

ΑΒ-INITIO ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ-ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΣΕ ΦΥΛΛΩΔΗ ΛΑΧΑΝΙΚΑ

Νίκος Χανιωτάκης¹, Μαρία Φουσκάκη¹, Βασιλική Σταυγιαννουδάκη² Ευστάθιος Γενιατάκης³

¹ Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης, 71003 Βούτες Ηράκλειο

Κρήτης

² CRETA FARM Ρέθυμνο Κρήτης

³ Τομέας Χημείας - Γενικό Τμήμα Θετικών Επιστημών – ΤΕΙ Κρήτης

Περίληψη

Με την εργασία αυτή παρουσιάζεται ο άμεσος διαπιστευμένος ποτενσιομετρικός προσδιορισμός των NO_3^- σε ξηρή φυτική ύλη μαρουλιού. Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε ένα αισθητήρα νιτρικών ο οποίος έχει αναπτυχθεί εξ αρχής για τον σκοπό αυτό. Μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης, έγινε αξιολόγηση των αναλυτικών χαρακτηριστικών του αισθητήρα. Βάση των αποτελεσμάτων αυτών, αναπτύχθηκαν τα πρωτόκολλα ανάλυσης για διάφορα υποστρώματα. Τόσο τα όρια ανίχνευσης, όσο και η επιλεκτικότητα και ιδιαίτερα η σταθερότητα του αισθητήρα ήταν εξαιρετικά, με αποτέλεσμα η αναπτυχθείσα μέθοδος να μπορούν εύκολα να εισαχθούν στην EN ISO 17025:2005 μέθοδο προσδιορισμού νιτρικών ιόντων σε φυλλώδη λαχανικά. Η εγκυρότητα της μεθόδου διασφαλίζεται με τη διαδικασία επικύρωσής της, κατά την οποία προσδιορίζονται η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα, η γραμμικότητα, το εύρος εργασίας, η ευαισθησία, η ανιχνευσιμότητα, η επιλεκτικότητα και η ανθεκτικότητα της μεθόδου.

Abstract

In this work, a certified direct potentiometric method for the determination of NO_3^- in dry plant material (lettuce) is presented. This method is based on a nitrate sensor which has been developed *ab-initio* for this purpose. Upon completion of the development, an evaluation of the analytical characteristics of the sensor was performed. Based on these results, the protocols were developed for the analysis of various substrates. The detection limits, selectivity, and the stability of the sensor were exceptional, thus the developed methods can be easily introduced into the EN ISO 17025:2005 method of determining nitrates in leafy vegetables. The validity of the method is ensured by the ratification process within the specified accuracy, repeatability, linearity, working range, sensitivity, traceability, selectivity and robustness of the method.

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 mg NO_3^-/lt) (Αγγελάκης Α.Ν) 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 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 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 παρακάτω. 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 ιοντικής 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 εργασίας είναι η χρήση βελτιστοποιημένου αισθητήρα NO_3^- για την απλούστευση της διαδικασίας προσδιορισμού των NO_3^- σε φυτικό ιστό μαρουλιού. 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. Επίσης, 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 παρουσιάζεται παρακάμπει 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 Μέθοδοι Ανάλυσης Νιτρικών

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.

Οι κυριότερες μέθοδοι μέτρησης νιτρικών είναι:

Μέθοδος αναγωγής με Cd. (Keeny and Nelson, 1982). Η μέθοδος εφαρμόζεται σε συγκεντρώσεις νιτρικών από 0,05 έως 5 mg NO₃⁻/lt, και 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 προκαλέσουν 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.

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 αρκετά 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. 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.

Μέθοδος χρωμοτροπικού οξέος (West and Lyles, 1960) Πρόβλημα για τη μέθοδο είναι η μεγάλη θερμοκρασία που αναπτύσσεται κατά την αντίδραση, γι' αυτό χρειάζεται ψύξη. Η μέθοδος συνιστάται για συγκεντρώσεις από 0.5 μέχρι 20 ppm NO₃⁻ με όριο ανίχνευσης τα: 220 μg NO₃⁻ /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, γι' αυτό πρέπει να εξουδετερώνονται με θειώδη άλατα πριν την ανάλυση.

Μέθοδος σαλικυλικού οξέος. (Cataldo D.A., et al, 1975). Το σύμπλοκο που προκύπτει από τη επίδραση των NO₃⁻ επί του σαλικυλικού οξέος σε ισχυρά όξινο περιβάλλον απορροφά στα 410 nm σε βασικά (pH>12) διαλύματα. Η απορρόφηση της χρωμοφόρου ουσίας είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των NO₃⁻. Τα NO₂⁻ και NH₄⁺ 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.

Μέθοδος αναγωγής με κράμα Devarda. (Cottenie A. 1982) Με τη μέθοδο αυτή τα NO₃⁻ και τα NO₂⁻ ανάγονται σε NH₃, 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 NH₃ που παράγεται αποστάζει και συλλέγεται σε φιάλη που περιέχει σε περίσσεια πρότυπο διάλυμα βορικού οξέος. Η NH₃ προσδιορίζεται συνήθως ογκομετρικά στο διάλυμα του βορικού οξέος. Επειδή τόσο η NH₃ όσο και τα NO₂⁻, 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.

Μέθοδος της βρυκίνης. Η βρυκίνη – μία φυσική ένωση συναρμογής – αντιδρά με τα NO₃⁻ παρουσία H₂SO₄ 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 NO₃⁻ να βρίσκεται στην περιοχή 0.5 – 5 mg/lt.

Μέθοδος υπεριώδους φασματοφωτομετρίας (Babko A.K., et al 1974). Η μέτρηση της απορρόφησης στα 220nm, επιτρέπει τον γρήγορο προσδιορισμό των NO₃⁻. Ο νόμος του Beer εφαρμόζεται για συγκεντρώσεις NO₃⁻ μέχρι 50 mg/lt. 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.

Μέθοδος ιοντικής χρωματογραφίας. Η μέθοδος δίνει πολύ καλά αποτελέσματα, αλλά απαιτεί ακριβή οργανολογία. Στηρίζεται στο διαχωρισμό ανιόντων με έκλουση 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⁻, NO₂⁻, SO₄⁼, PO₄³⁻) 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 NO₃⁻ και περιορισμό της παρεμπόδισης από άλλα ανταγωνιστικά ιόντα όπως π.χ. SO₄⁼. 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.

Μέθοδος επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων (ποτενσιομετρική μέθοδος). Η μέθοδος συγκαταλέγεται ανάμεσα στις επίσημες μεθόδους 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 παρεμποδίσσεις 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 αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων και ο μικρός χρόνος ζωής του ηλεκτροδίου, γίνεται διαρκής προσπάθεια να βελτιωθούν.

3 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. Μέχρι σήμερα έχουν κατασκευαστεί ηλεκτρόδια με πολύ καλά χαρακτηριστικά ποιότητας, όπως: όριο ανίχνευσης, κλίση, περιοχή γραμμικότητας, συντελεστές επιλεκτικότητας κ.λ.π. Όμως 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), δηλαδή ένα στερεό αγώγιμο 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 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 δυναμικό που αναπτύσσει το ηλεκτρόδιο στερεάς επαφής ακολουθεί τη εξίσωση Nikolski – Eisenman, με θεωρητική κλίση -59.2 mV/dec , σε θερμοκρασία δωματίου.

$$E = E_i^0 - 59.2 \cdot \log \left(\text{NO}_3^- + \sum_j K_{\text{NO}_3, j}^{\text{pot}} a_j^{1/z_j} \right)$$

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

Στον Πίνακα 1 δίνονται οι τιμές του συντελεστή επιλεκτικότητας για διάφορα ιόντα του ηλεκτροδίου στερεάς επαφής, οι οποίες έχουν υπολογιστεί με την μέθοδο των ξεχωριστών διαλυμάτων.

Πίνακας 1. Ποτενσιομετρικοί συντελεστές επιλεκτικότητας του ηλεκτροδίου νιτρικών στερεάς επαφής.

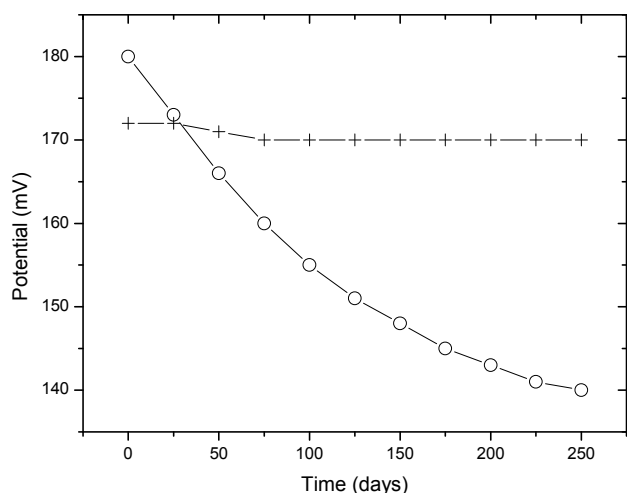
Ανιόν	K_{ij}^{pot}
ClO_4^-	137
SCN^-	18
I^-	0,96
Br^-	0,05
Cl^-	0,006
NO_2^-	0,06
SO_4^{2-}	0,01
H_2PO_4^-	0,008

Στο ηλεκτρόδιο νιτρικών στερεάς επαφής η αντικατάσταση του εσωτερικού αναφορικού υδατικού διαλύματος από το υπόστρωμα του αγώγιμου άνθρακα έχει σαν συνέπεια την μείωση της διολίσθησης του δυναμικού (potential drift). Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται ο χρόνος ζωής του ΗΣΕ σε σύγκριση με το εμπορικό ηλεκτρόδιο. 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 εμπορικό παρουσίασε σταθερή μείωση του δυναμικού του, που πιθανότατα οφείλεται στην σταθερή

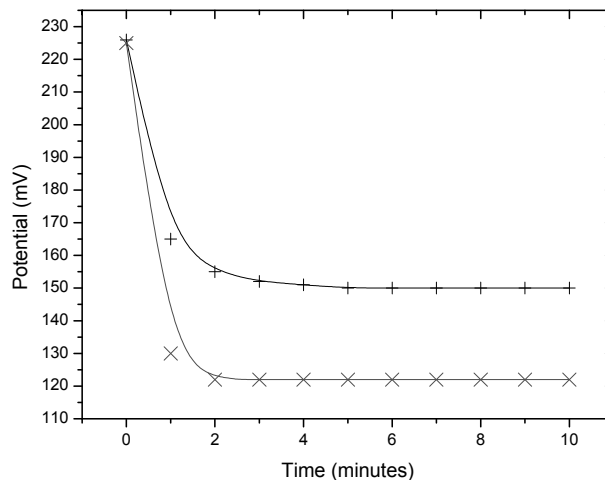
έκχυση του ιονομεταφορέα από την μεμβράνη προς το υδατικό διάλυμα (Ανδρεδάκης Γ.Ε.1998). Το όριο

ανίχνευσης και η περιοχή γραμμικότητας, όπως προκύπτει από το διάγραμμα βαθμονόμησης είναι $7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ και $10^{-4.5} - 10^{-1.5} \text{ M}$ αντίστοιχα (Vamvakaki M. et al., 1996).

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.



Σχήμα 1 Χρόνος ζωής ηλεκτροδίου ΗΣΕ (x) και εμπορικού (o)



Σχήμα 1 Χρόνος απόκριση ηλεκτροδίου ΗΣΕ (x) και εμπορικού (+)

4 Προσδιορισμός νιτρικών σε φυτικούς ιστούς

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 έπαυε 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 Mahendrapa 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 φασμοτοσκοπική 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 :

4.1 Το δείγμα.

Οι περισσότερες αναλύσεις στα φυτά γίνονται επί ξηρού δείγματος. Το καθαρισμένο φυτό, ολόκληρο ή μέρος αυτού, ξηραίνεται επί 48 ώρες στους $70^{\circ} - 85^{\circ} \text{ C}$. 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.

4.2 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. 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.

4.3 Ρυθμιστής ιονικής ισχύος (ISA)

Σε όλες τις εργασίες που έπεσαν στην αντίληψη 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 παρεμποδίζόντων 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.

Πίνακας 2 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.

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 $\text{Cl}^- / \text{NO}_3^- - \text{N} > 10$ 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 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 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 3 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

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.

Στις 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 νοπής 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%.

5 Ανάλυση Μαρουλιού

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων, με την προτεινόμενη μέθοδο (άμεση μέθοδος), για τα βάρη δείγματος 0,10 gr. 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 4 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			

Στον επόμενο Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων με την μέθοδο αναφοράς (κλασική μέθοδος), για όλα τα βάρη δείγματος.

Πίνακας 5 Κλασική μέθοδος. Μετρήσεις – αποτελέσματα για το δείγμα μαρουλιού.

Δείγμα (gr)	Δυναμικό (mV)	ppm NO ₃ ⁻ (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			

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 ppm NO₃⁻. Η δοκιμασία ανάκτησης έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Πίνακας 6 Δοκιμές ανάκτησης Νιτρικών σε Μαρούλι.

a/a	Δείγμα (gr)	E (mV)	ppm NO ₃ ⁻ (d.w)	Ανάκτηση %	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%	

6 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται ένας αισθητήρας νιτρικών στερεάς επαφής, με μεγάλο χρόνο ζωής και καλή επιλεκτικότητα. Παρουσιάζεται ότι η προτεινόμενη διαπιστευμένη μέθοδος είναι ικανή για άμεση και ακριβή μέτρηση των νιτρικών ιόντων σε φυλλώδη λαχανικά, όπως είναι το μαρούλι, δίχως καμιά ιδιαίτερη προετοιμασίας δείγματος. Η εξαιρετική σταθερότητα του αισθητήρα και η ικανότητα συνεχούς μέτρησης για περισσότερο από 9 μήνες, και το μεγάλο εύρος απόκρισης καλύπτει τις ανάγκες ανάλυσης πολλών διαφορετικών δειγμάτων με συγκεντρώσεις από μερικά ppm έως και 30 000 ppm. Διεργαστηριακές μελέτες ανάλυσης λαχανικών μέσω του οργανισμού FAPAS έδωσαν άριστο Z-score για την μέθοδο, πράγμα που πιστοποιεί την ικανότητα της μεθόδου για άμεση μέτρηση των νιτρικών δε πολύπλοκα, μη κατεργασμένα δείγματα.

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
- Bunton N.G., N.T.Crosby and S.J.Patterson, *Analyst*,. 94585(1969)
- 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
- Griffin G., Jokela W., Ross D., *Recommended Nitrate – N Tests*. Agronomy Facts.17. Pennsylvania State Univ. **1996**
- Keeny D.R., Nelson D.W., in : *Methods of Soil Analysis, Part 2*. **1982**. American Society of Agronomy, Madison WI, p.643
- Mahendrappa, M. K. *Soil Science*. 108(2):132-136, August 1969.
- 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
- Myers R.J.K., Paul E.A. *Can. J. Soil. Sci.* , **1968**. 48.369.
- Nikolski R.M., *J Phys. Chem. (USSR)*, **1937**, 10, 495.
- Orion, *Methods Manual for Series 93 Electrodes*, **1975**. Orion Research Inc., Cambridge, MA
- Paul J.L., Carlson R.M., *J. Agr. Food Chem.* **1968**, 16, 766.
- Qien, A., Selmer-Olsen A.R., *Analyst*, **1969**. 94. 888.
- Vamvakaki M, and N. A. Chaniotakis. *Analytica Chemica Acta*.320 (1996) 53-61)
- West, P.W. and Lyles G.L.,, *Anal. Chem. Acta*. **1960**, 23 , 227-232.
- Yamamoto, A. Matsunaga, A. Yasui, *Buseki Kagaku* 45 (4) (1996) 363.
- Μπλαδανοπούλου, Σ.Β., Α.Δ. Σιμώνης και Τ.Α. Τσιπρόπουλος (1990) 3ο Πανελλήνιο Εδαφολογικό Συνέδριο, Αθήνα, Πρακτικά, σελ.: 333-334.