδεύτηκε με vortex και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη για την ανάλυση στο LC-MS/MS. Η μέθοδος Γ επίσης αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής για την εκχύλιση των κυανοτοξινών από το νερό, όπου εφαρμόζεται για πρώτη φορά διάταξη διπλού φυσίγγιου SPE για τον συμπροσδιορισμό κυανοτοξινών που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες. Η αναλυτική πορεία της μεθόδου Γ παρατίθεται στην § 9.1.4.

Με την εφαρμογή της ροής εργασίας που αναπτύχθηκε μπορεί να προσδιορισθεί η συνολική συγκέντρωση των κυανοτοξινών στα ποικίλα υποστρώματα που προκύπτουν από ένα δείγμα επιφανειακού νερού με κυανοβακτηριακή άνθιση. Ειδικότερα με τις μεθόδους Α και Β μπορεί να προσδιορισθεί η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των κυανοτοξινών καθώς με την μέθοδο Γ μπορεί να προσδιορισθεί η εξωκυττάρια συγκέντρωσή τους. Η ροή εργασίας που αναπτύχθηκε αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τον αξιόπιστο προσδιορισμό της συγκέντρωσης ποικίλων κυανοτοξινών

από διαφορετικές κατηγορίες. Η ροή εργασίας, εφαρμόστηκε σε δείγματα από 14 λίμνες της Ελλάδας, όπου για πρώτη φορά ταυτοποιήθηκε αξιόπιστα η παρουσία ποικίλων κυανοτοξινών και προσδιορίστηκε η συνολική συγκέντρωσή τους (ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια).

Κεφάλαιο 7 : Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό

7.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων με LC-APCI-MS/MS

Κατά το πρώτο στάδιο της ανάπτυξης μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων σε νερό αναπτύχθηκε μέθοδος για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τους με την τεχνική LC-APCI-MS/MS. Αρχικά, έγινε απ' ευθείας έγχυση (infusion) μεμονωμένου πρότυπου διαλύματος της κάθε υπό μελέτη ένωσης συγκέντρωσης 10 mg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 50:50 v/v, στο MS με ταχύτητα ροής 10 μl/min για να βρεθούν τα πρόδρομα ιόντα των ενώσεων που σχηματίζονται με θετικό και αρνητικό ιοντισμό με την πηγή χημικού ιοντισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI). Στη συνέχεια, επιλέχθηκε για κάθε οργανικό ρύπο το πρόδρομο ιόν με την μεγαλύτερη ένταση στο MS φάσμα και θραυματοποιήθηκε στο 2^ο τετράπολο, παρουσία Αργού (1,5 mTorr). Με την βοήθεια αυτόματου προγράμματος λήφθηκαν οι καμπύλες θραυματοποίησης κάθε ένωσης και επιλέχθηκαν τα δύο (2) πιο ισχυρά θραύσματα τους. Η ανίχνευση των οργανικών ρύπων στο APCI-MS/MS, επιτεύχθηκε με τη μέθοδο σάρωσης πολλαπλών αντιδράσεων (multiple reaction monitoring, MRM) όπου γινόταν παρακολούθηση δύο μεταπτώσεων από το πρόδρομο σε θυγατρικό ιόν για κάθε ένωση.

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων αναπτύχθηκε μέθοδος με υδροχρωματογραφία (LC). Η κινητή φάση αποτελούταν από (Α) Νερό και (Β) ACN, η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 0,5 ml/min και ο όγκος ένεσης 20 μl για όλες τις δοκιμές. Για την επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού των αναλυτών δοκιμάστηκαν οι ακόλουθες τρεις στήλες υδροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως:

- Zorbax eclipse XDB-C18, 4.6 mm x 50 mm, 1.8 μm (Agilent, USA)
- Hypersil Gold, 2.1 x 100mm, 3μm (Thermo Electron Corporation)
- Atlantis dC18, 2.1 mm x 100 mm, 3 μm (Waters, Ireland)

Ποικίλα προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης εφαρμόστηκαν ώστε να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός των υπό μελέτη ενώσεων.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι το pH που διαλύτη που περιέχεται το δείγμα επηρεάζει σημαντικά την χρωματογραφία των Diclofenac και Pentachlorophenol. Για την μελέτη της επίδρασης αυτής, αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματος των 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 μg/L που περιέχονταν σε μίγμα ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v με 0%, 0,1% και 0,5% HCOOH.

Για την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες ιοντισμού παρουσία κινητής φάσης. Η βελτιστοποίηση, έγινε μονοπαραμετρικά, δηλαδή μελετιόνταν η επίδραση μίας παραμέτρου κάθε φορά. Για την μελέτη, έγιναν ενέσεις πρότυπου διαλύματος 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 μg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v (0,1% HCOOH) στο σύστημα LC-APCI-MS/MS όπου άλλαζαν διαδοχικά οι συνθήκες ιοντισμού. Οι τιμές των παραμέτρων ιοντισμού που μελετήθηκαν είναι οι ακόλουθες:

- Capillary temperature (°C): 200, 250, 300, 325, 350, 380
- Vaporizer temperature (°C): 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600
- Discharge current (V): 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

- Sheath gas (arbitrary units, a.u.) : 20, 25, 30, 35, 40, 45
- Auxiliary gas (arbitrary units, a.u.): 0, 3, 5, 7, 10, 15
- Θέση Probe: A, B, C, D

7.2 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό

Κατά την ανάπτυξη της SPE μεθόδου για τον προσδιορισμό 29 οργανικών ρύπων σε νερό, πραγματοποιήθηκαν ποικίλες δοκιμές για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών των πιο σημαντικών παραγόντων της SPE. Αρχικά μελετήθηκαν οι παράμετροι για την εύρεση του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη (100%) ανάκτηση των ενώσεων από το πληρωτικό υλικό καθώς και οι συνθήκες επανασύστασης του εκλούσματος. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι παράμετροι που σχετίζονται με τις συνθήκες του αρχικού δείγματος και το ποσοστό που επηρεάζουν την κατακράτηση των ενώσεων στο πληρωτικό υλικό κατά το πέρασμα του δείγματος από αυτό. Σε όλες τις δοκιμές για την ανάπτυξη της SPE μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα φυσιγγία Oasis HLB (200 mg, 6 cc).

Στις αρχικές δοκιμές για την εύρεση του βέλτιστου συστήματος έκλουσης, εκτιμήθηκε η εκλουστική ικανότητα έξι (6) οργανικών διαλυτών με διαφορετική πολικότητα, όπως παρατίθενται στον Πίνακα 7.1. Κατά τις δοκιμές, το φυσιγγίο Oasis HLB (200 mg, 6 cc) ενεργοποιήθηκε με 5 ml MeOH, 5 ml του υπό εξέταση διαλύτη και 5 ml H₂O. Στη συνέχεια, στο φυσιγγίο προστέθηκαν 500 ml προτύπου διαλύματος 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 µg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v και αφέθηκε για ξήρανση σε ρεύμα αέρα υπό κενό για 15 min. Η έκλουση έγινε με 5 ml του υπό μελέτη διαλύτη. Τα εκλούσματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 500 ml ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v (0,1% HCOOH) και αναλύθηκαν στο σύστημα LC-APCI-MS/MS. Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Πίνακας 7.1: Οργανικοί διαλύτες που μελετήθηκαν και οι δείκτες πολικότητάς τους (P')

Οργανικός διαλύτης	Δείκτης Πολικότητας (P') ^[322]
Μεθανόλη (MeOH)	5,1
Οξικός αιθυλεστέρας (EtAc)	4,4
Διχλωρομεθάνιο (DCM)	3,1
Μεθυλ-tert-βουτυλ-αιθέρας (MTBE)	2,5
Τολουόλιο	2,4
Εξάνιο	0,0

Για την συνέχεια της μελέτης επιλέχθηκαν οι οργανικοί διαλύτες MeOH, DCM και MTBE που απέδωσαν την καλύτερη ανάκτηση για το σύνολο των αναλυτών. Στη συνέχεια των πειραμάτων η ενεργοποίηση των φυσιγγίων Oasis HLB έγινε με διαδοχικό πέρασμα 5 ml DCM, 5 ml MTBE, 5 ml MeOH και 5 ml H₂O και το φυσιγγίο φορτώθηκε με 500 ml προτύπου διαλύματος 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 µg/L και αφέθηκε για ξήρανση σε ρεύμα αέρα υπό κενό για 15 min. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με δύο εκλουστικά συστήματα. Το εκλουστικό A που αποτελούσε μείγμα MeOH – MTBE παρουσία HCOOH και το εκλουστικό B που ήταν DCM. Η έκλουση κάθε φορά γινόταν με διαφορετικό όγκο για το κάθε εκλουστικό, καθώς μεταβλητή ήταν και η σύσταση του εκλουστικού A. Οι τιμές των παραμέτρων του εκλουστικού συστήματος που μελετήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 7.2. Σε όλες τις περιπτώσεις το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε

ρεύμα αζώτου και το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 500 μl ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v (0,1% HCOOH) και αναλύθηκε στο σύστημα LC-APCI-MS/MS.

Πίνακας 7.2: Οι παράμετροι της SPE μεθόδου και οι τιμές για τις οποίες μελετήθηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου

Υπό μελέτη παράμετρος		Τιμές παραμέτρου που μελετήθηκαν
Αρχικές συνθήκες δείγματος	Όγκος δείγματος	200, 400 & 500 ml
	pH δείγματος	5, 7, 9
	Παρουσία MeOH στο δείγμα	0, 2.5 & 5 ml
Εκλουστικό σύστημα	Ποσοστό MeOH στο εκλουστικό A	20, 40, 60 & 80%
	Ποσοστό HCOOH στο εκλουστικό A	0, 1.5, 3, 4.5 & 6%
	Όγκος εκλουστικού A (MeOH - MTBE)	3, 4 & 5 ml
	Όγκος εκλουστικού B (DCM)	2, 3, 4, 5 & 6 ml
Επανασύσταση εκλούσματος	Θερμοκρασία εξάτμισης εκλούσματος	25 & 40°C
	Ποσοστό ACN στο διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης	10, 20, 30, 40, 50 & 60%
	Ποσοστό HCOOH στο διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης	0, 0,1 & 0,5%

Επίσης, μελετήθηκαν οι συνθήκες επανασύστασης για να αποφευχθεί πιθανή απώλεια των αναλυτών κατά την διαδικασία αυτή. Για τις δοκιμές προστέθηκαν 500 μl προτύπου διαλύματος 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 μg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v και εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας κατά την εξάτμιση, όπου η εξάτμιση έγινε στους 40°C και σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και επανασύσταση έγινε σε 500 μl ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της σύστασης του διαλύτη, όπου στα πειράματα η επανασύσταση έγινε 500 μl διαλύτη ακετονιτρίλιο – νερό με ποικίλα ποσοστά ACN (οι τιμές παρατίθενται στον Πίνακα 7.2). Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, μελετήθηκε πως επηρεάζεται η χρωματογραφία από την παρουσία HCOOH (0%, 0,1% και 0,5%) στο διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης.

Τέλος, μελετήθηκε η επιρροή (1) του όγκου του αρχικού δείγματος, (2) του pH του και (3) της παρουσίας ποσοστού MeOH στο αρχικό δείγμα, στο ποσοστό των ανακτήσεων. Οι τιμές των παραμέτρων που μελετήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 7.2. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα υπερκάθαρου νερού εμβολιασμένα με 29 οργανικούς ρύπους σε συγκέντρωση 100 ng/L για κάθε οργανικό ρύπο. Η ενεργοποίηση των φυσιγγίων Oasis HLB έγινε με διαδοχικό πέρασμα 5 ml DCM, 5 ml MTBE, 5 ml MeOH και 5 ml H₂O. Μετά το πέρασμα του δείγματος τα φυσιγγία εκπλύθηκαν με 5ml H₂O και αφέθηκαν 15 min για ξήρανση σε ρεύμα αέρα υπό κενό. Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με το βέλτιστο εκλουστικό σύστημα. Το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v (0,1% HCOOH). Η προσυγκέντρωση ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 1:1000.

7.3 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό

Η επικύρωση της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων σε νερό με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία – συζευγμένη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) βασίστηκε στη διαδικασία επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων σύμφωνα με το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025. Κατά την επικύρωση διενεργήθηκαν σειρές πειραμάτων προκειμένου να εκτιμηθούν οι κυριότερες παράμετροι απόδοσής της μεθόδου. Συγκεκριμένα, εκτιμήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι απόδοσης:

7.3.1 Εκλεκτικότητα μεθόδου - παρεμποδίσεις

Για την εκτίμηση της εκλεκτικότητας της μεθόδου και τον εντοπισμό πιθανών παρεμποδίσεων αναλύθηκαν 3 δείγματα νερού. Τα δείγματα θεωρήθηκαν λευκά / τυφλά (blank) και δεν ήταν εμβολιασμένα με τους υπό προσδιορισμό οργανικούς ρύπους.

7.3.2 Γραμμικότητα – Εύρος μέτρησης

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους μέτρησης της μεθόδου αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα των 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 250 και 500 µg/L σε διαλύτη ακετονιτρίλιο-νερό 40:60 v/v (0,1% HCOOH). Από κάθε πρότυπο πραγματοποιήθηκαν τρεις (n=3) προσδιορισμοί στο σύστημα LC-APCI-MS/MS. Η πρότυπη καμπύλη για κάθε ένωση προέκυψε μετά από γραμμική συσχέτιση του εμβαδού της κορυφής (y) για κάθε συγκέντρωση οργανικού ρύπου και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων (x). Προσδιορίστηκε η κλίση (b) και η τέμνουσα (a) της ευθείας που προκύπτει για κάθε ένωση. Με βάση τα αποτελέσματα έγινε εκτίμηση της γραμμικότητας και υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) της ευθείας που προκύπτει.

7.3.3 Πιστότητα (precision) μεθόδου

Για την εκτίμηση της πιστότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα / ενισχυμένα (spiked) δείγματα νερού συγκέντρωσης 100 ng/L για κάθε υπό μελέτη οργανικό ρύπο. Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πέντε επαναλήψεις για τρεις διαφορετικές ημέρες (n=15). Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για κάθε αναλύτη με βάση τον τύπο 6.1. Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα των αναλύσεων και από τις τρεις ημέρες και υπολογίστηκε η διευρυμένη τυπική απόκλιση (SD pooled) με βάση τον τύπο 6.2. Με βάση το SD pooled υπολογίστηκε η διευρυμένη σχετική τυπική απόκλιση της επαναληψιμότητας (%RSD_r pooled). Η εκτίμηση της αναπαραγωγιμότητας έγινε από τα αποτελέσματα όλων των προσδιορισμών. Για τον υπολογισμό της σχετικής τυπικής απόκλισης της αναπαραγωγιμότητας (%RSD_R) υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση από τον τύπο 6.3.

7.3.4 Ακρίβεια (accuracy) μεθόδου

Η ακρίβεια της μεθόδου εξαρτάται από την ορθότητά (trueness) και την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Η ορθότητα της μεθόδου εκφρασμένη ως % ανάκτηση (% recovery, R) υπολογίστηκε με βάση τα αποτελέσματα από τα πειράματα εκτίμησης της πιστότητας της μεθόδου που πραγματοποιήθηκαν σε εμβολιασμένα δείγματα νερού συγκέντρωσης 100 ng/L/οργανικό ρύπο (πέντε επαναλήψεις για τρεις διαφορετικές ημέρες, n=15). Ο υπολογισμός της % ανάκτησης για κάθε αναλύτη έγινε με τον τύπο 6.4 και στη συνέχεια υπολογίστηκε η % μέση ανάκτηση.

7.3.5 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (LOD) υπολογίστηκαν από οκτώ αναλύσεις (n=8) προτύπου διαλύματος των υπό προσδιορισμό οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 10 µg/L με βάση τον τύπο 6.5 [321]. Τα όρια ποσοτικοποίησης της μεθόδου (LOQ) υπολογίστηκαν ως 3 x LOD.

7.3.6 Λόγοι έντασης θυγατρικών ιόντων

Οι λόγοι έντασης των θυγατρικών ιόντων των ουσιών που προσδιορίζονται υπολογίστηκαν με χρήση των δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση πρότυπου διαλύματος μίγματος των 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 µg/L σε διαλύτη ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v (0,1% HCOOH) σε διαφορετικές ημέρες (9 επαναλήψεις). Ο λόγος έντασης των ιόντων για κάθε ουσία υπολογίστηκε από τη διαίρεση της έντασης (εμβαδόν) της μετάπτωσης του πρόδρομου ιόντος στο ιόν ταυτοποίησης προς την ένταση (εμβαδόν) της μετάπτωσης του πρόδρομου ιόντος στο ιόν ποσοτικοποίησης. Επίσης, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση και για το λόγο ιόντων κάθε οργανικού ρύπου.

7.4 Εφαρμογή της μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων σε δείγματα νερού

Η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των οργανικών ρύπων σε 40 δείγματα πόσιμου νερού της Αττικής από τα διυλιστήρια της ΕΥΔΑΠ, 26 δείγματα επιφανειακού νερού (6 δείγματα από την τεχνητή λίμνη Μόρνο, 9 δείγματα από την τεχνητή λίμνη Μαραθώνα, 5 δείγματα από την λίμνη Υλίκη και 6 δείγματα από τον Εύηνο ποταμό) και 2 δείγματα από γεώτρηση. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά την χρονική περίοδο 02/06/2014 έως 01/12/2014.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 8 : Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών με την τεχνική LC-MS/MS

Η ανάπτυξη της μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό CYN, ANA, NOD, 12 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF), OA και DA με την τεχνική LC-ESI-MS/MS έγινε σε τρία στάδια. Αρχικά, βρέθηκαν οι κατάλληλες παράμετροι ανίχνευσης στο φασματογράφο μάζας (ESI-MS/MS). Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων με υδροχρωματογραφία (LC), όπου δοκιμάστηκαν ποικίλα προγράμματα βαθμιδωτής έκλυσης και διάφορες αναλυτικές στήλες χρωματογραφίας. Τέλος, έγιναν δοκιμές για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού παρουσία της κινητής φάσης.

8.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο σύστημα ESI-MS/MS

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου στο φασματογράφο μαζών (MS) χρησιμοποιήθηκε η πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) για τον ιοντισμό των υπό μελέτη τοξινών. Ως πηγή ιοντισμού επιλέχθηκε η ESI διότι είναι κατάλληλη για τον ιοντισμό μεγάλων μορίων, όπως είναι τα πεπτιδία (δηλαδή οι MCs και NOD) και οι πολυαιθέρες (δηλαδή το OA), αλλά και για τον ιοντισμό μικρότερων ενώσεων όπως τα αλκαλοειδή (δηλαδή οι CYN και ANA) και τα αμινοξέα (δηλαδή το DA).

Για την εύρεση των πρόδρομων ιόντων, των θραυσμάτων και των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μεμονωμένων ουσιών συγκέντρωσης 1 mg/L σε μεθανόλη-νερό 10:90 v/v (0,1% HCOOH). Αρχικά, έγινε απ' ευθείας έγχυση (infusion) στο σύστημα του MS των μεμονωμένων ουσιών με ταχύτητα ροής 20 μl/min για να επιλεγθούν τα πρόδρομα ιόντα των ενώσεων. Το [M+H]⁺ ήταν το βασικό ιόν στο MS φάσμα για τις CYN, ANA, DA, OA & NOD. Για τις MCs εκτός από το [M+H]⁺ υπήρχαν και άλλα ιόντα στο MS φάσμα, τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 8.1.

Πίνακας 8.1: Ιόντα των υπό μελέτη MCs στο MS φάσμα

	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+Na+H] ²⁺	[M+Na] ⁺
MC-RR	1038,7	519,9	-	-
[D-Asp3] MC-RR	1024,7	513,1	-	-
MC-WR	1068,5	534,0	546,0	-
MC-LR	995,3	-	509,5	-
[D-Asp3] MC-LR	981,4	-	502,5	-
MC-HilR	1009,4	-	516,4	-
MC-YR	1045,5	-	534,4	-
MC-HtyR	1059,5	-	541,9	-
MC-LA	910,5	-	-	932,3
MC-LF	986,5	-	-	1008,5
MC-LW	1025,2	-	-	1047,5
MC-LY	1002,5	-	-	1024,5

Αναλυτικά, σχεδόν σε όλες τις υπό μελέτη MCs το πρωτονιωμένο ιόν $[M+H]^+$ ήταν το βασικό ιόν στο MS φάσμα. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι MC-RR και $[D-Asp3]MC-RR$ όπου στο MS φάσμα τους, το βασικό ιόν ήταν το $[M+2H]^{2+}$, ενώ η ένταση του ιόντος $[M+H]^+$ ήταν 10 φορές χαμηλότερη. Στην περίπτωση που οι MCs περιέχουν αργινίνη στο μόριό τους, η πρωτονίωση λαμβάνει χώρα στο κομμάτι της αργινίνης [173]. Στην περίπτωση των MC-RR και $[DAsp3]MC-RR$ η πρωτονίωση ευνοείται σε δύο θέσεις καθώς περιέχουν στο μόριό τους δύο αργινίνες. Στην περίπτωση που οι MCs δεν περιέχουν αργινίνη στο μόριό τους, η πρωτονίωση γίνεται στη μεθόξυ ομάδα του Adda [139, 173, 323].

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασαν τα MS φάσματα των MCs καθώς παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μοτίβο στον ιοντισμό τους. Οι MCs που περιέχουν δύο αργινίνες στο μόριό τους (δηλ. MC-RR και $[DAsp3]MC-RR$) είχαν διπρωτονιωμένο βασικό ιόν. Διπρωτονιωμένο ιόν παρατηρήθηκε και στο φάσμα της MC-WR, που στο μόριό της έχει τα αμινοξέα αργινίνη και τρυπτόφανη. Όλες οι υπό μελέτη MCs που περιέχουν μια αργινίνη στο μόριό τους (δηλ. MC-LR, $[D-Asp3] MC-LR$, MC-HiLR, MC-YR, MC-HtyR και MC-WR) είχαν στο MS φάσμα τους εκτός από το πρωτονιωμένο ιόν $[M+H]^+$ και το διπλά φορτισμένο ιόν $[M+H+Na]^{2+}$, ενώ όλες οι υπό μελέτη MCs που δεν έχουν στο μόριό τους αργινίνη αλλά αλανίνη, εκτός από το $[M+H]^+$ ιόν είχαν στο MS φάσμα τους και το $[M+Na]^+$ ιόν. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί από τους Yuan *et al* [324]. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το Na^+ προστίθεται στη μεθόξυ ομάδα του Adda. Επομένως στην περίπτωση που υπάρχει αργινίνη στο μόριο της MC, τότε ευνοείται ο ιοντισμός της MC σε δύο διαφορετικά σημεία, ενώ όταν δεν περιέχεται αργινίνη στο μόριο της MC, τότε το Na^+ καταλαμβάνει τη θέση του H^+ .

Αφού επιλέχθηκε για κάθε τοξίνη το πρόδρομο ιόν με την μεγαλύτερη ένταση στο MS φάσμα και θραυσματοποιήθηκε στην κυψελίδα θραυσματοποίησης, παρουσία Αργού (1,5 mTorr), και με την βοήθεια αυτόματου λογισμικού, λήφθηκαν οι καμπύλες θραυσματοποίησης κάθε ένωσης και επιλέχθηκαν τα τρία (3) θυγατρικά ιόντα τους με την μεγαλύτερη ένταση και η αντίστοιχη βέλτιστη ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy). Η ανίχνευση των 17 τοξινών στο ESI-MS/MS, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (multiple reaction monitoring, MRM) όπου γινόταν παρακολούθηση τριών μεταπτώσεων από πρόδρομο σε θυγατρικό ιόν για κάθε ένωση. Στον Πίνακα 8.2 παρατίθενται οι μεταπτώσεις (από το πρόδρομο ιόν στα θυγατρικά ιόντα) που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση των ενώσεων στο σύστημα MS/MS, με τις βέλτιστες ενέργειες θραυσματοποίησης. Επίσης, παρατίθενται οι προτεινόμενες δομές των θυγατρικών ιόντων και οι σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές. Σε ορισμένες περιπτώσεις η δομή των θυγατρικών ιόντων προτείνεται για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη.

Με (*) υποδηλώνονται στον Πίνακα 8.2 τα θυγατρικά ιόντα που επιλέχθηκαν για την ποσοτικοποίηση. Η ποσοτικοποίηση των τοξινών που είχαν χαμηλή απόκριση πραγματοποιήθηκε με το άθροισμα των δύο θυγατρικών ιόντων που είχαν την μεγαλύτερη ένταση, ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου.

Πίνακας 8.2: Μελετώμενες μεταπτώσεις στο ESI-MS/MS σύστημα για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη κυανοτοξινών και φυκοτοξινών και οι προτεινόμενες δομές των θυγατρικών ιόντων

Ένωση	Πρόδρομο Ιόν (m/z)	Θυγατρικά Ιόντα (m/z)	Ενέργεια Θραυσματο- ποίησης (eV)	Προτεινόμενη δομή Θραύσματος	Βιβλ.
CYN	416.1 [M+H] ⁺	176.2	36	[M-C ₅ H ₅ N ₂ O ₃ -SO ₃ -H ₂ O] ⁺	[137]
		194.2*	36	[M-C ₅ H ₅ N ₂ O ₃ -SO ₃] ⁺	[137]
		336.2	20	[M+H-SO ₃] ⁺	[137]
ANA	166.1 [M+H] ⁺	91.0	21	[C ₇ H ₇] ⁺	[325]
		131.1	16	[M+H-NH ₃ -H ₂ O] ⁺	[137]
		149.1*	13	[M+H-NH ₃] ⁺	[137]
DA	312.1 [M+H] ⁺	161.2	22	[(COOH) ₂ C ₄ H ₇ NH ₂] ⁺	[326]
		248.2	16	[M+H-H ₂ O-HCOOH] ⁺	[327]
		266.2*	15	[M+H-HCOOH] ⁺	[327]
[D-Asp3]MC-RR	512.9 [M+2H] ²⁺	103.0	44	-	A
		127.1	40	-	A
		135.1*	29	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[328]
MC-RR	519.9 [M+2H] ²⁺	104.9	39	[PhCH ₂ CH ₂] ⁺	B
		127.1	38	-	A
		135.1*	26	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[328]
NOD	825.3 [M+H] ⁺	134.9*	49	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[329]
		227.0	46	[Glu-Mdha+H] ⁺	[329]
		781.1	29	[M+H-NH ₂ -CO] ⁺	[329]
MC-YR	1045.2 [M+H] ⁺	135.1*	63	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[328]
		213.0*	62	[Glu-Mdha+H] ⁺	[328]
		375.1	52	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	[330]
MC-HtyR	1059.5 [M+H] ⁺	134.9*	67	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[328]
		213.0*	57	[Glu-Mdha+H] ⁺	[328]
		374.9	50	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	[330]
[D-Asp3] MC-LR	981.6 [M+H] ⁺	135.2*	60	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[328]
		213.1*	50	[Glu-Mdha+H] ⁺	[328]
		375.2	52	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	[330]
MC-LR	995.5 [M+H] ⁺	104.6	73	[PhCH ₂ CH ₂] ⁺	B
		135.1*	62	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[328]
		213.0*	54	[Glu-Mdha+H] ⁺	[328]
MC-HiLR	1009.6 [M+H] ⁺	135.0*	62	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[328]
		213.3*	63	[Glu-Mdha+H] ⁺	[328]
		599.5	46	[Arg-Adda-Glu+H] ⁺	Γ
MC-WR	1068.5 [M+H] ⁺	135.0*	53	[PhCH ₂ CH(OMe)] ⁺	[328]
		213.0*	56	[Glu-Mdha+H] ⁺	[328]
		599.2	49	[Arg-Adda-Glu+H] ⁺	Γ

MC-LA	910.4 [M+H] ⁺	375.2	29	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	[323]
		402.2	24	[Ala-X-MeAsp-Z+2H] ⁺	[323]
		776.4*	19	[M+H-135] ⁺	[323]
MC-LY	1002.4 [M+H] ⁺	264.9	46	-	A
		494.2*	28	[Ala-X-MeAsp-Z+2H] ⁺	Γ
		868.2*	19	[M+H-135] ⁺	Γ
MC-LW	1025.4 [M+H] ⁺	375.1	34	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	[331]
		446.1*	32	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha-Ala] ⁺	[331]
		517.2	24	[Ala-X-MeAsp-Z+2H] ⁺	Γ
MC-LF	986.2 [M+H] ⁺	375.1	28	[C ₁₁ H ₁₅ O-Glu-Mdha] ⁺	[331]
		478.2*	23	[Ala-X-MeAsp-Z+2H] ⁺	Γ
		852.5*	21	[M+H-135] ⁺	Γ
OA	805.5 [M+H] ⁺	733.6	21	[M+H-4H ₂ O] ⁺	[332]
		751.8	13	[M+H-3H ₂ O] ⁺	[332]
		769.8*	13	[M+H-2H ₂ O] ⁺	[332]

* Ιόν / ιόντα ποσοτικοποίησης

A: Η δομή του θυγατρικού ιόντος δεν έχει προσδιορισθεί.

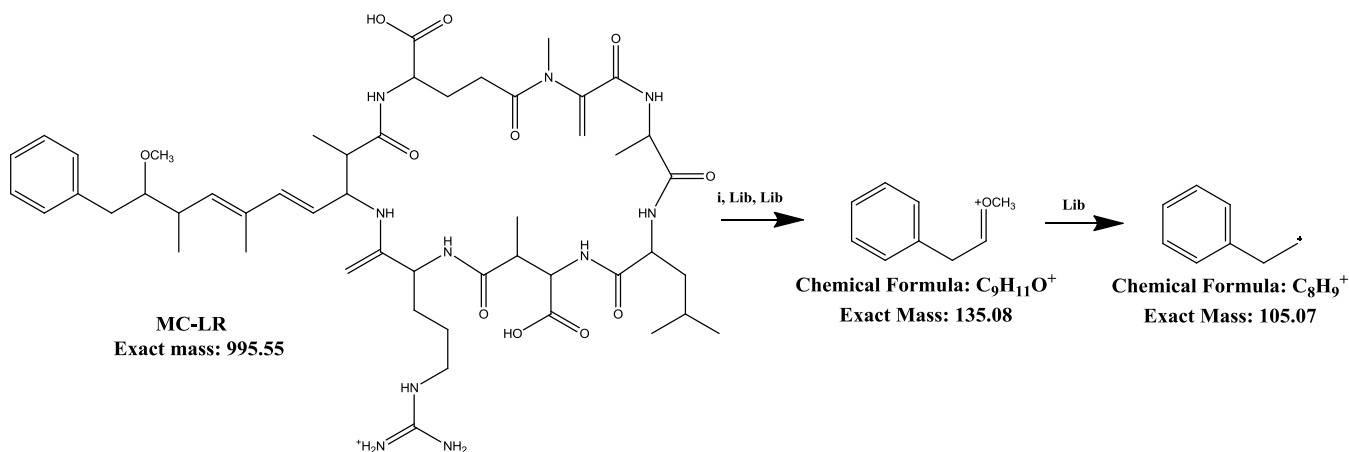
B: Η δομή του θυγατρικού ιόντος προτείνεται στην παρούσα μελέτη με τον μηχανισμό θραυσματοποίησης.

Γ: Η δομή του θυγατρικού ιόντος προτείνεται με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και τα δεδομένα της βιβλιογραφίας.

Οι MCs που περιέχουν τουλάχιστον μία αργινίνη στο μόριο τους (π.χ. MC-LR) έχουν στο MS/MS φάσμα τους ως βασικά ιόντα τα m/z 135 και m/z 213, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα των MCs [328]. Το θυγατρικό ιόν m/z 135 αντιστοιχεί στο [PhCH₂CH(OMe)]⁺ (γνωστό ως θραύσμα Adda), που προκύπτει από διάσπαση της μεθόξυ ομάδας του Adda [323, 328]. Το θυγατρικό ιόν m/z 213 είναι αποτέλεσμα της θραυσματοποίησης του μορίου και αποδίδεται σε κομμάτι που περιέχει δύο αμινοξέα [Glu-Mdha+H]⁺ [328]. Ένα άλλο χαρακτηριστικό θραύσμα των MCs είναι το m/z 375, το οποίο αποδίδεται στο [C₁₁H₁₅O-Glu-Mdha]⁺ και αποτελείται από μέρος του αμινοξέος Adda μαζί με τα δύο διαδοχικά αμινοξέα [323, 330].

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι MCs που έχουν λευκίνη στο μόριο τους αλλά δεν έχουν αργινίνη (δηλ. MC-LA, MC-LW, MC-LY και MC-LF) είχαν στο MS/MS φάσμα τους ως ένα από τα ιόντα με την μεγαλύτερη ένταση το m/z [M+H - 508]⁺. Στην περίπτωση της MC-LA το ιόν αυτό αντιστοιχεί στο m/z 402 το οποίο έχει αποδοθεί στο [Ala-X-MeAsp-Z-NH₂+2H]⁺ [323]. Κατά αντιστοιχία, το ιόν m/z [M+H - 508]⁺ μπορεί να αποδοθεί στο [Ala-X-MeAsp-Z-NH₂+2H]⁺ και για τις MC-LW, MC-LY και MC-LF. Επίσης, για τις MC-LY και MC-LF παρατηρήθηκαν τα m/z 868 και m/z 852, αντίστοιχα, τα οποία με βάση τα δεδομένα της βιβλιογραφίας προκύπτουν από την απόσπαση του θραύσματος Adda και μπορούν να αποδοθούν ως [M+H-135]⁺ [323, 328]. Ένα άλλο θραύσμα που παρατηρήθηκε είναι το m/z 599 που ήταν ανάμεσα σε αυτά με την μεγαλύτερη ένταση στο MS/MS φάσμα των MC-HiIR και MC-WR. Για τις MC-RR, MC-YR και MC-LR που έχουν αργινίνη στην θέση Z του μορίου τους το θυγατρικό ιόν m/z 599 έχει αποδοθεί στο θραύσμα [Arg-Adda-Glu+H]⁺ [323]. Το ίδιο θραύσμα μπορεί να αποδοθεί και στην περίπτωση των MC-HiIR και MC-WR καθώς κι αυτές περιέχουν αργινίνη στην θέση Z του μορίου τους.

Στο φάσμα θραυσματοποίησης των MC-LR και MC-RR παρατηρήθηκε το ιόν m/z 105. Η δομή του που αποδίδεται στο $[\text{PhCH}_2\text{CH}_2]^+$ προτείνεται για πρώτη φορά στην παρούσα μελέτη. Ο προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης και η δομή του θυγατρικού ιόντος m/z 105 για την MC-LR, όπως αυτά προέκυψαν με την χρήση του προγράμματος Mass-Frontier 3.0, παρατίθενται στο Σχήμα 8.1. Κατά αντίστοιχο τρόπο σχηματίζεται το θυγατρικό ιόν m/z 105 και από την MC-RR, αφού αποτελεί κομμάτι του χαρακτηριστικού αμινοξέος Adda και προκύπτει από περαιτέρω θραυσματοποίηση του ιόντος m/z 135.



Σχήμα 8.1: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού του θυγατρικού ιόντος m/z 105 της MC-LR με τη χρήση του προγράμματος Mass-Frontier 3.0

Η NOD που έχει παρόμοια δομή με τις MCs, σχηματίζει το πρόδρομο ιόν $[\text{M}+\text{H}]^+$ λόγω πρωτονίωσης στο κομμάτι της αργινίνης. Το θυγατρικό ιόν με την μεγαλύτερη ένταση ήταν το m/z 135 το οποίο και σε αυτή την περίπτωση αποδόθηκε στο $[\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{OMe})]^+$ που είναι κομμάτι του Adda. Τα θυγατρικά ιόντα m/z 227 και m/z 781 έχουν αποδοθεί στα θραύσματα $[\text{Glu-Mdhb}+\text{H}]^+$ και $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_2-\text{CO}]^+$, αντίστοιχα [329].

Η CYN παρουσίασε στο MS/MS φάσμα της τα χαρακτηριστικά για την ένωση θυγατρικά ιόντα m/z 194 και m/z 176. Το θραύσμα m/z 194 έχει αποδοθεί στην απώλεια του κομματιού [6-(2-υδροξυ-4-οξο-3-υδροπυριμιδyl)υδροξυμεθυλ] ακολουθούμενο από την απώλεια τριοξειδίου του θείου (SO_3), ενώ το m/z 176 προκύπτει από την περαιτέρω απώλεια (H_2O). Το θυγατρικό ιόν m/z 336 αποδόθηκε στην απώλεια του τριοξειδίου του θείου (SO_3) [137, 333].

Η ANA είχε ως βασικό ιόν στο MS/MS φάσμα το m/z 149 το οποίο προκύπτει από την απώλεια αμμωνίας (NH_3) από το πρόδρομο ιόν [137]. Το θυγατρικό ιόν m/z 131 προκύπτει από την περαιτέρω απώλεια νερού (H_2O) και αποδίδεται ως $[\text{M}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ [137]. Το τρίτο θραύσμα της ANA, το m/z 91 προκύπτει από την απόσπαση ομάδων από το μητρικό μόριο, σχηματίζοντας ένα τροπύλιο (κυκλοεπτατριενύλιο), $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$ [325].

Το βασικό ιόν στο MS/MS φάσμα της θαλάσσια φυκοτοξίνης DA, το m/z 266, προκύπτει είτε από την απώλεια ενός νερού (H_2O) και ενός καρβονυλίου (CO) που αποδίδεται ως $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$ ή από την απώλεια ενός μυρμηγκικού οξέος (HCOOH) δηλαδή $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+$ [326, 327]. Το θραύσμα m/z 248 προκύπτει από την περαιτέρω απώλεια νερού (H_2O) από το θραύσμα m/z 266 σχηματίζοντας το ιόν

$[M+H-H_2O-HCOOH]^+$ [327]. Το θυγατρικό ιόν m/z 161 αποδόθηκε ως $[(COOH)_2C_4H_7NH_2]^+$, το οποίο πιθανότατα σχηματίζεται από το άνοιγμα του δακτυλίου της προλίνης, αναδιάταξη των υδρογόνων και απόσπαση της πλευρική αλυσίδα μαζί με έναν επιπλέον άνθρακα [326].

Στην περίπτωση του OA το m/z 770, που προκύπτει από την απώλεια δύο μορίων νερού από το πρόδρομο ιόν, ήταν το βασικό ιόν στο MS/MS φάσμα του. Τα άλλα δύο ιόντα που παρατηρήθηκαν με την υψηλότερη ένταση στο MS/MS φάσμα, προκύπτουν επίσης από διαδοχικές απώλειες μορίων νερού [332].

8.2 Ανάπτυξη μεθόδου χρωματογραφικού διαχωρισμού κυανοτοξινών

Για τον διαχωρισμό των υπό μελέτη τοξινών αναπτύχθηκε κατάλληλη μέθοδος υγροχρωματογραφίας (LC) με βαθμιδωτή έκλυση. Με στόχο τον βέλτιστο διαχωρισμό των αναλυτών ελέχθησαν τέσσερις στήλες υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως: 1) Atlantis T3 (2.1 mm x 100 mm, 3 μ m), 2) Atlantis dC18 (2.1 mm x 100 mm, 3 μ m), 3) Zorbax eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 50 mm, 1.8 μ m) και 4) Poroshell 120 EC-C18 (2.1 mm x 100 mm, 2.7 μ m) με την εφαρμογή ποικίλων προγραμμάτων βαθμιδωτής έκλυσης.

Με τις στήλες Zorbax eclipse XDB-C18 και Atlantis dC18 επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός για τους περισσότερους αναλύτες, όμως παρατηρήθηκε σχετικά μεγάλο εύρος κορυφών. Η στήλη Poroshell 120 EC-C18 κατά τις δοκιμές παρουσίασε υψηλή πίεση με συνέπεια να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες ταχύτητες ροής και να αυξάνεται ο χρόνος ανάλυσης. Με την στήλη Atlantis T3 επιτεύχθηκε ο βέλτιστος χρωματογραφικός διαχωρισμός για όλες τις υπό μελέτη τοξίνες παρέχοντας συμμετρικές και οξείες κορυφές. Επίσης επιτεύχθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ των ενώσεων [D-Asp3]MC-RR / MC-RR και των ενώσεων [D-Asp3]MC-LR / MC-LR καθώς η διαχωριστικότητα (Resolution, R_s) για τα ζεύγη των κορυφών ήταν 3,5 και 1,2, αντίστοιχα. Η ικανότητα της Atlantis T3 να είναι συμβατή με υψηλό ποσοστό νερού στην κινητή φάση (95% νερό) βοηθάει στην κατακράτηση και τον διαχωρισμό των πολικών ενώσεων, όπως οι CYN και ANA [119, 136, 139, 140]. Η Atlantis T3 είναι ανθεκτική στις συνθήκες που εφαρμόζονται για τον διαχωρισμό των τοξινών, που έχουν ποικίλες πολικότητες, λόγω της χημείας του πληρωτικού υλικού της. Για όλους του παραπάνω λόγους η Atlantis T3 επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη στήλη.

Ο βέλτιστος διαχωρισμός στην στήλη Atlantis T3 επιτεύχθηκε με την κινητή φάση (A) Νερό (0,5% HCOOH) και (B) ACN (0,5% HCOOH) με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης. Το HCOOH χρησιμοποιήθηκε στην κινητή φάση ως πρωτονιοδότης, καθώς η χρήση οξυνοσιμένης κινητής φάσης προάγει την πρωτονίωση του καρβοξυλικού οξέος του Adda στα μόρια των MCs και NOD και ενισχύει την κατακράτησή τους στις C18 στήλες [144]. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης ξεκινούσε από 95% A – 5% B και κατέληγε σε 10% A – 90% B (Πίνακας 8.3). Μετά το τέλος του προγράμματος στα 32 min το σύστημα επέστρεφε στις αρχικές συνθήκες για 10 min για εξισορρόπηση. Η ταχύτητα ροής ήταν 0,2 ml/ml, ο όγκος ένεσης ήταν 20 μ l και η στήλη είχε σταθερή θερμοκρασία στους 30°C.

Πίνακας 8.3: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για τον διαχωρισμό των κυανοτοξινών

Χρόνος (min)	Ταχύτητα ροής (ml/min)	% Ακετονιτρίλιο (0,5% HCOOH)	% Νερό (0,5% HCOOH)
0	0,2	5	95
3	0,2	5	95
4	0,2	20	80
6	0,2	20	80
7	0,2	35	65
14	0,2	35	65
28	0,2	70	30
29	0,2	90	10
32	0,2	90	10
33	0,2	5	5
43	0,2	5	5

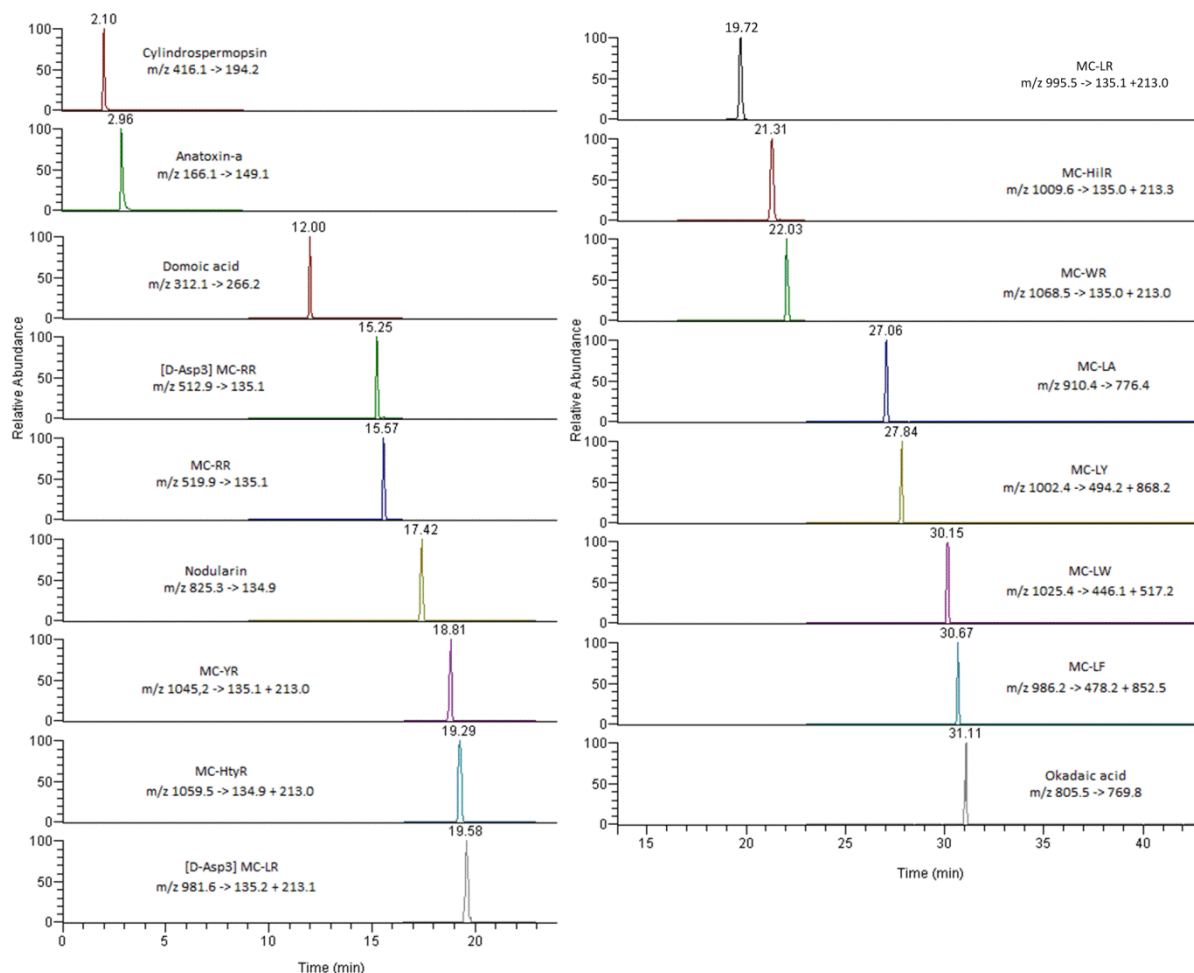
Μια άλλη παράμετρος που παρατηρήθηκε ότι επηρεάζει σημαντικά την κατακράτηση και τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των CYN και ANA, είναι η σύσταση του διαλύτη που περιέχεται το δείγμα. Από τα πειράματα που έγιναν παρατηρήθηκε ότι η παρουσία MeOH σε ποσοστό μεγαλύτερο από 8% στο διαλύτη του δείγματος έχει ως αποτέλεσμα την μερική έκλουση των πολικών ενώσεων CYN και ANA στο νεκρό όγκο του συστήματος. Για το λόγω αυτό η σύσταση του διαλύτη του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα H₂O:MeOH (95:5, v/v) ή 100% H₂O.

8.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών ιοντισμού των κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο σύστημα LC-ESI-MS/MS

Με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών ιοντισμού παρουσία κινητής φάσης. Κατά τα πειράματα βελτιστοποίησης, πραγματοποιήθηκαν εγχύσεις πρότυπου διαλύματος 17 τοξινών συγκέντρωσης 100 µg/L στο σύστημα LC-ESI-MS/MS όπου άλλαζαν διαδοχικά οι συνθήκες ιοντισμού. Ο ιοντισμός ήταν θετικός και οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων που μελετήθηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- Spray Voltage: 4250 V
- Ion transfer capillary temperature: 325°C
- Sheath gas pressure (N₂): 30 A.U. (arbitrary units)
- Auxilliary gas: 5 A.U.
- Θέση probe: C
- Collision gas pressure (argon): (1.5 mTorr)
- Q1 peak width: 0.7 Full Width Half Maximum (FWHM)
- Q2 peak width: 0.7 Full Width Half Maximum (FWHM)
- MRM (Multiple Reaction Monitoring) – Πίνακας 8.2

Στο Σχήμα 8.2 παρατίθενται τα MRM χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος των 15 κυανοτοξινών, του DA και OA, με την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών χρωματογραφικής ανάλυσης, ιοντισμού και ανίχνευσης, όπως αυτές προέκυψαν από την μελέτη ανάπτυξης της μεθόδου στο σύστημα LC-ESI-MS/MS.



Σχήμα 8.2: MRM χρωματογράφημα με τα ιόντα ποσοτικοποίησης, πρότυπου διαλύματος 15 κυανοτοξινών, DA και OA σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 µg/L

Η προτεινόμενη μέθοδος που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση των υπό μελέτη τοξινών είναι πολύ εκλεκτική καθώς παρέχει αξιόπιστη ταυτοποίηση που βασίζεται: 1) στον χρόνο ανάκτησης των ενώσεων (t_R , retention time), 2) στη μελέτη τριών χαρακτηριστικών μεταπτώσεων από το πρόδρομο σε θυγατρικό ιόν και 3) από τον υπολογισμό δύο λόγων ιόντων. Συνεπώς η προτεινόμενη μέθοδος επιτυγχάνει 5,5 μονάδες ταυτοποίησης (identification points, IPs) πληρώνοντας τα αυστηρότερα κριτήρια που ορίζονται από τις Ευρωπαϊκές οδηγίες σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων [334].

Κεφάλαιο 9 : Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό

9.1 Ανάπτυξη εκχύλισης στερεάς φάσης

Κατά την ανάπτυξη της SPE μεθόδου για την προσυγκέντρωση των CYN, ANA, NOD, 12 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR,[D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF), OA και DA και την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων μήτρας του δείγματος, μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν διάφορες παράμετροι. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν α) το αρχικό pH του δείγματος, β) η σειρά σύνδεσης των φυσιγγίων κατά τα στάδια της ενεργοποίησης και έκλουσης, γ) η σύσταση του διαλύτη έκλουσης, δ) ο όγκος του διαλύτη έκλουσης, ε) η σύσταση του διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης και στ) ο χρόνος παραμονής του τελικού εκχυλίσματος σε λουτρό υπερήχων. Στόχος της αυτής της μελέτης ήταν η αποτελεσματική εκχύλιση των αναλυτών με μια απλή και γρήγορη μέθοδο. Λόγο των διαφορετικών χημικών δομών, των ποικίλων φυσικοχημικών ιδιοτήτων και της ευρείας πολικότητας των υπό μελέτη τοξινών ήταν απαραίτητη η χρήση δύο διαφορετικών προσροφητικών υλικών SPE για την κατακράτησή τους. Τα φυσίγγια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη τη μεθόδου ήταν τα Oasis HLB και τα HyperSep Hypercarb PGC τα οποία μελετήθηκαν αρχικά μεμονωμένα και στην συνέχεια ενώθηκαν σε διάταξη διπλού φυσιγγίου.

9.1.1 Μελέτη μεμονωμένων φυσιγγίων SPE

Αρχικά μελετήθηκαν ξεχωριστά τα φυσίγγια Oasis HLB και HyperSep Hypercarb PGC για την ικανότητά τους να κατακρατήσουν όλες τις υπό μελέτη τοξίνες ταυτόχρονα. Έχει διαπιστωθεί ότι για την επαρκή κατακράτηση και ανάκτηση της ANA (πολύ πολικό αλκαλοειδές με pK_a 9,6) στα φυσίγγια HyperSep PGC απαιτείται ρύθμιση του pH του αρχικού διαλύματος. Το pH πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 10,5 ώστε να μην είναι φορτισμένη η αμινομάδα στο μόριο της ANA επιτρέποντας την κατακράτηση της στο προσροφητικό υλικό [145]. Από την άλλη, σε προηγούμενες μελέτες η κατακράτηση των MCs και NOD έχει επιτευχθεί με καλές ανακτήσεις σε ουδέτερο pH [172, 173].

Δεδομένου ότι απαιτείται ρύθμιση του pH >10,5 του αρχικού διαλύματος για την κατακράτηση της ANA, έγιναν συγκριτικές δοκιμές και με τα δύο είδη πληρωτικών υλικών σε ουδέτερο pH και σε pH 11. Οι ανακτήσεις από τις δοκιμές παρατίθενται στον Πίνακα 9.1. Από τα αποτελέσματα των δοκιμών προκύπτει ότι με τα φυσίγγια Oasis HLB οι ανακτήσεις των MCs και NOD σε pH 11 (με διαλύτη έκλουσης MeOH με 0,1% HCOOH και διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης 95:5 v/v H₂O:MeOH) κυμάνθηκαν από 41,4% έως 108,5% που ήταν σχετικά υψηλότερες σε σύγκριση με αυτές που παρατηρήθηκαν στο ουδέτερο pH (32,9% - 94,0%). Κάτω από αυτές τις συνθήκες κατακρατείται επαρκώς και το OA από τα Oasis HLB (ανάκτηση 80,7%) ενώ οι CYN και DA διέρχονται από το πληρωτικό υλικό χωρίς να κατακρατούνται. Επίσης, η ANA κατακρατείται μερικώς από τα Oasis HLB με ανάκτηση 52,6%. Η ίδια δοκιμή πραγματοποιήθηκε και με τα φυσίγγια Hypersep PGC. Με διαλύτη έκλουσης MeOH με 0,1% HCOOH η ανάκτηση της ANA ήταν 41,3%, ενώ η ανάκτηση της CYN ήταν μηδενική. Με την χρήση καταλληλότερου διαλύτη έκλουσης (DCM:MeOH με 0,5% HCOOH) επιτεύχθηκαν καλύτερες ανακτήσεις για τις CYN (87,0%), ANA (60.1%) και DA (78.6%). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε το pH του αρχικού δείγματος να είναι 11 για την συνέχεια των πειραμάτων.

Πίνακας 9.1: Αποτελέσματα μελέτης μεμονωμένων φυσιγγίων SPE –
% Ανακτήσεις σε διαφορετικό pH αρχικού διαλύματος και με διαφορετικούς διαλύτες έκλουσης

Διαλύτης έκλουσης	CYN	ANA	DA	[D-Asp3] MC-RR	MC-RR	NOD	MC-YR	MC-HtyR	[D-Asp3] MC-LR	MC-LR	MC-HiLR	MC-WR	MC-LA	MC-LY	MC-LW	MC-LF	OA
Oasis HLB φυσίγγιο – Ουδέτερο pH																	
10mL MeOH (0.1% HCOOH)	0.5	7.3	0.0	74.8	79.7	91.0	82.0	87.8	87.1	94.0	72.5	54.9	86.3	65.1	33.5	32.9	92.3
Oasis HLB φυσίγγιο – pH 11																	
10mL MeOH (0.1% HCOOH)	0.0	52.6	0.0	77.1	91.6	105.8	100.8	84.8	95.4	84.0	108.5	53.2	94.1	95.7	41.4	45.6	80.7
10mL MeOH (0.5% HCOOH)	0.3	38.4	0.0	81.3	93.3	76.1	107.8	96.6	90.4	106.7	70.9	51.7	112.9	89.3	83.7	98.4	65.8
10mL MeOH (1% HCOOH)	0.3	70.0	0.9	49.8	64.5	76.9	81.8	104.7	77.4	104.8	66.0	47.0	126.6	104.6	58.0	73.4	63.6
10mL MeOH (2% HCOOH)	0.5	63.0	0.0	47.3	66.7	87.8	74.4	72.2	81.7	103.1	66.0	11.9	149.5	91.7	22.3	68.7	116.3
10mL MeOH (5% HCOOH)	0.3	49.1	0.0	43.4	58.2	74.1	56.5	63.1	59.4	72.9	66.1	13.4	91.2	58.5	12.3	33.6	82.5
Hypersep PGC φυσίγγιο – pH 11																	
10ml MeOH (0.1% HCOOH)	0.5	41.3	M.Δ. ¹	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	M.Δ.
10mL 40:60 DCM:MeOH (0.5% HCOOH)	87.0	60.1	78.6	44.0	58.8	84.7	38.1	21.8	32.8	40.2	14.5	6.8	0.0	0.0	0.0	0.0	28.9

¹ M.Δ.: Μη διαθέσιμα δεδομένα

Με στόχο την βελτιστοποίηση της ανάκτησης των MC-WR, MC-LW και MC-LF από τα Oasis HLB, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικούς μεθανολικούς διαλύτες έκλουσης όπου αυξανόταν το ποσοστό του HCOOH (0,1, 0,5, 1, 2 και 5%). Ο διαλύτης επαναδιαλυτοποίησης ήταν 95:5 (v/v) H₂O:MeOH. Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 9.1) προκύπτει ότι οι βέλτιστες ανακτήσεις για τις περισσότερες τοξίνες από τα Oasis HLB επιτεύχθηκε με το εκλουστικό μεθανόλης με 0,5% HCOOH. Οι ανακτήσεις των MC-LW και MC-LF βελτιώθηκαν σημαντικά από 41,4% και 45,6% (MeOH με 0,1% HCOOH) σε 83,7% και 98,4%, αντίστοιχα. Οι ανακτήσεις της MC-WR ήταν παρόμοιες όταν το ποσοστό του HCOOH ήταν 0,1%, 0,5% και 1%. Γενικότερα, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του ποσοστού του HCOOH σε τιμές μεγαλύτερες από 0,5% είχε αρνητική επίδραση στις ανακτήσεις όλων των υπό μελέτη τοξινών.

Από τις δοκιμές που έγιναν με τα Hypersep PGC, παρατηρήθηκε ότι με τη χρήση του εκλουστικού MeOH με 0,1% HCOOH η ανάκτηση για την ANA ήταν μέτρια (41,3%) ενώ οι ανακτήσεις για την CYN και τα ολιγοπεπτίδια ήταν μηδενικές. Με την προσθήκη DMC στον διαλύτη έκλουσης (DCM:MeOH με 0,5% HCOOH) βελτιώθηκαν σημαντικά οι ανακτήσεις των CYN (87,0%), ANA (60.1%), DA (78.6%) και NOD (84,7%). Οι ανακτήσεις των MCs είχαν ως μέγιστο το 58,8% για την MC-RR ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάκτηση για 4 MCs (MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF). Χαμηλή ήταν και η ανάκτηση του OA (28,9%).

Από την συνολική αξιολόγηση της χρήσης των μεμονωμένων φυσιγγίων Oasis HLB και Hypersep PGC προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

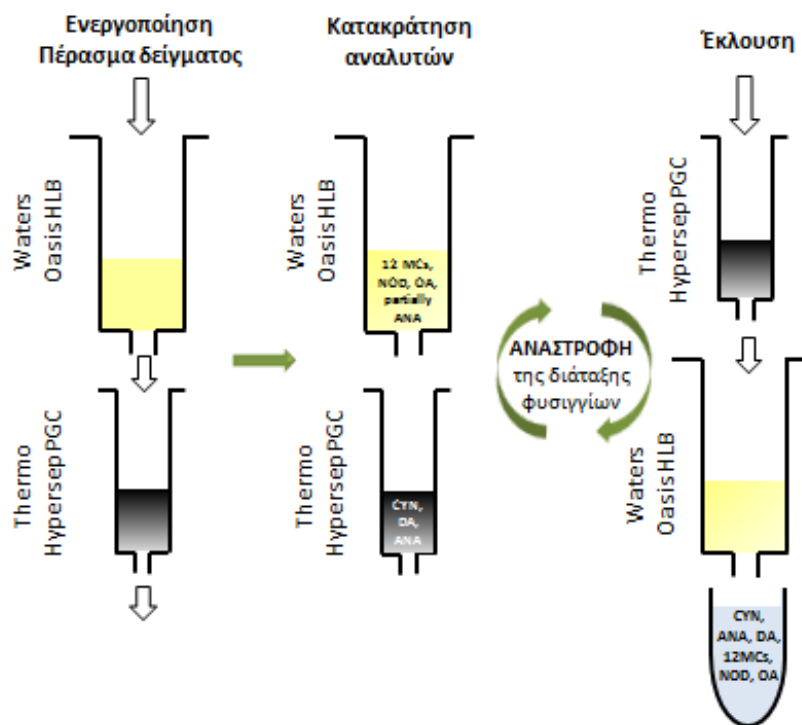
- Απαιτείται ρύθμιση του pH του αρχικού διαλύματος σε τιμή 11.
- Οι MCs, NOD και OA κατακρατούνται κυρίως από τα Oasis HLB και η βέλτιστη ανάκτησή τους επιτεύχθηκε με το διαλύτη έκλουσης MeOH με 0,1% HCOOH.
- Οι CYN και DA κατακρατούνται κυρίως από τα Hypersep PGC και η προσθήκη ποσοστού DCM στο εκλουστικό διάλυμα αυξάνει σημαντικά τις ανακτήσεις τους.
- Η ANA σε pH 11 κατακρατείται και από τα δύο φυσιγγία.

Με βάση τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η χρήση ενός μόνο πληρωτικού υλικού SPE δεν είναι επαρκής για την ανάκτηση όλων των υπό μελέτη τοξινών. Εναλλακτικά η χρήση των δύο πληρωτικών υλικών HLB και PGC σε διαδοχή σχηματίζοντας διάταξη διπλού φυσιγγίου θα ενίσχυε την συνολική απόδοση της SPE μεθόδου για το σύνολο των ουσιών, διευκολύνοντας την ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση τους παρά τις διαφορές στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

9.1.2 Μελέτη διάταξης διπλού φυσιγγίου SPE

Στην μελέτη με τη διάταξη διπλού φυσιγγίου SPE χρησιμοποιήθηκαν τα φυσιγγία Oasis HLB και Hypersep PGC. Λόγω του μικρότερου όγκου και συνεπώς της μικρότερης διαπερατότητάς του, το φυσιγγίο PGC τοποθετήθηκε στο κάτω μέρος της διάταξης κατά το πέρασμα του δείγματος ενώ το HLB ήταν από πάνω (Εικόνα 9.1). Με αυτή τη σειρά ήταν ευκολότερος ο έλεγχος της ροής κατά το πέρασμα του δείγματος ώστε να αποφευχθεί πιθανή ξήρανση κάποιου από τα δύο υλικά, η οποία έχει αρνητική επίδραση στις ανακτήσεις. Καθώς διέρχεται το δείγμα (με pH 11) και από τα δύο πληρωτικά υλικά με ελεγχόμενη ταχύτητα ροής (5 ml/min) οι τοξίνες MCs, NOD και OA καθώς και μέρος της ANA κατακρατούνται στο HLB, ενώ οι πιο πολικές τοξίνες (CYN, DA και μέρος της ANA) διέρχονται χωρίς να προσροφηθούν από το πρώτο φυσιγγίο και στη συνέχεια κατακρατούνται από το δεύτερο φυσιγγίο το PGC.

Με την χρήση του εκλουστικού διαλύτη 40:60 v/v DCM:MeOH με 0,5% HCOOH οι ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν για τις MCs και το OA ήταν πολύ χαμηλές καθώς κυμάνθηκαν από μηδέν έως 67,7% (Πίνακας 9.2). Ο διαλύτης επαναδιαλυτοποίησης ήταν 95:5 (v/v) H₂O:MeOH. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι MCs και OA πιθανότατα κατακρατούνται στο στάδιο της έκλουσης από το PGC, ενώ η NOD μπορεί να εκλουστεί και από τα δύο φυσιγγία (ανάκτηση 76,0%), που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των μεμονωμένων φυσιγγίων. Με την αναστροφή των φυσιγγίων στη διάταξη (PGC στο πάνω μέρος και Oasis HLB στο κάτω μέρος) επιτεύχθηκε η επιτυχής ανάκτηση των MCs και OA. Οι ανακτήσεις των MCs και OA αυξήθηκαν σημαντικά και κυμάνθηκαν από 39,2% έως 118,3% (Πίνακας 9.2). Στην Εικόνα 9.1 παρατίθεται η βέλτιστη σχηματική διάταξης διπλού φυσιγγίου κατά τα διάφορα στάδια της εκχύλισης, με την οποία επετεύχθη ικανοποιητική ανάκτηση για το σύνολο των υπό μελέτη τοξινών.



Εικόνα 9.1: Σχηματική διάταξη διπλού φυσιγγίου SPE κατά τα στάδια της εκχύλισης

Με στόχο την μείωση της χρήσης οργανικών διαλυτών έγιναν δοκιμές με διαφορετικούς όγκους διαλύτη έκλουσης (6 και 10 ml). Από τα αποτελέσματα (Πίνακας 9.2) προκύπτει ότι η χρήση μεγαλύτερου όγκου εκλουστικού διαλύματος (10 ml) είναι στις περισσότερες περιπτώσεις απαραίτητη για την αποτελεσματική ανάκτηση των αναλυτών, και ειδικότερα για τις λιγότερο πολικές τοξίνες. Με την χρήση 10 ml εκλουστικού διαλύματος οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 71,8% - 122,2%, με εξαίρεση τις ANA (61,0%), MC-WR (42,9%) και MC-LW (39,2%). Κατά συνέπεια, ως βέλτιστο εκλουστικό σύστημα για την συνέχεια των πειραμάτων επιλέχθηκαν τα 10 ml διαλύτη 40:60 v/v DCM:MeOH με 0,5% HCOOH.

Πίνακας 9.2: Αποτελέσματα μελέτης διάταξης διπλού φυσιγγίου SPE - % Ανακτήσεις

Διαλύτης έκλυσης	CYN	ANA	DA	[D-Asp3] MC-RR	MC-RR	NOD	MC-YR	MC-HtyR	[D-Asp3] MC-LR	MC-LR	MC-HiIR	MC-WR	MC-LA	MC-LY	MC-LW	MC-LF	OA
Διάταξης διπλού φυσιγγίου SPE - Hypersep PGC & Oasis HLB ΧΩΡΙΣ αναστροφή κατά την έκλυση																	
10ml 60:40 MeOH:DCM (0.5% FA)	79.1	51.3	74.6	61.5	62.3	76.0	59.3	50.5	46.5	67.7	40.8	19.4	46.8	29.0	0.0	1.2	54.7
Διάταξης διπλού φυσιγγίου SPE - Hypersep PGC & Oasis HLB ME αναστροφή κατά την έκλυση																	
6ml 60:40 MeOH:DCM (0.5% FA)	78.8	51.2	72.7	88.7	83.5	96.8	89.7	87.7	97.4	84.2	66.8	25.5	67.7	36.9	3.5	10.8	88.9
10ml 60:40 MeOH:DCM (0.5% FA)	80.9	61.0	71.8	92.4	92.0	76.7	118.3	89.3	95.9	97.5	85.4	42.9	122.2	88.9	39.2	96.5	105.2

Πίνακας 9.3: Αποτελέσματα μελέτης για την αξιολόγηση της σύστασης του διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης - % Ανακτήσεις

Διαλύτης επαναδιαλυτοποίησης	CYN	ANA	DA	[D-Asp3] MC-RR	MC-RR	NOD	MC-YR	MC-HtyR	[D-Asp3] MC-LR	MC-LR	MC-HiIR	MC-WR	MC-LA	MC-LY	MC-LW	MC-LF	OA
100% H ₂ O	97.6	97.4	90.0	47.8	64.6	91.8	109.6	129.9	79.6	112.1	62.1	71.2	117.4	99.6	47.0	51.1	43.7
90:10 H ₂ O:MeOH	69.0	80.4	90.6	86.9	92.9	85.3	104.7	143.9	98.4	119.9	80.9	116.6	113.5	111.7	83.6	126.4	80.0
80:20 H ₂ O:MeOH	73.5	82.0	91.8	84.3	89.3	98.0	102.1	114.8	107.0	116.1	91.3	84.2	107.6	106.8	65.8	131.7	78.2
50:50 H ₂ O:MeOH	41.9	50.2	85.7	85.5	90.3	95.6	96.9	129.1	106.2	126.1	88.1	132.4	112.4	103.5	81.3	116.1	82.2

9.1.3 Επανασύσταση εκλούσματος

Με την εφαρμογή της SPE παραλαμβάνεται το τελικό έκλουσμα το οποίο περιέχει προσυγκεντρωμένους τους αναλύτες και είναι απαλλαγμένο από τις παρεμποδίσσεις του υποστρώματος. Όμως, ο διαλύτης του εκλουστικού δεν είναι συμβατός με την υγρή χρωματογραφία με συνέπεια να απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο στην ανάλυση για την επανασύσταση του εκλούσματος σε κατάλληλο διαλύτη για την περαιτέρω ανάλυση στο LC σύστημα. Με στόχο την αποφυγή απώλειας τοξινών κατά το στάδιο της επανασύστασης του διαλύτη έγιναν δοκιμές όπου μελετήθηκε η σύσταση τους διαλύτη και ο χρόνος παραμονής του τελικού εκχυλίσματος σε λουτρό υπερήχων.

Κατά τις δοκιμές εξετάστηκαν διαλύτες που η σύστασή τους ήταν 100% H₂O και μείγματα MeOH:H₂O 90:10, 80:20 και 50:50 v/v. Από τα αποτελέσματα των δοκιμών (Πίνακας 9.3) προκύπτει ότι η παρουσία MeOH στο διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης επηρεάζει θετικά την ανάκτηση επτά MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, [D-Asp3] MC-LR, MC-HiLR, MC-WR, MC-LW και MC-LF) και του OA. Με τη χρήση 100% H₂O ως διαλύτη επανασύστασης η ανάκτηση αυτών των τοξινών ήταν η χαμηλότερη που παρατηρήθηκε καθώς κυμάνθηκε από 43,7% (OA) έως 79,6% ([D-Asp3] MC-LR) ενώ η χρήση του διαλύτη 90:10 MeOH:H₂O είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των ανακτήσεων για συγκεκριμένες τοξίνες που κυμάνθηκαν από 80,0% (OA) έως 116,6% (MC-WR). Αντίθετα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ανάκτηση των κυανοτοξινών CYN και ANA με την αύξηση του ποσοστού MeOH (0% - 50%) στο διαλύτη επανασύστασης, από 97,6% σε 41,9% και από 97,4% σε 50,2%, αντίστοιχα. Επιπλέον, από προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν κατά την ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου, διαπιστώθηκε ότι η παρουσία MeOH σε ποσοστό μεγαλύτερο του 8% στο διαλύτη του δείγματος έχει ως αποτέλεσμα την μερική έκλυση των κυανοτοξινών CYN και ANA στο νεκρό όγκο της στήλης. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι πρέπει να γίνει ένας συμβιβασμός σχετικά με τη σύσταση του διαλύτη έκλυσης. Αξιολογώντας όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις, ως βέλτιστος διαλύτης επανασύστασης του τελικού εκχυλίσματος επιλέχθηκαν τα 400 μl 5:95 (v/v) MeOH:H₂O.

Ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την ανάκτηση των υπό μελέτη τοξινών κατά το στάδιο της επανασύστασης είναι η χρήση λουτρού υπερήχων. Το λουτρό υπερήχων βοηθάει τις λιγότερο πολικές τοξίνες να «ξεκολλήσουν» από το γυαλί του δοκιμαστικού σωλήνα και διευκολύνει την διαλυτοποίησή τους. Από την άλλη, η παραμονή του τελικού εκχυλίσματος σε λουτρό υπερήχων για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση των τοξινών. Στα πειράματα που έγιναν στα πλαίσια αυτής της μελέτης, το τελικό εκχύλισμα, που προέκυψε μετά από την ξήρανση του εκλούσματος και την προσθήκη του διαλύτη επανασύστασης 5:95 v/v MeOH:H₂O, τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 0, 0,5, 1, 5, 10 και 15 min. Η αύξηση του χρόνου παραμονής στο λουτρό υπερήχων από 0 σε 15 min είχε ως αποτέλεσμα μια μικρή θετική αύξηση έως 20% στις ανακτήσεις των ANA, [D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-HiLR, MC-LY, MC-LW, MC-LF και NOD. Οι ανακτήσεις των υπόλοιπων τοξινών δεν επηρεάστηκαν σημαντικά. Ως εκ τούτου ο χρόνος παραμονής του τελικού εκχυλίσματος στο λουτρό υπερήχων ορίστηκε στα 5 min, που είναι σε συμφωνία με την μέθοδο που προτείνεται στο ISO 20179:2005 για τον προσδιορισμό των MCs [131].

9.1.4 Αναλυτική πορεία της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον προσδιορισμό 15 κυανοτοξινών, DA & OA σε νερό

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της SPE, LC-MS/MS μεθόδου, προέκυψε η ακόλουθη αναλυτική πορεία για την απομόνωση και προσυγκέντρωση των υπό μελέτη κυανοτοξινών και φυκοτοξινών από το νερό.

1. Τα δείγματα επιφανειακού νερού διηθούνται με γυάλινη συσκευή διήθησης υπό κενό με φίλτρα Glass Microfiber .
2. Το δείγμα (400ml) ογκομετρείται με τον ογκομετρικό κύλινδρο και μεταφέρεται σε γυάλινη φιάλη του 1L. Ρυθμίζεται το pH του δείγματος στην τιμή 11 με προσθήκη διαλύματος καυστικού νατρίου 2M, στάγδην. Έπειτα προστίθενται στο δείγμα 4ml μεθανόλης, αναδεύεται και αφήνεται για 5 min. Σε περίπτωση που σχηματισθεί θόλωμα, το δείγμα διηθείται ξανά.
3. Στη συσκευή SPE τοποθετούνται τα φυσιγγια, στην βάση τα HyperSep Hypercarb PGC και στην κορυφή τα Oasis HLB με την χρήση κατάλληλων προσαρμογών (adaptors), σχηματίζοντας διάταξη διπλού φυσιγγίου. Τα φυσιγγια ενεργοποιούνται με διαδοχικό πέρασμα 6 ml διχλωρομεθάνιου, 6 ml μεθανόλης και 6 ml νερού.
4. Οι φιάλες των δειγμάτων συνδέονται με σωλήνες teflon και κατάλληλους προσαρμογείς στα φυσιγγια SPE. Τα δείγματα περνούν από τα φυσιγγια με ροή περίπου 5ml/min (διακριτές σταγόνες), με χρήση κενού.
5. Αφού περάσει όλο το δείγμα, αποσυνδέονται οι σωληνώσεις Teflon. Τα φυσιγγια ξηραίνονται για 15 min σε ροή αέρα υπό κενό.
6. Αφού ολοκληρωθεί το στάδιο της ξήρανσης, αναστρέφεται η σειρά σύνδεσης των φυσιγγίων στη διάταξη (στην βάση τα Oasis HLB και στην κορυφή τα HyperSep Hypercarb PGC) και τοποθετείται στην συσκευή SPE κατάλληλος υποδοχέας δοκιμαστικών σωλήνων και ένας δοκιμαστικός σωλήνας των 10ml κάτω από κάθε σύριγγα της συσκευής.
7. Τα φυσιγγια εκλούνται με 10 ml διαλύματος έκλουσης MeOH:DCM 60:40 v/v (0,5% HCOOH) με ροή μικρότερη από 1 ml/min, με τη βοήθεια κενού.
8. Οι σωλήνες μεταφέρονται σε συσκευή εξάτμισης με άζωτο και τα εκλούσματα εξατμίζονται μέχρι ξηρού με ελαφρύ ρεύμα αζώτου.
9. Τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιούνται με 400 μl διαλύματος διαλυτοποίησης MeOH:H₂O 5:95 v/v και αφήνονται σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Στη συνέχεια αναδεύονται και τα τελικά εκχυλίσματα μεταφέρονται σε φιαλίδια δειγματολήπτη για την ανάλυση στο LC-ESI-MS/MS.

9.2 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών σε νερό

Με στόχο τον έλεγχο καταλληλότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την επικύρωση της. Στο πλαίσιο της επικύρωσης της μεθόδου μελετήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι απόδοσής της: ειδικότητα, γραμμικότητα & εύρος μετρήσεων, ακρίβεια (accuracy), πιστότητα (precision), όρια ανίχνευσης (LOD) & ποσοτικοποίησης (LOQ) και οι λόγοι των θυγατρικών ιόντων. Τα αποτελέσματα επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου παρατίθενται στον Πίνακα 9.4.

Πίνακας 9.4: Αποτελέσματα επικύρωσης SPE, LC-ESI-MS/MS μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο νερό (επίπεδο συγκέντρωσης: 100 ng/L για κάθε τοξίνη)

Αναλύτης	Εύρος γραμμικότητας (μg/L)	Συντελ. Προσδιορισμού (R ²)	% Μέση Ανάκτηση ^α	%RSD _r pooled ^β	%RSD _R ^γ	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Θυγατρικό ιόν Q1 m/z	Θυγατρικό ιόν Q2 m/z	Θυγατρικό ιόν Q3 m/z	[Q2]/[Q1] (%RSD) ^δ	[Q3]/[Q1] (%RSD) ^δ
CYN	1-250	0.993	81.3	4.0	5.5	0.9	2.8	194	336	176	0.39 (1.9)	0.32 (3.0)
ANA	1-250	0.980	62.3	26.0	25.3	0.8	2.5	149	131	91	0.72 (2.2)	0.30 (3.4)
DA	1-250	0.998	75.1	11.2	12.4	2.4	7.1	266	248	161	0.25 (4.4)	0.21 (4.6)
[D-Asp3] MC-RR	1-250	0.997	81.0	14.0	15.2	2.1	6.4	135	103	127	0.42 (1.9)	0.34 (2.4)
MC-RR	1-250	0.999	82.7	12.1	12.1	0.9	2.8	135	105	127	0.39 (4.4)	0.35 (5.5)
NOD	1-250	0.996	94.0	7.2	7.0	1.8	5.5	135	227	781	0.78 (7.2)	0.13 (13.0)
MC-YR	1-250	0.996	84.8	15.7	15.5	4.4	13.1	213	135	375	1.00 (19.5)	0.62 (24.0)
MC-HtyR	2-250	0.994	79.7	12.9	12.3	6.5	19.5	135	213	375	0.91 (16.3)	0.32 (25.4)
[D-Asp3] MC-LR	1-250	0.980	97.9	12.4	15.7	3.6	10.9	213	135	375	0.96 (11.8)	0.77 (14.3)
MC-LR	1-250	0.985	95.4	8.1	8.1	4.3	12.9	135	213	105	0.82 (19.5)	0.17 (35.6)
MC-HilR	1-250	0.992	93.0	9.2	13.7	6.2	18.6	135	213	599	0.67 (7.9)	0.43 (22.5)
MC-WR	1-250	0.993	47.6	20.9	39.5	5.5	16.6	213	135	599	0.48 (25.7)	0.35 (47.2)
MC-LA	1-250	0.994	94.2	9.0	8.9	2.9	8.7	776	375	402	0.57 (7.7)	0.57 (6.9)
MC-LY	2-250	0.993	79.8	20.6	20.6	6.1	18.4	868	265	494	0.83 (8.7)	0.81 (15.0)
MC-LW	2-250	0.980	44.2	48.4	45.8	4.4	13.3	517	375	446	1.17 (30.6)	0.92 (23.1)
MC-LF	2-250	0.958	68.7	43.5	41.1	5.3	15.9	853	478	375	0.95 (16.9)	0.44 (17.6)
OA	5-250	0.950	113.0	25.1	26.6	10.4	31.2	770	752	734	0.84 (16.0)	0.76 (18.3)

^α n=10

^β Σχετική τυπική απόκλιση υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=10), με την χρήση όλων των δεδομένων

^γ Σχετική τυπική απόκλιση υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (2 διαφορετικές μέρες) (n = 10)

^δ Λόγοι ιόντων και %RSD υπολογισμένα από την ανάλυση πρότυπου διαλύματος σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 μg/L για κάθε αναλύτη (n = 6)

Για την εκτίμηση της ειδικότητας της μεθόδου αναλύθηκαν λευκά δείγματα (blank samples) και δεν ανιχνεύθηκαν συνεκλουόμενες κορυφές κοντά στους αναμενόμενους χρόνους ανάσχεσης (t_R) των αναλυτών. Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους μετρήσεων της μεθόδου αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα των αναλυτών σε οκτώ διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταξύ 1 – 250 $\mu\text{g/L}$, εις τριπλούν. Από την γραμμική συσχέτιση προκύπτει ότι οι συντελεστές προσδιορισμού είναι $R^2 > 0,980$ για όλους τους αναλύτες με εξαίρεση τις MC-LF και OA των οποίων το R^2 ήταν 0,958 και 0,950, αντίστοιχα (Πίνακας 9.4).

Η ακρίβεια της μεθόδου, ειδικότερα η ορθότητα (trueness), εκφρασμένη ως % ανάκτηση εκτιμήθηκε από την ανάλυση εμβολιασμένων / ενισχυμένων (spiked) δειγμάτων με τις υπό προσδιορισμό τοξίνες σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng/L . Συνολικά αναλύθηκαν δέκα δείγματα σε δυο διαφορετικές ημέρες. Οι μέσες ανακτήσεις (Πίνακας 9.4) κυμάνθηκαν από 62,3% έως 113,0% με εξαίρεση τις MC-WR και MC-LW των οποίων η μέση ανάκτηση ήταν 47,6% και 44,2%, αντίστοιχα.

Η πιστότητα της μεθόδου (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα) εκφρασμένη ως % RSD εκτιμήθηκε από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων με τις υπό προσδιορισμό τοξίνες σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng/L (5 επαναλήψεις σε δύο διαφορετικές ημέρες). Η επαναληψιμότητας της μεθόδου, εκφρασμένη ως διευρυμένη σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_r, pooled), κυμάνθηκε από 4,0 έως 26,0%, με εξαίρεση τις MC-LF (43,5%) και MC-LW (48,4%). Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου, εκφρασμένη ως % RSD_R, κυμάνθηκε από 5,5 έως 26,6%, με εξαίρεση τις MC-WR (39,5%), MC-LF (41,1%) και MC-LW (45,8%) (Πίνακας 9.4).

Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν ακόμα ειδικοί κανονισμοί και οδηγίες που να αναφέρονται στα κριτήρια απόδοσης μεθόδων για την ανάλυση των κυανοτοξινών, η απόδοση της αναπτυχθείσας μεθόδου αξιολογήθηκε με βάση τις διαθέσιμες οδηγίες για την ανάλυση άλλων οργανικών ρύπων στο νερό [335-337]. Η παραμετρικές τιμές για την ορθότητα και την πιστότητα της προτεινόμενης μεθόδου είναι σε συμφωνία με τις παραπάνω οδηγίες για τις πιο διαδεδομένες και πιο συχνά ανιχνευόμενες κυανοτοξίνες. Εκτός των ορίων των οδηγιών είναι οι παραμετρικές τιμές των πιο σπάνια ανιχνευόμενων MCs: MC-WR, MC-LF και MC-LW. Παρά ταύτα, το γεγονός ότι η προτεινόμενη μέθοδος δεν καλύπτει τα κριτήρια καταλληλότητας μόνο για τρεις MCs που δεν ανιχνεύονται συχνά, υπερκαλύπτεται από το γεγονός ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών τοξινών που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες με μία μόνο ανάλυση. Επιπρόσθετα, η χαμηλή ακρίβεια της μεθόδου για τις συγκεκριμένες ενώσεις μπορεί να αντιμετωπιστεί με την χρήση κατάλληλου συντελεστή διόρθωσης, υπολογισμένου από τις ανακτήσεις των ενώσεων, κατά την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου.

Τα LODs της μεθόδου υπολογίστηκαν και κυμάνθηκαν από 1 έως 10 ng/L για όλους τους αναλύτες. Οι τιμές αυτές επιβεβαιώθηκαν πειραματικά από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων στο επίπεδο συγκέντρωσης των υπολογισμένων LODs. Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν οι αναλύτες και ο λόγος σήμα προς θόρυβο (signal to noise ratio, S/N) των κορυφών ήταν μεγαλύτερος από 3. Τα LODs της αναπτυχθείσας μεθόδου για τις MCs και NOD είναι αντίστοιχα με τα όρια των άλλων προτεινόμενων μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους στο νερό. Από την άλλη, τα LOD που επιτυγχάνονται με την παρούσα μέθοδο για τις CYN και ANA είναι από τα χαμηλότερα που έχουν επιτευχθεί σε σύγκριση με αυτά που αναφέρονται σε άλλες αντίστοιχες μελέτες [119, 136, 138, 141].

Στην παρούσα μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκαν υποκατάστατα των αναλυτών / εσωτερικά πρότυπα (surrogate / internal standards IS/SS), καθώς δεν υπάρχουν ακόμα εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα ισοτοπικά επισημασμένων κυανοτοξινών. Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η χρήση διαφόρων ενώσεων ως IS ή/και ως SS για την ανάλυση των κυανοτοξινών. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί η χρήση των HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid [338] και 1,9-Diaminononane [119, 138] για την ανάλυση της CYN, της Phenylalanine-d5 για την ανάλυση της ANA [145], και των Leucine Enkephalin [140, 339, 340], 4-Phenyl butyric acid [341] και 2,3,5-Trimethacarb [119, 138, 342] για τα κυκλικά πεπτίδια. Οι ενώσεις αυτές όμως δεν έχουν αξιολογηθεί για την καταλληλότητα τους ως IS/SS καθώς θα πρέπει να έχουν αντίστοιχες διακυμάνσεις στην απόκριση και την ανάκτηση με αυτές των αναλυτών. Κατά συνέπεια απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες για την αξιολόγησή τους. Ακόμα, τα προτεινόμενα IS/SS έχουν διαφορετικές χημικές δομές από τις κυανοτοξίνες για τις οποίες χρησιμοποιούνται και πιθανότατα να έχουν διαφορετική συμπεριφορά κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε σχέση με τους αναλύτες. Ο συλλογισμός αυτός ενισχύεται περισσότερο από το γεγονός ότι ακόμα και οι MCs που έχουν παρόμοιες χημικές δομές έχουν διαφορετική συμπεριφορά κατά την εφαρμογή της μεθόδου (Πίνακας 9.4).

Από την συνολική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων επικύρωσης της προτεινόμενης μεθόδου, προκύπτει ότι η αναπτυχθείσα SPE, LC-MS/MS μέθοδος είναι κατάλληλη για τον αξιόπιστο προσδιορισμό των υπό μελέτη κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο νερό, σε χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των ng/L, με εξαίρεση τις MC-WR, MC-LF και MC-LW που δεν παρουσίασαν καλή ακρίβεια και πιστότητα.

Οι περισσότερες μελέτες που υπάρχουν στην βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών αναφέρονται σε συγκεκριμένη κυανοτοξίνη ή σε δομικές παραλλαγές μιας κατηγορίας κυανοτοξινών [126]. Οι μελέτες που αναφέρονται σε περισσότερες από μια κατηγορίες κυανοτοξινών είναι περιορισμένες (Πίνακας 1.2), ενώ αυτές που χρησιμοποιούν συνδυασμό προσροφητικών υλικών SPE για την εκχύλιση των κυανοτοξινών από το νερό δεν περιγράφονται με λεπτομέρειες και δεν περιέχουν δεδομένα επικύρωσης που είναι απαραίτητα για την εκτίμηση της μεθόδου και την αναπαραγωγή της από άλλα εργαστήρια. Στον παρελθόν, είχε προταθεί η χρήση συνδυασμού των φυσιγγίων C18 και PGC για την αποτελεσματική ανάλυση της CYN [80, 343]. Σε μελέτη των Yen et al [119] αναφέρετε μέθοδος όπου χρησιμοποιείται συνδυασμός δύο φυσιγγίων SPE για τον προσδιορισμό ποικίλων κυανοτοξινών, χωρίς όμως να αναφέρονται σημαντικές λεπτομέρειες σχετικά με την διάταξη SPE, όπως η σειρά σύνδεσης των φυσιγγίων. Επίσης, προτείνουν μεγάλο όγκο εκλουστικού (40 ml) για την παραλαβή των αναλυτών, περίπλοκη διαδικασία για την επανασύσταση του εκλούσματος, εκτεταμένο πρόγραμμα χρωματογραφικής έκλυσης (διάρκειας 70 min). Η μέθοδος που προτείνουν δεν παρέχει αξιόπιστη και ευαίσθητη ταυτοποίηση των αναλυτών καθώς χρησιμοποιείται φασματομετρία μαζών με απλό τετράπολο και όχι συζευγμένη φασματομετρία μαζών. Επιπρόσθετα, δεν αναφέρουν την ρύθμιση του pH του αρχικού δείγματος σε τιμή >10, κάτι που είναι αναγκαίο για την κατακράτηση της ANA από το προσροφητικό υλικό [136, 145, 344].

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής είναι απλή, γρήγορη, ευαίσθητη και επιτυγχάνει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό και την αξιόπιστη ταυτοποίηση ποικίλων κυανοτοξινών από διαφορετικές κατηγορίες, πολλών δομικών παραλλαγών των MCs καθώς και φυκοτοξινών που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες με μία μόνο ανάλυση. Για την αποτελεσματική προσυγκέντρωση των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε διάταξη διπλού φυσιγγίου SPE

όπου περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια της εκχύλισης αλλά και ο μηχανισμός όπου περιγράφεται αναλυτικά ο ρόλος του κάθε προσροφητικού στην κατακράτηση των ενώσεων. Η επίδραση ποικίλων παραγόντων της SPE εκτιμήθηκε με στόχο την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την εκχύλιση των ποικίλων τοξινών. Επίσης, με την προτεινόμενη μέθοδο επιτυγχάνεται αξιόπιστη ταυτοποίηση των αναλυτών με την τεχνική LC-MS/MS και περιγράφονται αναλυτικά οι δομές των παράγωγων ιόντων που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των αναλυτών με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία ενώ για κάποια παράγωγα ιόντα προτείνεται για πρώτη φορά η δομή τους μαζί με το μηχανισμό σχηματισμού τους. Ένας επιπλέον σημαντικό πλεονέκτημα της παρούσας μελέτης είναι το γεγονός ότι για πρώτη φορά μελετάται ταυτόχρονα ένας μεγάλος αριθμός ποικίλων τοξινών, που έχουν διαφορετική προέλευση. Παρόλο που οι αναλύτες δεν είναι πιθανό να ανιχνευτούν στο ίδιο δείγμα νερού, με βάση τα δεδομένα της υπάρχουσα βιβλιογραφίας, η αναπτυχθείσα αναλυτική μέθοδος αποτελεί βάση για την μελέτη ποικίλων τοξινών στο νερό από διαφορετικές κατηγορίες και μπορεί να αναπαραχθεί από τα διάφορα εργαστήρια ανάλογα με τις ανάγκες τους. Τέλος, η προτεινόμενη μέθοδος για την ανάλυση τοξινών με διαφορετικές δομές, τοξική δράση, τοξικότητες, φυσικοχημικές ιδιότητες αλλά και προέλευση μπορεί να αποτελέσει μια πολύ χρήσιμη βάση για την ανάλυση και άλλων δομικών παραλλαγών των μελετώμενων κατηγοριών όπως και άλλων κατηγοριών τοξινών δεδομένου ότι συνεχώς ανακαλύπτονται νέες δομές τοξινών που παράγονται από κυανοβακτήρια και μικροφύκη.

Κεφάλαιο 10 : Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή βιομάζα

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε μελέτη για την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των κυανοτοξινών CYN, ANA και MCs σε κυανοβακτηριακά κύτταρα – βιομάζα. Στόχος ήταν η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου για την ποσοτική εκχύλιση των υπό μελέτη κυανοτοξινών από τα κυανοβακτηριακά κύτταρα ακολουθόμενη από ανάλυση στο σύστημα LC-MS/MS. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου μελετήθηκε η επίδραση των ακόλουθων παραγόντων στην ανάκτηση των τοξινών από την κυανοβακτηριακή βιομάζα: 1) τεχνική επεξεργασίας με υπερήχους για την λύση των κυττάρων, 2) εκχυλιστική ικανότητα διαλυτών, 3) σύσταση του διαλύτη εκχύλισης, 4) όγκος του διαλύτη εκχύλισης, 5) μάζα του αναλυόμενου δείγματος και 6) υλικό φίλτρων για τη διήθηση του εκχυλίσματος. Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε λυοφιλοποιημένο δείγμα κυανοβακτηριακής βιομάζας το οποίο συλλέχθηκε από την Λίμνη Καστοριά (ημερομηνία δειγματοληψίας 18/09/2014) κατά την διάρκεια έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης. Το δείγμα περιείχε MCs και εμβολιάστηκε με 25 ng/mg CYN και ANA. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η κυανοβακτηριακή βιομάζα δεν είναι ομογενής και η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε κάνοντας την παραδοχή ότι είναι ομογενής για να μπορέσουν να αξιολογηθούν τα αποτελέσματα. Όλα τα πειράματα της μελέτη πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

10.1.1 Τεχνική επεξεργασίας με υπερήχους

Η εφαρμογή υπερήχων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στάδιο κατά την εκχύλιση των τοξινών από τη βιομάζα καθώς προκαλεί λύση των κυανοβακτηριακών κυττάρων βοηθώντας την απελευθέρωση των τοξινών. Στην μέθοδο ISO 20179:2005 για τον προσδιορισμό των MCs [131] προτείνεται η επεξεργασία του δείγματος είτε με probe υπερήχων ή με λουτρό υπερήχων. Για να εκτιμηθεί ποια από τις δύο προτεινόμενες τεχνικές έχει την καλύτερη απόδοση εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται στην ISO μέθοδο σε 20 mg δείγματος λυοφιλοποιημένης βιομάζας.

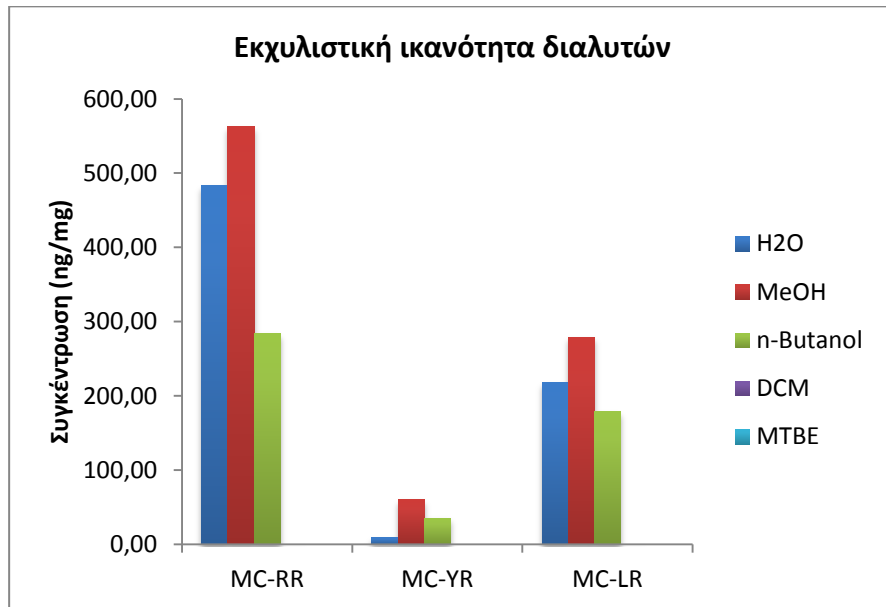
Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι και οι δύο τεχνικές έχουν παρόμοια απόδοση, με το λουτρό υπερήχων να παρέχει ελάχιστα μεγαλύτερες ανακτήσεις. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα του λουτρού υπερήχων είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα για ταυτόχρονη επεξεργασία πολλαπλών δειγμάτων, ενώ με το probe υπερήχων μπορεί να γίνει η επεξεργασία μόνο ενός δείγματος κάθε φορά. Συνεκτιμώντας τα παραπάνω, επιλέχθηκε το λουτρό υπερήχων για την λύση των κυττάρων καθώς έχει παρόμοια απόδοση με το probe υπερήχων ενώ ταυτόχρονα όταν υπάρχουν πολλά δείγματα μειώνεται σημαντικά ο συνολικός χρόνος εκχύλισης.

10.1.2 Εκχυλιστική ικανότητα διαλυτών

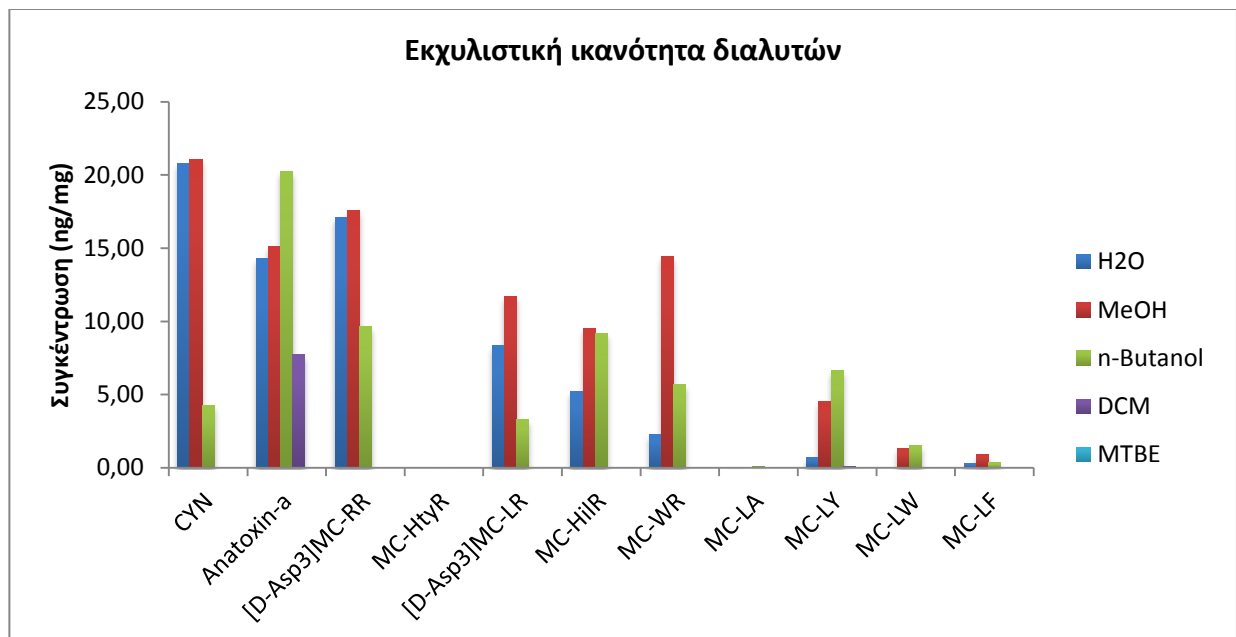
Πέντε διαλύτες (H₂O, MeOH, n-BuOH, DCM και MTBE) με διαφορετικές πολικότητες (όπως παρατίθενται στον Πίνακα 6.1) μελετήθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους στην εκχύλιση των κυανοτοξινών από την βιομάζα. Κατά την μελέτη 20 mg λυοφιλοποιημένης βιομάζας εκχυλίστηκαν με 1,5 ml καθαρού διαλύτη σε τρεις κύκλους εκχύλισης. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρατίθενται στα Σχήματα 10.1 & 10.2.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι λιγότερο πολικοί διαλύτες (DCM και MTBE) δεν είναι κατάλληλοι για την εκχύλιση των υπό μελέτη κυανοτοξινών από την βιομάζα. Συγκεκριμένα η βιομάζα δεν διασκορπίστηκε στον διαλύτη DCM, αλλά σχημάτισε συσσωματώματα στην επιφάνεια

του διαλύτη. Παρόμοια στο διαλύτη MTBE σχηματιστήκαν συσσωματώματα στον κάτω μέρος του διαλύματος. Με την χρήση του DCM μόνο ένα μέρος της ANA και ίχνη των MC-RR, [D-Asp3]MC-LR και MC-LR εκχυλίστηκαν, ενώ με την χρήση του διαλύτη MTBE δεν εκχυλίστηκε καμία κυανοτοξίνη.



Σχήμα 10.1: Εκχυλιστική ικανότητα διαλυτών για τις κυανοτοξίνες MC-RR, MC-YR & MC-LR



Σχήμα 10.2: Εκχυλιστική ικανότητα διαλυτών για τις υπό μελέτη κυανοτοξίνες (εκτός από MC-RR, MC-YR & MC-LR)

Αντιθέτως, στους πιο πολικούς διαλύτες (H₂O, MeOH και n-BuOH) η βιομάζα διασκορπίστηκε ομοιόμορφα, βοηθώντας την εκχύλιση των κυανοτοξινών (Σχήματα 10.1 & 10.2). Σε όλες τις

περιπτώσεις η MeOH είχε καλύτερη απόδοση ως εκχυλιστικός διαλύτης από το H₂O καθώς επιτεύχθηκαν καλύτερες ανακτήσεις για όλες τις υπό μελέτη κυανοτοξίνες και ειδικότερα για τις MC-HiIR, MC-WR, MC-LY, MC-LW. Το H₂O είχε καλύτερη εκχυλιστική ικανότητα από την n-BuOH για την CYN και τις [D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-LR, [D-Asp3]MC-LR και MC-LR. Αντίθετα, με τη χρήση της n-BuOH ως εκχυλιστικό διαλύτη επιτεύχθηκαν καλύτερες ανακτήσεις για την ANA και τις MCs, MC-LY και MC-LW, σε σύγκριση με το H₂O και την MeOH. Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι διαλύτες MeOH, H₂O και n-BuOH έχουν την ικανότητα να εκχυλίσουν τις κυανοτοξίνες από τη βιομάζα.

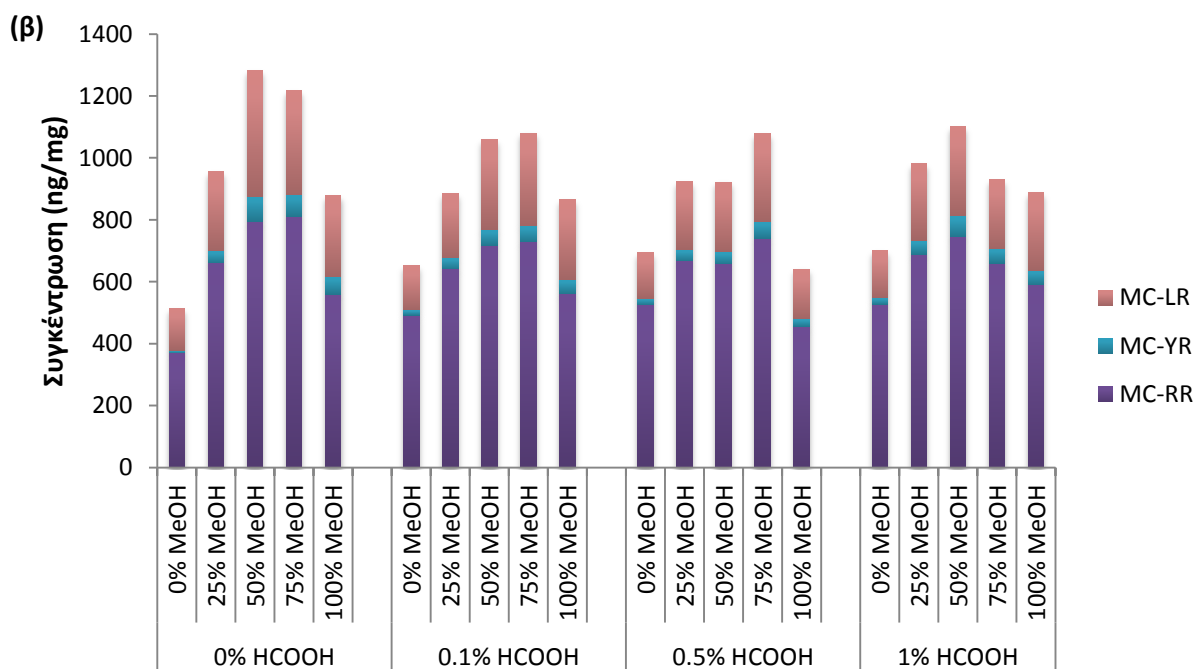
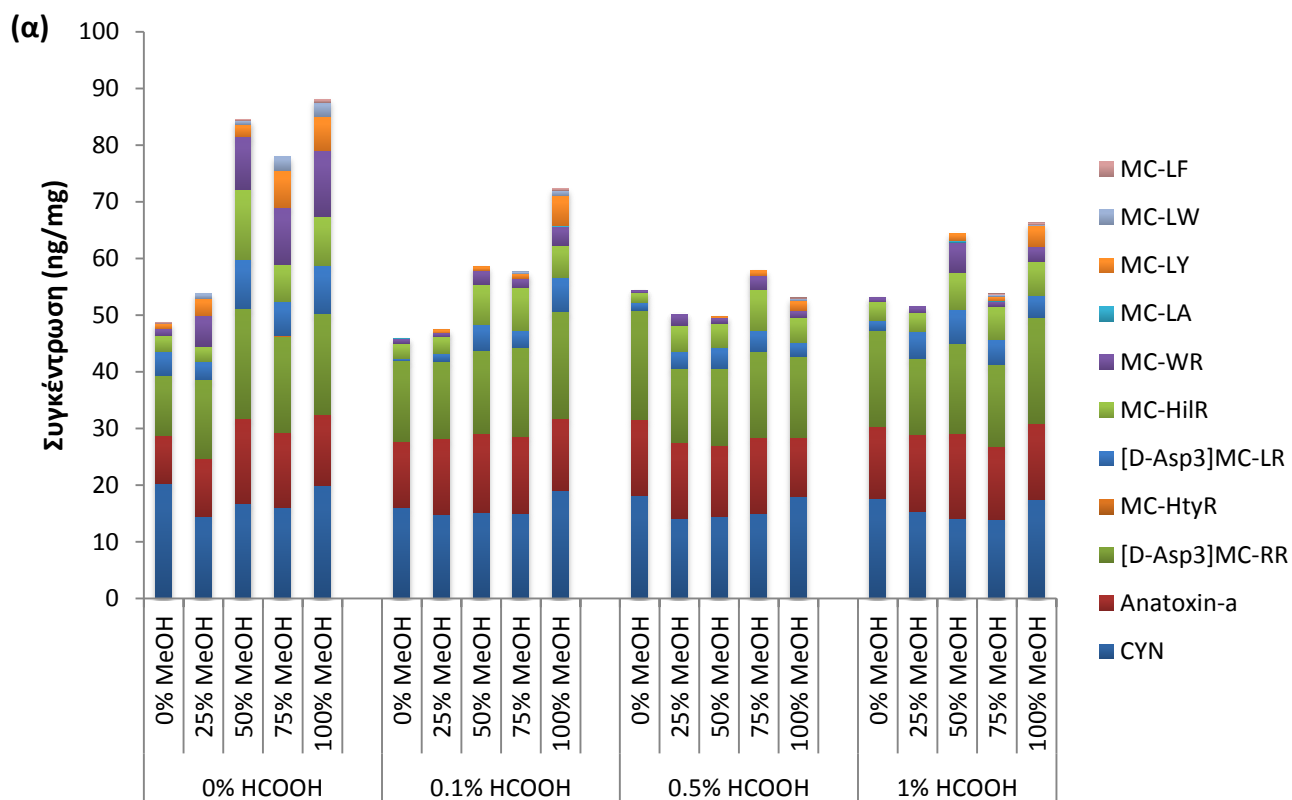
10.1.3 Σύσταση του διαλύτη εκχύλισης

Από τις δοκιμές που έγιναν για την εκτίμηση της εκχυλιστικής ικανότητας των διαλυτών προέκυψε ότι οι διαλύτες MeOH, H₂O και n-BuOH έχουν την ικανότητα να εκχυλίσουν τις κυανοτοξίνες από τη βιομάζα. Με στόχο την βελτιστοποίηση της εκχύλισης των κυανοτοξινών από την κυανοβακτηριακή βιομάζα έγιναν δοκιμές με μίγματα αυτών των διαλυτών.

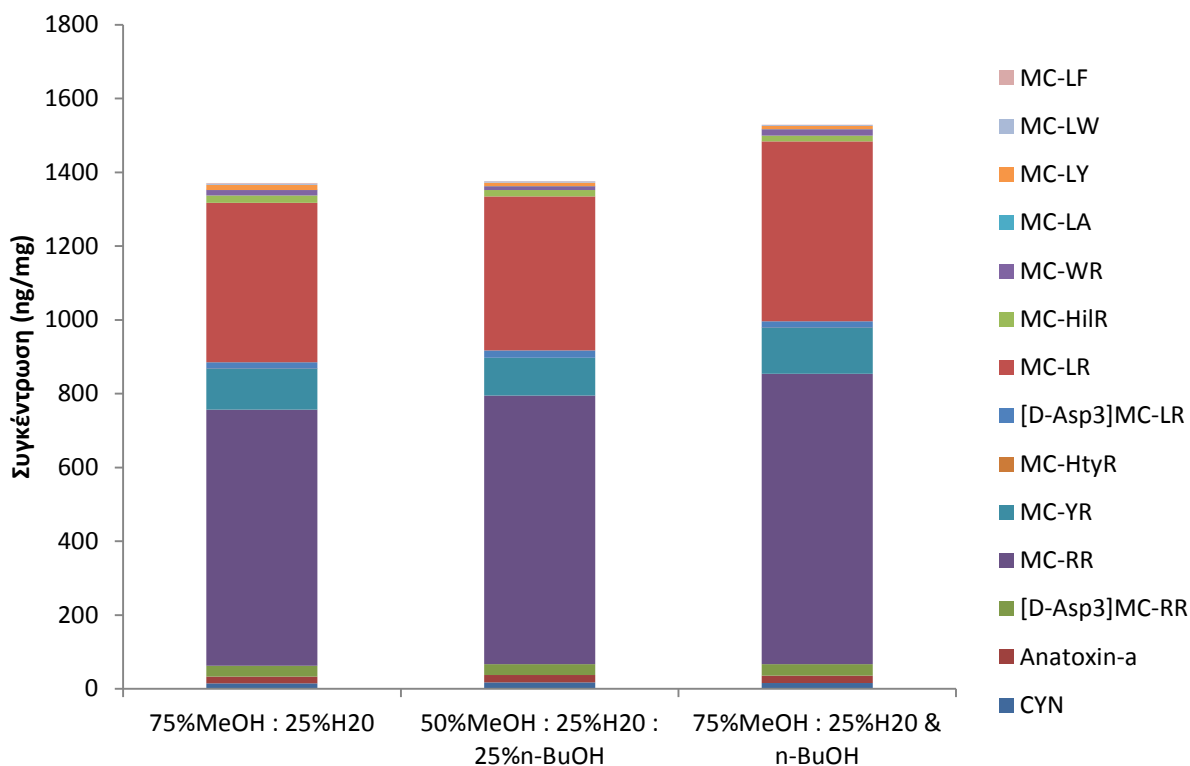
Πρώτα, έγιναν δοκιμές για την εκτίμηση της εκχυλιστικής ικανότητας υδατικών μιγμάτων MeOH. Επίσης εκτιμήθηκε η επίδραση της παρουσίας ποσοστού HCOOH στην ανάκτηση των κυανοτοξινών από τη βιομάζα. Για να εκτιμηθεί η ικανότητα των εκχυλιστικών μιγμάτων, 20 mg βιομάζας εκχυλίστηκαν τρεις φορές, κάθε φορά με 1,5 ml από το υπό μελέτη μίγμα διαλυτών. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη παρατίθενται στα Σχήματα 10.3 και 10.4.

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (Σχήμα 10.3) προέκυψε ότι η παρουσία ποσοστού HCOOH στο εκχυλιστικό διάλυμα έχει αρνητική επίδραση στην ανάκτηση των κυανοτοξινών, καθώς οι διαλύτες που δεν περιείχαν ποσοστό HCOOH παρουσίασαν καλύτερη εκχυλιστική απόδοση. Επίσης, η παρουσία υψηλού ποσοστού MeOH (75 – 100%) στο διαλύτη βοηθάει στην καλύτερη ανάκτηση της CYN και των MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF. Από την άλλη, η βέλτιστη ανάκτηση της ANA επιτεύχθηκε με το διαλύτη 50% MeOH : 50% H₂O. Οι βέλτιστες ανακτήσεις των [D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR και MC-HiIR επιτεύχθηκαν με την χρήση των μιγμάτων 50% MeOH : 50% H₂O και 75% MeOH : 25% H₂O. Συνεκτιμώντας όλα τα παραπάνω συμπεράσματα, ως συμβιβαστική λύση επιλέχθηκε το μίγμα 75% MeOH : 25% H₂O για την αποτελεσματική εκχύλιση όλων των υπό μελέτη κυανοτοξινών.

Στην συνέχεια, έγιναν δοκιμές όπου μελετήθηκαν μίγματα με n-BuOH, η οποία έδωσε καλύτερη ανάκτηση για την ANA και τις MC-LY και MC-LW. Στις δοκιμές χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά συστήματα. Στην πρώτη περίπτωση η εκχύλιση της βιομάζας έγινε τρεις φορές, κάθε φορά με 1,5ml μίγματος 50% MeOH : 25% H₂O : 25% n-BuOH. Στην δεύτερη περίπτωση, η εκχύλιση έγινε δύο φορές με 1,5ml διαλύτη 75% MeOH : 25% H₂O και την τρίτη φορά η εκχύλιση έγινε με καθαρή n-BuOH. Για συγκριτικούς λόγους έγιναν και δοκιμές όπου το εκχυλιστικό ήταν μίγμα 75% MeOH : 25% H₂O, όπως προτείνεται από την μέθοδο ISO 20179 για την εκχύλιση των ενδοκυττάρων MCs [131]. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο Σχήμα 10.4. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η μέγιστη ποσότητα των κυανοτοξινών εκχυλίστηκε από τη βιομάζα με τη χρήση του εκχυλιστικού συστήματος που ήταν συνδυασμός του μίγματος 75% MeOH : 25% H₂O και της καθαρής n-BuOH.



Σχήμα 10.3: Εκχυλιστική ικανότητα ποικίλων υδατικών μειγμάτων MeOH με διάφορα ποσοστά HCOOH **(α)** για τις υπό μελέτη κυανοτοξίνες εκτός από MC-RR, MC-YR και MC-LR και **(β)** για τις MC-RR, MC-YR και MC-LR, για την παραλαβή τους από τη κυανοβακτηριακή βιομάζα



Σχήμα 10.4: Εκχυλιστική ικανότητα συστημάτων διαλυτών αποτελούμενων από H₂O, MeOH και n-BuOH για την παραλαβή των υπό μελέτη κυανοτοξινών από τη βιομάζα

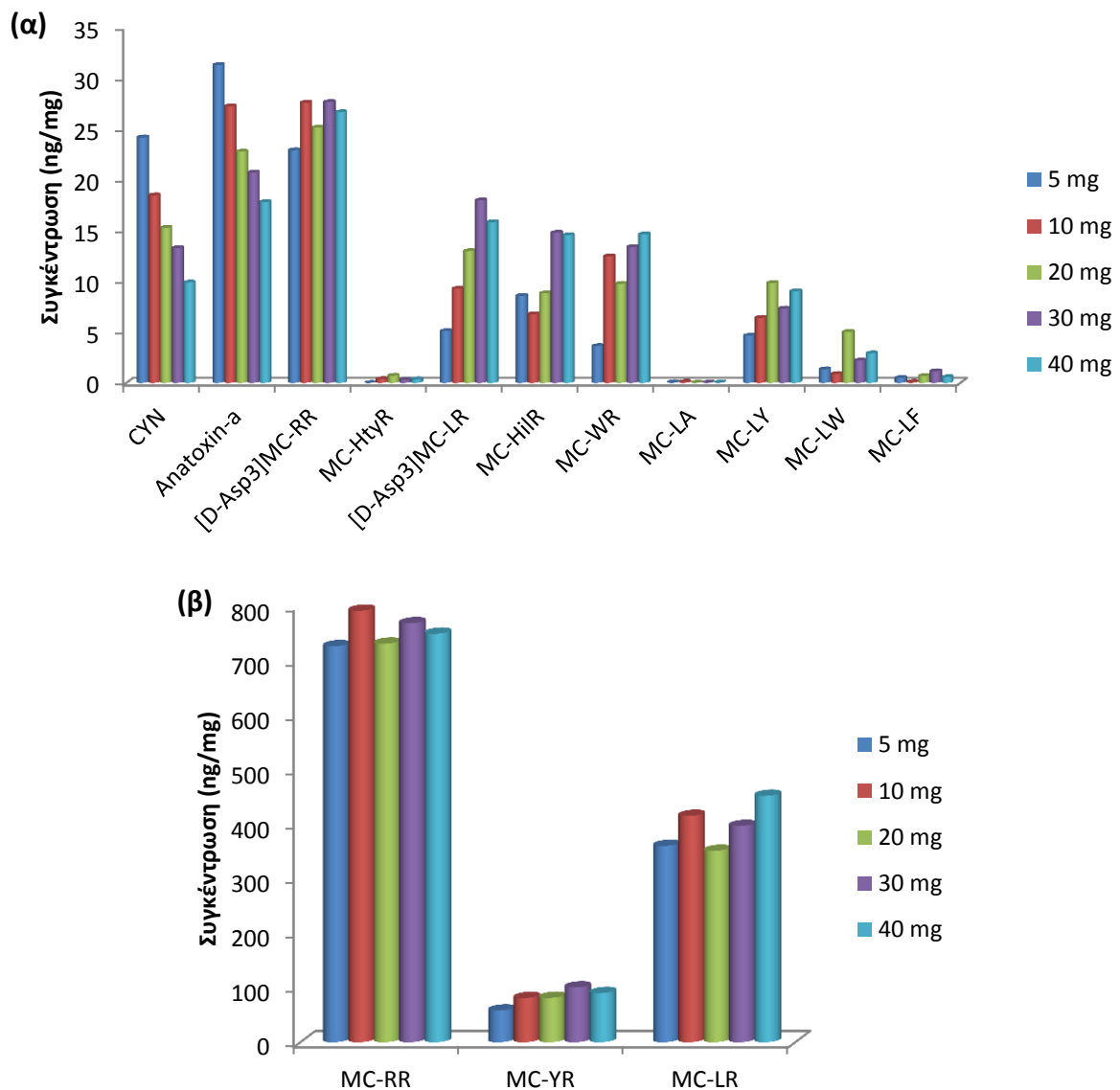
10.1.4 Όγκος του διαλύτη εκχύλισης

Για την εκτίμηση της επίδρασης του όγκου του διαλύτη εκχύλισης στην παραλαβή των κυανοτοξινών από την βιομάζα, έγιναν δοκιμές όπου χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί όγκοι (1,5 και 3 ml). Από τα αποτελέσματα των δοκιμών προέκυψε ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση, καθώς η χρήση διπλάσιου όγκου διαλύτη εκχύλισης και στους τρεις κύκλους εκχύλισης δεν αύξησε την ανάκτηση των υπό μελέτη τοξινών. Δεδομένου ότι η χρήση όγκου 1,5 ml είναι επαρκής για την αποτελεσματική παραλαβή των κυανοτοξινών από τη βιομάζα και παράλληλα μειώνονται η χρήση των επιβλαβών για το περιβάλλον οργανικών διαλυτών και το κόστος ανάλυσης, επιλέχθηκε ως βέλτιστη τιμή το 1,5 ml.

10.1.5 Μάζα δείγματος λυοφιλοποιημένης βιομάζας

Για την εκτίμηση της επίδρασης της μάζας του δείγματος βιομάζας στην ανάκτηση των κυανοτοξινών πραγματοποιήθηκαν δοκιμές όπου ζυγίστηκαν πέντε διαφορετικές μάζες δείγματος (5, 10, 20, 30 και 40 mg). Από τα αποτελέσματα των δοκιμών (Σχήμα 10.5) προκύπτει ότι δεν παρατηρείται η ίδια επίδραση της μάζας του δείγματος σε όλες τις περιπτώσεις. Δηλαδή, οι ανακτήσεις για τις υπό μελέτη κυανοτοξίνες επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο αυξανόμενης της μάζας του δείγματος. Να υπενθυμισθεί ότι η κυανοβακτηριακή βιομάζα είναι ανομοιογενής, όμως για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μελέτης έγινε η παραδοχή ότι είναι ομοιογενής.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι κυανοτοξίνες CYN και ANA επηρεάστηκαν αρνητικά από την αύξηση της μάζας του δείγματος. Πιθανότατα, αρκετές ενώσεις που δεν συγκαταλέγονται στους αναλύτες εκχυλίζονται από τη βιομάζα (παρεμποδίσσεις υποστρώματος) με αποτέλεσμα να γίνεται καταπίεση του σήματος (suppression) κατά την ανάλυση στο σύστημα LC-ESI-MS/MS. Οι ανακτήσεις των [D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR και MC-LR, δεν επηρεάστηκαν από την αύξηση της μάζας του δείγματος, υποδηλώνοντας ότι οι παρεμποδίσσεις του υποστρώματος δεν επηρεάζουν την ανάλυσή τους. Η ανάκτηση για τις υπόλοιπες MCs επηρεάστηκε θετικά με την αύξηση της μάζας του δείγματος. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεκριμένες MCs υπάρχουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο δείγμα, και όσο αυξάνεται η μάζα του δείγματος εκχυλίζεται μεγαλύτερη ποσότητα τοξινών, διευκολύνοντας την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τους στην περίπτωση που δεν υπάρχουν παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, αποφασίστηκε ως συμβιβαστική λύση να χρησιμοποιούνται 10 mg βιομάζας κατά την ανάλυση για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη κυανοτοξινών.

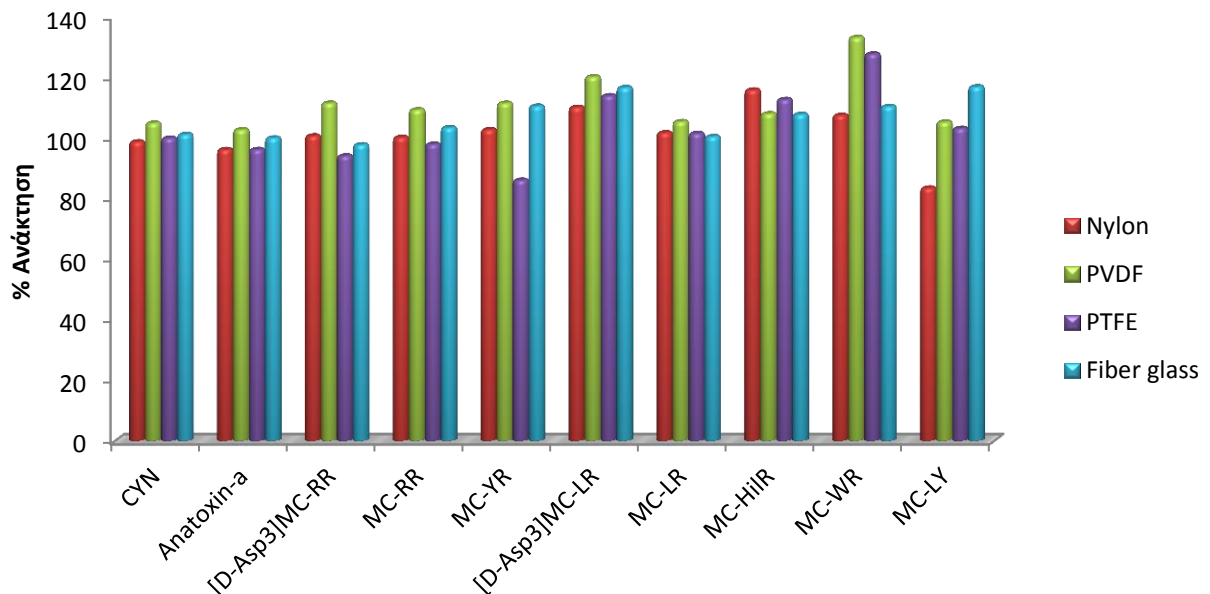


Σχήμα 10.5: Επίδραση της μάζας του δείγματος στην ανάκτηση (α) των υπό μελέτη κυανοτοξινών εκτός από MC-RR, MC-YR και MC-LR (β) των MC-RR, MC-YR και MC-LR

10.1.6 Υλικά φίλτρων διήθησης εκχυλίσματος

Σε κάποιες περιπτώσεις, η φύση της βιομάζας είναι τέτοια που δεν επιτυγχάνεται πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ του εκχυλίσματος και της βιομάζας με τη φυγοκέντρηση. Οι τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος είναι α) οι διαδοχικές φυγοκεντρήσεις του εκχυλίσματος και β) το φιλτράρισμα του εκχυλίσματος μετά την πρώτη φυγοκέντρηση. Όμως με το φιλτράρισμα του εκχυλίσματος υπάρχει η πιθανότητα να κατακρατηθεί μέρος των αναλυτών στο φίλτρο.

Με στόχο την αποφυγή απώλειας κυανοτοξινών, έγιναν δοκιμές όπου μελετήθηκαν τέσσερα διαφορετικά υλικά φίλτρων (Nylon 0,45μm, PVDF 0,45μm, PTFE 0,45μm και Fiber glass 0,47μm). Κατά τις δοκιμές το εκχύλισμα χωρίστηκε σε δύο μέρη. Το ένα μέρος διήλθε από το φίλτρο, ενώ το άλλο μέρος δεν φιλτραρίστηκε. Όλες οι δοκιμές έγιναν εις διπλούν. Από τα αποτελέσματα των δοκιμών υπολογίστηκε η % ανάκτηση των κυανοτοξινών από τα φίλτρα (Σχήμα 10.6). Με βάση την % ανάκτηση προκύπτει ότι οι κυανοτοξίνες δεν κατακρατούνται από τα υλικά των φίλτρων που μελετήθηκαν. Μικρές απώλειες παρατηρήθηκαν μόνο για την MC-YR (14%) με τα PTFE φίλτρα και για την MC-LY (17%) με τα Nylon φίλτρα.



Σχήμα 10.6: % Ανάκτηση των κυανοτοξινών από τέσσερα διαφορετικά υλικά φίλτρων

10.1.7 Αναλυτική πορεία εκχύλισης δειγμάτων βιομάζας για τον προσδιορισμό κυανοτοξινών

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από την βελτιστοποίηση της μεθόδου, προέκυψε η ακόλουθη αναλυτική πορεία για την εκχύλιση των υπό μελέτη κυανοτοξινών από την κυανοβακτηριακή βιομάζα.

1. Ζυγίζονται 10mg δείγματος λυοφιλιωμένης βιομάζας σε πλαστικό φιαλίδιο μικροφυγοκέντρησης Eppendorf 1,5ml.
2. Στο φιαλίδιο Eppendorf προστίθενται 1,5ml διαλύματος εκχύλισης MeOH : H₂O 75:25 v/v και αναδεύονται ώστε να διαβραχεί όλη η κυανοβακτηριακή βιομάζα.

3. Τα δείγματα αφήνονται σε λουτρό υπερήχων για 15 min.
4. Στη συνέχεια αναδεύονται και φυγοκεντρώνονται στις 4000 rpm για 10 min.
5. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και συλλέγεται σε γυάλινο σωλήνα 10 ml.
6. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της εκχύλισης (στάδια 2-5) για δεύτερη φορά με 1,5 ml διαλύτη εκχύλισης MeOH : H₂O 75:25 v/v και την τρίτη φορά με 1,5 ml n-BuOH.
7. Από το σύνολο του υπερκείμενου υγρού παραλαμβάνονται 1,5 ml τα οποία εξατμίζονται μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου
8. Το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιείται με 500 μl διαλύματος διαλυτοποίησης MeOH:H₂O 5:95 v/v και αφήνεται σε λουτρό υπερήχων για 5 min. Τα τελικά εκχυλίσματα μεταφέρονται σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη για την ανάλυση στο LC-ESI-MS/MS.

Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η επικύρωση της αναπτυχθείσας μεθόδου δεν ήταν εφικτή καθώς δεν υπάρχουν ακόμα εμπορικά διαθέσιμα υλικά αναφοράς (CRM) κυανοβακτηριακής βιομάζας που να έχουν πιστοποιημένη συγκέντρωση ενδοκυττάρων κυανοτοξινών. Επομένως, η ακρίβεια της μεθόδου (% ανάκτηση), που αποτελεί σημαντική παράμετρο απόδοσης μίας αναλυτικής μεθόδου δεν μπορεί να εκτιμηθεί αξιόπιστα. Η χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων κυανοβακτηριακής βιομάζας για την εκτίμηση της ακρίβειας έχει τον σημαντικότερο περιορισμό ότι οι κυανοτοξίνες δεν βρίσκονται ενδοκυττάρια στο δείγμα, αλλά στην επιφάνεια των κυττάρων. Επίσης, με την χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων βιομάζας εισέρχονται επιπλέον παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τις ανακτήσεις των κυανοτοξινών, όπως ο όγκος του διαλύματος εμβολιασμού, ο χρόνος «επάσης» του δείγματος και η ομοιόμορφη κατανομή των κυανοτοξινών στο δείγμα. Ειδικότερα, ο όγκος του διαλύματος εμβολιασμού μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανάκτηση, καθώς με την χρήση μεγάλου όγκου θα υπάρχει πλεονάζων διαλύτης. Συνεπώς, οι κυανοτοξίνες μπορεί να παραμείνουν στον διαλύτη του προτύπου και στην συνέχεια να περάσουν απ' ευθείας στο εκχυλιστικό διάλυμα δίνοντας μη αντιπροσωπευτικές ανακτήσεις. Ένας τρόπος αντιμετώπισης αυτού του θέματος είναι η «επάση» του δείγματος, δηλαδή η παραμονή του δείγματος βιομάζας στο διάλυμα εμβολιασμού για ένα χρονικό διάστημα, ώστε να εξατμισθεί ο διαλύτης. Όμως και σε αυτή την περίπτωση ο χρόνος επάσης αλλά και οι συνθήκες επάσης (π.χ. υψηλή θερμοκρασία) επηρεάζουν σημαντικά τις ανακτήσεις, καθώς κάποιες κυανοτοξίνες αφού δεν βρίσκονται ενδοκυττάρια στα κυανοβακτήρια μπορεί να αποικοδομηθούν. Για την αποφυγή της επάσης του δείγματος, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί πολύ μικρός όγκος προτύπου διαλύματος εμβολιασμού. Σε αυτή την περίπτωση όμως οι κυανοτοξίνες θα υπάρχουν συγκεντρωμένες σε ένα σημείο του δείγματος και δεν θα είναι ομοιόμορφα καταμεμημένες σε όλο το δείγμα. Να σημειωθεί ότι υπάρχει μόνο μια εργασία όπου παρατίθενται δεδομένα επικύρωσης για τον προσδιορισμών των MCs σε κυανοβακτηριακά κύτταρα, η οποία δημοσιεύτηκε πρόσφατα, αλλά χωρίς να αποκλείει όλους τους παραπάνω περιορισμούς [345].

Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν ακόμα εμπορικά διαθέσιμα CRM κυανοβακτηριακής βιομάζας, η ανάπτυξη της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε δείγμα που συλλέχθηκε από ελληνική λίμνη κατά την διάρκεια έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης και περιείχε κυανοτοξίνες. Ως βέλτιστες συνθήκες της εκχύλισης επιλέχθηκαν εκείνες που παρείχαν την μέγιστη συγκέντρωση κυανοτοξινών. Και σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης κυανοτοξινών από κυανοβακτηριακή βιομάζα χρησιμοποίησαν δείγματα που περιείχαν κυανοτοξίνες φυσικά (και όχι εμβολιασμένα δείγματα). Σε όλες αυτές τις μελέτες, ως βέλτιστες

συνθήκες επιλέχθηκαν αυτές με τις οποίες εκχυλίζεται η μέγιστη συγκέντρωση κυανοτοξινών από το δείγμα [139, 345-349].

Για την ταυτόχρονη εκχύλιση διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών (όπως CYN, ANA, NOD, MCs) οι Dahlmann et al χρησιμοποίησαν ως εκχυλιστικό διάλυμα μίγμα 50% H₂O: 50% MeOH [135]. Στην εργασία τους οι Dell' Aversano et al χρησιμοποίησαν ένα εκχυλιστικό σύστημα που αποτελούταν από H₂O και από το μίγμα ACN:H₂O:HCOOH σε αναλογία 80:19,9:0,1 αντίστοιχα [137]. Οι Chen et al για την εκχύλιση διαφορετικών κατηγοριών κυανοτοξινών δεν χρησιμοποίησαν κάποιο μίγμα με οργανικό διαλύτη, αλλά νερό με 15% CH₃COOH [141]. Και στις τρεις αυτές μελέτες, η λύση των κυττάρων γινόταν σε λουτρό υπερήχων. Αντίθετα, στις μελέτες των Graham et al [118] και Ballot et al [142] δεν πραγματοποιείται εκχύλιση των ποικίλων κυανοτοξινών με κάποιο διάλυμα, παρά μόνο προκαλείται η λύση των κυττάρων με κύκλους ψύξης – απόψυξης (freeze – thaw). Να τονισθεί ότι στις συγκεκριμένες μελέτες, όπως και στις περισσότερες μελέτες που προσδιορίζεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση μιας μόνο κατηγορίας κυανοτοξινών, δεν τεκμηριώνεται η επιλογή του εκχυλιστικού συστήματος που χρησιμοποιείται και δεν γίνεται εκτίμηση της απόδοσής του.

Είναι περιορισμένος ο αριθμός των μελετών στη βιβλιογραφία όπου παρατίθεται η αξιολόγηση κάποιων εκχυλιστικών συστημάτων. Συγκεκριμένα, οι Harada et al μελέτησαν την επίδραση τεσσάρων διαλυτών (H₂O, 0,05M HCOOH σε H₂O, MeOH και 0,05M HCOOH σε MeOH) για την αποτελεσματική εκχύλιση της ANA και κατέληξαν ότι την καλύτερη απόδοση την έχει το 0,05M HCOOH σε νερό [346]. Οι Lawton et al μελέτησαν την επίδραση τριών εκχυλιστικών συστημάτων ((1) MeOH, (2) 5% n-BuOH : 20% MeOH : 75% H₂O και (3) 0,5% CH₃COOH σε νερό) για την αποτελεσματική εκχύλιση 4 MCs (MC-LR, MC-LY, MC-LW, MC-LF) και συμπέραναν ότι την καλύτερη απόδοση την έχει η MeOH [347]. Οι Gjolme & Utkilen μελέτησαν την επίδραση τεσσάρων εκχυλιστικών ((1) MeOH, (2) 70% MeOH : 30% H₂O, (3) H₂O και (4) 5% CH₃COOH σε νερό) για την αποτελεσματική ανάκτηση της MC-RR και κατέληξαν ότι όλα τα εκχυλιστικά είχαν την ίδια απόδοση με εξαίρεση τη MeOH που παρείχε λίγο πιο χαμηλή ανάκτηση της τοξίνης [348]. Στην μελέτη των Fastner et al, όπου βασίστηκε η μέθοδος ISO 20179 για τις MCs, μελετήθηκε η επίδραση πέντε εκχυλιστικών συστημάτων ((1) H₂O, (2) MeOH, (3) 5% CH₃COOH σε νερό, (4) 75% MeOH : 20% H₂O και (5) διαδοχική εκχύλιση από MeOH ακολουθούμενη από H₂O) για την αποτελεσματική παραλαβή των MCs από τα κυανοβακτηριακά κύτταρα. Με βάση τα αποτελέσματά τους προτείνουν για την χρήση του διαλύματος 75% MeOH : 25% H₂O ή τη διαδοχική εκχύλιση [349]. Πιο πρόσφατα, οι Turner et al μελέτησαν την επίδραση επτά εκχυλιστικών διαλυμάτων, μίγματα MeOH:H₂O όπου το ποσοστό της MeOH μεταβαλλόταν από 70% έως 100%, σε δείγμα κυανοβακτηριακών κυττάρων που περιείχαν τις MC-LR & [Asp3]MC-LR. Σε αυτή την μελέτη κατέληξαν πως την βέλτιστη απόδοση την έχει το μίγμα με 80% MeOH [345]. Μόνο μία εργασία υπάρχει όπου μελετάται η επίδραση διαφόρων εκχυλιστικών στην ανάκτηση ποικίλων κατηγοριών κυανοτοξινών, αυτή των Hiller et al. Όμως και σε αυτή την εργασία εκτιμάται η εκχυλιστική ικανότητα μόνο τριών μιγμάτων διαλυτών, (1) 25% MeOH : 75% H₂O με 0.1M CH₃COOH, (2) 50% MeOH : 50% H₂O με 0.1M CH₃COOH και (3) 75% MeOH : 25% H₂O με 0.1M CH₃COOH. Στα αποτελέσματά της μελέτης συγκρίνεται η ανάκτηση των MC-LR, MC-RR και MC-YR σε συνδυασμό με την NOD και 3 saxitoxins και ως βέλτιστο εκχυλιστικό προτείνεται το 50% MeOH : 50% H₂O με 0.1M CH₃COOH [139].

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες που μελετάται μόνο η επίδραση μερικών εκχυλιστικών διαλυτών, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετάται για πρώτη φορά συστηματικά η επίδραση ποικίλων παραγόντων στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης ενός μεγάλου αριθμού

κυανοτοξινών από διαφορετικές κατηγορίες, όπως είναι ο συνδυασμός CYN, ANA και MCs αλλά και ενός μεγάλου αριθμού δομικών παραλλαγών της κατηγορίας των MCs. Επίσης, το εκχυλιστικό σύστημα που προτείνεται με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (διαδοχική εκχύλιση με 75% MeOH:25% H₂O & n-BuOH) έχει καλύτερη απόδοση από το εκχυλιστικό σύστημα που προτείνεται από την μέθοδο ISO 20179 [131], όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στο Σχήμα 10.4. Με την μέθοδο που προτείνεται μπορούν να εκχυλιστούν πολλές διαφορετικές κατηγορίες κυανοτοξινών ταυτόχρονα και επιτυγχάνεται η αξιόπιστη ταυτοποίησή τους με το σύστημα LC-MS/MS. Η μέθοδος για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή βιομάζα, που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη της παρουσίας ποικίλων κυανοτοξινών κατά την εμφάνιση επεισοδίων έντονης κυανοβακτηριακή άνθισης (blooms). Η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί για τον έλεγχο συμπληρωμάτων διατροφής (food supplements), όπως η Spirulina και άλλα συμπληρώματα από φύκη, καθώς στο παρελθόν έχει καταγραφεί η παρουσία κυανοτοξινών σε τέτοια προϊόντα του εμπορίου [350, 351].

Κεφάλαιο 11 : Μελέτη παρουσίας κυανοτοξινών σε λίμνες της Ελλάδας

Στα πλαίσια της μελέτης για την παρουσία κυανοτοξινών σε λίμνες και ταμιευτήρες νερού στην Ελλάδα συλλέχθηκαν δείγματα από 14 διαφορετικές λίμνες κατά την χρονική περίοδο 2007 – 2016. Ο χειρισμός των δειγμάτων και η ανάλυσή τους έγινε με βάση τη ροή εργασίας (workflow) που αναπτύχθηκε και περιελάμβανε τρεις διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους (Σχήμα 6.2), όπως περιγράφεται αναλυτικά στην §6.5. Με την εφαρμογή της ροής εργασίας προσδιορίστηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των κυανοτοξινών στην κυανοβακτηριακή βιομάζα και η εξωκυττάρια συγκέντρωση των κυανοτοξινών στο νερό.

11.1 Παρουσία κυανοτοξινών στην κυανοβακτηριακή βιομάζα

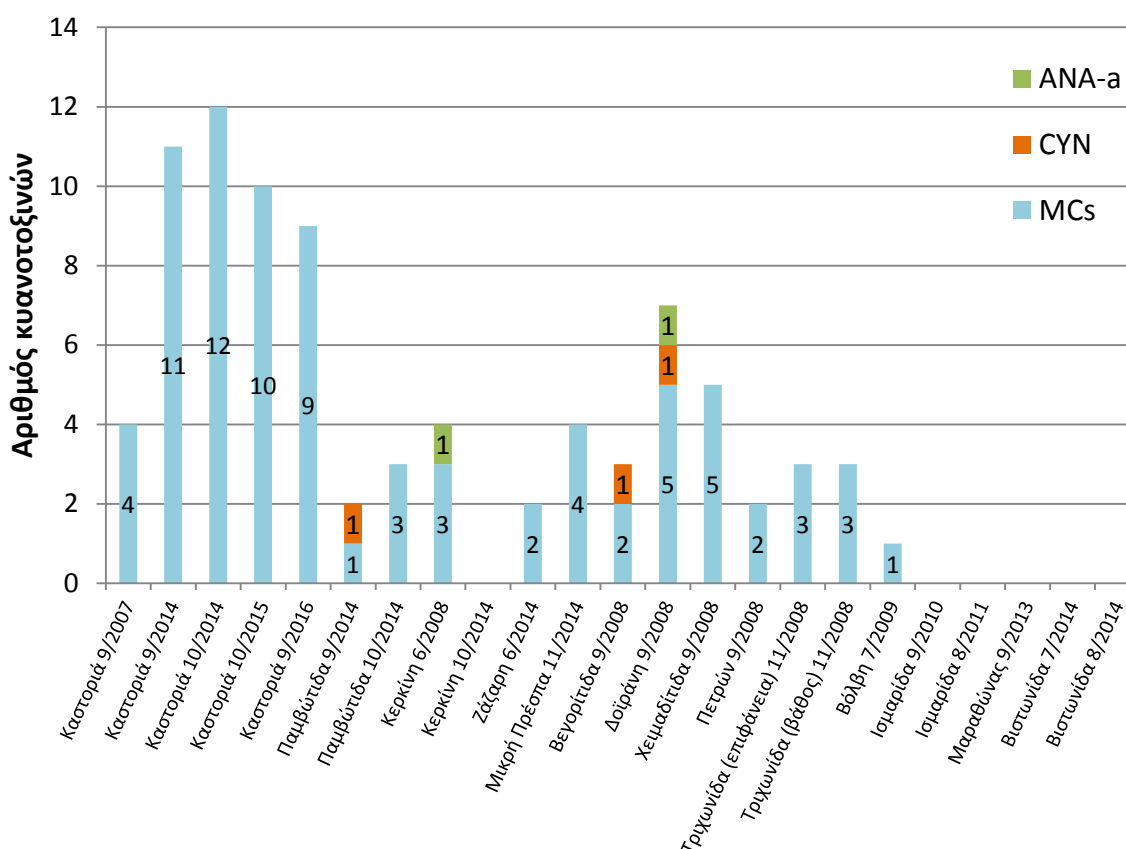
Στα δείγματα βιομάζας που συλλέχθηκαν από τις ελληνικές λίμνες ανιχνεύθηκε και ταυτοποιήθηκε η παρουσία πολλών κυανοτοξινών από διαφορετικές κατηγορίες. Οι κυανοτοξίνες που ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα κυανοβακτηριακής βιομάζας που μελετήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 11.1. Συγκεκριμένα οι ενδοκυττάριας κυανοτοξίνες που ανιχνεύθηκαν ήταν 12 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW, MC-LF), CYN και ANA. Το κυκλικό πενταπεπτιδίο NOD δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα βιομάζας από τις Ελληνικές λίμνες. Η παρουσία των [D-Asp3]MC-RR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF αναφέρεται για πρώτη φορά σε δείγματα κυανοβακτηριακής βιομάζας από λίμνες της Ελλάδας με την χρήση αξιόπιστης αναλυτικής τεχνικής, όπως είναι το LC-MS/MS.

Πίνακας 11.1: Παρουσία κυανοτοξινών σε δείγματα κυανοβακτηριακής βιομάζας

Λίμνη / Ταμιευτήρας νερού	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Κυανοτοξίνες που ταυτοποιήθηκαν στην βιομάζα
Καστοριά	09/2007	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR
Καστοριά	09/2014	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW, MC-LF
Καστοριά	10/2014	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW, MC-LF
Καστοριά	10/2015	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW
Καστοριά	09/2016	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LW
Παμβώτιδα	09/2014	CYN , MC-RR
Παμβώτιδα	10/2014	MC-RR, MC-YR, MC-LR
Κερκίνη	06/2008	Anatoxin-a , MC-RR, MC-LR, MC-LW
Κερκίνη	10/2014	-
Ζάζαρη	06/2014	MC-RR, MC-YR
Μικρή Πρέσπα	11/2014	MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR
Βεγορίτιδα	09/2008	CYN , MC-RR, MC-LR
Δοϊράνη	09/2008	CYN , Anatoxin-a [D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-LY
Χειμαδίτιδα	09/2008	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-HilR
Πετρών	09/2008	MC-RR, MC-LR
Τριχωνίδα (επιφάνεια)	11/2008	[D-Asp3]MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR

Τριχωνίδα (βάθος)	11/2008	[D-Asp3]MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR
Βόλβη	07/2009	MC-RR
Ισμαρίδα	09/2010	-
Ισμαρίδα	08/2011	-
Μαραθώνας	09/2013	-
Βιστωνίδα	07/2014	-
Βιστωνίδα	08/2014	-

Από τις 14 λίμνες που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη μόνο στα δείγματα βιομάζας από τις λίμνες Ισμαρίδα, Μαραθώνα και Βιστωνίδα δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία των υπό μελέτη κυανοτοξινών. Σε όλες τις υπόλοιπες λίμνες ανιχνεύτηκε και ταυτοποιήθηκε η παρουσία MCs (Πίνακας 11.1 & Σχήμα 11.1). Να σημειωθεί ότι στο δεύτερο δείγμα βιομάζας που συλλέχθηκε από την λίμνη Κερκίνη (10/2014) δεν ανιχνευτήκαν MCs, παρόλο που ταυτοποιήθηκε η παρουσία των MC-RR, MC-LR και MC-LW στο πρώτο δείγμα που συλλέχθηκε από τη λίμνη (6/2008).



Σχήμα 11.1 : Παρουσία κυανοτοξινών σε κυανοβακτηριακή βιομάζα από λίμνες της Ελλάδας

Στην λίμνη Καστοριά ταυτοποιήθηκε η μεγαλύτερη ποικιλία κυανοτοξινών στα δείγματα βιομάζας (Σχήμα 11.1) που συλλέχθηκαν κατά την χρονική περίοδο 2014 - 2016. Στο δείγμα βιομάζας που συλλέχθηκε το Οκτώβριο του 2014 ανιχνεύθηκαν και οι 12 MCs, και αποτελούν το μεγαλύτερο αριθμό κυανοτοξινών που ταυτοποιήθηκαν σε ένα δείγμα κατά την παρούσα μελέτη. Μεγάλη ποικιλία κυανοτοξινών υπήρχε και στο δείγμα βιομάζας από τη λίμνη Δοϊράνη (9/2008) όπου ταυτοποιήθηκε η παρουσία των CYN, ANA και 5 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-

LY). Την ίδια χρονική περίοδο (9/2008) ανιχνεύθηκαν στη λίμνη Χειμαδίτιδα 5 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR, MC-HiLR) και στη λίμνη Τριχωνίδα 3 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR). Στο δείγμα βιομάζας από τη λίμνη Κερκίνη που συλλέχθηκε τον Ιούνιο 2008 ταυτοποιήθηκε η παρουσία των ANA και 3 MCs (MC-RR, MC-LR, MC-LW). Στις υπόλοιπες λίμνες ανιχνεύθηκε μικρός αριθμός κυανοτοξινών, με εξαίρεση τα δείγματα βιομάζας από τις λίμνες Ισμαρίδα, Μαραθώνα και Βιστωνίδα όπου δεν ανιχνεύθηκε κάποια από τις υπό μελέτη κυανοτοξίνες.

Η κατηγορία κυανοτοξινών που κυριαρχούσε στα δείγματα βιομάζας των ελληνικών λιμνών ήταν οι MCs (ανιχνεύθηκαν σε 11 από τις 14 λίμνες και σε 18 από τα 23 δείγματα βιομάζας). Η MC-RR ήταν η πιο συχνά ανιχνευόμενη MC (ταυτοποιήθηκε σε 10 λίμνες) ακολουθούμενη από τις MC-LR, MC-YR και [D-Asp3]MC-RR που βρέθηκαν σε 8, 7 και 4 λίμνες αντίστοιχα.

Να αναφερθεί ότι στις περισσότερες μελέτες που έγιναν στο παρελθόν, η ανάλυση των κυανοτοξινών πραγματοποιήθηκε σε δείγματα λίμνης που ήταν μαζί η βιομάζα και το νερό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένας συγκεκριμένος όγκος δείγματος διηθούταν και η βιομάζα που είχε συλλεχθεί στο φίλτρο στη συνέχεια εκχυλιζόταν για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών. Η συγκέντρωση των κυανοτοξινών που προσδιοριζόταν με αυτό τον τρόπο εκφραζόταν ως μg ενδοκυττάριας κυανοτοξίνης προς τον όγκο (L) του δείγματος νερού που διηθήθηκε. Κατά την διάρκεια μιας έντονης κυανοβακτηριακή άνθισης, τα κυανοβακτήρια τείνουν να συσσωρεύονται στην επιφάνεια του νερού σχηματίζοντας ένα στρώμα βιομάζας. Συνεπώς, δεν υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή των κυανοβακτηρίων στην υδάτινη στήλη και άρα η συγκέντρωση εκφρασμένη ως μg/L πολλές φορές μπορεί να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική τιμή αλλά να είναι υπερεκτιμημένη. Επίσης, με τη συγκεκριμένη προσέγγιση δεν προσδιορίζεται η εξωκυττάρια συγκέντρωση των κυανοτοξινών που βρίσκονται στο νερό. Στην παρούσα εργασία, με τη ροή εργασίας που ακολουθήθηκε, προσδιορίστηκε ξεχωριστά η εξωκυττάρια συγκέντρωση των κυανοτοξινών στο διηθημένο νερό (μg/L) από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της λυοφιλοποιημένης βιομάζας. Τα αποτελέσματα από την μελέτη της παρουσίας κυανοτοξινών στο νερό περιγράφονται αναλυτικά στην § 11.2. Για να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των κυανοτοξινών εκφράστηκε και με τους δύο τρόπους: α) ως ng τοξίνης ανά mg ξηρού βάρους (dry weight, dw) λυοφιλοποιημένης βιομάζας (Πίνακας 11.2) και β) ως μg τοξίνης ανά όγκο (L) δείγματος νερού που διηθήθηκε (Πίνακας 11.3).

Οι ενδοκυττάριας συγκεντρώσεις για κάθε κυανοτοξίνη, που προσδιορίστηκαν στα δείγματα βιομάζας από ελληνικές λίμνες, παρατίθενται στους Πίνακες 11.2 & 11.3 και στο Σχήμα 11.2. Κάποια από τα δείγματα που αναλύθηκαν, όπως αυτά της Καστοριάς, είχαν πάρα πολύ υψηλές συγκεντρώσεις με αποτέλεσμα να αυξάνουν σημαντικά τη μέση συγκέντρωση όλων των δειγμάτων. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκε και η διάμεση συγκέντρωση που είναι ανθεκτικότερο στατιστικό στοιχείο και δεν επηρεάζεται από τις ισχυρά αποκλίνουσες τιμές (outliers).

Πίνακας 11.2: Ενδοκυττάρια συγκέντρωση κυανοτοξινών σε βιομάζα (ng/mg dw - ξηρού βάρους)

Δείγμα	CYN	ANA	[D- Asp3] MC-RR	MC-RR	NOD	MC-YR	MC- HtyR	[D- Asp3] MC-LR	MC-LR	MC- HilR	MC- WR	MC-LA	MC-LY	MC- LW	MC-LF
Καστοριά 09/2007	M.A.	M.A.	<LOQ	24.6	M.A.	2.77	M.A.	M.A.	13.4	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Καστοριά 09/2014	M.A.	M.A.	34.0	430	M.A.	71.5	M.A.	26.8	458	13.3	12.7	<LOQ	7.46	2.94	<LOQ
Καστοριά 10/2014	M.A.	M.A.	20.9	632	M.A.	93.2	2.94	13.5	368	15.7	11.2	<LOQ	8.73	2.77	2.50
Καστοριά 10/2015	M.A.	M.A.	16.6	738	M.A.	128	M.A.	13.4	382	10.2	9.30	1.32	3.41	<LOQ	<LOQ
Καστοριά 09/2016	M.A.	M.A.	19.9	754	M.A.	113	M.A.	8.00	391	18.7	10.7	<LOQ	M.A.	<LOQ	M.A.
Παμβώτιδα 09/2014	<LOQ	M.A.	M.A.	1.06	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Παμβώτιδα 10/2014	M.A.	M.A.	M.A.	4.50	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.	2.12	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Κερκίνη 06/2008	M.A.	61.7	M.A.	3.42	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	14.0	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.
Κερκίνη 10/2014	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Ζάζαρη 06/2014	M.A.	M.A.	M.A.	10.5	M.A.	8.19	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μικρή Πρέσπα 11/2014	M.A.	M.A.	M.A.	3.54	M.A.	<LOQ	M.A.	<LOQ	<LOQ	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βεγορίτιδα 09/2008	<LOQ	M.A.	M.A.	5.09	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	2.14	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.

Δοϊράνη 09/2008	1.72	65.5	<LOQ	25.6	M.A.	4.95	M.A.	M.A.	12.1	M.A.	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.
Χειμαδίτιδα 09/2008	M.A.	M.A.	1.3	20.1	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.	3.44	<LOQ	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Πετρών 09/2008	M.A.	M.A.	M.A.	0.84	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	1.96	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Τριχωνίδα 11/2008 επιφάνεια	M.A.	M.A.	175	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.	4.93	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Τριχωνίδα 11/2008 βάθος	M.A.	M.A.	1.43	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βόλβη 07/2009	M.A.	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Ισμαρίδα 09/2010	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Ισμαρίδα 08/2011	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μαραθώνας 09/2013	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βιστωνίδα 07/2014	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βιστωνίδα 08/2014	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μέση τιμή	<LOQ	63.6	30.0	177	M.A.	35.7	2.94	9.68	138	11.8	11.0	<LOQ	6.53	<LOQ	<LOQ
Διάμεση τιμή	<LOQ	63.6	16.6	10.5	M.A.	3.86	2.94	8.00	12.7	13.3	11.0	<LOQ	7.46	<LOQ	<LOQ

M.A.: Μη ανιχνεύσιμη

<LOQ: Μικρότερο του ορίου ποσοτικοποίησης, αλλά μεγαλύτερο του ορίου ανίχνευσης

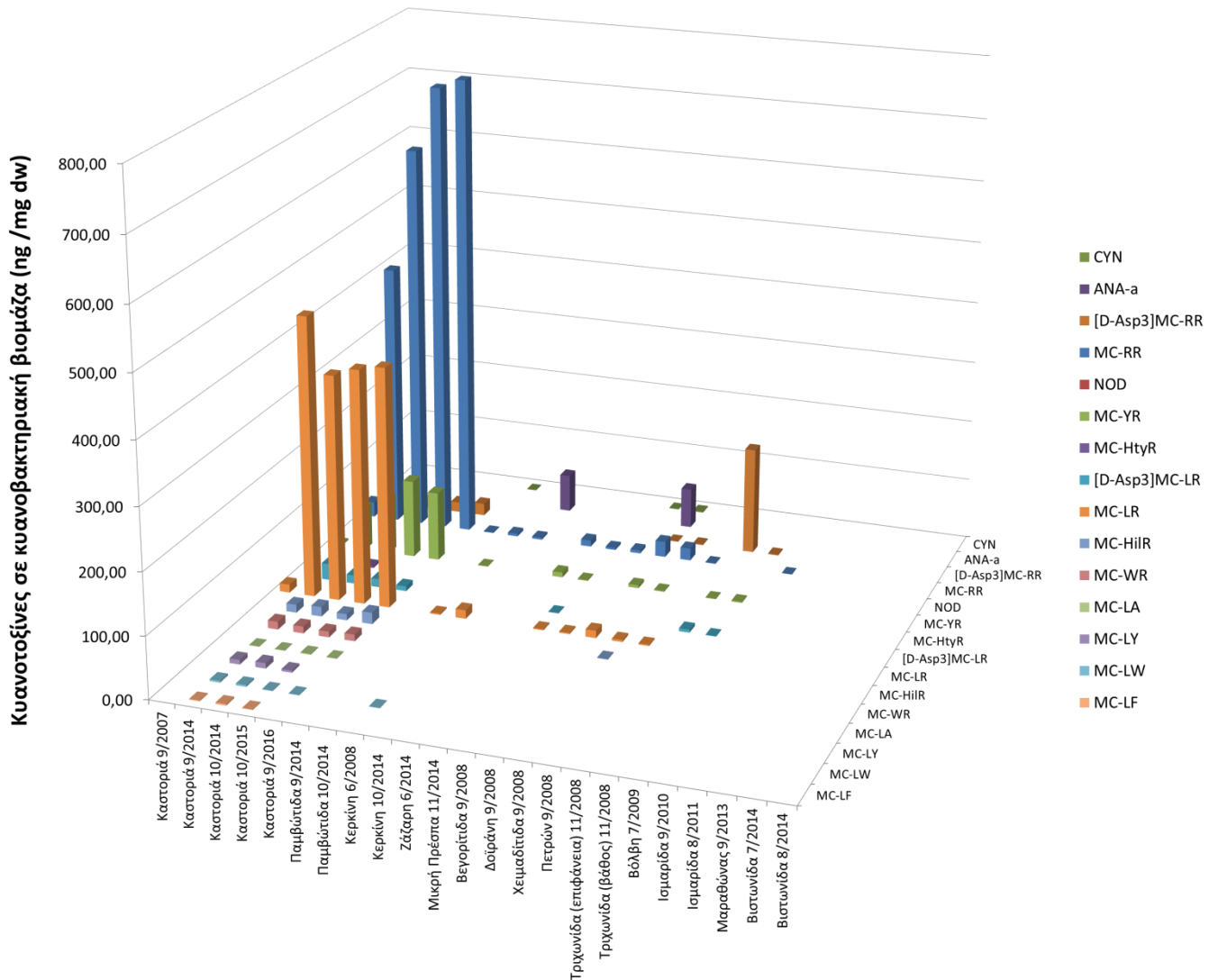
Πίνακας 11.3: Ενδοκυττάρια συγκέντρωση κυανοτοξινών σε βιομάζα (εκφρασμένη σε µg/L)

Δείγμα	CYN	ANA	[D- Asp3] MC-RR	MC-RR	NOD	MC-YR	MC- HtyR	[D- Asp3] MC-LR	MC-LR	MC- HilR	MC- WR	MC-LA	MC-LY	MC- LW	MC-LF
Καστοριά 09/2007	M.A.	M.A.	<LOQ	0.403	M.A.	0.045	M.A.	M.A.	0.219	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Καστοριά 09/2014	M.A.	M.A.	3.40	43.0	M.A.	7.15	M.A.	2.68	45.8	1.33	1.27	<LOQ	0.746	0.294	<LOQ
Καστοριά 10/2014	M.A.	M.A.	2.09	63.2	M.A.	9.32	0.294	1.35	36.8	1.57	1.12	<LOQ	0.873	0.277	0.250
Καστοριά 10/2015	M.A.	M.A.	1.66	73.8	M.A.	12.8	M.A.	1.34	38.2	1.02	0.93	0.130	0.341	<LOQ	<LOQ
Καστοριά 09/2016	M.A.	M.A.	1.99	75.4	M.A.	11.3	M.A.	0.800	39.1	1.87	1.07	<LOQ	M.A.	<LOQ	M.A.
Παμβώτιδα 09/2014	<LOQ	M.A.	M.A.	0.106	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Παμβώτιδα 10/2014	M.A.	M.A.	M.A.	0.450	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.	0.212	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Κερκίνη 06/2008	M.A.	0.607	M.A.	0.034	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	0.137	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.
Κερκίνη 10/2014	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Ζάζαρη 06/2014	M.A.	M.A.	M.A.	1.05	M.A.	0.819	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μικρή Πρέσπα 11/2014	M.A.	M.A.	M.A.	0.354	M.A.	<LOQ	M.A.	<LOQ	<LOQ	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βεγορίτιδα 09/2008	<LOQ	M.A.	M.A.	0.118	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	0.049	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.

Δοϊράνη 09/2008	0.024	0.926	<LOQ	0.363	M.A.	0.070	M.A.	M.A.	0.171	M.A.	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.
Χειμαδίτιδα 09/2008	M.A.	M.A.	0.076	1.16	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.	0.198	<LOQ	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Πετρών 09/2008	M.A.	M.A.	M.A.	0.003	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	0.006	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Τριχωνίδα 11/2008 επιφάνεια	M.A.	M.A.	2.62	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.	0.074	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Τριχωνίδα 11/2008 βάθος	M.A.	M.A.	0.020	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βόλβη 07/2009	M.A.	M.A.	M.A.	<LOQ	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Ισμαρίδα 09/2010	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Ισμαρίδα 08/2011	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μαραθώνας 09/2013	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βιστωνίδα 07/2014	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βιστωνίδα 08/2014	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μέση τιμή	0.012	0.767	1.32	17.3	M.A.	3.49	0.294	0.901	13.4	1.17	1.10	0.067	0.653	0.145	0.154
Διάμεση τιμή	0.007	0.767	1.66	0.403	M.A.	0.116	0.294	0.800	0.205	1.33	1.10	0.046	0.746	0.080	0.133

M.A.: Μη ανιχνεύσιμη

<LOQ: Μικρότερο του ορίου ποσοτικοποίησης, αλλά μεγαλύτερο του ορίου ανίχνευσης



Σχήμα 11.2 : Παρουσία κυανοτοξινών και η συγκέντρωσή τους (ng/mg dw) σε κυανοβακτηριακή βιομάζα από λίμνες της Ελλάδας

Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι τις υψηλότερες συγκεντρώσεις τις είχαν οι MCs. Η MC-RR παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση απ' όλες, που έφτασε τα 754 ng/mg dw βιομάζας ή 75,4 μg/L (λίμνη Καστοριά, 09/2016). Η μέση συγκέντρωση της MC-RR στα δείγματα βιομάζας ήταν 177 ng/mg dw (17,3 μg/L) και η διάμεση συγκέντρωση ήταν 10,5 ng/mg dw (0,403 μg/L). Η κυανοτοξίνη με την δεύτερη υψηλότερη συγκέντρωση στα δείγματα βιομάζας από ελληνικές λίμνες ήταν η MC-LR, η οποία έφτασε τα 458 ng/mg dw (45,8 μg/L) στο δείγμα από τη λίμνη Καστοριά (09/2014). Η μέση συγκέντρωση της MC-LR στα δείγματα βιομάζας ήταν 138 ng/mg dw (13,4 μg/L) και η διάμεση τιμή ήταν 12,7 ng/mg dw (0,205 μg/L). Οι υπόλοιπες MCs που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα βιομάζας από τις ελληνικές λίμνες ([D-Asp3]MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-HiLR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW, MC-LF) προσδιορίστηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Η συνολική συγκέντρωση των MCs (total MCs, TMCs) στη βιομάζα από τις ελληνικές λίμνες κυμάνθηκε από <LOQ έως 1316 ng/mg dw ή αλλιώς από <LOQ έως 132 μg/L (λίμνη Καστοριά, 9/2016).

Η παρουσία των MCs και ειδικότερα η παρουσία των MC-RR, MC-LR και MC-YR σε υψηλές συγκεντρώσεις στις λίμνες της Ελλάδας είναι σε συμφωνία με πολλές μελέτες από όλο τον κόσμο που αποδεικνύουν ότι οι MCs που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες από τα κυανοβακτήρια *Microcystis* spp. είναι κυρίως οι MC-RR, MC-LR και MC-YR σε ποικίλες αναλογίες [125, 352, 353], ενώ οι πιο υδρόφοβες MCs (π.χ. MC-LA, MC-LW, MC-LF) και κάποιες απομεθυλιωμένες MCs (π.χ. [D-Asp3]MC-RR και [D-Asp3]MC-LR) σπάνια υπερεισχύουν [118, 354, 355].

Η παρουσία των MCs στις ελληνικές λίμνες έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες, όπως παρατίθεται αναλυτικά στην § 1.7. Συνοπτικά, σε μελέτη που έγινε από τους Gkelis et. al. (2015) δείγματα κυανοβακτηριακής βιομάζας από διάφορες λίμνες της Ελλάδας εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με ELISA, PPIA και LC-DAD [167]. Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, καθώς οι MCs ανιχνεύθηκαν στο 95% των δειγμάτων με επικρατέστερες τις MC-RR και MC-LR. Σε προηγούμενη μελέτη που έγινε σε έξι λίμνες και ταμειυτήρες νερού [166], οι MCs ήταν και πάλι η επικρατέστερη κατηγορία κυανοτοξινών και η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους έφτασε τα 40, 15, 8, 70 και 98 µg/L για τις λίμνες Δοϊράνη, Κερκίνη, Βόλβη, Καστοριά και Παμβώτιδα, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν για τις ίδιες λίμνες και σε παλιότερη μελέτη (άνοιξη 2005) όπου προσδιορίστηκε η TMCs συγκέντρωση με ELISA [158]. Στην παρούσα εργασία, οι ενδοκυττάριας TMCs συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν για τις λίμνες Δοϊράνη, Κερκίνη, Βόλβη, Καστοριά και Παμβώτιδα ήταν 43,1, 18,1, <LOQ, 1316, 7,51 ng/mg dw που εκφράζονται και ως 0,610, 0,178, <LOQ, 132 και 0,751 µg/L, αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που 12 διαφορετικές MCs διαχωρίζονται χρωματογραφικά και ταυτοποιείται η παρουσία τους σε αυτές τις λίμνες, ενώ παράλληλα προσδιορίζεται η συγκέντρωση της κάθε μίας ξεχωριστά με την χρήση κατάλληλης και αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου (LC-MS/MS). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα, είναι προφανές ότι οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν με την τεχνική LC-MS/MS για τις MCs είναι σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με αυτές που προσδιορίστηκαν σε προηγούμενες μελέτες για τις ίδιες λίμνες με την τεχνική ELISA.

Οι λίμνες Καστοριά, Μικρή Πρέσπα, Παμβώτιδα και Κερκίνη έχουν μελετηθεί στο παρελθόν και σε άλλη εργασία, όπου ο προσδιορισμός των κυανοτοξινών έγινε με HPLC-DAD [150]. Σε εκείνη τη μελέτη, η λίμνη Καστοριά παρουσίασε μέγιστη TMCs συγκέντρωση ίση με 2564,3 ng/mg, που προέκυψε από το άθροισμα των MC-LR, [D-Asp3]MC-LR, MC-RR, [Dha7]MC-RR, MC-YR και MC-LA. Οι λίμνες Μικρή Πρέσπα και Παμβώτιδα, επίσης είχαν MCs σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις, που ξεπερνούσαν τα 1100 ng/mg. Στη λίμνη Κερκίνη ανιχνεύθηκαν οι M-LR, MC-RR και MC-YR και η μέγιστη TMCs συγκέντρωση έφτασε τα 598,6 ng/mg, ενώ στη λίμνη Βιστωνίδα ανιχνεύθηκε η MC-LR με συγκέντρωση: 317,2 ng/mg. Στην παρούσα εργασία, ταυτοποιήθηκε στις συγκεκριμένες λίμνες ένας μεγάλος αριθμός MCs. Ειδικότερα, στα δείγματα από την λίμνη Καστοριά ανιχνεύθηκαν περισσότερες MCs σε σχέση με τις προηγούμενες μελέτες. Να τονισθεί, επίσης, ότι είναι η πρώτη φορά που ταυτοποιείται, με την χρήση LC-MS/MS, η παρουσία των [D-Asp3]MC-LR, [D-Asp3]MC-RR, MC-WR, MC-HtyR, MC-HilR, MC-LY, MC-LW και MC-LF σε κυανοβακτηριακή βιομάζα από την Καστοριά και γενικότερα στην Ελλάδα. Στα δείγματα βιομάζας που συλλέχθηκαν στη παρούσα μελέτη από τις λίμνες Καστοριά (2016), Μικρή Πρέσπα (2014), Παμβώτιδα (2014) και Κερκίνη (2008), οι TMCs συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν 1316, 7,19, 7,51 και 18,1 ng/mg, αντίστοιχα. Στα δείγματα βιομάζας από την λίμνη Βιστωνίδα (2014) δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία MCs.

Στα δείγματα βιομάζας που συλλέχθηκαν από την λίμνη Τριχωνίδα το Νοέμβριο 2008, ανιχνεύθηκε η παρουσία των απο-μεθυλιωμένων MCs, [D-Asp3]MC-RR (μέγιστη συγκέντρωση 173 ng/mg) και [D-Asp3]MC-LR (μέγιστη συγκέντρωση 4,93 ng/mg) ενώ δεν ανιχνεύθηκαν οι «μεθυλιωμένες» μορφές τους, δηλαδή οι MC-RR και MC-LR που ανιχνεύονται συνήθως. Από μικροσκοπική μελέτη που έγινε στα δείγματα προέκυψε ότι τα κυρίαρχα είδη κυανοβακτηρίων στο δείγμα από την επιφάνεια της λίμνης ήταν τα *Planktothrix rubescens* και *Aphanizomenon flos-aquae*, ενώ στο δείγμα από το βάθος της λίμνης υπήρχε μόνο το κυανοβακτήριο *P.rubescens*, το οποίο είναι γνωστό ότι αναπτύσσεται περισσότερο σε μεγαλύτερα βάθη νερού [356]. Η ταυτοποίηση της παρουσίας των απομεθυλιωμένων μορφών MCs είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν ότι τα κυανοβακτηριακά γένη *Planktothrix* και κάποια *Dolichospermum sp.* τείνουν να παράγουν κυρίως απομεθυλιωμένες MCs, όπως [D-Asp3] MC-RR, [D-Asp3, Dhb7] MC-RR, [D-Asp3] MC-LR και [D-Asp3] MC-HtyR [357-359]. Ωστόσο, η παρουσία απομεθυλιωμένων μορφών MCs σε μία λίμνη μπορεί να έχει περιοδικές τάσεις, οι οποίες εναλλάσσονται ανάμεσα σε περιόδους που οι απομεθυλιωμένες μορφές είναι οι μοναδικές μορφές MCs στη λίμνη και σε περιόδους που συνυπάρχουν με άλλες μορφές MCs [359]. Η απουσία των μεθυλιωμένων MCs μπορεί να οφείλεται και στην απουσία των κυανοβακτηριακών ειδών *Microcystis sp.*, *Cylindrospermopsis raciborskii* ή *Anabaena flos-aquae* που τις παράγουν [47].

Στα δείγματα που συλλέχθηκαν από τη λίμνη Παμβώτιδα η ενδοκυττάρια συγκέντρωση των MCs ήταν αρκετά χαμηλή, με τη μέγιστη TMCs να είναι 7,51 ng/mg dw (0,751 μg/L) στο δείγμα του Οκτωβρίου 2014. Στη λίμνη ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά και η παρουσία της CYN σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (<LOQ). Σε προηγούμενες μελέτες, οι ενδοκυττάρια συγκέντρωση των MCs στην λίμνη Παμβώτιδα, που προσδιορίστηκε με την τεχνική ELISA, είχε κυμανθεί την περίοδο 08/2004 – 12/2005 από 0,001 έως 19,5 μg ισοδύναμα MC-LR/L [154], το 2008 είχε κυμανθεί από 0,15 έως 15,21 μg ισοδύναμα MC-LR/L [163] και την περίοδο 1/2018 – 2/2009, είχε κυμανθεί από <1 έως 19 μg ισοδύναμα MC-LR/L [165].

Η τεχνητή λίμνη του Μαραθώνα, αποτελεί ένας από τους ταμειυτήρες πόσιμοι νερού της Αθήνας, και στο παρελθόν έχει καταγραφεί περιοδικά ο σχηματισμός κυανοβακτηριακών ανθίσεων [161, 173]. Στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία κυανοτοξινών στο δείγμα βιομάζας που συλλέχθηκε από τη λίμνη του Μαραθώνα. Όμως σε άλλη μελέτη που κάναμε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικών Αναλύσεων του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», και τα αποτελέσματά της έχουν ήδη παρουσιαστεί [173, 360], είχε συλλεχθεί δείγμα βιομάζας από την λίμνη του Μαραθώνα κατά την διάρκεια έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης τον Οκτώβριο 2010 και είχε ταυτοποιηθεί η παρουσία των MC-RR, MC-YR και MC-LR σε συγκεντρώσεις 1956, 555 και 382 ng/mg dw, αντίστοιχα.

Στην παρούσα μελέτη, εκτός από τις MCs, ταυτοποιήθηκε και η παρουσία των κυανοτοξινών CYN και ANA στα δείγματα βιομάζας που συλλέχθηκαν από ελληνικές λίμνες (Πίνακες 11.1, 11.2 και 11.3). Η παρουσία της CYN ταυτοποιήθηκε στα δείγματα από τις λίμνες Παμβώτιδα, Βεγορίτιδα και Δοϊράνη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτή είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται η ταυτοποίηση της CYN σε δείγματα από ελληνικές λίμνες με την χρήση LC-MS/MS. Σε προηγούμενη μελέτη έχει καταγραφεί η ανίχνευση της CYN στις λίμνες Βόλβη, Παμβώτιδα και Κάρλα με ELISA [166], χωρίς όμως να έχει γίνει αξιόπιστη ταυτοποίησή της με την εφαρμογή άλλης μεθόδου. Η ANA προσδιορίστηκε στα δείγματα βιομάζας από τις λίμνες Κερκίνη (6/2018) και Δοϊράνη (9/2008) σε συγκεντρώσεις 61,7 ng/mg dw και 61,5 ng/mg dw, αντίστοιχα. Και σε αυτές τις περιπτώσεις είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται η ταυτοποίηση της ANA στις συγκεκριμένες λίμνες της Ελλάδας με την

τεχνική LC-MS/MS, καθώς έχει καταγραφεί μόνο η ανίχνευση της ANA στην λίμνη Κερκίνη το 2008 με την τεχνική ELISA [166].

11.2 Παρουσία κυανοτοξινών στο νερό

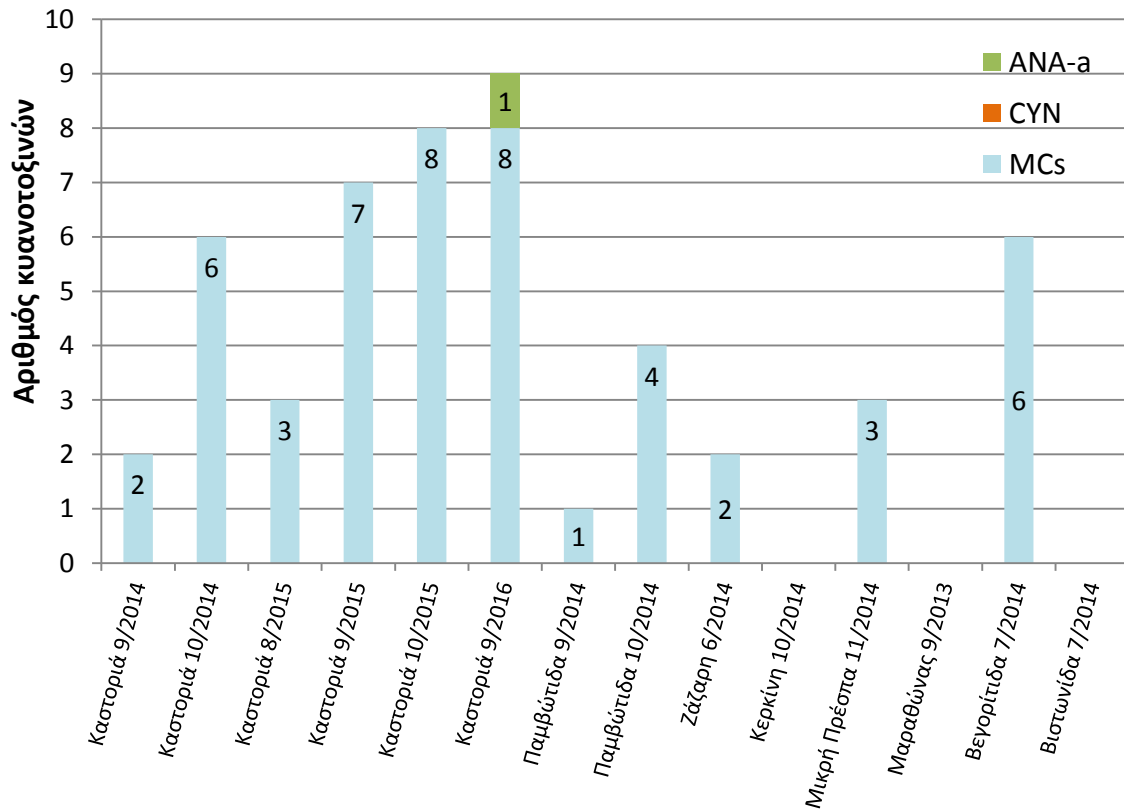
Η ανάλυση του διηθημένου νερού από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τις ελληνικές λίμνες φανέρωσε την παρουσία μεγάλης ποικιλίας κυανοτοξινών. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα που παρατίθενται στον Πίνακα 11.4 και στο Σχήμα 11.3, οι εξωκυττάριες κυανοτοξίνες που προσδιορίστηκαν ήταν κυρίως MCs (δηλ. [D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HiIR, MC-LY, MC-WR και MC-LA), ενώ ταυτοποιήθηκε και η παρουσία της ANA. Οι CYN και NOD δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα νερού λίμνης. Ειδικότερα, τα περισσότερα δείγματα διηθημένου νερού που αναλύθηκαν περιείχαν MCs και κυρίως MC-RR (11 από τα 14 δείγματα) και MC-LR (10 από τα 14 δείγματα). Σε ένα δείγμα διηθημένου νερού ελληνικής λίμνης ταυτοποιήθηκε και η παρουσία της ANA.

Πίνακας 11.4: Παρουσία κυανοτοξινών σε δείγματα νερού

Λίμνη / Ταμιευτήρας νερού	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Κυανοτοξίνες που ταυτοποιήθηκαν στο νερό
Καστοριά	9/2014	MC-RR, MC-LR
Καστοριά	10/2014	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HiIR
Καστοριά	8/2015	MC-RR, MC-YR, MC-LR,
Καστοριά	9/2015	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HiIR, MC-LY
Καστοριά	10/2015	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HiIR, MC-WR, MC-LA
Καστοριά	9/2016	Anatoxin-a, [D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HiIR, MC-LY, MC-LW
Παμβώτιδα	9/2014	MC-RR
Παμβώτιδα	10/2014	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR
Ζάζαρη	6/2014	MC-RR, MC-LR
Κερκίνη	10/2014	-
Μικρή Πρέσπα	11/2014	MC-RR, MC-YR, MC-LR
Μαραθώνας	9/2013	-
Βεγορίτιδα	7/2014	[D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-LY
Βιστωνίδα	7/2014	-

Ο μεγαλύτερος αριθμός και ποικιλία εξωκυττάριων κυανοτοξινών παρατηρήθηκε σχεδόν σε όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν από την λίμνη Καστοριά, κατά τις διάφορες χρονικές περιόδους από το 2014 έως το 2016 (Σχήμα 11.3). Ο μεγαλύτερος αριθμός MCs υπήρχε στα δείγματα που συλλέχθηκαν από την λίμνη Καστοριά τον Οκτώβριο του 2015 και το Σεπτέμβριο του 2016, όπου ταυτοποιήθηκε η παρουσία 8 διαφορετικών MCs. Στον Πίνακα 11.4 παρατίθενται οι MCs που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα νερού που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από μελέτη που έχει ήδη δημοσιευθεί, όπου καταγράφηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία η παρουσία ποικίλων MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HiIR, MC-WR, MC-LA και MC-LY) στο νερό της λίμνης Καστοριάς [175]. Στο δείγμα από την λίμνη

Βεγορίτιδα (Σεπτέμβριος 2014) ταυτοποιήθηκαν 6 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-LY), στη λίμνη Παμβώτιδα (Οκτώβριος 2014) ταυτοποιήθηκαν 4 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR) και στην λίμνη Μικρή Πρέσπα 3 MCs (MC-RR, MC-YR, MC-LR). Στα δείγματα διηθημένου νερού που μελετήθηκαν από τις λίμνες Κερκίνη (10/2014), Βιστωνίδα (9/2014) και Μαραθώνα (9/2013) δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία κυανοτοξινών.



Σχήμα 11.3 : Παρουσία κυανοτοξινών σε νερό από λίμνες της Ελλάδας

Οι MC-RR και MC-LR ανιχνεύθηκαν σε πέντε λίμνες και ήταν από τις κυανοτοξίνες με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στα δείγματα διηθημένου νερού (Πίνακας 11.5). Συγκεκριμένα, η μέγιστη συγκέντρωσή της MC-RR ήταν 338 $\mu\text{g/L}$ και προσδιορίστηκε στο δείγμα που συλλέχθηκε από τη λίμνη Καστοριά τον Οκτώβριο του 2014. Η μέση συγκέντρωση της MC-RR στα δείγματα διηθημένου νερού ήταν 62,1 $\mu\text{g/L}$ και η διάμεση συγκέντρωση ήταν 36,5 $\mu\text{g/L}$. Σε εξίσου υψηλές συγκεντρώσεις προσδιορίστηκε και η MC-LR, της οποίας η μέγιστη συγκέντρωση ήταν 354 $\mu\text{g/L}$ (λίμνη Καστοριά, 10/2014). Η μέση συγκέντρωση της MC-LR στα δείγματα διηθημένου νερού ήταν 69,3 $\mu\text{g/L}$ και η διάμεση συγκέντρωση ήταν 21,7 $\mu\text{g/L}$. Σε αντίστοιχη τάξη μεγέθους ήταν και οι συγκεντρώσεις της MC-YR που ανιχνεύθηκε σε τέσσερις λίμνες. Η μέγιστη συγκέντρωση της MC-YR ήταν 80,7 $\mu\text{g/L}$, ενώ η μέση και διάμεση συγκέντρωσή της στα δείγματα διηθημένου νερού ήταν 22,0 και 12,9 $\mu\text{g/L}$, αντίστοιχα. Η μέγιστη εξωκυττάρια TMC συγκέντρωση ήταν 827 $\mu\text{g/L}$ (λίμνη Καστοριά, 10/2014).

Πίνακας 11.5: Εξωκυττάρια συγκέντρωση κυανοτοξινών στο νερό (µg/L)

Δείγμα	CYN	ANA	[D- Asp3] MC-RR	MC- RR	NOD	MC- YR	MC- HtyR	[D- Asp3] MC-LR	MC-LR	MC- HilR	MC- WR	MC-LA	MC-LY	MC- LW	MC-LF
Καστοριά 9/2014	M.A.	M.A.	M.A.	12.3	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	14.8	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Καστοριά 10/2014	M.A.	M.A.	28.20	338	M.A.	80.7	M.A.	9.60	354	16.1	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Καστοριά 8/2015	M.A.	M.A.	M.A.	0.092	M.A.	0.013	M.A.	M.A.	0.072	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Καστοριά 9/2015	M.A.	M.A.	0.007	0.308	M.A.	0.074	M.A.	0.026	0.373	0.019	M.A.	M.A.	0.018	M.A.	M.A.
Καστοριά 10/2015	M.A.	M.A.	1.71	62.9	M.A.	3.60	M.A.	0.034	18.3	0.101	0.507	0.537	M.A.	M.A.	M.A.
Καστοριά 9/2016	M.A.	0.058	0.99	36.5	M.A.	4.65	M.A.	0.076	13.2	1.07	M.A.	M.A.	0.281	0.031	M.A.
Παμβώτιδα 9/2014	M.A.	M.A.	M.A.	2.8	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Παμβώτιδα 10/2014	M.A.	M.A.	<LOQ	66.9	M.A.	21.1	M.A.	M.A.	131	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Ζάζαρη 6/2014	M.A.	M.A.	M.A.	17.5	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	25.0	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Κερκίνη 10/2014	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μικρή Πρέσπα 11/2014	M.A.	M.A.	M.A.	41.4	M.A.	36.2	M.A.	M.A.	40.8	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μαραθώνας 9/2013	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Βεγορίτιδα 7/2014	M.A.	M.A.	<LOQ	104	M.A.	29.3	M.A.	10.9	96.3	M.A.	M.A.	M.A.	18.1	M.A.	M.A.
Βιστωνίδα 7/2014	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
Μέση τιμή	M.A.	0.058	6.14	62.1	M.A.	22.0	M.A.	4.13	69.3	4.32	0.507	0.537	6.13	0.031	M.A.
Διάμεση τιμή	M.A.	0.058	1.96	36.5	M.A.	12.9	M.A.	0.076	21.7	0.58	0.507	0.537	0.281	0.031	M.A.

M.A.: Μη ανιχνεύσιμη

<LOQ: Μικρότερο του ορίου ποσοτικοποίησης, αλλά μεγαλύτερο του ορίου ανίχνευσης

Σε δείγματα νερού από τη λίμνη Καστοριά, έχει γίνει και άλλη μελέτη για την παρουσία κυανοτοξινών με την μέθοδο που αναπτύχθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή και τα αποτελέσματά της έχουν ήδη δημοσιευθεί. Στη μελέτη αυτή συλλέχθηκαν δύο δείγματα από τη λίμνη Καστοριά το 2014 και το 2015. Στο δείγμα που συλλέχθηκε το 2014 ανιχνεύθηκαν κυρίως οι MC-RR, MC-YR και MC-LR σε συγκεντρώσεις 7,1, 1,5 και 9,0 μg/L, αντίστοιχα. Ακόμα, στο δείγμα ταυτοποιήθηκε η παρουσία των [D-Asp3]MC-LR, MC-HiIR, MC-WR και MC-LY ενώ η TMCs συγκέντρωση ήταν 18,8 μg/L. Το δείγμα που συλλέχθηκε το 2015 ανιχνεύθηκε μεγαλύτερος αριθμός MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HiIR, MC-WR και MC-LA MC-LY) και προσδιορίστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις κυανοτοξινών, TMC: 87,5 μg/L [175]. Σε προηγούμενη μελέτη, αναφέρεται ότι η εξωκυττάρια TMC συγκέντρωση στη λίμνη Καστοριά που προσδιορίστηκε με την τεχνική ELISA, έφτασε τα 4 μg/L. Σε παλαιότερη μελέτη που έγινε με LC-MS/MS στη λίμνη Καστοριά ανιχνεύθηκε η παρουσία των MC-RR και MC-LR σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,007 και 0,008 μg/L, αντίστοιχα) [172].

Στην λίμνη Παμβώτιδα ανιχνεύθηκαν 4 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR) στο διηθημένο νερό, σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Η μέγιστη συγκέντρωση που προσδιορίστηκε ήταν 131 μg/L για την MC-LR στο δείγμα Οκτωβρίου 2014 ενώ η TMC συγκέντρωση ήταν 219 μg/L. Στη βιομάζα του ίδιου δείγματος (10/2014) ταυτοποιήθηκαν οι MC-RR και MC-LR σε χαμηλές συγκεντρώσεις (4,50 και 2,12 ng/mg dw, αντίστοιχα), υποδηλώνοντας την παρουσία κυανοβακτηριακής άνθισης (bloom) σε προχωρημένο στάδιο όπου υπήρχε κυτταρική λύση και ελευθέρωση των κυανοτοξινών στο νερό της λίμνης. Σε προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει με ELISA, η εξωκυττάρια TMCs συγκέντρωση στην λίμνη Παμβώτιδα αναφέρεται ότι κυμάνθηκε <1 - 9 μg ισοδύναμα MC-LR/L [165], 0,01 – 7,88 μg ισοδύναμα MC-LR/L [163], 0,01 – 19,5 μg/L [154] και 0,310 – 2,4 μg/L [153].

Στη λίμνη Βεγορίτιδα (7/2014) ταυτοποιήθηκε η παρουσία 6 MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-LY) στο δείγμα διηθημένου νερού. Η μέγιστη συγκέντρωση ήταν αυτή της MC-RR (104 μg/L) και η TMC εξωκυττάρια συγκέντρωση ήταν 259 μg/L. Στη λίμνη Μικρή Πρέσπα (11/2014) ταυτοποιήθηκε η παρουσία των MC-RR, MC-YR και MC-LR σε συγκεντρώσεις 41,4, 36,2, και 40,8 μg/L, αντίστοιχα, ενώ στη λίμνη Ζάζαρη ανιχνεύθηκαν μόνο οι MC-RR (17,5 μg/L) και MC-LR (25,0 μg/L). Οι ίδιες MCs ανιχνεύθηκαν και στη λυοφιλοποιημένη βιομάζα των αντίστοιχων δειγμάτων. Με βάση τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, αυτή είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται η παρουσία συγκεκριμένων MCs στις λίμνες Βεγορίτιδα, Μικρή Πρέσπα και Ζάζαρη και γίνεται η ταυτοποίησή τους με LC-MS/MS.

Στο δείγμα που συλλέχθηκε από τον ταμιευτήρα νερού του Μαραθώνα (9/2013) δεν ανιχνεύθηκαν κυανοτοξίνες. Αντιθέτως, σε άλλη μελέτη για την παρουσία κυανοτοξινών, με την μέθοδο που αναπτύχθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή και τα αποτελέσματά της έχουν ήδη δημοσιευθεί, συλλέχθηκε δείγμα νερού από τον Μαραθώνα τον Σεπτέμβριο 2014 και ταυτοποιήθηκε η παρουσία των MC-RR (0,062 μg/L), MC-YR (0,050 μg/L), [D-Asp3]MC-LR (0,004 μg/L) και MC-LR (0,063 μg/L) [175]. Επίσης, σε συστηματική μελέτη (monitoring) που πραγματοποιήθηκε στο παρελθόν στο Μαραθώνα κατά την χρονική περίοδο 2007-2010, ταυτοποιήθηκε η παρουσία των MC-YR, MC-LR και MC-RR στο νερό, με τις συγκεντρώσεις τους να παρουσιάζουν περιοδική διακύμανση. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν σε αυτή την μελέτη ήταν 717 μg/L (MC-YR), 451 μg/L (MC-LR) και 174 μg/L (MC-RR) [173]. Οι ίδιες MCs ανιχνεύθηκαν στο νερό του Μαραθώνα και σε προηγούμενη μελέτη που έγινε με LC-MS/MS, όμως

οι συγκεντρώσεις ήταν συγκριτικά χαμηλότερες και κυμάνθηκαν μεταξύ 5 - 60 ng/L για την MC-RR, 4 - 44 ng/L για την MC-LR και <LOQ - 4 ng/L για την MC-YR [172].

Η παρουσία της ANA ταυτοποιήθηκε μόνο στο δείγμα νερού της λίμνης Καστοριάς (9/2016), σε χαμηλή συγκέντρωση 0,058 µg/L. Με βάση τα δεδομένα της βιβλιογραφίας αυτή είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται η παρουσία της ANA στην λίμνη Καστοριά και γίνεται ταυτοποίηση της με LC-MS/MS. Στο παρελθόν έχει καταγραφεί η παρουσία της ANA σε ελληνική λίμνη, με την χρήση LC-MS/MS, όμως στη μελέτη δεν διευκρινίζεται η προέλευση του δείγματος [145].

1.3 Κυανοτοξίνες στη λίμνη Καστοριά

Από τη λίμνη Καστοριά συλλέχθηκε μια σειρά δειγμάτων σε διάφορες χρονικές περιόδους κατά το 2007, 2014, 2015 και 2016. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προκύπτει ότι υπάρχει σταθερή παρουσία, μεγάλη ποικιλία και ανησυχητικά υψηλές συγκεντρώσεις κυανοτοξινών στη βιομάζα και το νερό της λίμνης, σε όλες τις περιόδους που συλλέχθηκαν δείγματα.

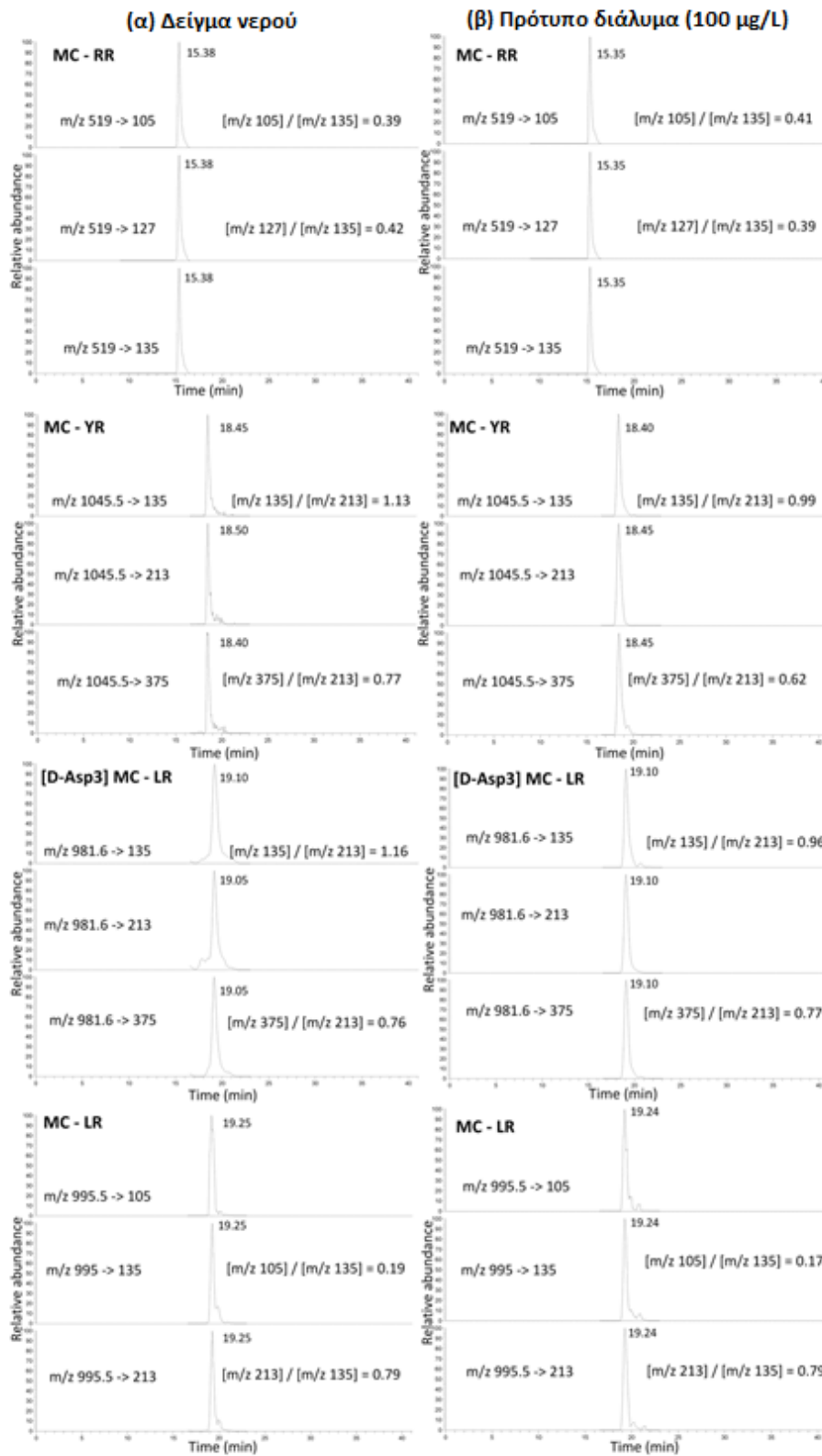
Κυανοτοξίνες από τη κατηγορία των MCs ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα βιομάζας που μελετήθηκαν, και ταυτοποιήθηκε η παρουσία όλων των υπό μελέτη MCs (Πίνακες 11.1 & 11.2). Η κυανοτοξίνη με την μεγαλύτερη συγκέντρωση στη βιομάζα της λίμνης Καστοριάς ήταν η MC-RR, της οποίας η συγκέντρωση κυμάνθηκε από 24,6 έως 754 ng/mg. Η μέση συγκέντρωσή της MC-RR στη βιομάζα της Καστοριάς ήταν 516 ng/mg (51,1 µg/L) και η διάμεση συγκέντρωση ήταν 632 ng/mg (63,2 µg/L). Σε υψηλές συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκε και η MC-LR, που κυμάνθηκαν από 13,4 έως 458 ng/mg dw βιομάζας. Η μέση και η διάμεση συγκέντρωση της MC-LR στη βιομάζα ήταν 323 ng/mg (32,0 µg/L) και 382 ng/mg (38,2 µg/L), αντίστοιχα. Υψηλές ήταν και οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν για την MC-YR που κυμάνθηκαν μεταξύ 2,77 – 128 ng/mg ή αλλιώς 0,045 – 12,8 µg/L. Τα δείγματα βιομάζας από τη λίμνη Καστοριά περιείχαν και σημαντικές ποσότητες των απομεθυλιωμένων [D-Asp3]MC-RR και [D-Asp3]MC-LR, των οποίων η μέση συγκέντρωση ήταν 18,42 και 15,43 ng/mg dw βιομάζας, αντίστοιχα. Ακόμα, στα δείγματα ταυτοποιήθηκε η παρουσία των MC-WR, MC-HtyR, MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF. Η TMCs συγκέντρωση στην λίμνη Καστοριά κυμάνθηκε από 41,4 έως 1316 ng/mg και η μέση TMC συγκέντρωση ήταν 978,2 ng/mg (97,1 µg/L).

Οι CYN και ANA δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα δείγμα βιομάζας από τη λίμνη Καστοριά, παρόλο που ταυτοποιήθηκε η παρουσία της ANA σε δείγμα νερού που συλλέχθηκε από τη λίμνη τον Σεπτέμβριο του 2016.

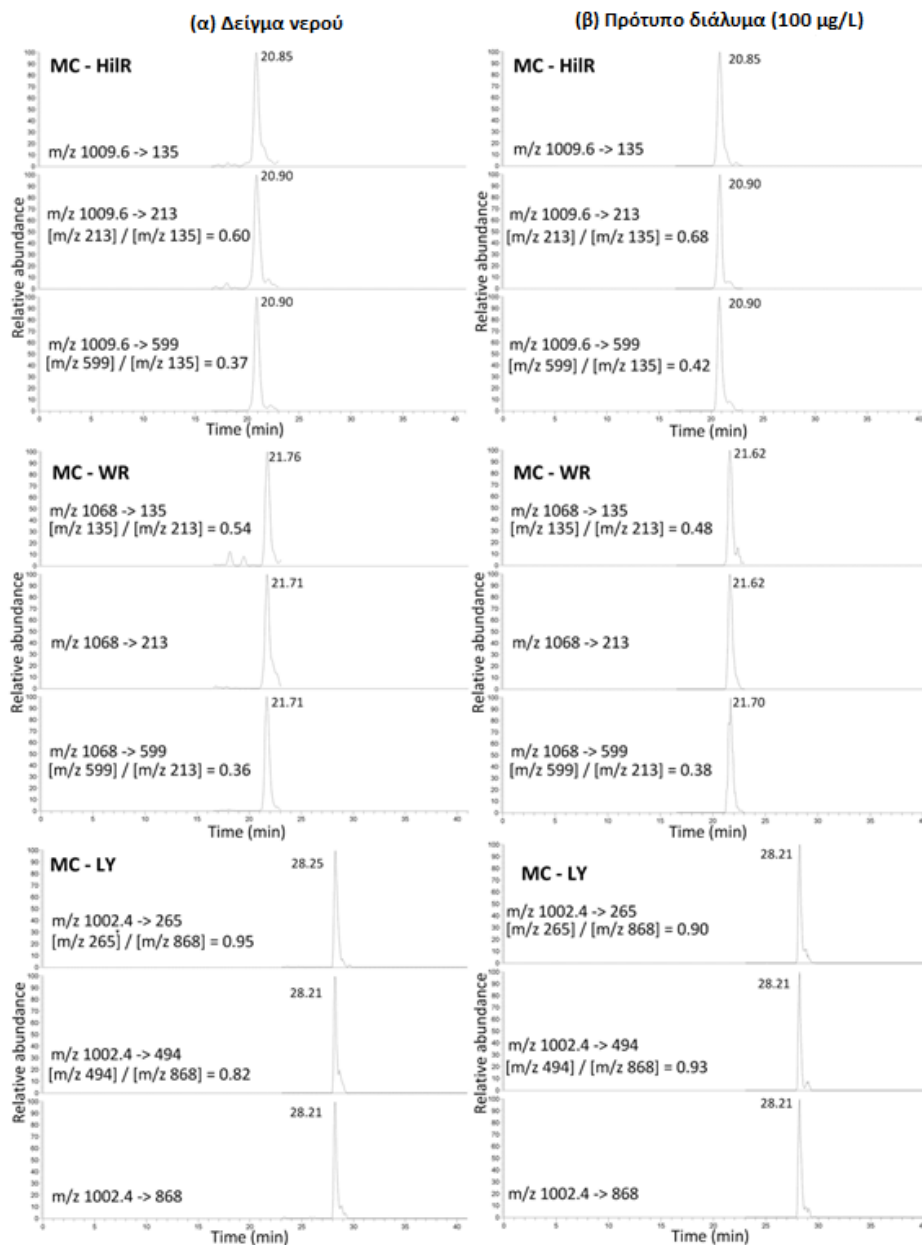
Οι MCs προσδιορίστηκαν και στα δείγματα διηθημένου νερού από την λίμνη Καστοριά. Η MC-RR προσδιορίστηκε με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, που κυμάνθηκαν από 0,092 έως 338 µg/L (Πίνακας 11.5). Η μέση συγκέντρωση της MC-RR στο διηθημένο νερό ήταν 75,0 µg/L και η διάμεση συγκέντρωση ήταν 24,4 µg/L. Συστηματικά ανιχνεύθηκε και η MC-LR στα δείγματα της λίμνης Καστοριάς σε συγκεντρώσεις από 0,072 μέχρι 354 µg/L. Η μέση και η διάμεση συγκέντρωση της MC-LR ήταν 66,7 και 14,0 µg/L, αντίστοιχα. Η MC-YR προσδιορίστηκε στα δείγματα διηθημένου νερού σε συγκεντρώσεις από 0,013 μέχρι 80,7 µg/L. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύθηκαν επίσης οι [D-Asp3]MC-RR και [D-Asp3]MC-LR.

Να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που επιτεύχθηκε η ανίχνευση και η αξιόπιστη ταυτοποίηση ενός τόσο μεγάλου αριθμού δομικών παραλλαγών MCs, χάρη στις μεθόδους που αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Ένα παράδειγμα της αξιόπιστης ταυτοποίησης των

κυανοτοξινών της κατηγορίας των MCs που ανιχνεύθηκαν σε δείγμα νερού που συλλέχθηκε από τη λίμνη Καστοριά στις 18 Σεπτέμβριο του 2014 παρατίθεται στα σχήματα 11.4 και 11.5.



Σχήμα 11.4: MRM χρωματογραφήματα από την ανάλυση (α) δείγματος νερού από την λίμνη Καστοριά όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία των MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR και (β) προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 100 µg/L



Σχήμα 11.5: MRM χρωματογραφήματα από την ανάλυση (α) δείγματος νερού από την λίμνη Καστοριά όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία των MC-HiLR, MC-WR, MC-LY και (β) προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 100 µg/L

Η ταυτοποίηση κάθε κυανοτοξίνης επιτεύχθηκε από την σύγκριση των MRM χρωματογραφημάτων που προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος νερού με τα αντίστοιχα MRM χρωματογραφήματα από την ανάλυση προτύπου διαλύματος. Για παράδειγμα, η αξιόπιστη ταυτοποίηση της MC-RR βασίστηκε στα ακόλουθα: (1) Ο χρόνος ανάσχεσης της MC-RR στο δείγμα ήταν $t_R = 15,38$ min και στο πρότυπο διάλυμα ο χρόνος ανάσχεσης της ήταν $t_R = 15,35$ min. (2) Κατά την ανάλυση του δείγματος ανιχνεύθηκαν και οι τρεις χαρακτηριστικές μεταπτώσεις της MC-RR στα θυγατρικά ιόντα (m/z 105, 127, 135). (3) Οι λόγοι ιόντων στο δείγμα ήταν 0,39 για το $[m/z$ 105]/ $[m/z$ 135] και 0,42 για το $[m/z$ 127]/ $[m/z$ 135]. Οι αντίστοιχοι λόγοι ιόντων στο πρότυπο διάλυμα ήταν 0,41 και 0,39. Ομοiotρόπως, πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση για όλες τις κυανοτοξίνες όπου οι λόγοι ιόντων στο δείγμα δεν είχαν απόκλιση μεγαλύτερη από $\pm 30\%$ των αντίστοιχων λόγων ιόντων του προτύπου διαλύματος.

Κεφάλαιο 12 : Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε νερό

Η ανάπτυξη της μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των οργανικών ρύπων 17a Ethinyl estradiol, β -Estradiol, Diclofenac, Alachlor, Atrazine, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Diuron, Isoproturon, Simazine, Trifluralin, Pentachlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorotoluron, Cyanazine, Diazinon, Dimethoate, Ethion, Fenthion, Linuron, Malathion, Methidathion, Metribuzine, Monuron, Phosalone, Propazine και Triazophos με τις τεχνικές SPE, LC-APCI-MS/MS έγινε σε τέσσερα στάδια. Αρχικά, βρέθηκαν οι κατάλληλες παράμετροι ανίχνευσης στο φασματογράφο μάζας (APCI-MS/MS). Ακολούθως, επιχειρήθηκε ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ενώσεων με υγροχρωματογραφία (LC), όπου δοκιμάστηκαν ποικίλα προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης και διάφορες αναλυτικές στήλες χρωματογραφίας και στη συνέχεια, έγιναν δοκιμές για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού παρουσία της κινητής φάσης. Τέλος, αναπτύχθηκε SPE μέθοδος για την προεργασία του δείγματος και την προσυγκέντρωση των ενώσεων. Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου έγινε η επικύρωσή της, όπου εκτιμήθηκαν οι κυριότερες παράμετροι απόδοσής της.

12.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων στο σύστημα APCI-MS/MS

Κατά το πρώτο στάδιο της ανάπτυξης μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων σε νερό αναπτύχθηκε μέθοδος για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό τους με την τεχνική MS/MS. Αρχικά, έγινε απ' ευθείας έγχυση (infusion) μεμονωμένου πρότυπου διαλύματος της κάθε υπό μελέτη ένωσης συγκέντρωσης 10 mg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 50:50 v/v, στο MS με ταχύτητα ροής 10 μ l/min για να βρεθούν τα πρόδρομα ιόντα των ενώσεων που σχηματίζονται εφαρμόζοντας θετικό και αρνητικό ιοντισμό με την πηγή χημικού ιοντισμού υπό ατμοσφαιρική πίεση (APCI). Η επιλογή της πηγής ιοντισμού APCI έναντι της ESI έγινε βάση προηγούμενης μελέτης, όπου διαπιστώθηκε ότι η πηγή ESI δεν μπορεί να ιοντίσει το φυτοφάρμακο Trifluralin [360]. Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε ο ιοντισμός όλων των υπό μελέτη ενώσεων με την πηγή APCI, εφαρμόζοντας είτε θετικό είτε αρνητικό ιοντισμό. Οι ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των φυτοφαρμάκων ιοντίζονται καλύτερα με θετικό ιοντισμό, ενώ οι υπόλοιποι 6 οργανικοί ρύποι ιοντίζονται με αρνητικό ιοντισμό.

Στη συνέχεια, επιλέχθηκε για κάθε οργανικό ρύπο το πρόδρομο ιόν με την μεγαλύτερη ένταση στο MS φάσμα και θραυσματοποιήθηκε στο 2^ο τετράπολο, παρουσία Αργού (1,5 mTorr). Με την βοήθεια αυτόματου προγράμματος λήφθηκαν οι καμπύλες θραυσματοποίησης κάθε ένωσης και επιλέχθηκαν τα δύο (2) πιο ισχυρά θραύσματα τους και η αντίστοιχη βέλτιστη ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy). Η ανίχνευση των οργανικών ρύπων στο APCI-MS/MS, επιτεύχθηκε με τη μέθοδο σάρωσης πολλαπλών αντιδράσεων (multiple reaction monitoring, MRM) όπου γινόταν παρακολούθηση δύο μεταπτώσεων από το πρόδρομο σε θυγατρικό ιόν για κάθε ένωση. Στον Πίνακα 12.1 παρατίθενται οι μεταπτώσεις από το πρόδρομο στα θυγατρικά ιόντα που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση των ενώσεων στο σύστημα MS/MS, με τις βέλτιστες ενέργειες θραυσματοποίησης σε θετικό ιοντισμό και στον Πίνακα 12.2 με αρνητικό ιοντισμό. Επίσης, παρατίθενται οι προτεινόμενες δομές των θυγατρικών ιόντων και η σχετική βιβλιογραφία.

12.1.1 Θετικός ιοντισμός

Πίνακας 12.1: Μελετώμενες μεταπτώσεις στο APCI-MS/MS σύστημα με θετικό ιοντισμό για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη οργανικών ρύπων και οι προτεινόμενες δομές των θυγατρικών ιόντων

Ένωση	Πρόδρομο Ιόν (m/z)	Θυγατρικά Ιόντα (m/z)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης	Προτεινόμενη δομή θραύσματος	Βιβλ.
Alachlor	238 [M-CH ₃ OH+H] ⁺	147*	29	[M-CH ₃ OH+H-C ₂ HOC(=O)-CH ₃] ⁺	[361]
		162*	22	[M-CH ₃ OH+H-C ₂ HOC(=O)] ⁺	
Atrazine	216 [M+H] ⁺	104	31	[M+H-C ₃ H ₆ -CH ₂ N ₂ -C ₂ H ₄] ⁺	[362]
		174*	17	[M+H-C ₃ H ₆] ⁺	
Azinphos-ethyl	346 [M+H] ⁺	137*	25	[M+H-CH ₃ NCO-(CH ₃ CH ₂ O)PS-CH ₂ CH ₂] ⁺	A[363]
		97*	32	[(OH) ₂ P=S] ⁺	[364]
Azinphos-methyl	318 [M+H] ⁺	125*	22	[(CH ₃ O) ₂ P=S] ⁺	[364]
		132*	18	[M+H-(CH ₃ O) ₂ PS(SH)-CO] ⁺	[363]
Chlorfenvinphos	359 [M+H] ⁺	155*	15	[(CH ₃ CH ₂ O) ₂ (OH)P=O+H] ⁺	[217]
		205	20	[M+H-(CH ₃ CH ₂ O) ₂ (OH)P=O] ⁺	A[364]
Chlortoluron	213 [M+H] ⁺	72*	25	[OCN(CH ₃) ₂] ⁺	[365]
		46	17	[NH ₂ (CH ₃) ₂] ⁺	A[364]
Chlorpyrifos	350 [M+H] ⁺	97	35	[SP(OH ₂)] ⁺	[364]
		198*	24	[M+H-(CH ₃ CH ₂ O)PO ₂ -CH ₂ CH ₂] ⁺	[363]
Cyanazine	241 [M+H] ⁺	214*	15	[M+H-CHN] ⁺	[366]
		104	28	[M+H-C ₃ H ₆ -CH ₂ N ₂ -C ₂ H ₄] ⁺	[367]
Diazinon	305 [M+H] ⁺	169*	24	[M+H-(CH ₃ CH ₂ O)PO ₂ -CH ₂ CH ₂] ⁺	[368]
				or [(CH ₃ CH ₂ O) ₂ POS] ⁺	[363]
		153	23	[M+H-(CH ₃ CH ₂ O)POS-CH ₂ CH ₂] ⁺	[363]
Dimethoate	230 [M+H] ⁺	125*	20	[(CH ₃ O) ₂ P=S] ⁺	[364]
		171	14	[M+H-(CH ₃) ₂ -NCH ₃] ⁺	[369]
Diuron	233 [M+H] ⁺	72*	18	[OCN(CH ₃) ₂] ⁺	[365]
		160	24	[M+H-CO-NH(CH ₃) ₂] ⁺	[370]
Ethion	385 [M+H] ⁺	143*	22	[(CH ₃ O) ₂ (OH)P=S+H] ⁺	A[364]
		97	40	[SP(OH ₂)] ⁺	[364]
Fenthion	279 [M+H] ⁺	169*	18	[M+H-CH ₃ OH-CH ₃ O ₂ P] ⁺	[371]
		247*	12	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	
Isoproturon	207 [M+H] ⁺	72*	16	[OCN(CH ₃) ₂] ⁺	[365]
		165	15	[M+H-C(CH ₃) ₂] ⁺	[367]

Linuron	249 [M+H] ⁺	182*	15	[C ₈ H ₅ ClO ₂ N] ⁺	[366]
		160*	18	[M+H-CO-NH(CH ₃)(OCH ₃)] ⁺	
Malathion	331 [M+H] ⁺	127*	12	[M+H-(CH ₃ O) ₂ (HS)P=S- CH ₃ CH ₂ OH] ⁺	[372]
		99	24	[M+H-(CH ₃ O) ₂ (HS)P=S- CH ₃ CH ₂ OH-C ₂ H ₄] ⁺	
Methidathion	303 [M+H] ⁺	145*	7	[M+H-(CH ₃ O) ₂ (HS)P=S] ⁺	[217]
		85*	21	[M+H-(CH ₃ O) ₂ (HS)P=S- SC=O] ⁺	[373]
Metribuzin	215 [M+H] ⁺	187*	16	[M+H-C ₂ H ₄] ⁺	[369]
		131	21	[M+H-C(CH ₃) ₃ -NHC] ⁺	B
Monuron	199 [M+H] ⁺	72*	16	[OCN(CH ₃) ₂] ⁺	[365]
		126	26	[M+H-CO-NH(CH ₃) ₂] ⁺	A[367]
Phosalone	368 [M+H] ⁺	182*	16	[M+H-(CH ₃ CH ₂ O) ₂ (HS)P=S] ⁺	[217]
		111*	35	[M+H-(CH ₃ CH ₂ O) ₂ (HS)P=S- CHN(C=O)O] ⁺	A[363, 364]
Propazine	230 [M+H] ⁺	188*	16	[M+H-C ₃ H ₆] ⁺	[362]
		146	22	[M+H-2(C ₃ H ₆)] ⁺	
Simazine	202 [M+H] ⁺	124	16	[M+H-NHC(Cl)NH ₂] ⁺	[366]
		132*	18	[M+H-C ₂ H ₄ -CH ₂ N ₂] ⁺	[367]
Triazophos	314 [M+H] ⁺	162*	25	[M+H-(CH ₃ CH ₂ O) ₂ P=S-H] ⁺	[217]
		119	34	[M+H-(CH ₃ CH ₂ O) ₂ P=S- NCH ₂ O] ⁺	[373]
Trifluralin	336 [M+H] ⁺	202*	40	[M+H-(NO ₂) ₂ -C ₃ H ₆] ⁺	B
		232*	19	[M+H-F-(C ₃ H ₇) ₂ +H] ⁺	

Με (*) επισημαίνονται τα ιόντα ποσοτικοποίησης

A : Προτεινόμενη δομή με βάση την βιβλιογραφία

B : Προτεινόμενη δομή με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας

Με στόχο να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία στη μέθοδο, στις περιπτώσεις των οργανικών ρύπων που η ένταση του κύριου ιόντος ήταν χαμηλή, η ποσοτικοποίηση έγινε λαμβάνοντας υπόψη το άθροισμα και των δύο θυγατρικών ιόντων, όπως αυτά σημειώνονται στον παραπάνω πίνακα.

Κατά τον θετικό ιοντισμό του Alachlor, που ανήκει στην κατηγορία των χλωροακετανιλιδων, παρατηρήθηκε στο φάσμα μάζας του στο πρώτο τετράπολο, ότι το ιόν [M-CH₃OH+H]⁺ = 238 είχε πολύ μεγαλύτερη ένταση από το ιόν του πρωτονιωμένου μορίου [M+H]⁺ = 270. Ως εκ τούτου το ιόν m/z 238 επιλέχθηκε ως πρόδρομο ιόν για το Alachlor. Το θυγατρικό ιόν του m/z 162 προκύπτει από την απώλεια C₂HOC₂ και με την περαιτέρω απώλεια ενός μεθυλίου (CH₃) προκύπτει το θυγατρικό ιόν m/z 147 [361].

Στην κατηγορία των τριαζινών (Atrazine, Cyanazine, Metribuzin, Propazine & Simazine) ως πρόδρομο ιόν σχηματίζεται κυρίως το πρωτονιωμένο μόριο [M+H]⁺. Το χαρακτηριστικό θυγατρικό ιόν m/z 174

για το Atrazine σχηματίζεται από την απώλεια του ισο-προπυλενίου από το μόριο. Κατ' αντιστοιχία για το Propazine, το θυγατρικό ιόν m/z 188 σχηματίζεται από την απώλεια ενός ισο-προπυλενίου ενώ το m/z 146 σχηματίζεται από την απώλεια και των δύο ισο-προπυλενίων του μορίου [362, 367]. Το θυγατρικό ιόν του Cyanazine m/z 214 που παρουσίασε και την μεγαλύτερη ένταση προκύπτει από την απώλεια του $N\equiv CH$ από την πλευρική αλυσίδα [366]. Το θυγατρικό ιόν m/z 104, που χρησιμοποιείται ως ιόν ταυτοποίησης για τα Atrazine και Cyanazine, αποτελεί χαρακτηριστικό θραύσμα των χλωροτριαζινών και προκύπτει από την απώλεια των πλευρικών αλυσίδων και την διαδοχική απώλεια του $NH_2-C\equiv N$ (που έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου) και ενός αιθυλενίου ($CH_2=CH_2$) [362, 367]. Τα θυγατρικά ιόντα του Isoproturon m/z 132 και m/z 124 προκύπτουν από άνοιγμα του δακτυλίου. Αναλυτικότερα το θυγατρικό ιόν m/z 132 με την μεγαλύτερη ένταση προκύπτει από την απώλεια ενός C_2H_4 και στην συνέχεια $HN=C=NH$ που έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου, ενώ το θυγατρικό ιόν m/z 124 προκύπτει από την απώλεια του $NH-C(Cl)-NH_2$ που είναι μέρος του δακτυλίου και έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμά του [366]. Το κύριο θυγατρικό ιόν του Metribuzin m/z 187 προκύπτει από την απώλεια δύο μεθυλίων (C_2H_4) από την πλευρική αλυσίδα του ισο-βουτανίου [369], ενώ το ιόν m/z 131 προκύπτει από τις διαδοχικές απώλειες του ισο-βουτανίου ($C(CH_3)_3$) και του $C=NH$ που έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου.

Για όλα τα φυτοφάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών, και ειδικότερα στην υποκατηγορία των οργανοθειοφωσφορικών με εξαίρεση το Chlorfenvinphos, ως πρόδρομο ιόν χρησιμοποιήθηκε το $[M+H]^+$ που ήταν και το ιόν με την μεγαλύτερη ένταση στο φάσμα μάζας τους. Ο μηχανισμός θραυσματοποίησης των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και οι πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων έχουν μελετηθεί και προταθεί σε υπάρχουσες εργασίες στην βιβλιογραφία [217, 363, 364, 366, 369, 374]. Σε κάποιες περιπτώσεις οι δομές των θυγατρικών ιόντων δεν αποδίδονται απ' ευθείας στο εκάστοτε μελετώμενο φυτοφάρμακο της παρούσας εργασίας. Στις περιπτώσεις αυτές, οι δομές των θυγατρικών ιόντων προτείνονται στην παρούσα εργασία, με βάση τους μηχανισμούς της βιβλιογραφίας προσαρμοσμένους στο μόριο του υπό μελέτη φυτοφαρμάκου.

Αναλυτικότερα, το θυγατρικό ιόν m/z 137 του Azinphos-ethyl πιθανότατα προκύπτει από την απόσπαση του $CH_3N=C=O$ που έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου με τα άζωτα ακολουθούμενη από την απόσπαση των $(CH_3CH_2O)PS$ και CH_2CH_2 [363] ενώ το ιόν m/z 97 αποδίδεται στο $[SP(OH_2)]^+$ και αποτελεί κοινό θραύσμα των διαίθυλο-φωσφοροθειικών φυτοφαρμάκων [364]. Το θυγατρικό ιόν m/z 132 του Azinphos-methyl αποδίδεται στην απόσπαση του $(CH_3O)_2PS(SH)$ από τους δακτυλίους και την περεταίρω απόσπαση μονοξειδίου του άνθρακα (CO) που έχει ως αποτέλεσμα στην συστολή του δακτυλίου με τα άζωτα [363]. Το θυγατρικό ιόν m/z 125 που είναι κοινό για τα Azinphos-methyl και Dimethoate αντιστοιχεί στο $[(CH_3O)_2P=S]^+$ και αποτελεί κοινό θραύσμα διμέθυλο-φωσφοροθειικών φυτοφαρμάκων [364]. Το άλλο θυγατρικό ιόν του Dimethoate, m/z 171, προκύπτει από την απόσπαση των δύο μεθυλίων από των φώσφορο και του NCH_3 από την άλλη άκρη του μορίου [369]. Το κύριο ιόν θραυσματοποίησης του Chlorfenvinphos m/z 155 αποτελεί κοινό ιόν για όλα τα διαίθυλο-φωσφορικά φυτοφάρμακα και αποδίδεται στο $[(CH_3CH_2O)_2(OH)P=O+H]^+$ [217] και το m/z 205 μπορεί να αποδοθεί στο κομμάτι του μορίου που προκύπτει από την απόσπαση του m/z 155 (δακτύλιο) το οποίο έχει προσλάβει ένα πρωτόνιο [217, 364]. Το κύριο θυγατρικό ιόν του Chlorpyrifos m/z 198 προκύπτει από την απόσπαση του $(CH_3CH_2O)_2PO_2$ από το δακτύλιο αφήνοντας όμως ένα υδρογόνο στο ιόν [363] και το ιόν m/z 97 αποδίδεται στο $[SP(OH_2)]^+$ [364].

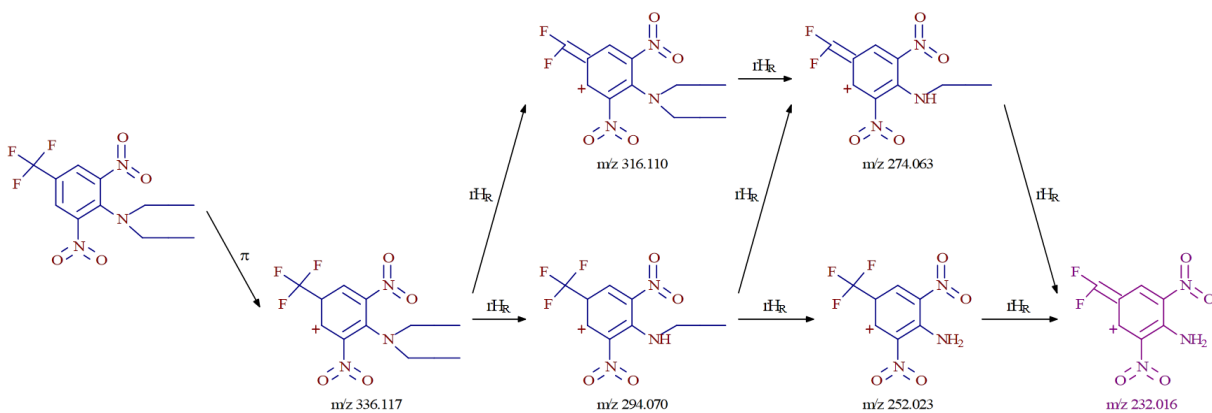
Οι προτεινόμενες δομές των θραυσμάτων του Diazinon εξηγήθηκαν πρώτη φορά σε εργασία των Βαουβ *et al* όπου το m/z 169 αποδίδεται στο $[(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{POS}]^+$ και το m/z 153 προκύπτει από την απόσπαση του $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{PS}$ από το μόριο αφήνοντας όμως ένα από τα υδρογόνα [363]. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν είναι σε συμφωνία με μεταγενέστερη εργασία των Barr *et al* όπου προτείνεται λεπτομερώς ο μηχανισμός θραυσματοποίησης του Diazinon. Κατά τους Barr *et al* το θυγατρικό ιόν m/z 169 προκύπτει μετά από μια θειόνο-θειόλο αναδιάταξη του μορίου (thiono-thiolo rearrangement) όπου στον δακτύλιο συνδέεται το θείο αντικαθιστώντας την σύνδεση με το οξυγόνο με αποτέλεσμα να αποσπάται σε αυτή την περίπτωση $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{PO}$ [368]. Τις ίδιες δομές των θυγατρικών ιόντων του Diazinon είχαν προτείνει νωρίτερα και οι da Cunha *et al* χωρίς όμως να εξηγούν τον μηχανισμό [366].

Το κυριότερα ιόντα θραυσματοποίησης του Ethion είναι το m/z 143 που αποδόθηκε στο $[(\text{CH}_3\text{O})_2(\text{OH})\text{P}=\text{S}+\text{H}]^+$ και το m/z 97 αποδόθηκε στο $[\text{SP}(\text{OH}_2)]^+$ καθώς και τα δύο αποτελούν κοινά θραύσματα των διαίθυλο-φωσφοροθειικών φυτοφαρμάκων [364]. Το θυγατρικό ιόν του Fenthion m/z 247 προκύπτει από την απώλεια μεθανόλης και το m/z 169 προκύπτει από το σπάσιμο του δεσμού S-P μετά από θειόνο-θειόλο αναδιάταξη στο μόριο [371]. Στην περίπτωση του Malathion το θυγατρικό ιόν m/z 127 προκύπτει από την απόσπαση της χαρακτηριστικής ομάδας $(\text{CH}_3\text{O})_2(\text{HS})\text{P}=\text{S}$ και μίας από πλευρικές αλυσίδες $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})$, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου αποτελούμενο από έξι άνθρακες και ένα οξυγόνο. Το θυγατρικό ιόν m/z 99 του Malathion προκύπτει από την περαιτέρω απόσπαση δύο ανθράκων (C_2H_4) από τον δακτύλιο [372]. Το θυγατρικό ιόν m/z 145 του Methidathion προκύπτει από την απώλεια της χαρακτηριστικής ομάδας $(\text{CH}_3\text{O})_2(\text{HS})\text{P}=\text{S}$ [217] ενώ το m/z 85 είναι αποτέλεσμα της περαιτέρω απώλειας S-C=O από τον δακτύλιο, σύμφωνα με τα δεδομένα από την εργασία των Coscollà *et al* που χρησιμοποίησαν Orbitrap high resolution MS (supplementary data [373]). Παρομοίως το θυγατρικό ιόν m/z 162 του Triazophos είναι αποτέλεσμα της απώλεια της χαρακτηριστικής ομάδας $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{P}=\text{S}$ ενώ το m/z 119 προκύπτει από την περαιτέρω απόσπαση CH_2NO από το ιόν (supplementary data [373]). Στην περίπτωση του Phosalone, το θυγατρικό ιόν m/z 182 προκύπτει από την απώλεια της χαρακτηριστικής ομάδας $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2(\text{HS})\text{P}=\text{S}$ και το m/z 111 πιθανότατα αποδίδεται στον αρωματικό δακτύλιο με χλώριο μετά και την απόσπαση του $\text{CHN}(\text{C}=\text{O})\text{O}$ [363, 364].

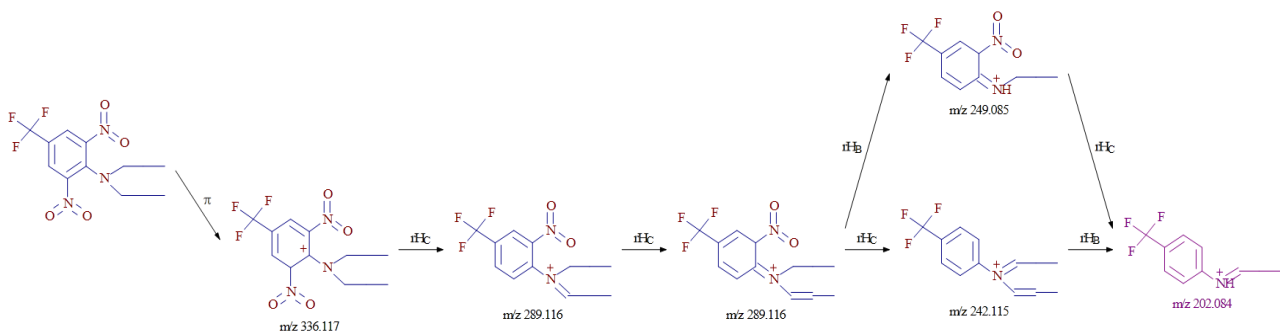
Στην περίπτωση της κατηγορίας των φαινυλουριών (Chlorotoluron, Diuron, Isoproturon, Linuron & Monuron) ως πρόδρομο ιόν σχηματίζεται κυρίως το $[\text{M}+\text{H}]^+$. Το κύριο και χαρακτηριστικό θραύσμα αυτής της κατηγορίας είναι το m/z 72 το οποίο αντιστοιχεί σε διμεθυλουρία και είναι αποτέλεσμα της διάσπασης του δεσμού της ουρίας με το φαινύλιο [365, 366]. Οι Baglio, Kotzias & Larsen στην εργασία τους παραθέτουν λεπτομερώς τον μηχανισμό θραυσματοποίησης (fragmentation pathway) των φαινυλουριών [367], βάση του οποίου αποδόθηκαν οι προτεινόμενες δομές των θραυσμάτων των Chlorotoluron και Monuron στην παρούσα εργασία. Οι πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Diuron μαζί με τον μηχανισμό σχηματισμού τους εξηγήθηκαν λεπτομερώς από τον Draper [370]. Επίσης, σε συνέχεια οι da Cunha *et al* στην εργασία τους αποδίδουν τις πιθανές δομές των ιόντων θραυσματοποίησης του Linuron, χωρίς όμως να εξηγούν τον μηχανισμό [366].

Το Trifluralin που ανήκει στην κατηγορία των δινιτροανιλιδων σχηματίζει ως πρόδρομο ιόν το $[\text{M}+\text{H}]^+$. Τα θυγατρικά ιόντα του με την μεγαλύτερη ένταση ήταν τα m/z 232 και 202 των οποίων οι προτεινόμενοι μηχανισμοί σχηματισμού τους, όπως προέκυψαν με την βοήθεια του προγράμματος Mass Frontier 3.0, παρατίθενται στα ακόλουθα σχήματα. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι

στην βιβλιογραφία οι προτεινόμενες μεταπτώσεις για την μελέτη του Trifluralin με την τεχνική LC-MS/MS δεν είναι σε συμφωνία μεταξύ τους [375-377].



Σχήμα 12.1: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού του θυγατρικού ιόντος m/z 232 του Trifluralin με τη χρήση του προγράμματος Mass-Frontier 3.0



Σχήμα 12.2: Προτεινόμενος μηχανισμός σχηματισμού του θυγατρικού ιόντος m/z 202 του Trifluralin με τη χρήση του προγράμματος Mass-Frontier 3.0

12.1.2 Αρνητικός Ιοντισμός

Σε αντίθεση με τις παραπάνω ενώσεις φυτοφαρμάκων που ιοντίζονται θετικά, ο ιοντισμός των υπόλοιπων υπό μελέτη οργανικών ρύπων επιτεύχθηκε με την εφαρμογή αρνητικού ιοντισμού. Σε όλες τις περιπτώσεις το πιο ισχυρό ιόν στο MS φάσμα, το οποίο επιλέχθηκε και ως πρόδρομο ιόν ήταν το $[M-H]^-$. Στον Πίνακα 12.2 παρατίθενται οι μεταπτώσεις από το πρόδρομο στα θυγατρικά ιόντα που επιλέχθηκαν για την ανίχνευση των ενώσεων στο σύστημα MS/MS με αρνητικό ιοντισμό. Επίσης, παρατίθενται οι προτεινόμενες δομές των θυγατρικών ιόντων και η σχετική βιβλιογραφία.

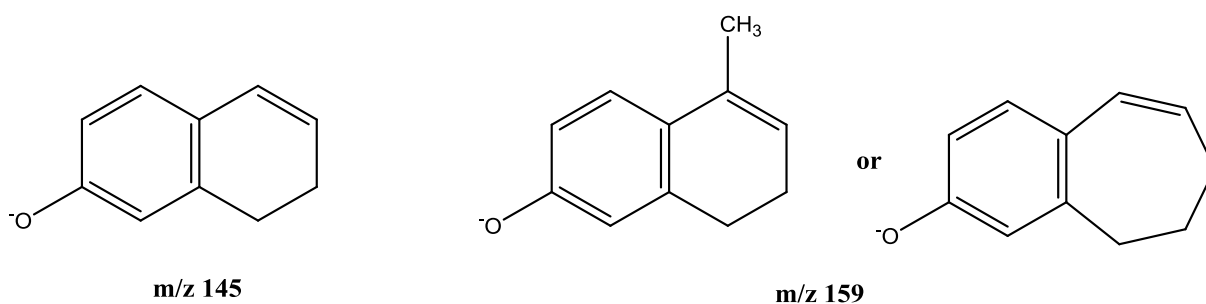
Πίνακας 12.2: Μελετώμενες μεταπτώσεις στο APCI-MS/MS σύστημα με αρνητικό ιοντισμό για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη οργανικών ρύπων και οι προτεινόμενες δομές των θυγατρικών ιόντων

Ένωση	Πρόδρομο Ιόν (m/z)	Θυγατρικά Ιόντα (m/z)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης	Προτεινόμενη δομή θραύσματος	Βιβλ.
2,4,6-Trichlorophenol	197 [M-H] ⁻	161*	24	[M-H-HCl] ⁻	[378]
17α-Ethinylestradiol	295 [M-H] ⁻	145*	42	[M-H-C ₉ H ₁₂ O] ⁻	[379]
		159*	57	[M-H-C ₁₀ H ₁₄ O] ⁻	
β-Estradiol	271 [M-H] ⁻	143*	34	[M-H-C ₈ H ₁₆ O] ⁻	[379]
		133	31	[M-H-C ₆ H ₅ OH] ⁻	
Diclofenac	294 [M-H] ⁻	250*	13	[M-H-CO ₂] ⁻	[380]
		214	22	[M-H-CO ₂ -HCl] ⁻	A[381]
Pentachlorophenol	265 [M-H] ⁻	265*	0	[M-H] ⁻	[378]

Με (*) επισημαίνονται τα ιόντα ποσοτικοποίησης

A : Προτεινόμενη δομή με βάση την βιβλιογραφία

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες β-Estradiol και 17α-Ethinylestradiol παρουσίασαν κοινά θυγατρικά ιόντα, τα m/z 145 & 159 όπως αυτά δίνονται στο Σχήμα 12.3, τα οποία είναι αποτέλεσμα διαδοχικών διασπάσεων των δακτυλίων και επανακυκλοποίησης. Ειδικότερα, το ιόν m/z 145 αποτελεί χαρακτηριστικό ιόν της ομάδας των στεροειδών και είναι ενδεικτικό της σταθερότητας του φαινολικού δακτυλίου στο σύστημα τους. Οι δομές αυτές προτάθηκαν πρώτη φορά σε εργασία των Croley *et al* [379]. Στη συνέχεια οι Magi *et al* πρότειναν με λεπτομέρειες τους μηχανισμούς θραυσματοποίησης των Bisphenol-a, β-Estradiol και 17α-Ethinylestradiol [382].



Σχήμα 12.3 : Προτεινόμενες δομές των θυγατρικών ιόντων m/z 145 και m/z 159 των β-Estradiol και 17α-Ethinylestradiol [379, 382]

Στην περίπτωση των χλωροφαινολών στο MS φάσμα εκτός από το μοριακό ιόν της ένωσης [M-H]⁻ υπήρχαν και άλλες κορυφές με διαφορά μεταξύ τους 2 m/z μονάδες (στο εύρος m/z 195-199 για την 2,4,6-Trichlorophenol και m/z 263-271 για την Pentachlorophenol) που οφείλονται στα ισότοπα του χλωρίου ³⁵Cl and ³⁷Cl. Το χαρακτηριστικό θυγατρικό ιόν όλων των χλωροφαινολών προκύπτει από την απώλεια ενός HCl από το αρνητικά φορτισμένο μόριο οδηγώντας στο ιόν [M-H-HCl]⁻ [378]. Ένα άλλο θυγατρικό ιόν που παρατηρήθηκε στη παρούσα μελέτη ήταν το m/z 35 το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο Cl⁻ όμως δεν θεωρείται αξιόπιστο για να χρησιμοποιηθεί ως χαρακτηριστικό θυγατρικό ιόν. Στην περίπτωση της Pentachlorophenol δεν υπήρξε θραυσματοποίηση του μορίου και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκε ψεύδο-μετάπτωση για την μελέτη του το MS/MS σύστημα. Μη θραυσματοποίηση της Pentachlorophenol σε αρνητικό ιοντισμό με APCI-MS/MS έχει αναφερθεί και σε εργασία των Sarrion *et al* [378]. Τέλος, στην περίπτωση της φαρμακευτικής ένωσης Diclofenac το θυγατρικό ιόν m/z 250 προέρχεται από την απώλεια ενώ CO₂ από το αποπρωτονιωμένο μοριακό ιόν [380], ενώ το θυγατρικό ιόν m/z 214 είναι αποτέλεσμα της περαιτέρω απώλειας ενός HCl [381].

12.2 Ανάπτυξη μεθόδων χρωματογραφικού διαχωρισμού οργανικών ρύπων

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των ενώσεων αναπτύχθηκε μέθοδος υγροχρωματογραφίας (LC) με βαθμιδωτή έκλουση. Σε όλες τις δοκιμές για την επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού, η κινητή φάση αποτελούταν από (A) Νερό και (B) Ακετονιτρίλιο, η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης τέθηκε στα 0,5 ml/min και ο όγκος ένεσης ήταν 20 μl. Για την επίτευξη διαχωρισμού των υπό μελέτη ενώσεων δοκιμάστηκαν οι τρεις στήλες υγροχρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως: Zorbax eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 50 mm, 1.8 μm), Hypersil Gold (2.1 x 100mm, 3μm) & Atlantis dC18 (2.1 mm x 100 mm, 3 μm) με εφαρμογή κοινού προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν πρώτα με εφαρμογή θετικού ιοντισμού, που είναι κατάλληλος για το μεγαλύτερο μέρος των υπό μελέτη ενώσεων, και στην συνέχεια με αρνητικό ιοντισμό.

Αρχικά δοκιμάστηκε η αναλυτική στήλη υγρής χρωματογραφίας Zorbax eclipse XDB-C18 η οποία παρείχε ικανοποιητικό διαχωρισμό για τις περισσότερες ενώσεις. Όμως, συγκρινόμενη με τις άλλες αναλυτικές στήλες που εξετάστηκαν, παρείχε μεγαλύτερο εύρος κορυφών, λόγω της διπλάσιας διατομής της (4.6 έναντι 2.1mm) παρόλο που διαθέτη τη μικρότερη διάμετρο σωματιδίων πλήρωσης (1.8 έναντι 3μm). Εν συνέχεια, από την μελέτη των άλλων δύο στηλών χρωματογραφίας, προέκυψε ότι η στήλη Atlantis dC18 παρείχε καλύτερο διαχωρισμό και σχήμα κορυφών έναντι της Hypersyl Gold. Σύμφωνα με τα τεχνικά χαρακτηριστικά τους, η Atlantis dC18 έχει μικρότερη διάμετρο πόρων (pore size) από την Hypersyl Gold, 100Å έναντι 175Å, και μεγαλύτερο φορτίο άνθρακα (carbon load), 12% έναντι 11%. Αυτές οι μικρές διαφορές στα χαρακτηριστικά τους μπορούν να αιτιολογήσουν την καλύτερη απόδοσή της Atlantis dC18 σε σύγκριση με τις άλλες στήλες χρωματογραφίας που μελετήθηκαν. Επομένως, για την συνέχεια των πειραμάτων επιλέχθηκε η Atlantis dC18.

Ακολούθως, εξετάστηκαν ποικίλα προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης ώστε να επιτευχθεί ο βέλτιστος διαχωρισμός των υπό μελέτη ενώσεων. Ικανοποιητικός διαχωρισμός των 30 οργανικών ρύπων επιτεύχθηκε με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, το οποίο ξεκινά από 85% νερό – 15% ακετονιτρίλιο και καταλήγει σε 100% ακετονιτρίλιο (Πίνακας 12.3). Μετά το τέλος του προγράμματος στα 45 min το σύστημα επιστρέφει στις αρχικές συνθήκες για 10 min για εξισορρόπηση.

Πίνακας 12.3: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για τον διαχωρισμό των οργανικών ρύπων

Χρόνος (min)	Ταχύτητα ροής (ml/min)	% Ακετονιτρίλιο	% Νερό
0	0,5	15	85
8	0,5	20	80
25	0,5	40	60
37	0,5	50	50
43	0,5	70	30
43,1	0,5	100	0
45	0,5	100	0
45,1	0,5	15	85
55	0,5	15	85

Με την εφαρμογή του παραπάνω προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης ο διαχωρισμός των ενώσεων που ιοντίζονται με θετικό ιοντισμό σε σχέση με τις ενώσεις που ιοντίζονται με αρνητικό ιοντισμό είναι πλήρης. Όμως, η χρονική διαφορά στον χρόνο έκλουσης τους που επιτεύχθηκε δεν ήταν επαρκής για τον ανιχνευτή ώστε να μεταβαίνει από τον θετικό στον αρνητικό ιοντισμό και αντίστροφα. Ως εκ τούτου, και για να μην επεκταθεί σε μεγάλο βαθμό η χρωματογραφική ανάλυση, αναπτύχθηκε ξεχωριστή χρωματογραφική μέθοδος για τον διαχωρισμό των 5 οργανικών ρύπων που ιοντίζονται με αρνητικό ιοντισμό. Πλήρης διαχωρισμός των ενώσεων επιτεύχθηκε μέσα σε 6 min με εφαρμογή ισοκρατικού συστήματος 50% ακετονιτρίλιο – 50% νερό.

Και με τα δύο χρωματογραφικά συστήματα επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός ($R_s \geq 1,5$) για τις περισσότερες ενώσεις. Εξαιρέση αποτελούν τα ζεύγη: 1) Monuron-Metribuzine ($R_s=0,4$), 2) Methidathion-Linuron ($R_s=0,2$) και 3) Ethion-Trifluralin ($R_s=0,1$). Να σημειωθεί πως η ειδικότητα της μεθόδου εξασφαλίζεται με τη χρήση του ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών σε λειτουργία MRM. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των ουσιών με υγροχρωματογραφία είναι βοηθητικός για τον καλύτερο ιοντισμό τους κατά την ανίχνευσή τους, αλλά δεν αναγκαίος για τον ακριβή προσδιορισμό τους.

Κατά την διάρκεια των περαμάτων παρατηρήθηκε ότι το pH που διαλύτη που περιέχεται το πρότυπο/δείγμα επηρεάζει σημαντικά την χρωματογραφία των Diclofenac και Pentachlorophenol στον αρνητικό ιοντισμό. Συγκεκριμένα, για τις ενώσεις αυτές παρατηρήθηκαν στο χρωματογράφημα δύο κορυφές. Για την μελέτη της επίδρασης αυτής, αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματος των 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 µg/L που περιέχονταν σε διαλύτες ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v με 0%, 0,1% και 0,5% HCOOH. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προέκυψε ότι η παρουσία HCOOH βοηθάει τις ενώσεις Diclofenac και Pentachlorophenol να εκλουστούν ως μία κορυφή, έκαστη, χωρίς να επηρεάζονται οι χρόνοι ανάσχεση των άλλων ενώσεων. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι αυξανόμενου του ποσοστού του HCOOH υπάρχει μικρή μείωση στην απόκριση – εμβαδόν κάποιων κορυφών. Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά, αποφασίστηκε ο διαλύτης που θα περιέχει το δείγμα πριν την χρωματογραφική του ανάλυση να έχει 0,1% HCOOH.

12.3 Βελτιστοποίηση συνθηκών ιοντισμού οργανικών ρύπων στο σύστημα LC-APCI-MS/MS

Με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου, έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών ιοντισμού παρουσία κινητής φάσης. Κατά τα πειράματα βελτιστοποίησης, πραγματοποιήθηκαν ενέσεις πρότυπου διαλύματος 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 µg/L σε ακετονιτρίλιο-νερό 40:60, v/v (0,1% HCOOH) στο σύστημα LC-APCI-MS/MS όπου άλλαζαν διαδοχικά οι συνθήκες ιοντισμού. Οι τιμές των παραμέτρων ιοντισμού που μελετήθηκαν σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό περιγράφονται στην παράγραφο §7.1.

Για την καλύτερη ανίχνευση των ενώσεων και κυρίως για την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου στον θετικό ιοντισμό, η ανίχνευση των ενώσεων στον φασματογράφο μάζας χωρίστηκε σε οκτώ (8) παράθυρα – segments. Σε κάθε παράθυρο μελετούταν ένας μικρός αριθμός ενώσεων ώστε να μειωθεί ο συνολικός θόρυβος από το άθροισμα των μεταπτώσεων (MRM). Επιπροσθέτως, εφαρμόστηκε η βέλτιστη τιμή για τις παραμέτρους ιοντισμού discharge current και sheath gas, οι οποίες μπορούν να μεταβάλλονται κατά την διάρκεια της ανάλυσης χωρίς να επηρεάζουν την σταθερότητα του ιοντισμού. Ο χωρισμός των παραθύρων, οι ενώσεις που μελετώνται σε κάθε ένα από αυτά καθώς και οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων discharge current και sheath gas παρατίθενται στον Πίνακα 12.4.

Πίνακας 12.4: Συνθήκες θετικού ιοντισμού οργανικών ρύπων με την πηγή APCI

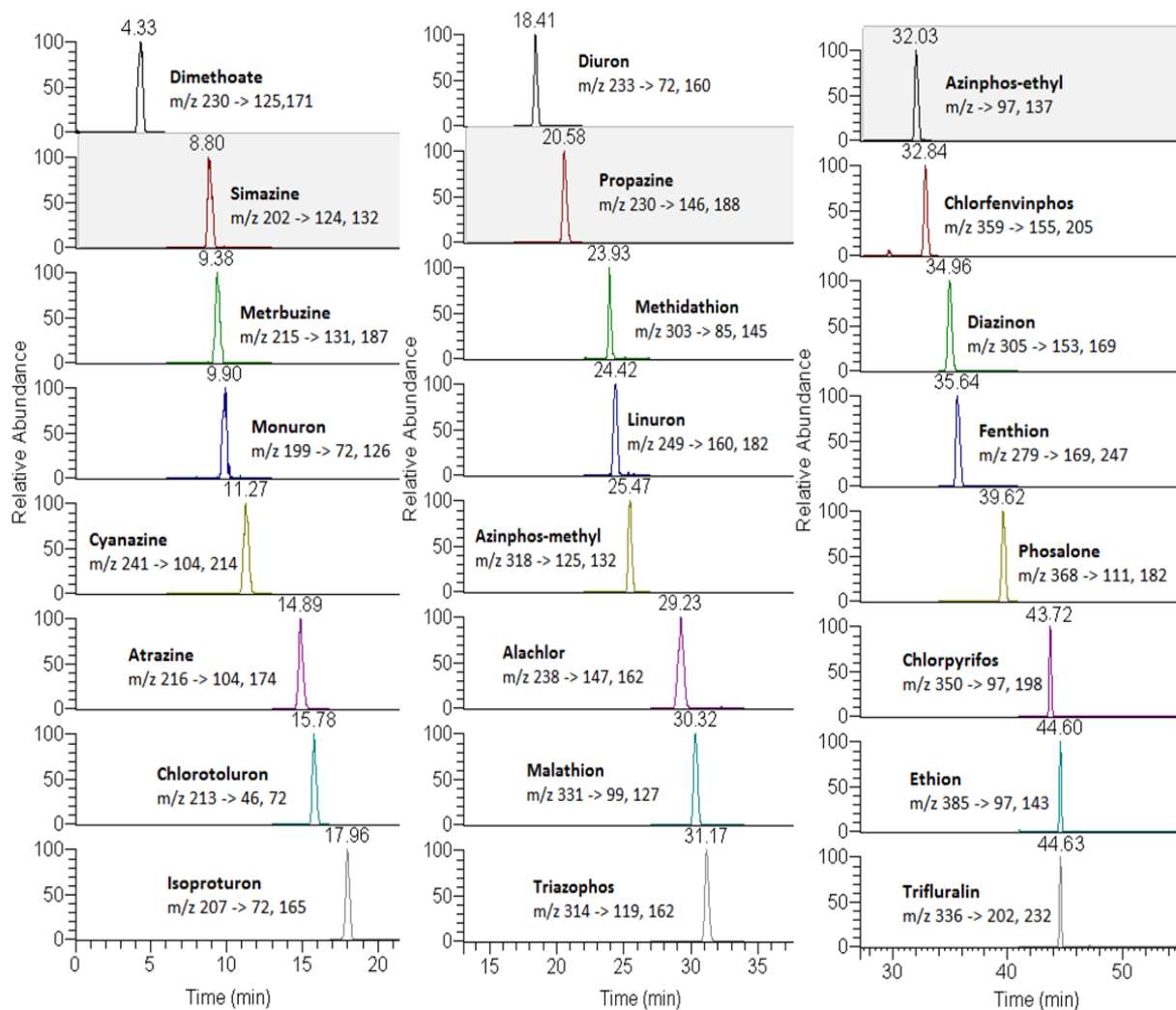
Segment	Χρόνος (min)	Ενώσεις	Συνθήκες APCI
1	0-6	Dimethoate	Discharge Current : 4 Sheath gas : 20 a.u.
2	6-13	Simazine, Metribuzine, Monuron, Cyanazine	Discharge Current : 5 Sheath gas : 20 a.u.
3	13-16,8	Atrazine, Chlorotoluron	Discharge Current : 4 Sheath gas : 20 a.u.
4	16,8-22	Isoproturon, Diuron, Propazine	Discharge Current : 5 Sheath gas : 20 a.u.
5	22-27	Methidathion, Linuron, Azinphos-methyl	Discharge Current : 4 Sheath gas : 45 a.u.
6	27-34	Alachlor, Malathion, Triazophos, Chlorfenvinphos, Azinphos-ethyl	Discharge Current : 4 Sheath gas : 35 a.u.
7	34-41	Diazinon, Fenthion, Azinphos-ethyl, Phosalone	Discharge Current : 4 Sheath gas : 45 a.u.
8	41-55	Chlorpyrifos, Ethion, Trifluralin	Discharge Current : 5 Sheath gas : 45 a.u.

Οι υπόλοιπες τιμές των παραμέτρων κατά τον θετικό ιοντισμό με την πηγή APCI και την ανίχνευση με MS/MS ήταν σταθερές σε όλη την διάρκεια της ανάλυσης και είχαν ως εξής:

- Vaporizer temperature : 500 °C
- Ion transfer capillary temperature : 325 °C
- Auxiliary gas : 15 a.u.

- Θέση probe : C
- Collision gas pressure (argon) : 1,5 mTorr
- Q1 peak width: 0.7 Full Width Half Maximum (FWHM)
- Q2 peak width: 0.7 Full Width Half Maximum (FWHM)
- MRM (Multiple reaction monitoring) – Πίνακας 12.1

Στο Σχήμα 12.4 παρατίθενται τα MRM χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος οργανικών ρύπων από την ανάλυση τους σε θετικό ιοντισμό με την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών χρωματογραφικής ανάλυσης, ιοντισμού και ανίχνευσης, όπως αυτές προέκυψαν από την μελέτη ανάπτυξης της μεθόδου στο σύστημα LC-APCI-MS/MS.



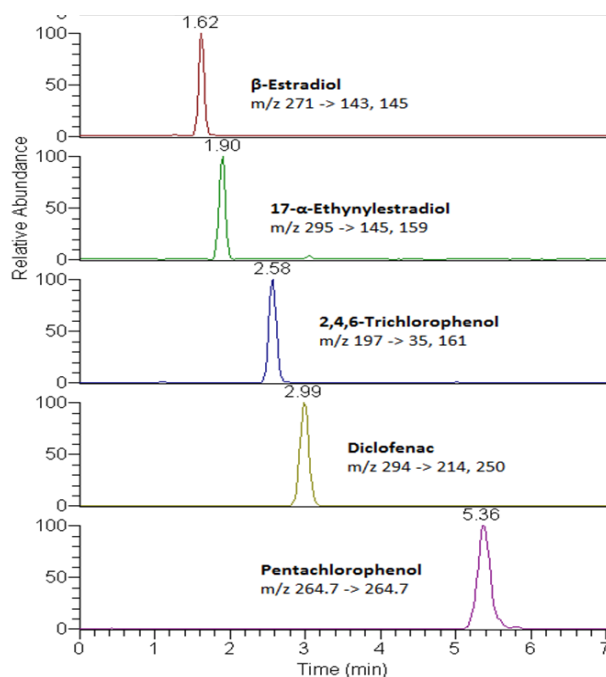
Σχήμα 12.4: MRM χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος 24 οργανικών ρύπων (φυτοφαρμάκων) σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 µg/L, ανάλυση με θετικό ιοντισμό

Για την ανάλυση με αρνητικό ιοντισμό δημιουργήθηκε μόνο ένα παράθυρο – segment, λόγω του μικρού αριθμού των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων της πηγής APCI και της ανίχνευσης με MS/MS που προέκυψαν από την ανάπτυξη της μεθόδου ήταν οι εξής:

- Vaporizer temperature : 300 °C
- Ion transfer capillary temperature : 350 °C

- Discharge Current : 8
- Sheath gas : 25 a.u.
- Auxiliary gas : 15 a.u.
- Θέση probe : B
- Collision gas pressure (argon) : 1,5 mTorr
- Q1 peak width: 0.7 Full Width Half Maximum (FWHM)
- Q2 peak width: 0.7 Full Width Half Maximum (FWHM)
- MRM (Multiple reaction monitoring) – Πίνακας 12.2

Στο Σχήμα 12.5 παρατίθενται τα MRM χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος των οργανικών ρύπων που προσδιορίζονται με αρνητικό ιοντισμό, με την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών χρωματογραφικής ανάλυσης, ιοντισμού και ανίχνευσης, όπως αυτές προέκυψαν από την μελέτη ανάπτυξης της μεθόδου στο σύστημα LC-APCI-MS/MS.



Σχήμα 12.5: MRM χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος 5 οργανικών ρύπων σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 µg/L, ανάλυση με αρνητικό ιοντισμό

12.4 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)

Κατά την ανάπτυξη της SPE μεθόδου για την προσυγκέντρωση των οργανικών ρύπων από το νερό και την απομάκρυνση των παρεμποδίσων από την μήτρα, πραγματοποιήθηκε πλήθος δοκιμών με στόχο να μελετηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της SPE και να επιλεγθούν οι βέλτιστες τιμές τους. Κατά τις δοκιμές μελετήθηκαν οι αρχικές συνθήκες του δείγματος (όγκος δείγματος, pH, παρουσία %MeOH), το εκλουστικό σύστημα (σύσταση και όγκος εκλουστικού) και οι συνθήκες επαναδιαλυτοποίησης (θερμοκρασία εξάτμισης, %ACN & %HCOOH στο διαλύτη). Στόχος των περαμάτων ήταν να βρεθούν οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων ώστε να επιτευχθεί 100% ανάκτηση για το σύνολο των αναλυτών.

Ως προσροφητικό υλικό για την SPE επιλέχθηκαν τα φυσίγγια Oasis HLB (200 mg, 6 cc) της Waters. Η επιλογή τους έγινε διότι, σύμφωνα με την κατασκευάστρια εταιρία, το υλικό πλήρωσης τους είναι σταθερό σε ακραία pH και σε πλήθος διαλυτών καθώς αυτό αποτελείται από δύο μονομερή, την υδρόφιλο N-βινυλοπυρρολιδόνη (N-vinylpyrrolidone) και το λιπόφιλο διβινυλοβενζόλιο, με αποτέλεσμα να είναι ένα ισορροπημένο υδρόφιλο-λιπόφιλο (Hydrophilic – Lipophilic Balanced, HLB) προσροφητικό υλικό αντιστρόφου φάσεως. Επιπλέον, παρέχει πολύ καλή κατακράτηση για ένα ευρύ φάσμα πολικότητας αναλυτών, η οποία δεν επηρεάζεται στην περίπτωση που περάσει αέρας από το υλικό κατά τα στάδια της ενεργοποίησης ή του περάσματος του δείγματος (σε αντίθεση με άλλα υλικά πλήρωσης, π.χ. C18), καθιστώντας την μέθοδο πιο ανθεκτική (robust). Επιπροσθέτως, στην βιβλιογραφία (βλ. Κεφάλαιο 2) αναφέρεται ότι τα φυσίγγια με πληρωτικό υλικό Oasis HLB έχουν την καλύτερη απόδοση και προσφέρουν τις μέγιστες ανακτήσεις για οργανικούς ρύπους όπως φυτοφάρμακα, ενδοκρινικοί διαταράκτες κ.α..

12.4.1 Αρχικές συνθήκες δείγματος

Στα πλαίσια της ανάπτυξης της SPE μεθόδου μελετήθηκε αν επηρεάζεται η απόδοση της από τον όγκο του δείγματος που διέρχεται από το φυσίγγιο. Έγιναν δοκιμές όπου ο όγκος του δείγματος ήταν 200, 400 και 500 ml. Σε όλες τις δοκιμές η προσυγκέντρωση ήταν σταθερά 1:1000. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι ανακτήσεις των ενώσεων δεν επηρεάζονται από την ποσότητα του δείγματος που διέρχεται από το πληρωτικό υλικό. Για την μέθοδο επιλέχθηκε ο όγκος του δείγματος να είναι 400 ml ώστε να μειωθεί ο χρόνος για το πέρασμα του δείγματος, αλλά και στο τέλος να υπάρχει αρκετή ποσότητα εκχυλίσματος (400 ml).

Ένας άλλος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν το pH του δείγματος πριν το πέρασμα του από το πληρωτικό υλικό SPE. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε pH ελαφρά όξινο (5), ουδέτερο (7) και ελαφρά βασικό pH (9). Από τα αποτελέσματα των δοκιμών προκύπτει ότι οι ανακτήσεις για τις περισσότερες ενώσεις δεν επηρεάζονται σημαντικά από το pH του δείγματος. Επίδραση του pH στις ανακτήσεις παρατηρήθηκε για τις ενώσεις Malathion, Diazinon και Ethion. Συγκεκριμένα, για τα Malathion και Diazinon παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ανάκτηση στο pH 9, της τάξης του -20% και -8% αντίστοιχα, ενώ για το Ethion παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στην ανάκτησή του (της τάξης του 5 με 10%) αυξανόμενου του pH. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποφασίστηκε για την καλύτερη ανάκτηση του συνόλου των ενώσεων, το pH του αρχικού δείγματος να είναι ουδέτερο και να μην γίνεται κάποια τροποποίηση του.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας ποσοστού MeOH στο αρχικό δείγμα. Για την μελέτη έγιναν δοκιμές όπου το αρχικό δείγμα περιείχε 0, 2.5 και 5 ml MeOH. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η παρουσία ποσοστού MeOH είχε μικρή θετική επίδραση στο ποσοστό των ανακτήσεων για τις περισσότερες ενώσεις (αύξηση στην ανάκτηση από 3 έως 8%). Αυτό πιθανότατα οφείλετε στο ότι η παρουσία μικρής ποσότητας μεθανόλης στο δείγμα αποτρέπει την απώλεια των αναλυτών λόγω προσρόφησής τους στο σύστημα της SPE (φιάλη, σωλήνας σύνδεσης και προσαρμογέας) [383] χωρίς να επιδρά αρνητικά στην κατακράτησή τους από το προσροφητικό υλικό. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε να γίνεται προσθήκη 5 ml MeOH στο αρχικό δείγμα πριν από την εκχύλισή του.

12.4.2 Εκλουστικό σύστημα

Για την εύρεση του βέλτιστου εκλουστικού συστήματος στα πλαίσια της ανάπτυξης της SPE μεθόδου, αρχικά μελετήθηκε η εκλουστική ικανότητα έξι οργανικών διαλυτών με διαφορετικό δείκτη πολικότητας, P' (Πίνακας 7.1). Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι % ανάκτησεις για τις υπό μελέτη ενώσεις που επιτυγχάνονται με την χρήση του κάθε διαλύτη ως εκλουστικό από τα φυσίγγια Oasis HLB (200 mg, 6 cc). Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Στον Πίνακα 12.5 παρατίθενται τα αποτελέσματα των ανακτήσεων των υπό μελέτη οργανικών ρύπων με την χρήση ποικίλων οργανικών διαλυτών ως εκλουστικό. Με βάση τα αποτελέσματα, η MeOH, που είναι και ο προτεινόμενος διαλύτης έκλουσης για τα OASIS HLB, βοηθάει στην ικανοποιητική ανάκτηση (60 - 100%) για τον μεγαλύτερο αριθμό των υπό μελέτη οργανικών ρύπων. Χαμηλές ανακτήσεις (<40%) παρατηρήθηκαν για τα Alachlor, Diazinon, Fenthion, Chlorpyrifos, Trifluralin και 2,4,6-Trichlorophenol. Παρόμοιες ανακτήσεις με αυτές της MeOH παρατηρήθηκαν και με την χρήση του EtAc ως διαλύτης έκλουσης.

Η χρήση του DCM ως εκλουστικό είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση του ποσοστού ανάκτησης για τον μεγαλύτερο αριθμό των αναλυτών. Με το DCM (1) οι ανακτήσεις ήταν μεγαλύτερες από 80% για τις 21 από τις 29 υπό μελέτη ενώσεις, (2) βελτιώθηκε σημαντικά η ανάκτηση των Alachlor, Diazinon, Fenthion και Chlorpyrifos, όμως (3) η ανάκτηση των Trifluralin και 2,4,6-Trichlorophenol ήταν 20 – 35% και (4) παρατηρήθηκε μηδενική ανάκτηση για τα Diclofenac και Pentachlorophenol.

Με την χρήση του τολουολίου ως εκλουστικό, παρατηρήθηκαν μέτριες ανακτήσεις (50 - 70%) για τις 17 από τις 29 ενώσεις ενώ οι ανακτήσεις για 7 αναλύτες ήταν χαμηλότερες του 15%. Συνεπώς το τολουόλιο δεν είναι κατάλληλο εκλουστικό για την ποσοτική ανάκτηση των υπό μελέτη ενώσεων.

Το εξάνιο, επίσης, δεν είναι κατάλληλος διαλύτης έκλουσης για την ανάκτηση των υπό μελέτη οργανικών ρύπων καθώς παρατηρήθηκε μηδενική ανάκτηση για τις 24 από τις 29 ενώσεις. Με την χρήση του εξανίου ανακτήθηκαν μόνο οι ενώσεις Alachlor, Diazinon, Chlorpyrifos, Ethion και Trifluralin σε ποσοστό 30 - 40%.

Με την χρήση του MTBE ως εκλουστικό επιτεύχθηκαν (1) ανακτήσεις > 80% για 13 αναλύτες, (2) ανακτήσεις > 50% για 8 αναλύτες συμπεριλαμβανομένων των Chlorpyrifos και Trifluralin όμως (3) οι ανακτήσεις ήταν μηδενικές για τις φαινυλουρίες Monuron, Chlorotoluron, Diuron και Linuron, όπως και για τις ενώσεις 17-a-Ethynylestradiol, 2,4,6-Trichlorophenol, Diclofenac και Pentachlorophenol.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται κατανοητό ότι δεν μπορεί να επιτευχθεί ποσοτική ανάκτηση όλων των υπό μελέτη οργανικών ρύπων με την χρήση ενός μόνο διαλύτη ως εκλουστικό διάλυμα. Με βάση τα αποτελέσματα των ανακτήσεων από τις παραπάνω δοκιμές, αποφασίστηκε για την συνέχεια των δοκιμών να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες έκλουσης οι MeOH, DCM και MTBE. Με στόχο την μείωση του όγκου των χρησιμοποιούμενων οργανικών διαλυτών, στη συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο εκλουστικά, το εκλουστικό Α που ήταν μίγμα MeOH – MTBE και το εκλουστικό Β που ήταν DCM.

Πίνακας 12.5: Ποσοστιαία (%) ανάκτηση των υπό μελέτη οργανικών ρύπων με την χρήση ποικίλων οργανικών διαλυτών ως εκλουστικό

Οργανικός διαλύτης - Εκλουστικό	% Ανάκτηση	Οργανικοί ρύποι
Μεθανόλη (MeOH) <i>Προτεινόμενο εκλουστικό για τα OASIS HLB</i>	80 – 100 %	Dimethoate, Monuron, Cyanazine, Chlorotoluron, Isoproturon, Diuron, Methidathion, Linuron, Azinphos-methyl, Triazophos, Azinphos-ethyl, Chlorfenvinphos, Phosalone, β-Estradiol, Diclofenac, Pentachlorophenol
	60 – 80 %	Simazine, Metribuzine, Atrazine, Propazine, Malathion, Ethion, 17-a-Ethynylestradiol
	<40%	Alachlor, Diazinon, Fenthion, Chlorpyriphos, Trifluralin, 2,4,6-Trichlorophenol
Οξικός αιθυλεστέρας (EtAc)	80 – 100 %	Dimethoate, Monuron, Cyanazine, Chlorotoluron, Isoproturon, Diuron, Propazine, Methidathion, Linuron, Azinphos-methyl, Malathion, Triazophos, Azinphos-ethyl, Chlorfenvinphos, Phosalone, Ethion, β-Estradiol, 17-a-Ethynylestradiol, Diclofenac
	60 – 80 %	Simazine, Metribuzine, Atrazine, Chlorpyriphos, Pentachlorophenol
	<50%	Alachlor, Diazinon, Fenthion, Trifluralin, 2,4,6-Trichlorophenol
Διχλωρομεθάνιο (DCM)	80 – 100 %	Dimethoate, Simazine, Metribuzine, Monuron, Cyanazine, Atrazine, Chlorotoluron, Isoproturon, Diuron, Propazine, Methidathion, Linuron, Azinphos-methyl, Malathion, Triazophos, Azinphos-ethyl, Chlorfenvinphos, Phosalone, Ethion, β-Estradiol, 17-a-Ethynylestradiol
	60 – 80 %	Alachlor, Diazinon, Fenthion, Chlorpyriphos,
	20 - 35 %	Trifluralin, 2,4,6-Trichlorophenol
	0 %	Diclofenac, Pentachlorophenol
Τολουόλιο	70 – 85 %	Azinphos-methyl, Azinphos-ethyl, Chlorfenvinphos, Phosalone, Ethion
	50 – 70 %	Dimethoate, Simazine, Metribuzine, Monuron, Atrazine, Chlorotoluron, Isoproturon, Diuron, Propazine, Methidathion, Linuron, Alachlor, Malathion, Triazophos, Diazinon, Fenthion, Chlorpyriphos
	0 - 15 %	Cyanazine, Trifluralin, β-Estradiol, 17-a-Ethynylestradiol, 2,4,6-Trichlorophenol, Diclofenac, Pentachlorophenol
Εξάνιο	30 – 40 %	Alachlor, Diazinon, Chlorpyriphos, Ethion, Trifluralin
	0 %	Dimethoate, Simazine, Metribuzine, Monuron, Cyanazine, Atrazine, Chlorotoluron, Isoproturon, Diuron, Propazine, Methidathion, Linuron, Azinphos-methyl, Malathion, Triazophos, Azinphos-ethyl, Chlorfenvinphos, Fenthion, Phosalone, β-Estradiol, 17-a-Ethynylestradiol, 2,4,6-Trichlorophenol, Diclofenac, Pentachlorophenol

Μεθυλ-tert-βουτυλ-αιθέρας (MTBE)	80 – 100 %	Dimethoate, Metribuzine, Propazine, Methidathion, Azinphos-methyl, Alachlor, Malathion, Triazophos, Azinphos-ethyl, Chlorfenvinphos, Diazinon, Phosalone, Ethion
	50 – 80 %	Simazine, Cyanazine, Atrazine, Isoproturon, Fenthion, Chlorpyrifos, Trifluralin, β-Estradiol
	0 %	Monuron, Chlorotoluron, Diuron, Linuron, 17-a-Ethynylestradiol, 2,4,6-Trichlorophenol, Diclofenac, Pentachlorophenol

Αρχικά, κατά τις δοκιμές με τα δύο εκλουστικά μελετήθηκε η επίδραση του ποσοστού της MeOH στο εκλουστικό Α. Για το λόγο αυτό έγιναν πειράματα όπου η έκλυση πραγματοποιήθηκε με 5 ml μίγματος MeOH – MTBE όπου το ποσοστό MeOH ήταν 20, 40, 60 και 80% ακολουθούμενη από 5 ml DCM. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι όσο αυξανόταν το ποσοστό MeOH στο μίγμα του εκλουστικού είχε αρνητική επίδραση στις ανακτήσεις των ενώσεων Linuron (-9%), Malathion (-9%), Chlorfenvinphos (-15%) Diazinon (-34%), Chlorpyrifos (-20%), Ethion (-21%) και Trifluralin (-13%). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε θετική επίδραση (αύξηση) στην ανάκτηση της 2,4,6-Trichlorophenol (+36%) με το αυξανόμενο ποσοστό MeOH στο μίγμα του εκλουστικού. Οι ανακτήσεις των υπόλοιπων ενώσεων δεν παρουσίασαν κάποια σημαντική μεταβολή με την αλλαγή του ποσοστού της MeOH στο μίγμα του εκλουστικού. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα για το σύνολο των υπό μελέτη οργανικών ρύπων, ως βέλτιστη τιμή για το ποσοστό της MeOH στο μίγμα του εκλουστικού Α επιλέχθηκε το 60% με 40% MTBE.

Έπειτα, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας ποσοστού HCOOH στο εκλουστικό Α, στο σύνολο των ανακτήσεων. Στα πειράματα που διεξήχθησαν η έκλυση πραγματοποιήθηκε με 5 ml μίγματος 60% MeOH : 40% MTBE με μεταβαλλόμενο ποσοστό HCOOH (0, 1.5, 3, 4.5 και 6%) ακολουθούμενη από 5 ml DCM. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η παρουσία ποσοστού HCOOH το εκλουστικό Α βοηθάει στην αύξηση των ανακτήσεων για ένα μεγάλο αριθμό των υπό μελέτη ενώσεων. Αναλυτικότερα, με την παρουσία 3% HCOOH παρατηρήθηκε θετική επίδραση για τις ενώσεις Dimethoate (+4%), Monuron (+10%), Chlorotoluron (+6%), Methidathion (+12%), Azinphos-methyl (+6%), Malathion (+4%), Triazophos (+9%) Azinphos-ethyl (+5%), Chlorfenvinphos (+7%), Diazinon (+40%), Ethion (+20%) και Diclofenac (+6%) (σε σύγκριση με 0% HCOOH). Η περαιτέρω αύξηση του HCOOH δεν επηρέασε περαιτέρω τις ανακτήσεις των παραπάνω ενώσεων, με εξαίρεση τις Methidathion, Chlorfenvinphos και Diclofenac, για τις οποίες με 6% HCOOH παρατηρήθηκε μείωση στην ανάκτηση της τάξης του -5% σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ανακτήσεις τους με 3% HCOOH. Εξαίρεση αποτελούν επίσης και οι Diazinon και Ethion για τις οποίες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην ανάκτηση (-45% και -18% αντίστοιχα) με την περαιτέρω αύξηση του %HCOOH από το 3 στο 6%. Η αύξηση του ποσοστού του HCOOH στο εκλουστικό Α επηρέασε αρνητικά τις ανακτήσεις των Cyanazine (-16%), Fenthion (-48%), Phosalone (-11%) και Pentachlorophenol (-19%) (σύγκριση 0% με 6% HCOOH). Συνυπολογίζοντας όλα τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε ως βέλτιστο η παρουσία 3% HCOOH στο εκλουστικό Α (60% MeOH : 40% MTBE).

Μετά την επιλογή της βέλτιστης σύστασης του διαλύτη Α πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την εύρεση του κατάλληλου όγκου του με στόχο την βέλτιστη ανάκτηση των αναλυτών από το υλικό πλήρωσης. Στα πειράματα που διεξήχθησαν η έκλυση πραγματοποιήθηκε με μεταβαλλόμενους όγκους (3, 4 & 5ml) του εκλουστικού Α (60% MeOH : 40% MTBE, 3% HCOOH) ακολουθούμενη από 5

ml DCM. Οι καλύτερες ανακτήσεις σημειώθηκαν με την χρήση των 5ml εκλουστικού Α για το σύνολο των υπό μελέτη αναλυτών, ο οποίος και επιλέχθηκε για την συνέχεια των δοκιμών.

Ο τελευταίος παράγοντας που εξετάστηκε στα πλαίσια της μελέτης για την εύρεση του βέλτιστου εκλουστικού συστήματος, ήταν ο όγκος του εκλουστικού Β (DCM). Κατά τις δοκιμές η έκλουση πραγματοποιήθηκε με 5 ml 60:40 MeOH:MTBE (v/v, 3% HCOOH) ακολουθούμενη από μεταβαλλόμενους όγκους (2, 3, 4, 5 & 6 ml) DCM. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ανάκτηση για το μεγαλύτερο μέρος των υπό μελέτη ενώσεων δεν επηρεάζεται από τον όγκο του εκλουστικού Β. Μικρή θετική επίδραση παρατηρήθηκε με την αύξηση του όγκου του DCM από 2 σε 4 ml για τα Malathion (+6%), Azinphos-ethyl (+5%), Diazinon (+12%), Chlorpyrifos (+10%) και Ethion (+12%). Με την χρήση μεγαλύτερου από 4ml όγκου του εκλουστικού Β δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση στις ανακτήσεις των υπό μελέτη ενώσεων. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της μελέτης και με στόχο την ανάπτυξη μίας μεθόδου φιλικής προς το περιβάλλον και την οικονομία στην χρήση των οργανικών διαλυτών, ως βέλτιστη τιμή του όγκου του εκλουστικού Β επιλέχθηκαν τα 4ml.

12.4.3 Επανασύσταση εκλούσματος

Ένα επιπλέον στάδιο που επηρεάζει την ανάκτηση των ουσιών είναι η επανασύσταση του εκλούσματος σε κατάλληλο διαλύτη – συμβατό με την υγρή χρωματογραφία. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές για την εκτίμηση των συνθηκών επαναδιαλυτοποίησης (σύσταση διαλύτη και θερμοκρασία εξάτμισης) με στόχο την ποσοτική παραλαβή των υπό προσδιορισμό ενώσεων από το δοκιμαστικό σωλήνα μετά την μέχρι ξηρού εξάτμιση του εκλούσματος της SPE.

Κατά τις δοκιμές προστέθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες 500 ml προτύπου διαλύματος 29 οργανικών ρύπων συγκέντρωσης 100 µg/L παρουσία εκλουστικού διαλύτη, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 500 ml διαλύτη μίγματος ACN:H₂O όπου το ποσοστό του ACN ήταν 10, 20, 30, 40, 50 και 60%. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι με 10% ACN στον διαλύτη επανασύστασης δεν επιτυγχάνεται ποσοτική παραλαβή για τις περισσότερες τις υπό μελέτη ενώσεις. Ανάκτηση μεγαλύτερη του 95% παρατηρήθηκε για τα Monuron, Atrazine, Chlorotoluron, Isoproturon, Azinphos-ethyl, Alachlor και 17-α-Ethinylestadiol. Με 20% ACN στον διαλύτη επανασύστασης παρατηρήθηκαν ανακτήσεις μεγαλύτερες του 95% για τις προαναφερθείσες ενώσεις καθώς και για τα Methidathion, Malathion, Triazophos και Diclofenac. Αντιθέτως, τόσο με 10%, όσο και 20% ACN παρατηρήθηκαν πολύ χαμηλές ανακτήσεις (μικρότερες του 10% και 40%, αντίστοιχα) για τα φυτοφάρμακα Diazinon, Fenthion, Phosalone, Chlorpyrifos, Ethion, Trifluralin και για τις 2,4,6-Trichlorophenol και Pentachlorophenol. Με 30% ACN στον διαλύτη αυξήθηκε περαιτέρω το ποσοστό ανάκτησης για όλες τις ενώσεις. Παρόλα αυτά δεν ήταν το βέλτιστο για όλες τις περιπτώσεις. Οι καλύτερες ανακτήσεις για το σύνολο των υπό μελέτη οργανικών ρύπων επιτεύχθηκαν με 40% ACN στον διαλύτη επανασύστασης. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό ανάκτησης ήταν 95-100%, με εξαίρεση τα Fenthion και Chlorpyrifos που η ανάκτηση τους από το γυαλί ήταν 80% και 84% αντίστοιχα καθώς και του Trifluralin του οποίου η ανάκτηση ήταν 50%. Με την χρήση 50% και 60% ACN στον διαλύτη επανασύστασης δεν επιτεύχθηκε κάποια επιπλέον βελτίωση αυτών των ποσοστών ανάκτησης. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και με στόχο την οικονομία στην χρήση των οργανικών διαλυτών, επιλέχθηκε η επανασύσταση του υπολείμματος να γίνεται σε διαλύτη ACN:H₂O 40:60, v/v.

Όπως προαναφέρθηκε λεπτομερώς και στην παράγραφο 12.2, παρατηρήθηκε ότι το pH που διαλύτη που περιέχεται το τελικό εκχύλισμα επηρεάζει σημαντικά την χρωματογραφία των Diclofenac και Pentachlorophenol στον αρνητικό ιοντισμό. Για την μελέτη της επίδρασης αυτής, αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματος των οργανικών συγκέντρωσης 100 µg/L που περιέχονταν σε διαλύτες ACN:H₂O 40:60, v/v με 0%, 0,1% και 0,5% HCOOH. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προέκυψε ότι η παρουσία μικρού ποσοστού HCOOH βελτιώνει την χρωματογραφία, ενώ η αύξησή του ποσοστού του προκαλεί μείωση στην απόκριση (εμβαδόν) κάποιων ενώσεων. Για του παραπάνω λόγους ο διαλύτης επαναδιαλυτοποίησης αποφασίστηκε να έχει 0,1% HCOOH.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές όπου η μέχρι ξηρού εξάτμιση του εκλούσματος έγινε στους 40°C και σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) και το υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 500 µl διαλύτη ACN:H₂O 40:60, v/v (0,1% HCOOH). Από τα αποτελέσματα προκύπτει ελαφριά πτώση στην ανάκτηση κάποιων ενώσεων κατά την εξάτμιση τους στους 40°C. Για τον λόγο αυτό αποφασίστηκε η εξάτμιση του εκλουστικού κατά την διαδικασία της επανασύστασης να γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

12.4.4 Αναλυτική πορεία της αναπτυχθείσας μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων σε νερό

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της SPE, LC-MS/MS μεθόδου, προκύπτει η ακόλουθη αναλυτική πορεία για την απομόνωση και προσυγκέντρωση των υπό μελέτη οργανικών ρύπων από νερό.

1. Τα δείγματα επιφανειακών νερών διηθούνται στη γυάλινη συσκευή διήθησης υπό κενό με φίλτρα Glass Microfiber. Τα δείγματα πόσιμου νερού αναλύονται ως έχουν.
2. Το δείγμα (400ml) ογκομετρείται με ογκομετρικό κύλινδρο και μεταφέρεται σε γυάλινη φιάλη του 1L.
3. Στο δείγμα προστίθενται 5ml μεθανόλης, αναδεύεται και αφήνεται για 5 min.
4. Στη συσκευή SPE προετοιμάζονται τα φυσίγγια Oasis HLB (200 mg, 6 cc, Waters) με διαδοχικό πέρασμα 5ml DCM, 5ml MTBE, 5ml MeOH και 5ml νερού.
5. Οι φιάλες των δειγμάτων συνδέονται με σωλήνες teflon και κατάλληλους προσαρμογείς στα φυσίγγια SPE. Τα δείγματα περνούν από τα φυσίγγια με ροή περίπου 5ml/min (διακριτές σταγόνες), με χρήση κενού. Αφού περάσει όλο το δείγμα αποσυνδέονται οι σωληνώσεις Teflon.
6. Τα φυσίγγια εκπλένονται με 6ml νερό και στη συνέχεια ξηραίνονται για 30min σε ροή αέρα υπό κενό.
7. Αφού ολοκληρωθεί το στάδιο της ξήρανσης, τοποθετείται στην συσκευή SPE κατάλληλος υποδοχέας δοκιμαστικών σωλήνων και ένας δοκιμαστικός σωλήνας των 10ml κάτω από κάθε σύριγγα της συσκευής.
8. Τα φυσίγγια εκλούονται με 5ml διαλύματος έκλουσης MTBE:MeOH 40:60 v/v (3% HCOOH) και 4ml DCM με ροή μικρότερη από 1 ml/min. Στο τέλος της έκλουσης αφήνεται το κενό για λίγα δευτερόλεπτα, ώστε να συλλεχθεί όλο το έκλουσμα.
9. Οι σωλήνες μεταφέρονται στην συσκευή εξάτμισης με άζωτο και τα εκλούσματα εξατμίζονται, σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι ξηρού με ελαφρύ ρεύμα αζώτου.
10. Τα υπολείμματα επαναδιαλυτοποιούνται με 400µl διαλύματος διαλυτοποίησης ACN:H₂O 40:60 v/v (0.1% HCOOH). Στη συνέχεια αναδεύονται καλά με vortex και τα τελικά εκχυλίσματα μεταφέρονται σε κατάλληλα φιαλίδια και αναλύονται στο σύστημα LC-APCI-MS/MS.

12.5 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων

Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων σε νερό με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία – συζευγμένη φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) πραγματοποιήθηκε επικύρωση ώστε να αξιολογηθεί η απόδοση της μεθόδου. Κατά την επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων προκειμένου να εκτιμηθούν οι ακόλουθες παράμετροι απόδοσής της: ειδικότητα, γραμμικότητα & εύρος μετρήσεων, ακρίβεια (accuracy), πιστότητα (precision), όρια ανίχνευσης (LOD) & ποσοτικοποίησης (LOQ) και οι λόγοι των θυγατρικών ιόντων. Τα αποτελέσματα επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου παρατίθενται στον Πίνακα 12.6.

Για τον εντοπισμό πιθανών παρεμποδίσεων (ειδικότητα μεθόδου) αναλύθηκαν λευκά δείγματα νερού. Σε κανένα από τα λευκά δείγματα που αναλύθηκαν δεν υπήρχαν συνεκλούμενες κορυφές στους χρόνους ανάσχεσης (t_R) των υπό προσδιορισμό οργανικών ρύπων. Να σημειωθεί ότι η προτεινόμενη μέθοδος που αναπτύχθηκε για την ανίχνευση των υπό μελέτη οργανικών ρύπων είναι πολύ εκλεκτική καθώς παρέχει αξιόπιστη ταυτοποίηση που βασίζεται: 1) στον χρόνο ανάκτησης των ενώσεων (t_R , retention time), 2) στη μελέτη δύο χαρακτηριστικών μεταπτώσεων από το πρόδρομο σε θυγατρικό ιόν και 3) από τον υπολογισμό του λόγου ιόντων. Συνεπώς, η προτεινόμενη μέθοδος επιτυγχάνει 4 μονάδες ταυτοποίησης (identification points, IPs) πληρώντας τα αυστηρά κριτήρια που ορίζονται από την Ευρωπαϊκή νομοθεσία σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων [334].

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους μετρήσεων της μεθόδου αναλύθηκε σειρά πρότυπων διαλυμάτων, μιγμάτων των 29 οργανικών ρύπων σε δέκα διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταξύ 0,1 – 500 $\mu\text{g/L}$, εις τριπλούν. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε καλή γραμμικότητα, με τον συντελεστή προσδιορισμού να είναι $R^2 > 0,980$ (Πίνακας 12.6). Επίσης, παρατηρήθηκε καλή ευαισθησία καθώς οι περισσότερες ενώσεις ανιχνεύτηκαν απ' ευθείας στο σύστημα LC-APCI-MS/MS σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 1 $\mu\text{g/L}$. Εξάιρεση αποτέλεσαν οι Methidathion, Azinphos-methyl, Azinphos-ethyl, Trifluralin, 2.4.6-Trichlorophenol και Pentachlorophenol που άρχισαν να ανιχνεύονται από μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (2 ή 5 $\mu\text{g/L}$).

Η ακρίβεια της μεθόδου, ειδικότερα η ορθότητα (trueness), εκφρασμένη ως % ανάκτηση εκτιμήθηκε από την ανάλυση εμβολιασμένων / ενισχυμένων (spiked) δειγμάτων νερού με τους υπό προσδιορισμό οργανικούς ρύπους σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng/L . Συνολικά αναλύθηκαν δεκαπέντε δείγματα σε τρεις διαφορετικές ημέρες. Οι μέσες ανακτήσεις (Πίνακας 12.6) για το πλήθος των αναλυτών κυμάνθηκαν από 70,6% έως 99,4%. Εξάιρεση αποτελούν οι ενώσεις Chlorpyrifos (57,5%), Pentachlorophenol (62,9%), Fenthion (24,2%), Trifluralin (26,7%) και 2.4.6-Trichlorophenol (8,0%) που η μέση ανάκτησή τους ήταν χαμηλή. Αυτές οι αποκλίσεις στην ανάκτηση οφείλονται στις πολύ διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών.

Η πιστότητα της μεθόδου (επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα) εκφρασμένη ως % RSD εκτιμήθηκε από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων νερού με τους υπό προσδιορισμό οργανικούς ρύπους σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng/L (5 επαναλήψεις σε 3 διαφορετικές ημέρες, $n=15$). Η επαναληψιμότητας της μεθόδου, εκφρασμένη ως διευρυμένη σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_r, pooled), κυμάνθηκε από 3,0 έως 20,2%, με εξαίρεση τα Fenthion (32,7%), Trifluralin (27,1%) και 2.4.6-Trichlorophenol (45,1%). Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου, εκφρασμένη ως % RSD_R, κυμάνθηκε από 4,9 έως 20,2%, με εξαίρεση τα Fenthion (35,3%), Trifluralin (27,3%), και 2.4.6-Trichlorophenol (47,4%) (Πίνακας 12.6).

Πίνακας 12.6: Αποτελέσματα επικύρωσης SPE, LC-APCI-MS/MS μεθόδου προσδιορισμού οργανικών ρύπων στο νερό
(επίπεδο συγκέντρωσης: 100 ng/L για κάθε ένωση)

Αναλύτης	Εύρος γραμμικότητας (μg/L)	Συντελεστής Προσδιορισμού (R ²)	% Μέση Ανάκτηση ^α	%RSD _r pooled ^β	%RSD _R ^γ	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Θυγατρικό ιόν Q1 m/z	Θυγατρικό ιόν Q2 m/z	[Q2]/[Q1] (%RSD) ^δ
Dimethoate	0,1-500	0,9982	90,2	4,7	9,8	0,6	1,7	125	171	0,69 (1,42)
Simazine	0,1-500	0,9959	89,1	7,1	8,4	1,4	4,2	132	124	0,70 (4,08)
Metribuzine	0,1-500	0,9974	73,9	7,8	12,3	1,2	3,5	187	131	0,22 (9,07)
Monuron	0,1-500	0,9966	97,6	3,8	6,3	1,0	2,9	72	126	0,19 (3,89)
Cyanazine	0,1-500	0,9955	88,1	3,3	6,4	0,6	1,8	214	104	0,14 (3,35)
Atrazine	0,1-500	0,9945	86,6	8,5	9,8	0,4	1,1	174	104	0,20 (7,19)
Chlorotoluron	0,1-500	0,9955	97,0	3,0	4,9	1,1	3,2	72	46	0,32 (4,09)
Isoproturon	0,1-500	0,9953	93,1	4,0	10,0	1,3	4,0	72	165	0,49 (2,70)
Diuron	0,1-500	0,9948	99,4	4,1	8,7	1,4	4,3	72	160	0,13 (4,74)
Propazine	0,1-500	0,9949	83,4	8,4	15,6	0,8	2,3	188	146	1,00 (1,67)
Methidathion	1-500	0,9903	89,4	6,1	8,5	1,9	5,6	145	85	0,79 (8,84)
Linuron	0,1-500	0,9918	93,0	7,6	11,3	1,7	5,1	182	160	0,96 (2,24)
Azinphos-methyl	2-500	0,9875	95,0	3,7	5,1	3,2	9,7	125	132	0,74 (7,13)
Alachlor	0,5-500	0,9893	75,7	13,3	13,8	3,1	9,2	147	162	0,56 (15,47)
Malathion	0,1-500	0,9879	80,9	8,6	15,6	3,3	9,9	127	99	0,87 (5,04)
Triazophos	0,1-500	0,9878	96,7	3,0	7,3	1,3	3,9	162	119	0,27 (4,75)
Azinphos-ethyl	2-500	0,9859	94,2	6,5	11,0	4,0	12,1	97	137	0,99 (8,49)
Chlorfenvinphos	0,1-500	0,9877	93,9	4,7	14,1	3,6	10,9	155	205	0,67 (5,63)
Diazinon	0,1-500	0,9902	73,8	12,6	16,6	1,3	3,9	169	153	0,52 (1,15)
Fenthion	0,5-500	0,9878	24,2	32,7	35,3	3,1	9,4	247	169	0,88 (2,57)
Phosalone	0,1-500	0,9861	88,3	11,1	11,5	2,1	6,3	182	111	0,46 (4,74)

Αναλύτης	Εύρος γραμμικότητας (μg/L)	Συντελεστής Προσδιορισμού (R ²)	% Μέση Ανάκτηση ^α	%RSD _r pooled ^β	%RSD _R ^γ	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Θυγατρικό ιόν Q1 m/z	Θυγατρικό ιόν Q2 m/z	[Q2]/[Q1] (%RSD) ^δ
Chlorpyrifos	0,1-500	0,9819	57,5	17,0	20,2	4,0	12,1	198	97	0,72 (5,11)
Ethion	0,1-500	0,9831	70,6	7,3	18,8	2,6	7,8	143	97	0,61 (9,68)
Trifluralin	5-500	0,9836	26,7	27,1	27,3	16,3	48,8	232	202	0,21 (16,92)
β-Estradiol	0,5-500	0,9963	80,9	17,8	17,2	7,2	21,6	145	143	0,75 (11,49)
17α-Ethinylestadiol	1-500	0,9979	90,3	7,3	7,4	3,4	10,1	145	159	0,64 (16,16)
2.4.6-Trichlorophenol	2-500	0,9934	8,0	45,1	47,4	4,1	12,2	-	-	-
Diclofenac	0,1-500	0,9989	97,8	9,7	10,6	1,6	4,8	250	214	0,05 (9,94)
Pentachlorophenol	2-500	0,9993	62,9	12,4	13,1	2,8	8,3	-	-	-

^α n=15

^β Σχετική τυπική απόκλιση υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=15), με την χρήση όλων των δεδομένων

^γ Σχετική τυπική απόκλιση υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (3 διαφορετικές μέρες) (n = 15)

^δ Λόγοι ιόντων και %RSD υπολογισμένα από την ανάλυση πρότυπου διαλύματος σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 μg/L για κάθε αναλύτη (n = 9)

Οι υπάρχουσες ευρωπαϊκές οδηγίες σχετικά με την απόδοση των αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των οργανικών ρύπων και ειδικότερα των φυτοφαρμάκων στο πόσιμο νερό αναφέρουν το 25% ως ελάχιστο χαρακτηριστικό επίδοσης της πιστότητας και της ορθότητας της μεθόδου [335, 336]. Οι παραμετρικές τιμές για την πιστότητα και την ορθότητα της προτεινόμενης μεθόδου είναι σε συμφωνία με τις οδηγίες για τους περισσότερους μελετώμενους ρύπους. Εκτός των ορίων των οδηγιών για την πιστότητα και την ορθότητα είναι οι παραμετρικές τιμές που προσδιορίστηκαν για τις ενώσεις Fenthion, Trifluralin και 2.4.6-Trichlorophenol. Ακόμα, εκτός των ορίων των οδηγιών για το πόσιμο νερό είναι και οι παραμετρικές τιμές για την ορθότητα των Chlorpyrifos και Pentachlorophenol, των οποίων η μέση ανάκτηση ήταν 57,5 και 62,9%, αντίστοιχα. Η ευρωπαϊκή οδηγία στο πλαίσιο της κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων (WFD) δεν αναφέρει συγκεκριμένα όρια απόδοσης μεθόδου για τις παραμετρικές τιμές της πιστότητας και της ορθότητας.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου υπολογίστηκαν και κυμάνθηκαν από 0,4 έως 16,3 ng/L για όλους τους αναλύτες, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 1,1 έως 21,6 ng/L, με εξαίρεση το Trifluralin για το οποίο το LOQ ήταν 48,8 ng/L. Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία για το πόσιμο νερό τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου θα πρέπει να είναι τουλάχιστον στο 25% της παραμετρικής τιμής (0,10 µg/L για τα φυτοφάρμακα), δηλαδή $LOD \leq 25 \text{ ng/L}$ [335, 336]. Για όλα τα υπό προσδιορισμό φυτοφάρμακα, αλλά και για τους άλλους οργανικούς ρύπους, τα LODs της προτεινόμενης μεθόδου είναι μικρότερα από 25 ng/L. Επίσης, σύμφωνα με την ευρωπαϊκή οδηγία στο πλαίσιο της κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων (WFD) το LOQ της μεθόδου θα πρέπει να είναι ίσο ή μικρότερο από το 30% του σχετικού ΠΠΠ για την κάθε ουσία προτεραιότητας [198]. Τα LOQs της αναπτυχθείσας μεθόδου για τις ουσίες προτεραιότητας Alachlor, Atrazine, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Diuron, Isoproturon, Simazine και Pentachlorophenol είναι σε συμφωνία με την οδηγία, ενώ για το Trifluralin το LOQ είναι πολύ υψηλότερο.

Συνολικά, από τα αποτελέσματα επικύρωσης προκύπτει ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό των περισσότερων υπό μελέτη οργανικών ρύπων στο νερό καθώς οι προσδιορισθείσες παραμετρικές τιμές απόδοσης της μεθόδου είναι σε συμφωνία με τις σχετικές ευρωπαϊκές οδηγίες. Οι παραμετρικές τιμές που προέκυψαν από την εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου για τις ενώσεις Fenthion, Trifluralin και 2.4.6-Trichlorophenol δεν είναι σε συμφωνία με τις σχετικές οδηγίες. Η χαμηλή ακρίβεια και πιστότητα που παρουσιάζει η μέθοδος για τις συγκεκριμένες ενώσεις μπορεί να αντιμετωπιστεί με την χρήση ισοτοπικά επισημασμένων ενώσεων. Οι ισοτοπικά επισημασμένες ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εσωτερικά πρότυπα – υποκατάστατα των αναλυτών (surrogate standards) μειώνοντας σημαντικά το σφάλμα της ανάκτησης της μεθόδου. Επίσης, με την χρήση τους αυξάνεται και η πιστότητα της μεθόδου καθώς παρατηρούνται οι ίδιες μεταβολές στην απόκριση του αναλύτη και του υποκατάστατου του που οφείλονται στα τυχαία σφάλματα κατά την εφαρμογή της μεθόδου.

Η ανακτήσεις που επιτυγχάνονται με την παρούσα μέθοδο είναι αντίστοιχες ή και υψηλότερες σε σύγκριση με άλλες πολύ-παραμετρικές μεθόδους που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Ειδικότερα, οι ανακτήσεις που επιτυγχάνονται με την παρούσα μέθοδο για τα φυτοφάρμακα είναι αντίστοιχες με αυτές που αναφέρονται σε άλλες μελέτες για τον προσδιορισμό διαφορετικών κατηγοριών φυτοφαρμάκων [282, 288-290] ενώ είναι υψηλότερες σε σύγκριση με αυτές που αναφέρονται από τους Carvalho et al [287], Bossi et al [384], Belmonte Vega et al [385] & Rorigues et al [281]. Επίσης, και σε άλλες μελέτες έχουν καταγραφεί χαμηλές ανακτήσεις για το Chlorpyrifos όπως 16% [290]

και 43,7% [281]. Επιπλέον, στη μία μελέτη που αναφέρεται ο συμπροσδιορισμός του Trifluralin η ανάκτηση του είναι χαμηλή (56%) και παράλληλα η ανίχνευση του επιτυγχάνεται με GC-MS και όχι με LC-MS, ενώ η ανάκτηση που επιτυγχάνεται για το Fenthion είναι ικανοποιητική (70%) αλλά παρουσιάζει μεγάλη απόκλιση ($SD = 30$) [288]. Στην ίδια μελέτη επιτυγχάνονται καλές ανακτήσεις και για τις χλωροφαινόλες, 2.4.6-Trichlorophenol ($76\% \pm 4,8$) και Pentachlorophenol ($81\% \pm 17$).

Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους όπου επιτυγχάνεται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών κατηγοριών φυτοφαρμάκων αλλά και άλλων ρύπων όπως β -Estradiol, 17- α -Ethinylestradiol και Diclofenac η παρούσα μέθοδος υπερτερεί. Ειδικότερα οι ανακτήσεις που επιτεύχθηκαν με την παρούσα μέθοδο είναι υψηλότερες σε σύγκριση με αυτές που αναφέρονται από τους Loos et al (β -Estradiol $54\% \pm 15$, 17 α -Ethinylestradiol $44\% \pm 1$, Diclofenac $65\% \pm 6$, Simazine $70\% \pm 11$, Atrazine $72\% \pm 13$, Isoproturon $72\% \pm 13$, Diuron $72\% \pm 12$ & Linuron $75\% \pm 9$) [283]. Χαμηλές είναι και οι απόλυτες ανακτήσεις που αναφέρονται από τους Ribeiro et al (recoveries: 6,61 – 63,9%). Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ισοτοπικά επισημασμένα εσωτερικά πρότυπα (SSs) βελτιώνοντας σημαντικότερα την ακρίβεια της μεθόδου (accuracy: 80,2 – 119%) [286]. Επιπρόσθετα, τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο είναι της ίδια τάξης μεγέθους με αυτά που αναφέρονται σε αντίστοιχες μεθόδους στην βιβλιογραφία, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις με την προσυγκέντρωση του δείγματος με SPE και με την χρήση της ευαίσθητης και εκλεκτικής τεχνικής ανίχνευσης LC-MS/MS μπορούν να προσδιορισθούν οι οργανικοί ρύποι σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, μερικών ng/L.

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν και μελέτες όπου επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός ενός πολύ μεγάλου αριθμού οργανικών ρύπων. Σε μελέτη των Becouze et al αναφέρεται ο προσδιορισμός 20 ουσιών προτεραιότητας, όμως ανάμεσα σε αυτές δεν συμπεριλαμβάνεται το Chlorpyrifos και ο προσδιορισμός του Trifluralin πραγματοποιείται με GC-MS και όχι με LC-MS/MS όπως οι άλλες ενώσεις [386]. Επίσης, οι Rubirola et al ανέπτυξαν μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 24 ουσιών προτεραιότητας και ενώσεων που συμπεριλαμβάνονται στον κατάλογο επιτήρησης, με on-line SPE LC-MS/MS, όμως στην μελέτη τους δεν συμπεριλαμβάνονται τα Alachlor και Trifluralin [387]. Οι Campos-Manãs et al δημοσίευσαν μία μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 115 οργανικών ρύπων με UPLC-MS/MS. Στην μέθοδο που προτείνουν δεν γίνεται προκατεργασία του δείγματος με SPE και ανάμεσα στους υπό μελέτη ρύπους δεν είναι η ουσία προτεραιότητας Trifluralin ούτε κάποια από τις ενώσεις που συμπεριλαμβάνονται στον κατάλογο επιτήρησης [388]. Οι Robles Molina et al πρότειναν μία μέθοδο όπου επιτυγχάνεται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός 430 οργανικών ρύπων που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες με off line SPE και LC-TOF MS. Στην μέθοδο που προτείνουν μόνο το 35% των υπό μελέτη ενώσεων είχε ανακτήσεις μεγαλύτερες από 70%. Για το μεγαλύτερο μέρος των αναλυτών οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 30 με 70%. Στη συγκεκριμένη μελέτη οι ανακτήσεις των Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorpyrifos και Fenthion ήταν <40%, η ανάκτηση του Trifluralin ήταν <20% ενώ ανάμεσα στις ενώσεις δεν ήταν η Pentachlorophenol [312].

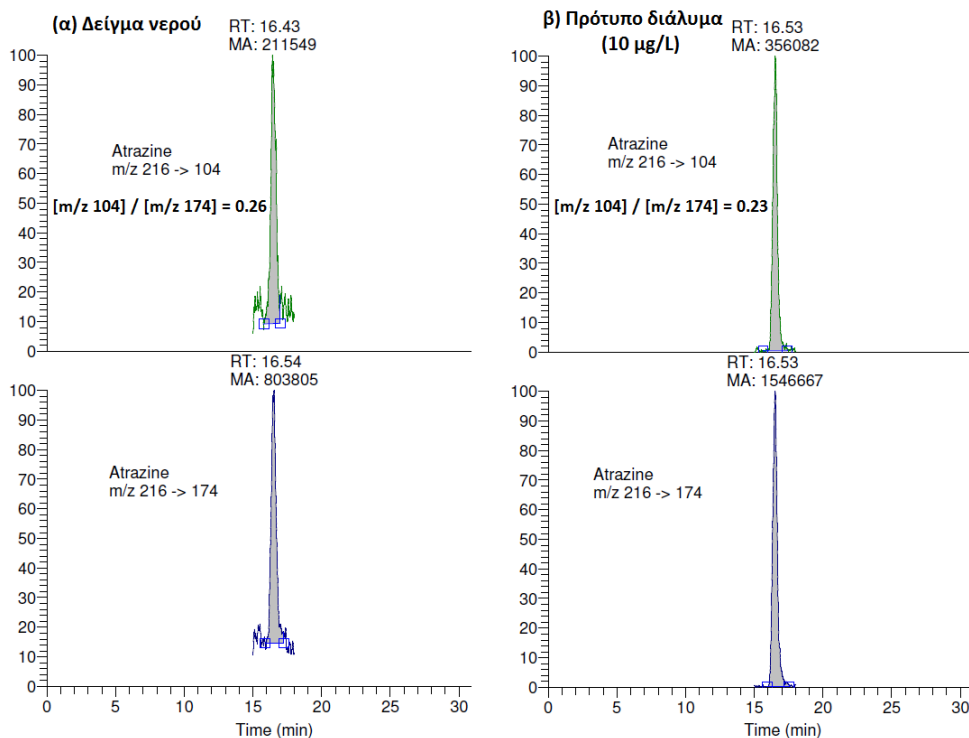
12.6 Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα νερού

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των οργανικών ρύπων εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα πόσιμου, επιφανειακού και υπόγειου νερού. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν 40 δείγματα πόσιμου νερού της Αττικής από τα διυλιστήρια της ΕΥΔΑΠ, 26 δείγματα επιφανειακού

νερού και 2 δείγματα υπόγειου νερού. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τις 02/06/2014 έως τις 01/12/2014.

Σε κανένα από τα 40 δείγματα πόσιμου νερού που συλλέχθηκαν από τα διωλιστήρια της ΕΥΔΑΠ δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία των υπό μελέτη οργανικών ρύπων με εξαίρεση 2 δείγματα, που συλλέχθηκαν στις 14/08/2014. Σε αυτά τα 2 δείγματα ανιχνεύτηκε η παρουσία του φυτοφαρμάκου Atrazine και σε ένα από αυτά ανιχνεύθηκε και η παρουσία του φυτοφαρμάκου Simazine. Και στα δύο δείγματα οι συγκεντρώσεις των Atrazine και Simazine που ανιχνεύθηκαν ήταν χαμηλότερες του LOQ.

Τα δείγματα επιφανειακού νερού συλλέχθηκαν από τις λίμνες Μόρνο, Υλίκη και Μαραθώνα και τον ποταμό Εύηνο. Σε κανένα από τα 6 δείγματα που συνολικά συλλέχθηκαν από την λίμνη Μόρνο τον Ιούλιο 2014 και τον Νοέμβριο 2014 δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία των υπό μελέτη οργανικών ρύπων. Από την λίμνη Υλίκη συλλέχθηκαν συνολικά 5 δείγματα τους μήνες Ιούλιο και Νοέμβριο 2014. Στα δύο δείγματα που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο 2014 ανιχνεύθηκε η παρουσία του φυτοφαρμάκου Atrazine σε συγκεντρώσεις 3,0 ng/L και 5,2 ng/L καθώς σε ένα δείγμα ανιχνεύθηκε και η παρουσία του Simazine σε συγκέντρωση μικρότερη του LOQ. Επίσης, σε ένα από τα τρία δείγματα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο 2014 ανιχνεύθηκε η παρουσία του φυτοφαρμάκου Diuron σε συγκέντρωση μικρότερη του LOQ.



Σχήμα 12.6: MRM χρωματογραφήματα από την ανάλυση (α) δείγματος νερού από την λίμνη Υλίκη (ημερ. δειγματ.: 07/2014) όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία της Atrazine και (β) προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 10 µg/L

Στο σχήμα 12.6 παρατίθενται τα MRM χρωματογραφήματα του φυτοφαρμάκου Atrazine που προέκυψαν από την ανάλυση του δείγματος νερού από την Υλίκη όπου ανιχνεύθηκε και από την ανάλυση πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 10 µg/L. Η αξιόπιστη ταυτοποίηση του Atrazine βασίστηκε στα ακόλουθα: (1) Ο χρόνος ανάρχεσης του Atrazine στο δείγμα ήταν $t_R = 16,54$ min και

στο πρότυπο διάλυμα ο χρόνος ανάλυσης της ήταν $t_R = 16,53 \text{ min}$. (2) Κατά την ανάλυση του δείγματος ανιχνεύθηκαν και οι δύο χαρακτηριστικές μεταπτώσεις του Atrazine στα θυγατρικά ιόντα (m/z 104 & 174). (3) Ο λόγος ιόντων στο δείγμα ήταν 0,26 για το $[m/z$ 104]/ $[m/z$ 174] και ο αντίστοιχος λόγος ιόντων στο πρότυπο διάλυμα ήταν 0,23.

Από την λίμνη Μαραθώνα συλλέχθηκαν συνολικά 9 δείγματα κατά τον Ιούλιο 2014 και τον Νοέμβριο 2014. Σε 3 από τα 4 δείγματα που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο 2014 ανιχνεύθηκε η παρουσία του φυτοφαρμάκου Atrazine και σε 1 από αυτά ανιχνεύθηκε η παρουσία και του Simazine. Σε όλες τις περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις των Atrazine & Simazine ήταν κατώτερες του LOQ. Σε κανένα από τα 5 δείγματα που συλλέχθηκαν από την λίμνη του Μαραθώνα τον Νοέμβριο 2014 δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία των υπό μελέτη ρύπων. Από τον Εύηνο ποταμό συλλέχθηκαν συνολικά 6 δείγματα νερού, 3 δείγματα συλλέχθηκαν τον Σεπτέμβριο 2014 και 3 δείγματα συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο 2014. Σε 2 από τα 3 δείγματα που συλλέχθηκαν τον Σεπτέμβριο 2014 ανιχνεύτηκε η παρουσία του φυτοφαρμάκου Diuron και σε 1 από αυτά και η παρουσία του Metribuzine. Σε όλες τις περιπτώσεις οι προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις των Diuron & Metribuzine ήταν χαμηλότερες του LOQ. Σε κανένα από τα 3 δείγματα που συλλέχθηκαν τον Νοέμβριο 2014 δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία των υπό μελέτη οργανικών ρύπων. Ακόμα, συλλέχθηκαν 2 δείγματα υπόγειου νερού από γεώτρηση στη Μαυροσουβάλα τον Ιούλιο 2014 και τον Νοέμβριο 2014. Σε κανένα από τα δύο δείγματα που αναλύθηκαν δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία των υπό μελέτη οργανικών ρύπων.

Συνολικά, οι ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στα περισσότερα δείγματα ήταν οι τριαζίνες Atrazine και Simazine. Το Atrazine ανιχνεύθηκε σε 2 δείγματα πόσιμου νερού και 5 δείγματα επιφανειακού νερού από τον Μαραθώνα και την Υλίκη ενώ το Simazine ανιχνεύθηκε σε 1 δείγμα πόσιμου νερού και 2 δείγματα επιφανειακού νερού από τον Μαραθώνα και την Υλίκη. Να σημειωθεί ότι η χρήση του Atrazine έχει απαγορευθεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση από τον Σεπτέμβριο 2004 [389], και η χρήση του Simazine στην Ευρωπαϊκή Ένωση απαγορεύτηκε οριστικά τον Δεκέμβριο του 2007 [390]. Παρόλο που έχει απαγορευθεί η χρήση τους, τα φυτοφάρμακα αυτά ανιχνεύονται ακόμα στο επιφανειακό νερό. Όπως έχει καταγραφεί, το Atrazine και οι μεταβολίτες του μπορούν να παραμείνουν σταθερά στο νερό και στο χώμα για δεκαετίες καθώς υπάρχει αυξημένος κίνδυνος να μεταναστεύουν από το χώμα στο υπόγειο νερό [391]. Λόγω του κίνδυνου που αποτελούν για τα υδάτινα περιβάλλον οι ενώσεις Atrazine και Simazine είναι ανάμεσα στις ουσίες προτεραιότητας της WFD [198]. Σύμφωνα με μελέτη, οι χλώρο-S-τριαζίνες, όπως τα Atrazine και Simazine, δεν απομακρύνονται εύκολα από το νερό με τις συμβατικές τεχνικές επεξεργασίας, με εξαίρεση την χρήση ενεργού άνθρακα [392]. Πιθανότατα, για το λόγω αυτό ανιχνεύθηκαν και στα δείγματα πόσιμου νερού. Η τριαζίνη Atrazine ήταν η ένωση που ανιχνεύθηκε στα περισσότερα δείγματα που αναλύθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Αξίζει να τονισθεί ότι το Atrazine είναι το πιο συχνά ανιχνευόμενο φυτοφάρμακο στα ελληνικά επιφανειακά νερά [393-395]. Σύμφωνα με τους Konstantinou et al, στα ελληνικά επιφανειακά νερά (λίμνες και ποτάμια) ανιχνεύονταν πιο συχνά τα φυτοφάρμακα Atrazine, Simazine και Alachlor.

Εκτός από τις δύο τριαζίνες, στα δείγματα που αναλύθηκαν ανιχνεύτηκε επιπλέον η παρουσία της φαινυλουρίας Diuron και της τριαζινόνης Metribuzine. Το Diuron ανιχνεύθηκε σε 1 δείγμα από την λίμνη Υλίκη και σε 2 δείγματα από τον Εύηνο ποταμό ενώ το Metribuzine ανιχνεύθηκε μόνο σε ένα δείγμα από τον Εύηνο ποταμό. Το Diuron αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο φυτοφάρμακο από την κατηγορία των φαινυλουριών [215]. Καθώς αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για το υδάτινο περιβάλλον έχει συμπεριληφθεί στις ουσίες προτεραιότητας [198]. Το Metribuzine χρησιμοποιείται

για την καταπολέμηση ζιζανίων σε καλλιέργειες πατάτας, ντομάτας, σόγιας, καρότου και σπαραγγιού και η χρήση του επιτρέπεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση [204].

Να αναφερθεί ότι είναι πολύ λίγα τα δεδομένα για την παρουσία σημαντικών οργανικών ρύπων που περιλαμβάνονται στις Ευρωπαϊκές νομοθεσίες για το πόσιμο νερό της Αττικής και τους ταμειυτήρες νερού που υδροδοτούν την Αττική. Με εξαίρεση την μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, υπάρχει μόνο μία ακόμα μελέτη στη διαθέσιμη βιβλιογραφία. Η μελέτη των Golfopoulou et al πραγματοποιήθηκε σε αντίστοιχα δείγματα πόσιμου νερού της Αττικής και επιφανειακού νερού από τους ταμειυτήρες Μόρνο, Υλίκη, Μαραθώνα και Εύηνο, κατά την διάρκεια ενός έτους (2004 – 2005) [396]. Στη μελέτη ανιχνεύθηκε η παρουσία του Atrazine σε δύο δείγματα πόσιμου νερού (σε συγκέντρωση 0,05 µg/L) και σε ένα δείγμα επιφανειακού νερού από την λίμνη Υλίκη (σε συγκέντρωση 0,025 µg/L). Επίσης, σε εκείνη την μελέτη ανιχνεύθηκε η παρουσία του Alachlor σε ένα δείγμα από την λίμνη Μόρνο (σε συγκέντρωση 0,002 µg/L) και σε ένα δείγμα πόσιμου νερού (σε συγκέντρωση 0,002 µg/L) καθώς και η παρουσία του Trifluralin σε ένα δείγμα πόσιμου νερού (σε συγκέντρωση 0,110 µg/L) ενώ δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα η παρουσία των Simazine, Diuron και Isoproturon (LODs: 0,025, 0,040 και 0,050 µg/L, αντίστοιχα). Η ανίχνευση της παρουσίας του Atrazine στα δείγματα πόσιμου και επιφανειακού νερού που έγινε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της μελέτης των Golfopoulou et al. Οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν στην παρούσα διατριβή για το Atrazine (μέγιστη συγκέντρωση 0,005 µg/L) είναι πολύ χαμηλότερες σε σύγκριση με την προηγούμενη μελέτη. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς τα δείγματα συλλέχθηκαν περίπου μια δεκαετία αργότερα (6/2014 – 12/2014) και η χρήση της Atrazine έχει απαγορευτεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 2004. Σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη, στην παρούσα διατριβή ανιχνεύθηκε επιπλέον η παρουσία των Simazine, Diuron και Metribuzine. Σε σύγκριση με την προηγούμενη μελέτη, η μέθοδος που προτείνεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή επιτυγχάνει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης για τα Simazine και Diuron (LODs: 1,4 ng/L) και πιθανότατα για το λόγω αυτό πραγματοποιήθηκε η ανίχνευσή τους. Να σημειωθεί ότι στην προηγούμενη μελέτη δεν αναλυόταν το Metribuzine, ενώ εφαρμόστηκαν διαφορετικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό του συνόλου των υπό μελέτη ενώσεων.

Εν κατακλείδι, με την προτεινόμενη μέθοδο που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής εργασίας επιτυγχάνεται αξιόπιστα ο ταυτόχρονος προσδιορισμός για ένα πλήθος οργανικών ρύπων που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες (όπως χλωροφαινόλες, ενδοκρινικοί διαταράκτες, φαρμακευτικές ενώσεις και φυτοφάρμακα από διαφορετικές κατηγορίες: τριαζίνες, φαινυλουρίες, οργανοφωσφωρικά, ανιλίδες και δινιτροανιλίνες) και έχουν ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες. Επίσης, η προτεινόμενη μέθοδος έχει πολύ καλή ακρίβεια και πιστότητα για τις περισσότερες ενώσεις χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων, τα οποία αυξάνουν το κόστος της ανάλυσης. Παράλληλα, έχει πολύ καλή ευαισθησία και με βάση τα όρια ανίχνευσης που επιτυγχάνονται μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των ρύπων τόσο σε πόσιμα όσο και σε επιφανειακά ύδατα, πληρώνοντας τις σχετικές απαιτήσεις των ευρωπαϊκών οδηγιών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιτεύχθηκε η ανάπτυξη πολυδύναμων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό κυανοτοξινών, φυκοτοξινών και ποικίλων άλλων οργανικών ρύπων σε δείγματα νερού. Στις προτεινόμενες μεθόδους η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με LC-MS/MS και προτάθηκε προκατεργασία του δείγματος με την τεχνική SPE.

Ειδικότερα αναπτύχθηκε μία απλή, γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδος για τον προσδιορισμό 17 κυανοτοξινών και φυκοτοξινών (Cylindrospermopsin, Anatoxin-a, Nodularin, 12 Microcystins ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF), Okadaic Acid και Domoic Acid) στο νερό. Για την εκχύλιση των δειγμάτων νερού αναπτύχθηκε μέθοδος SPE με τη χρήση διάταξης διπλού φυσιγγίου, αποτελούμενο από Oasis HLB και PGC. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου μελετήθηκαν σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της SPE, όπως το υλικό πλήρωσης των φυσιγγίων SPE, το αρχικό pH του δείγματος, η σειρά σύνδεσης των φυσιγγίων, η σύσταση και ο όγκος του διαλύτη έκλουσης καθώς και η σύσταση του διαλύτη επαναδιαλυτοποίησης του τελικού εκλούσματος. Για την ανίχνευση των ενώσεων αναπτύχθηκε μέθοδος LC-ESI-MS/MS σε MRM mode. Με την υδροχρωματογραφική μέθοδο που αναπτύχθηκε επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός για το σύνολο των ενώσεων. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου στο MS/MS μελετήθηκε ο ιοντισμός των ενώσεων καθώς και η θραυσματοποίηση τους. Για κάθε τοξίνη επιλέχθηκαν τρεις μεταπτώσεις από το πρόδρομο ιόν σε θυγατρικά ιόντα. Σε όλες τις περιπτώσεις προτάθηκαν οι δομές των θυγατρικών ιόντων με βάση την βιβλιογραφία, ενώ για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας μελέτης προτάθηκε η δομή του θυγατρικού ιόντος m/z 105 της κατηγορίας των Microcystins. Στην προτεινόμενη μέθοδο επιτυγχάνεται η αξιόπιστη ταυτοποίηση των υπό μελέτη κυανοτοξινών και φυκοτοξινών που βασίζεται στον ικανοποιητικό χρωματογραφικό διαχωρισμό και κυρίως με την μελέτη τριών μεταπτώσεων για κάθε τοξίνη. Η προτεινόμενη μέθοδος μειώνει σημαντικά τον χρόνο και το κόστος ανάλυσης των κυανοτοξινών και φυκοτοξινών αφού μπορεί να προσδιορίσει ταυτόχρονα ένα μεγάλο εύρος τοξινών από διαφορετικές χημικές κατηγορίες με μία μόνο ανάλυση. Κατά την επικύρωση της μεθόδου εκτιμήθηκαν σημαντικές παράμετροι της απόδοσής της (ειδικότητα, γραμμικότητα - εύρος μετρήσεων, ακρίβεια, πιστότητα, όρια ανίχνευσης - ποσοτικοποίησης και οι λόγοι των θυγατρικών ιόντων). Η προτεινόμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό ποικίλων κατηγοριών κυανοτοξινών και φυκοτοξινών στο νερό μπορεί να προσδιορίσει αξιόπιστα τις τοξίνες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, της τάξης των ng/L ενώ παράλληλα μπορεί να αποτελέσει βάση για την ανάλυση και άλλων τοξινών για τα οποία προς το παρόν δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα.

Παράλληλα αναπτύχθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό ποικίλων κυανοτοξινών (Cylindrospermopsin, Anatoxin-a, 12 Microcystins ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-HtyR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HilR, MC-WR, MC-LA, MC-LY, MC-LW και MC-LF) σε κυανοβακτηριακή βιομάζα. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου μελετήθηκαν για πρώτη φορά διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την εκχύλιση των κυανοτοξινών από την κυανοβακτηριακή βιομάζα, όπως η εκχυλιστική ικανότητα των διαλυτών, η σύσταση και ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης και η μάζα του δείγματος βιομάζας.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε μελέτη για την παρουσία κυανοτοξινών σε δείγματα επιφανειακού νερού από 14 λίμνες και ταμιευτήρες της Ελλάδας. Για την ανάλυση των

δειγμάτων αναπτύχθηκε ροή εργασίας που περιελάμβανε στο προσδιορισμό των κυανοτοξινών σε νερό, λυοφιλοποιημένη κυανοβακτηριακή βιομάζα και φίλτρα με κυανοβακτηριακή βιομάζα με βάση τις αναπτυχθείσες μεθόδους. Να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη μελέτη που πραγματοποιείται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός κυανοτοξινών από διαφορετικές κατηγορίες σε λίμνες της Ελλάδας με την αξιόπιστη τεχνική LC-MS/MS. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίσθηκε τόσο η ενδοκυττάρια όσο και η εξωκυττάρια συγκέντρωση των κυανοτοξινών.

Στα δείγματα βιομάζας από τις ελληνικές λίμνες ταυτοποιήθηκε η παρουσία όλων των υπό μελέτη κυανοτοξινών. Η πιο συχνά ανιχνευόμενη κυανοτοξίνη ήταν η MC-RR, ακολουθούμενη από τις MC-LR, MC-YR και [DAsp3]MC-RR. Τα δείγματα βιομάζας από την λίμνη Καστοριά είχαν το μεγαλύτερο αριθμό κυανοτοξινών καθώς και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις με την MC-RR να φτάνει τα 753,6 ng/mg και την MC-LR τα 457,8 ng/mg. Στα δείγματα νερού από τις ελληνικές λίμνες, επίσης ταυτοποιήθηκε η παρουσία ενός μεγάλου αριθμού κυανοτοξινών από την κατηγορία των MCs ([D-Asp3]MC-RR, MC-RR, MC-YR, [D-Asp3]MC-LR, MC-LR, MC-HiLR, MC-LY, MC-WR και MC-LA) και η παρουσία της Anatoxin-a. Την μεγαλύτερη ποικιλία κυανοτοξινών την παρουσίασαν τα δείγματα νερού που συλλέχθηκαν από την λίμνη Καστοριά, όπου ταυτοποιήθηκαν 8 Microcystins και η Anatoxin-a. Και στο νερό η πιο συχνά ανιχνευόμενη κυανοτοξίνη ήταν η MC-RR ακολουθούμενη από την MC-LR, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις τους να είναι 338 μg/L και 354 μg/L, αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που ταυτοποιήθηκε αξιόπιστα και καταγράφηκε η παρουσία τόσο πολλών δομικών παραλλαγών της κατηγορίας των Microcystins σε συνδυασμό με τις κυανοτοξίνες *Cylindrospermopsis* και Anatoxin-a.

Επιπλέον αναπτύχθηκε μία πολυδύναμη μέθοδος για τον προσδιορισμό 29 οργανικών ρύπων του νερού (17α-Ethinylestradiol, β-Estradiol, Diclofenac, Alachlor, Atrazine, Chlorfenvinphos, Chlorpyrifos, Diuron, Isoproturon, Simazine, Trifluralin, Pentachlorophenol, 2,4,6-Trichlorophenol, Azinphos-ethyl, Azinphos-methyl, Chlorotoluron, Cyanazine, Diazinon, Dimethoate, Ethion, Fenthion, Linuron, Malathion, Methidathion, Metribuzine, Monuron, Phosalone, Propazine και Triazophos) με LC-MS/MS, εκ των οποίων οι 12 περιλαμβάνονται είτε στις ουσίες προτεραιότητας είτε στον κατάλογο επιτήρησης και για τις υπόλοιπες έχει απαγορευθεί η χρήση τους στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Για την εκχύλιση των δειγμάτων νερού αναπτύχθηκε μέθοδος SPE. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου μελετήθηκαν σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της SPE, όπως οι αρχικές συνθήκες του δείγματος, το εκλουστικό σύστημα και οι συνθήκες επαναδιαλυτοποίησης. Για την ανίχνευση των ενώσεων αναπτύχθηκε μέθοδος LC-APCI-MS/MS σε MRM mode. Με την χρωματογραφική μέθοδο που αναπτύχθηκε επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός για το σύνολο των ενώσεων. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου στο MS/MS μελετήθηκε ο ιοντισμός των ενώσεων καθώς και η θραυσματοποίηση τους. Οι ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των φυτοφαρμάκων προσδιορίσθηκαν με θετικό ιοντισμό ενώ οι ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες των χλωροφαινολών, ενδοκρινικών διαταρακτών και φαρμακευτικών προϊόντων προσδιορίσθηκαν με αρνητικό ιοντισμό. Για κάθε οργανικό ρύπο επιλέχθηκαν δύο μεταπτώσεις από το πρόδρομο ιόν σε θυγατρικά ιόντα. Σε όλες τις περιπτώσεις προτάθηκαν οι δομές των θυγατρικών ιόντων με βάση την βιβλιογραφία, ενώ για πρώτη φορά στα πλαίσια της παρούσας μελέτης προτάθηκαν οι δομές των θυγατρικών ιόντων του Trifluralin. Η αναπτυχθείσα μέθοδος επικυρώθηκε και εκτιμήθηκαν σημαντικές παράμετροι της απόδοσής της (ειδικότητα, γραμμικότητα - εύρος μετρήσεων, ακρίβεια, πιστότητα, όρια ανίχνευσης - ποσοτικοποίησης και οι λόγοι των θυγατρικών ιόντων). Η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να προσδιορίσει αξιόπιστα τους αναλύτες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, της τάξης των ng/L ενώ παράλληλα μπορεί να αποτελέσει βάση για την ανάλυση και

άλλων οργανικών ρύπων από διάφορες κατηγορίες φυτοφαρμάκων. Η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα πόσιμου νερού από τις δεξαμενές πόσιμου νερού της ΕΥΔΑΠ που υδροδοτεί την Αττική, σε δείγματα υπογείου νερού από γεώτρηση και σε δείγματα επιφανειακού νερού από τους ταμιευτήρες Υλίκη, Μόρνο, Μαραθώνα και Εύηνο. Στα δείγματα ανιχνεύθηκε και ταυτοποιήθηκε η παρουσία της τριαζίνης Atrazine, με μέγιστη συγκέντρωση τα 5,2 ng/L σε δείγμα από την λίμνη Υλίκη. Επίσης, σε κάποια από τα δείγματα που αναλύθηκαν ανιχνεύθηκε η παρουσία των Simazine, Diuron και Metribuzine σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ορίου ποσοτικοποίησης. Σε όλες τις περιπτώσεις οι συγκεντρώσεις ήταν πολύ χαμηλότερες από τα σχετικά νομοθετικά όρια ενώ οι υπόλοιποι υπό μελέτη οργανικοί ρύποι δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα δείγμα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Schopf, J.W. and M.R. Walter, *Origin and early evolution of cyanobacteria : the geological evidence* The biology of cyanobacteria, ed. N.G. Carr and B.A. Whitton 1982, Oxford: Blackwell Scientific.
2. Harlin, M.M. and W.M. Darley, *The algae: an overview*. Algae and human affairs, ed. C.A. Lembi and J.R. Waaland 1988, Cambridge: Cambridge University Press.
3. Echlin, P., *The blue-green algae*. Scientific American, 1966. **214**(6): p. 75-81.
4. Whitton, B.A., *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* 2012, Springer Dordrecht Heidelberg New York London: Springer Science & Business Media.
5. Prescott, G.W., *The algae: a review* 1968: Houghton Mifflin.
6. Codd, G.A., J. Meriluoto, and J.S. Metcalf, *Introduction*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 2017, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-8.
7. A Codd, G., et al., *INTERNATIONAL HYDROLOGICAL PROGRAMME CYANONET A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management Initial Situation Assessment and Recommendations* 2005.
8. Carmichael, W.W., *Cyanobacteria secondary metabolites - The cyanotoxins*. Journal of Applied Bacteriology, 1992. **72**(6): p. 445-459.
9. World Health Organization, W.H.O., *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring, and management* 1999, Genova.
10. Codd, G.A., *Harmful algae news* 1996, Paris: IOC OF UNESCO, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization.
11. Francis, G., *Poisonous Australian Lake*. Nature, 1878. **18**: p. 11-12.
12. Azevedo, S.M.F.O., et al., *Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 441-446.
13. Gramling, C., *Toxic algae may be culprit in mysterious dinosaur deaths*. Science, 2017. **357**(6354): p. 857-857.
14. Papke, R.T., et al., *Geographical isolation in hot spring cyanobacteria*. Environmental Microbiology, 2003. **5**(8): p. 650-659.
15. Zakhia, F., et al., *Cyanobacteria in cold ecosystems*, in *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* 2008. p. 121-135.
16. Garcia-Pichel, F., et al., *Small-Scale Vertical Distribution of Bacterial Biomass and Diversity in Biological Soil Crusts from Arid Lands in the Colorado Plateau*. Microbial Ecology, 2003. **46**(3): p. 312-321.
17. Lampert, W. and U. Sommer, *Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams* 1997: Oxford University Press.
18. Walsby, A.E. *Relations Between Structure and Functioning in the Prokaryotic Cell - The gas vesicles of aquatic prokaryotes*. in *28th Symposium of the Society for General Microbiology*. 1978. Cambridge University Press.
19. Humbert, J.-F. and J. Fastner, *Ecology of Cyanobacteria*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 2017, John Wiley & Sons, Ltd. p. 9-18.
20. [29/10/2017]; A cyanobacterial bloom in Chao Hu, the fifth largest freshwater lake in China]. Available from: finance.ifeng.com.
21. [29/10/2017]; OC Fisher Reservoir in San Angelo State Park in Texas, Apr 10 2013]. Available from: <https://imgur.com/YXm5lXh>.
22. [29/10/2017]; Lake Erie, North America, 12 Apr 2003]. Available from: <https://earth.esa.int/web/earth-watching/environmental-hazards/content/-/article/algal-blooms-in-lake-erie-north-america->

23. 29/10/2017]; A USGS technician scoops Cyanobacteria scum from a pond in Iowa]. Available from: https://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/bluegreen_algae/docs/cyanobacteria_bloom.jpg.
24. 29/10/2017]; Newburgh: Algal mats at the mouth of the Ythan estuary]. Available from: <http://www.geograph.org.uk/photo/820275>.
25. World Health Organization, W.H.O., *Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water, WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. 2nd ed. Health criteria and other supporting information 1998, Geneva.
26. O'Farrell, I., F. Bordet, and G. Chaparro, *Bloom forming cyanobacterial complexes co-occurring in a subtropical large reservoir: Validation of dominant eco-strategies*. *Hydrobiologia*, 2012. **698**(1): p. 175-190.
27. Kokociński, M., et al., *Expansion of Alien and Invasive Cyanobacteria*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 2017, John Wiley & Sons, Ltd. p. 28-39.
28. Padisak, J., *Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: Worldwide distribution and review of its ecology*. Vol. 107. 1997. 563-593.
29. Antal, O., et al., *Screening the toxic potential of Cylindrospermopsis raciborskii strains isolated from Lake Balaton, Hungary*. *Toxicon*, 2011. **57**(6): p. 831-840.
30. Stoyneva, M.P., *Development of the phytoplankton of the shallow Srebarna Lake (north-eastern Bulgaria) across a trophic gradient*. *Hydrobiologia*, 1998. **369-370**: p. 259-267.
31. Stoyneva, M.P., *Steady-state phytoplankton assemblages in shallow Bulgarian wetlands*. *Hydrobiologia*, 2003. **502**: p. 169-176.
32. Karadžić, V., et al., *Changes in the phytoplankton community and dominance of Cylindrospermopsis raciborskii (Wolosz.) Subba Raju in a temperate lowland river (Ponjavica, Serbia)*. *Hydrobiologia*, 2013. **711**(1): p. 43-60.
33. Barone, R., G. Castelli, and L. Naselli-Flores, *Red sky at night cyanobacteria delight: The role of climate in structuring phytoplankton assemblage in a shallow, Mediterranean lake (Biviere di Gela, southeastern Sicily)*. *Hydrobiologia*, 2010. **639**(1): p. 43-53.
34. Moustaka-Gouni, M., et al., *Raphidiopsis mediterranea Skuja represents non-heterocytous life-cycle stages of Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju in Lake Kastoria (Greece), its type locality: Evidence by morphological and phylogenetic analysis*. *Harmful Algae*, 2009. **8**(6): p. 864-872.
35. Katsiapi, M., et al., *Different phytoplankton descriptors show asynchronous changes in a shallow urban lake (L. Kastoria, Greece) after sewage diversion*. *Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie*, 2013. **182**(3): p. 219-230.
36. Romo, S., et al., *Water residence time and the dynamics of toxic cyanobacteria*. *Freshwater Biology*, 2013. **58**(3): p. 513-522.
37. Babanazarova, O.V., et al., *Phytoplankton structure and microcystine concentration in the highly eutrophic Nero Lake*. *Water Resources*, 2011. **38**(2): p. 229-236.
38. Kobos, J., et al., *Cyanobacteria and cyanotoxins in Polish freshwater bodies*. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 2013. **42**(4): p. 358-378.
39. Sukenik, A., et al., *Invasion of Nostocales (cyanobacteria) to subtropical and temperate freshwater lakes - physiological, regional, and global driving forces*. *Frontiers in Microbiology*, 2012. **3**(MAR).
40. Akcaalan, R., et al., *Phenotypic and toxicological characterization of toxic Nodularia spumigena from a freshwater lake in Turkey*. *Harmful Algae*, 2009. **8**(2): p. 273-278.
41. Herbert, R.B., *The biosynthesis of secondary metabolites*, ed. C. Hall 1989, London.

42. Pearson, M.J., et al., *Toxic blue-green algae*, in *Water Quality series No. 2*, U.N.R. Authority, Editor 1990. p. 1-128.
43. Watanabe, M.F. and S. Oishi, *A Highly Toxic Strain of Blue-green Alga <i>Microcystis aeruginosa</i> Isolated from Lake Suwa*. NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1983. **49**(11): p. 1759-1759.
44. Watanabe, M.F., et al., *Heptapeptide toxin production during the batch culture of two Microcystis species (cyanobacteria)*. Journal of applied phycology, 1989. **1**: p. 161-165.
45. Bernard, C., et al., *Novel toxic effects associated with a tropical Limnothrix/Geitlerinema-like cyanobacterium*. Environmental Toxicology, 2011. **26**(3): p. 260-270.
46. Nováková, K., et al., *Novel metabolites in cyanobacterium Cyndrospermopsis raciborskii with potencies to inhibit gap junctional intercellular communication*. Journal of Hazardous Materials, 2013. **262**: p. 571-579.
47. Bernard, C., et al., *Appendix 2: Cyanobacteria Associated With the Production of Cyanotoxins*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 2017, John Wiley & Sons, Ltd. p. 501-525.
48. Bishop, C.T., E.F.L. Anet, and P.R. Gorham, *Isolation and identification of the fast-death factor in Microcystis aeruginosa NRC-1*. Canadian journal of biochemistry and physiology, 1959. **37**: p. 453-471.
49. Carmichael, W.W., et al., *Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae)*. Toxicon, 1988. **26**(11): p. 971-973.
50. Botes, D.J., H. Kruger, and C.C. Viljoen, *Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga, Microcystis aeruginosa*. Toxicon, 1982. **20**(6): p. 945-954.
51. Spoo, L. and A. Catherine, *Appendix 3: Tables of Microcystins and Nodularins*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 2017, John Wiley & Sons, Ltd. p. 526-537.
52. Niedermeyer, T., *Microcystin congeners described in the literature*.
53. Catherine, A., et al., *Microcystins and Nodularins*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 2017, John Wiley & Sons, Ltd. p. 107-126.
54. Namikoshi, M., et al., *New nodularins, A general method for structure assignment*. Journal of Organic Chemistry, 1994. **59**: p. 2349-2357.
55. Moffitt, M.C. and B.A. Neilan, *Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(11): p. 6353-6362.
56. Codd, G.A., *Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance*. Water Science and Technology, 1995. **32**(4): p. 149-156.
57. Jochimsen, E.M., et al., *Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil*. New England Journal of Medicine, 1998. **338**(13): p. 873-878.
58. Gácsi, M., et al., *Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells*. Toxicology in Vitro, 2009. **23**(4): p. 710-718.
59. Hastie, C.J., et al., *Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin*. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 2005. **1726**(2): p. 187-193.
60. MacKintosh, C., et al., *Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants*. FEBS Letters, 1990. **264**(2): p. 187-192.
61. Honkanen, R.E., et al., *Cyanobacterial nodularin is a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases*. Molecular Pharmacology, 1991. **40**(4): p. 577-583.

62. Honkanan, R.E., et al., *Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases*. *Toxicol*, 1994. **32**(3): p. 339-350.
63. Dawson, R.M., *The toxicology of microcystins*. *Toxicol*, 1998. **36**(7): p. 953-962.
64. Nishiwaki-Matsushima, R., et al., *Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1992. **118**(6): p. 420-424.
65. Ito, E., et al., *Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR*. *Toxicol*, 1997. **35**(9): p. 1453-1457.
66. Rojas, M., M.T. Nuñez, and F. Zambrano, *Inhibitory effect of a toxic peptide isolated from a waterbloom of Microcystis sp. (cyanobacteria) on iron uptake by rabbit reticulocytes*. *Toxicol*, 1990. **28**(11): p. 1325-1332.
67. Hernández, M., et al., *Modulation of human polymorphonuclear leukocyte adherence by cyanopeptide toxins*. *Environmental Research*, 2000. **84**(1): p. 64-68.
68. Leiers, T., et al., *[Ca²⁺]_i- and insulin-stimulating effect of the non-membranepерmeable phosphatase-inhibitor microcystin-LR in intact insulin-secreting cells (RINm5F)*. *British Journal of Pharmacology*, 2000. **130**(6): p. 1406-1410.
69. Lankoff, A., et al., *The uptake kinetics and immunotoxic effects of microcystin-LR in human and chicken peripheral blood lymphocytes in vitro*. *Toxicology*, 2004. **204**(1): p. 23-40.
70. Žegura, B., B. Sedmak, and M. Filipič, *Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2*. *Toxicol*, 2003. **41**(1): p. 41-48.
71. Bouaïcha, N., et al., *Genotoxic potential of microcystin-LR and nodularin in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver*. *Environmental Toxicology*, 2005. **20**(3): p. 341-347.
72. Li, H., et al., *In vivo study on the effects of microcystin extracts on the expression profiles of proto-oncogenes (c-fos, c-jun and c-myc) in liver, kidney and testis of male Wistar rats injected i.v. with toxins*. *Toxicol*, 2009. **53**(1): p. 169-175.
73. Ohta, T., et al., *Nodularin, a Potent Inhibitor of Protein Phosphatases 1 and 2A, Is a New Environmental Carcinogen in Male F344 Rat Liver*. *Cancer Research*, 1994. **54**(24): p. 6402-6406.
74. Žegura, B., A. Štraser, and M. Filipič, *Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2011. **727**(1): p. 16-41.
75. Fischer, A., et al., *The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010. **245**(1): p. 9-20.
76. Ito, E., F. Kondo, and K.I. Harada, *Intratracheal administration of microcystin-LR, and its distribution*. *Toxicol*, 2000. **39**(2-3): p. 265-271.
77. Chen, Y., D. Shen, and D. Fang, *Nodularins in poisoning*. *Clinica Chimica Acta*, 2013. **425**: p. 18-29.
78. Ohtani, I., R.E. Moore, and M.T.C. Runnegar, *Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, 1992. **114**(20): p. 7941-7942.
79. Hawkins, P.R., et al., *Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985. **50**(5): p. 1292-1295.
80. Norris, R.L.G., et al., *Extraction and purification of the zwitterions cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*, 2001. **16**(5): p. 391-396.

81. Banker, R., et al., *Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin*. Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A, 2001. **62**(4): p. 281-288.
82. Wimmer, K.M., W.K. Strangman, and J.L.C. Wright, *7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of Cylindrospermopsis raciborskii*. Harmful Algae, 2014. **37**: p. 203-206.
83. Sivonen, K., *Cyanobacterial Toxins A2 - Schaechter, Moselio*, in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*2009, Academic Press: Oxford. p. 290-307.
84. Devlin, J.P., et al., *Anatoxin-a, a toxic alkaloid from Anabaena flos-aquae NRC-44h*. Canadian Journal of Chemistry, 1977. **55**(8): p. 1367-1371.
85. Skulberg, O.M., et al., *Investigations of a neurotoxic oscillatorialean strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1992. **11**(3): p. 321-329.
86. Namikoshi, M., et al., *Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium Raphidiopsis mediterranea Skuja*. Toxicon, 2003. **42**(5): p. 533-538.
87. Selwood, A.I., et al., *Production of anatoxin-a and a novel biosynthetic precursor by the cyanobacterium Aphanizomenon issatschenkoi*. Environmental Science and Technology, 2007. **41**(2): p. 506-510.
88. Stevens, D.K. and R.I. Krieger, *Stability studies on the cyanobacterial nicotinic alkaloid snatoxin-A*. Toxicon, 1991. **29**(2): p. 167-179.
89. Carmichael, W.W., D.F. Biggs, and M.A. Peterson, *Pharmacology of Anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte Anabaena flos-aquae NRC-44-1*. Toxicon, 1979. **17**(3): p. 229-236.
90. James, K.J., et al., *Anatoxin-a and Analogues: Discovery, Distribution, and Toxicology*, in *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*2007, Blackwell Publishing. p. 141-158.
91. Solter, P.F. and V.R. Beasley, *Chapter 38 - Phycotoxins A2 - Haschek, Wanda M*, in *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)*, C.G. Rousseaux and M.A. Wallig, Editors. 2013, Academic Press: Boston. p. 1155-1186.
92. Van Dolah, F.M., *Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence*. Environmental Health Perspectives, 2000. **108**(SUPPL. 1): p. 133-141.
93. Stommel, E.W. and M.R. Watters, *Marine neurotoxins: Ingestible toxins*. Current Treatment Options in Neurology, 2004. **6**(2): p. 105-114.
94. Ferreiro, S.F., et al., *Acute cardiotoxicity evaluation of the marine biotoxins OA, DTX-1 and YTX*. Toxins, 2015. **7**(4): p. 1030-1047.
95. Boerlage, S. and N. Nada, *Algal toxin removal in seawater desalination processes*. Desalination and Water Treatment, 2015. **55**(10): p. 2575-2593.
96. Daigo, K., *Studies on the Constituents of Chondria armata. II Isolation of an Anthelmintical Constituent*. Yakugaku Zasshi 1959. **79**(3): p. 353-356.
97. Impellizzeri, G., et al., *Amino acids and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae*. Phytochemistry, 1975. **14**(7): p. 1549-1557.
98. Takemoto, T., et al., *Studies on the Constituents of Chondria armata. VIII. : On the Structure of Domoic Acid. (1)*. Yakugaku zasshi, 1966. **86**(10): p. 874-877.
99. Saeed, A.F., et al., *Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics*. Algal Research, 2017. **24**: p. 97-110.
100. Clayden, J., B. Read, and K.R. Hebditch, *Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues*. Tetrahedron, 2005. **61**(24): p. 5713-5724.
101. Kumar, K.P., S.P. Kumar, and G.A. Nair, *Risk assessment of the amnesic shellfish poison, domoic acid, on animals and humans*. Journal of Environmental Biology, 2009. **30**(3): p. 319-325.

102. Tachibana, K., et al., *Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria*. Journal of the American Chemical Society, 1981. **103**(9): p. 2469-2471.
103. FAO, *Marine Biotoxins*. In FAO Food and Nutrition Paper 80. Vol. 80. 2004, Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
104. EFSA, *Marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain*, in *EFSA Journal*, E.F.S. Authority, Editor 2008, Wiley Online Library.
105. Bialojan, C. and A. Takai, *Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics*. Biochemical Journal, 1988. **256**(1): p. 283-290.
106. Louzao, M.C., M.R. Vieytes, and L.M. Botana, *Effect of okadaic acid on glucose regulation*. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2005. **5**(2): p. 207-215.
107. Valdiglesias, V., et al., *Okadaic Acid: More than a diarrhetic toxin*. Marine Drugs, 2013. **11**(11): p. 4328-4349.
108. Aune, T., et al., *Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice*. Toxicon, 2007. **49**(1): p. 1-7.
109. Tubaro, A., et al., *Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice*. Toxicon, 2003. **41**(7): p. 783-792.
110. Ibelings, B.W., et al., *Current approaches to cyanotoxin risk assessment and risk management around the globe*. Harmful Algae, 2014. **40**(Supplement C): p. 63-74.
111. *Global Water Research Coalition*. Cyanotoxin drinking water guidelines 29/12/2017]; Available from: <https://www.waterra.com.au/cyanobacteria-manual/Chapter1.htm>.
112. HMRC and NRMCMC, *Australian Drinking Water Guidelines Paper 6, Version 3.4 Updated October 2017 in National Water Quality Management Strategy 2011*, National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, : Canberra, Australia.
113. *Ministry of Health, Guidelines for Drinking-water Quality Management for New Zealand*, 2017, Ministry of Health, New Zealand Government: Wellington, New Zealand.
114. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document - Cyanobacterial Toxins in Drinking Water*, F.-P.-T.o.D. Water, Editor 2016, Health Canada: Canada.
115. U.S.EPA. *United States Environmental Protection Agency (EPA)*. 28/12/2017]; Available from: <https://www.epa.gov/nutrient-policy-data/guidelines-and-recommendations#what1>.
116. Farrer, D., et al., *Health-based cyanotoxin guideline values allow for cyanotoxin-based monitoring and efficient public health response to cyanobacterial blooms*. Toxins, 2015. **7**(2): p. 457-477.
117. *Proposal for a DIRECTIVE OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the quality of water intended for human consumption (recast), 1.2.2018*, E. Commission, Editor 2018: Brussels.
118. Graham, J.L., et al., *Cyanotoxin mixtures and taste-and-odor compounds in cyanobacterial blooms from the midwestern united states*. Environmental Science and Technology, 2010. **44**(19): p. 7361-7368.
119. Yen, H.-K., T.-F. Lin, and P.-C. Liao, *Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry*. Toxicon, 2011. **58**(2): p. 209-218.
120. EU, *Commission regulation (EC) No. 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs*, 2004, Official Journal of the European Union. p. 55-205.

121. EFSA, *Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on regulated marine biotoxins*, in 1306, E.F.S. Authority, Editor 2009, The EFSA Journal. p. 1-23.
122. Gerssen, A., et al., *Marine Toxins: Chemistry, Toxicity, Occurrence and Detection, with Special Reference to the Dutch Situation*. Toxins, 2010. **2**(4): p. 878.
123. Kaushik, R. and R. Balasubramanian, *Methods and Approaches Used for Detection of Cyanotoxins in Environmental Samples: A Review*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2012. **43**(13): p. 1349-1383.
124. Prego-Faraldo, M., et al., *Okadaic Acid Meet and Greet: An Insight into Detection Methods, Response Strategies and Genotoxic Effects in Marine Invertebrates*. Marine Drugs, 2013. **11**(8): p. 2829.
125. Merel, S., et al., *State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins*. Environment International, 2013. **59**(0): p. 303-327.
126. *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis* 2017: John Wiley & Sons, Ltd.
127. Metcalf, J.S. and G.A. Codd, *Immunoassays and Other Antibody Applications*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, J. Meriluoto, L. Spoof, and G.A. Codd, Editors. 2017, John Wiley & Sons, Ltd. p. 263-266.
128. Metcalf, J.S., A. Hiskia, and T. Kaloudis, *Protein Phosphatase Inhibition Assays*, in *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, J. Meriluoto, L. Spoof, and G.A. Codd, Editors. 2017, John Wiley & Sons, Inc. p. 267-271.
129. Botana, A.M., et al., *Current situation on analysis of marine toxins*. Reviews in Analytical Chemistry, 2013. **32**(1): p. 15-34.
130. Vasas, G., et al., *Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis*. ELECTROPHORESIS, 2004. **25**(1): p. 108-115.
131. ISO, *Water Quality - Determination of Microcystins - Method Using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) Detection*, 2005, International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
132. ISO, *Water quality - Determination of microcystins - Method using liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with pre-screening by immunoassay*, International Organization for Standardization: Under development.
133. U.S.EPA, *EPA Method 544: Determination of Microcystins and Nodularin in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)*, 2015, United States Environmental Protection Agency: Cincinnati.
134. U.S.EPA, *EPA Method 545: Determination of Cylindrospermopsin and Anatoxin-a in Drinking Water by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS)*, 2015, United States Environmental Protection Agency: Cincinnati.
135. Dahlmann, J., W.R. Budakowski, and B. Luckas, *Liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins*. Journal of Chromatography A, 2003. **994**(1–2): p. 45-57.
136. Maizels, M. and W.L. Budde, *A LC/MS Method for the Determination of Cyanobacteria Toxins in Water*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(5): p. 1342-1351.

137. Dell'Aversano, C., G.K. Eaglesham, and M.A. Quilliam, *Analysis of cyanobacterial toxins by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. **1028**(1): p. 155-164.
138. Bogialli, S., et al., *Monitoring algal toxins in lake water by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Environmental Science and Technology, 2006. **40**(9): p. 2917-2923.
139. Hiller, S., et al., *Rapid detection of cyanobacterial toxins in precursor ion mode by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2007. **42**(9): p. 1238-1250.
140. Oehrle, S.A., B. Southwell, and J. Westrick, *Detection of various freshwater cyanobacterial toxins using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Toxicon, 2010. **55**(5): p. 965-972.
141. Chen, J., et al., *Simultaneous determination of toxins in algae and water samples by high-performance liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry*. Journal of Separation Science, 2012. **35**(9): p. 1094-1101.
142. Ballot, A., et al., *Diversity of cyanobacteria and cyanotoxins in Hartbeespoort Dam, South Africa*. Marine and Freshwater Research, 2014. **65**(2): p. 175-189.
143. Rodriguez, I., et al., *Toxin profile in samples collected in fresh and brackish water in Germany*. Toxicon, 2014. **91**: p. 35-44.
144. Meriluoto, J., *Chromatography of microcystins*. Analytica Chimica Acta, 1997. **352**(1-3): p. 277-298.
145. Dimitrakopoulos, I., et al., *Development of a fast and selective method for the sensitive determination of anatoxin-a in lake waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry and phenylalanine-d 5 as internal standard*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(6): p. 2245-2252.
146. Lanaras, T., et al., *Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters*. Journal of Applied Phycology, 1989. **1**(1): p. 67-73.
147. Romero, J., et al., *Seasonal water quality of shallow and eutrophic Lake Pamvotis, Greece: implications for restoration*. Hydrobiologia, 2002. **474**(1-3): p. 91-105.
148. Cook, C.M., E. Vardaka, and T. Lanaras, *Toxic Cyanobacteria in Greek Freshwaters, 1987–2000: Occurrence, Toxicity, and Impacts in the Mediterranean Region*. Acta hydrochimica et hydrobiologica, 2004. **32**(2): p. 107-124.
149. Vardaka, E., et al., *Cyanobacterial blooms and water quality in Greek waterbodies*. Journal of Applied Phycology, 2005. **17**(5): p. 391-401.
150. Gkelis, S., et al., *Diversity of hepatotoxic microcystins and bioactive anabaenopeptins in cyanobacterial blooms from Greek freshwaters*. Environmental Toxicology, 2005. **20**(3): p. 249-256.
151. Moustaka-Gouni, M., et al., *Plankton food web structure in a eutrophic polymictic lake with a history of toxic cyanobacterial blooms*. Limnology and Oceanography, 2006. **51**(1 II): p. 715-727.
152. Moustaka-Gouni, M., E. Vardaka, and E. Tryfon, *Phytoplankton species succession in a shallow Mediterranean lake (L. Kastoria, Greece): Steady-state dominance of *Limnothrix redekei*, *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii**. Hydrobiologia, 2007. **575**(1): p. 129-140.
153. Kagalou, I., et al., *Assessment of microcystins in lake water and the omnivorous fish (*Carassius gibelio*, Bloch) in Lake Pamvotis (Greece) containing dense cyanobacterial bloom*. Environmental Monitoring and Assessment, 2008. **137**(1-3): p. 185-195.
154. Vareli, K., et al., *Molecular characterization of cyanobacterial diversity and yearly fluctuations of Microcystin loads in a suburban Mediterranean Lake (Lake Pamvotis, Greece)*. Journal of Environmental Monitoring, 2009. **11**(8): p. 1506-1512.

155. Michaloudi, E., et al., *Plankton community structure during an ecosystem disruptive algal bloom of Prymnesium parvum*. Journal of Plankton Research, 2009. **31**(3): p. 301-309.
156. Chrisostomou, A., et al., *Air-dispersed phytoplankton in a Mediterranean River-Reservoir System (Aliakmon-Polyphytos, Greece)*. Journal of Plankton Research, 2009. **31**(8): p. 877-884.
157. Vareli, K., et al., *Molecular confirmation of Planktothrix rubescens as the cause of intense, microcystin—Synthesizing cyanobacterial bloom in Lake Ziros, Greece*. Harmful Algae, 2009. **8**(3): p. 447-453.
158. Papadimitriou, T., et al., *Accumulation of microcystins in water and fish tissues: An estimation of risks associated with microcystins in most of the Greek Lakes*. Environmental Toxicology, 2010. **25**(4): p. 418-427.
159. Kormas, K., et al., *Molecular detection of potentially toxic cyanobacteria and their associated bacteria in lake water column and sediment*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010. **26**(8): p. 1473-1482.
160. Lympelopoulou, D., et al., *Diversity of cyanobacterial phylotypes in a Mediterranean drinking water reservoir (Marathonas, Greece)*. Environmental Monitoring and Assessment, 2011. **173**(1-4): p. 155-165.
161. Katsiapi, M., et al., *Phytoplankton and water quality in a Mediterranean drinking-water reservoir (Marathonas Reservoir, Greece)*. Environmental Monitoring and Assessment, 2011. **181**(1-4): p. 563-575.
162. Kormas, K.A., et al., *Morphological and molecular analysis of bloom-forming Cyanobacteria in two eutrophic, shallow Mediterranean lakes*. Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters, 2011. **41**(3): p. 167-173.
163. Papadimitriou, T., et al., *Detection of microcystins in Pamvotis lake water and assessment of cyanobacterial bloom toxicity*. Environmental Monitoring and Assessment, 2012. **184**(5): p. 3043-3052.
164. Papadimitriou, T., et al., *Artificially-born “killer” lake: Phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake*. Science of The Total Environment, 2013. **452–453**(0): p. 116-124.
165. Gkelis, S., et al., *Anthropogenic and climate-induced change favors toxic cyanobacteria blooms: Evidence from monitoring a highly eutrophic, urban Mediterranean lake*. Harmful Algae, 2014. **39**(0): p. 322-333.
166. Gkelis, S. and N. Zaoutsos, *Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: A multi-disciplinary approach*. Toxicon, 2014. **78**(0): p. 1-9.
167. Gkelis, S., T. Lanaras, and K. Sivonen, *Cyanobacterial Toxic and Bioactive Peptides in Freshwater Bodies of Greece: Concentrations, Occurrence Patterns, and Implications for Human Health*. Marine Drugs, 2015. **13**(10): p. 6319.
168. Gkelis, S., et al., *Monitoring a newly re-born patient: water quality and cyanotoxin occurrence in a reconstructed shallow Mediterranean lake*. 2017, 2017.
169. Berillis, P., et al., *Brain and liver histopathological examination of carassius gibelio from a newly reconstructed lake with toxic cyanobacteria*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2014. **14**(1): p. 213-219.
170. Lanaras, T. and C.M. Cook, *Toxin extraction from an Anabaenopsis milleri — dominated bloom*. Science of The Total Environment, 1994. **142**(3): p. 163-169.
171. Gkelis, S., et al., *First report of the cyanobacterium Aphanizomenon ovalisporum Forti in two Greek lakes and cyanotoxin occurrence*. Journal of Plankton Research, 2005. **27**(12): p. 1295-1300.

172. Triantis, T., et al., *Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters*. *Toxicon*, 2010. **55**(5): p. 979-989.
173. Kaloudis, T., et al., *Determination of microcystins and nodularin (cyanobacterial toxins) in water by LC-MS/MS. Monitoring of Lake Marathonas, a water reservoir of Athens, Greece*. *Journal of Hazardous Materials*, 2013. **263**, Part 1(0): p. 105-115.
174. Moustaka-Gouni, M., et al., *First report of <i>Aphanizomenon favaloroi</i> occurrence in Europe associated with saxitoxins and a massive fish kill in Lake Vistonis, Greece*. *Marine and Freshwater Research*, 2016: p. -.
175. Zervou, S.-K., et al., *New SPE-LC-MS/MS method for simultaneous determination of multi-class cyanobacterial and algal toxins*. *Journal of Hazardous Materials*, 2017. **323**(Part A): p. 56-66.
176. Koukaras, K. and G. Nikolaidis, *Dinophysis blooms in Greek coastal waters (Thermaikos Gulf, NW Aegean Sea)*. *Journal of Plankton Research*, 2004. **26**(4): p. 445-457.
177. Mouratidou, T., et al., *Detection of the marine toxin okadaic acid in mussels during a diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Thermaikos Gulf, Greece, using biological, chemical and immunological methods*. *Science of The Total Environment*, 2006. **366**(2-3): p. 894-904.
178. Mouratidou, T., et al., *Determination of okadaic acid and related toxins in Greek mussels by HPLC with fluorimetric detection*. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 2004. **27**(14): p. 2153-2166.
179. Ciminiello, P., et al., *Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography - Mass spectrometry*. *Toxicon*, 2006. **47**(2): p. 174-181.
180. Prassopoulou, E., et al., *Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection*. *Toxicon*, 2009. **53**(2): p. 214-227.
181. Reizopoulou, S., et al., *Okadaic acid accumulation in macrofilter feeders subjected to natural blooms of *Dinophysis acuminata**. *Harmful Algae*, 2008. **7**(2): p. 228-234.
182. Moschandreu, K.K., et al., *Inter- and intra-specific diversity of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in the northeastern Mediterranean*. *European Journal of Phycology*, 2012. **47**(3): p. 321-339.
183. Moschandreu, K.K., et al., *Morphology, phylogeny and toxin analysis of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) isolated from the Thermaikos Gulf, Greece*. *Phycologia*, 2010. **49**(3): p. 260-273.
184. Kaniou-Grigoriadou, I., T. Mouratidou, and P. Katikou, *Investigation on the presence of domoic acid in Greek shellfish*. *Harmful Algae*, 2005. **4**(4): p. 717-723.
185. Hunter, P.R., *Climate change and waterborne and vector-borne disease*. *Journal of Applied Microbiology*, 2003. **93**(1): p. 37-46.
186. Moore, S.K., et al., *Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health*. *Environmental Health*, 2008. **7**(Suppl 2): p. S4.
187. Johnk, K.D., et al., *Summer haedwaters promote blooms of harmful cyanobacteria*. *Global Change Biology*, 2008. **14**(3): p. 495-512.
188. Anderson, D.M., et al., *Harmful algal blooms and eutrophication: Examining linkages from selected coastal regions of the Unated States* *Harmful Algae*, 2008. **8**(1): p. 39-53.
189. Paerl, H.W. and J. Huisman, *Climate - blooms like it hot*. *Science*, 2008. **320**(5872): p. 57-58.

190. UNESCO, *International Initiative on Water Quality*, U.N.E.S.a.C. Organization, Editor 2015: Paris, France.
191. Koop, S.H.A. and C.J. van Leeuwen, *The challenges of water, waste and climate change in cities*. Environment, Development and Sustainability, 2017. **19**(2): p. 385-418.
192. Ribeiro, C., A.R. Ribeiro, and M.E. Tiritan, *Occurrence of persistent organic pollutants in sediments and biota from Portugal versus European incidence: A critical overview*. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2016. **51**(3): p. 143-153.
193. Gorito, A.M., et al., *A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation*. Environmental Pollution, 2017. **227**: p. 428-443.
194. Vasquez, M.I., et al., *Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know*. Journal of Hazardous Materials, 2014. **279**: p. 169-189.
195. *Οδηγία 2006/11/ΕΚ του Ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 15ης Φεβρουαρίου 2006 για τη ρύπανση που προκαλείται από ορισμένες επικίνδυνες ουσίες που εκχέονται στο υδάτινο περιβάλλον της Κοινότητας*, in L 64/52, Ε.Ε.τ.Ε. Ένωσης, Editor 2006, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης: Στρασβούργο.
196. Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, *ΟΔΗΓΙΑ 2000/60/ΕΚ του ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 23ης Οκτωβρίου 2000 για την θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων*, 2000, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
197. Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, *ΟΔΗΓΙΑ 2008/105/ΕΚ του ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 16ης Δεκεμβρίου 2008 σχετικά με πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος στον τομέα της πολιτικής υδάτων 2008*, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
198. Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, *ΟΔΗΓΙΑ 2013/39/ΕΕ του Ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 12ης Αυγούστου 2013 για την τροποποίηση των οδηγιών 2000/60/ΕΚ και 2008/105/ΕΚ όσον αφορά τις ουσίες προτεραιότητας στον τομέα της πολιτικής των υδάτων*, 2013, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης
199. *Κοινή Υπουργική Απόφαση οικ. 170766/2016 - ΦΕΚ 69/Β/22-1-2016. Τροποποίηση της υπ' αριθ. 51354/2641/Ε103/2010 κοινής υπουργικής απόφασης (Β' 1909), σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της οδηγίας 2013/39/ΕΕ «για την τροποποίηση των οδηγιών 2000/60/ΕΚ και 2008/105/ΕΚ όσον αφορά τις ουσίες προτεραιότητας στον τομέα της πολιτικής των υδάτων» του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 12ης Αυγούστου 2013 και άλλες συναφείς διατάξεις». in ΦΕΚ 69/Β/22-1-20162016, ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ. p. 875-885.*
200. *Ευρωπαϊκή Επιτροπή, Εκτελεστική απόφαση (ΕΕ) 2015/495 της επιτροπής της 20ής Μαρτίου 2015 για τη δημιουργία καταλόγου επιτήρησης των ουσιών για την παρακολούθηση σε επίπεδο Ένωσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, σύμφωνα με την οδηγία 2008/105/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου*, in L 782015, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης: Βρυξέλλες.
201. Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, *ΟΔΗΓΙΑ 98/83/ΕΚ του συμβουλίου της 3ης Νοεμβρίου 1998 σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης*, 1998, Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων.
202. *Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001 : "Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης" σε συμμορφωση προς την οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης της 3ης Νοεμβρίου 1998*, in ΦΕΚ 892Β/11-7-20012001, Εφυμερίς της Κυβερνήσεως της Ελληνικής Δημοκρατίας

203. LeBaron, H.M., J.E. McFarland, and O.C. Burnside, *Chapter 1 - The Triazine Herbicides: A Milestone in the Development of Weed Control Technology*, in *The Triazine Herbicides* 2008, Elsevier: San Diego. p. 1-12.
204. *EU Pesticides database*. Available from: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>.
205. Kniewald, J., et al., *Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine*. *Journal of Applied Toxicology*, 2000. **20**(1): p. 61-68.
206. Jin, Y., et al., *Exposure of mice to atrazine and its metabolite diaminochlorotriazine elicits oxidative stress and endocrine disruption*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014. **37**(2): p. 782-790.
207. Sathiakumar, N., et al., *A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer*. *Critical Reviews in Toxicology*, 2011. **41**(sup1): p. 1-34.
208. Kettles, M.K., et al., *Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties*. *Environmental Health Perspectives*, 1997. **105**(11): p. 1222-1227.
209. Gupta, P.K., *Chapter 39 - Herbicides and fungicides*, in *Reproductive and Developmental Toxicology* 2011, Academic Press: San Diego. p. 503-521.
210. Liu, X.-M., et al., *Cytotoxic effects and apoptosis induction of atrazine in a grass carp (Ctenopharyngodon idellus) cell line*. *Environmental Toxicology*, 2006. **21**(1): p. 80-89.
211. Huang, P., J. Yang, and Q. Song, *Atrazine Affects Phosphoprotein and Protein Expression in MCF-10A Human Breast Epithelial Cells*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014. **15**(10): p. 17806.
212. Li, Y.-S., et al., *The Effect of Exposure to Atrazine on Dopaminergic Development in Pubertal Male SD Rats*. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 2015. **104**(5): p. 184-189.
213. Ma, K., et al., *Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation*. *Molecular BioSystems*, 2015. **11**(11): p. 2915-2924.
214. *PPDB: Pesticide Properties Database*, University of Hertfordshire.
215. Gupta, P.K., *Chapter 24 - Herbicides and fungicides*, in *Biomarkers in Toxicology* 2014, Academic Press: Boston. p. 409-431.
216. Liu, J., *Chapter 80 - Phenylurea Herbicides A2 - Krieger, Robert*, in *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)* 2010, Academic Press: New York. p. 1725-1731.
217. Niessen, W.M.A., *Group-specific fragmentation of pesticides and related compounds in liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(25): p. 4061-4070.
218. Hodge, H.C., et al., *Oral toxicity of linuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea) in rats and dogs*. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1968. **6**(2): p. 171-183.
219. Hodge, H.C., et al., *Oral toxicity and metabolism of diuron (N-(3,4-dichlorophenyl)-N',N'-dimethylurea) in rats and dogs*. *Food and Cosmetics Toxicology*, 1967. **5**(C): p. 513-531.
220. Gupta, R.C., J.K. Malik, and D. Milatovic, *Chapter 37 - Organophosphate and carbamate pesticides*, in *Reproductive and Developmental Toxicology* 2011, Academic Press: San Diego. p. 471-486.
221. Jaga, K. and C. Dharmani, *Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides*. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 2003. **14**(3): p. 171-185.

222. Mnif, W., et al., *Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2011. **8**(6): p. 2265-2303.
223. McKinlay, R., et al., *Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment*. Environment International, 2008. **34**(2): p. 168-183.
224. Karami-Mohajeri, S. and M. Abdollahi, *Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review*. Human and Experimental Toxicology, 2011. **30**(9): p. 1119-1140.
225. Li, D., et al., *The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis*. Chemosphere, 2015. **135**: p. 387-393.
226. Hung, D.Z., et al., *The long-term effects of organophosphates poisoning as a risk factor of CVDs: A nationwide population-based cohort study*. PLoS ONE, 2015. **10**(9).
227. Rosenstock, L., et al., *Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication*. The Lancet, 1991. **338**(8761): p. 223-227.
228. Wesseling, C., et al., *Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticides among banana workers*. International Journal of Occupational and Environmental Health, 2002. **8**(1): p. 27-34.
229. Lin, J.-N., et al., *Increased Risk of Dementia in Patients With Acute Organophosphate and Carbamate Poisoning: A Nationwide Population-Based Cohort Study*. Medicine, 2015. **94**(29): p. e1187.
230. Waddell, B.L., et al., *Agricultural use of organophosphate pesticides and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among male farmers (United States)*. Cancer Causes & Control, 2001. **12**(6): p. 509-517.
231. Eskenazi, B., et al., *Association of in Utero Organophosphate Pesticide Exposure and Fetal Growth and Length of Gestation in an Agricultural Population*. Environmental Health Perspectives, 2004. **112**(10): p. 1116-1124.
232. Eskenazi, B., A. Bradman, and R. Castorina, *Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects*. Environmental Health Perspectives, 1999. **107**(SUPPL. 3): p. 409-419.
233. Rauh, V.A., et al., *Prenatal exposure to the organophosphate pesticide chlorpyrifos and childhood tremor*. NeuroToxicology, 2015. **51**: p. 80-86.
234. Heydens, W.F., I.C. Lamb, and A.G.E. Wilson, *Chapter 82 - Chloracetanilides A2 - Krieger, Robert, in Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)2010*, Academic Press: New York. p. 1753-1769.
235. *Weed Ecology and Management Laboratory*. [cited 2018 02/03/2018]; Available from: <https://weedecology.css.cornell.edu/herbicide/herbicide.php?id=5>.
236. Cocco, P., *On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects*. Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2002. **18**(2): p. 379-402.
237. Mikamo, E., et al., *Endocrine disruptors induce cytochrome P450 by affecting transcriptional regulation via pregnane X receptor*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2003. **193**(1): p. 66-72.
238. U.S.EPA, *Consumer Factsheet on: ALACHLOR, in National Primary Drinking Water Regulations*, U.S.E.P. Agency, Editor 2015.
239. Epp, J.B., P.R. Schmitzer, and G.D. Crouse, *Fifty years of herbicide research: comparing the discovery of trifluralin and halauxifen-methyl*. Pest Management Science, 2018. **74**(1): p. 9-16.

240. U.S.EPA, *Health and Environmental Effects Profile for Trifluralin*. EPA/600/x-84/234, U.S.E.P. Agency, Editor 1984, Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development: Cincinnati, OH.
241. Grover, R., et al., *Environmental fate of trifluralin*. Reviews of environmental contamination and toxicology, 1997. **153**: p. 1-64.
242. WHO, *Chlorophenols in Drinking-water*, in *Guidelines for drinking-water quality, Health criteria and other supporting information*, W.H. Organization, Editor 1996: Geneva.
243. ATSDR, *Toxicological Profile for 2,4,6-Trichlorophenol*, A.f.T.S.a.D.R. (ATSDR), Editor 1990, U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services: Atlanta, GA.
244. Freiter, E., *Chlorophenols*, in *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology* 1979, John Wiley: New York. p. 864-872.
245. USEPA, *2,4,6 Trichlorophenol*, U.S.E.P. Agency, Editor 2000.
246. Sousa, J.C.G., et al., *A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines*. Journal of Hazardous Materials, 2018. **344**: p. 146-162.
247. IPCS, *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. International Programme on Chemical Safety 2002, Geneva, Switzerland: World Health Organization.
248. WHO/UNEP, *State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO*, ed. Å. Bergman, et al. 2013, Geneva, Switzerland: World Health Organization & United Nations Environment Programme.
249. Kabir, E.R., M.S. Rahman, and I. Rahman, *A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015. **40**(1): p. 241-258.
250. Aris, A.Z., A.S. Shamsuddin, and S.M. Praveena, *Occurrence of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review*. Environment International, 2014. **69**: p. 104-119.
251. Wit, M.D., et al., *An integrated transcriptomic and proteomic approach characterizing estrogenic and metabolic effects of 17 α -ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*)*. General and Comparative Endocrinology, 2010. **167**(2): p. 190-201.
252. Chen, T.-S., et al., *High estrogen concentrations in receiving river discharge from a concentrated livestock feedlot*. Science of The Total Environment, 2010. **408**(16): p. 3223-3230.
253. Dzieweczynski, T.L. and O.L. Hebert, *The Effects of Short-Term Exposure to an Endocrine Disrupter on Behavioral Consistency in Male Juvenile and Adult Siamese Fighting Fish*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2013. **64**(2): p. 316-326.
254. Saaristo, M., et al., *Sand goby (*Pomatoschistus minutus*) males exposed to an endocrine disrupting chemical fail in nest and mate competition*. Hormones and Behavior, 2009. **56**(3): p. 315-321.
255. Silva, P., et al., *Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads—A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model*. Aquatic Toxicology, 2012. **124-125**: p. 1-10.

256. Vethaak, A.D., et al., *An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands*. Chemosphere, 2005. **59**(4): p. 511-524.
257. Liu, Y., et al., *Influence of a Marine Diatom on the Embryonic Toxicity of 17 α -Ethinylestradiol to the Abalone *Haliotis diversicolor supertexta**. Water, Air, and Soil Pollution, 2012. **223**(7): p. 4383-4395.
258. Lecomte, S., et al., *Emerging Estrogenic Pollutants in the Aquatic Environment and Breast Cancer*. Genes, 2017. **8**(9): p. 229.
259. Ali, S. and R.C. Coombes, *Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(2): p. 101-112.
260. Barbosa, M.O., et al., *Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495*. Water Research, 2016. **94**: p. 257-279.
261. Falconer, I.R., et al., *Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse*. Environmental Toxicology, 2006. **21**(2): p. 181-191.
262. Tiedeken, E.J., et al., *Monitoring, sources, receptors, and control measures for three European Union watch list substances of emerging concern in receiving waters – A 20 year systematic review*. Science of The Total Environment, 2017. **574**: p. 1140-1163.
263. Bodzek, M. and M. Dudziak, *Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes*. Desalination, 2006. **198**(1-3): p. 24-32.
264. He, K., et al., *Detection of a wide variety of human and veterinary fluoroquinolone antibiotics in municipal wastewater and wastewater-impacted surface water*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. **106**: p. 136-143.
265. Aydin, E. and I. Talinli, *Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey*. Chemosphere, 2013. **90**(6): p. 2004-2012.
266. Altman, R., et al., *Advances in NSAID Development: Evolution of Diclofenac Products Using Pharmaceutical Technology*. Drugs, 2015. **75**(8): p. 859-877.
267. Patrono, C., P. Patrignani, and L.A.G. Rodríguez, *Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs*. Journal of Clinical Investigation, 2001. **108**(1): p. 7-13.
268. Smyth, E.M., et al., *Prostanoids in health and disease*. Journal of Lipid Research, 2009. **50**(Suppl): p. S423-S428.
269. Grosser, T., S. Fries, and G.A. FitzGerald, *Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities*. Journal of Clinical Investigation, 2006. **116**(1): p. 4-15.
270. Vieno, N. and M. Sillanpää, *Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant – A review*. Environment International, 2014. **69**: p. 28-39.
271. Zhang, Z., K. Zeng, and J. Liu, *Immunochemical detection of emerging organic contaminants in environmental waters*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2017. **87**: p. 49-57.
272. Justino, C.I.L., A.C. Duarte, and T.A.P. Rocha-Santos, *Recent progress in biosensors for environmental monitoring: A review*. Sensors (Switzerland), 2017. **17**(12).
273. Hennion, M.C. and P. Scribe, *Chapter 2 Sample Handling Strategies For The Analysis Of Organic Compounds From Environmental Water Samples*, in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, D. Barceló, Editor 1993, Elsevier. p. 23-77.
274. Farré, M., et al., *Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques*. Journal of Chromatography A, 2012. **1259**(0): p. 86-99.

275. Pérez-Fernández, V., et al., *Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2017. **983**: p. 9-41.
276. Richardson, S.D. and T.A. Ternes, *Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues*. *Analytical Chemistry*, 2018. **90**(1): p. 398-428.
277. Dimpe, K.M. and P.N. Nomngongo, *Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016. **82**: p. 199-207.
278. Olives, A.I., V. González-Ruiz, and M.A. Martín, *Isolation and quantitative methods for analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2012. **11**(1): p. 65-95.
279. Płotka-Wasyłka, J., et al., *Miniaturized solid-phase extraction techniques*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015. **73**: p. 19-38.
280. Gorga, M., M. Petrovic, and D. Barceló, *Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2013. **1295**: p. 57-66.
281. Rodrigues, A.M., et al., *Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1150**(1-2): p. 267-278.
282. Dujaković, N., et al., *Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2010. **678**(1): p. 63-72.
283. Loos, R., et al., *Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **387**(4): p. 1469-1478.
284. Zwir-Ferenc, A. and M. Biziuk, *Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications*. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2006. **15**(5): p. 677-690.
285. Erger, C. and T.C. Schmidt, *Disk-based solid-phase extraction analysis of organic substances in water*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014. **61**: p. 74-82.
286. Ribeiro, A.R., et al., *Environmental friendly method for urban wastewater monitoring of micropollutants defined in the Directive 2013/39/EU and Decision 2015/495/EU*. *Journal of Chromatography A*, 2015. **1418**: p. 140-149.
287. Carvalho, J.J., et al., *Evaluation of a multiresidue method for measuring fourteen chemical groups of pesticides in water by use of LC-MS-MS*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **392**(5): p. 955-968.
288. de Almeida Azevedo, D., et al., *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*. *Journal of Chromatography A*, 2000. **879**(1): p. 13-26.
289. Gervais, G., et al., *Ultra-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water*. *Journal of chromatography. A*, 2008. **1202**(2): p. 163-172.
290. Martínez Bueno, M.J., et al., *Application of Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the Determination of Pharmaceuticals and Related Contaminants in Wastewater*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(24): p. 9372-9384.

291. Samsidar, A., S. Siddiquee, and S.M. Shaarani, *A review of extraction, analytical and advanced methods for determination of pesticides in environment and foodstuffs*. Trends in Food Science & Technology, 2018. **71**: p. 188-201.
292. Παπαδογιάννης, Ι.Ν., *Διαχωριστικές τεχνικές στην ενόργανη χημική ανάλυση* 1992, Θεσσαλονίκη: Γραφικές τέχνες.
293. Δεληγιαννάκης, Ι., Δ. Χελά, and Ι. Κωσταντίνου, *Ενόργανη περιβαλλοντική ανάλυση* 2010: Εκδόσεις ΤΖΙΟΛΑ.
294. Snyder R., D.W.J., *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear -Solvent -Strength Model* 2007: Wiley Interscience.
295. Braus, H., F.M. Middleton, and G. Walton, *Organic Chemical Compounds in Raw and Filtered Surface Waters*. Analytical Chemistry, 1951. **23**(8): p. 1160-1164.
296. Liška, I., *Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview*. Journal of Chromatography A, 2000. **885**(1): p. 3-16.
297. Camel, V., *Solid phase extraction of trace elements*. Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy, 2003. **58**(7): p. 1177-1233.
298. Hackett, J., *Solid Phase Extraction*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers, Editor 2014, John Wiley & Sons.
299. Lucci, P., et al., *Chapter 5: Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis*, in *Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, L. Calderon, Editor 2012, InTech.
300. Hagen, D.F., et al., *Membrane approach to solid-phase extractions*. Analytica Chimica Acta, 1990. **236**(C): p. 157-164.
301. Niessen, W.M.A., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. 3rd ed 2006, London: Taylor and Francis Group.
302. Blevins, D.D., et al., *Handbook: Sorbent extraction technology* 1990, Cambridge, U.K.: Analytichem International.
303. Majors, R.E., *The Role of Polymers in Solid-Phase Extraction and Sample Preparation*. LC-GC, 2008.
304. Hennon, M.C., C. Cau-Dit-Coumes, and V. Pichon, *Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples: Tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters*. Journal of Chromatography A, 1998. **823**(1): p. 147-161.
305. Rastrelli, L., K. Totaro, and F. De Simone, *Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography*. Food Chemistry, 2002. **79**(3): p. 303-305.
306. Medvedovici, A.V., et al., *Analysis of polyaromatic hydrocarbons in water samples, at ppt level, using on-line solid phase extraction-reversed phase liquid chromatography-fluorescence detection*. Chemia Analityczna, 1998. **43**(1): p. 47-56.
307. Watson, L., et al., *The Development and Single-Laboratory Validation of a Method for the Determination of Steroid Residues in Fish and Fish Products*. Journal of AOAC International, 2015. **98**(3): p. 580-587.
308. Herrero, P., et al., *Efficient tandem solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method to determine polar benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide contaminants in environmental water samples*. Journal of Chromatography A, 2013. **1309**: p. 22-32.
309. Grabic, R., et al., *Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry*. Talanta, 2012. **100**: p. 183-195.
310. Huerta, B., et al., *Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates*. Talanta, 2015. **132**: p. 373-381.

311. Masiá, A., et al., *Ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry to identify contaminants in water: An insight on environmental forensics*. Journal of Chromatography A, 2014. **1345**: p. 86-97.
312. Robles-Molina, J., et al., *Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2014. **1350**: p. 30-43.
313. McMaster, M., *LC/MS A practical's user guide* 2005, New Jersey: John Wiley and Sons.
314. Ardrey, R.E., *Liquid chromatography-Mass spectrometry: An introduction* 2003, UK: John Wiley and Sons.
315. De Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3rd ed 2007.
316. Watson, J.T. and O.D. Sparkman, *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*. 4th ed 2007: John Wiley & Sons.
317. Skoog, D.A., J.F. Holler, and T.A. Nieman, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 5th ed 2005: Εκδόσεις Κωσταράκης.
318. *Notes from the Thermo Electron European Training Institute* 2008.
319. *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS)*. [cited 2018 31-3]; Available from: <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html>.
320. AL Milhome, M., et al., *Advances in Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry for Determination of Pesticide Residues in Food*, in *Advances in Chromatographic Analysis*, R.F. Do Nascimento, Editor 2017, Avid Science: Open Access.
321. Gustavo González, A. and M. Ángeles Herrador, *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(3): p. 227-238.
322. Sadek, P.C., *Solvent Miscibility and Viscosity Chart*, in *The HPLC Solvent Guide*, P.C. Sadek, Editor 2002, Wiley-Interscience: New York.
323. Yuan, M., et al., *Low-energy collisionally activated decomposition and structural characterization of cyclic heptapeptide microcystins by electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 1999. **34**(1): p. 33-43.
324. Yuan, M., et al., *Electrospray ionization mass spectrometric analysis of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins: modulation of charge states and $[M + H]^+$ to $[M + Na]^+$ ratio*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1999. **10**(11): p. 1138-1151.
325. Furey, A., et al., *Strategies to avoid the mis-identification of anatoxin-a using mass spectrometry in the forensic investigation of acute neurotoxic poisoning*. Journal of Chromatography A, 2005. **1082**(1): p. 91-97.
326. Quilliam, M.A., et al., *Ion-spray mass spectrometry of marine neurotoxins*. Rapid communications in mass spectrometry : RCM, 1989. **3**(5): p. 145-150.
327. Furey, A., et al., *Determination of domoic acid in shellfish by liquid chromatography with electrospray ionization and multiple tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2001. **938**(1–2): p. 167-174.
328. Namikoshi, M., et al., *Identification of 12 hepatotoxins from a homer lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: Nine new microcystins*. Journal of Organic Chemistry, 1992. **57**(3): p. 866-872.

329. Mazur-Marzec, H., et al., *Characterization of nodularin variants in Nodularia spumigena from the Baltic Sea using liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(13): p. 2023-2032.
330. Edwards, C., et al., *Analysis of microcystins from cyanobacteria by liquid chromatography with mass spectrometry using atmospheric-pressure ionization*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1993. **7**(8): p. 714-721.
331. Bateman, K.P., et al., *Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations*. Journal of Chromatography A, 1995. **712**(1): p. 253-268.
332. Bencsath, F.A. and R.W. Dickey, *Mass spectral characteristics of okadaic acid and simple derivatives*. Rapid communications in mass spectrometry : RCM, 1991. **5**(6): p. 283-290.
333. Guzmán-Guillén, R., et al., *Cylindrospermopsin determination in water by LC-MS/MS: Optimization and validation of the method and application to real samples*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2012. **31**(10): p. 2233-2238.
334. *2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2002) 3044) in L 221*, Official Journal of the European Communities: Brussels.
335. *EU Commission Directive 2015/1787 amending Annexes II and III to Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption*, in L 260/6, E. Commission, Editor 2015.
336. *Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption*, in L 330/321998.
337. *EU Commission Directive 2009/90/EC laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status*, in L 201/362009.
338. Kikuchi, S., T. Kubo, and K. Kaya, *Cylindrospermopsin determination using 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) as the internal standard*. Analytica Chimica Acta, 2007. **583**(1): p. 124-127.
339. Cong, L., et al., *Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2006. **569**(1-2): p. 157-168.
340. Xu, W., et al., *Development and application of ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem triple quadrupole mass spectrometry for determination of seven microcystins in water samples*. Analytica Chimica Acta, 2008. **626**(1): p. 28-36.
341. Ott, J.L. and W.W. Carmichael, *LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues*. Toxicon, 2006. **47**(7): p. 734-741.
342. Bogialli, S., et al., *Simple assay for analyzing five microcystins and nodularin in fish muscle tissue: Hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(17): p. 6586-6592.
343. Metcalf, J.S., et al., *Effects of organic solvents on the high performance liquid chromatographic analysis of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin and its recovery from environmental eutrophic waters by solid phase extraction*. FEMS Microbiology Letters, 2002. **216**(2): p. 159-164.

344. Harada, K.-i., et al., *Liquid chromatography/mass spectrometric detection of anatoxin-a, a neurotoxin from cyanobacteria*. *Tetrahedron*, 1993. **49**(41): p. 9251-9260.
345. Turner, A.D., et al., *Development and single-laboratory validation of a UHPLC-MS/MS method for quantitation of microcystins and nodularin in natural water, cyanobacteria, shellfish and algal supplement tablet powders*. *Journal of Chromatography B*, 2018. **1074-1075**: p. 111-123.
346. Harada, K.I., et al., *A new procedure for the analysis and purification of naturally occurring anatoxin-a from the blue-green alga Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*, 1989. **27**(12): p. 1289-1296.
347. Lawton, L.A., C. Edwards, and G.A. Codd, *Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters*. *The Analyst*, 1994: p. 1525-1530.
348. Gjølme, N. and H. Utkilen, *The extraction and stability of microcystin-RR in different solvents*. *Phycologia*, 1996. **35**(SUPPL.): p. 80-82.
349. Fastner, J., I. Flieger, and U. Neumann, *Optimised extraction of microcystins from field samples — a comparison of different solvents and procedures*. *Water Research*, 1998. **32**(10): p. 3177-3181.
350. Heussner, A.H., et al., *Toxin content and cytotoxicity of algal dietary supplements*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012. **265**(2): p. 263-271.
351. Vichi, S., et al., *Contamination by Microcystis and microcystins of blue-green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population*. *Food and Chemical Toxicology*, 2012. **50**(12): p. 4493-4499.
352. Paerl, H.W. and T.G. Otten, *Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls*. *Microbial Ecology*, 2013. **65**(4): p. 995-1010.
353. Rastogi, R.P., R.P. Sinha, and A. Incharoensakdi, *The cyanotoxin-microcystins: Current overview*. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2014. **13**(2): p. 215-249.
354. Faassen, E.J. and M. Lürling, *Occurrence of the microcystins MC-LW and MC-LF in Dutch surface waters and their contribution to total microcystin toxicity*. *Marine Drugs*, 2013. **11**(7): p. 2643-2654.
355. Beversdorf, L.J., et al., *Variable cyanobacterial toxin and metabolite profiles across six eutrophic lakes of differing physiochemical characteristics*. *Toxins*, 2017. **9**(2).
356. Dokulil, M.T. and K. Teubner, *Deep living Planktothrix rubescens modulated by environmental constraints and climate forcing*. *Hydrobiologia*, 2012. **698**(1): p. 29-46.
357. Fastner, J., et al., *Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera Microcystis and Planktothrix from German freshwaters*. *Archiv für Hydrobiologie*, 1999. **145**(2): p. 147-163.
358. Kurmayer, R., et al., *Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus Planktothrix*. *Microbiology*, 2005. **151**(5): p. 1525-1533.
359. Cerasino, L., et al., *Multiannual trend of microcystin production in the toxic cyanobacterium Planktothrix rubescens in Lake Garda (Italy)*. *Chemistry and Ecology*, 2016. **32**(5): p. 492-506.
360. Ζερβού, Σ.-Κ., *Προσδιορισμός Φυτοφαρμάκων και Κυανοτοξινών σε νερό με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης σε συνδιασμό με υγρή χρωματογραφία συζευγμένη φασματομετρία μαζών (SPE, LC-MS/MS)*, in *Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας 2011*, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ): Αθήνα.

361. Park, S.-G., et al., *Structural characterization of alachlor complexes with transition metal ions by electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Microchemical Journal*, 2007. **86**(2): p. 248-256.
362. Banoub, J., E. Gentil, and J. Kiceniuk, *Characterization of Triazine Herbicides by Electrospray and Tandem Mass Spectrometry*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1995. **61**(1): p. 11-26.
363. Banoub, J., E. Gentil, and J. Kiceniuk, *Analysis of organophosphorus pesticide residues by low energy tandem mass spectrometry using electrospray ionization*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1995. **61**(2): p. 143-167.
364. Hong, J., D.G. Kim, and K.J. Paeng, *Electron impact fragmentations of chlorinated organophosphorus pesticides*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2000. **21**(8): p. 785-792.
365. Limbach, P.A., *Applications of LC-MS in Environmental Chemistry. Series: Journal of Chromatography Library, Vol. 59. Edited by D. Barceló (CID-CSIC). Elsevier: Amsterdam. 1996. xxii + 543 pp. \$281.25. ISBN 0-444-82067-1*. *Journal of the American Chemical Society*, 1997. **119**(22): p. 5276-5276.
366. Da Cunha, A.C.B., et al., *Multianalyte determination of different classes of pesticides (acidic, triazines, phenyl ureas, anilines, organophosphates, molinate and propanil) by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004. **378**(4): p. 940-954.
367. Baglio, D., D. Kotzias, and B.R. Larsen, *Atmospheric pressure ionisation multiple mass spectrometric analysis of pesticides*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **854**(1-2): p. 207-220.
368. Barr, J.D., et al., *Fragmentations and reactions of the organophosphate insecticide Diazinon and its oxygen analog Diazoxon studied by electrospray ionization ion trap mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005. **16**(4): p. 515-523.
369. Sinha, S.N., et al., *Quantification of organophosphate insecticides in drinking water in urban areas using lyophilization and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry techniques*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2011. **300**(1): p. 12-20.
370. Draper, W.M., *Electrospray liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry determination of phenyl urea herbicides in water*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. **49**(6): p. 2746-2755.
371. Picó, Y., et al., *Confirmation of Fenthion Metabolites in Oranges by IT-MS and QqTOF-MS*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(24): p. 9350-9363.
372. García-Reyes, J.F., A. Molina-Díaz, and A.R. Fernández-Alba, *Identification of pesticide transformation products in food by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry via "fragmentation- degradation" relationships*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(1): p. 307-321.
373. Coscollà, C., et al., *Combined target and post-run target strategy for a comprehensive analysis of pesticides in ambient air using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1368**: p. 132-142.
374. Harden, C.S., A.P. Snyder, and G.A. Eiceman, *Determination of collision-induced dissociation mechanisms and cross-sections in organophosphorus compounds by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry*. *Organic Mass Spectrometry*, 1993. **28**(5): p. 585-592.
375. Jin, B.-h., et al., *Simultaneous determination of 42 organic chemicals in bottled water by combining C18 extraction disk with GC-MS and LC/MS/MS technique*. *Journal of Water and Health*, 2010. **8**(1): p. 116-125.

376. Hogenboom, A.C., et al., *Single short-column liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization - (Tandem) mass spectrometric detection for trace environmental analysis*. *Chromatographia*, 1996. **42**(9-10): p. 506-514.
377. Mezcua, M., et al., *Application of ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the analysis of priority pesticides in groundwater*. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1109**(2): p. 222-227.
378. Sarrión, M.N., et al., *Solid-phase microextraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the analysis of chlorophenols in environmental samples*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003. **17**(1): p. 39-48.
379. Croley, T.R., et al., *Mass spectrometry applied to the analysis of estrogens in the environment*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000. **14**(13): p. 1087-1093.
380. Miksa, I.R., M.R. Cummings, and R.H. Poppenga, *Multi-residue determination of anti-inflammatory analgesics in sera by liquid chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Analytical Toxicology*, 2005. **29**(2): p. 95-104.
381. Galmier, M.-J., et al., *Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005. **38**(4): p. 790-796.
382. Magi, E., et al., *Determination of endocrine-disrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2010. **45**(9): p. 1003-1011.
383. Asperger, A., et al., *Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **960**(1-2): p. 109-119.
384. Bossi, R., et al., *Analysis of polar pesticides in rainwater in Denmark by liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2002. **957**(1): p. 27-36.
385. Belmonte Vega, A., A. Garrido Frenich, and J.L. Martínez Vidal, *Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2005. **538**(1): p. 117-127.
386. Becouze, C., et al., *Optimisation of pressurised liquid extraction for the ultra-trace quantification of 20 priority substances from the European Water Framework Directive in atmospheric particles by GC–MS and LC–FLD–MS/MS*. *Analytica Chimica Acta*, 2011. **693**(1): p. 47-53.
387. Rubirola, A., M.R. Boleda, and M.T. Galceran, *Multiresidue analysis of 24 Water Framework Directive priority substances by on-line solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry in environmental waters*. *Journal of Chromatography A*, 2017. **1493**: p. 64-75.
388. Campos-Mañas, M.C., et al., *Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2017. **1507**: p. 84-94.
389. 2004/248/ΕΚ: Απόφαση της επιτροπής της 10ης Μαρτίου 2004 σχετικά με τη μη καταχώριση της ουσίας atrazine στο παράρτημα Ι της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου και με την απόσυρση των εγκρίσεων για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν αυτή τη δραστική ουσία, in L 782004, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης: Βρυξέλλες.

390. 2004/247/ΕΚ: Απόφαση της επιτροπής της 10ης Μαρτίου 2004 για τη μη καταχώριση της ουσίας *simazine* στο παράρτημα Ι της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου και με την απόσυρση των εγκρίσεων για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν αυτή τη δραστική ουσία, 2004, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης: Βρυξέλλες.
391. Jablonowski, N.D., A. Schäffer, and P. Burauel, *Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine*. Environmental Science and Pollution Research, 2011. **18**(2): p. 328-331.
392. Jiang, H. and C. Adams, *Treatability of chloro-s-triazines by conventional drinking water treatment technologies*. Water Research, 2006. **40**(8): p. 1657-1667.
393. Konstantinou, I.K., D.G. Hela, and T.A. Albanis, *The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels*. Environmental Pollution, 2006. **141**(3): p. 555-570.
394. Stamatis, N., et al., *Spatiotemporal Variation and Risk Assessment of Pesticides in Water of the Lower Catchment Basin of Acheloos River, Western Greece*. The Scientific World Journal, 2013. **2013**: p. 231610.
395. Thomatou, A.-A., et al., *Determination and risk assessment of pesticide residues in lake Amvrakia (W. Greece) after agricultural land use changes in the lake's drainage basin*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2012. **93**(7): p. 780-799.
396. Golfinopoulos, S.K., et al., *Determination of the priority substances regulated by 2000/60/EC and 2008/105/EC Directives in the surface waters supplying water treatment plants of Athens, Greece*. Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, 2017. **52**(4): p. 378-384.