

**Άμεσος προσδιορισμός των νιτρικών ιόντων
σε φυτικούς ιστούς.**

Γενιατάκης Ευθ.
Τμήμα Χημείας
Πανεπιστήμιο Κρήτης

Εργασία για το
Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ν. Χανιωτάκης , Αναπλ. Καθηγητής.
(επιβλέπων καθηγητής)
Δ. Γανωτάκης, Καθηγητής
Ν. Μιχαλόπουλος, Αναπλ. Καθηγητής.

Νοέμβριος 2000

Ευχαριστώ

Με την ολοκλήρωση αυτού του μεταπτυχιακού κύκλου σπουδών, νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω, τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Νίκο Χανιωτάκη για την συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και ηθική στήριξη του όχι μόνο στη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας αλλά και σε πλήθος άλλα θέματα, στα οποία συνεργαζόμαστε. Εκτός από την επιστημονική του υπόσταση, έχει ήθος και ανθρωπιά, που του προσδίδει ακόμα μεγαλύτερη αξία.

Θέλω να ευχαριστήσω τους καθηγητές Γανωτάκη Δ. και Μιχαλόπουλο Ν. για την συμμετοχή τους στην επιτροπή, αλλά συγχρόνως και όλους τους άλλους καθηγητές, με τους οποίους παρακολούθησα μαθήματα, για την ευγένεια και τη διάθεση τους να βοηθήσουν, όποτε το χρειάστηκα.

Θέλω να ευχαριστήσω, την Κατερίνα Περδικάκη και τη Μαίρη Φουσκάκη του Εργαστηρίου της Αναλυτικής Χημείας και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές της Χημείας Περιβάλλοντος, για τις συμβουλές τους και την συνεργασία τους.

Ευχαριστώ τέλος, το προσωπικό της Γραμματείας του Τμήματος Χημείας και βεβαίως τους συνεργάτες μου στην εργασία μου στο ΤΕΙ και την οικογένεια μου, που ανέχθηκαν να κάνω τον μαθητή.

Περιεχόμενα

| | |
|--|-----------|
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 2 |
| 2. ΤΑ ΝΙΤΡΙΚΑ ΙΟΝΤΑ | 5 |
| 2.1 Τα νιτρικά ιόντα στο περιβάλλον. Ο κύκλος του N ₂ | 5 |
| 2.2 Νιτροποίηση | 8 |
| 2.3 Απονιτροποίηση | 11 |
| 2.4 Τα νιτρικά ιόντα στα φυτά. | 14 |
| 2.5 Τα νιτρικά στον άνθρωπο. | 17 |
| 2.6 Τα επιτρεπτά όρια νιτρικών. | 20 |
| 3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΙΤΡΙΚΩΝ | 22 |
| 3.1 Μέθοδος αναγωγής σε στήλη Cd | 22 |
| 3.2 Μέθοδος φαινυλοδισουλφονικού οξέος | 23 |
| 3.3 Μέθοδος χρωμοτροπικού οξέος | 23 |
| 3.4 Μέθοδος σαλικυλικού οξέος | 24 |
| 3.5 Μέθοδος αναγωγής με κράμα Devarda | 24 |
| 3.6 Μέθοδος βρυκίνης | 25 |
| 3.7 Μέθοδος υπεριώδους φασματοφωτομετρίας | 25 |
| 3.8 Μέθοδος ιοντικής χρωματογραφίας | 26 |
| 3.9 Μέθοδος επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων | 26 |
| 4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΓΙΑ ΝΙΤΡΙΚΑ | 28 |
| 4.1 Το ηλεκτρόδιο των νιτρικών | 28 |
| 4.2 Το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο νιτρικών στερεάς επαφής | 35 |
| 4.3 Προσδιορισμός νιτρικών σε φυτικούς ιστούς και άλλα δείγματα. | 40 |
| 4.4 Ερευνητική εργασία | 47 |
| 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 54 |
| 5.1 Περίληψη | 54 |
| 5.2 Υλικά - Μέθοδοι | 54 |
| 5.3 Διαδικασία | 57 |
| 5.4 Μετρήσεις | 58 |
| 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 74 |
| 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 77 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-) – η πιο οξειδωμένη μορφή των ενώσεων που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου – είναι ευρέως διαδεδομένα σε νερά, εδάφη, φυτά. Η χρήση μεγάλων ποσοτήτων νιτρικών και γενικά αζωτούχων λιπασμάτων τις τελευταίες δεκαετίες (το 1987 χρησιμοποιήθηκαν 120% περισσότερα αζωτούχα λιπάσματα σε σχέση με το 1970) συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες νιτρικών ιόντων σε νερά, εδάφη και φυτά και δημιουργείται πλέον όχι ένα τοπικό – περιφερειακό πρόβλημα, αλλά ένα διεθνές πρόβλημα νιτρικών.

Το πρόβλημα σχετίζεται τόσο με το θέμα του ευτροφισμού (όριο ευτροφισμού για ήρεμες λίμνες $15 \text{ mg NO}_3^-/\text{lt}$) (Tchobanoglous G., 1995) που προκαλείται από τα νιτρικά στο περιβάλλον, όσο και με θέματα υγείας των καταναλωτών. Η διαρκώς μεγαλύτερη ποσότητα νιτρικών που προσλαμβάνεται καθημερινά με το νερό και κυρίως με τα φυτικής προέλευσης τρόφιμα, έχει καταστήσει επικίνδυνα τα σχετικώς ακίνδυνα νιτρικά – θανατηφόρος δόση $66 - 300 \text{ mg/kg}$ – (Corre and Breimer, 1979).

Η συσσώρευση των νιτρικών στα φυτικής προέλευσης τρόφιμα και κυρίως στα φυλλώδη λαχανικά, είναι ιδιαίτερα υψηλή. Η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων σε πολλά από τα συνήθη στο διαιτολόγιο μας φυλλώδη λαχανικά (μαρούλι, σπανάκι, λάχανο κ.α) μπορεί να φτάσει σε τιμές μέχρι και $40000 - 50000 \text{ ppm}$ επί ξηρής ουσίας, ξεπερνώντας κατά πολύ τα ανώτατα επιτρεπτά όρια, που έχουν θεσπιστεί για τα τρόφιμα αυτά. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις Η.Π.Α έχουν οριστεί ανώτατα όρια για τα περισσότερα από τα λαχανικά και φυσικά το νερό. Παράλληλα διεξάγονται εκτεταμένες έρευνες σε πολλές χώρες (Αγγλία, Γερμανία, Ελβετία, κ.λ.π) επί σειρά ετών, στη συγκέντρωση των νιτρικών στα φυτικά τρόφιμα και κυρίως στα λαχανικά. Οι έρευνες συνδυάζονται με διαιτολογικές και επιδημιολογικές μελέτες με σκοπό τη συσχέτιση της κατανάλωσης νιτρικών με ορισμένες μορφές καρκίνου, όπως ο καρκίνος του στομάχου.

Ο προσδιορισμός των νιτρικών με αξιόπιστο και ακριβή τρόπο, στα νερά αλλά ιδιαίτερα στα φυτικά τρόφιμα, παραμένει μια δύσκολη διαδικασία. Η ανάλυση των νιτρικών θεωρείται από τις δύσκολες αναλύσεις, για λόγους που αναπτύσσονται και στα πλαίσια της εργασίας αυτής.

Οι περισσότερες από τις δέκα περίπου μεθόδους ανάλυσης που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα είναι φασματοφωτομετρικές, ενώ μία γίνεται με απόσταξη σε συσκευή Kjeldahl. Η ιοντική χρωματογραφία άρχισε να χρησιμοποιείται τα τελευταία 15 χρόνια και εκτοπίζει σιγά-σιγά σε επίσημο επίπεδο τις περισσότερες από τις υπόλοιπες.

Ο ποτενσιομετρικός προσδιορισμός των νιτρικών με επιλεκτικό ηλεκτρόδιο, ξεκίνησε το 1967 και περνώντας μέσα από πολλές δυσκολίες για την καθιέρωση του, βρίσκεται σήμερα στη πρώτη τριάδα των αναλυτικών τεχνικών, μαζί με την ιοντική χρωματογραφία και την αναγωγή σε στήλη Cd.

Τα βασικά πλεονεκτήματα του ποτενσιομετρικού προσδιορισμού, είναι :

- Η απλότητα και ο μικρός αριθμός των σταδίων προετοιμασίας του δείγματος.
- Η ταχύτητα της ανάλυσης. Ο χρόνος απόκρισης του ηλεκτροδίου είναι από μερικά δευτερόλεπτα έως λίγα λεπτά
- Η μεγάλη γραμμική απόκριση του ηλεκτροδίου. Πρακτικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για συγκεντρώσεις από 0.2 έως 1000 ppm NO_3^- .
- Απλά και φτηνά αντιδραστήρια.
- Εύκολη αντιμετώπιση των παρεμποδίσεων από διάφορα ιόντα που υπάρχουν σε νερά, φυτικούς ιστούς και εδάφη, όπως Cl^- , NO_2^- , HCO_3^- , οργανική ύλη, με προσθήκη κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων, τα οποία παίζουν παράλληλα το ρόλο του ρυθμιστή της ιονικής ισχύος (ISA).
- Η μέθοδος δεν επηρεάζεται από έγχρωμα ή θολά διαλύματα.
- Είναι μη καταστρεπτική μέθοδος ανάλυσης.
- Μικρό σχετικά κόστος των ηλεκτροδίων που κατασκευάζονται εύκολα, ενώ υπάρχει η δυνατότητα ελαχιστοποίησης του μεγέθους τους.
- Απλή και προσιτή σε κάθε εργαστήριο οργανολογία.
- Δυνατότητα αυτοματοποίησης για τη συνεχή παρακολούθηση δειγμάτων συνεχούς ροής σε βιομηχανικές και κλινικές εφαρμογές.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι :

- η μικρή αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων που δεν είναι καλύτερη από 1%. Απόκλιση 1 mV στη μέτρηση του δυναμικού ισοδυναμεί με 4% απόκλιση στον υπολογισμό της ενεργότητας των NO_3^- .
- Ο μικρός χρόνος ζωής και η ποιότητα των εμπορικά διαθέσιμων αισθητήρων.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η χρήση βελτιστοποιημένου αισθητήρα NO_3^- για την απλούστευση της διαδικασίας προσδιορισμού των NO_3^- σε φυτικούς ιστούς .

Ο στόχος αυτός είναι διαρκώς επίκαιρος, αφενός διότι η σημασία της παρουσίας των νιτρικών στους φυτικούς ιστούς σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του φυτού είναι μεγάλη και αφετέρου η γνώση της συγκέντρωσης των νιτρικών στα φυτά έχει ιδιαίτερη αξία για την υγεία των καταναλωτών.

Χωρίς δισταγμό θεωρούμε ότι ο προσδιορισμός των νιτρικών είναι η σημαντικότερη και η συχνότερη ανάλυση, από τις αναλύσεις που πραγματοποιούνται στα φυτά.

Η μέχρι τώρα συνήθης αναλυτική πρακτική περιελάμβανε την εκχύλιση του φυτικού ιστού σε μηχανικό αναδευτήρα για χρόνο κατά μέσο όρο 15 min, τη διήθηση ή φυγοκέντρωση και τη μέτρηση των νιτρικών στο εκχύλισμα.

Με την εργασία αυτή γίνεται άμεσος ποτενσιομετρικός προσδιορισμός των NO_3^- σε ξηρή φυτική ύλη.

Η εκχύλιση των νιτρικών της φυτικής ύλης γίνεται με ισχυρή ανάδευση, παρουσία ηλεκτροδίου νιτρικών στερεής επαφής (solid contact - ISE), το οποίο καταγράφει τη φθίνουσα τάση μέχρι να σημειωθεί η ελάχιστη τιμή της.

Η ελάχιστη αυτή τιμή δυναμικού, που σημειώνεται ανάλογα με τη περιεκτικότητα των νιτρικών σε χρόνο 3 – 10 min, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των NO_3^- . Σε κατάλληλο όργανο, είναι δυνατή η απευθείας ανάγνωση της συγκέντρωσης

Η μέθοδος που προτείνεται παρακάμπτει ουσιαστικά τα στάδια της εκχύλισης και διήθησης, μειώνοντας σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο, τα όργανα και την εργασία. Αύξηση μπορεί να σημειωθεί, στον χρόνο απόκρισης του ηλεκτροδίου, κατά την άμεση μέτρηση, λόγω ακριβώς της ταυτόχρονης εκχύλισης των νιτρικών.

2. ΤΑ ΝΙΤΡΙΚΑ ΙΟΝΤΑ

2.1 Τα νιτρικά ιόντα στο περιβάλλον. Ο κύκλος του N₂

Το άζωτο είναι τόσο για τα φυτά, όσο και για τον άνθρωπο ο πιο κοινός περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης

Πολλά συστατικά των ζωντανών κυττάρων περιέχουν άζωτο όπως πρωτεΐνες αμινοξέα, νουκλειικά οξέα, πουρίνες πυριμιδίνες, αλκαλοειδή, βιταμίνες κ.α.

Τα άτομα του αζώτου αυτών των ενώσεων προκύπτουν κύρια από τον **κύκλο του αζώτου** (Σχήμα 2.1), ο οποίος ξεκινά από τα αποθέματα του αζώτου της ατμόσφαιρας.

Το άζωτο αφαιρείται από την ατμόσφαιρα κυρίως με τη διαδικασία της **αζωτοδέσμευσης** και επιστρέφει στην ατμόσφαιρα με τη διαδικασία της **απονιτροποίησης**. Εκτιμάται ότι $25 * 10^6$ τόνοι αζώτου αφαιρούνται ετησίως από τα εδάφη των Η.Π.Α με την απονιτροποίηση και την έκπλυση των εδαφών και $3 * 10^6$ τον. αζώτου προστίθενται ετησίως, υπό μορφή λιπασμάτων (λιπάσματα, κοπριά, ούρα) για την αποκατάσταση της γονιμότητας. Επίσης ένα άλλο ισοδύναμο ποσό προστίθεται με τη βροχόπτωση με ενυδάτωση των οξειδίων του αζώτου που σχηματίζονται στην ατμόσφαιρα με τις ηλεκτρικές εκκενώσεις. Το πιο σημαντικό τμήμα $10 * 10^6$ τον. αζώτου επιστρέφει με βιολογική δέσμευση του αζώτου.

Το άζωτο, αν και απαρτίζει το 79% του ατμοσφαιρικού αέρα είναι θρεπτικό στοιχείο σε ανεπάρκεια για τις καλλιέργειες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μορφή του N₂ στην ατμόσφαιρα είναι αδρανής και άχρηστη για τους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς. Μόνο όταν το άζωτο ενωθεί με άλλα στοιχεία όπως οξυγόνο ή υδρογόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους οργανισμούς. Η δέσμευση του αζώτου σε χρήσιμες μορφές γίνεται :

- Στη φύση με την αζωτοδέσμευση (βιολογική δέσμευση) και τις ηλεκτρικές εκκενώσεις.
- Στη βιομηχανία με τη σύνθεση της αμμωνίας (μέθοδος Haber)

Στη φύση η αζωτοδέσμευση γίνεται από μερικά γένη βακτηρίων (και κυανοπράσινων φυκών). Τα ανώτερα φυτά δεν ανέπτυξαν την ικανότητα για αζωτοδέσμευση, αν και μερικά συμμετέχουν έμμεσα με συμβίωση με τα βακτήρια. Η πιο γνωστή περίπτωση είναι αυτή των ψυχανθών με τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*. Άλλα βακτήρια συμβιώνουν με άλλους ξενιστές και άλλα ζουν ελεύθερα στο έδαφος ή στο νερό. Ανάμεσα τους έχουμε αερόβια, αναερόβια αλλά και φωτοσυνθετικά βακτήρια.

Όλοι οι παραπάνω οργανισμοί δεσμεύουν το άζωτο δίνοντας αμμωνία σε φυσιολογικές συνθήκες 25 °C και πίεση 1 Atm. σύμφωνα με την αντίδραση :

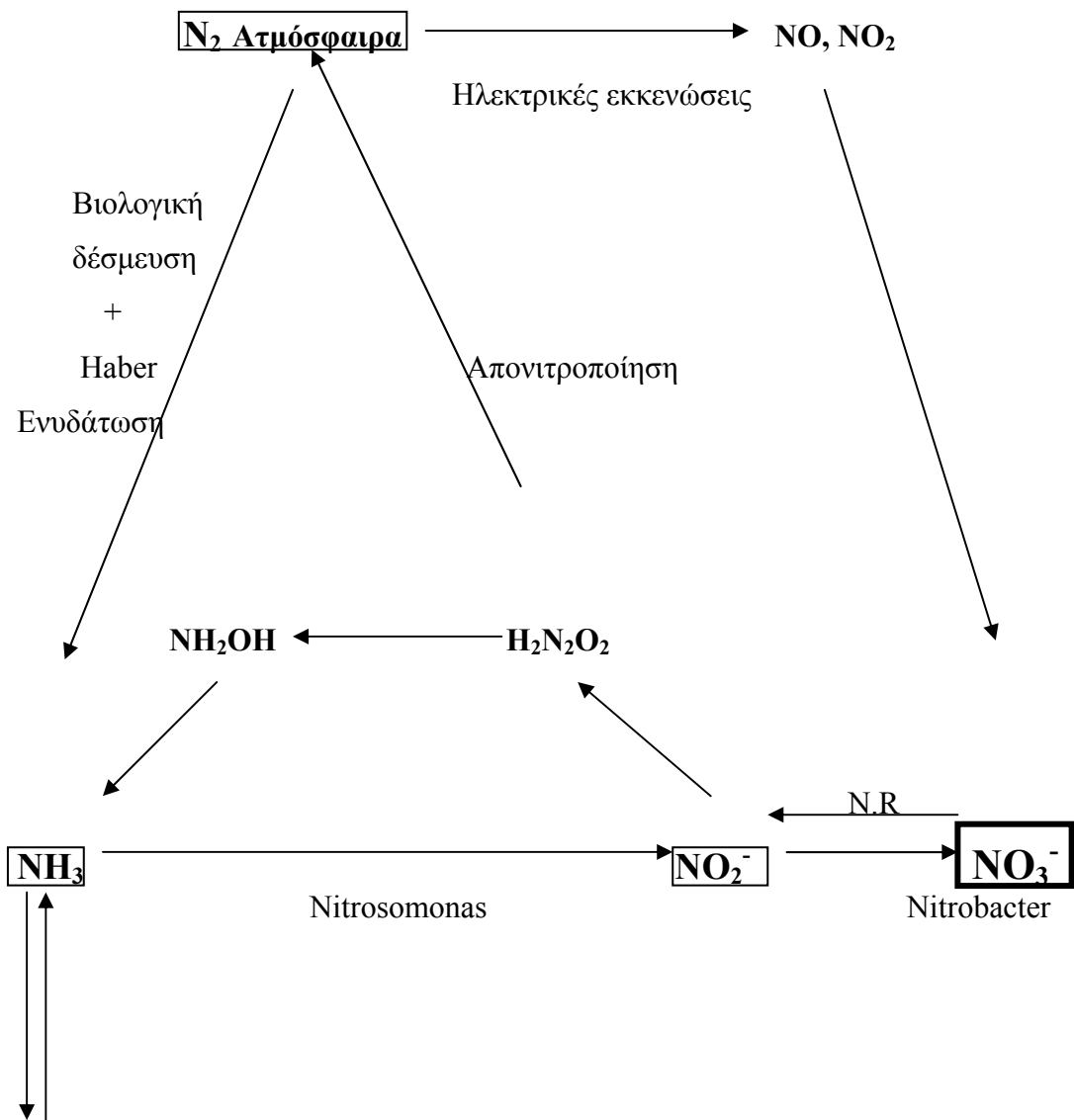


Η ενέργεια για την αντίδραση προέρχεται από την διάσπαση της γλυκόζης που δίνει ATP. Το ATP υδρολύεται κατά την διάρκεια της αναγωγής του N₂ και τα H⁺ που αποδεσμεύονται μετατρέπονται με καταλυτική δράση σε H₂.

Το βασικό ένζυμο της αζωτοδέσμευσης είναι η **νιτρογενάση**, το οποίο αποτελείται από δύο πρωτεϊνικά τμήματα : μία μολυβδαινο-σιδηροπρωτεΐνη (μολυβδοφερεδοξίνη) και μία σιδηροπρωτεΐνη (αζωφερεδοξίνη) . Πιστεύεται ότι η Fe – πρωτεΐνη δρα ως δεξαμενή ηλεκτρονίων, ενώ η MoFe – πρωτεΐνη είναι αυτή που συναρμόζεται με το N₂, πιθανώς μέσω του Mo.

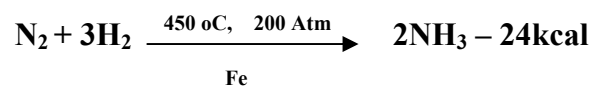
Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η αναγωγή του N₂ σε NH₃ γίνεται κατά στάδια, στα οποία σχηματίζονται ως ενδιάμεσα προϊόντα διμίνη (NH=NH) και υδραζίνη (NH₂NH₂).

ΚΥΚΛΟΣ ΑΖΩΤΟΥ



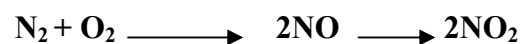
Σχήμα 2.1. Ο κύκλος του N₂

Βιομηχανικά το άζωτο δεσμεύεται προς αμμωνία, σύμφωνα με την αντίδραση Haber και στη συνέχεια μετατρέπεται σε νιτρικά :



Οι έντονες συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και ο καταλύτης δείχνουν πόσο σταθερό είναι το μόριο του N₂, το οποίο όμως διασπάται σε εντελώς ήπιες συνθήκες με τη δράση της νιτρογενάσης, στη βιολογική δέσμευση. Για το λόγο αυτό το ένζυμο της νιτρογενάσης έχει τύχει μεγάλης προσοχής και ευρείας μελέτης.

Τέλος, νιτρικά ιόντα σχηματίζονται στις ηλεκτρικές εκκενώσεις κατά τη διάρκεια καταιγίδων. Στις έντονες συνθήκες που δημιουργούνται σχηματίζονται οξειδία του αζώτου τα οποία ενυδατώνονται προς νιτρικά ιόντα.



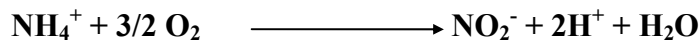
Παρόλο που οι παραπάνω διαδικασίες είναι σημαντικές στην οικονομία του αζώτου, το μέγιστο ποσό αζώτου δεσμεύεται με βιολογικό τρόπο.

Η μορφή των νιτρικών ιόντων NO₃⁻, είναι η πλέον οξειδωμένη μορφή του αζώτου με αρ.οξειδ. +5. Η διαδικασία οξείδωσης της NH₃, αλλά και άλλων μορφών σε νιτρικά ιόντα ονομάζεται νιτροποίηση.

2.2 Νιτροποίηση

Η νιτροποίηση είναι μία εξαιρετικά σημαντική διαδικασία στα νερά και στο έδαφος. Τα ιόντα NH_4^+ στα νερά και στο έδαφος μετατρέπονται ενζυματικά πρώτα σε νιτρώδη και μετά σε νιτρικά. Παρόλο που το άζωτο βρίσκεται στις βιολογικές ενώσεις κυρίως ως $-\text{NH}_2$, με αριθμό οξείδωσης -3 , στα υδατικά συστήματα και σε θερμοδυναμική ισορροπία με τον αέρα είναι κυρίως με βαθμό οξείδωσης $+5$, δηλ. κυρίως ως NO_3^- .

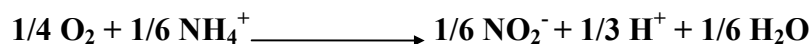
Η διαδικασία της νιτροποίησης αποτελείται από δύο διαδοχικά ενζυματικά στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η μετατροπή των αμμωνιακών ιόντων σε νιτρώδη, με το βακτήριο *Nitrosomonas*. Τα νιτρώδη που σχηματίζονται οξειδώνονται αμέσως ενζυματικά από μία δεύτερη ομάδα βακτηρίων που ονομάζεται *Nitrobacter*.



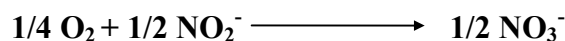
Και τα δύο είδη των ειδικά εξειδικευμένων ομάδων βακτηρίων είναι υποχρεωτικά αερόβια που σημαίνει ότι λειτουργούν μόνο παρουσία οξυγόνου και επίσης είναι αυτότροφα, δηλαδή μπορούν να χρησιμοποιήσουν διάφορα ανόργανα υλικά που μπορούν να οξειδωθούν, ως δότες ηλεκτρονίων, για τη παραγωγή της απαιτούμενης σε αυτά μεταβολικής ενέργειας. Στην περίπτωση μας ως δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται τα αμμωνιακά και νιτρώδη ιόντα.

Και τα δύο στάδια της νιτροποίησης απελευθερώνουν ένα σημαντικό ποσό ελεύθερης ενέργειας που είναι περίπου το ίδιο και για τα δύο στάδια.

Σε $\text{pH} = 7.00$ και σε αερόβιες συνθήκες η μετατροπή 1 electron - mole αμμωνιακού αζώτου σε νιτρώδη δίνει :

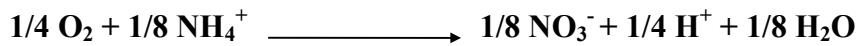


η δε μετατροπή των νιτρωδών σε νιτρικά δίνει ανά electron - mole :



Σε κανονικές συνθήκες η δεύτερη αντίδραση ακολουθεί την πρώτη, έτσι το αμμωνιακό άζωτο μετατρέπεται σε νιτρικά και αποφεύγεται η συσσώρευση των νιτρικών, τα οποία σε συγκεντρώσεις ακόμα και λίγων ppm, είναι εξαιρετικά τοξικά σε φυτά και ζώα.

Η συνολική αντίδραση της νιτροποίησης γραμμένη για ένα electron - mole ,



έχει σταθερά ισοροπίας $K=10^{7.59}$.

Από θερμοδυναμική λοιπόν άποψη η αντίδραση της νιτροποίησης είναι ιδιαίτερα ευνοϊκή.

Είναι αξιοσημείωτο ότι ανεξάρτητα από την πηγή των αμμωνιακών (αζωτοδέσμευση, λίπανση, λύματα κ.τ.λ) η νιτροποίηση προκαλεί μείωση του pH των νερών και εδαφών.

Στα επιφανειακά νερά τα φυτά συνεχώς προσλαμβάνουν άζωτο σε διάφορες μορφές , αλλά προτιμούν την μορφή της αμμωνίας, διότι με αυτή τη μορφή εισέρχεται άμεσα στους βιοσυνθετικούς κύκλους. Η μορφή των νιτρικών κοστίζει ενεργειακά διότι πρέπει πρώτα το φυτό να την αναγάγει σε αμμωνιακά ιόντα. Γενικά το φυτοπλαγκτόν προσλαμβάνει αμμωνία, έως ότου η συγκέντρωση της πέσει σε χαμηλά επίπεδα και μετά αρχίζει να χρησιμοποιεί τα νιτρικά.

Συνθήκες που επιδρούν στην νιτροποίηση

Τα βακτήρια της νιτροποίησης είναι πολύ πιο ευαίσθητα στις περιβαλλοντικές συνθήκες σε σύγκριση με τους ετερότροφους οργανισμούς που απελευθερώνουν το αμμώνιο από τις οργανικές αζωτούχες ενώσεις. Μερικές από τις συνθήκες που επιδρούν στη διαδικασία της νιτροποίησης είναι :

- **Συγκέντρωση των αμμωνιακών:** Νιτροποίηση θα συμβεί εάν υπάρχουν αμμωνιακά ιόντα. Παράγοντες όπως υψηλός λόγος C/N που εμποδίζει την απελευθέρωση των αμμωνιακών, εμποδίζει και τη νιτροποίηση. Υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας ή ουρίας είναι τοξικές για τα βακτήρια *Nitrobacter*. Χωρίς τα βακτήρια αυτά τα νιτρικά δεν οξειδώνονται σε νιτρικά, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται σε τοξικές συγκεντρώσεις στα νερά και στο έδαφος.

- **Αερισμός :** Όπως αναφέρθηκε τα βακτήρια της νιτροποίησης είναι υποχρεωτικά αερόβια, επομένως οι αερόβιες συνθήκες είναι απαραίτητες για την μετατροπή των αμμωνιακών σε νιτρικά.
- **η πηγή του άνθρακα :** Τα νιτροποιητικά βακτήρια είναι αυτότροφοι οργανισμοί και δεν χρειάζονται οργανική ύλη είτε σαν πηγή άνθρακα είτε σαν πηγή ενέργειας. Συνήθως χρησιμοποιούν CO₂ ή διττανθρακικά ιόντα σαν πηγή άνθρακα για τις μεταβολικές τους ανάγκες.
- **Θερμοκρασία :** Ιδανική θερμοκρασία για τη νιτροποίηση είναι 20 - 30°C. Η νιτροποίηση είναι πολύ αργή σε χαμηλές θερμοκρασίες και διακόπτεται κάτω από τους 5°C. Επίσης, σε υψηλές θερμοκρασίες πάνω από τους 35°C ο ρυθμός της επιβραδύνεται και διακόπτεται σε θερμοκρασίες πάνω από τους 50°C.

2.3 Απονιτροποίηση

Η απονιτροποίηση είναι η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και στη συνέχεια σε οξείδια του αζώτου και τελικά σε άζωτο κατά το σχήμα:

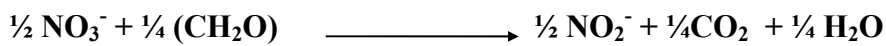


Απουσία οξυγόνου, τα νιτρικά χρησιμοποιούνται από διάφορους μικροοργανισμούς (βακτήρια) σαν ένας εναλλακτικός δέκτης ηλεκτρονίων. Τα βακτήρια (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*, και *Achromobacter*) αυτά είναι αναερόβια και ετερότροφα δηλαδή παίρνουν ενέργεια και άνθρακα από την οξείδωση των οργανικών ουσιών. Υπάρχουν και αυτότροφα βακτήρια (*Thiobacillus denitrificans*) που παίρνουν την απαραίτητη ενέργεια από την οξείδωση των θειούχων σε θειικά.

Το άζωτο είναι ένα βασικό συστατικό των πρωτεϊνών και κάθε οργανισμός που χρησιμοποιεί άζωτο από τα νιτρικά για τη σύνθεση των πρωτεϊνών πρέπει πρώτα να ανάγει το άζωτο των νιτρικών από τον αριθμό οξείδωσης +5 σε αριθμό οξείδωσης -3 της αμινομάδας (-NH₂). Η αναγωγή αυτή που είναι η πλήρης

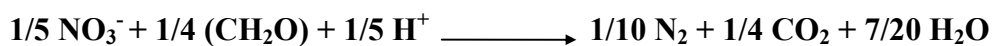
αναγωγή του αζώτου και απαιτεί 8 ηλεκτρόνια ανά άτομο αζώτου, είναι υποχρεωτική για τα φυτά, αλλά αντιπροσωπεύει μικρό μέρος του αζώτου που ανάγεται στη φύση μικροβιακά.

Γενικά το νιτρικό άζωτο ανάγεται σε νιτρώδη, λειτουργώντας σαν δέκτης ηλεκτρονίων, κατά την εξίσωση :



Το νιτρικό ιόν είναι ένας καλός αποδέκτης ηλεκτρονίων απουσία οξυγόνου, παρόλο που στη παραπάνω αντίδραση η απόδοση ελευθέρης ενέργειας ανά electron - mole είναι μόνο τα 2/3 της απόδοσης, εάν ήταν οξυγόνο το οξειδωτικό. Στα νερά, η έκταση αυτής της δράσης είναι μειωμένη λόγω της μικρής συγκέντρωσης των νιτρικών, επιπλέον η δράση των νιτρωδών είναι τοξική και εμποδίζει την ανάπτυξη πολλών βακτηρίων. Η προσθήκη νιτρικού νατρίου σε λιμνοδεξαμενές επεξεργασίας λυμάτων είναι απαραίτητη, όταν έχουν δημιουργηθεί αναερόβιες συνθήκες διότι το νιτρικό ιόν αποτελεί μία εφεδρική πηγή οξυγόνου και αποκαθιστά τη κανονική ανάπτυξη των βακτηρίων.

Μιά άλλη ειδική περίπτωση αναγωγής των νιτρικών είναι αυτή που οδηγεί στο σχηματισμό αερίου αζώτου. Σε pH=7.00 η απόδοση ελευθέρης ενέργειας ανά electron - mole της αντίδρασης :



είναι - 2.84 kcal και είναι μικρότερη από την απόδοση της μετατροπής των νιτρικών σε νιτρώδη.

Επίσης είναι συνηθισμένη η αναγωγή των νιτρικών σε αέριο N₂O. Το N₂O είναι ένα σχετικά αδρανές αέριο που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τα φυτά. Η βιοχημεία του σχηματισμού του δεν έχει ακόμα ερμηνευθεί αλλά φαίνεται ότι προκύπτει από πλευρικές δράσεις κατά την απονιτροποίηση. Σαν αέριο το N₂O συνήθως απελευθερώνεται από τα νερά προς την ατμόσφαιρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν αποδείξεις ότι το N₂O σχηματίζεται και κατά την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά στα επιφανειακά νερά των ωκεανών. Το υποξείδιο του αζώτου, όπως και τα άλλα οξείδια του έχουν σημαντική συμβολή

στην ατμοσφαιρική ρύπανση. Να σημειώσουμε ότι η αναλογία του στον αέρα είναι περίπου 0.31 ppm και σύμφωνα με μελέτες, ο ρυθμός αύξησης του είναι 0.25% κάθε χρόνο.

Στο έδαφος η απονιτροποίηση συμβαίνει κάτω από τις παρακάτω συνθήκες:

- πρέπει να υπάρχει έτοιμη οργανική ύλη για να αποικοδομηθεί.
- ο αέρας του εδάφους πρέπει να περιέχει λιγότερο από 10% οξυγόνο ή λιγότερο από 0.2 mg/l O₂ στο υδατικό διάλυμα.
- θερμοκρασία από 2 έως 50°C, με ευνοϊκότερη τη θερμοκρασία 25 - 35°C
- πολύ όξινα εδάφη (pH<5) παρεμποδίζουν τη γρήγορη απονιτροποίηση και δημιουργούν συνθήκες όπου το κυρίαρχο προϊόν της αναγωγής των νιτρικών να είναι το N₂O.

Γενικά στο έδαφος όταν τα επίπεδα του οξυγόνου είναι πολύ χαμηλά, το τελικό προϊόν της απονιτροποίησης είναι τα αέριο άζωτο(N₂). Αξίζει όμως να σημειωθεί, ότι κάτω από τις μεταβαλλόμενες συνθήκες αερισμού του εδάφους δημιουργούνται επίσης τα αέρια οξείδια του αζώτου N₂O και NO. Η αναλογία ανάμεσα στα διάφορα αέρια προϊόντα της απονιτροποίησης εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, τη έλλειψη του οξυγόνου και τη συγκέντρωση των νιτρικών και νιτρωδών. Για παράδειγμα η παραγωγή του N₂O ευνοείται όταν η συγκέντρωση των νιτρικών και νιτρωδών είναι υψηλή και η συγκέντρωση του οξυγόνου δεν είναι τόσο χαμηλή. Σε πολύ όξινες συνθήκες σχεδόν ολοκληρωτικά σχηματίζεται N₂O . Το NO βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα και κυρίως σε όξινες συνθήκες.

2.4 Τα νιτρικά ιόντα στα φυτά.

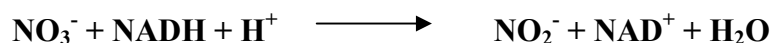
Η συγκέντρωση των νιτρικών στους φυτικούς ιστούς είναι ένα φυσιολογικό φαινόμενο που συνδέεται με τον μεταβολισμό του αζώτου στα φυτά.

Τα φυτά μπορούν να απορροφήσουν το άζωτο με τη μορφή των νιτρικών NO_3^- και αμμωνιακών NH_4^+ ιόντων. Ενώ όμως η αμμωνιακή μορφή δεν είναι συγκεντρώσιμη γιατί είναι τοξική στα φυτά, αντίθετα η νιτρική μορφή συγκεντρώνεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων επιτελώντας τρεις φυσιολογικές λειτουργίες :

- αντισταθμίζει τα θετικά φορτία των ιόντων νατρίου, ασβεστίου, καλίου, μαγνησίου.
- ασκεί ωσμορυθμιστική δράση.
- αποτελεί την απόθετη - αποθησαυριστική μορφή του αζώτου, για το φυτό.

Ενώ τα αμμωνιακά ιόντα που απορροφούνται από τα φυτά χρησιμοποιούνται άμεσα για τη σύνθεση των απαραίτητων αμινοξέων και άλλων αζωτούχων ουσιών, τα νιτρικά ιόντα πρέπει πρώτα να αναχθούν σε αμμωνιακά.

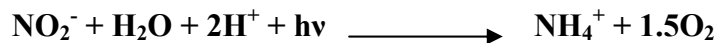
Το πρώτο στάδιο της αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη καταλύεται από το ένζυμο **νιτρική αναγωγάση (nitrate reductase N.R)** η οποία μεταφέρει δύο ηλεκτρόνια από το NADH ή NADPH στο N των νιτρικών ιόντων, κατά το σχήμα :



Το ένζυμο αυτό που επιτελεί μια απλή αναγωγή είναι ένα μεγάλο και σύνθετο ένζυμο. Περιέχει FAD, ένα κυτόχρωμα και μολυβδένιο (Mo).

Ιδιαίτερο βάρος έχει δοθεί στη σημασία της δράσης του ενζύμου, καθότι απο αυτό εξαρτάται η σύνθεση των πρωτεϊνών αλλά και η συσσώρευση των νιτρικών στα φυτά.

Στο δεύτερο στάδιο της αναγωγής τα νιτρώδη ανάγονται σε αμμωνιακά με το ένζυμο νιτρώδη αναγωγάση (nitrite reductase) και τη βοήθεια της φερεδοξίνης (Fd) και του φωτός, σύμφωνα με την αντίδραση:



Το ποσοστό των νιτρικών που δεν ανάγεται από τα ένζυμα μπορεί να συγκεντρωθεί στα κύτταρα αποτελώντας εφεδρική πηγή αζώτου για το φυτό, χωρίς να προκαλεί καμιά βλάβη. Το ποσοστό μάλιστα αυτό στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυτών αποτελεί δείκτη της υγιεινής κατάστασης αλλά και της τελικής αποτελεσματικότητας της καλλιέργειας

Παράγοντες που επιδρούν στη συγκέντρωση των νιτρικών στα φυτά

Η συσσώρευση των νιτρικών στα φυτά με τη προϋπόθεση ότι τα νιτρικά αποτελούν τη κύρια μορφή του απορροφούμενου αζώτου, εξαρτάται από το βαθμό απορρόφησης τους και την ενεργότητα του ενζύμου της νιτρικής ρεδοκτάσης (Maynard and Barker, 1979)

Η βοτανική κατάταξη του φυτικού είδους, το κληρονομικό δυναμικό της ποικιλίας, το όργανο και η θέση του ιστού, η ηλικία του φυτού, η ενεργότητα της νιτρικής ρεδοκτάσης είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που επιδρούν στη συσσώρευση των νιτρικών στα φυτά (Corre and Breimer, 1979, Darwinkel, 1975). Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, που έχουν σχέση με την ανάπτυξη του φυτού όπως : θερμοκρασία , φως, υγρασία, το CO₂ , η αζωτούχος λίπανση, οι αναστολείς της νιτροποίησης, η περιεκτικότητα του εδάφους σε νιτρικά, παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο, στην συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων.

Γενικά για τα διάφορα φυτικά είδη υπάρχει διαφοροποίηση στη συγκέντρωση των νιτρικών, η οποία δεν είναι απόλυτη διότι επηρεάζεται πολύ και από τους

υπόλοιπους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Μια τέτοια γενική κατάταξη είναι η παρακάτω :

Σπανάκι, παντζάρια, σέλινο > πράσα, ραδίκια, μαιντανός > μαρούλι, λάχανο, κολοκύθια > αγγούρια, κουνουπίδια, πεπόνια > πατάτες, ντομάτες, φασόλια.

Όσον αφορά την κατανομή στα επί μέρους όργανα του φυτού, αυτή γενικά ακολουθεί της εξής σειρά :

Μίσχος > Ελασμα > Σπόρος > Καρπός > Ανθος (Maynard and Barker, 1979)

Η φάση της ανάπτυξης, κυρίως λίγο πριν την άνθηση είναι η εποχή της μεγαλύτερης συσσώρευσης, ενώ η ωρίμανση συνοδεύεται με μείωση. Συστηματικές μεταβολές παρατηρούνται ακόμα και κατά τη διάρκεια της ημέρας. Μέγιστα έχουμε από τις 4 –8 το πρωί και ελάχιστα στις 4 το απόγευμα.

Οι κλιματικοί παράγοντες επηρεάζουν την συγκέντρωση των NO_3^- μακροπρόθεσμα αλλά και βραχυπρόθεσμα. Έτσι, δεν είναι περίεργο που τα επιτρεπτά όρια ορίζονται συχνά με βάση την εποχή του έτους (π.χ. καλοκαίρι, χειμώνας).

Μείωση της έντασης του φωτός συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών διότι το ένζυμο νιτρική αναγωγάση χάνει την αναγωγική του ικανότητα στο σκοτάδι. Ανάλογα με την επίδραση του φωτός ισχύουν και για τη θερμοκρασία. Δηλαδή πτώση της θερμοκρασίας προκαλεί μείωση της αναγωγικής δράσης του ενζύμου και επομένως αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών.

Ο σημαντικότερος όμως παράγοντας που προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών είναι η χρησιμοποίηση των αζωτούχων λιπασμάτων .

Ανεξάρτητα από το είδος της αζωτούχου λίπανσης λόγω της ανοργανοποίησης και νιτροποίησης έχουμε αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών, στα φυτά. Από τα αζωτούχα λιπάσματα ουρία, KNO_3 και NH_4NO_3 , το KNO_3 προκαλεί τη μεγαλύτερη αύξηση νιτρικών. Γενικά , τα αμμωνιακά λιπάσματα και οι αναστολείς της νιτροποίησης χρησιμοποιούνται πρακτικά για τον έλεγχο της συγκέντρωσης νιτρικών στα φυτά.

2.5 Τα νιτρικά στον άνθρωπο.

Τα τελευταία 20 χρόνια το πρόβλημα της συσσώρευσης των νιτρικών σε νερά και τρόφιμα ιδίως λαχανικά, μετατράπηκε από ένα δευτερεύον – τοπικό πρόβλημα, σε πρόβλημα με διεθνείς διαστάσεις. Η εκτεταμένη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων στις καλλιέργειες οδηγεί συχνά σε υπερβολική συσσώρευση σε πολλά είδη λαχανικών, σε εκτεταμένη ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων νερών και τελικά σε μια διαρκώς μεγαλύτερη προσλαμβανόμενη ποσότητα από τον ίδιο τον άνθρωπο.

Μελέτες δείχνουν ότι η μεγαλύτερη ποσότητα νιτρικών που προσλαμβάνει ο άνθρωπος προέρχεται από τα λαχανικά, των οποίων η κατανάλωση διαρκώς αυξάνει, για λόγους διαίτης. Η επόμενη σε σημασία πηγή νιτρικών είναι το πόσιμο νερό και τέλος τα διάφορα προϊόντα του κρέατος, όπου τα νιτρικά χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά . Στον επόμενο πίνακα 2.1, παρουσιάζεται η μέση ημερήσια πρόσληψη νιτρικών ανά πηγή και ανά κάτοικο στις Η.Π.Α.

Πίνακας 2.1

Μέση ημερήσια πρόσληψη νιτρικών, ανά κάτοικο στις Η.Π.Α

| Πηγή Νιτρικών | Ημερήσια προσλαμβανόμενη ποσότητα NO_3^- | |
|-------------------|---|------|
| | mg | % |
| Λαχανικά | 86,1 | 81,2 |
| Φρούτα | 1,4 | 1,3 |
| Προϊόντα γάλακτος | 0,2 | 0,2 |
| Ψωμί | 2,0 | 1,9 |
| Νερό | 0,7 | 0,7 |
| Κρέας | 15,6 | 14,7 |

| | | |
|---------------|--------------|--------------|
| Σύνολο | 106,0 | 100,0 |
|---------------|--------------|--------------|

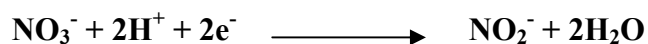
Η μεθαιμοσφαιρίνη

Τα νιτρικά ιόντα χαρακτηρίζονται από χαμηλή βιολογική ενεργότητα και πολύ χαμηλή τοξικότητα – θανατηφόρος δόση 66 – 300 mg/kg – (Corre and Breimer, 1979). Η κύρια τοξική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό οφείλεται στην αναγωγή τους σε νιτρώδη, τα οποία οξειδώνουν τον Fe(+2) της αιμοσφαιρίνης, σε Fe(+3). Η ένωση που προκύπτει ονομάζεται μεθαιμοσφαιρίνη και διαθέτει μειωμένη ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς.

Χαμηλά επίπεδα μεθαιμοσφαιρίνης, της τάξης 0.5 – 2.0% υπάρχουν σε φυσιολογικά άτομα (NAS, 1981). Εντούτοις, λόγω της μεγάλης ικανότητας του αίματος στη μεταφορά οξυγόνου, η μεθαιμοσφαιρίνη μέχρι και σε ποσοστό 10% δεν προκαλεί κανένα κλινικό σύμπτωμα (ECETOC, 1988). Συγκεντρώσεις πάνω από 10% προκαλούν συνήθως μπλε απόχρωση (κυάνωση) στο δέρμα και στα χείλη (λόγω του χρώματος της μεθαιμοσφαιρίνης) ενώ τιμές πάνω από 25%

οδηγούν σε αδυναμία, ταχυκαρδία και ταχύπνια. Θάνατος μπορεί να προκύψει για συγκεντρώσεις που ξεπερνούν το 50 –60%.

Η μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη γίνεται κυρίως στο γαστροεντερικό σύστημα με τη βοήθεια ορισμένου τύπου βακτηρίων (*E.coli*, *clostridium*):



Ο κίνδυνος λοιπόν από τα νιτρικά δεν εξαρτάται μόνο από τη προσλαμβανόμενη ποσότητα, αλλά και από τη ποσότητα και το είδος των εντερικών βακτηρίων.

Στο στομάχι συμβαίνει επίσης αναγωγή νιτρικών εφόσον το pH είναι μεγαλύτερο από 5 για να επιτρέψει την ανάπτυξη βακτηρίων (αχλωριδρία, ατροφική γαστρίτιδα) . Οι προϋποθέσεις για ανάπτυξη βακτηρίων είναι ιδιαίτερα ευνοϊκές στα βρέφη, κυρίως σε ηλικία κάτω των 3 μηνών και σε διάφορα μυρηκαστικά ζώα. Τα δεδομένα δείχνουν επίσης ότι, από τη ποσότητα των

νιτρικών που προσλαμβάνουμε 5% ανάγεται από τα βακτήρια, στο στόμα (NAS,1981).

Οι νιτροζαμίνες

Ο βασικός φόβος, από τα μάλλον ακίνδυνα νιτρικά, προέρχεται από τις νιτροζαμίνες, προϊόντα αντίδρασης των νιτρωδών με δευτεροταγείς αμίνες.

Οι νιτροζαμίνες προσλαμβάνονται με τις τροφές, τον καπνό του τσιγάρου, τα ορεκτικά, και θεωρούνται καρκινογόνες ή μεταλλαξιογόνες ενώσεις.

Ο σχηματισμός όμως των επικίνδυνων αυτών ουσιών, στον άνθρωπο από τα νιτρικά δεν έχει αποδειχθεί, ούτε και η πρόκληση καρκίνου του στομάχου έχει αποδειχθεί ότι έχει σχέση με τη πρόσληψη νιτρικών. Μάλιστα σε χώρες με υψηλή κατανάλωση νιτρικών (Δανία, Ολλανδία), ο καρκίνος του στομάχου έχει υποχωρήσει τις τελευταίες δεκαετίες. Το ζήτημα είναι περίπλοκο, διότι πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η κατανάλωση νωπών λαχανικών σε μεγάλες ποσότητες δεν προσπορίζει μόνο νιτρικά στον οργανισμό, αλλά και μεγάλες ποσότητες της αντιοξειδωτικής βιταμίνης C, η οποία μπορεί να παρέχει προστασία κατά του καρκίνου του στομάχου.

2.6. Τα επιτρεπτά όρια νιτρικών.

Η διαρκώς αυξανόμενη πρόσληψη νιτρικών ιόντων διαμέσου της τροφής και του νερού κυρίως, έχουν επιβάλλει από καιρού την ανάγκη για τη θέσπιση ανώτερων ορίων για την συνολική πρόσληψη νιτρικών, αλλά και ανώτερων ορίων στο πόσιμο νερό και στα λαχανικά που συνιστούν την κύρια πηγή νιτρικών στη διατροφή.

Για τη συνολική ποσότητα νιτρικών που προσλαμβάνονται καθημερινά, η Ευρωπαϊκή Ένωση δια της αρμόδιας επιτροπής τροφίμων, (Commission of the European Communities Scientific Committee for Food ,1995. Opinion on Nitrate and Nitrite, expressed on 22 September. Annex 4 to Document III/5611/95.) εισηγήθηκε το 1995, ως Επιτρεπτή Ημερήσια Δόση (Acceptable Daily Intake) (ADI) :

$$ADI = 3.65 \text{ mg NO}_3^- / \text{kg σωματικού βάρους}$$

Η αντίστοιχη ποσότητα για τις Η.Π.Α είναι :

$$ADI = 3.2 \text{ mg NO}_3^- / \text{kg σωματικού βάρους}$$

Τα όρια που έχουν προταθεί για πολλά είδη λαχανικών με την οδηγία της Ε.Ε. (VI / 3080 / 93 Rev.7) παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 2.2. Η κατώτερη τιμή του ορίου αναφέρεται σε συγκομιδή το καλοκαίρι (Απρίλιος – Οκτώβριος) και η μεγαλύτερη αφορά συγκομιδή το χειμώνα (Νοέμβριος- Μάρτιος). Οι τιμές εκφράζουν τα $\text{mg NO}_3^- / \text{kg}$ νωπής φυτικής ύλης ($\text{ppm NO}_3^- \text{ F.W}$).

Στα νερά, η συγκέντρωση των νιτρικών παρουσιάζει σταθερή αύξηση τα τελευταία χρόνια, γεγονός που συνδέεται άμεσα με την αυξημένη ή και αλόγιστη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων.

Η συμμετοχή του πόσιμου νερού, στην ημερήσια προσλαμβανόμενη ποσότητα νιτρικών είναι φυσιολογικά μικρή (περίπου 2-3% της συνολικής) (NAS 1981). Αν όμως το πόσιμο νερό περιέχει νιτρικά που ξεπερνούν τα ανώτερα όρια (45 – 50 ppm), τότε και με τη συμμετοχή της μύρας το ποσοστό συμμετοχής μπορεί να φτάσει το 20%, ημερησίως.

Πίνακας 2.2

Ανώτερα όρια νιτρικών ιόντων σε λαχανικά κατά την οδηγία
VI / 3080 / 93 Rev.7 της Ε.Ενωσης

| Είδος | Ανώτερα Όρια (mg NO ₃ ⁻ / kg F.W) |
|-----------------|--|
| Μαρούλι | 2500 - 4500 |
| Σπανάκι | 2500 - 3000 |
| Καλαμπόκι | 2500 - 3500 |
| Πατζάρι | 3500 - 4500 |
| Λάχανο | 1500 |
| Καρότο | 1500 |
| Παιδικές τροφές | 250 |

Επιδημιολογικές και διαιτολογικές μελέτες πολλών ετών, σε Ευρώπη και Αμερική, οδήγησαν στα παρακάτω ανώτερα επιτρεπτά όρια για το πόσιμο νερό
Ευρωπαϊκή Ένωση : 50 ppm NO₃⁻ (οδηγία 80/78/ΕΟΚ, 15/7/1980)

Αμερική : 45 ppm NO₃⁻ (U.S. EPA. 1990. Criteria Document for Nitrate/Nitrite. Office of Drinking Water, Washington, DC.)

Η τεχνική η οποία προτείνεται για την απομάκρυνση των νιτρικών από το πόσιμο νερό σε περιπτώσεις που έχουμε υπέρβαση των ορίων είναι η ιοντοανταλλαγή και η αντίστροφη ώσμωση.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΙΤΡΙΚΩΝ

Όπως αναφέρεται στην 14η έκδοση των Standard Methods of Water and Wastewaters Analysis, η ανάλυση των νιτρικών είναι μία από τις δύσκολες αναλύσεις για τους εξής λόγους : α) εξαιτίας της σχετικά περίπλοκης διαδικασίας που χρησιμοποιείται β) της μεγάλης πιθανότητας να συνυπάρχουν συστατικά που παρεμποδίζουν και γ) επειδή οι διάφορες μέθοδοι έχουν μικρό γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων.

Η ανάλυση των φυτικών ιστών, που είναι και το αντικείμενο αυτής της εργασίας, είναι ιδιαίτερα προβληματική λόγω του μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων που μπορεί να συναντήσει κανείς σε ένα συγκεκριμένο είδος και λόγω του ευμετάβλητου της συγκέντρωσης από τη δράση του ενζύμου της νιτρικής αναγωγής.

Στην γενική παρουσίαση των κυριότερων μεθόδων που ακολουθεί δίνεται έμφαση στα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που παρουσιάζει η κάθε μία και η δυνατότητα εφαρμογής της, στην ανάλυση φυτικών ιστών.

3.1 Μέθοδος αναγωγής με Cd. (Keeny and Nelson, 1982)

Στο εκχυλισμένο και φιλτραρισμένο δείγμα νιτρικών, προστίθεται NH_4Cl και μετά διέρχεται μέσα από μια ειδικά παρασκευασμένη στήλη που περιέχει κράμα του Cd με Cu. Κατά τη διέλευση τους τα NO_3^- ανάγονται ποσοτικά σε NO_2^- . Τα NO_2^- που παράγονται υφίστανται διαζώτωση με σουλφανιλαμίδιο και σύζευξη με N- (1-ναφθυλο) – αιθυλενοδιαμίνη. Το μωβ χρώμα που προκύπτει μετράται στα 540 nm. Η ποσότητα των NO_3^- υπολογίζεται μετά την αφαίρεση της ποσότητας των ενδογενών NO_2^- .

Η μέθοδος εφαρμόζεται σε συγκεντρώσεις νιτρικών από 0.05 έως 5 mg NO₃⁻/lt. Η μέθοδος συνιστάται ειδικά για επίπεδα νιτρικών μικρότερα των 0.5 mg NO₃⁻/lt, όπου άλλες μέθοδοι στερούνται ικανοποιητικής ευαισθησίας .

Οι παρεμποδίσσεις από τα συνηθισμένα ιόντα είναι αμελητέες. Το υπολειμματικό χλώριο, ο Fe, Cu , τα αιωρούμενα σωματίδια και οι λιπαρές ουσίες, μπορούν να πρακαλέσουν μείωση της αναγωγικής ικανότητας της στήλης του Cd.

Η μέθοδος έχει πλήρως αυτοματοποιηθεί για συγκεντρώσεις από 2-45 ppm NO₃⁻ με ταχύτητα 20 – 120 δείγματα ανά ώρα.

Χρησιμοποιείται σε αναλύσεις νιτρικών κυρίως σε νερά και εδάφη.

3.2. Μέθοδος φαινυλοδισουλφονικού οξέος. (Bremner J.M., 1965)

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε περισσότερο από κάθε άλλη στις αναλύσεις φυτικών δειγμάτων. Θεωρείται ευαίσθητη μέθοδος και χρησιμοποιείται συχνά, σαν μέθοδος αναφοράς κυρίως στις αναλύσεις φυτικών δειγμάτων. Είναι μάλλον περίπλοκη με πολλά στάδια και πολλά αντιδραστήρια. Τα τελευταία χρόνια έχει εγκαταλειφθεί και αντικατασταθεί από τη μέθοδο των ηλεκτροδίων , την ιοντική χρωματογραφία ή την αναγωγή σε στήλη Cd.

Το φαινυλοδισουλφονικό οξύ – προϊόν αντίδρασης της φαινόλης με πυκνό θειικό οξύ – αντιδρά με τα νιτρικά ιόντα και το προϊόν της αντίδρασης, σε αλκαλικό περιβάλλον έχει κίτρινο σταθερό χρώμα που μετράται στα 440 nm.

Σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η έντονη παρεμβολή από τα ιόντα χλωρίου και την οργανική ύλη των δειγμάτων, όπως επίσης και από τις εκχυλιζόμενες χρωστικές των φυτικών ιστών και τα νιτρώδη.

3.3 Μέθοδος χρωμοτροπικού οξέος (West and Lyles, 1960)

1 mole χρωμοτροπικού οξέος (4,5-dihydroxy-2,7-naphthalene disulfonic acid) αντιδρά με 2 moles NO₃⁻ και δίνει προϊόν κίτρινου χρώματος, με μέγιστο απορρόφησης τα 410 nm. Το έγχρωμο προϊόν αναπτύσσει το μέγιστο σε 10 min και είναι σταθερό για 24 ώρες.

Πρόβλημα για τη μέθοδο είναι η μεγάλη θερμοκρασία που αναπτύσσεται κατά την αντίδραση, γιαυτό χρειάζεται ψύξη.

Η μέθοδος συνιστάται για συγκεντρώσεις από 0.5 μέχρι 20 ppm NO_3^- με όριο ανίχνευσης τα : 220 $\mu\text{g NO}_3^- /\text{lt}$

Τα ιόντα του Fe (III), Cr(III) αναπτύσσουν επίσης κίτρινο χρωματισμό, αλλά η παρουσία τους είναι αμελητέα στα περισσότερα δείγματα. Διάφορα οξειδωτικά όπως το χλώριο αναπτύσσουν επίσης κίτρινο χρωματισμό, γιαυτό πρέπει να εξουδετερώνονται με θειώδη άλατα πριν την ανάλυση.

3.4 Μέθοδος σαλικυλικού οξέος. (Cataldo D.A., et al, 1975)

Το σύμπλοκο που προκύπτει από τη επίδραση των NO_3^- επί του σαλικυλικού οξέος σε ισχυρά όξινο περιβάλλον απορροφά στα 410 nm σε βασικά ($\text{pH}>12$) διαλύματα. Η απορρόφηση της χρωμοφόρου ουσίας είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των NO_3^- .

Τα NO_2^- και NH_4^+ δεν παρεμποδίζουν καθόλου, τα δε Cl^- μόνο σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 2% στο φυτικό ιστό.

Πρόβλημα της μεθόδου είναι η επίδραση των εκχυλιζόμενων χρωστικών, από τους φυτικούς ιστούς και συγκρινόμενη με άλλες μεθόδους είναι σχετικά χρονοβόρα στην ανάπτυξη του χρώματος.

Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση νερών, εδάφους και φυτικών ιστών.

3.5 Μέθοδος αναγωγής με κράμα Devarda. (Cottenie A. 1982)

Με τη μέθοδο αυτή τα NO_3^- και τα NO_2^- ανάγονται σε NH_3 , σε αλκαλικό περιβάλλον εν θερμώ με τη βοήθεια του κράματος Devarda (50% Cu, 45% Al και 5%Zn).

Η αναγωγή γίνεται σε αποστακτική συσκευή kjeldahl και η NH_3 που παράγεται αποστάζει και συλλέγεται σε φιάλη που περιέχει σε περίσσεια πρότυπο διάλυμα βορικού οξέος. Η NH_3 προσδιορίζεται συνήθως ογκομετρικά στο διάλυμα του βορικού οξέος.

Επειδή τόσο η NH_3 όσο και τα NO_2^- , που υπάρχουν στο δείγμα προσδιορίζονται ταυτόχρονα, πρέπει να έχει προηγηθεί ο προσδιορισμός τους και να αφαιρούνται από την τελική μέτρηση.

Το όριο προσδιορισμού των νιτρικών με τη μέθοδο είναι τα 2 ppm.

Πρόβλημα παρεμβολών δημιουργείται από δείγματα πλούσια σε αζωτούχες ενώσεις.

3.6 Μέθοδος της βρυκίνης.

Η βρυκίνη – μία φυσική ένωση συναρμογής – αντιδρά με τα NO_3^- παρουσία H_2SO_4 σε υψηλή θερμοκρασία και δίνει κίτρινο χρώμα, το οποίο μετράται στα 410 nm.

Σοβαρό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η ανάπτυξη του χρώματος που εξαρτάται στενά από τη θερμοκρασία και το χρόνο. Έτσι οι δύο αυτοί παράγοντες πρέπει να ελέγχονται αυστηρά κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Άλλο μειονέκτημα είναι ότι η ανάπτυξη του χρώματος υπακούει στο νόμο του Beer, μόνο σε μικρές συγκεντρώσεις. Για να ξεπεραστεί αυτό, τα δείγματα αραιώνονται ώστε η συγκέντρωση των NO_3^- να βρίσκεται στην περιοχή 0.5 – 5 mg/l.

3.7 Μέθοδος υπεριώδους φασματοφωτομετρίας (Babko A.K., et al 1974)

Η μέτρηση της απορρόφησης στα 220nm, επιτρέπει τον γρήγορο προσδιορισμό των NO_3^- . Ο νόμος του Beer εφαρμόζεται για συγκεντρώσεις NO_3^- μέχρι 50 mg/l.

Σοβαρό πρόβλημα της μεθόδου είναι η παρεμπόδιση από την παρουσία οργανικής ουσίας, η οποία απορροφά επίσης στα 220nm. Εντός ορισμένων ορίων μπορεί να γίνει διόρθωση με μέτρηση της απορρόφησης και στα 275nm, όπου απορροφά μόνο η οργανική ύλη.

Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για νερά ή λύματα με περιορισμένη περιεκτικότητα σε οργανική ουσία.

3.8 Μέθοδος ιοντικής χρωματογραφίας.

Η μέθοδος δίνει πολύ καλά αποτελέσματα, αλλά απαιτεί ακριβή οργανολογία. Στηρίζεται στο διαχωρισμό ανιόντων με έκλυση μέσα από στήλη πακεταρισμένη με λεπτόκοκκη ανιοανταλλακτική ρητίνη. Η κατάλληλη επιλογή της στήλης και των συνθηκών επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό και άλλων ανιόντων (Br^- , F^- , NO_2^- , $\text{SO}_4^{=}$, PO_4^{3-}) που υπάρχουν στο υδατικό εκχύλισμα. Με ρύθμιση των παραμέτρων λειτουργίας του οργάνου, αλλά και του όγκου του δείγματος, επιτυγχάνεται η γραμμική απόκριση στη συγκέντρωση των NO_3^- και περιορισμό της παρεμπόδισης από άλλα ανταγωνιστικά ιόντα όπως π.χ. $\text{SO}_4^{=}$.

Ανάλογα με το είδος του δείγματος γίνεται προετοιμασία με ιοντοανταλλαγή ή προσθήκη ενεργού άνθρακα, ώστε να απαλλαγεί από κατιόντα που παρεμποδίζουν ή διαλυτή οργανική ύλη που μειώνει την ευαισθησία της στήλης.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε από τους Hunt and Seymour, 1985, για φυτικούς ιστούς. Η μέθοδος περιλαμβάνει τα εξής :

Στήλη : Chrompack Ionosphere 5A

Κινητή φάση : KH_2PO_4 , 0.045M ρυθμισμένο σε pH=3 με H_3PO_4 .

Ταχύτητα έκλυσης : 1.5 ml/min

Ανιχνευτής : UV στα 210 nm

Χρόνος κατακράτησης : περίπου 6 min

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, είναι 3 mg/lit NO_3^-

3.9 Μέθοδος επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων (ποτενσιομετρική μέθοδος).

Η μέθοδος συγκαταλέγεται ανάμεσα στις επίσημες μεθόδους (Standard Methods) για τον προσδιορισμό των νιτρικών ιόντων και αναπτύσσεται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο. Συνοπτικά, μπορούμε να πούμε :

Τα ηλεκτρόδια των νιτρικών είναι ηλεκτρόδια υγρής πολυμερικής μεμβράνης που περιέχουν ιονομεταφορέα επιλεκτικό των νιτρικών ιόντων. Η κατανομή των ιόντων, ανάμεσα στο εξεταζόμενο δείγμα και την μεμβράνη δίνει μία μετρήσιμη διαφορά δυναμικού που αξιοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων.

Η λογαριθμικά γραμμική απόκριση του ηλεκτροδίου στην ενεργότητα των NO_3^- είναι από 2.0 έως 600 ppm. Με κατάλληλη ρύθμιση επιτυγχάνεται ικανοποιητικά ακριβής προσδιορισμός για συγκεντρώσεις από 0.2 έως 1000 ppm NO_3^- .

Οι παρεμποδίσεις από άλλα ιόντα (κυρίως Cl^- , HCO_3^- , NO_2^-), αντιμετωπίζονται επιτυχώς με τη προσθήκη στα εξεταζόμενα δείγματα καταλλήλων διαλυμάτων, που μειώνουν την επίδραση τους στο διαμορφούμενο δυναμικό.

Συνήθως, προστίθεται κατάλληλο διάλυμα ρύθμισης της ιονικής ισχύος του του δείγματος (Ion Strength Adjustor, ISA), προκειμένου να διατηρηθεί σταθερή η σχέση ανάμεσα στην ενεργότητα και στη συγκέντρωση του ιόντος κατά την διάρκεια των μετρήσεων.

Τα πολλά πλεονεκτήματα της μεθόδου αναφέρθησαν ήδη. Τα μειονεκτήματα, όπως η κακή επιλεκτικότητα, η αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων και ο μικρός χρόνος ζωής του ηλεκτροδίου, γίνεται διαρκής προσπάθεια να βελτιωθούν.

4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΩΝ ΓΙΑ ΝΙΤΡΙΚΑ.

4.1 Το ηλεκτρόδιο των νιτρικών

Το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο των νιτρικών είναι **ηλεκτρόδιο υγρής πολυμερικής μεμβράνης**. Τα βασικά συστατικά μιας υγρής πολυμερικής μεμβράνης είναι :

α. Ο ιονομεταφορέας δηλαδή η ουσία που είναι υπεύθυνη για τη χημική αναγνώριση του εξεταζόμενου ιόντος.

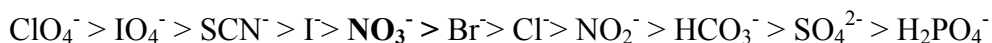
β. Το πολυμερές που είναι το κατασκευαστικό υλικό της μεμβράνης

γ. Ο πλαστικοποιητής είναι ο διαλύτης όλων των συστατικών της μεμβράνης.

Συχνά, στις μεμβράνες εισάγονται και **πρόσθετες ουσίες** που βελτιώνουν ορισμένα χαρακτηριστικά.

Οι ιονομεταφορείς των νιτρικών ανήκουν σε τρεις κατηγορίες :

Στους **ανιοανταλλάκτες**, των οποίων η συμπεριφορά εξαρτάται από την ικανότητα εκχύλισης των ανιόντων από το υδατικό διάλυμα, προς τη λιπόφιλη μεμβράνη. Η εκχύλιση αυτή εξαρτάται από την ελεύθερη ενέργεια ενυδάτωσης των ανιόντων, η οποία δημιουργεί την κλασσική σειρά επιλεκτικότητας κατά Hofmeister :



Οι ανιοανταλλάκτες μπορεί να είναι άλατα αμμωνιακά, φωσφονιακά, αρσωνικά και γουανιδικά, χωρίς αυτό να μεταβάλλει την παραπάνω σειρά.

Στη κατηγορία των ανιοανταλλακτών έχουν χρησιμοποιηθεί τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα με γενικό τύπο : $\text{R}_4\text{N}^+\text{X}^-$, όπου R μακριά αλειφατική αλυσίδα με 8 – 18 άτομα άνθρακα και X ⁻ ιόν νιτρικού ή φωσφωνικού ή αρσωνικού άλατος. Οι Nielsen .H.J. et al, 1976, Hara H. et al, 1993, χρησιμοποίησαν πολλά τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα ως ιονομεταφορείς νιτρικών ιόντων. Τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε το tetraoctyl ammonium nitrate (TOAN).

Άλλοι ιονομεταφορείς της κατηγορίας των ανιοανταλλακτών που έδωσαν σχετικά καλά αποτελέσματα ήταν ο triallyldodecyl ammonium bromide (TADDAB) (Ebdon L. et al, 1991), ο tributylhexadecyl phosphonium bromide (TBHDPB) (Mitrakas M.G. et al, 1991).

Σε όλες τις περιπτώσεις των ανιοανταλλακτικών ιονομεταφορέων, οι παρεμποδίσεις από τα λιπόφιλα ανιόντα που βρίσκονται αριστερά των νιτρικών στη σειρά Hofmeister, είναι μεγάλες.

Στους οργανομεταλλικούς ιονομεταφορείς έγινε προσπάθεια να αυξηθεί η επιλεκτικότητα του ηλεκτροδίου στα νιτρικά ιόντα και να μειωθεί κατά το δυνατόν η επίδραση των ιόντων που επιβάλλει η σειρά Hofmeister.

Ο Ross. J.W., 1969, χρησιμοποίησε ως ιονομεταφορέα το σύμπλοκο του Ni(II) , nickel(II) bathophenanthroline nitrate, το οποίο παρουσίασε σημαντικές αποκλίσεις από τη σειρά επιλεκτικότητας Hofmeister

Ο Mansurov M.M., et al, 1990, συνέθεσε ιονομεταφορείς με τύπο $[M_3O(RCOO)_6(H_2O)_3] NO_3$, όπου M= Fe(III), Cr(III), και R= C₁₅H₃₁, C₁₇H₃₅, C₁₇H₃₃. Ο Trojanowich M. 1979, χρησιμοποίησε επίσης το bis neocuproin Cu(I).

Στους ιονομεταφορείς μοριακών θέσεων δημιουργούνται στη μεμβράνη κενές μοριακές θέσεις που μπορούν να δεχτούν μόνο νιτρικά ιόντα. Ο Huskins R.S., et al, 1995, παγίδευσαν ιόντα νιτρικών σε μεμβράνη με πολυμερισμό πυρολίου παρουσία NaNO₃ . Με έκπλυση της μεμβράνης αφαιρούνται τα νιτρικά ιόντα αφήνοντας κενές τις μοριακές τους θέσεις. Τα ηλεκτρόδια που κατασκευάστηκαν με τον τρόπο αυτό είχαν πολύ καλή επιλεκτικότητα στα περισσότερα ιόντα που παρεμποδίζουν την ανάλυση των νιτρικών, αλλά είχαν μικρό χρόνο ζωής (9 ημέρες) και ευαισθησία στο φως.

Ο πλαστικοποιητής είναι το μέσον στο οποίο διαλύονται όλα τα συστατικά της μεμβράνης και το μέσον στο οποίο συμβαίνει η ιοντική κατανομή και η δέσμευση των ιόντων. Καθοριστικό μέγεθος είναι ο συντελεστής κατανομής K_p ενός ιόντος ανάμεσα στην οργανική και υδατική φάση, π.χ. για τα NO₃⁻ θα είναι :

$$K_p = [NO_3^-]_{org} / [NO_3^-]_{aq}$$

Οι κυριότεροι πλαστικοποιητές είναι οι :

- o-nitrophenyl octyl ether (o-NPOE)
- tris(ethylhexyl) phosphate (TEHP)
- bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS)
- n- Octanol.

Οι συντελεστές κατανομής των νιτρικών και άλλων λιπόφιλων ιόντων δίνονται στον Πίνακα 4.1 .

Πίνακας 4.1

Συντελεστές Κατανομής Αλάτων Καλίου

| Ανιόντ α | o- NPOE | n- Octanol | DOS | TEHP |
|--------------------|---------|------------|--------|-------|
| NO_3^- | 0,012 | 0,048 | - | 0,33 |
| Γ | 0,065 | 0,038 | - | 0,097 |
| SCN^- | 0,21 | 0,085 | 0,0015 | 0,77 |
| ClO_4^- | 0,17 | 0,058 | 0,019 | 0,094 |

Ο πλαστικοποιητής, που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο στη κατασκευή ηλεκτροδίων νιτρικών για ερευνητικούς αλλά και για εμπορικούς σκοπούς είναι ο o- NPOE.

Το πολυμερές που συνήθως χρησιμοποιείται στις μεμβράνες είναι το πολυβινιλοχλωρίδιο (PVC)

Τα πρόσθετα είναι οργανικές ουσίες που εισάγονται σε πολύ μικρές ποσότητες στη μεμβράνη προκειμένου να επηρεάσουν θετικά ορισμένα χαρακτηριστικά. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι:

- η επιλεκτικότητα του ηλεκτροδίου

- η απόκριση του ηλεκτροδίου
- η μείωση της αντίστασης της μεμβράνης
- η αύξηση της σταθερότητας και διάρκειας του ηλεκτροδίου.

Η αρχή λειτουργίας των επιλεκτικών ηλεκτροδίων για τα νιτρικά , όπως εξάλλου και όλων των άλλων ιόντων, στα οποία χρησιμοποιούνται οι υγρές πολυμερικές μεμβράνες, βασίζεται στην επιλεκτική και αντιστρεπτή εκχύλιση των ιόντων που μας ενδιαφέρουν από το εξεταζόμενο δείγμα. Η κατανομή των ιόντων που επιτυγχάνεται, ανάμεσα στη μεμβράνη και το δείγμα, μπορεί να παράγει μια μετρήσιμη διαφορά δυναμικού που υπό ορισμένες προϋποθέσεις μπορεί να αξιοποιηθεί για αναλυτικούς σκοπούς.

Η συμμετρική διαμόρφωση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου ιόντων (EHI) περιλαμβάνει την επιλεκτική μεμβράνη, το εσωτερικό αναφορικό διάλυμα και το εσωτερικό αναφορικό ηλεκτρόδιο. Η παράσταση αυτού του ημιστοιχείου, μπορεί να είναι η εξής :

EHI



Το ποτενσιομετρικό σύστημα μέτρησης, περιλαμβάνει εκτός του παραπάνω EHI, ένα εξωτερικό ηλεκτρόδιο αναφοράς (REF). Και τα δύο αυτά ημιστοιχεία είναι βυθισμένα στο υπό εξέταση δείγμα. Συνολικά το γαλβανικό στοιχείο που δημιουργείται παριστάνεται ως εξής:



Στην ιδανική περίπτωση ενός απόλυτα ειδικού ηλεκτροδίου για ένα ιόν, το δυναμικό του ηλεκτροδίου σχετίζεται με την ενεργότητα του εξεταζόμενου ιόντος, από την εξίσωση Nernst :

$$\mathbf{E = E_i^\circ + s \log a_i}$$

Οπου :

$$s = \frac{2.303RT}{z_i F}$$

a_i = η ενεργότητα του ιόντος

z_i = το φορτίο του ιόντος

F = η σταθερά του Faraday (96487 C* mol⁻¹)

R = η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J*K⁻¹*mol⁻¹)

Στην περίπτωση που οι μεμβράνες είναι επιλεκτικές κάποιων ιόντων και όχι ειδικές, το δυναμικό του ηλεκτροδίου δίνεται από την εξίσωση Nikolski – Eisenman (Nikolski B.P.,1937, Eisenman G. et al. 1957)

$$E = E_i^o + s \log \left(a_i + \sum_j K_{ij}^{pot} a_j^{z_i/z_j} \right)$$

όπου :

a_j = η ενεργότητα του παρεμποδίζοντος ιόντος

K_{ij}^{pot} = ο ποτενσιομετρικός συντελεστής επιλεκτικότητας του ιόντος

z_j = το φορτίο του ιόντος j

Τα EHI δίνουν την δυνατότητα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας a_i στο διάλυμα. Τα παρεμποδίζοντα ιόντα επηρεάζουν την μέτρηση, σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση. Γνωρίζοντας τον συντελεστή επιλεκτικότητας και την ενεργότητα ενός παρεμποδίζοντος ιόντος μπορούμε θεωρητικά να υπολογίσουμε την επίδραση του στο μετρούμενο δυναμικό.

Ο ποτενσιομετρικός συντελεστής επιλεκτικότητας K_{ij}^{pot} δεν είναι μια αυστηρή σταθερά, αλλά εξαρτάται από διάφορους παράγοντες και κυρίως από την ενεργότητα των παρεμποδίζόντων ιόντων στο διάλυμα. Επιπλέον υπάρχει μεγάλη αντιπαράθεση για τη μέθοδο υπολογισμού του συντελεστή και οι τιμές που

λαμβάνονται για το ίδιο ηλεκτρόδιο μπορεί να διαφέρουν κατά μια τάξη μεγέθους (IUPAC,1979). Γιαυτό, οι τιμές K_{ij}^{pot} δεν χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της πραγματικής συγκέντρωσης του ιόντος που προσδιορίζεται, αλλά χρειάζονται σαν οδηγός για την εκτίμηση του επιθυμητού επιπέδου συγκέντρωσης των παρεμποδιζόντων ιόντων.

Γενικά πάντως, θεωρούμε ότι οποιοδήποτε ιόν έχει $K_{ij}^{pot} \ll 1$ δεν παρεμποδίζει το ηλεκτρόδιο, ενώ για $K_{ij}^{pot} \geq 1$ το ιόν θεωρείται παρεμποδίζον.

Τα ιόντα, για τα οποία συνήθως υπολογίζεται το K_{ij}^{pot} στα ηλεκτρόδια των νιτρικών είναι κυρίως τα ιόντα της σειράς Hofmeister. Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται οι ακραίες τιμές του K_{ij}^{pot} για τα διάφορα ιόντα, σύμφωνα με τα στοιχεία που δίνονται από διάφορους ερευνητές για τα ηλεκτρόδια τους.

Πίνακας 4.2

Ποτενσιομετρικός συντελεστής επιλεκτικότητας αισθητήρων νιτρικών

| Ανιόν | K_{ij}^{pot} |
|--------------------|----------------|
| ClO_4^- | 7.95 - 1259 |
| SCN^- | 6.31 - 85 |
| I^- | 1.41 - 20 |
| Br^- | 0.05 - 0.81 |
| Cl^- | 0.001 - 0.002 |
| NO_2^- | 0.001 - 0.10 |
| SO_4^{2-} | 0.00005 - 0.50 |

Με τη μέθοδο των ΕΗΙ το μετρούμενο μέγεθος είναι ουσιαστικά η ενεργότητα των ιόντων και όχι η συγκέντρωση και επειδή ως γνωστόν :

$$a = \gamma C$$

όπου : a = ενεργότητα ιόντος

γ = συντελεστής ενεργότητας του ιόντος

C = συγκέντρωση ιόντος.

θα πρέπει η ενεργότητα των ιόντων να διατηρείται σταθερή και ανάλογη της συγκέντρωσης κατά την διάρκεια των μετρήσεων. Ο παράγοντας που εξασφαλίζει τα παραπάνω σε ένα διάλυμα είναι η σταθερότητα της ιονικής ισχύος του διαλύματος και αυτό διότι ο συντελεστής ενεργότητας γ παραμένει σταθερός εφόσον διατηρείται σταθερή η ιονική ισχύς του διαλύματος, όπως φαίνεται από τη παρακάτω εξίσωση :

$$\log \gamma = \frac{-0.51z^2 \sqrt{\mu}}{1 + \left(a \sqrt{\frac{\mu}{305}} \right)} \quad \text{στους } 25^\circ \text{ C}$$

μ = η ιονική ισχύς του διαλύματος και
$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$$

όπου :

c_i = η συγκέντρωση του ιόντος i

z_i = το φορτίο του ιόντος i

Για τους παραπάνω λόγους, κατά τις μετρήσεις με τα EHI, προστίθεται στο υπό εξέταση δείγμα, διάλυμα ρυθμιστή της ιονικής ισχύος (Ionic Strength Adjustor, ISA) διότι έτσι εξασφαλίζεται η σταθερότητα του συντελεστή ενεργότητας και κατά συνέπεια η ενεργότητα των μετρουμένων ιόντων παραμένει σταθερή και ανάλογη της συγκέντρωσής τους. Είναι αυτονόητο, ότι η επιλογή του ISA γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε τα ιόντα που περιέχει να μην παρεμποδίζουν (μικρό K_{ij}^{pot}) κατά το δυνατόν, το εξεταζόμενο ιόν.

4.2 Επιλεκτικό ηλεκτρόδιο νιτρικών στερεάς επαφής

Στα συνήθη συμμετρικά ηλεκτρόδια υγρής πολυμερικής μεμβράνης, η μεμβράνη είναι σε απευθείας επαφή με δύο υδατικά διαλύματα, το εσωτερικό διάλυμα αναφοράς με σταθερή ιοντική συγκέντρωση και το εξωτερικό που περιέχει το εξεταζόμενο ιόν.

Μεχρι σήμερα έχουν κατασκευαστεί ηλεκτρόδια με πολύ καλά χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως : όριο ανίχνευσης, κλίση, περιοχή γραμμικότητας, συντελεστές επιλεκτικότητας κ.λ.π. Ομως μειονεκτήματα όπως : ο μικρός χρόνος ζωής, η μεγάλη ηλεκτρική αντίσταση, η περίπλοκη κατασκευή, η μικρή αντοχή σε υψηλές πιέσεις, δεν έχουν ξεπεραστεί. Τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων στερεάς επαφής (Solid Contact – ISE) χρησιμοποιούν μία νέα τεχνολογία στερεάς επαφής (Nikolsky B.P, et al. 1985, Khalil M. M., 1993), δηλαδή ένα στερεό αγωγίμο υπόστρωμα που βρίσκεται σε άμεση επαφή με την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Έχει διαπιστωθεί (Vamvakaki M. et al., 1996) ότι η αντικατάσταση του εσωτερικού αναφορικού διαλύματος από πορώδη άνθρακα υψηλής αγωγιμότητας, βελτιώνει σημαντικά τα χαρακτηριστικά των επιλεκτικών ηλεκτροδίων.

Το ηλεκτρόδιο νιτρικών στερεάς επαφής (Σχήμα 4.1) που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία αποτελείται από στερεό εσωτερικό αναφορικό ημιστοιχείο Ag/AgCl, σε επαφή με τον πορώδη άνθρακα, ο οποίος είναι εμποτισμένος με διάλυμα ιονομεταφορέα σε πλαστικοποιητή, της ίδιας περιεκτικότητας με την εξωτερική μεμβράνη. Έτσι ο πορώδης άνθρακας, αφενός μεν μεταδίδει το ηλεκτρικό σήμα από την πολυμερική μεμβράνη στην ηλεκτρική επαφή, αφετέρου λειτουργεί σαν εσωτερική δεξαμενή που τροφοδοτεί την μεμβράνη με υλικά που ενδεχόμενα εκχύνονται στο εξεταζόμενο διάλυμα.

Το μίγμα του ιονομεταφορέα με τον πλαστικοποιητή στην μεμβράνη είναι :

Ni - phenanthroline σε o-nitrophenyl octyl ether (o-NPOE)

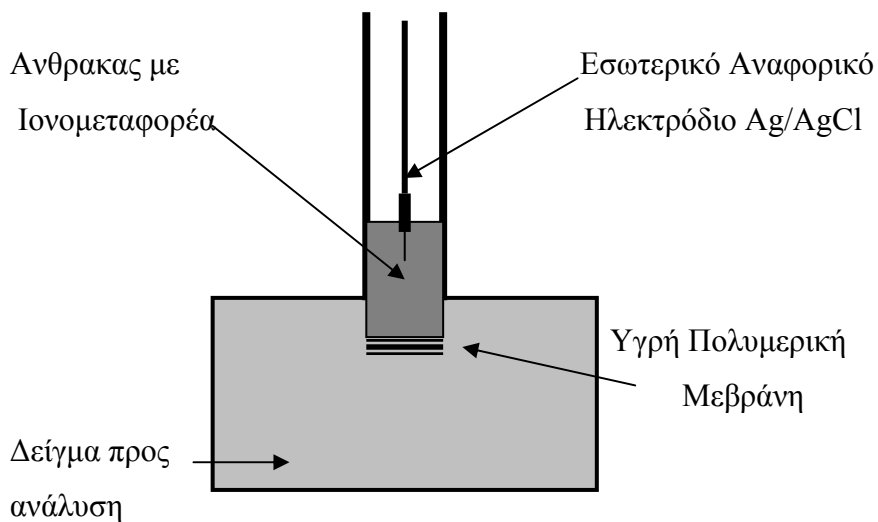
Το δε μίγμα κατασκευής της μεμβράνης είναι :

bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS) με υψηλού μοριακού βάρους PVC.

Το δυναμικό που αναπτύσσει το ηλεκτρόδιο στερεάς επαφής ακολουθεί τη εξίσωση Nikolski – Eisenman, με θεωρητική κλίση -59.2 mV/dec , σε θερμοκρασία δωματίου.

$$E = E_i^o - 59.2 \cdot \log \left(\text{NO}_3^- + \sum_j K_{\text{NO}_3, j}^{\text{pot}} a_j^{1/z_j} \right)$$

όπου $j, a_j, n_j, K_{\text{NO}_3, j}^{\text{pot}}$ τα χαρακτηριστικά κάθε παρεμποδίζοντος ιόντος.



Σχήμα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτροδίου στερεάς – επαφής.

Στον Πίνακα 4.3 δίνονται οι τιμές του συντελεστή επιλεκτικότητας για διάφορα ιόντα του ηλεκτροδίου στερεάς επαφής, οι οποίες έχουν υπολογιστεί με την μέθοδο των ξεχωριστών διαλυμάτων.

Πίνακας 4.3

Ποτενσιομετρικοί συντελεστές επιλεκτικότητας του ηλεκτροδίου
νιτρικών στερεάς επαφής.

| Ανιόν | K_{ij}^{pot} |
|---------------------------|----------------|
| ClO_4^- | 137 |
| SCN^- | 18 |
| I ⁻ | 0.96 |
| Br^- | 0.05 |
| Cl^- | 0.006 |
| NO_2^- | 0.06 |
| SO_4^{2-} | 0.01 |
| H_2PO_4^- | 0.008 |

Στο ηλεκτρόδιο νιτρικών στερεάς επαφής η αντικατάσταση του εσωτερικού αναφορικού υδατικού διαλύματος από το υπόστρωμα του αγωγίμου άνθρακα έχει σαν συνέπεια την μείωση της διολίσθησης του δυναμικού (potential drift).

Στο Σχήμα 4.3 εξετάζεται ο χρόνος ζωής του ΗΣΕ σε σύγκριση με το εμπορικό ηλεκτρόδιο Orion #93-07. Στο διάγραμμα φαίνεται η διολίσθηση του δυναμικού με το χρόνο, σε διάλυμα 10^{-2} M KNO_3 . Το ΗΣΕ έδειξε σταθερή και επαναλήψιμη λειτουργία για χρόνο μεγαλύτερο των 6 μηνών, ενώ το Orion #93-07 παρουσίασε σταθερή μείωση του δυναμικού του, που πιθανότατα οφείλεται στην σταθερή έκχυση του ιονομεταφορέα από την μεμβράνη προς το υδατικό διάλυμα (Ανδρεδάκης Γ.Ε.1998).

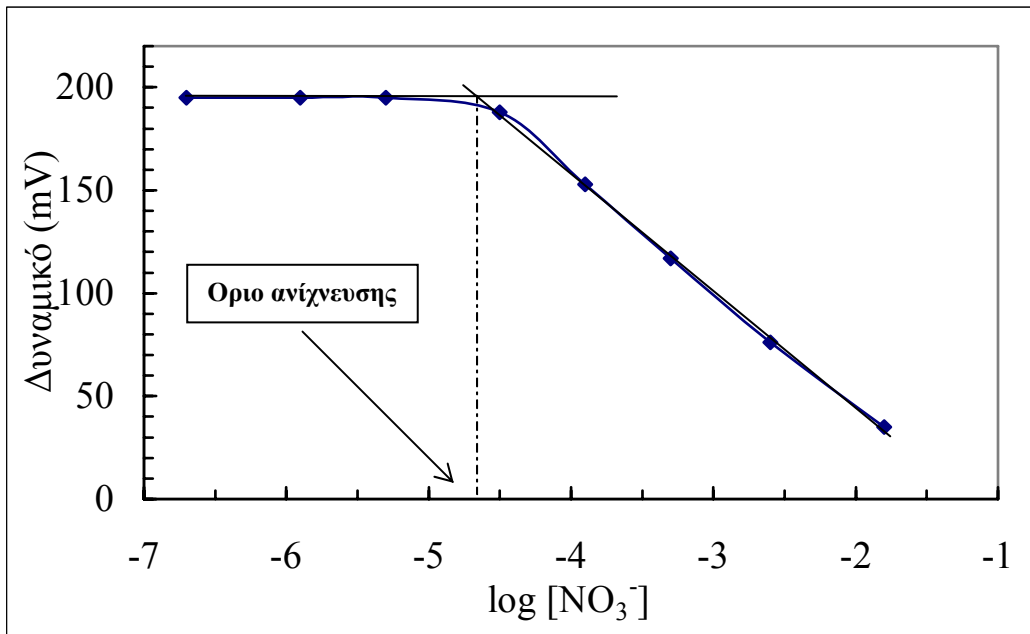
Το όριο ανίχνευσης και η περιογή γραμμικότητας, όπως προκύπτει από το διάγραμμα βαθμονόμησης Σχήμα 4.2 είναι $7 \cdot 10^{-4}$ M και $10^{-4.5} - 10^{-1.5}$ M αντίστοιχα (Vamvakaki M. et al., 1996). Οι τιμές αυτές είναι τουλάχιστον στα ίδια επίπεδα με αυτά των άλλων ηλεκτροδίων.

Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι η ηλεκτρική αντίσταση του ηλεκτροδίου είναι σχετικά χαμηλή, ενώ αυξάνεται η αντοχή του ηλεκτροδίου σε υψηλές πιέσεις. Όλα αυτά συμβάλλουν στην αναβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του ηλεκτροδίου. Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται τα τεχνικά, ποιοτικά χαρακτηριστικά από όπου φαίνεται ότι ο χρόνος ζωής και ο χρόνος απόκρισης του ηλεκτροδίου είναι σαφώς βελτιωμένοι συγκρινόμενοι με τους αντίστοιχους γνωστών εμπορικών ηλεκτροδίων.

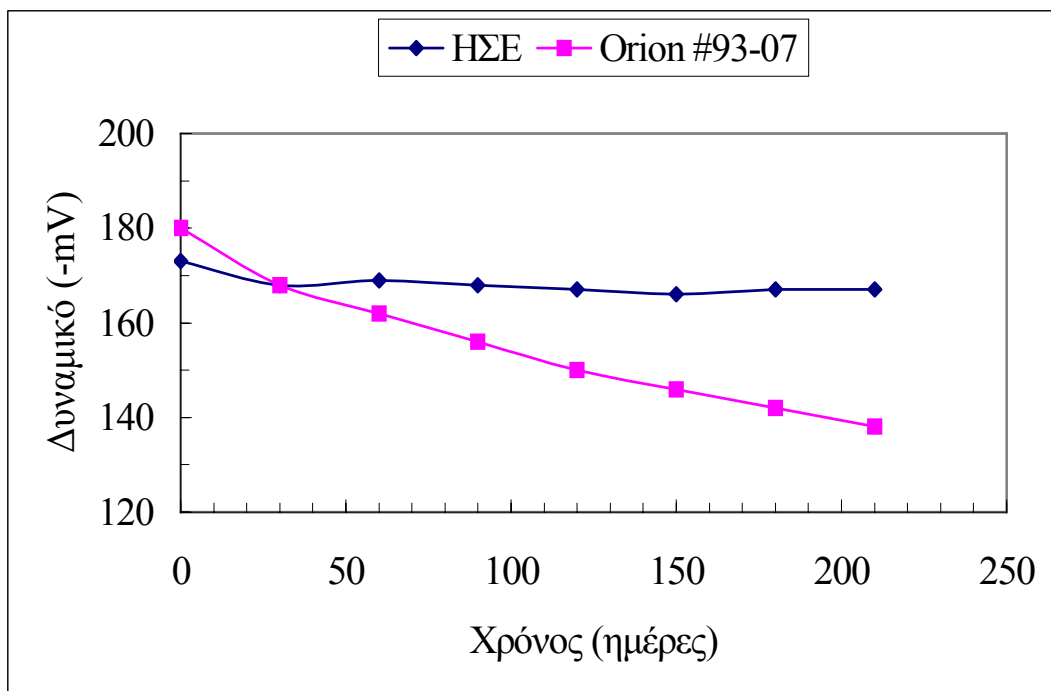
Πίνακας 4.4

Ποιοτικά χαρακτηριστικά ηλεκτροδίου νιτρικών Model # 97103

| | |
|--------------------------------|---|
| Περιοχή συγκέντρωσης | $10^{-6} - 10^{-1} \text{ M}$ |
| Χρόνος απόκρισης | < 10 sec |
| Περιοχή pH | 2.5 – 11 |
| Αντίσταση ηλεκτροδίου | < 100 KΩ |
| Επαναληψιμότητα | < $\pm 2\%$ |
| Δείγμα | Υδατικό |
| Χρόνος ζωής ηλεκτροδίου | > 8 μήνες |



Σχήμα 4.2 Καμπύλη βαθμονόμησης του ΗΣΕ, ως προς τα νιτρικά ιόντα



Σχήμα 4.3 Χρόνος ζωής ηλεκτροδίου ΗΣΕ και Orion#93-07

4.3 Προσδιορισμός νιτρικών σε φυτικούς ιστούς και άλλα δείγματα.

Από το 1967 μέχρι σήμερα, η ποτενσιομετρική μέθοδος προσδιορισμού των νιτρικών σε όλων των ειδών τα δείγματα, έχει παραμείνει εντυπωσιακά διαχρονική. Αν και για κάποια χρονικά διαστήματα, άλλες μέθοδοι κυρίως φασματοσκοπικές είχαν μεγάλη χρήση, η ποτενσιομετρική μέθοδος δεν έπαψε ποτέ να χρησιμοποιείται και να βελτιώνεται.

Η μέθοδος έχει επανειλημμένα συγκριθεί, από διάφορους ερευνητές, με τις περισσότερες από τις άλλες μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των νιτρικών σε νερά, εδάφη και φυτικούς ιστούς. Ιδιαίτερα έχει εξεταστεί η σχέση της με την μέθοδο του φαινυλοδισουλφονικού οξέος (PDS) και ειδικά τα τελευταία χρόνια με την μέθοδο της ιοντικής χρωματογραφίας (IC).

Ενδεικτικά θα αναφέρουμε τα αποτελέσματα μερικών τέτοιων εργασιών.

Ο Mahendrappa M.K., 1969, συνέκρινε την μέθοδο με την μέθοδο PDS και την μέθοδο απόσταξης Kjeldahl, σε δείγματα εδάφους και εκτός από την διαπίστωση της ευκολίας και απλότητας της ποτενσιομετρικής μεθόδου, η ακρίβεια της μεθόδου ήταν καλύτερη των άλλων δύο.

Οι Bunton N.G., et al, 1969, συνέκρινε τις μετρήσεις σε νερά και λύματα με ηλεκτρόδιο Orion 92-07, με μετρήσεις που έγιναν με την φασματοσκοπική μέθοδο (Brusine method) και τη μέθοδο απόσταξης μετά από αναγωγή με κράμα Devarda. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων και των δοκιμών ανάκτησης με το ηλεκτρόδιο διαπιστώνει ότι είναι πιο ακριβή σε σχέση με τις δύο άλλες μεθόδους.

Ο Mitrakas M.G., et al, 1990, συσχέτισε τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε νερά, εδαφικά εκχυλίσματα και φυτικούς ιστούς με την ποτενσιομετρική μέθοδο, με τα αντίστοιχα της ιοντικής χρωματογραφίας (IC), της μεθόδου φαινυλοδισουλφονικού οξέος (PDS) και της μεθόδου αναγωγής σε στήλη Cd. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης δείχνουν την ουσιαστική σύμπτωση των αποτελεσμάτων και την ακρίβεια της ποτενσιομετρικής μεθόδου.

Σε συγκριτική μελέτη του Ινστιτούτου Εδαφολογίας Θεσσαλονίκης (Μπλαδενόπουλος Σ.Β., Σιμωνής Α.Δ), όλων σχεδόν των μεθόδων προσδιορισμού

των νιτρικών σε νερά, εδάφη και φυτικούς ιστούς το συμπέρασμα είναι ότι, η μέθοδος των ηλεκτροδίων και η μέθοδος αναγωγής σε στήλη Cd έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα, με την πρώτη να υπερτερεί για αναλύσεις ρουτίνας.

Ο Yamamoto A., et al, 1996, συγκρίνει τα αποτελέσματα της ποτενσιομετρικής μεθόδου με αυτά της ιοντικής χρωματογραφίας (IC) αποκλειστικά σε λαχανικά και διαπιστώνει την σύμπτωση των αποτελεσμάτων σε όλα τα είδη λαχανικών, εκτός από αυτά με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και υδατάνθρακες.

Σκοπός μας εδώ, είναι η παρουσίαση της έρευνας που έχει γίνει στα διάφορα στάδια της ανάλυσης για τον ποτενσιομετρικό προσδιορισμό των νιτρικών.

Αναλυτικά για τα διαδοχικά στάδια της ανάλυσης διαφόρων δειγμάτων, με έμφαση στα δείγματα φυτικών ιστών, έχουμε :

Το δείγμα.

Οι περισσότερες αναλύσεις στα φυτά γίνονται επί ξηρού δείγματος. Το καθαρισμένο φυτό, ολόκληρο ή μέρος αυτού, ξηραίνεται επί 48 ώρες στους 70° – 85° C. Οι ξηροί ιστοί αλέθονται, το δείγμα κονιορτοποιείται και μετά συλλέγεται το κλάσμα του δείγματος 20 – 40 mesh (212.5 – 425 μm). Η ξήρανση εμποδίζει τη δράση της νιτρικής ρεδουκτάσης, αλλά η μικροβιακή δράση μπορεί να συνεχίζει να μεταβάλλει τη συγκέντρωση των νιτρικών στους ιστούς. Το ξηρό δείγμα φυλάσσεται σε ψυγείο στους – 10° C . Παράλληλα, κατά τη διαδικασία της ξήρανσης υπολογίζεται και το ποσοστό υγρασίας που θα χρησιμοποιηθεί, αν χρειάζεται, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών επι νωπής φυτικής ύλης.

Η ποσότητα ξηρής φυτικής ύλης που χρησιμοποιείται για κάθε ανάλυση κυμαίνεται από 100 – 500 mg.

Προκειμένου για ανάλυση απευθείας επί νωπής φυτικής ύλης (Consalter, A., et al, 1992, Mitrakas, M.G., 1990) 1 kg νωπού φυτικού ιστού ομογενοποιείται και από το μίγμα που προκύπτει ζυγίζονται 10gr.

Σε δείγματα εδάφους, ποσότητα ξηρού δείγματος σε αέρα (air-dried) αλέθεται και συλλέγεται το κλάσμα 2 mesh. Ο λόγος δείγμα προς εκχυλιστικό κυμαίνεται από 1: 2 μέχρι 1:5 (w: v) (Griffin G. et al. 1993)

Σε υγρά περιβαλλοντικά δείγματα (αστικά ή βιομηχανικά απόβλητα) και νερά η εξεταση γίνεται απευθείας σε ορισμένο όγκο (π.χ. 10 ml) μετά από διήθηση ή φυγοκέντρωση, αν χρειάζεται.

Η εκχύλιση.

Για την εκχύλιση των νιτρικών ιόντων από δείγματα φυτικών ιστών και εδάφους, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτός του νερού και διάφορα άλλα εκχυλιστικά υδατικά διαλύματα που περιλαμβάνονται στον Πίνακα 4.5 .

Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν εκχυλιστικά, παίζουν παράλληλα και τον ρόλο του ρυθμιστή της ιονικής ισχύος ISA, όπως π.χ. το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ή το CaSO_4 . Πολλές από αυτές, όπως το $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ εξουδετερώνουν διάφορα παρεμποδίζοντα ιόντα ή άλλες ουσίες (π.χ. οργανική ύλη)

Όσον αφορά την αναλογία του εκχυλιστικού, αυτή κυμαίνεται συνήθως από 1: 125 μέχρι 1: 200 (w: v) για του φυτικούς ιστούς.

Ο χρόνος εκχύλισης με μηχανικό αναδευτήρα είναι 5 – 20 min, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται χρόνος 15 min προκειμένου για ξηρή φυτική ύλη. Στα εδάφη ο χρόνος είναι πάντοτε περισσότερος (15 – 30 min) και τέλος σε νωπή φυτική ύλη εφαρμόζονται χρόνοι 30 – 60 min.

Πίνακας 4.5

Διαλύματα εκχύλισης νιτρικών από φυτά και εδάφη

| Διάλυμα εκχύλισης | Αναφορά |
|--|---|
| 0.025 M $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ | Cantliffe, D. et al . 1970 |
| 0.04 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Griffin G. et al. 1993 |
| 0.1 M KF | Orion ,1975 |
| 0.01 M CuSO_4 | Qien A., et al 1969, Cosalter A, et al, 1992 |
| 0.01 M CaSO_4 | Myers, R.J.K., et al 1968. |

Συνήθως μετά την εκχύλιση ακολουθεί διήθηση ή φυγοκέντρωση προκειμένου να ληφθεί καθαρό, διαυγές εκχύλισμα. Η διαδικασία αυτή κρίνεται απαραίτητη κυρίως στα εδάφη, για να προστατευτεί η μεμβράνη του ηλεκτροδίου κατά την μέτρηση.

Ρυθμιστής ιονικής ισχύος (ISA)

Σε όλες τις εργασίες που έπεσαν στην αντιλήψη μας, κατά τη μελέτη αυτή, έχει χρησιμοποιηθεί ISA.

Η προσθήκη ISA για την ρύθμιση της ιονικής ισχύος γίνεται για τους λόγους που εκτέθηκαν αναλυτικά σε προηγούμενη παράγραφο. Όμως στα φυσικά δείγματα νερά, εδάφη, φυτά κτλ. υπάρχει ανάγκη όχι μόνο ρύθμισης της ιονικής ισχύος, αλλά και εξουδετέρωσης των παρεμποδιζόντων ιόντων που προκύπτουν κατά την εκχύλιση ή υπάρχουν φυσιολογικά. Στα φυτικά εκχυλίσματα π.χ. υπολογίστηκε μέσω μέτρησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (Paul J.L., et al, 1968), ότι η συγκέντρωση των αλάτων κυμαίνεται από 0.005 μέχρι 0.02 N.

Τα κυριότερα ιόντα στα εκχυλίσματα που μας ενδιαφέρουν είναι τα ιόντα χλωρίου, τα οποία βρίσκονται στους ξηρούς φυτικούς ιστούς σε συγκεντρώσεις μέχρι και 10%. Αν η αναλογία $Cl^- / NO_3^- - N > 10$ τα ιόντα χλωρίου θεωρείται ότι επηρεάζουν τις μετρήσεις του ηλεκτροδίου (Standard Methods for Examination of Waters and Waste Waters). Η αντιμετώπιση της παρεμπόδισης από τα ιόντα χλωρίου γίνεται με προσθήκη Ag_2SO_4 (Miham P.J., et al, 1970).

Τα HCO_3^- και τα ανιόντα των οργανικών οξέων $RCOO^-$ είναι ανιόντα που παρεμποδίζουν σημαντικά τη λειτουργία του ηλεκτροδίου και συνήθως υπάρχουν στα εκχυλίσματα φυτών, εδαφών αλλά και φυσικών νερών. Στις περισσότερες μεθόδους η αντιμετώπιση των παραπάνω ιόντων γίνεται με προσθήκη $Al_2(SO_4)_3$ το οποίο διασπά τα HCO_3^- και καταβυθίζει την οργανική ουσία. (Paul J.L., et al, 1968, Miham P.J., et al, 1970).

Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται τα κυριότερα διαλύματα που έχουν χρησιμοποιηθεί ως ISA στον προσδιορισμό νιτρικών.

Πίνακας 4.5

Διαλύματα ρύθμισης ιονικής ισχύος (ISA)

| Διάλυμα ISA | Αναφορά |
|---|---------------------------|
| 0.025 M $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ | Cantliffe D., et al, 1970 |
| 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Griffin G., et al, 1993 |
| 0.01 M CuSO_4 | Consalter A., et al, 1992 |
| 0.01 M $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 0.01 M Ag_2SO_4 0.02 M H_3BO_3 , 0.02 M $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ | Miham P.J., et al, 1970 |

Σε μεμονωμένες εργασίες συναντάμε και άλλα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ως ISA, όπως :

- 0.01 M CH_3COOH Rakhmanko E.M., et al 1992
- 0.01M $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0.01 M PbO
0.02 M CH_3COOK , 0.01 M $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ Mitrakas M.G., et al, 1990
- 0.17 M CH_3COOH , 0.03 M CH_3COOLi
 $5.5 \cdot 10^{-3}$ M Na_2SO_4 Hirokazu H., et al, 1997.
- 0.01 M Li_2SO_4 Zuther F., et al, 1995

Από τα υπόλοιπα ιόντα μικρότερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα :



Από αυτά τα S^{2-} , Br^- , I^- , CN^- αντιμετωπίζονται με τον Ag_2SO_4 και τα NO_2^- με σουλφαμικό οξύ.

Η ακρίβεια της μεθόδου.

Η ακρίβεια των μετρήσεων, όπως παρουσιάζεται βιβλιογραφικά, είναι αρκετά καλή για τιμές συγκέντρωσης νιτρικών μεγαλύτερες από 10 ppm, αλλά για τιμές νιτρικών μικρότερες των 10 ppm και ιδίως στην περιοχή του ορίου ανίχνευσης έχουμε συχνά σοβαρές αποκλίσεις. Στίς δοκιμές ανάκτησης (recovery tests) δίνονται ικανοποιητικά αποτελέσματα από τους διάφορους ερευνητές. Ενδεικτικά αναφέρουμε :

Ο Mahendrappa, M.K., 1969, σε εκχυλίσματα εδάφους με συγκεντρώσεις από 10 έως 450 ppm νιτρικών υπολόγισε ακρίβεια, εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) 6 μέχρι 2%, αντίστοιχα.

Οι Qien, A., et al, 1969, σε παρόμοια δείγματα, υπολόγισαν τιμές RSD μικρότερες από 2%, αλλά η ακρίβεια μειώνεται αισθητά για συγκεντρώσεις μικρότερες των 10 ppm. Η δοκιμές ανάκτησης για επίπεδα συγκέντρωσης 25 ppm, έδωσαν ποσοστά ανάκτησης μεγαλύτερα του 97%.

Οι Mitrakas M.G., et al, 1990, σε δείγματα νερών με επίπεδα νιτρικών από 2 μέχρι 40 ppm, είχε τιμές συντελεστού μεταβλητότητας C.V (coefficient of variation) από 2.89 έως 0.69% αντίστοιχα και ποσοστά ανάκτησης 96 έως 100.6%. Σε δείγματα φυτικών ιστών με συγκεντρώσεις από 2000 μέχρι και 40000 ppm, είχε C.V 1.8 – 0.7% και ποσοστά ανάκτησης 99 – 101 %. Όταν τα επίπεδα συγκέντρωσης είναι στο όριο ανίχνευσης προκύπτουν και εδώ υψηλές τιμές C.V. Π.χ. σε δείγμα νερού 0.29 ppm το C.V βρέθηκε 8.12%.

Οι Consalter A. et al, 1992, σε μετρήσεις νιτρικών επί νωπής φυτικής ύλης με συγκεντρώσεις από 3 μέχρι 370 ppm, υπολόγισε τιμές C.V 6.7 έως 2.2% αντίστοιχα και ποσοστά ανάκτησης 100 έως 110%.

4.4 Ερευνητική Εργασία.

Εισαγωγή

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας είναι η απλούστευση της διαδικασίας προσδιορισμού των νιτρικών σε φυτικούς ιστούς με τη ποτενσιομετρική μέθοδο. Η σημασία της ταχύτητας και απλότητας στον προσδιορισμό καταδεικνύεται από το γεγονός, ότι στη βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια δημοσιεύονται όλο και περισσότερες εργασίες που αφορούν τη χρησιμοποίηση μικρών φορητών συσκευών (π.χ. Cardy nitrate meter, Horiba Ltd., Kyoto, Japan) για τον προσδιορισμό των νιτρικών in situ, σε σταγόνες φρέσκου εκχυλίσματος από διάφορα μέρη του φυτού. Η μέθοδος αυτή είναι παραλλαγή της κλασικής ποτενσιομετρικής.

Η απλούστευση της διαδικασίας μπορεί να αφορά την μείωση του χρόνου κάποιων σταδίων ή τη παράληψη εξ ολοκλήρου κάποιων σταδίων της ανάλυσης.

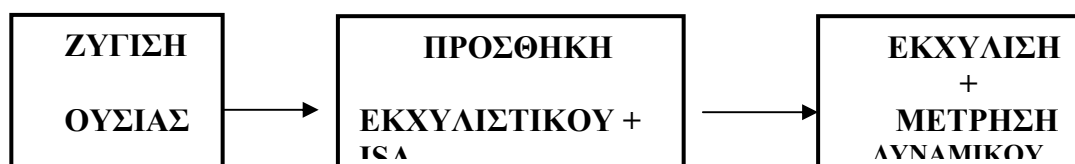
Η κεντρική ιδέα γύρω από την οποία αναπτύσσεται η αναλυτική τεχνική της μεθόδου είναι η άμεση μέτρηση των νιτρικών κατά τη στιγμή της εκχύλισης με την χρησιμοποίηση του βελτιστοποιημένου ηλεκτροδίου νιτρικών στερεάς επαφής.

Η αντοχή του ηλεκτροδίου αυτού σε μεγάλες πιέσεις επιτρέπει την χρήση του σε συνθήκες ισχυρής ανάδευσης, όπως αυτές που απαιτούνται για την άμεση εκχύλιση των νιτρικών από την ξηρό δείγμα.

Η μέθοδος που προτείνεται παρακάμπτει τα στάδια της εκχύλισης και διήθησης που προηγούνται της μέτρησης του δυναμικού, μειώνοντας σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο, τα όργανα και την εργασία. Αύξηση μπορεί να σημειωθεί στον χρόνο απόκρισης του ηλεκτροδίου, λόγω ακριβώς της ταυτόχρονης εκχύλισης και μέτρησης των NO_3^- .

Η βιβλιογραφική έρευνα πάνω στα βασικά στάδια της ποτενσιομετρικής ανάλυσης που προηγήθηκε, αποτελεί οδηγό για την ερευνητική πρόταση που ακολουθεί.

Το γενικό σχήμα ροής της ανάλυσης περιλαμβάνει τρία στάδια :



Για την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλου ανάλυσης μελετήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι :

α. Το μέγεθος του δείγματος

Εξετάζεται η επίδραση του βάρους του δείγματος, τόσο στον χρόνο απόκρισης, όσο και στην αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων.

Συγκεκριμένα, γίνονται μετρήσεις νιτρικών για τέσσερα διαφορετικά βάρη από 0.05 έως 0.20 g και μετράται ο χρόνος απόκρισης και η αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων.

β. Ο χρόνος απόκρισης

Ο χρόνος απόκρισης του συστήματος εξαρτάται από δύο καθοριστικούς παράγοντες. Καταρχήν από τον χρόνο απόκρισης του αισθητήρα, όπως επίσης και από τον χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση της ισορροπίας μεταξύ του ξηρού δείγματος και του διαλύματος ISA.

Ο χρόνος απόκρισης του αισθητήρα έχει μελετηθεί σε προηγούμενη εργασία (Vamvakaki M. et al.,1996) και είναι μερικά δευτερόλεπτα. Από την άλλη, ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της ισορροπίας μεταξύ του ξηρού δείγματος και του διαλύματος εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως το

μέγεθος του δείγματος, ο λόγος δείγματος και ISA, η περιεκτικότητα του δείγματος σε νιτρικά, η θερμοκρασία, η ανάδευση κλπ.

Η βελτιστοποίηση του χρόνου απόκρισης γίνεται εξετάζοντας μόνο τον λόγο δείγματος προς ml ISA, κρατώντας όλες τις άλλες παραμέτρους σταθερές (θερμοκρασία, ανάδευση, όγκος ISA).

γ. Μελέτη ανάκτησης

Για την πιστοποίηση της ακρίβειας της προτεινόμενης μεθόδου γίνεται ταυτόχρονα προσδιορισμός των νιτρικών με τη χρήση της κλασικής μεθοδολογίας (Baker A.S. et al, 1969, Miham P.J. et al, 1970, Mitrakas M.G. et al, 1990)

Τέλος για όλα τα δείγματα πραγματοποιείται μελέτη ανάκτησης με σταθερή προσθήκη νιτρικών ιόντων, για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της μεθόδου.

Στη συνέχεια θα παρατεθούν αναλυτικά οι συνθήκες που επελέγησαν και οι λόγοι για την επιλογή αυτή.

Το δείγμα.

Τα δείγματα των νωπών φυτικών ιστών πλένονται, ξηραίνονται στους 70°C για 48 ώρες, αλέθονται και συλλέγεται το κλάσμα που είναι μικρότερο από 40 mesh.

Εχει ήδη αναφερθεί, ότι η εξέταση επι ξηρής ουσίας είναι η πιο αποδεκτή και αξιόπιστη μέθοδος διεθνώς. Ο προσδιορισμός της υγρασίας κατά την ξήρανση δίνει επιπλέον την δυνατότητα για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών και επί νωπής ουσίας, αν αυτό απαιτείται.

Το δείγμα φυλάσσεται σε ψυγείο, για παρεμπόδιση μεταβολής της συγκέντρωσης των νιτρικών.

Εκχυλιστικό και ISA

Ως εκχυλιστικό για τα νιτρικά χρησιμοποιούμε **το νερό**. Είναι το συνηθέστερο εκχυλιστικό των περισσότερων μεθόδων για φυτικούς ιστούς.

Ως ISA, αλλά και για την εξουδετέρωση της παρεμπόδισης των διαφόρων ιόντων που προκύπτουν κατά την εκχύλιση, επιλέγουμε το διάλυμα :

0.02 M Al₂(SO₄)₃ , 0.01 M Ag₂SO₄, 0.02 M H₃BO₃, 0.02 M NH₂SO₃H

με PH ρυθμισμένο στο 3.0 (Miham P.J., et al, 1970, Mitrakas M.G., et al, 1990, Standard Methods for Examination of Waters and Waste Waters).

Τα κυριότερα ιόντα που εκχυλίζονται από τους φυτικούς ιστούς και μπορεί να προκαλέσουν παρεμπόδιση της λειτουργίας του ηλεκτροδίου, όπως : Cl⁻, HCO₃⁻, RCOO⁻, NO₂⁻ εξουδετερώνονται από τα συστατικά του ISA. Συγκεκριμένα :

Το Al₂(SO₄)₃ διασπά τα HCO₃⁻ και καταβυθίζει την οργανική ύλη.

Το Ag₂SO₄ εξουδετερώνει τα Cl⁻, Br⁻, I⁻

Το NH₂SO₃H (σουλφαμικό οξύ) εξουδετερώνει τα NO₂⁻

Το H₃BO₃ βοηθάει στη ρύθμιση του pH και μειώνει την παρεμπόδιση από ιόντα όπως CN⁻, S²⁻, HCO₃⁻, CO₃⁼, φωσφορικά. Επίσης έχει δράση αντιβακτηριακή και χρησιμοποιείται συχνά ως συντηρητικό.

Η αναλογία νερού / ISA στο εκχυλιστικό διάλυμα επιλέγεται η σχέση **1:1** και συγκεκριμένα **10 ml H₂O : 10 ml ISA** για πρακτικούς και οικονομικούς λόγους.

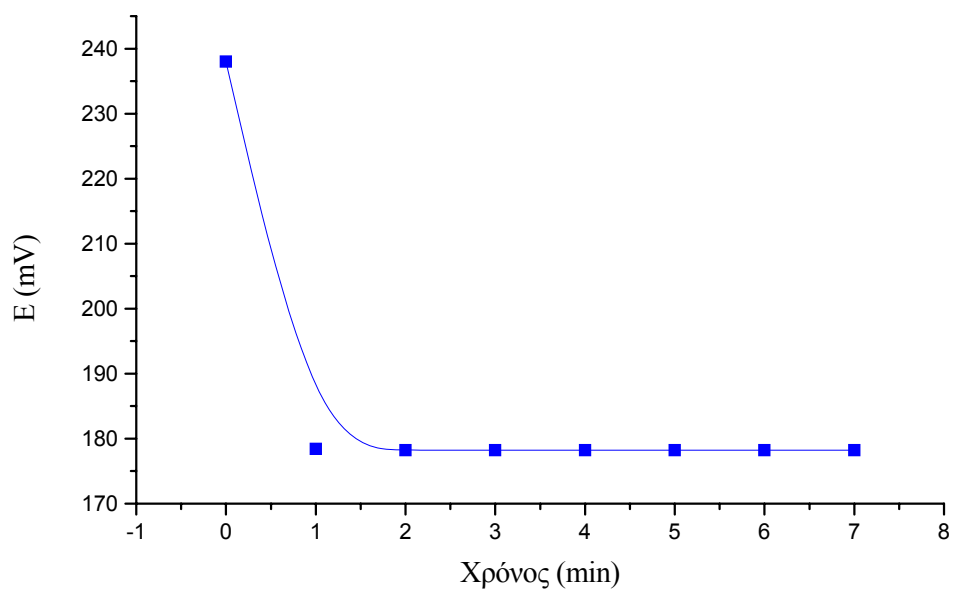
Προκειμένου να προχωρήσουμε στην εφαρμογή της μεθόδου εξετάσαμε την συμπεριφορά του ηλεκτροδίου των νιτρικών στερεάς – επαφής, διαδοχικά σε πρότυπα διαλύματα νιτρικών και στη συνέχεια την συμπεριφορά του κατά την εκχύλιση φυτικών ιστών.

Συγκεκριμένα σε συνθήκες ισχυρής ανάδευσης με τον μαγνητικό αναδευτήρα καταγράφεται η εξέλιξη του δυναμικού του ηλεκτροδίου με ακρίβεια 0.1 mV, κάθε 1 min, για συνολικό χρόνο 10 min.

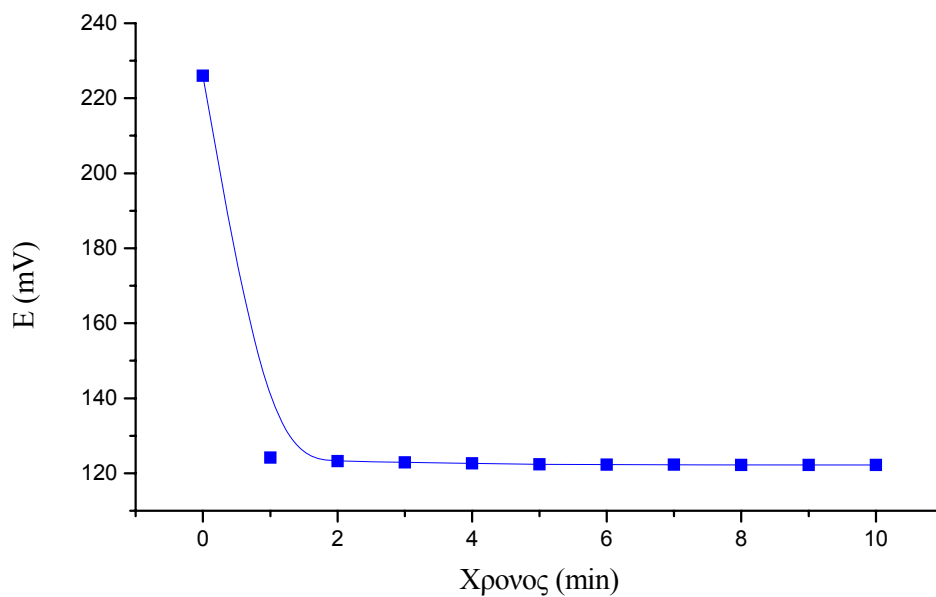
A. Πρότυπα διαλύματα νιτρικών

Η απόκριση του ηλεκτροδίου σε δύο πρότυπα διαλύματα NO₃⁻ παρουσιάζεται στα παρακάτω διαγράμματα. Στο *Σχήμα 4.4* σε διάλυμα 10 ml, 10 ppm NO₃⁻ +10 ml ISA το δυναμικό σταθεροποιείται στα 178,2 mV μετά από 2 min.

Στο *Σχήμα 4.5* παρουσιάζεται αντίστοιχα η εξέλιξη σε πρότυπο διάλυμα 100 ppm NO₃⁻. Το δυναμικό μετά από 8 min σταθεροποιείται σε δυναμικό 122,2 mV.



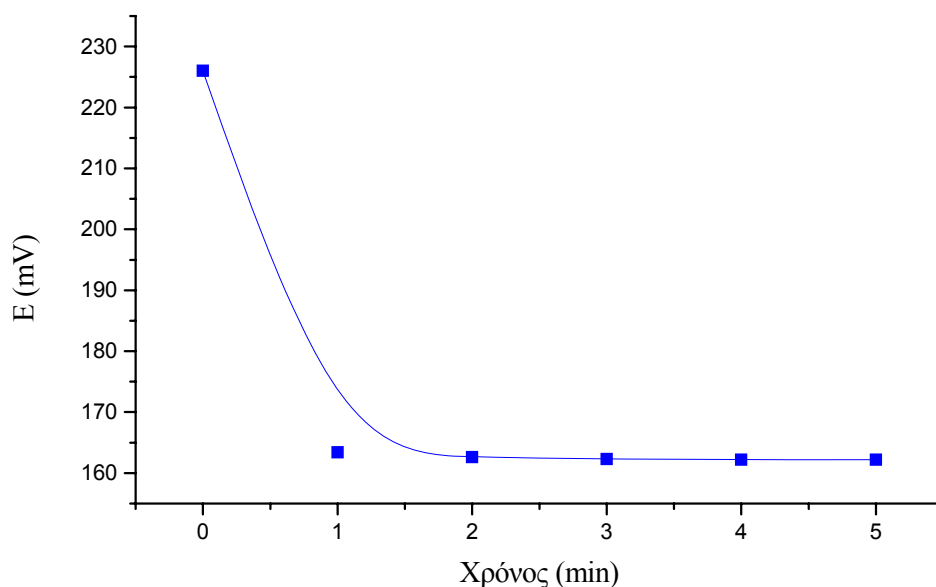
Σχήμα 4.4 Εξέλιξη του δυναμικού σε 10 ml, 10 ppm NO_3^- + 10 ml ISA



Σχήμα 4.5. Εξέλιξη του δυναμικού, σε διάλυμα 10 ml, 100 ppm NO_3^- + 10 ml ISA

B. Σε φυτικά εκχυλίσματα

Σε δύο δείγματα ξηρής φυτικής ύλης (φύλλα ντομάτας, σπανάκι), όπου αναμένουμε αρκετά διαφορετική συγκέντρωση νιτρικών παρακολουθούμε την εξέλιξη της εκχύλισης των NO_3^- στα παρακάτω διαγράμματα.



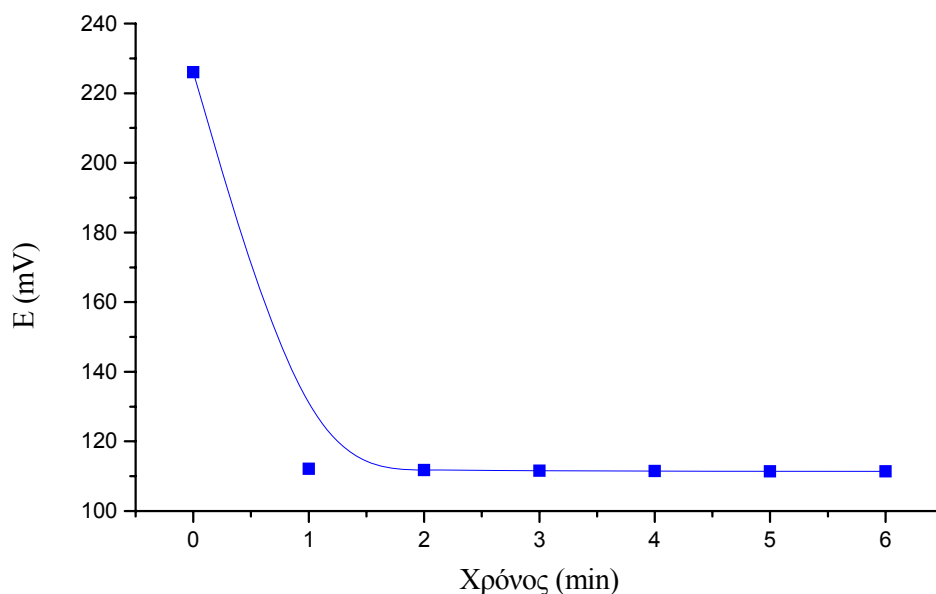
Σχήμα 4.6. Εξέλιξη του δυναμικού, κατά την εκχύλιση 0.1 gr φύλλων ντομάτας με 10 ml H_2O + 10 ml ISA

Στο Σχήμα 4.6 φαίνεται η συμπεριφορά του ηλεκτροδίου κατά την εκχύλιση 0.1 gr ξηρής ύλης φύλλων ντομάτας, με το εκχυλιστικό διάλυμα 10 ml H_2O +10 ml ISA. Όπως παρατηρούμε το δυναμικό του ηλεκτροδίου σταθεροποιείται σε 4 min σε δυναμικό 162,2 mV.

Στο δείγμα με 0.05 gr ξηρής ύλης σπανακιού (Σχήμα 4.7) παρατηρούμε την ίδια μορφή εξέλιξης του δυναμικού, δηλαδή σταθεροποίηση στα 5 min σε δυναμικό 111,4 mV.

Αυτή η μορφή εξέλιξης του δυναμικού κατά την εκχύλιση είναι η συνήθης. Δηλαδή, το δυναμικό του ηλεκτροδίου καταγράφει κάποια ελάχιστη τιμή στην οποία σταθεροποιείται.

Η τιμή του ελάχιστου δυναμικού σχετίζεται με τη μέγιστη ποσότητα των νιτρικών που εκχυλίζονται από το δείγμα.



Σχήμα 4.7. Εξέλιξη δυναμικού κατά την εκχύλιση 0.05 gr σπανάκι με διάλυμα 10 ml H₂O + 10 ml ISA

Υπολογισμός συγκέντρωσης NO₃⁻

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών κατασκευάζεται η γραφική παράσταση ανάμεσα στο δυναμικό του ηλεκτροδίου και τον λογάριθμο της συγκέντρωσης των νιτρικών στο εκχύλισμα, δηλ. η συνάρτηση :

$$E = f(\log [\text{NO}_3^-])$$

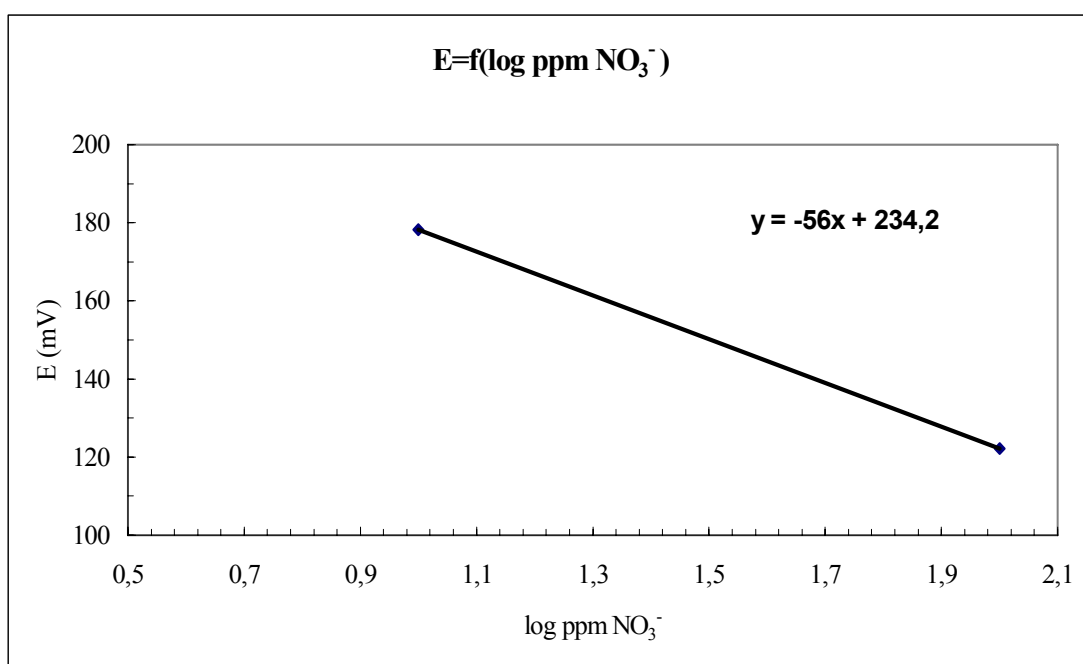
Για συγκεντρώσεις $[\text{NO}_3^-] > 10^{-4} \text{ M}$, όπου η παραπάνω συνάρτηση είναι γραμμική, απαιτούνται δύο πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα νιτρικών για την κατασκευή της γραμμικής απεικόνισης.

Για συγκεντρώσεις: $10^{-6} < [\text{NO}_3^-] < 10^{-4}$, όπου έχουμε απόκλιση από τη γραμμική εξάρτηση, απαιτείται η κατασκευή γραφικής παράστασης με τουλάχιστον τέσσερα πρότυπα διαλύματα νιτρικών.

Για παράδειγμα κατά την μελέτη συμπεριφοράς του ηλεκτροδίου, που είδαμε παραπάνω, πήραμε τις μετρήσεις του πίνακα :

| Διάλυμα | Χρόνος απόκρισης (min) | Ελάχιστο δυναμικό (mV) |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 10 ppm NO ₃ ⁻ | 2 | 178.2 |
| 100 ppm NO ₃ ⁻ | 8 | 122.2 |

Με βάση αυτές τις μετρήσεις αυτές, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση :



Από την εξίσωση της γραφικής παράστασης, $E=234,2-56\log(\text{ppmNO}_3^-)$, υπολογίζεται η συγκέντρωση των νιτρικών στα δείγματα των φυτικών ιστών .

| Δείγμα | Βάρος (gr) | Χρόνος απόκρισης (min) | Ελάχιστο δυναμικό (mV) | Συγκέντρωση mg/kg NO ₃ ⁻ (d.w) |
|----------------|------------|------------------------|------------------------|--|
| Φύλλα ντομάτας | 0.1 | 4 | 162.2 | 1930 |
| Σπανάκι | 0.05 | 5 | 111.4 | 31180 |

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1 Περίληψη

Με την εργασία αυτή γίνεται άμεσος ποτενσιομετρικός προσδιορισμός των NO_3^- , σε ξηρή φυτική ύλη. Η εκχύλιση των νιτρικών γίνεται με ισχυρή ανάδευση, παρουσία ηλεκτροδίου στερεής επαφής (solid contact ISE), το οποίο καταγράφει τη φθίνουσα τάση, μέχρι να σημειωθεί η ελάχιστη τιμή της.

Η ελάχιστη αυτή τιμή δυναμικού, που σημειώνεται ανάλογα με τη περιεκτικότητα των νιτρικών, σε χρόνο 3 – 10 min, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των NO_3^- . Σε κατάλληλο οργανο, είναι δυνατή η απευθείας ανάγνωση της συγκέντρωσης.

Εγιναν μετρήσεις για 4 διαφορετικά βάρη δείγματος, ήτοι: 50, 100, 150, 200 mg

Εξετάστηκαν τρία διαφορετικά φυτικά υλικά : μαρούλι με υψηλά επίπεδα νιτρικών, compost φύλλων ελιάς με μέτρια επίπεδα και καφές με χαμηλό επίπεδο τιμών.

Για κάθε δείγμα, έγινε δοκιμή ανάκτησης (recovery test).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αξιολογήθηκαν με βάση τη κλασσική διαδικασία ανάλυσης με το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο των νιτρικών.

5.2 Υλικά – Μεθοδοι

A. Ηλεκτρόδιο στερεής επαφής (H.Σ.Ε) με σταθερό εσωτερικό ηλεκτρόδιο αναφοράς

Το ηλεκτρόδιο στερεάς επαφής, που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Χημικού Τμήματος Παν/μιου Κρήτης, βασίστηκε σε μεμβράνη PVC με ιονομεταφορέα το σύμπλοκο Ni(II)–φαινανθρολίνης, και πλαστικοποιητή ο-νιτροφαίνυλο-οκτυλ-αιθέρα (ο-NPOE)

Το ηλεκτρόδιο αυτό έχει τουλάχιστον τα ίδια χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλα εμπορικά ηλεκτρόδια νιτρικών, όπως π.χ. το ORION # 93-07. Συγκεκριμένα :

- Οριο ανίχνευσης $5.0 * 10^{-6}$ M
- Κλίση - 56.1 (mV/dec)
- Περιοχή γραμμικότητας $10^{-1} - 10^{-5}$ M
- Χρόνος ζωής > 6 μήνες.

Επίσης το ηλεκτρόδιο αυτό επιδεικνύει μεγάλη σταθερότητα και αντοχή σε υψηλές πιέσεις, γεγονός με ιδιαίτερη σημασία για τη μέθοδο που προτείνουμε.

B. Ιοντόμετρο Crison GLP 22

Χρονική παρακολούθηση δυναμικού (ακρίβεια ± 0.1 mV). Δυνατότητα ανάγνωσης απευθείας σε συγκέντρωση (ppm, M)

Ελεγχος της λειτουργίας μέσω υπολογιστή. Μεταφορά μετρήσεων και ρυθμίσεων σε υπολογιστή.

Σύνδεση με μαγνητικό αναδευτήρα ρυθμιζόμενης ταχύτητας από το όργανο.

Γ. Αντιδραστήρια (analytical grade)

Merck, BDH με ελάχιστη περιεκτικότητα σε NO_3^-

Stock solution 10^{-1} M και 1000 ppm KNO_3 . Για τη παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Φυλάσσονται στο ψυγείο (4°C)

Διάλυμα ISA (Ionic Strength Adjustor, Ρύθμισης Ιονικής Ισχύος)

Το διάλυμα ISA που χρησιμοποιείται, προτείνεται από τις ‘‘ Standard Methods for Examination of Waters and Waste Waters’’ και αποσκοπεί στη μείωση των παρεμβολών από την οργανική ύλη και διάφορα ιόντα (Cl^- , NO_2^- , HCO_3^- , Br^- , J^- , $\text{S}^{=}$, CN^-). Αποτελείται από : $0.01 \text{ M Al}_2(\text{SO}_4)_3 - 0.02 \text{ M H}_3\text{BO}_3 - 0.01 \text{ M Ag}_2\text{SO}_4$

0.02 M $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ και με $\text{PH}=3$, ρυθμισμένο με διάλυμα 0.1 N NaOH .

5.3 Διαδικασία.

A. Προετοιμασία δείγματος – ηλεκτροδίου

Τα δείγματα νωπού φυτικού υλικού πλένονται, ξηραίνονται στους 70°C για 48 ώρες, αλέθονται και συλλέγεται το κλάσμα που περνάει από κόσκινο 40 mesh.

Το ηλεκτρόδιο αφήνεται να παραμείνει με ελαφρά ανάδευση επί 1 ώρα σε διάλυμα 0.01 M KNO_3 (ή 0.001 M, εάν πρόκειται να γίνουν μετρήσεις σε χαμηλές συγκεντρώσεις).

Η ρύθμιση του ηλεκτροδίου γίνεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί με 2 πρότυπα διαλύματα KNO_3 , συγκέντρωσης S_1 , S_2 . Συγκεκριμένα, γίνεται δοκιμαστική μέτρηση στο δείγμα και προσδιορίζονται τα επίπεδα συγκέντρωσης S_x των νιτρικών στο εκχύλισμα. Τα πρότυπα διαλύματα επιλέγονται έτσι που να περιλαμβάνουν, μεταξύ τους, την συγκέντρωση του δείγματος δηλαδή, $S_1 < S_x < S_2$ και επιπλέον η σχέση των συγκεντρώσεων των δύο προτύπων να είναι : $S_2/S_1=5-10$

Αν οι συγκεντρώσεις του δείγματος στο εκχύλισμα είναι μικρές ($S_x < 10^{-5}$ M) απαιτείται η κατασκευή γραφικής παράστασης με 4 τουλάχιστον πρότυπα διαλύματα.

B. Μέτρηση.

Ορισμένο βάρος δείγματος ζυγίζεται σε διάλυμα 10 ml H_2O + 10 ml ISA.

Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά, παρουσία του ηλεκτροδίου, ενώ το ιοντόμετρο καταγράφει συνεχώς το δυναμικό, συναρτήσει του χρόνου. Σε χρόνο που εξαρτάται από τη περιεκτικότητα των νιτρικών (3 – 10 min), καταγράφεται κάποια ελάχιστη τιμή δυναμικού (ακρίβεια 0.1 mV). Η ελάχιστη αυτή τιμή δυναμικού χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των νιτρικών.

Με τη μέθοδο αυτή μετρήθηκε η συγκέντρωση των νιτρικών για τέσσερα διαφορετικά βάρη, κάθε δείγματος : 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 g

Παράλληλα για τον έλεγχο των παραπάνω μετρήσεων, έγινε προσδιορισμός των νιτρικών με τη κλασσική μεθοδολογία ποτενσιομετρικού προσδιορισμού με ηλεκτρόδιο (Miham P.J., et al, 1970, Mitrakas M.G., et al, 1990, Standard Methods for Examination of Waters and Waste Waters).

δηλαδή:

Ζύγιση δείγματος στο διάλυμα 10 ml H₂O + 10 ml ISA. Ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα για 15 min, διήθηση και μέτρηση του δυναμικού σε 3min.

Τέλος για κάθε είδους δείγματος έγινε δοκιμή ανάκτησης (recovery test) με την προτεινόμενη μέθοδο.

5.4 Μετρήσεις

Παρουσιάζουμε τα αποτελέσματα των μετρήσεων, για κάθε ένα από τα δείγματα, στους πίνακες και στα διαγράμματα που ακολουθούν :

A. Δείγμα μαρουλιού (υψηλής συγκέντρωσης σε νιτρικά)

Στους πίνακες 5.1 – 5.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων, με την προτεινόμενη μέθοδο (άμεση μέθοδος), για τα βάρη δείγματος 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 gr. Για κάθε βάρος δίνονται αναλυτικά τα ελάχιστα δυναμικά του ηλεκτροδίου, για τις 4 μετρήσεις που έγιναν και ο χρόνος που σημειώνονται τα δυναμικά (χρόνος απόκρισης). Από τις μετρήσεις αυτές υπολογίζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων των νιτρικών στο ξηρό δείγμα ppm NO₃⁻ (d.w), ο μέση τιμή (ave), η τυπική απόκλιση (s.d) και ο συντελεστής μεταβλητότητας C.V (coefficient of variation)

Πίνακας 5.1

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.05 gr δείγματος μαρουλιού.

| A/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO ₃ ⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|-----|--------------|---------------|--|-------|-----|-------|
| 1 | 5 | 86,6 | 20386 | 20644 | 418 | 2,02% |
| 2 | 5 | 85,5 | 21262 | | | |
| 3 | 5 | 86,6 | 20386 | | | |
| 4 | 6 | 86,4 | 20542 | | | |

Πίνακας 5.2

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.10 gr δείγματος μαρουλιού.

| A/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO ₃ ⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|-----|--------------|---------------|--|-------|-----|-------|
| 1 | 4 | 67,9 | 20842 | 20923 | 269 | 1,28% |
| 2 | 5 | 67,7 | 21002 | | | |
| 3 | 4 | 68,2 | 20604 | | | |
| 4 | 6 | 67,4 | 21244 | | | |

Πίνακας 5.3

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.15 gr δείγματος μαρουλιού.

| a/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO ₃ ⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|-----|--------------|---------------|--|-------|-----|-------|
| 1 | 5 | 60,0 | 18786 | 18650 | 380 | 2,03% |
| 2 | 4 | 59,8 | 18940 | | | |
| 3 | 7 | 60,0 | 18786 | | | |
| 4 | 6 | 61,0 | 18091 | | | |

Πίνακας 5.4

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.20 gr δείγματος μαρουλιού.

| a/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------|------------|------------|
| 1 | 3 | 52,2 | 18997 | 19278 | 551 | 2,80% |
| 2 | 6 | 50,8 | 20043 | | | |
| 3 | 5 | 51,8 | 19291 | | | |
| 4 | 5 | 52,5 | 18781 | | | |

Στον επόμενο Πίνακα 5.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων με την μέθοδο αναφοράς (κλασική μέθοδος), για όλα τα βάρη δείγματος. Για κάθε βάρος έγιναν 3 μετρήσεις. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές.

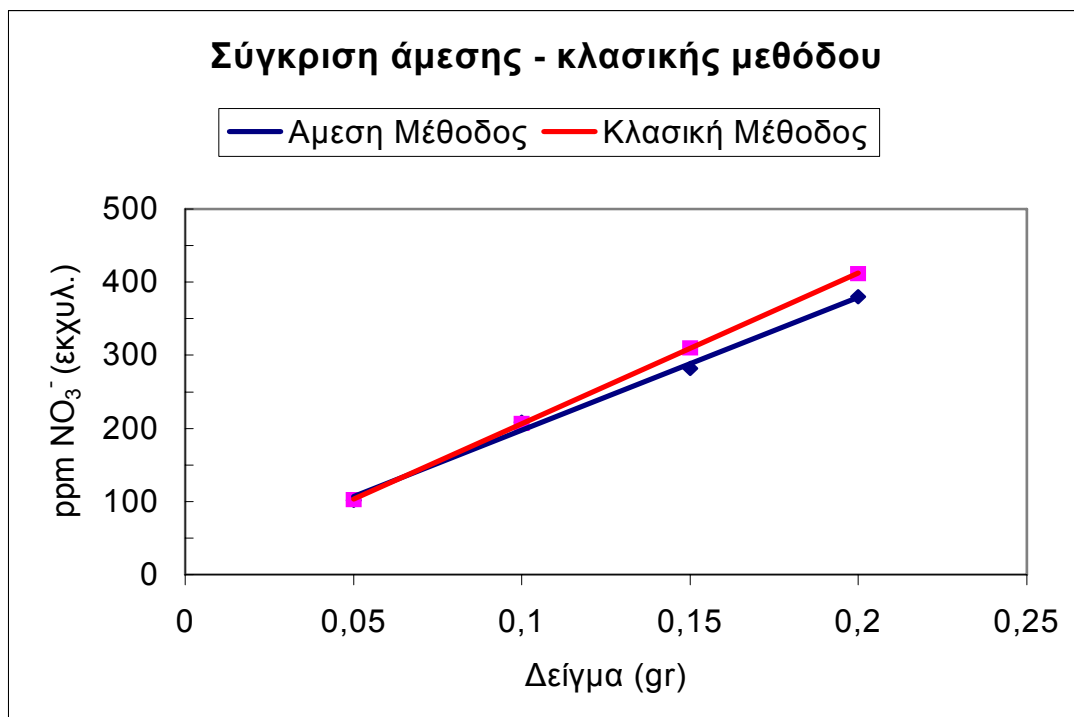
Πίνακας 5.5

Κλασική μέθοδος. Μετρήσεις – αποτελέσματα για το δείγμα μαρουλιού.

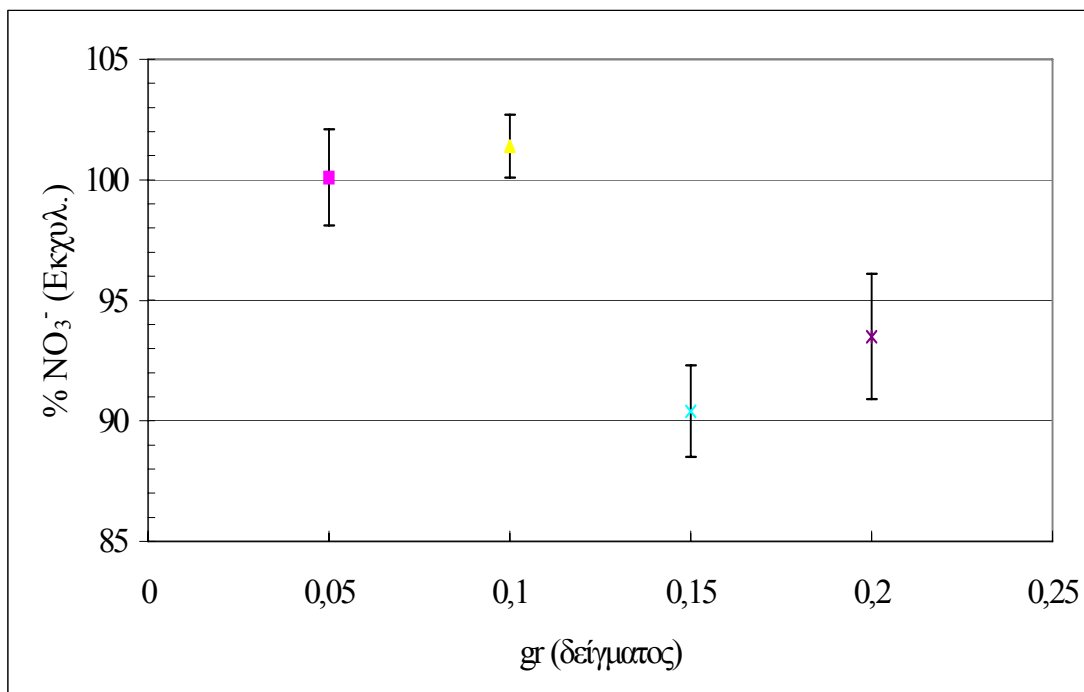
| Δείγμα (gr) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave | s.d | C.V |
|------------------------|--------------------------|---|------------|------------|------------|
| 0.05 | 86,4 | 20542 | 20623 | 61 | 0,30% |
| 0.10 | 68,1 | 20683 | | | |
| 0.15 | 57,5 | 20682 | | | |
| 0.20 | 50,1 | 20586 | | | |

Στο διαγραμμα Σχήμα 5.1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των νιτρικών στο εκχύλισμα, όπως μετρήθηκαν με τις δύο μεθόδους (άμεση και κλασική), για τα βάρη του δείγματος, όπου έγιναν μετρήσεις.

Στο Σχήμα 5.2 απεικονίζονται με τη μορφή error bars οι % τυπικές αποκλίσεις, για όλα τα βάρη δείγματος. Το 100% αντιστοιχεί στη συγκέντρωση νιτρικών, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο αναφοράς, δηλαδή 20623 ppm.



Σχήμα 5.1. Σύγκριση ppm NO₃⁻ στο εκχύλισμα, ανάμεσα στην άμεση και κλασική μέθοδο, για τα βάρη δείγματος μαρουλιού.



Σχήμα 5.2. Απεικόνιση της τυπικής απόκλισης %, για τα βάρη του δείγματος μαρουλιού.

Για τη δοκιμή ανάκτησης (recovery test), στο δείγμα μαρουλιού, προστέθηκαν 10000 mg/kg NO₃⁻, έτσι η μέση ολική συγκέντρωση των νιτρικών έγινε:

$$20623 + 10000 = 30623 \text{ ppm NO}_3^-$$

Εγιναν 4 μετρήσεις με την άμεση μέθοδο, σε βάρος δείγματος 0.1 gr
Στον πίνακα 5.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεσσάρων μετρήσεων, το ποσοστό ανάκτησης % (Rec.%) και ο μέσος όρος ανάκτησης %.

Πίνακας 5.6

Δοκιμή ανάκτησης σε δείγμα μαρουλιού

| α/α | Δείγμα (gr) | Δυναμικό E(mV) | ppm NO ₃ ⁻ (d.w) | Ανάκτηση (Rec. %) | Μέση Τιμή |
|-----|-------------|----------------|--|-------------------|-----------|
| 1 | 0.1076 | 49,0 | 30139 | 98,4% | 101,05% |
| 2 | 0.1084 | 47,7 | 31445 | 102,7% | |
| 3 | 0.1046 | 48,8 | 31242 | 102,0% | |
| 4 | 0.1051 | 48,9 | 30975 | 101,1% | |

Στο τέλος του κεφαλαίου, στους Πίνακες 5.20, 5.21, 5.22 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το μαρούλι και τα άλλα δείγματα που εξετάζονται στην συνέχεια.

B. Δείγμα compost φύλλων ελιάς. (Μέτρια συγκέντρωση νιτρικών)

Αντίστοιχα, όπως για το δείγμα μαρουλιού, παρουσιάζονται οι πίνακες με τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το δείγμα compost, που παρασκευάστηκε με φύλα ελιάς, από τα απορρίμματα των ελαιουργείων.

Πίνακας 5.7

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.05 gr δείγματος compost.

| a/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------|------------|------------|
| 1 | 9 | 126,3 | 2733 | 2879 | 247 | 8,57% |
| 2 | 8 | 123,3 | 3157 | | | |
| 3 | 9 | 124,3 | 3009 | | | |
| 4 | 9 | 127,2 | 2617 | | | |

Πίνακας 5.8

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.10 gr δείγματος compost.

| a/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------|------------|------------|
| 1 | 9 | 109,7 | 3035 | 3065 | 75 | 2,40% |
| 2 | 6 | 108,8 | 3169 | | | |
| 3 | 8 | 109,5 | 3064 | | | |
| 4 | 7 | 110,0 | 2992 | | | |

Πίνακας 5.9

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.15 gr δείγματος compost.

| a/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------|------------|------------|
| 1 | 6 | 102,3 | 2855 | 2908 | 37 | 1,27% |
| 2 | 7 | 101,9 | 2944 | | | |
| 3 | 6 | 102,1 | 2916 | | | |
| 4 | 7 | 102,1 | 2916 | | | |

Πίνακας 5.10

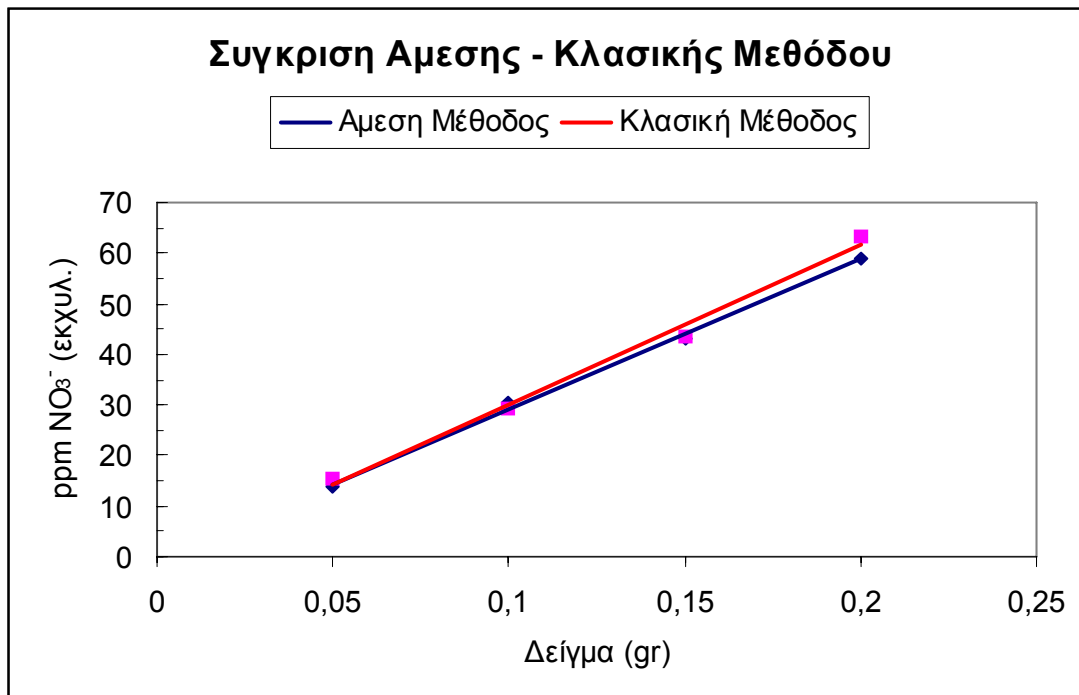
Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.20 gr δείγματος compost.

| a/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------|------------|------------|
| 1 | 8 | 95,9 | 2946 | 2950 | 29 | 0,98% |
| 2 | 7 | 95,6 | 2989 | | | |
| 3 | 9 | 95,9 | 2946 | | | |
| 4 | 6 | 96,1 | 2918 | | | |

Πίνακας 5.11

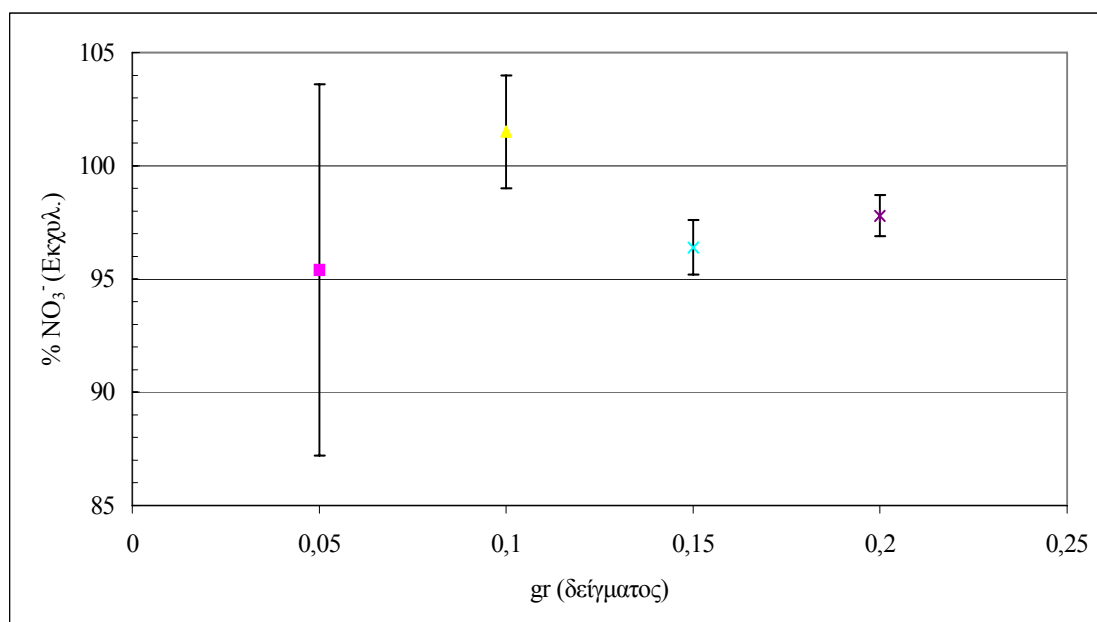
Κλασική μέθοδος. Μετρήσεις – αποτελέσματα για το δείγμα compost.

| Δείγμα (gr) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave | s.d | C.V |
|------------------------|--------------------------|---|------------|------------|------------|
| 0.05 | 124,0 | 3053 | 3017 | 74 | 2,40% |
| 0.10 | 110,4 | 2935 | | | |
| 0.15 | 102,1 | 2916 | | | |
| 0.20 | 94,5 | 2950 | | | |



Σχήμα 5.3. Σύγκριση ppm NO₃⁻ στο εκχύλισμα, ανάμεσα στην άμεση και κλασική μέθοδο, για τα βάρη δείγματος compost που εξετάζονται.

Τα διαγράμματα σύγκρισης της άμεσης μεθόδου και της κλασικής, όπως και αυτό της τυπικής απόκλισης%, για κάθε βάρος δείγματος, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.3 και 5.4.



Σχήμα 5.4. Απεικόνιση της τυπικής απόκλισης %, για τα βάρη του δείγματος compost.

Για τη δοκιμή ανάκτησης (recovery test), στο δείγμα compost, προστέθηκαν 11995 mg/kg NO₃⁻, έτσι η μέση ολική συγκέντρωση των νιτρικών έγινε:

$$3018 + 11995 = 15013 \text{ ppm NO}_3^-$$

Εγιναν 4 μετρήσεις με την άμεση μέθοδο, σε βάρος δείγματος 0.1 gr
Στον πίνακα 5.12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεσσάρων μετρήσεων, με το ποσοστό ανάκτησης % (Rec.%) και ο μέσος όρος ανάκτησης %.

Πίνακας 5.12

Δοκιμή ανάκτησης σε δείγμα compost.

| α/α | Δείγμα (gr) | Δυναμικό E(mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ανάκτηση (Rec. %) | Μέση Τιμή |
|------------|------------------------|---------------------------|---|------------------------------|----------------------|
| 1 | 0.1018 | 78,5 | 15031 | 100,1% | 100,4% |
| 2 | 0.1032 | 79,4 | 14149 | 94,2% | |
| 3 | 0.1022 | 77,9 | 15447 | 102,9% | |
| 4 | 0.1007 | 77,7 | 15677 | 104,4% | |

Στο τέλος του κεφαλαίου στον Πίνακα 5.21 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των μετρήσεων για το δείγμα compost φύλλων ελιάς.

Γ. Δείγμα καφέ (χαμηλής περιεκτικότητας σε νιτρικά)

Στο δείγμα καφέ, με αναμενόμενη χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών (< 5 ppm) στο εκχύλισμα, κατασκευάζεται η γραφική παράσταση της συνάρτησης :

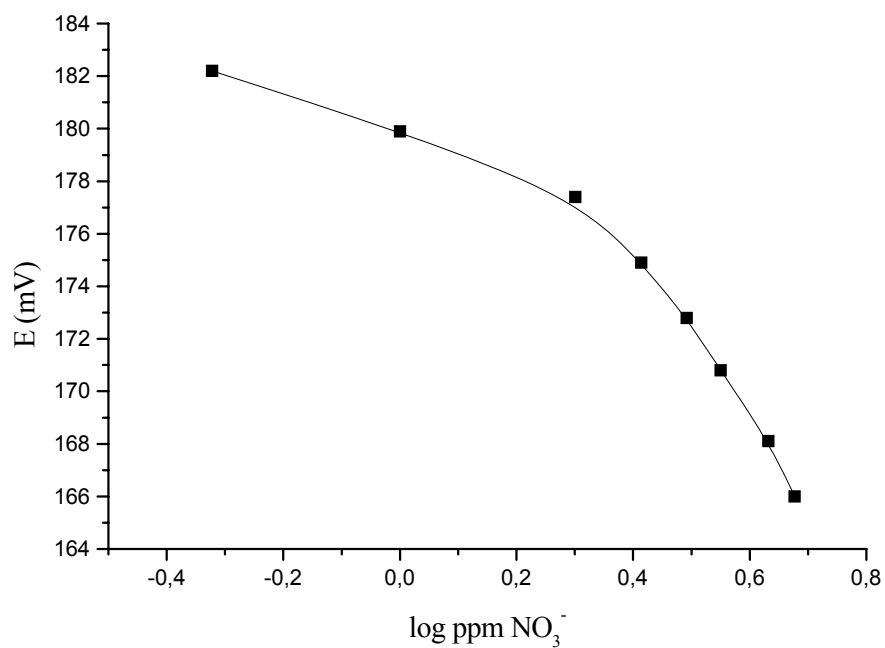
$$E = f(\log \text{ppmNO}_3^-)$$

Στον πίνακα 5.13 παρατίθενται τα δεδομένα της κατασκευής της γραφικής παράστασης (Σχήμα 5.6) , που προέκυψε με διαδοχική προσθήκη πρότυπου διαλύματος 10 ppm NO₃⁻ σε διάλυμα 10 ml H₂O + 10 ml ISA.

Πίνακας 5.13

Δεδομένα κατασκευής γραφικής παράστασης $E = f(\log \text{ppmNO}_3^-)$ για μετρήσεις χαμηλής συγκέντρωσης νιτρικών.

| α/α | Προσθήκη ml διαλυμ. 10ppm NO ₃ ⁻ | Τελική Συγκέντρωση (ppm NO ₃ ⁻) | log ppm NO ₃ ⁻ | E (mV) |
|-----|--|--|--------------------------------------|--------|
| 1 | 1 | 0,476 | -0,322 | 182,2 |
| 2 | 2 | 1,000 | 0,000 | 179,9 |
| 3 | 2 | 2,000 | 0,301 | 177,4 |
| 4 | 2 | 2,592 | 0,414 | 174,9 |
| 5 | 2 | 3,103 | 0,492 | 172,8 |
| 6 | 2 | 3,548 | 0,550 | 170,8 |
| 7 | 4 | 4,286 | 0,632 | 168,1 |
| 8 | 4 | 4,872 | 0,677 | 166,0 |



Σχήμα 5.6 Γραφική απεικόνιση της $E = f(\log \text{ppmNO}_3^-)$

Στους επόμενους πίνακες δίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων, στο δείγμα καφέ, της άμεσης μεθόδου.

Πίνακας 5.14

Άμεση μέθοδος, Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.05 gr δείγματος καφέ.

| a/a | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO ₃ ⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|-----|--------------|---------------|--|-------|-----|-------|
| 1 | 9 | 180,4 | 356,5 | 325,2 | 41 | 12,6% |
| 2 | 7 | 180,3 | 364,8 | | | |
| 3 | 9 | 181,0 | 289,8 | | | |
| 4 | 10 | 181,0 | 289,8 | | | |

Πίνακας 5.15

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.10 gr δείγματος καφέ.

| α/α | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------|------------|------------|
| 1 | 8 | 178,0 | 355,6 | 343,0 | 20 | 5,8% |
| 2 | 9 | 178,2 | 328,1 | | | |
| 3 | 9 | 177,9 | 363,9 | | | |
| 4 | 7 | 178,3 | 324,4 | | | |

Πίνακας 5.16

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.15 gr δείγματος καφέ.

| α/α | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------|------------|------------|
| 1 | 10 | 175,6 | 327,3 | 348,3 | 25 | 7,17% |
| 2 | 10 | 174,7 | 384,5 | | | |
| 3 | 10 | 175,0 | 342,7 | | | |
| 4 | 8 | 175,1 | 338,8 | | | |

Πίνακας 5.17

Άμεση μέθοδος. Μετρήσεις- αποτελέσματα για 0.20 gr δείγματος καφέ.

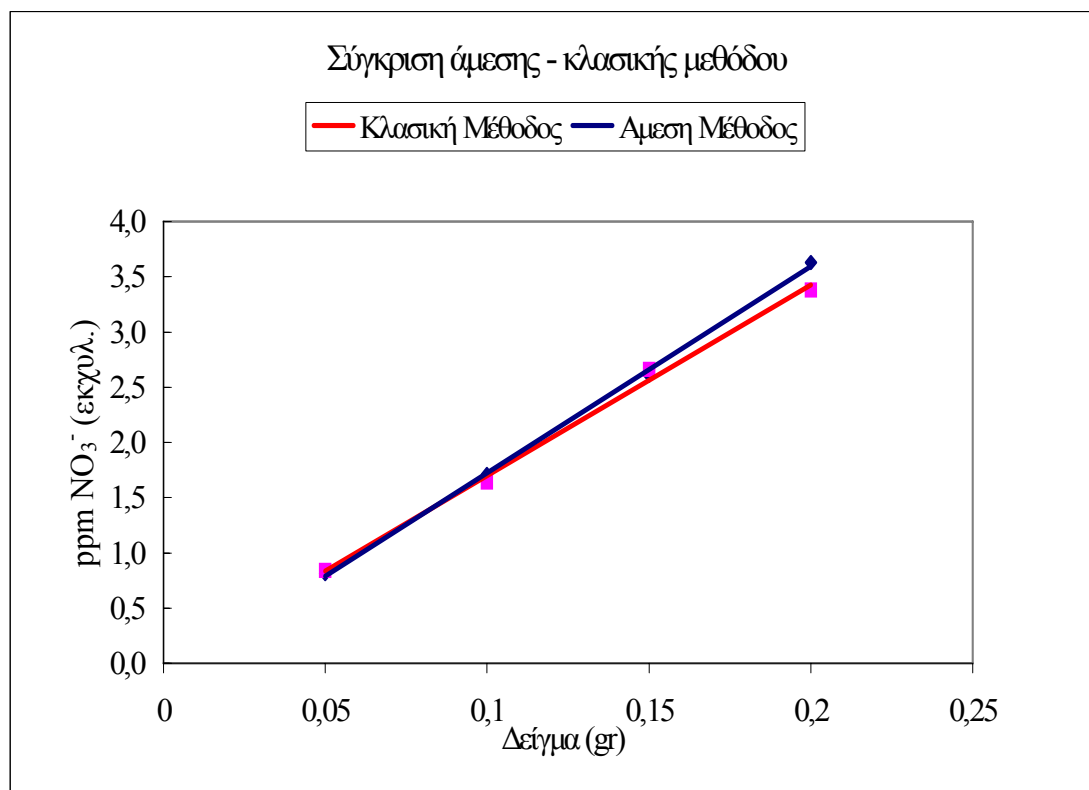
| α/α | Χρόνος (min) | Δυναμικό (mV) | ppm NO₃⁻ (d.w) | Ave. | s.d | C.V |
|------------|-------------------------|--------------------------|---|-------------|------------|------------|
| 1 | 10 | 171,3 | 346,7 | 363,3 | 15 | 4,12% |
| 2 | 9 | 170,4 | 371,5 | | | |
| 3 | 8 | 170,0 | 380,2 | | | |
| 4 | 10 | 171,0 | 354,8 | | | |

Πίνακας 5.18

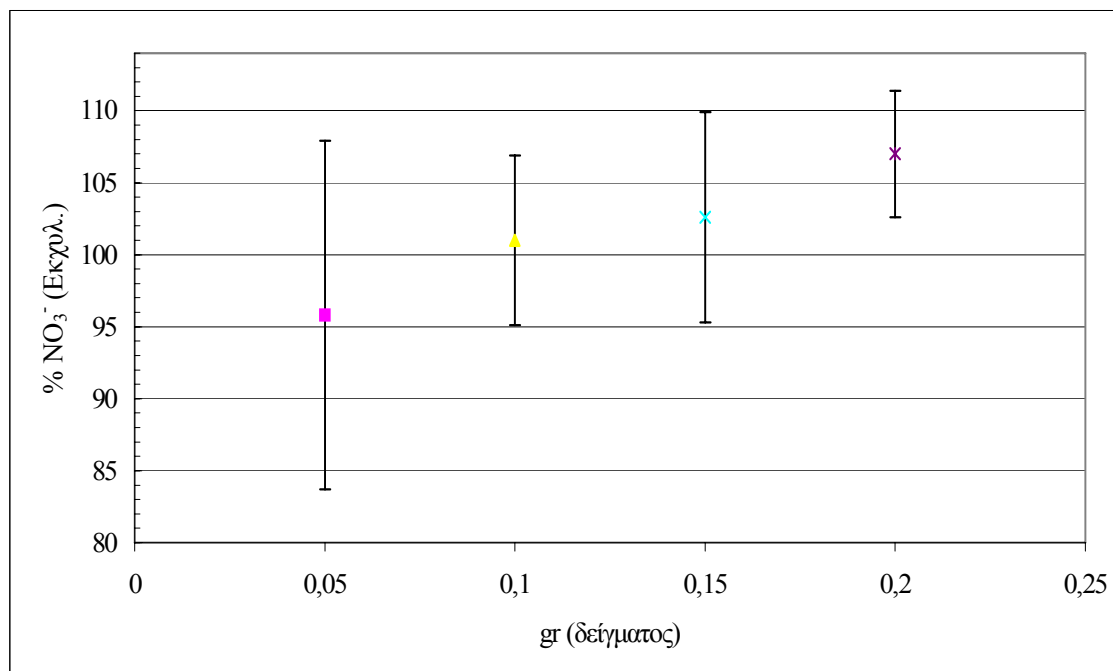
Κλασική μέθοδος. Μετρήσεις – αποτελέσματα για το δείγμα καφέ.

| Δείγμα (gr) | Δυναμικό (mV) | ppm NO ₃ ⁻ (d.w) | Ave | s.d | C.V |
|-------------|---------------|--|-------|-----|------|
| 0.05 | 180,8 | 336,5 | 339,5 | 11 | 3,2% |
| 0.10 | 178,2 | 328,0 | | | |
| 0.15 | 174,5 | 354,7 | | | |
| 0.20 | 171,4 | 338,8 | | | |

Τα διαγράμματα σύγκρισης της άμεσης μεθόδου και της κλασικής, όπως και αυτό της τυπικής απόκλισης%, για κάθε βάρος δείγματος, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.7 και 5.8.



Σχήμα 5.7. Σύγκριση ppm NO₃⁻ στο εκχύλισμα ανάμεσα στην άμεση και κλασική μέθοδο, για τα βάρη δείγματος καφέ που εξετάζονται.



Σχήμα 5.8. Απεικόνιση της τυπικής απόκλισης %, για τα βάρη του δείγματος καφέ.

Για τη δοκιμή ανάκτησης (recovery test), στο δείγμα καφέ, προστέθηκαν 900 mg/kg NO₃⁻, έτσι η μέση ολική συγκέντρωση των νιτρικών έγινε:

$$339,5 + 900 = 1239,5 \text{ ppm NO}_3^-$$

Εγιναν 4 μετρήσεις με την άμεση μέθοδο, σε βάρος δείγματος 0.1 gr

Στον πίνακα 5.19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τεσσάρων μετρήσεων, με το ποσοστό ανάκτησης % (Rec.%) και ο μέσος όρος ανάκτησης %.

Πίνακας 5.19

Δοκιμή ανάκτησης σε δείγμα καφέ.

| α/α | Δείγμα (gr) | Δυναμικό E(mV) | ppm NO ₃ ⁻ (d.w) | Ανάκτηση (Rec. %) | Μέση Τιμή |
|-----|-------------|----------------|--|-------------------|-----------|
| 1 | 0.1015 | 149,9 | 1246 | 100,5% | 100,05% |
| 2 | 0.1056 | 149,0 | 1247 | 100,6% | |
| 3 | 0.1029 | 150,0 | 1224 | 98,7% | |
| 4 | 0.1021 | 149,8 | 1244 | 100,4% | |

Πίνακας 5.20

Μετρήσεων – αποτελεσμάτων δείγματος μαρουλιού

| | Άμεση | | | | Κλασική | Δοκ. Ανακτ. Rec% |
|-------|------------------------|--------|--|-------|----------------------------------|--|
| M(gr) | E(mV) Ελάχιστη | t(min) | ppm NO ₃ ⁻ x ±s.d | C.V | ppm NO ₃ ⁻ | ppmNO ₃ ⁻ +10000ppm |
| 0.05 | 86.4-86.6 ^d | 5-6 | 20644±418 ^a | 2.02% | 20542 ^b | |
| 0.10 | 67.4-68.2 | 4-5 | 20923±269 | 1.28% | 20683 | 30950 ^c (101.05%) |
| 0.15 | 59.8-61.0 | 4-7 | 18650±380 | 2.03% | 20682 | |
| 0.20 | 50.8-52.5 | 3-6 | 19278±551 | 2.80% | 20586 | |
| | | | | | x±s.d=20623±61 | |

a: μέση τιμή και τυπική απόκλιση 4 επαναλήψεων.

b: μέση τιμή 3 επαναλήψεων.

c: μέση τιμή 4 επαναλήψεων.

d: ακραίες τιμές 4 επαναλήψεων.

Πίνακας 5.21

Μετρήσεων - αποτελεσμάτων δείγματος compost φύλλων ελιάς

| m(gr) | Αμεση | | | | Κλασική | Δοκ.Α νακτ Rec.% |
|-------|--------------------------|--------|--|-------|----------------------------------|--|
| | E(mV) Ελάχιστη | t(min) | ppm NO ₃ ⁻ x ±s.d | C.V | ppm NO ₃ ⁻ | ppmNO ₃ ⁻ +11995ppm |
| 0.05 | 123.3-127.2 ^d | 8-9 | 2879±247 ^a | 8.57% | 3053 ^b | |
| 0.10 | 108.8-110.0 | 6-9 | 3065±75 | 2.40% | 2935 | 15076 ^c (100.4%) |
| 0.15 | 101.9-102.3 | 6-7 | 2908±37 | 1.27% | 2916 | |
| 0.20 | 95.6-96.1 | 7-9 | 2950±29 | 0.98% | 3167 | |
| | | | | | x±s.d = 3017±74 | |

Πίνακας 5.22

Μετρήσεων - αποτελεσμάτων δείγματος καφέ

| | Άμεση | | | | Κλασική | Δοκ. Ανακτ. Rec% |
|-------|--------------------------|--------|--|-------|----------------------------------|---|
| m(gr) | E(mV) Ελάχιστη | t(min) | ppm NO ₃ ⁻ x ±s.d | C.V | ppm NO ₃ ⁻ | ppmNO ₃ ⁻ +900 ppm |
| 0.05 | 180.3-181.0 ^d | 4-9 | 325±41 ^a | 12.6% | 336.5 ^b | |
| 0.10 | 177.9-178.3 | 7-9 | 343±20 | 5.80% | 328.0 | 1240 ^c (100.05%) |
| 0.15 | 174.7-175.6 | 8-10 | 348±25 | 7.17% | 354.7 | |
| 0.20 | 170.0-171.3 | 9-10 | 363±15 | 4.12% | 338.8 | |
| | | | | | x±s.d = 339±11 | |

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για όλες τις μετρήσεις των νιτρικών, που παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ηλεκτρόδιο νιτρικών στερεάς επαφής.

Το ηλεκτρόδιο επέδειξε υψηλή αντοχή, αφού πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι κατά την μέτρηση του δυναμικού είχαμε σταθερές συνθήκες ισχυρής ανάδευσης του υδατικού εκχυλίσματος του φυτικού ιστού, προκειμένου να πετύχουμε καλό βαθμό εκχύλισης των νιτρικών.

Η ευαισθησία (κλίση, slope) του ηλεκτροδίου σε όλη τη διάρκεια των μετρήσεων κυμάνθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα και συγκεκριμένα :

$$\text{Κλίση} = S = -51,9 \text{ έως } -60,2 \text{ mV/dec}$$

Για τις μετρήσεις, σε συγκεντρώσεις νιτρικών στο εκχύλισμα μεγαλύτερες των 5 ppm χρησιμοποιήθηκαν – όπως έχει ήδη αναφερθεί - δύο πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα νιτρικών κατάλληλης συγκέντρωσης, ενώ για μετρήσεις σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις κατασκευάστηκε γραφική παράσταση τουλάχιστον τεσσάρων πρότυπων διαλυμάτων.

Στο δείγμα με υψηλή συγκέντρωση νιτρικών (δείγμα μαρουλιού) ο χρόνος απόκρισης του ηλεκτροδίου κυμαίνεται από 3 έως 7 min, με συχνότερη τιμή 5 min.

Οι τιμές του C.V που κυμαίνονται από 1,28% μέχρι 2,80%, ανάλογα με το βάρος δείγματος, δείχνουν ότι η μέθοδος είναι ακριβής.

Από τη σύγκριση με τη κλασική μέθοδο φαίνεται ότι για τα μεγάλα βάρη δείγματος 0.20 και 0.15 gr, έχουμε μικρότερες τιμές νιτρικών με την άμεση μέθοδο, πιθανώς λόγω αδυναμίας για πλήρη εκχύλιση των νιτρικών.

Η δοκιμή ανάκτησης δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα για 0.1 gr (98,4 - 102,7%) με μέση τιμή 101,05%

Για το δείγμα compost με μέτρια συγκέντρωση νιτρικών, ο χρόνος απόκρισης του ηλεκτροδίου κυμαίνεται από 6 έως 9 min.

Οι τιμές του C.V είναι καλές (0,98 – 2,40%), εκτός από την τιμή 8,57% για βάρος δείγματος 0.05 gr.

Από τη σύγκριση των δύο μεθόδων (Σχήμα 5.3) προκύπτει πάλι σε μικρότερο βαθμό, μειωμένη τιμή νιτρικών για βάρος δείγματος 0.15 και 0.2 gr.

Η δοκιμή ανάκτησης έχει μεγαλύτερη τυπική απόκλιση (94,2 – 104,4%) από ότι στη προηγούμενη περίπτωση, αλλά δίνει καλή μέση τιμή 100,4%.

Στο δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών (καφές) ο χρόνος απόκρισης του ηλεκτροδίου κυμαίνεται από 7 έως 10 min. Όπως φαίνεται είναι σαφώς αυξημένος (σχεδόν διπλάσιος) σε σχέση με το δείγμα με υψηλή περιεκτικότητα σε νιτρικά. Αυτό οφείλεται στην αργή απόκριση του ηλεκτροδίου, οποτεδήποτε μετράει χαμηλές συγκεντρώσεις .

Από την σύγκριση με την κλασική μέθοδο προκύπτουν αυξημένες τιμές κυρίως για τα βάρη 0.15 και 0.20 gr

Οι τιμές C.V είναι επίσης μεγάλες (4,12 – 7,17%). Η τιμή μάλιστα για το μικρότερο βάρος 0.05 gr είναι 12,6%. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις στο εκχύλισμα είναι στο όριο ανίχνευσης της ποτενσιομετρικής μεθόδου.

Η δοκιμή ανάκτησης δίνει πάλι καλά αποτελέσματα, με μέση τιμή 100,05%.

Γενικά, θεωρώντας τη μέθοδο που προτείνεται, μπορούμε να πούμε :

- ότι είναι ακριβής, διότι οι περισσότερες τιμές του συντελεστή μεταβλητότητας C.V (coefficient of variation) είναι μικρότερες του 2,5%.
- τα ποσοστά ανάκτησης, μετά από προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων νιτρικών ήταν όλα περίπου 100% που επιβεβαιώνει την ακρίβεια και καθιστά τη μέθοδο αξιόπιστη στις εφαρμογές.
- η σύγκριση με την κλασική μέθοδο έδειξε καλή σύμπτωση τιμών, ιδιαίτερα για βάρος δείγματος 0.1 gr
- το βάρος δείγματος 0.1 gr, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε όλα τα είδη φυτικού υλικού.

Η άμεση μέθοδος έχει μιά σειρά πλεονεκτήματα συγκρινόμενη με τη κλασική ποτενσιομετρική μέθοδο και βεβαίως με όλες τις άλλες μεθόδους που προσδιορίζουν τα νιτρικά σε φυτικούς ιστούς :

- είναι απλούστερη, όσον αφορά τη διαδικασία.
- είναι οικονομικότερη και για τα όργανα που χρησιμοποιεί και τα αντιδραστήρια, που χρειάζεται.
- είναι σαφώς πιο γρήγορη μέθοδος, ακόμα και στη περίπτωση που έχουμε μεγάλο χρόνο απόκρισης στις χαμηλές συγκεντρώσεις.
- παρακάμπτει τα στάδια της μηχανικής ανάδευσης και διήθησης ή φυγοκέντρησης, κερδίζοντας σε χρόνο, όργανα και εργασία.
- προσφέρεται περισσότερο για αυτοματοποίηση.

Είναι φανερό από την περιγραφή της μεθόδου, ότι αυτή μπορεί να εφαρμοστεί χωρίς καμμία τροποποίηση σε αναλύσεις νερών, περιβαλλοντικών δειγμάτων (υγρά και στερεά απόβλητα). Επίσης μεγάλο ενδιαφέρον έχει η προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου στο προσδιορισμό νιτρικών, σε εδαφικά δείγματα και νωπή φυτική ύλη, όπου οι συνθήκες εκχύλισης είναι ιδιαίτερα έντονες και ο χρόνος που συνήθως απαιτείται είναι αρκετά μεγάλος.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αγγελάκης Α.Ν., Tchobonoglous G., Υγρά Απόβλητα ., Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. **1995**.
- Ανδρεδάκης Γ.Ε., *Εργασία για Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης*.**1998**.
- Babko A.K., Pilipenko A.T., in *Photometric Analysis*, MIR Publishers Moscow,**1974**.
- Bremner J.M.. in : *Methods of Soil Analysis, Part 2*, **1965**, American Society of Agronomy, Madison WI, pp. 1216-1219.
- Bremner, J.M., Bundy L.G., Agarwal, A.S., *Anal.Letters*. **1968**, 1, 837-844
- Campanella L., et al, *Sensors and Actuators B*, 26-27, **1995**, 329-335
- Cantliffe D., Mac Donald G.E., Peck N.H., *New York Food and Life Sciences Bul.3*. **1970**. 7p.
- Cantliffe, D.J. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* **1972**, 97, 414-418
- Cataldo D.A., Haroon M., Shrader L.E., Youngs V.L., *Commun. Soil Science and Plant analysis*. **1975**. 6 (1) : 71-80
- Consalter, A., Rigato, A., Clamor L., Gianton P., *Journal of food composition and analysis* **1992**, 5,3 252-256
- Corre W.J., Breimer T., *Literary Survey 39 BUDOC*, Wagengen, The Netherlands.

- Cottenie A., Verloo M., Kienkes L., Velche G., Carnerlynck R., *Chemical analysis of plants and soils*. **1982.**, I.W.O.N.L., Brussels
- Darwinkel, A. *PUDOC*, **1975**, Wageningen, The Netherlands.
- Ebdon I., Braven J., Frampton N.C., *Analyst*, **1991**, 116, 1005-1010.
- ECETOC (European Chemical Industry Ecology and Toxicology Center).**1988**. Nitrate and drinking water. Technical Report No. 27, Brussels, Belgium.
- Eisenman G., Rudin D.O., Casby J.D., *Science.*,**1957**, 126, 831
- Griffin G., Jokela W., Ross D., *Recommended Nitrate – N Tests*. Agronomy Facts.17. Pennsylvania State Univ. **1996**
- Hara H., Ohkubo H., Sawai K., *Analyst*, **1993**, 118,549-552.
- Hartz, T.K., Smith, R.F., **1993.**, *Commun.Soil. Sci. Plant Anal.* 24, 2607-15
- Hoffmeister F., *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol*, **1888**, 24,247
- Hunt, J. and Seymour, D.J. *Analyst*. **1985**, 110, 131-133
- Huskins R.S., Bachas L.G., *Anal.Chem.*, **1995**, 67, 1654-1660.
- IUPAC., *Pure Appl. Chem.*, **1979**, 51, 1913.
- Keeny D.R., Nelson D.W., in : *Methods of Soil Analysis, Part 2*. **1982**. American Society of Agronomy, Madison WI, p.643
- Kubota, A. **1996**, Sap nitrate tests. Department of Soil, Water and Enviromental Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ.

Mansurov M.M., Semenova G.L., Lucovengo A.N., *Zn.Anal.Chem.*,**1990**, 45, 1573-1579.

Maynard D.N., Barker A.V. *Acta Hort.* **1979**, 93, 153-162

Miham P.J., Awad A.S., Paull J.H., *Analyst.* **1970.** 95, 751.

Mitrakas M.G., Alexiades C.A., Keramidas V.Z., *Analyst*,**1991**, 116, 361-367.

Mitrakas M.G., Alexiades C.A., *Microchim. Acta.*,**1990**, I, 7-16

MyersR.J.K., Paul E.A. *Can. J. Soil. Sci.* ,**1968.** 48.369.

NAS (National Academy of Sciences). **1981.** The health effects of nitrate, nitrite and N- nitroso compounds. National Academic Press, Washington, D.C.

Nielsen H.J., Hansen E.H., *Anal. Chim. Acta*, **1976**, 85, 1-16.

Nikolski R.M., *J Phys. Chem.(USSR)*, **1937**, 10, 495.

Orion, *Methods Manual for Series 93 Electrodes*, **1975.** Orion Research Inc., Cambridge,MA

Pai S.C., Yang C.C., Riley J.P., *Anal.Chim.Acta*, **1990.**, 232, 345.

Paul J.L., Carlson R.M., *J. Agr. Food Chem.* **1968**, 16, 766.

Qien, A., Selmer-Olsen A.R., *Analyst*, **1969.** 94. 888.

Rakhmanko E.M., Kutas I.M., *J. Anal. Chemistry*.**1994**,49, 414-417.

Ross J.W., US Patent No 3 483 112, **1969.**

Trojanowicz M., *Fresenius Z. Anal.Chem.* **1979**, 297, 414-416

West, P.W. and Lyles G.L.,, *Anal.Chem.Acta.* **1960**, 23 , 227-232.

Zuther F., Ross B., Camman K., *Anal.Chim. Acta.*, **1995**, 83 – 87

Direct potentiometric analysis of nitrates in plant tissues
Άμεσος προσδιορισμός των νιτρικών ιόντων σε φυτικούς ιστούς
Geniatakis Evthimios

Γενιατάκης Ευθύμιος

November 2000

This project presents a direct potentiometric determination of nitrates in dry plant tissues. Nitrate extraction is performed by stirring, in the presence of a solid –contact nitrate selective electrode. The electrode records the falling potential, until it reaches to the lowest value, after 3 – 10 min, depending on the concentration level of nitrates in the sample.

The minimum potential value is used for the determination of nitrates. In a suitable calibrated ionometer, nitrate concentration in ppm or M can be displayed.

Three different kinds of plant material have been analysed. Lettuce, with high concentration levels of nitrates, olive oil leaves with medium levels and coffee with low levels.

The effect of sample mass in the precision of the method and electrode response time was evaluated.

For each sample recovery test was performed.

Nitrate values obtained by the direct method correlated with those obtained by the classic potentiometric method.

Με την εργασία αυτή γίνεται άμεσος ποτενσιομετρικός προσδιορισμός των NO_3^- , σε ξηρή φυτική ύλη. Η εκχύλιση των νιτρικών γίνεται με ισχυρή ανάδευση, παρουσία ηλεκτροδίου στερεής επαφής (solid contact ISE), το οποίο καταγράφει τη φθίνουσα τάση, μέχρι να σημειωθεί η ελάχιστη τιμή της.

Η ελάχιστη αυτή τιμή δυναμικού, που σημειώνεται ανάλογα με τη περιεκτικότητα των νιτρικών, σε χρόνο 3 – 10 min, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της

συγκέντρωσης των NO_3^- . Σε κατάλληλο οργανο, είναι δυνατή η απευθείας ανάγνωση της συγκέντρωσης .

Εγιναν μετρήσεις για 4 διαφορετικά βάρη δείγματος, ήτοι: 50, 100, 150, 200 mg

Εξετάστηκαν τρία διαφορετικά φυτικά υλικά : μαρούλι με υψηλά επίπεδα νιτρικών, compost φύλλων ελιάς με μέτρια επίπεδα και καφές με χαμηλό επίπεδο τιμών.

Για κάθε δείγμα, έγινε δοκιμή ανάκτησης (recovery test).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αξιολογήθηκαν με βάση τη κλασική διαδικασία ανάλυσης με το επιλεκτικό ηλεκτρόδιο των νιτρικών.