

# ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



### ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΕΧΝΙΚΗ LPME-GC/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΟΡΙΣΜΟ  
ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ  
(PAHs) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ

**ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΚΙΤΣΟΣ**

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ (επιβλέπων)  
ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ ΜΑΝΤΖΑΒΙΝΟΣ  
ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ ΨΥΛΛΑΚΗ

ΧΑΝΙΑ  
ΙΟΥΛΙΟΣ 2003

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στη μελέτη των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) σε υδατικά δείγματα. Τα PAHs είναι μια ομάδα ενώσεων με τοξικές και καρκινογενείς ιδιότητες και προέρχονται κυρίως από τα παράγωγα του πετρελαίου. Η μόλυνση των επιφανειακών και των υπόγειων υδάτων από τα PAHs είναι ένα ζήτημα που έχει προκαλέσει το παγκόσμιο ενδιαφέρον και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τον τρόπο εισαγωγής τους σε αυτά καθώς και με τις επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία και στους υδρόβιους οργανισμούς. Η ανίχνευση και ο ποιοτικός προσδιορισμός των PAHs στην συγκεκριμένη εργασία έγινε με την αναπτυσσόμενη τεχνική της Μικροεκχύλισης Υγρής Φάσης (LPME) με φασματομετρία μαζών (GC/MS). Δείγματα νερού ελήφθησαν και αναλύθηκαν από διάφορα μέρη του Νομού Χανίων, όπως η παραλία του Μαραθίου, το παλιό λιμάνι της πόλης των Χανίων, η παραλία της Σούδας πλησίον της Ιχθυόσκαλας.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε λεπτομερής περιγραφή της μεθόδου LPME, αναλύθηκε η θεωρία που την διέπει και έγινε σύγκριση της με άλλες τεχνικές Μικροεκχύλισης (SPME, SDME). Η LPME αποδείχτηκε ότι υπερέχει έναντι των άλλων τεχνικών, μια και πρόκειται για μια εξαιρετικά απλή, γρήγορη και φθηνή μέθοδο, όπου η παρουσία της τριχοειδούς ίνας παρέχει σημαντική προστασία στην μικρο-σταγόνα. Είναι μια τεχνική μεγάλης ευαισθησίας και συμβάλλει στην εξαγωγή αποτελεσμάτων πολύ μεγάλης ακρίβειας, σχετικά με την ανάλυση διαφόρων βιολογικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε ανάλυση της λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου (GC), του φασματογράφου μάζας (MS) καθώς και της σύζευξής τους. Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους χημικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται σήμερα και η διάδοση της είναι ταχύτατη. Η σύζευξή της με τον φασματογράφο μάζας αποτελεί μια τεχνική με πολλές εφαρμογές στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων.

Έτσι στο πρώτο κεφάλαιο της εργασίας περιγράφονται αναλυτικά οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των PAHs καθώς και οι πηγές και τα σημεία εμφάνισής τους στα επιφανειακά ύδατα. Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφεται το θεωρητικό υπόβαθρο της τεχνικής LPME, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων. Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται λεπτομερώς τα μέρη του αέριου χρωματογράφου, ενώ στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται ανάλυση της λειτουργίας του φασματογράφου μάζας και της σύζευξής του με τον αέριο χρωματογράφο. Στο πέμπτο και έκτο κεφάλαιο αντίστοιχα παρουσιάζονται το πειραματικό μέρος και τα αποτελέσματα της ανάλυσης των υδατινών δειγμάτων με LPME-GC/MS. Η εργασία ολοκληρώνεται με τις βιβλιογραφικές αναφορές που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίησή της.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ (ΡΑΗs).....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 ΠΗΓΕΣ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΡΑΗs.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΝΕΡΑ.....	11
1.2.2 ΥΠΟΓΕΙΑ ΝΕΡΑ.....	17
1.2.3 ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ.....	17
1.2.4 ΕΔΑΦΟΣ.....	18
1.2.5 ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑ.....	18
<b>1.3 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΡΑΗs.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 ΕΠΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΡΑΗs ΣΤΟΥΣ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....</b>	<b>21</b>
1.4.1 ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΡΑΗs.....	21
1.4.2 ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ-ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΡΑΗs.....	22
<b>1.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΡΑΗs.....</b>	<b>24</b>
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ(LPME).....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ (LLE).....	28.
2.2.2 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ.....	28
2.2.3 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΔΙΑΛΥΤΗ-SDME.....	29
2.2.4 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ.....	30
<b>2.3 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ LPME ΔΥΟ ΦΑΣΕΩΝ.....	33
2.3.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ LPME ΤΡΙΩΝ ΦΑΣΕΩΝ.....	35
2.3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ LPME ΔΥΟ ΦΑΣΕΩΝ ΜΕ LPME ΤΡΙΩΝ ΦΑΣΕΩΝ.....	39
<b>2.4 ΔΙΑΤΑΞΗ ΤΗΣ ΙΝΑΣ.....</b>	<b>39</b>
<b>2.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ LPME.....</b>	<b>41</b>
2.5.1 ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ.....	41
2.5.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	41
<b>2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ LPME-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....</b>	<b>48</b>
2.6.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΙΝΑΣ.....	48
2.6.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ.....	50
2.6.3 ΑΝΑΔΕΥΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	50
2.6.4 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΛΑΤΟΣ.....	52

2.6.5 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	52
2.6.6 ΟΓΚΟΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΔΟΤΗ ΚΑΙ ΔΕΚΤΗ.....	53
2.6.7 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΡΗ.....	53
2.6.8 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	54
2.6.9 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΥΡΟΥΣ ΓΡΑΜΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	55
2.6.10 ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ LPME.....	55
<b>2.7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ LPME ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....</b>	<b>56</b>
2.7.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ LPME ΜΕ SPME.....	56
2.7.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ LPME ΜΕ SDME.....	57
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC).....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.....</b>	<b>60</b>
<b>3.3 ΘΕΩΡΙΑ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.....</b>	<b>60</b>
3.3.1 ΧΡΟΝΟΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ.....	60
3.3.2 ΟΓΚΟΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ.....	61
3.3.3 ΙΔΑΝΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	61
3.3.4 ΜΗ ΙΔΑΝΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ .....	61
3.3.5 ΘΕΩΡΙΑ ΠΛΑΚΩΝ.....	61
<b>3.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ.....</b>	<b>62</b>
<b>3.5 ΦΕΡΟΝ ΑΕΡΙΟ.....</b>	<b>64</b>
3.5.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΡΟΗΣ ΦΕΡΟΝΤΟΣ ΑΕΡΙΟΥ.....	64
<b>3.6 ΦΟΥΡΝΟΣ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ.....</b>	<b>65</b>
3.6.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΦΟΥΡΝΟΥ.....	66
<b>3.7 ΘΑΛΑΜΟΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....</b>	<b>67</b>
<b>3.8 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ.....</b>	<b>70</b>
<b>3.9 ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ.....</b>	<b>73</b>
<b>3.10 ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΑΕΡΙΑΣ.....</b>	<b>73</b>
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS).....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΑΣ.....</b>	<b>78</b>
<b>4.3 ΙΟΝΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑ.....</b>	<b>80</b>
4.3.1 ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ ΜΑΖΑΣ.....	82
4.3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΙΟΝΤΩΝ.....	84
4.3.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	84
4.3.4 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	86
<b>4.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΑΣ.....</b>	<b>87</b>

<b>4.5 ΣΥΖΕΥΞΗ GC/MS.....</b>	<b>88</b>
4.5.1 FAST TEMPERATURE PROGRAMMING.....	88
4.5.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟ.....	88
<b>4.6 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ GC/MS.....</b>	<b>89</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ LPME-GC/MS.....</b>	<b>91</b>
<b>5.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ.....</b>	<b>91</b>
5.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	91
5.1.2 ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	91
5.1.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ.....	92
<b>5.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΩΝ ΡΑΗs.....</b>	<b>95</b>
5.2.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	97
5.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΡΑΗs ΜΕ ΤΗΝ LPME.....	97
<b>5.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ LPME-GC/MS.....</b>	<b>97</b>
5.3.1 ΟΡΓΑΝΑ.....	97
5.3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΙΝΑΣ.....	97
5.3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ LPME.....	98
5.3.4 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ GC/MS.....	99
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΑΗs ΣΤΑ ΥΔΑΤΙΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....</b>	<b>102</b>
<b>6.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>102</b>
<b>6.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>103</b>
6.2.1 ΛΙΜΑΝΙ ΧΑΝΙΩΝ.....	103
6.2.2 ΙΧΘΥΟΣΚΑΛΑ ΣΟΥΔΑΣ.....	104
6.2.3 ΠΑΡΑΛΙΑ ΜΑΡΑΘΙΟΥ.....	104

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χημική δομή των 16 PAHs που περιέχονται στην λίστα προτεραιότητας ρυπαντών της US EPA.....	10
Πίνακας 2: Οι 16 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες προτεραιότητας της EPA και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες.....	14
Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις PAHs σε επιφανειακά νερά ποταμών.....	15
Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις PAHs σε θαλασσινά νερά.....	16
Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις PAHs στο πόσιμο νερό.....	18
Πίνακας 6: Εφαρμογές της LPME.....	43

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 : Μικροβιακή οξείδωση των PAHs σε μύκητες και βακτήρια με την βοήθεια μονοοξυγενάσης και διοξυγενάσης.....	21
Εικόνα 2:Τεχνική μικροεκχύλισης μικρο-σταγόνας (SDME).....	30
Εικόνα 3: Δύο διαφορετικοί τύποι διάταξης της τριχοειδούς ίνας κατά την LPME.....	32
Εικόνα 4 : Σχηματική περιγραφή της LPME δύο φάσεων .....	33
Εικόνα 5 : Σχηματική περιγραφή της LPME τριών φάσεων.....	36
Εικόνα 6 : Διάταξη Α της ίνας (hollow fiber).....	40
Εικόνα 7 : Διάταξη Β της ίνας (hollow fiber).....	41
Εικόνα 8: Διαγράμματα των παραγόντων εμπλουτισμού με τους χρόνους εκχύλισης για τις ουσίες citalopram, methamphetamine, με την χρήση δύο διαφορετικών ινών σε δείγμα (α) νερού και (β)ούρων.....	49
Εικόνα 9:Επίδραση της ανάδευσης στην αποδοτικότητα της εκχύλισης.....	51
Εικόνα10: Επίδραση της προσθήκης οργανικών οξέων στην LPME.....	52
Εικόνα 11: Βασικά χαρακτηριστικά ενός αέριου χρωματογράφου.....	62
Εικόνα 12: Τυπικός εισαγωγέας δείγματος σε συστήματα αέριας χρωματογραφίας.....	67
Εικόνα 13: Θάλαμος εισαγωγής δείγματος με ή /και χωρίς διαχωρισμό (Split/Splitless).....	69
Εικόνα 14: Τριχοειδή στήλη επικαλυμμένη με SiO <sub>2</sub> .....	70
Εικόνα 15: Κάθετη τομή τριχοειδούς στήλης.....	71
Εικόνα 16:Καμπύλη απόκρισης ενός ανιχνευτή.....	74
Εικόνα 17:Σχηματικό διάγραμμα ενός φασματογράφου μάζας με απόκλιση 180°.....	79
Εικόνα 18: Σχηματικό διάγραμμα πηγής με ηλεκτρονιακή κρούση.....	80
Εικόνα 19: Η απόδοση παραγωγής ιόντων αργού σαν συνάρτηση της ενέργειας της δέσμης ηλεκτρονίων.....	81
Εικόνα 20. Σχηματικό διάγραμμα τετραπολικού αναλυτή μάζας και εξαρτήματα για την απεικόνιση των δεδομένων.....	83
Εικόνα 21: Φάσμα μάζας με μικρό διαχωρισμό σε οθόνη CRT.....	85
Εικόνα 22: Αέριο χρωματογράφημα ειδικού ιόντος.....	86
Εικόνα 23: Σχηματικά διαγράμματα διαχωριστών μορίων για την σύνδεση αέριου χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας.(α) Πορώδης σωλήνας (b) Ακροφύσιο από γυαλί.....	89
Εικόνα 24:Παλιό λιμάνι της πόλης των Χανίων.....	92
Εικόνα 25:Παλιό λιμάνι της πόλης των Χανίων(κοντά στο Ναυτικό Μουσείο).....	93
Εικόνα 26: Λιμανάκι δίπλα στην ιχθυόσκαλα της Σούδας.....	93
Εικόνα 27: Σημείο προσάραξης βαρκών στην ιχθυόσκαλα της Σούδας.....	94
Εικόνα 28: Εξωτερικό τμήμα της παραλίας του Μαραθίου.....	94
Εικόνα 29: Παραλία Μαραθίου.....	95
Εικόνα 30: Σημείο προσάραξης βαρκών στην παραλία του Μαραθίου.....	95
Εικόνα 31: Σύστημα στήριξης και υποδοχής της ίνας.....	99
Εικόνα 32: Shimadzu GC-17A (Version 3) QP5050A.....	100
Εικόνα 33 : Διάγραμμα θερμοκρασίας στήλης με το χρόνο.....	101
Εικόνα 34:Χρωματογράφημα για το δείγμα από λιμάνι.....	102
Εικόνα 35:Χρωματογράφημα για το δείγμα από παραλία Μαραθίου.....	103

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### 1.ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΟΙ ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΙ ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ (PAHs)

#### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μόλυνση του νερού από οργανικές ενώσεις, πολλές από τις οποίες είναι τοξικές ή καρκινογόνες, έχει προκαλέσει το παγκόσμιο ενδιαφέρον. Τα νερά των ακτών αλλά και τα ποτάμια και οι λίμνες είναι αποδέκτες αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων, όμβριων υδάτων καθώς και άλλων εισροών που προέρχονται από εκροές αγροτικών δραστηριοτήτων. Όπως γνωρίζουμε τα ποτάμια, οι λίμνες και οι χείμαρροι χρησιμοποιούνται συνήθως για την παροχή πόσιμου νερού. Έτσι είναι ανεπιθύμητη η μόλυνση των υδάτινων πόρων όπου το νερό πρακτικά μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί [1].

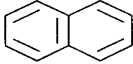
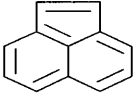
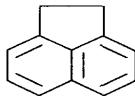

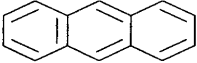
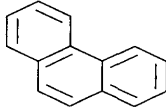
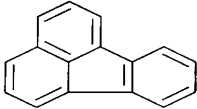
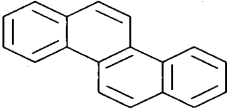
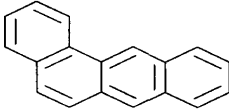
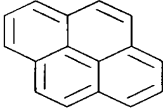
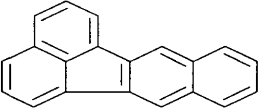
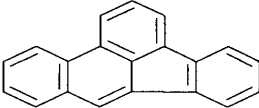
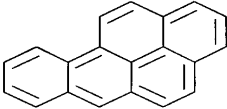
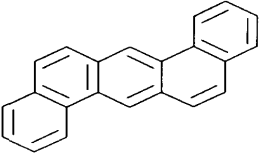
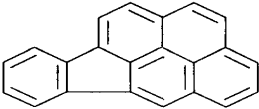
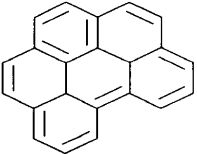
Μια πολύ σημαντική κατηγορία ενώσεων που συμβάλλει στην μόλυνση των υδάτινων πόρων είναι οι πολυκυκλικές αρωματικές ενώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν διάφορες ομάδες ενώσεων που έχουν δύο ή περισσότερες βενζολικές ομάδες στη δομή τους και πολλές άλλες ομάδες που μπορεί να περιέχουν αρκετά άλλα στοιχεία. Υπάρχει μια σημαντική ποικιλία τέτοιων ομάδων, αλλά μόνο λίγες από αυτές είναι σημαντικές και σχετίζονται με περιβαλλοντικά ζητήματα [1].

Σε αυτή την κατηγορία των ενώσεων ανήκουν οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), στους οποίους έχει δοθεί πολύ μεγάλη σημασία, μια και έχει τεκμηριωθεί η καρκινογένεση πολλών ενώσεων που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, ύστερα από πειράματα σε διάφορα είδη ζώων. Τα PAHs είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από ενωμένους (συζευγμένους) βενζολικούς δακτυλίους. Όταν ένα ζευγάρι ατόμων άνθρακα είναι κοινό, τότε οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που διανέμονται από κοινού θεωρούμε ότι είναι συγχωνευμένοι. Η τελική δομή είναι ένα μόριο, όπου όλα τα άτομα άνθρακα και υδρογόνου βρίσκονται σε ένα επίπεδο. Έτσι προκύπτει μια ποικιλία ενώσεων μεταξύ του coronene ( $C_{10}H_8$ ) και του naphthalene ( $C_{24}H_{12}$ ). Σε αυτήν την ποικιλία ενώσεων υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός PAHs, που διαφέρουν ως προς τον αριθμό και την θέση των αρωματικών δακτυλίων. Οι διαφοροποιήσεις ως προς τον αριθμό, την θέση και ενδεχομένως την χημεία των ατόμων που αντικαθιστούν άλλα άτομα, βασίζονται στο βασικό σύστημα δακτυλίων. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των PAHs ποικίλλουν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Τα PAHs αποτελούν μια από τις πιο επικίνδυνες κατηγορίες ρύπων του περιβάλλοντος, γεγονός που οφείλεται στο ότι έχουν καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες ιδιότητες. Μέσω χημικών αντιδράσεων (με  $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ) μπορούν να μετασχηματιστούν σε περισσότερο τοξικές ενώσεις. Λόγω του τεράστιου ενδιαφέροντος που υπάρχει για τα PAHs (σχετικά με τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον) έχουν συμπεριληφθεί στις λίστες προτεραιότητας ρυπαντών που έχει συντάξει η US EPA (Environmental Protection Agency) και η Ευρωπαϊκή Ένωση. Η US EPA έχει τοποθετήσει στην λίστα προτεραιότητας ρυπαντών 16 PAHs, χωρίς υποκατάστατες στο βασικό σύστημα των βενζολικών δακτυλίων τους, μερικά από τα οποία θεωρείται ότι προκαλούν διάφορες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο [1].



Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες σχετικά με την διασπορά αυτών των ενώσεων και τους κινδύνους που εγκυμονούν για την ανθρώπινη υγεία. Η χημική δομή των 16 PAHs της US EPA δίνεται στον Πίνακα 1. Η λίστα της Ευρωπαϊκής Ένωσης περιλαμβάνει 6 βασικά PAHs: Fluorene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Benzo[g,h,i]perylene και Dibenzo[b,c]fluoranthene [1].

**Πίνακας 1: Χημική δομή των 16 PAHs που περιέχονται στην λίστα προτεραιότητας ρυπαντών της US EPA**

 Naphthalene	 Acenaphthylene	 Acenaphthene
 Fluorene	 Anthracene	 Phenanthrene
 Fluoranthene	 Chrysene	 Benzo[a]anthracene
 Pyrene	 Benzo[k]fluoranthene	 Benzo[b]fluoranthene
 Benzo[a]pyrene	 Dibenzo[a,h]anthracene	 Indeno[1,2,3-cd]pyrene
	 Benzo[g,h,i]perylene	

Τα PAHs εισάγονται στο περιβάλλον μέσω των φυσικών και ανθρωπογενών διαδικασιών καύσης. Επομένως οι ποσότητες τους που βρίσκονται σε υδατικά και εδαφικά συστήματα έχουν ένα συστατικό ατμοσφαιρικής προέλευσης. Οι κυριότερες φυσικές πηγές, μέσω των οποίων εισάγονται τα PAHs στην ατμόσφαιρα, είναι οι εκρήξεις ηφαιστειών και οι πυρκαγιές στα δάση και σε μεγάλες πεδιάδες. Οι σημαντικότερες ανθρωπογενείς πηγές είναι : η καύση φυσικών καυσίμων, η αποτέφρωση απορριμμάτων, η παραγωγή ασφάλτου και άνθρακα, η διύλιση του πετρελαίου, η παραγωγή αλουμινίου και άλλες βιομηχανικές δραστηριότητες [1].

Παρά την ύπαρξη πολλών ανθρωπογενών πηγών στις αστικές και βιομηχανικές περιοχές, τα PAHs απαντώνται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σε αγροτικές και απομακρυσμένες περιοχές, λόγω της ικανότητας τους να μεταφέρονται σε πολύ μεγάλες αποστάσεις ως αέρια και αεροζόλ και λόγω της φαινόμενης αντοχή τους στην αποικοδόμηση τους στην ατμόσφαιρα. Γι'αυτό το λόγο οι εκπομπές των PAHs σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των παράκτιων νερών καθώς και τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών [1].

Ύστερα από την είσοδο των PAHs στο υδατικό περιβάλλον, η συμπεριφορά, και η τύχη που θα έχουν εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Οι κύριες διεργασίες μέσα στο νερό στις οποίες συμμετέχουν τα PAHs είναι οι ακόλουθες : διάλυση, εξάτμιση, προσρόφηση σε αιωρούμενα στερεά, διαδοχική ιζηματοποίηση, βιοτική και αβιοτική αποικοδόμηση, πρόσληψη από υδρόβιους οργανισμούς και συσσώρευση. Στον Πίνακα 2 που ακολουθεί, απεικονίζονται οι χημικοί τύποι των 16 PAHs της λίστας ρυπαντών της US EPA μαζί με τις φυσικοχημικές σταθερές τους και την εκτιμώμενη καρκινογενή δραστικότητά τους [1].

## **1.2 ΠΗΓΕΣ ΚΑΙ ΣΗΜΕΙΑ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΤΩΝ PAHs**

### **1.2.1 ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΝΕΡΑ**

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες εισάγονται στα επιφανειακά νερά μέσω των ατμοσφαιρικών κατακρημνισμάτων, των αστικών απορροών, από έκπλυση αστικών περιοχών από δημοτικές εκροές, από βιομηχανικές εκροές και από διαρροές ή κηλίδες πετρελαίου. Τα ατμοσφαιρικά κατακρημνίσματα περιλαμβάνουν την υγρή και ξηρή απόθεση σωματιδίων και ατμών. Τα PAHs, ως ημιπτητικές οργανικές ενώσεις, συναντώνται τόσο σε αέρια όσο και σε σωματιδιακή μορφή στον αέρα και υπόκεινται σε έκπλυση με τους ατμούς αλλά και με τα σωματίδια κατά τη διάρκεια της κατακρήμνισης [1].

Η εισαγωγή των PAHs στα επιφανειακά νερά οφείλεται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στις ατμοσφαιρικές αποθέσεις. Έχει εκτιμηθεί ότι το 10-80% των PAHs που εισέρχονται στους ωκεανούς, προέρχεται από ατμοσφαιρικές πηγές. Οι ποσότητες των PAHs που εισάγονται στην θάλασσα της Μεσογείου είναι περίπου 35-70 τόνους/έτος με μέση τιμή 47.5t τόνους/έτος. Επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι οι εισαγωγές PAHs από τους ποταμούς Έμπρο και Ρήνο στην Μεσόγειο είναι 5.3 και 1.3 τόνους/έτος αντίστοιχα. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι τα όμβρια ύδατα περιέχουν πολλές οργανικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων και των PAHs. Οι συγκεντρώσεις των PAHs στα νερά της βροχής είναι σε αρκετές περιπτώσεις πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες στο σώμα του νερού του αποδέκτη [1].

Μια σημαντική ποσότητα PAHs που μεταφέρονται στα επιφανειακά νερά, προέρχεται από απορροές υπονόμων από αστικές εκπλύσεις. Οι αστικές εκπλύσεις περιλαμβάνουν τα νερά που προέρχονται από αδιαπέραστες εκτάσεις, όπως δρόμους, αυτοκινητόδρομους, πλακόστρωτους χώρους στάθμευσης, πεζοδρόμια και από διαπερατές εκτάσεις, όπως κήπους,

εργοτάξια. Συνεπώς οι αστικές εκπλύσεις περιέχουν PAHs που εναποτίθενται στη επιφάνεια τους καθώς και PAHs που σχετίζονται με την βενζίνη για την κίνηση των αυτοκινήτων, PAHs από διαρροές πετρελαίου, από παράγωγα καυσαερίων, από σωματίδια των ελαστικών των αυτοκινήτων, από την ασφαλτο από την επιφάνεια των δρόμων. Κατά την διάρκεια του χειμώνα και του φθινοπώρου έχουν βρεθεί υψηλές συγκεντρώσεις PAHs σε αστικές εκπλύσεις, λόγω της αυξημένης κίνησης των οχημάτων στους δρόμους και της αυξημένης χρήσης συστημάτων θέρμανσης. Το ποσοστό των αστικών επλύσεων που εισέρχονται στα νερά των αποδεκτών είναι διαφορετικό για κάθε περιοχή, μια και εξαρτάται από την ένταση με την οποία οι καιρικές συνθήκες φορτίζουν (υγρή και ξηρή απόθεση) τους αποδέκτες [1].

Το αργό πετρέλαιο περιέχει υψηλά επίπεδα PAHs, αλλά η σχετική συγκέντρωση της κάθε ένωσης εξαρτάται από το είδος και την προέλευση του πετρελαίου. Επιπλέον σε διάφορα παράγωγα πετρελαίου παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στην περιεκτικότητα των PAHs. Έχει εκτιμηθεί ότι οι εγκαταστάσεις διύλισης πετρελαίου και παραγωγής πετροχημικών προϊόντων συνεισφέρουν μέχρι και 200000 μετρικούς τόνους από τα παράγωγα του πετρελαίου και το ακατέργαστο πετρέλαιο στους ωκεανούς ετησίως. Αν και δεν είναι διαθέσιμες οι αντίστοιχες τιμές για τις εισροές στα γλυκά νερά, υπάρχουν αναφορές σχετικά με τα απόβλητα των διυλιστηρίων που συμβάλλουν στην ρύπανση ποταμών και λιμνών [1].

Επίσης τα PAHs εισέρχονται στα επιφανειακά νερά μέσω των βιομηχανικών αποβλήτων. Βιομηχανίες που ασχολούνται με την κατασκευή χημικών (διαλύτες, λιπαντικά, βαφικές ύλες, εντομοκτόνα), όπου χρησιμοποιούνται PAHs χαμηλότερου μοριακού βάρους (naphthalene, acenaphthene) παράγουν απόβλητα με υψηλή περιεκτικότητα σε PAHs. Γενικά βιομηχανίες που χρησιμοποιούν πετρέλαιο ή κάρβουνο ως πρώτη ύλη ή ως καύσιμο παράγουν απόβλητα με υψηλές συγκεντρώσεις σε PAHs. Επίσης σε απόβλητα βιομηχανιών κατασκευής ελαστικών περιέχονται ποσότητες PAHs, όταν η αιθάλη χρησιμοποιείται ως μέσο ενίσχυσης για τα συνθετικά ελαστικά. Ύστερα από αναλύσεις σε 35 είδη βιομηχανικών εκροών, τα μεγαλύτερα ποσοστά PAHs βρέθηκαν σε εκροές βιομηχανιών παραγωγής οργανικών μειγμάτων και πλαστικών καθώς και σε εκροές από την κατασκευή σιδήρου και χάλυβα [1].

Μια άλλη πηγή των PAHs για την ρύπανση των επιφανειακών νερών είναι τα αστικά απόβλητα. Έχει αποδειχθεί ότι οι ολικές συγκεντρώσεις των PAHs στα ανεπεξέργαστα αστικά απόβλητα ποικίλλουν σημαντικά και εξαρτώνται από την ποσότητα των βιομηχανικών εκροών που προεπεξεργάζονται μαζί με τα αστικά απόβλητα. Τα επεξεργασμένα αστικά απόβλητα συνήθως περιέχουν αρκετά μικρές συγκεντρώσεις PAHs, λόγω της απομάκρυνσής τους μέσω της προσρόφησής τους από τα σωματίδια, της βιοαποικοδόμησής ή της εξάτμισης τους κατά την διάρκεια της επεξεργασίας τους [1,2].

Παρά το γεγονός ότι είναι γνωστές συγκεκριμένες πηγές που ευθύνονται για την παρουσία των PAHs στα επιφανειακά νερά, υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις που η παρουσία τους δεν μπορεί να συσχετιστεί με μια συγκεκριμένη πηγή [1].

Οι σύγχρονες βέβαια αναλυτικές τεχνικές παρέχουν την δυνατότητα αποτελεσματικού προσδιορισμού των PAHs και εύρεσης των πηγών τους [1].

Η διαλυτότητα των PAHs στο νερό είναι χαμηλή και μειώνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους. Λόγω της υδροφοβικής τους φύσης ( $\log K_{ow}=3-8$ ) οι συγκεντρώσεις των διαλυμένων PAHs στο νερό είναι πολύ χαμηλές. Τα PAHs ενώνονται εύκολα με σωματιδιακή ύλη και τελικά εναποτίθενται στο ίζημα. Οι συγκεντρώσεις των PAHs στα νερά διαφόρων ποταμών της Ευρώπης απεικονίζονται στον Πίνακα 3 [1,6,7].

















Θα πρέπει να αναφερθεί ότι είναι αρκετά δύσκολη η άμεση σύγκριση των στοιχείων της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, λόγω των διαφορών στην φάση (διαλυμένη, σωματιδιακή) και στα συστατικά που λαμβάνονται υπόψη σε κάθε μελέτη. Οι συγκεντρώσεις των PAHs στα ιζήματα των ποταμών είναι πολύ υψηλότερες από τις αντίστοιχες του υδάτινου σώματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο ποταμός Slave στον Καναδά, όπου οι διαλυμένες συγκεντρώσεις των PAHs βρέθηκαν να είναι υψηλότερες από τα όρια ανίχνευσης των οργάνων ανάλυσης σε λίγες περιπτώσεις, ενώ οι συγκεντρώσεις τους στο ίζημα ξεπερνούσαν το χαμηλότερο επίπεδο επίδρασης (Ontario Sediment Quality Guidelines). Παρομοίως η ολική συγκέντρωση στα στερεά σωματίδια των PAHs στον ποταμό Seine κυμαινόταν από 2 έως 687 ng/l, ενώ τα επίπεδα των διαλυμένων PAHs ήταν μία τάξη μεγέθους χαμηλότερα [1,8].

Στον Πίνακα 4 απεικονίζονται κάποιες ενδεικτικές συγκεντρώσεις PAHs στο θαλασσινό νερό. Συνήθως οι συγκεντρώσεις των PAHs σε θαλασσινά νερά μακριά από την παραλία είναι σε χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, ενώ παρατηρήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε παράκτιες περιοχές ή σε εκβολές ποταμών [9]

Σε πρόσφατη μελέτη σχετικά με την ποσότητα και την μεταφορά των PAHs στα νερά της Δυτικής Μεσογείου βρέθηκε ότι η περιεκτικότητα των PAHs στην διαλυμένη μορφή ήταν μέγιστη στα ανοιχτά της Βαρκελώνης (1800pg/l) και στην εκβολή του ποταμού Ebro (2170pg/l), ενώ οι συγκεντρώσεις σε απομακρυσμένες περιοχές παρατήρησης ήταν χαμηλότερες (400-890pg/l). Τα PAHs που συνδέονταν με την αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη μεταφέρθηκαν κάτω από τα επιφανειακά νερά και οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονταν από 200 έως 750pg/l, με μέγιστη τιμή στα στενά του Γιβραλτάρ και της Σικελίας και το μέσο της εμπρόσθιας ζώνης μεταξύ της Ιβηρικής χερσονήσου και των Βαλέριων νήσων. Ελαφρά υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν στην υφαλοκρηπίδα (457-772) από ότι στην ανοιχτή θάλασσα (212-605pg/l) [9].

Επίσης παρατηρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις διαλυμένων στο νερό PAHs στο Δέλτα του Ρήνου. Τα PAHs στην διαλυμένη φάση βρέθηκαν ότι είναι πάνω από 30 και 50ng/l το καλοκαίρι και το χειμώνα αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες σχετικές συγκεντρώσεις ήταν αρκετά χαμηλότερες (πάνω από 14 και 19ng/l) [1].

Πίνακας 2: Οι 16 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες προτεραιότητας της EPA και μερικές φυσιοχημικές τους ιδιότητες

PAH	Χημικός Τύπος	Μοριακό Βόρος	Χημική Δομή	Τόση στην ατμόσφαιρα στους 20°C (T <sub>air</sub> )	Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C (mg L <sup>-1</sup> )	K <sub>ow</sub>	Κοινογενής ταξινόμηση IARC/IUS EPA*
Naphthalene, Np	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	128.17		0.0492	32	2300	-
Acenaphthylene, Acy	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	152.20		10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-2</sup>	3.93	12000	-
Acenaphthene, Ace	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	154.21		10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-2</sup>	3.4	21000	-
Fluorene, F	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	166.22		10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-2</sup>	1.9	15000	-
Anthracene, An	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178.23		2x10 <sup>-4</sup>	0.05 – 0.07	28000	3
Phenanthrene, Ph	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	178.23		6.8x10 <sup>-4</sup>	1.0 – 1.3	29000	3
Fluoranthene, Fl	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202.26		10 <sup>-6</sup> – 10 <sup>-4</sup>	0.26	340000	3
Chrysene, Chry	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228.29		10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-6</sup>	0.002	4x10 <sup>5</sup>	3/B2
Benzo[a]anthracene, B[a]An	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	228.29		5x10 <sup>-9</sup>	0.01	4x10 <sup>5</sup>	2A/B2
Pyrene, Py	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	202.26		6.9x10 <sup>-9</sup>	0.14	2x10 <sup>5</sup>	3
Benzo[k]fluoranthene, B[k]Fl	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252.31		9.6x10 <sup>-7</sup>	-	7x10 <sup>6</sup>	2B
Benzo[b]fluoranthene, B[b]Fl	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252.31		10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-4</sup>	-	4x10 <sup>6</sup>	2B/B2
Benzo[a]pyrene, B[a]Py	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	252.31		5x10 <sup>-9</sup>	0.0038	10 <sup>6</sup>	2A/B2
Dibenzo[a,h]anthracene, dB[a,h]An	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	278.35		~10 <sup>-10</sup>	0.0005	10 <sup>6</sup>	2A/B2
Indeno[1,2,3-cd]pyrene, I[1,2,3-cd]Py	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276.34		~10 <sup>-10</sup>	-	5x10 <sup>7</sup>	2B/B2
Benzo[g,h,i]perylene, B[g,h,i]Pe	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	276.34		~10 <sup>-10</sup>	0.00026	10 <sup>7</sup>	3

\*IARC: International Agency for Research on Cancer  
 IUS: International Union for Pure and Applied Chemistry  
 EPA: Environmental Protection Agency  
 2A: Probably carcinogenic  
 2B: Possibly carcinogenic  
 3: Not classifiable as to carcinogenicity  
 B1: Known human carcinogen  
 B2: Suspected human carcinogen  
 B3: Suspected human carcinogen  
 B4: Suspected human carcinogen  
 B5: Suspected human carcinogen  
 B6: Suspected human carcinogen  
 B7: Suspected human carcinogen  
 B8: Suspected human carcinogen  
 B9: Suspected human carcinogen  
 B10: Suspected human carcinogen  
 B11: Suspected human carcinogen  
 B12: Suspected human carcinogen  
 B13: Suspected human carcinogen  
 B14: Suspected human carcinogen  
 B15: Suspected human carcinogen  
 B16: Suspected human carcinogen  
 B17: Suspected human carcinogen  
 B18: Suspected human carcinogen  
 B19: Suspected human carcinogen  
 B20: Suspected human carcinogen  
 B21: Suspected human carcinogen  
 B22: Suspected human carcinogen  
 B23: Suspected human carcinogen  
 B24: Suspected human carcinogen  
 B25: Suspected human carcinogen  
 B26: Suspected human carcinogen  
 B27: Suspected human carcinogen  
 B28: Suspected human carcinogen  
 B29: Suspected human carcinogen  
 B30: Suspected human carcinogen  
 B31: Suspected human carcinogen  
 B32: Suspected human carcinogen  
 B33: Suspected human carcinogen  
 B34: Suspected human carcinogen  
 B35: Suspected human carcinogen  
 B36: Suspected human carcinogen  
 B37: Suspected human carcinogen  
 B38: Suspected human carcinogen  
 B39: Suspected human carcinogen  
 B40: Suspected human carcinogen  
 B41: Suspected human carcinogen  
 B42: Suspected human carcinogen  
 B43: Suspected human carcinogen  
 B44: Suspected human carcinogen  
 B45: Suspected human carcinogen  
 B46: Suspected human carcinogen  
 B47: Suspected human carcinogen  
 B48: Suspected human carcinogen  
 B49: Suspected human carcinogen  
 B50: Suspected human carcinogen  
 B51: Suspected human carcinogen  
 B52: Suspected human carcinogen  
 B53: Suspected human carcinogen  
 B54: Suspected human carcinogen  
 B55: Suspected human carcinogen  
 B56: Suspected human carcinogen  
 B57: Suspected human carcinogen  
 B58: Suspected human carcinogen  
 B59: Suspected human carcinogen  
 B60: Suspected human carcinogen  
 B61: Suspected human carcinogen  
 B62: Suspected human carcinogen  
 B63: Suspected human carcinogen  
 B64: Suspected human carcinogen  
 B65: Suspected human carcinogen  
 B66: Suspected human carcinogen  
 B67: Suspected human carcinogen  
 B68: Suspected human carcinogen  
 B69: Suspected human carcinogen  
 B70: Suspected human carcinogen  
 B71: Suspected human carcinogen  
 B72: Suspected human carcinogen  
 B73: Suspected human carcinogen  
 B74: Suspected human carcinogen  
 B75: Suspected human carcinogen  
 B76: Suspected human carcinogen  
 B77: Suspected human carcinogen  
 B78: Suspected human carcinogen  
 B79: Suspected human carcinogen  
 B80: Suspected human carcinogen  
 B81: Suspected human carcinogen  
 B82: Suspected human carcinogen  
 B83: Suspected human carcinogen  
 B84: Suspected human carcinogen  
 B85: Suspected human carcinogen  
 B86: Suspected human carcinogen  
 B87: Suspected human carcinogen  
 B88: Suspected human carcinogen  
 B89: Suspected human carcinogen  
 B90: Suspected human carcinogen  
 B91: Suspected human carcinogen  
 B92: Suspected human carcinogen  
 B93: Suspected human carcinogen  
 B94: Suspected human carcinogen  
 B95: Suspected human carcinogen  
 B96: Suspected human carcinogen  
 B97: Suspected human carcinogen  
 B98: Suspected human carcinogen  
 B99: Suspected human carcinogen  
 B100: Suspected human carcinogen

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις PAH σε επιφανειακά νερά ποταμών (ng/l)

PAH	Danube (Γερμανία) [2]	Aach (Γερμανία) [2]	Elbe (Γερμανία) [2]	Thames (Αγγλία) [2]	Jiulong (Κίνα) [3]	Severn (Αγγλία) [2]	Trent (Αγγλία) [2]	Αιόκμονας (Ελλάδα) (μέση τιμή) [2]	Λουδίας (Ελλάδα) (μέση τιμή) [2]
Np			7-51		120-1400			107	367
Acy			0.65-1.9		170-4180				
Ace			0.85-4.6		110-5700				
F			2.0-7.5		220-2290			12	20
Ph			4.1-22		160-1370			31	48
An			0.56-2.5		160-1020			<1.7	<1.7
Fl	60-110	380-760	7.6-40	140-360	90-2870	15-128	89-343	<14	
Py			7.3-33		220-2660			3.7	9.5
B[a]An	<10-10	100-390	2-12		280-1800			<0.9	11.3
Chy			3.5-26		<1070			0.94	2.3
B[b]Fl	10-20	80-360	3-30	40-120	130-1820			1.56	0.81
B[k]Fl	<10	130-170	2-13		210-2190	0.8-7.7	33-265	0.37	0.28
B[a]Py	<10	10-40	1.9-16	130-350	560-2600	1.5-12.5	51-504	0.86	0.73
Db[a,h]An			0.53-1.6		630-6030			1.28	1.17
B[ghi]Pe	<10	40-110	2.8-18	60-160	610-1930	2.0-11.3	75-688	2.1	<2.1
I[1,2,3-cd]Py	<10	120-220	2.3-15	50-210	960-5420	3.9-10.0	40-195	2.72	2.18
$\sum$ PAH	+70 – 150	860 – 2050	47.09 – 294.1	420 – 1200	+4630– 44350	23.2– 169.5	288– 1995	<180.13	<467.07

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις PAH σε θαλασσινά νερά (ng/l)

PAH	Βόρειος Ατλαντικός [4]	King George (Ανταρκτική) [5]	Μεσόγειος Θάλασσα [4]	Θάλασσα της Βαλτικής [2]		Κόλπος Θερμικού (Ελλάδα) [2]	Παράλια Chesapeake (Η.Π.Α.) [2]
				Βόθος 10-25 m	Βόθος 70-415 m		
Np		200		0.27 – 1.78	0.05 – 0.41		
AcY		11					
Ace		8		1.63 – 4.86	0.13 – 1.04	10 – 64	
F				0.27 – 0.86	0.03 – 0.18	10 – 150	0.32 – 2.12
Ph	0.40	8	0.24	0.50 – 2.26	0.08 – 1.00	30 – 132	0.88 – 4.86
An		2		0.16 – 0.46	0.04 – 0.56	10 – 170	0.08 – 0.28
Fl	0.11	5	0.35	0.41 – 0.93	0.10 – 0.85	10 – 65	0.35 – 2.12
Py	0.07	3	0.07	0.12 – 0.99	0.03 – 0.42	10 – 140	0.22 – 1.14
B[a]An	~0.01		~0.01	0.03 – 0.90	0.01 – 0.11	10 – 45	0.08 – 0.74
Crhy			~0.01	0.04 – 0.46	0.01 – 0.09	10 – 45	0.10 – 0.39
B[b]Fl	~0.04		~0.05	0.03 – 0.13	0.01 – 0.09		0.07 – 1.58
B[k]Fl	~0.04		~0.05	0.01 – 0.06	0.01 – 0.07	15 – 32	0.10 – 0.43
B[a]Py	~0.02		~0.01	0.01 – 0.12	0.01 – 0.07	10 – 44	0.16 – 0.48
Db[a,h]An				0.01 – 0.02	0.00 – 0.17		0.13 – 1.11
B[ghi]Pe				0.02 – 0.48	0.00 – 0.35	10 – 30	0.12 – 2.87
I[1,2,3-cd]Py				0.01 – 0.19	0.00 – 0.19		0.17 – 0.74
$\sum$ PAH	~0.69	237	~0.79	3.25 – 7.86	0.51 – 5.60	135 – 917	2.78 – 17.86

### 1.2.2 ΥΠΟΓΕΙΑ ΝΕΡΑ

Η ύπαρξη των PAHs στα υπόγεια νερά προέρχεται από μολυσμένα επιφανειακά νερά, από τις εκροές των γεωργικών αρδεύσεων, από την διήθηση σωματιδίων που προέρχονται από περιοχές διάθεσης στερεών αποβλήτων ή από μολυσμένα εδάφη. Η κίνηση και η μεταφορά των PAHs στα εδαφικά συστήματα καθώς και οι μηχανισμοί διείσδυσης τους στα υπόγεια νερά παραμένουν ασαφείς [1].

Η σύσταση του υπόγειου νερού μεταβάλεται καθώς ρέει μέσω των διαφόρων εδαφικών σωματιδίων και τα PAHs προσροφούνται στα οργανικά στερεά του χώματος. Οι συγκεντρώσεις των καρκινογενών PAHs στα υπόγεια νερά σε περιοχές της Αμερικής κυμαίνονται από 0.2 ng/l έως 6.9 ng/l, ενώ οι αντίστοιχες τιμές στα επιφανειακά νερά κυμαίνονται από 0.1 ng/l έως 800 ng/l με πιο συχνές συγκεντρώσεις μεταξύ 2 ng/l και 50 ng/l. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις των PAHs στα υπόγεια νερά που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια είναι δυνατόν να αυξηθούν ύστερα από περιόδους βροχόπτωσης, γεγονός που σημαίνει ότι πραγματοποιείται μια γρήγορη μεταφορά από το νερό της βροχής στο υπόγειο νερό [1].

### 1.2.3 ΠΟΣΙΜΟ ΝΕΡΟ

Η παρουσία των PAHs στο πόσιμο νερό μπορεί να οφείλεται στην χρήση επιφανειακών ή υπόγειων νερών για κατανάλωση ή στην χρήση σωλήνων, που είναι κατασκευασμένοι από άνθρακα (επίστρωση πίσσας) στα δημόσια δίκτυα ύδρευσης, μια και αυτό επιτρέπεται σε ορισμένες χώρες. Επίσης από έρευνες έχει προκύψει ότι υψηλότερα επίπεδα PAHs αναμένονται στο πόσιμο νερό που προέρχεται από πηγές, όπως εγκαταστάσεις επεξεργασίας νερού και συστήματα συλλογής του βρόχινου νερού. Η χλωρίωση του πόσιμου νερού, ως τεχνική απολύμανσης, μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό οξυγονωμένων και χλωριωμένων PAHs, ενώσεις που είναι πολύ πιο τοξικές από τα PAHs [1].

Ανάμεσα στις πολυάριθμες οργανικές ενώσεις που έχουν βρεθεί σε δείγματα πόσιμου νερού, έχει αναφερθεί και η παρουσία PAHs από πολλούς ερευνητές. Οι συγκεντρώσεις των PAHs στο πόσιμο νερό σε διάφορες περιοχές (Ιαπωνία, Δανία) παρέχονται στον Πίνακα 5. Η οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης 80/778/EEC ορίζει ως ανώτατο όριο για τα PAHs στο πόσιμο νερό τα 0.2 µg/l για τα Fluoranthene, Benzo[k]pyrene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[ghi]perylene και Indeno[1,2,3-cd]pyrene ως συστατικά αναφοράς. Τα μέγιστα επίπεδα για το άθροισμα αυτών των PAHs στα επιφανειακά νερά μπορούν να προσεγγίσουν το 1µg/l, ανάλογα με τις διαδικασίες επεξεργασία των επιφανειακών νερών που ακολουθούνται [1].



Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις PAHs στο πόσιμο νερό (ng/l) [2]

PAH	Tsukuda (Ιαπωνία)	Elsinki (Φινλανδία)	Horsholm (Δανία)	Copenhagen (Δανία)	Uppsala (Σουηδία)	Oslo (Νορβηγία)
Np	0.31 – 2.3	8.8	5.5		<6.3	1.2
Acy		1.6	0.4			
Ace		7.4	14			
F	0.25 – 5.8	20	21		<1.1	0.51
Ph	0.45 – 1.41	64	28	0.16	<2.2	1.6
An		9.7	5.4	0.04	<1.3	0.39
Fl	0.02 – 0.21	24	15	0.94	<0.58	1.8
Py		12	8.5	0.31	<0.30	0.72
B[a]An		0.76	1.5	0.12		0.24
Crhy		1.8	6.7	0.47		1.0
B[b]Fl		0.17	0.29	0.05		0.34
B[k]Fl		0.09	0.10	0.02		0.10
B[a]Py		0.05	0.04	0.05		0.29
Db[a,h]An						
B[ghi]Pe						
I[1,2,3-cd]Py						
$\sum PAH$	<b>1.03 – 7.42</b>	<b>150.37</b>	<b>106.43</b>	<b>2.16</b>	<b>&lt;11.78</b>	<b>8.19</b>

#### 1.2.4 ΕΔΑΦΟΣ

Η φυσική πτώση των αιωρούμενων σωματιδίων της ατμόσφαιρας και οι βροχές, έχουν σαν αποτέλεσμα την παρουσία μικρών ποσοτήτων PAHs στο έδαφος. Μεγαλύτερες σχετικά συγκεντρώσεις παρατηρούνται σε περιοχές με αυξημένη βιομηχανική δραστηριότητα και μεγάλη πυκνότητα πληθυσμού [1].

Επίσης μεγάλες ποσότητες PAHs υπάρχουν στα στερεά απόβλητα των δεικνυμένων σε εδάφη, που χρησιμοποιούνται για landfarming επεξεργασία των αποβλήτων τους. Τα PAHs δεσμεύονται με τα χουμικά συστατικά του εδάφους και σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα. Η βιοαποικοδόμηση αυτών των PAHs-χουμικών συμπλόκων υπολογίζεται σε δεκάδες, εκατοντάδες ή και χιλιάδες χρόνια. Επίσης τα PAHs εισέρχονται στο χώμα ως σύνθετα μείγματα, λόγω διαρροής από χώρους αποθήκευσης καυσίμων ή ύστερα από ατελή καύση διαφόρων ουσιών (κάρβουνο, πετρέλαιο, ξύλο, καπνός, βενζίνη, απορρίμματα) [33].

#### 1.2.5 ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑ

Η βιομηχανία πετρελαίου είναι η σημαντικότερη πηγή ρύπανσης της ατμόσφαιρας με PAHs. Ο σχηματισμός των PAHs λαμβάνει χώρα κατά την αναγέννηση του καταλύτη στην διαδικασία καταλυτικής διάσπασης προϊόντων, που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή καυσίμων ή για την παραγωγή ασφάλτου [33].

Η βιομηχανία άνθρακα προκαλεί επίσης σημαντικές εκπομπές PAHs και κυρίως κατά την διαδικασία καύσης του φυσικού αερίου και της πυρόλυσης υγρών αρωματικών υδρογονανθράκων σε υψηλή θερμοκρασία. Άλλες πηγές είναι οι βιομηχανίες λιπασμάτων, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις PAHs παρατηρούνται στο εσωτερικό των χυτηρίων ή στα γκαράζ αυτοκινήτων [33].

Επιπλέον η οικιακή θέρμανση αποτελεί σημαντική πηγή ρύπανσης με PAHs, κυρίως όταν χρησιμοποιείται το ξύλο ως καύσιμο υλικό. Αντίθετα το κάρβουνο, τα υγρά καύσιμα και το υγραέριο παράγουν μικρότερες ποσότητες PAHs. Σημαντικές εκπομπές PAHs στην ατμόσφαιρα προκαλούνται και από την καύση των στερεών απορριμμάτων. Το είδος των ενώσεων που εκπέμπονται εξαρτάται από τη φύση των απορριμμάτων. Τα αυτοκίνητα τέλος αποτελούν την τελευταία σημαντική πηγή ρύπανσης της ατμόσφαιρας με PAHs. Τα σωματίδια, που εκπέμπονται από τα αυτοκίνητα, περιέχουν εκτός των PAHs και τα αμίνο- και τα νίτρο-παράγωγα αυτών, καθώς και αζααρένια, ενώσεις καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες. Ο τύπος του αυτοκινήτου καθορίζει σε μεγάλο ποσοστό το είδος και την ποσότητα των PAHs, που εκπέμπονται στην ατμόσφαιρα [33].

Τα αυτοκίνητα με κινητήρες Diesel εκπέμπουν μικρότερες ποσότητες PAHs από τα βενζινοκίνητα αυτοκίνητα. Παρόλα αυτά το περιεχόμενο των καυσαερίων Diesel θεωρείται πιο καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο. Αυτό αποδίδεται στην αντίδραση των PAHs με τα νιτρικά, που υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στις εξατμίσεις πετρελαιοκίνητων μηχανών προς σχηματισμό πολυαρωματικών νιτροπαραγώγων. Τα νιτροπαραγωγα είναι ισχυρότερα μεταλλαξιογόνα από τους μη υποκατεστημέ-νους PAHs [33].

Το μεγαλύτερο ποσοστό (70-90%) των PAHs στην ατμόσφαιρα βρίσκεται σε σωματιδιακή κατάσταση, προσροφημένο σε αιωρούμενα σωματίδια. Επιπλέον στην πλειοψηφία τους είναι προσροφημένοι στα σωματίδια με μέγεθος μικρότερο των 5μm, δηλαδή στα σωματίδια, που αντιστοιχούν στο αναπνευστικό κλάσμα των αεροζόλ. Τα σωματίδια αυτά διεισδύουν στην ανώτερη αναπνευστική οδό και είναι διαθέσιμα για κατακάθιση στο πνευμονικό σύστημα. Οι σωματιδιακοί PAHs μπορούν να μεταφερθούν από τους ανέμους σε μακρινές αποστάσεις [33].

Οι αντιδράσεις των PAHs στην ατμόσφαιρα είναι πολύ μεγάλης σημασίας, επειδή σε πολλές περιπτώσεις προκύπτουν προϊόντα πολύ πιο επικίνδυνα για τον άνθρωπο από τις αρχικές ενώσεις. Παρακάτω αναφέρονται οι πιο σημαντικές ατμοσφαιρικές αντιδράσεις των PAHs :

Τα PAHs απορροφούν έντονα την ακτινοβολία UV (μήκη κύματος 300-420 nm) και υφίστανται φωτοοξειδωση. Τα προϊόντα μπορεί να είναι ενδοπεροξειδία, διό-νες και γενικά καρβονυλικές ενώσεις. Η τάση για φωτοοξειδωση είναι μεγαλύτερη στα PAHs, που είναι σε σωματιδιακή κατάσταση παρά στην υγρή φάση.

Οι PAHs αντιδρούν με τα οξείδια του αζώτου και σχηματίζουν νιτροπαραγωγα, τα οποία έχουν μεταλλαξιογόνες ιδιότητες. Οι αντιδράσεις των PAHs με τα οξείδια του αζώτου είναι μεγάλης σημασίας, επειδή ακόμη και μη μεταλλαξιογόνα PAHs μπορούν να σχηματίσουν μεταλλαξιογόνα νιτροπαραγωγα (π.χ. περυλένιο).

Τα PAHs αντιδρούν επίσης με το όζον και σχηματίζουν οξειδία, π.χ. Βενζο(α)πυρρένιο-4,4-οξείδιο, ένα ισχυρό μεταλλαξιογόνο.

Τα οξειδία του θείου ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{SO}_3$ ) και το  $\text{H}_2\text{SO}_4$  αντιδρούν εύκολα με τα PAHs, ιδιαίτερα όταν αυτά είναι προσροφημένα με αιωρούμενα σωματίδια.

Τέλος τα PAHs αντιδρούν με υπεροξειδία, ρίζες και άλλα οξειδωτικά της ατμόσφαιρας και σχηματίζουν κινόνες, ενώσεις καρκινογόνες [33].

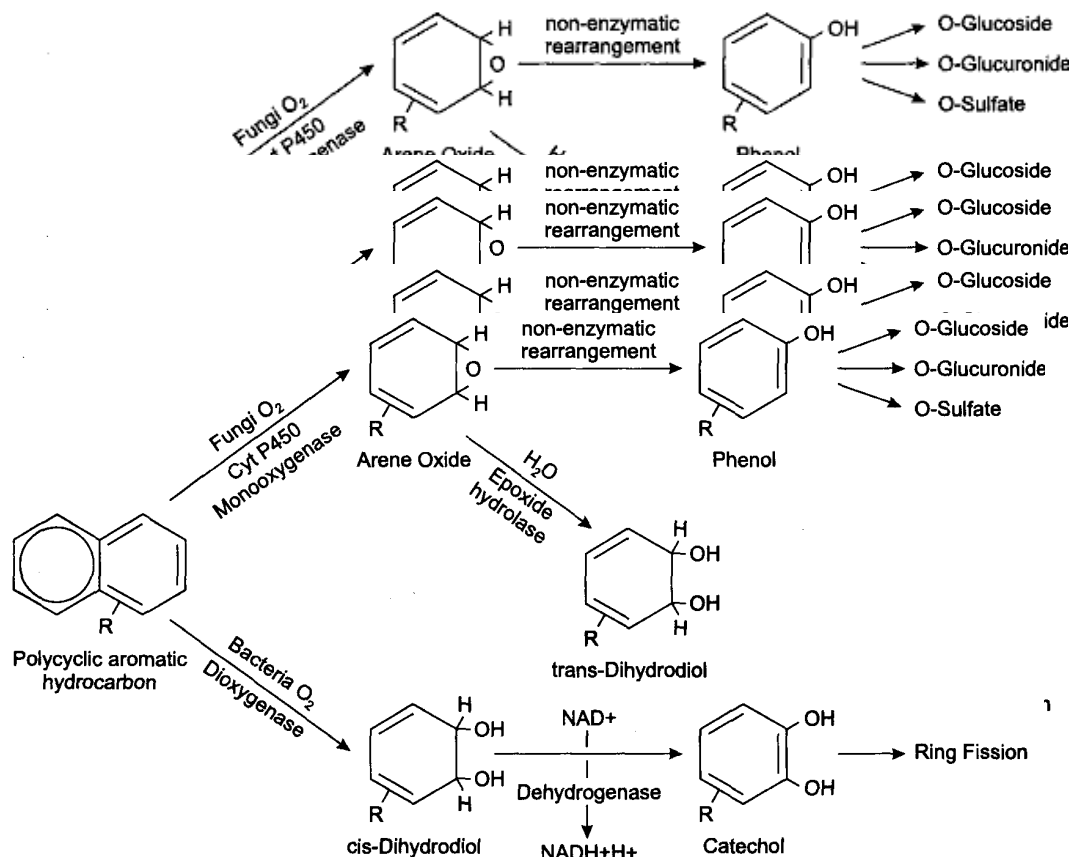
### 1.3 ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ PAHs

Η μικροβιακή αποδόμηση των PAHs, που αποτελούνται από 1-4 αρωματικούς δακτυλίους, έχει ήδη περιγραφεί σε πολλές δημοσιεύσεις. Η βιοαποικοδόμηση των PAHs βρίσκεται σε απευθείας συσχέτιση με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων στο μόριο τους. Με αυξάνοντα αριθμό αρωματικών πυρήνων μειώνεται η δυνατότητα βιοαποικοδόμησης. Στο μικροβιακό μεταβολισμό των PAHs δύο σημαντικές κατηγορίες ενζύμων λαμβάνουν μέρος, οι μονό- και οι διοξυγενάσες. Για αυτό το λόγο οι μικροοργανισμοί χρειάζονται μοριακό οξυγόνο για την αρχική υδροξυλίωση του μορίου (Εικόνα 1). Η υδροξυλίωση είναι η πιο σημαντική βιοχημική μετατροπή των PAHs, η οποία ανοίγει το δρόμο στο μετέπειτα μεταβολισμό τους [33].

Στα βακτήρια οι διοξυγενάσες ενσωματώνουν στον αρωματικό δακτύλιο δύο άτομα οξυγόνου υπό μορφή υδροξυλίων, που οδηγούν στη δημιουργία διυδροδιόλων. Στη συνέχεια δεϋδρογενάσες καταλύουν τη δεύτερη σημαντική βιοχημική αντίδραση στον βακτηριακό μεταβολισμό των PAHs δημιουργώντας ξανά έναν αρωματικό δακτύλιο με δύο υδροξυλικές ομάδες. Οι ενώσεις, που δημιουργούνται, λέγονται κατεχόλες και ανήκουν στους σημαντικότερους κεντρικούς μεταβολίτες του αρωματικού μεταβολισμού. Η επόμενη βιοχημική αντίδραση οδηγεί στην διάσπαση του αρωματικού δακτυλίου στην ορθό- ή στην μέτα-θέση [33].

Οι μύκητες μπορούν να μεταβολίζουν τα PAHs με τη βοήθεια κυτοχρωμικών P-450 μονοοξυγενασών. Το ένα άτομο του μοριακού οξυγόνου δεσμεύεται στο μόριο του PAH, ενώ το δεύτερο άτομο του μοριακού οξυγόνου ανάγεται σε νερό. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας παράγεται ένα μόριο PAH-οξειδίου, το οποίο ενζυμικά μετατρέπεται σε μια trans-διυδροδιόλη και δε μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω. Εάν το PAH-οξείδιο μετατραπεί αβιοτικά (χωρίς ένζυμα) δημιουργείται ένα μόριο φαινόλης, η οποία μπορεί να αντιδράσει και να συνδεθεί με θειικές ρίζες, γλυκόζη, γλουταθιόνη ή και γλυκουρονικό οξύ [33].

Μύκητες, που μεταβολίζουν τη λιγνίνη με υπεροξειδάσες, όπως ο *Phanerochaete chrysosporium*, μπορούν να οξειδώσουν πολλούς PAH, όπως πυρένιο, ανθρακένιο, βενζο(α)πυρένιο, βενζο(α)ανθρακένιο και περυλένιο. Μερικά φύκη έχουν ακόμη παρατηρηθεί, που μετατρέπουν μερικά PAH στις αντίστοιχες διυδροδιόλες ανοίγοντας έτσι το δρόμο προς το μεταβολισμό τους. Τα φύκη δεν μεταβολίζουν τα PAHs, τα βιομετατρέπουν μόνο. Γενικά τα PAHs δεν μεταβολίζονται σε ανοξικές συνθήκες. Έτσι λοιπόν διατηρούνται αμετάβλητα για εκατοντάδες ή χιλιάδες χρόνια σε υπόγεια ύδατα ή βαθιά



**Εικόνα 1 :** Μικροβιακή οξείδωση των PAHs σε μύκητες και βακτήρια με την βοήθεια μονοοξυγενάσης και διοξυγενάσης.

## 1.4 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ PAHs ΣΤΟΥΣ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Τα PAHs έχουν πολλά χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν την ιδιότητα επικίνδυνων υποκαταστάτων. Έχουν ανιχνευθεί πολλά PAHs σε υδρόβια φυτά, οστρακοειδή και σε διάφορα είδη ψαριών. Προσδιορισίμες συγκεντρώσεις PAHs διαπιστώθηκαν και σε οστρακοειδή απομακρυσμένων περιοχών του κόσμου (Ανταρκτική), γεγονός που αποδόθηκε στην ανά τον κόσμο διασπορά των πετρελαιοειδών και των προϊόντων καύσης. Τα PAHs έχουν μεγάλη διαλυτότητα στα λιπίδια και συγκεντρώνονται στους λιπώδεις ιστούς, στο γάλα και κυρίως στο συκώτι των υδρόβιων οργανισμών. Στο σκοτάδι και κάτω από αναερόβιες συνθήκες είναι πολύ ανθεκτικά, κυρίως όταν βρίσκονται σε ίζημα [10,33].

### 1.4.1 ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ PAHs

Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου μπορούν να προκύψουν βλάβες από τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες είναι η σύνδεση με αντίδραση με τα λιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες ή σε άλλα κυτταρικά τμήματα. Αυτός ο τύπος αντίδρασης είναι χαρακτηριστικός για λιπόφιλα υποκατάστατα, δεδομένου ότι είναι μικρής διάρκειας ενδιάμεσοι μεταβολίτες που αντιδρούν με τις πρωτεΐνες ή ενώνονται με το DNA. Η δέσμευση με το DNA μπορεί να προκαλέσει μεταλλάξεις και αν οι μηχανισμοί διόρθωσης υπερφορτωθούν, μπορεί να προκληθεί καρκίνος [33].

Μελέτες έχουν δείξει ότι η μεταβολικότητα είναι περισσότερο ανεπτυγμένη στα ψάρια, μέτρια ανεπτυγμένη στα οστρακοειδή και λιγότερο ανεπτυγμένη στα μαλάκια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά των PAHs στην τροφική αλυσίδα. Η μετέπειτα βιοσυσσώρευσή τους είναι μικρής σημασίας και πρακτικά δεν συμβαίνει σε υψηλότερα διατροφικά επίπεδα. Ακόμα και σε αρκετά ρυπασμένα περιβάλλοντα παρατηρούνται χαμηλές συγκεντρώσεις των PAHs στα ψάρια [33].

Σημαντικές είναι οι συνέπειες των PAHs στο ανοσοποιητικό σύστημα των ασπόνδυλων. Μελέτες που έγιναν σε ψάρια, τα οποία εκτέθηκαν σε ρυπασμένα ιζήματα σε δοκιμές στο εργαστήριο καθώς και στο πεδίο, έδειξαν ότι αυτά τα ψάρια είχαν μειωμένη μακροβιοφαγική δραστηριότητα. Επιπλέον παρατηρήθηκε και χαμηλότερος αριθμός λεμφοαδένων σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα. Επίσης έχει παρατηρηθεί σημαντικά χαμηλότερη αντίδραση των λεμφοκυττάρων σε ψάρια που προέρχονται από πολύ ρυπασμένες περιοχές [33].

Γνωρίζουμε ότι η σύνθεση των ορμονών στα ψάρια και ο μεταβολισμός τους, εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την ομαλή λειτουργία του κυτταροχωμίου P-450. Επομένως υπάρχει η πιθανότητα κάθε ανισορροπία στην ενζυμική δραστηριότητα να οδηγήσει σε διαταραχή των διεργασιών ελέγχου των επιπέδων των ορμονών (αναπαραγωγή) [10,33].

Ένας άλλος μηχανισμός, μέσω του οποίου επιδρούν τα PAHs στους οργανισμούς, είναι η αντίδραση τους με τις κυτταρικές μεμβράνες και τα κυτταρικά στοιχεία. Αυτή η αντίδραση προκαλεί αλλαγές στην δομή και την λειτουργία των μεμβρανών. Έτσι παρατηρούνται αλλαγές στην διαπερατότητα και διαταραχές στην μεταφορά ουσιών από και προς το εσωτερικό του κυττάρου. Επίσης υπάρχει ο κίνδυνος να διαταραχθεί το ισοζύγιο ενέργειας. Παραδείγματα τέτοιων συνεπειών προέρχονται από τις παρατηρήσεις μειωμένης ανάπτυξης μυδίων, μειωμένου περιεχομένου σε λίπος σε στρείδια καθώς και αρνητικές συνέπειες στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή σε πολυχαίτες [33].

#### **1.4.2 ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ-ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ PAHs**

Τα PAHs μεταβολίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό και δημιουργούν μεταβολίτες με κυτταροτοξικές, μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες. Ο μεταβολισμός γίνεται με την βοήθεια ενός ενζύμου, που βρίσκεται στο συκώτι και είναι μια οξυγενάση (η κυτοχρωμική μονοοξυγενάση P430). Οι μεταβολίτες που θεωρούνται υπεύθυνοι για τις αντιδράσεις με τα κυτταρικά μακρομόρια [νουκλεϊκά οξέα (RNA,DNA), πρωτεΐνες (ένζυμα)] είναι τα διοξείδια του βενζολικού δακτυλίου. Τα εποξειδία αυτά ευνοούν τις χημικές αντιδράσεις με πυρηνόφιλες ομάδες κυττάρων (DNA,RNA), με αποτέλεσμα να προκαλούνται μεταλλάξεις ή καρκίνοι [33].

Τα εποξειδία αυτά στην συνέχεια υδρολύονται δημιουργώντας υδροξυ-παράγωγα, τα οποία αποβάλλονται μέσω του γαστρεντερικού συστήματος. Τα μη καρκινογόνα PAHs (ναφθαλένιο, ανθρακένιο) αποβάλλονται επίσης με

τα ούρα. Η παραμονή των PAHs στους διαφόρους οργανισμούς ποικίλλει σημαντικά [33].

Η περισσότερο μελετημένη παθολογική συνέπεια των PAHs είναι ο καρκίνος. Η παρουσία καταλοίπων PAHs στον άνθρωπο δεν θεωρείται άμεσα υπεύθυνη για την ανάπτυξη καρκίνου. Βέβαια πολλά PAHs έχουν αποδειχτεί ή θεωρούνται καρκινογόνα και συγκαταλέγονται στο συνολικό καρκινογόνο φορτίο για τον άνθρωπο. Αν και για πολλά PAHs έχει διαπιστωθεί τερατογόνος δράση σε πειραματόζωα, δεν έχει παρατηρηθεί ανάλογο φαινόμενο στον άνθρωπο [33].

Η IARC (International Agency for Research on Cancer) έχει κατατάξει 11PAHs σαν είτε πιθανώς (group 2A) είτε δυνατός (group 2B) ανθρωπίνως καρκινογενή. Επτά από αυτά είναι τα πιο συνηθισμένα σε απόβλητα χυτηρίων και από αυτά τρία είναι στην κατηγορία των πιθανώς καρκινογόνων : Benzo[a]anthracene, Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene. Τα τρία PAHs : Benzo[b,j,k]fluoranthenes που εμφανίζονται συχνά σε απόβλητα χυτηρίων ανήκουν στην ομάδα 2B όπως και το indeno[1,2,3-cd]pyrene [10].

Γενικά η σχέση των PAHs με τον καρκίνο δεν έχει προσδιοριστεί σε μεγάλο βαθμό και είναι αρκετά σύνθετη. Ορισμένα PAHs διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη όγκων, κάτω από ορισμένες συνθήκες (θερμοκρασία, ηλικία ψαριού) [10].

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τον καρκίνο στα ψάρια, λόγω των PAHs, είναι λίγες. Διαπιστώθηκε ότι μακροχρόνια έκθεση των ψαριών σε υψηλή συγκέντρωση PAHs μπορεί να προκαλέσει ελάττωση της ανάπτυξης και της ικανότητας αναπαραγωγής διαφόρων ειδών. Βέβαια σε αυτές τις πειραματικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις PAHs, που δεν αναμένονται σε φυσικά νερά. Σε ορισμένες περιπτώσεις το αποτέλεσμα ενισχύθηκε με εφαρμογή στο δέρμα ή εισαγωγή με ένεση. Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί η δημιουργία όγκων στα ψάρια με περιοδική έκθεσή τους σε συγκεντρώσεις PAHs (Benzo[a]pyrene, Dimethyl-Benzo[a]anthracene) που είναι δυνατόν να παρατηρηθούν σε λίμνες ή ποτάμια με ρυπασμένα ιζήματα (<5μg/l)[6]. Επιπλέον αναφέρθηκαν ανωμαλίες στην ανάπτυξη (όγκοι στο ήπαρ, υπερπλασία των βραγχίων, νεφρικές βλάβες), που αποδίδονται στην μεταλλαξιογόνο και τερατογόνο δράση τους. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η τοξικότητα των PAHs αυξάνει μαζί με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η EPA έχει καθορίσει 16 πρότυπα PAHs σαν επικίνδυνους ρύπους για την δημόσια υγεία και το περιβάλλον, με βάση τις μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες των PAHs [10,33].

Τέλος είναι πολύ δύσκολο να αποδειχτεί ότι τα PAHs προκαλούν καρκίνο στους οργανισμούς φυσικών συστημάτων, μια και υπάρχουν μαζί με τα PAHs και άλλες ρυπαντικές ουσίες που συμβάλλουν στην εμφάνιση όγκων στους οργανισμούς. Παρά το γεγονός αυτό την τελευταία δεκαετία έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που παρέχουν σημαντικά στοιχεία για τον τρόπο με τον οποίο σχετίζονται τα PAHs με τον καρκίνο [10].

## 1.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PAHs

Για τον προσδιορισμό των PAHs σε πολύπλοκα περιβαλλοντικά δείγματα έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές αναλυτικές τεχνικές. Οι πιο διαδεδομένες είναι οι ακόλουθες : η αέρια χρωματογραφία (GC) με ανίχνευση ιονισμού φλόγας (FID) ή με ανίχνευση φασματομέτρου μάζας (MSD) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανίχνευση υπεριώδους ακτινοβολίας (UVD) ή με φθορική ανίχνευση (FLD). Άλλες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι : η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) με UVD ή FLD, η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC) με UVD ή MSD και η υγρή χρωματογραφία (LC) με MSD [1,11].

Σύμφωνα με το E-DIN38407 F18, η HPLC-FLD είναι η πιο κατάλληλη για τον προσδιορισμό των 15 PAHs (εκτός από την acenaphthylene) σε υδάτινα δείγματα, ενώ η μέθοδος 610 της US EPA προτείνει την HPLC με UVD ή FLD ή την GC-FID για τον προσδιορισμό των 16 PAHs στα υγρά απόβλητα. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η αέρια χρωματογραφία δεν αναλύει επαρκώς τα ακόλουθα 4 ζεύγη ενώσεων : An-Ph, Chry-B[a]An, B[b]Fl-B[k]Fl και Db[a,h]An-In[1,2,3-cd]Py [1].

Έχει αποδειχθεί ότι η υγρή χρωματογραφία αντεστραμμένης φάσης σε ακίνητες φάσεις που αποτελούνται από χημικούς δεσμούς  $C_{18}$ , παρέχει εξαιρετικό διαχωρισμό των PAHs. Παρ'όλα αυτά δεν παρέχουν όλες οι ακίνητες φάσεις  $C_{18}$  αυτόν τον διαχωρισμό, διότι ο διαχωρισμός επηρεάζεται από το είδος της σύνθεσης που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία της συζευγμένης φάσης. Η πλειοψηφία των φάσεων  $C_{18}$  προκύπτει από την αντίδραση μονοσυναρτησιακών υδριδίων του πυριτίου (μονοχλωρυδρίδια του πυριτίου) με πυριτία ( $SiO_2$ ) για το σχηματισμό μονομερών δεσμών. Οι πολυμερείς φάσεις προκύπτουν από δισυναρτησιακά ή τρισυναρτησιακά υδρίδια του πυριτίου παρουσία νερού, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την σύνδεσή τους και το σχηματισμό πολυμερών υδριδίων του πυριτίου πάνω στην επιφάνεια της πυριτίας. Η φάση που προκύπτει δεν είναι ορισμένη τόσο καλά όσο η μονομερής φάση. Καλός διαχωρισμός των 16 PAHs (US EPA) μπορεί να επιτευχθεί σε πολυμερείς φάσεις  $C_{18}$ , σε αντίθεση με τις μονομερείς φάσεις όπου τα ισομερή τεσσάρων δακτυλίων (Chry, B[a]An) δεν μπορούν να αναλυθούν και τα ισομερή πέντε δακτυλίων (B[k]Fl, B[b]Fl, Fl και Ace), έξι δακτυλίων (B[ghi]Pe και I [1,2,3-cd]Py) αναλύονται μερικώς [1].

Στην αέρια χρωματογραφία έχει υιοθετηθεί η χρήση τριχοειδών στηλών πυριτίου, που επικαλύπτονται από μη πτητική υγρή φάση (μεθυλ-σιλικόνη). Επίσης χρησιμοποιούνται και συμπιεσμένες στήλες με παρόμοιες ακίνητες φάσεις [1].

Η απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας και η ανίχνευση φθορισμού είναι οι πιο διαδεδομένοι ανιχνευτές στην υγρή χρωματογραφία για την μέτρηση των PAHs. Οι ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας παρέχουν σχεδόν πλήρη ανίχνευση των PAHs, ενώ για την μέτρηση πολύπλοκων δειγμάτων PAHs οι ανιχνευτές φθορισμού παρέχουν υψηλότερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Ένας υψηλός βαθμός εκλεκτικότητας μπορεί να επιτευχθεί, με βάση την επιλογή κατάλληλων μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής [1].

Ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδίων( PDA) είναι ένας άλλος ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας για την μέτρηση των PAHs. Οι ανιχνευτές PDA είναι λιγότερο ευαίσθητοι από άλλους ανιχνευτές απορρόφησης και η παρουσία πολλαπλάσιων μηκών κύματος του φωτός στα κύτταρα των δειγμάτων αυξάνει την πιθανότητα εσφαλμένων μετρήσεων που προέρχονται από το δευτεροβάθμιο φθορισμό. Παρ'όλα αυτά τα πλεονεκτήματα που παρέχονται από τα φασματικά στοιχεία που καταγράφονται, είναι πολύ σημαντικά. Η καθαρότητα της κορυφής μπορεί να εξακριβωθεί από τα φάσματα επίστρωσης που λαμβάνονται από διαφορετικές περιοχές της ίδιας κορυφής, καθώς και από οποιεσδήποτε αλλαγές που θα μπορούσαν να αποδοθούν σε προσμείξεις έκλουσης [1].

Ο φασματογράφος μάζας χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για την ανάλυση των PAHs και είναι γενικά αποδεκτό ότι αποτελεί το πιο εύχρηστο εργαλείο για τον προσδιορισμό των PAHs. Αν και η τεχνική είναι λιγότερο ευαίσθητη από την απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας και τις μεθόδους φθορισμού, εντούτοις παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα πολύπλοκα μείγματα PAHs , λόγω των απλών φασμάτων μάζας που λαμβάνονται από αυτές τις ενώσεις. Το φασματομέτρο μάζας (MSD) μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την αέρια χρωματογραφία(GC) ή την υγρή χρωματογραφία(LC). Τα όργανα που χρησιμοποιούνται στην LC-MSD είναι σχετικά ακριβά και επιπρόσθετα η σύνδεση της LC με MS δεν είναι τόσο εύκολη συγκριτικά με την GC [1].

Η σύγκριση ανάμεσα στην συζευγμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας-ανίχνευσης φθορισμού (LC-FLD) και την συζευγμένη τεχνική αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MSD) για τον προσδιορισμό των PAHs σε περιβαλλοντικά δείγματα, απέδειξε ότι και οι δύο τεχνικές παρέχουν ακριβή αποτελέσματα. Παρ'όλα αυτά τα PAHs : anthracene, perylene μετρήθηκαν με μεγαλύτερη ακρίβεια με την τεχνική LC-FLD, λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας της ανίχνευσης φθορισμού για αυτές τις ενώσεις. Αντιθέτως η τεχνική GC-MSD παρέχει αποτελέσματα μεγαλύτερης ακρίβειας και ορθότητας για τα : B[ghi]Pe και I[1,2,3-cd]Py, λόγω της χαμηλής ευαισθησίας της ανίχνευσης φθορισμού για αυτές τις ενώσεις. Για τα υπόλοιπα PAHs που εξετάζονται (Ph, Fl, Py, B[a]An, B[a]Py) οι δύο τεχνικές έδωσαν ισοδύναμα αποτελέσματα [1].

Μια άλλη μελέτη σχετικά με τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς της HPLC στην περιβαλλοντική ανάλυση, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η τεχνική HPLC-FLD είναι πιο ευαίσθητη από την GC-MSD για τον προσδιορισμό των PAHs και παρέχει όρια ανίχνευσης 2-5 φορές χαμηλότερα για συγκεκριμένες ενώσεις [1].

Η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία μπορούν να αυξηθούν με την χρήση λέιζερ ως πηγή διέγερσης στο μοριακό φθορισμό. Έχει χρησιμοποιηθεί χρονικά διαχωριζόμενος φθορισμός (TRF), βασισμένος σε λέιζερ, σε συνδυασμό με την HPLC για τον προσδιορισμό των PAHs. Αντικαθιστώντας την λάμπα ξενίου ενός συμβατικού φθορισμόμετρου με ένα λέιζερ (N<sub>2</sub>) που χρησιμοποιεί ως πηγή διέγερσης τις χρωστικές ουσίες, η ικανότητα ανίχνευσης των PAHs βελτιώνεται. Πρόκειται για μια τεχνική υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας.



Για το B[a]Py επιτεύχθηκε όριο ανίχνευσης 180 fg και αυτή η τεχνική έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των PAHs σε λίμνες [1].

Τέλος μια αναλυτική μέθοδος που αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια είναι η ινώδης ανίχνευση των PAHs με την χρήση φθορισμού επαγόμενου μέσω λείζερ. Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι οι ινώδεις αισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία για την ταυτοποίηση σωματιδιακών και υδατικών PAHs σε χαμηλές συγκεντρώσεις ( $\mu\text{g/l}$  και  $\text{ng/l}$  αντίστοιχα). Η παρουσία των αισθητήρων μπορεί να επηρεαστεί από τον κορεσμό στην περίπτωση των σωματιδιακών PAHs ή από την αλληλεπίδραση με την οργανική ύλη στην περίπτωση των PAHs υδατικής φύσεως. Προς το παρόν με τους υπάρχοντες αισθητήρες είναι πιθανή η πραγματοποίηση μόνο ημιποσοτικής ανάλυσης για τα περισσότερα δείγματα. Όταν χρησιμοποιείται σύγχρονος φθορισμός για την ανάλυση των PAHs, μπορεί να περιοριστεί η προεπεξεργασία του δείγματος, λόγω της εξαιρετικής εκλεκτικότητας αυτής της τεχνικής σχετικά με την εκπομπή φθορισμού [1].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2. ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ-LPME

#### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη μεθόδων προετοιμασίας του δείγματος μεγάλης ευαισθησίας, ακρίβειας και ταχύτητας έχει εξελιχθεί σε πολύ σημαντικό ζήτημα. Παρά το γεγονός ότι η συνεχιζόμενη τεχνολογική ανάπτυξη παρέχει ουσιώδη πλεονεκτήματα, τα περισσότερα όργανα ανάλυσης δεν είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν απευθείας τα δείγματα. Έτσι μια προετοιμασία του δείγματος είναι απαραίτητη. Στην περίπτωση ανάλυσης οργανικών ιχνών (υπολειμμάτων) το παραπάνω βήμα περιλαμβάνει εκχυλίσσεις, έτσι ώστε να απομονωθούν από το δείγμα οι ενώσεις που μας ενδιαφέρουν. Τελικά η συγκέντρωση των ενώσεων που μελετάμε αυξάνεται (εμπλουτισμός) και μειώνεται η παρουσία των συστατικών (επιτυγχάνεται με καθαρισμό του δείγματος) [12].

Η ανάπτυξη μιας τεχνικής προετοιμασίας του δείγματος που θα είναι πιο γρήγορη, απλή, φθηνή και φιλική προς το περιβάλλον είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα στην χημική ανάλυση. Πρόσφατα έγιναν μελέτες σχετικά με την μείωση της αναλογίας μεταξύ της φάσης του δέκτη και του δότη. Μια τεχνική που ανέρχεται συνεχώς σε αυτό τον τομέα είναι η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LPME), όπου μια κοίλη ίνα (hollow fiber) εμποτίζεται με οργανικό διαλύτη και χρησιμοποιείται για να προστατεύσει τους όγκους του δέκτη. Αυτή η μέθοδος αποδείχτηκε εξαιρετικά απλή, χαμηλού κόστους και διαπιστώθηκε ότι παρέχει υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας και εμπλουτισμού. Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι παράμετροι που επηρεάζουν την ανάκτηση και τον εμπλουτισμό της μεθόδου LPME [12].

Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LPME) βασίζεται στη χρήση πορώδων υδροφοβικών ινών (hollow fibers) οι οποίες είναι εμποτισμένες με οργανική φάση και αποτελεί εξέλιξη της μικροεκχύλισης με διαλύτη. Η LPME συνδυάζει τις βασικές αρχές άλλων τεχνικών μικροεκχύλισης (LLE, SPME) και παρουσιάζει σημαντική εξάπλωση τα τελευταία χρόνια. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών και μη πτητικών ενώσεων σε υγρά ή αέρια δείγματα και έχει πολλές εφαρμογές τόσο στην Βιοιατρική όσο και στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων. Είναι συμβατή με το διαχωρισμό και την ανίχνευση των ενώσεων με αέρια χρωματογραφία (GC) ή υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και συμβάλλει στην απλή και γρήγορη προετοιμασία των δειγμάτων πριν από την ανάλυσή τους [12].

Η χρήση της κοίλης ίνας στην LPME συμβάλλει στην εξαγωγή αποτελεσμάτων μεγάλης ακρίβειας και προστατεύει την μικροσταγόνα. Στην LPME παρατηρείται σημαντική μείωση της κατανάλωσης διαλύτη, συγκριτικά με άλλες μεθόδους, και επιτυγχάνεται υψηλός εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων και εξαιρετικός καθαρισμός των ενδογενών ενώσεων.

Είναι συμβατή με την τεχνική GC, με την HPLC και με την CE και η σύζευξή της με την τεχνική GC/MS έχει χρησιμοποιηθεί σε ευρεία κλίμακα για την ανάλυση διαφόρων ουσιών σε βιολογικά δείγματα [12].

Γενικά η αναλυτική διαδικασία περιλαμβάνει αρκετά βήματα : δειγματοληψία πεδίου, διατήρηση δείγματος, προετοιμασία του δείγματος, ποιοτική και ποσοτική ανάλυση καθώς και στατιστική εκτίμηση. Έχει πολύ μεγάλη σημασία η συνεπής και σωστή ολοκλήρωση αυτών των βημάτων, για την επίτευξη αποτελεσμάτων μεγάλης ακρίβειας και για την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων. Οι διάφορες μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος που υπάρχουν απαιτούν μεγάλους χρόνους και πολύπλοκα βήματα, ενώ μερικές στηρίζονται στην χρήση τοξικών διαλυτών. Έτσι το μεγαλύτερο μέρος του χρόνου ανάλυσης ξοδεύεται για την δειγματοληψία και την προετοιμασία του δείγματος. Η LPME συντελεί στην μείωση του χρόνου προετοιμασίας και είναι μια απλή και εύχρηστη μέθοδος. Για αυτό το λόγο αποτελεί μια πολύ ελπιδοφόρα τεχνική προετοιμασίας των δειγμάτων και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολλών περιβαλλοντικών δειγμάτων [12].

## **2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ**

### **2.2.1 ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ (LLE)**

Η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) είναι μια πολύπλευρη μέθοδος προετοιμασίας δείγματος και χρησιμοποιείται σε πολλές αναλυτικές μεθόδους. Παρά την διαδεδομένη χρήση της , θεωρείται αρκετά χρονοβόρα και κουραστική διαδικασία, μια και ο σχηματισμός γαλακτωμάτων δημιουργεί σοβαρά προβλήματα και παρεμποδίζει τον αυτοματισμό. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η χρήση μεγάλων ποσοτήτων τοξικών οργανικών διαλυτών που επιδρούν σημαντικά στην ανάλυση των ιχνών και μπορούν να προκαλέσουν τεράστια προβλήματα υγείας στο προσωπικό του εργαστηρίου. Επιπλέον συμβάλλουν στην παραγωγή επικίνδυνων εργαστηριακών αποβλήτων, αυξάνοντας έτσι τα έξοδα για την διαχείριση των αποβλήτων. Η ανάγκη να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων τεχνικών για την προετοιμασία του δείγματος. Οι τεχνικές αυτές διευκόλυναν την αύξηση της ταχύτητας και της αποτελεσματικότητας της προετοιμασίας του δείγματος και ταυτόχρονα συνέβαλαν στην εξάλειψη της κατανάλωσης τοξικών οργανικών διαλυτών [12].

### **2.2.2 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SPME)**

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) αναίρεσε τους περιορισμούς που προέρχονταν από την παραδοσιακή μέθοδο της υγρής-υγρής εξαγωγής. Διαδόθηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα , μια και πέτυχε να ενσωματώσει την εκχύλιση, την συγκέντρωση και τη εισαγωγή του δείγματος σε ένα βήμα, ανεξάρτητο από τον διαλύτη [12].

Σύμφωνα με την SPME μια μικρή ποσότητα από την φάση που εξάγεται διασκορπίζεται πάνω σε στερεό υπόστρωμα (ίνα) και έρχεται σε επαφή με το δείγμα. Τα κυριότερα κατάλοιπα διαχωρίζονται μεταξύ του δείγματος και της

εξαγόμενης φάσης και ύστερα από καθορισμένο χρονικό διάστημα η ίνα μεταφέρεται σε αέριο-χρωματογράφο (GC) ή σε υγρό-χρωματογράφο υψηλής απόδοσης (HPLC) για να αναλυθεί [12,13,14].

Τα σημαντικότερα προβλήματα σχετικά με την SPME εμφανίστηκαν μια δεκαετία από την παρουσίαση της μεθόδου και είναι τα ακόλουθα:

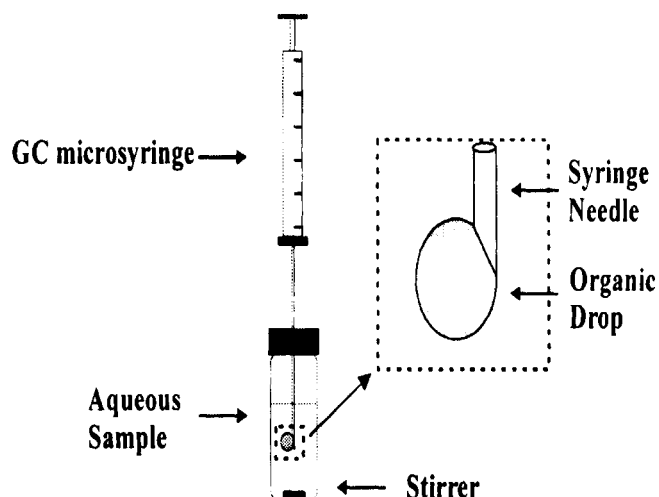
- η περιορισμένη διάρκεια ζωής των ινών που χρησιμοποιούνται στην SPME
- η δομή και φύση των ινών (πολύ εύθραυστες)
- η πιθανότητα συμπαράσυρσης μεταξύ των αναλύσεων [12].

Παρά την ύπαρξη αυτών των προβλημάτων η SPME έχει πολλές εφαρμογές και χρησιμοποιείται για περιβαλλοντικές, κλινικές αναλύσεις καθώς και αναλύσεις τροφών [12,14].

### **2.2.3 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΔΙΑΛΥΤΗ-SDME**

Η αναζήτηση βελτιωμένων και πρωτοποριακών τεχνικών προετοιμασίας του δείγματος δεν σταμάτησε και πρόσφατα παρατηρήθηκε μια προσπάθεια σμίκρυνσης της παραδοσιακής μεθόδου LLE. Η κεντρική ιδέα αυτής της τεχνικής είναι η μείωση της ογκομετρικής αναλογίας ανάμεσα στον δότη και στον δέκτη. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με την χρήση υγρών φάσεων που δεν αναμειγνύονται (μικροεκχύλιση με διαλύτη), είτε με την χρήση μιας μεμβράνης η οποία διαχωρίζει τις φάσεις του δότη και του δέκτη (μεμβράνη εκχύλισης) [12].

Μια σημαντική μέθοδος που αναπτύχθηκε από την μικροεκχύλιση με διαλύτη είναι η μικροεκχύλιση μικρο-σταγόνας (SDME), όπου το ρόλο του δέκτη έχει μια μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη (ο οποίος δεν αναμιγνύεται με το νερό) η οποία κρέμεται πάνω από υδατικό διάλυμα (δότης). Αυτό είναι το σύστημα δύο φάσεων. Στην Εικόνα 2 απεικονίζεται η τεχνική της μικροεκχύλισης μικρο-σταγόνας. Όταν η μικρο-σταγόνα έρθει σε επαφή με το υδατικό δείγμα, οι υδρόφοβες οργανικές ενώσεις μεταφέρονται στην φάση του οργανικού διαλύτη και έτσι επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των ουσιών προς ανάλυση. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, το οποίο έχει καθοριστεί κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, η μικρο-σταγόνα αποσύρεται μέσα στην μικροσύριγγα και μεταφέρεται στον θάλαμο εισαγωγής δειγμάτων ενός GC ή HPLC για ανάλυση. Η SDME, αν και είναι μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος εκχύλισης, παρουσιάζει και κάποια σημαντικά μειονεκτήματα όπως τα ακόλουθα : η εφαρμογή εκτεταμένων χρόνων δειγματοληψίας και μεγάλων ταχυτήτων ανάδευσης έχουν ως αποτέλεσμα την πιθανή μετατόπιση και απώλεια της μικρο-σταγόνας. Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LPME) αρχικά παρουσιάστηκε για να περιγράψει το σύστημα δύο φάσεων σε μικροεκχύλιση με διαλύτη. Τελικά αποδείχτηκε ότι η μικροεκχύλιση με διαλύτη είναι μια γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική προετοιμασίας του δείγματος και το κόστος για την χρήση της είναι χαμηλό. Επιπλέον αυτή η μέθοδος συνέβαλε στην εξάλειψη των τοξικών διαλυτών [15,16].



*Εικόνα 2:Τεχνική μικροεκχύλισης μικρο-σταγόνας (SDME)*

#### 2.2.4 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Μια άλλη εκδοχή της LLE είναι η μικροεκχύλιση με μεμβράνη, η οποία βασίζεται στην χρήση υγρών φίλμ. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση καθώς και η υγρή-υγρή-υγρή μικροεκχύλιση (σύστημα τριών φάσεων), η οποία στηρίζεται στην επανεκχύλιση. Επανεκχύλιση είναι η διαδικασία μεταφοράς μιας ουσίας που ήδη έχει εκχυλισθεί με ένα διαλύτη σε μια νέα υγρή φάση (π.χ βενζοϊκό οξύ που έχει παραληφθεί σε αιθερική φάση επανεκχυλίζεται σε υδατικό διάλυμα NaOH) [12].

Οι τεχνικές που αναπτύχθηκαν, χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες :

- Τεχνικές πορώδους μεμβράνης, όπου τα διαλύματα και στις δύο πλευρές της μεμβράνης (δότης και δέκτης) έρχονται σε επαφή μέσω των πόρων της μεμβράνης
- Τεχνικές μη πορώδους μεμβράνης, όπου η μεμβράνη σχηματίζει μια φάση (υγρή ή πολυμερή) ανάμεσα στα διαλύματα δότη και δέκτη [17].

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στην περίπτωση που η μεμβράνη αποτελείται από υγρό, παρατηρούνται κοινά χαρακτηριστικά με την μικροεκχύλιση με διαλύτη, αφού έχουμε σχηματισμό υγρών φίλμ που δεν αναμειγνύονται. Παρά το γεγονός αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως πολυμερή υλικά ως μεμβράνες [12].

Από τις τεχνικές μη πορώδους μεμβράνης προβλήθηκε κυρίως η SLM (υποστηριζόμενη υγρή μεμβράνη), η οποία στηρίζεται στην χρήση των πόρων πολυμερικής μεμβράνης ως στήριγμα στον οργανικό διαλύτη. Έτσι δημιουργείται ένα σύστημα τριών φάσεων και το στρώμα του οργανικού διαλύτη βρίσκεται ανάμεσα στα διαλύματα δότη και δέκτη. Στην περίπτωση

όπου μία από τις φάσεις είναι επίσης οργανικός διαλύτης (συνήθως ο δέκτης) θεωρούμε ότι έχουμε σύστημα δύο φάσεων και η τεχνική είναι γνωστή ως υγρή-υγρή εκχύλιση μικροπορώδους μεμβράνης (MMLLE) [12,17].

Η χρήση μεμβρανών έχει σημαντικά πλεονεκτήματα, μερικά από τα οποία είναι τα ακόλουθα : υψηλή εκλεκτικότητα, υψηλός βαθμός εμπλουτισμού και καθαρή εκχύλιση [17].

Η ανάλυση ιχνών διευκολύνεται και από την μείωση της κατανάλωσης διαλυτών. Η πολυμερής μεμβράνη μπορεί να είναι επίπεδη ή να έχει την μορφή κοίλης ίνας και οι περισσότερες τεχνικές περιλαμβάνουν άμεση σύνδεση των μεμβρανών εκχύλισης με τα όργανα ανάλυσης. Παρά το γεγονός ότι ο αυτοματισμός παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έχουν αναφερθεί προβλήματα μνήμης λόγω της απευθείας διάταξης και για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί λίγες off-line τεχνικές. Μία από αυτές είναι και η LPME, που αναπτύχθηκε από τους Rasmussen και Pedersen-Bjergaard [12,18].

### **2.3 ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ- LPME**

Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LPME) βασίζεται στη χρήση πορώδων υδροφοβικών ινών (hollow fibers) οι οποίες είναι εμποτισμένες με οργανική φάση για την δημιουργία των συστημάτων SLM και MMLLE. Η μέθοδος αυτή αποτελεί την εξέλιξη της μικροεκχύλισης με διαλύτη, μια και προσθέτει ένα φιλμ προστασίας σε συστήματα μικροσταγόνας και ενισχύει την δημιουργία υγρών φίλμ που δεν αναμιγνύονται με το νερό. Αυτή η νέα μέθοδος μικροεκχύλισης αποδείχθηκε πολύ καλή επιλογή, μια και είναι απλή, φθηνή, γρήγορη και ανεξάρτητη από διαλύτες. Επίσης συνέβαλε στην αύξηση της ευαισθησίας και λόγω της φύσης της κοίλης ίνας περιορίσε στο ελάχιστο την πιθανότητα συμπαράσυρσης (carry over) μεταξύ των αναλύσεων [19].

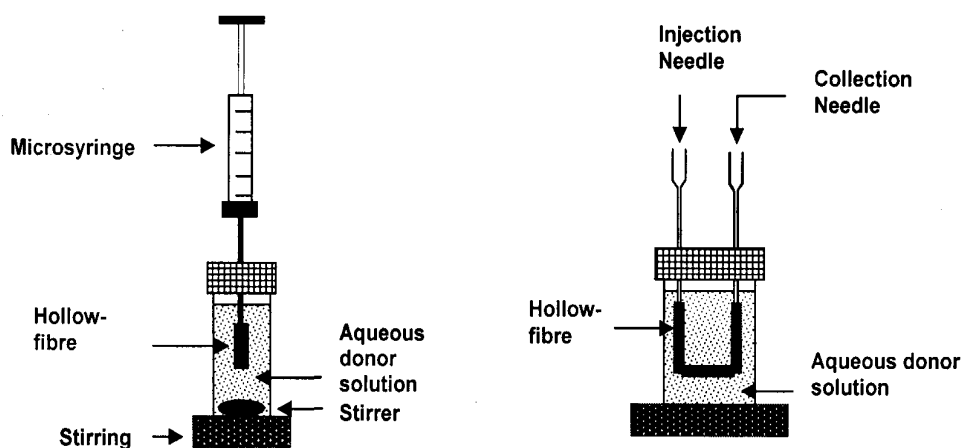
Τα προβλήματα σταθερότητας της σταγόνας και μειωμένης ευαισθησίας που παρουσιάζει η SDME επιλύθηκαν με την βοήθεια της LPME. Σχετικά με την μέθοδο της μικροσταγόνας, υπάρχουν διάφορες αναφορές. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο μια μικρή ποσότητα (συνήθως 1μl) ενός μη-υδατοδιαλυτού διαλύτη εκτίθεται με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας στο υδατικό δείγμα υπό ανάλυση. Λόγω του ότι οι δύο φάσεις δεν μπορούν να αναμειχθούν, σχηματίζεται μια μικρο-σταγόνα, η οποία κρέμεται από τη μύτη της βελόνας (Εικόνα 3, πρώτος τύπος διάταξης). Η μικρο-σταγόνα προστατεύεται από μια υδροφοβική μεμβράνη (τριχοειδής ίνα). Όταν αυτή η ίνα έρθει σε επαφή με το υδατικό δείγμα, οι υδρόφοβες οργανικές ενώσεις μεταφέρονται στην φάση του οργανικού διαλύτη και έτσι επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των ουσιών που θα αναλυθούν. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, το οποίο έχει οριστεί κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, η τριχοειδής ίνα αποσύρεται μέσα στη μικροσύριγγα και μεταφέρεται στον θάλαμο εισαγωγής δειγμάτων του αέριου χρωματογράφου (GC) για περαιτέρω ανάλυση [15].

Η χρήση της ίνας που προστατεύει την μικρο-σταγόνα, έχει ως αποτέλεσμα την εφαρμογή εκτεταμένων χρόνων δειγματοληψίας, μεγάλων ταχυτήτων ανάδευσης και μεγαλύτερων όγκων οργανικού διαλύτη. Η ευαισθησία έτσι της

τεχνικής είναι μεγάλη (επίπεδα χαμηλού  $\mu\text{g/l}$ ) και επιτρέπει την αποτελεσματική και με μεγάλη ακρίβεια προσέγγισης ανάλυση οργανικών ρύπων. Το χαμηλό κόστος ανά δείγμα, επιτρέπει την χρήση μιας ίνας ανά εκχύλιση αποκλείοντας έτσι φαινόμενα τύπου carry-over. Η γρήγορη και εύχρηστη αυτή μέθοδος, αν και δεν αυτοματοποιείται, καθιστά δυνατή την ταυτόχρονη ανάλυση έως και 30 δειγμάτων. Αν και τις περισσότερες φορές χρησιμοποιείται το σύστημα δύο φάσεων, έχουν αναφερθεί και εκχυλίσες τριών φάσεων από υδατικά διαλύματα σε οργανικούς διαλύτες. Στο Σχήμα 3 απεικονίζονται δύο διαφορετικοί τύποι διάταξης της τριχοειδούς ίνας κατά την μικροεκχύλιση υγρής φάσης με τριχοειδή ίνα [15].

Η LPME συνδυάζει τις βασικές αρχές της LLE και της SPME και αποτελεί μια ελπιδοφόρα μέθοδο με σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους εκχύλισης. Αποτελεί μια αναπτυσσόμενη τεχνική προετοιμασίας των δειγμάτων πριν από την ανάλυση τους σε διάφορα όργανα ανάλυσης (GC, HPLC) και πραγματοποιείται είτε με την εκχύλιση μικρών σταγόνων οργανικών διαλυτών (μη-υδατοδιαλυτών), είτε με την εκχύλιση μικρών όγκων του διαλύματος του δέκτη μέσα στην κοιλότητα της πορώδους κοίλης ίνας. Και στις δύο περιπτώσεις οι προσδιοριζόμενες ουσίες εκχυλίζονται και προσυγκεντρώνονται σε όγκους μεγέθους 25-50 $\mu\text{l}$ . Για αυτό το λόγο η LPME είναι πολύ αποτελεσματική σχετικά με τον εμπλουτισμό των ουσιών και συμβάλλει στην μείωση της χρήσης των οργανικών διαλυτών [12].

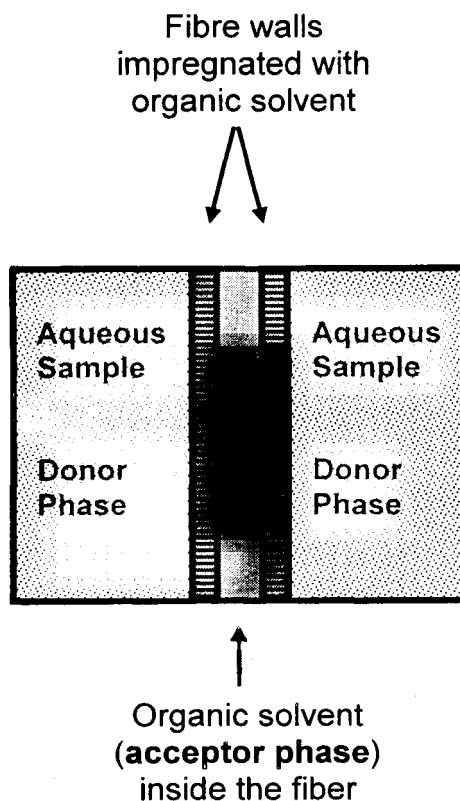
Πρόσφατα παρουσιάστηκε η LPME που βασίζεται στην φθινή και εύχρηστη τριχοειδή ίνα (hollow fiber) και έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση διαφόρων όξινων και βασικών ενώσεων (Εικόνα 3). Παρακάτω αναφέρονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά της LPME δύο φάσεων και τριών φάσεων καθώς και η θεωρία που τις διέπει [12].



**Εικόνα 3: Δύο διαφορετικοί τύποι διάταξης της τριχοειδούς ίνας κατά την LPME**

### 2.3.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ LPME ΔΥΟ ΦΑΣΕΩΝ

Υπάρχουν δύο μέθοδοι ανάλυσης του δείγματος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην LPME : το σύστημα δύο φάσεων και το σύστημα τριών φάσεων. Στην LPME δύο φάσεων το προσδιοριζόμενο συστατικό  $i$  εκχυλίζεται από υδατικό δείγμα (δότης) μέσω μη-υδατοδιαλυτού διαλύτη και ακινητοποιείται στους πόρους της ίνας μέσα σε οργανικό διαλύτη (δέκτης) που βρίσκεται μέσα στην ίνα (Εικόνα 4) [12].



*Εικόνα 4 : Σχηματική περιγραφή της LPME δύο φάσεων*

Η διαδικασία της εκχύλισης στην LPME δύο φάσεων για ένα συστατικό  $i$  περιγράφεται ως εξής :  $i_d \rightleftharpoons i_{org}$  εξίσωση (1), όπου  $i_d$  είναι η προσδιοριζόμενη ουσία στην υδατική φάση (δότης) και  $i_{org}$  η προσδιοριζόμενη ουσία στην οργανική φάση (δέκτης). Βασικό χαρακτηριστικό της είναι ο συντελεστής κατανομής  $K_{org/d}$ , ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων του συστατικού  $i$  στην οργανική (δέκτης) και στην υδατική (δότης) φάση σε συνθήκες ισορροπίας. Για την σωστή εφαρμογή της LPME δύο φάσεων απαιτούνται μεγάλοι συντελεστές κατανομής για τα προσδιοριζόμενα συστατικά. Αυτές οι τιμές του  $K_{org/d}$  ανταποκρίνονται σε μέτρια ή υψηλά υδροφοβικές ενώσεις οι οποίες περιέχουν όξινες, βασικές ενώσεις ή ουδέτερες ενώσεις παρόμοιας υδροφοβικότητας. Το τελικό εκχύλισμα είναι μια οργανική φάση και αυτή η μέθοδος ανάλυσης του δείγματος έχει κοινά στοιχεία με άλλες αναλυτικές μεθόδους (GC, HPLC) [12].



Σε συνθήκες ισορροπίας ο συντελεστής κατανομής για το προσδιοριζόμενο συστατικό  $i$  δίνεται από τη σχέση :  $K_{org/d} = \frac{C_{org,eq}}{C_{d,eq}}$  εξίσωση (2)

όπου  $C_{org,eq}$  και  $C_{d,eq}$  είναι οι συγκεντρώσεις ισορροπίας του  $i$  στην οργανική και στην υδατινή φάση αντίστοιχα. Υποθέτοντας ότι δεν έχουμε απώλειες της προσδιοριζόμενης ουσίας κατά την προετοιμασία του δείγματος, η συνολική μάζα της ουσίας, στην LPME δύο φάσεων, θα ισούται με την αρχική ποσότητα της ουσίας [12] :

$$C_{initial} \cdot V_d = C_{d,eq} \cdot V_d + C_{org,eq} \cdot V_{org} \quad \text{εξίσωση (3)}$$

όπου  $C_{initial}$  είναι η αρχική συγκέντρωση του  $i$  στην υδατική φάση του δότη και  $V_d$  ,  $V_{org}$  είναι οι όγκοι της υδατικής φάσης (δότης) και της οργανικής φάσης (δέκτης) αντίστοιχα [12].

Η ανάκτηση (R) της προσδιοριζόμενης ουσίας στην οργανική φάση, δίνεται από την σχέση :  $R = \frac{C_{org,eq} \cdot V_{org}}{C_{initial} \cdot V_d} \cdot 100$  εξίσωση (4)

Αν η εξίσωση (4) συνδυαστεί με τις εξισώσεις (2),(3) προκύπτει ότι :

$$R = \frac{K_{org/d}}{K_{org/d} + (V_d / V_{org})} \cdot 100 \quad \text{εξίσωση (5)}$$

Αν ο παράγοντας εμπλουτισμού (EF) της προσδιοριζόμενης ουσίας, που ορίζεται ως ο λόγος :  $\frac{C_{org,eq}}{C_{initial}}$  , συνδυαστεί με τις εξισώσεις (2),(3) προκύπτει ότι :

$$EF = \frac{K_{org/d}}{K_{org/d} \cdot (V_{org} / V_d) + 1} \quad \text{εξίσωση (6)}$$

$$\text{ή } EF = \frac{V_d \cdot R}{V_{org} \cdot 100} \quad \text{εξίσωση (7)}$$

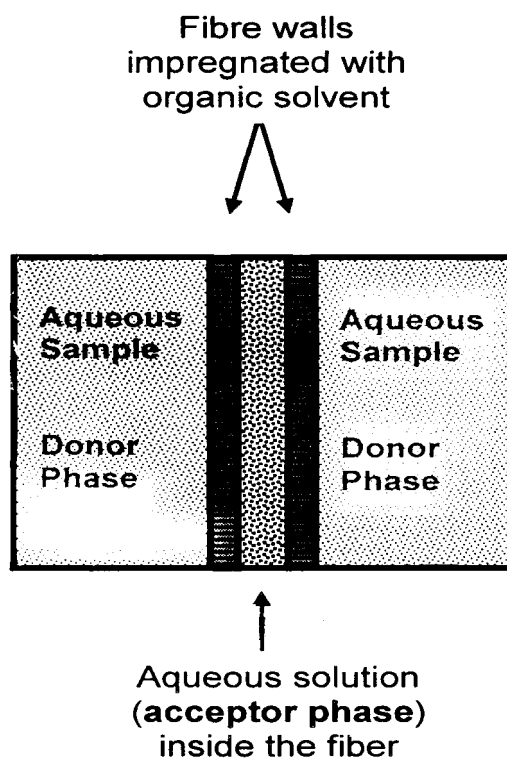
Από τις σχέσεις (5), (6) προκύπτει ότι οι τιμές των R και EF εξαρτώνται από τις τιμές των  $K_{org/d}$  και  $V_d / V_{org}$ . Έτσι οι ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών αυξάνονται με αύξηση του  $K_{org/d}$  και μείωση του λόγου  $V_d / V_{org}$ . Έχει μελετηθεί η μεταβολή του R σε σχέση με το  $K_{org/d}$ , για διάφορες τιμές του λόγου  $V_d / V_{org}$  και έχουν προκύψει διάφορα συμπεράσματα. Έτσι για δεδομένη αναλογία όγκων όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του  $K_{org/d}$  τόσο μεγαλύτερη είναι και η ανάκτηση. Επιπλέον για ορισμένο  $K_{org/d}$ , η ανάκτηση αυξάνει με την μείωση του λόγου  $V_d / V_{org}$ . Το τελικό αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί με την μείωση του όγκου του διαλύματος του δότη ή με την αύξηση του όγκου της οργανικής φάσης (δέκτης). Για παράδειγμα αν  $V_d = 5\text{ml}$ , τότε η

ανάκτηση θα αυξηθεί με την αύξηση του  $V_{org}$  από 1μl σε 25μl. Γενικά στην LPME δύο φάσεων επιτυγχάνεται μια σχεδόν ποσοτική εκχύλιση, αν ο λόγος  $V_d / V_{org}$  είναι χαμηλός και η τιμή του  $K_{org/d}$  υψηλή (500-1000). Μεγαλύτεροι λόγοι  $V_d / V_{org}$  ή χαμηλότερες τιμές  $K_{org/d}$  έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένες ανακτήσεις για τις προσδιοριζόμενες ουσίες [12].

Από την άλλη μεριά οι παράγοντες εμπλουτισμού έχουν διαφορετική συμπεριφορά. Σε αυτή την περίπτωση υψηλές τιμές EF επιτυγχάνονται με την αύξηση της τιμής του  $K_{org/d}$  και την αύξηση του λόγου  $V_d / V_{org}$ . Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την μεταβολή του EF ως συνάρτηση του  $K_{org/d}$  για διάφορες τιμές του λόγου  $V_d / V_{org}$  έχουν οδηγήσει σε ορισμένα συμπεράσματα. Το πρώτο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι για ορισμένη αναλογία όγκων της υδάτινης φάσης προς την οργανική φάση, αυξημένες τιμές του  $K_{org/d}$  έχουν ως αποτέλεσμα αυξημένο εμπλουτισμό. Παρά το γεγονός αυτό όταν διατηρείται σταθερό το  $K_{org/d}$ , ο βαθμός εμπλουτισμού (EF) αυξάνεται με την αύξηση του λόγου  $V_d / V_{org}$ . Άρα συμπεραίνουμε ότι υψηλοί εμπλουτισμοί επιτυγχάνονται με την αύξηση του όγκου του διαλύματος του δότη ή/και με την μείωση του όγκου της οργανικής φάσης (δέκτης). Για παράδειγμα αν θεωρήσουμε τον όγκο  $V_d$  σταθερό και ίσο με 5ml, ο παράγοντας εμπλουτισμού θα αυξηθεί σημαντικά με την μείωση της τιμής του όγκου  $V_{org}$  από 25μl σε 1μl. Γενικά υψηλοί παράγοντες εμπλουτισμού επιτυγχάνονται για προσδιοριζόμενες ουσίες με χαμηλές τιμές του  $K_{org/d}$  (50-100). Διατηρώντας το λόγο  $V_d / V_{org}$  υψηλό, επιτυγχάνεται μια επιπρόσθετη αύξηση του EF [12].

### 2.3.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ LPME ΤΡΙΩΝ ΦΑΣΕΩΝ

Στην LPME τριών φάσεων η διαδικασία της εκχύλισης για μια προσδιοριζόμενη ουσία  $i$  μπορεί να περιγραφεί ως εξής :  $i_d \Leftrightarrow i_{org} \Leftrightarrow i_a$  εξίσωση (8). Από την ισορροπία της εξίσωσης (8) μπορούμε να συμπεράνουμε ότι πραγματοποιείται εκχύλιση της ουσίας  $i$  από το υδατικό διάλυμα του δότη ( $i_d$ ) στον οργανικό διαλύτη. Η ουσία ακινητοποιείται στους πόρους της κοίλης ίνας ( $i_{org}$ ) και επαναεκχυλίζεται στο υδατικό διάλυμα του δέκτη ( $i_a$ ), που βρίσκεται μέσα στην κοιλότητα της κοίλης ίνας (Εικόνα 5). Σε αυτή την περίπτωση η οργανική φάση «λειτουργεί» ως διάφραγμα ανάμεσα στα υδατικά διαλύματα δότη και δέκτη και παρεμποδίζει την ανάμειξη των δύο φάσεων. Η LPME τριών φάσεων περιλαμβάνει την εκχύλιση από ένα υδατικό δείγμα, μέσω μιας μη-υδατοδιαλυτής οργανικής φάσης και έπειτα πίσω σε μια νέα υδατική φάση. Έτσι πραγματοποιείται ένας σημαντικός καθαρισμός του δείγματος. Με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζεται η είσοδος πρωτεϊνών, αλάτων, ουδέτερων συστατικών και όξινων ενώσεων στο διάλυμα του δέκτη [12,20]



*Εικόνα 5 : Σχηματική περιγραφή της LPME τριών φάσεων*

Στην ισορροπία διακρίνουμε δύο συντελεστές κατανομής :  $K_{org/d}$  ανάμεσα στην οργανική φάση και στην φάση του δότη και  $K_{a/org}$  ανάμεσα στο διάλυμα του δότη και στην οργανική φάση.

$$K_{org/d} = \frac{C_{org,eq}}{C_{d,eq}} \quad \text{εξίσωση (9)}$$

$$K_{a/org} = \frac{C_{a,eq}}{C_{org,eq}} \quad \text{εξίσωση (10)}$$

όπου  $C_{d,eq}$  είναι η συγκέντρωση ισορροπίας του  $i$  στην φάση του δότη,  $C_{org,eq}$  είναι η συγκέντρωση ισορροπίας του  $i$  στον οργανικό διαλύτη και  $C_{a,eq}$  είναι η συγκέντρωση ισορροπίας του  $i$  στην φάση του δέκτη [12].

Ο συνολικός συντελεστής κατανομής  $K_{a/d}$  ανάμεσα στην φάση του δέκτη και του δότη, μπορεί να γραφτεί ως εξής :

$$K_{a/d} = \frac{C_{a,eq}}{C_{d,eq}} = K_{org/d} \cdot K_{a/org} \quad \text{εξίσωση (11)}$$

Η διατήρηση της μάζας για το συστατικό  $i$  δίνεται από την σχέση :

$$C_{initial} \cdot V_d = C_{d,eq} \cdot V_d + C_{org,eq} \cdot V_{org} + C_{a,eq} \cdot V_a \quad \text{εξίσωση (12)}$$

όπου  $V_{org}$  είναι τώρα ο όγκος του οργανικού διαλύτη, που είναι ακινητοποιημένος στους πόρους της κοίλης ίνας, και  $V_a$  είναι ο όγκος της φάσης του δέκτη (υδατική) [12].

Η συνολική ανάκτηση του προσδιοριζόμενου συστατικού  $i$  δίνεται από τη σχέση :

$$R = \frac{C_{a,eq} \cdot V_a}{C_{initial} \cdot V_d} \cdot 100 \quad \text{εξίσωση (13)}$$

Αντικαθιστώντας τις εξισώσεις (9), (11) και (12) στην εξίσωση (13), προκύπτει η ακόλουθη σχέση :

$$R = \frac{K_{a/d}}{K_{a/d} + K_{org/d} \cdot (V_{org}/V_d) + (V_d/V_a)} \cdot 100 \quad \text{εξίσωση (14)}$$

Ο βαθμός εμπλουτισμού (EF) του  $i$  στην LPME τριών φάσεων εκφράζεται ως :

$$EF = \frac{C_{a,eq}}{C_{initial}}$$

Αντικαθιστώντας τις εξισώσεις (9), (11) και (12) στην παραπάνω έκφραση, προκύπτει:

$$EF = \frac{K_{a/d}}{1 + K_{org/d} \cdot (V_{org}/V_d) + K_{a/d} \cdot (V_d/V_a)} \quad \text{εξίσωση (15)}$$

Σε σχέση με το  $R$  προκύπτει η ακόλουθη σχέση :

$$EF = \frac{V_d \cdot R}{V_a \cdot 100} \quad \text{εξίσωση (16)}$$

Από τις εξισώσεις (14) και (15) συμπεραίνουμε ότι στην LPME τριών φάσεων τα  $R$ ,  $EF$  εξαρτώνται από τις τιμές των λόγων κατανομής ανάμεσα στις τρεις φάσεις καθώς επίσης και από το λόγο  $V_d/V_a$ . Οι μεταβολές του λόγου  $V_{org}/V_a$  δεν είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπόψη, μια και αύξηση του όγκου του διαλύματος του δέκτη απαιτεί μια ανάλογη ρύθμιση του μήκους της κοίλης ίνας, η οποία είναι επίσης ανάλογη με τον όγκο της οργανικής φάσης που είναι ακινητοποιημένη στους πόρους της κοίλης ίνας. Επομένως μπορούμε να

θεωρήσουμε σταθερό το λόγο  $V_{org}/V_a$  για ένα συγκεκριμένο είδος κοίλης ίνας. Έτσι σε μια προηγούμενη αναφορά ο όγκος  $V_{org}$  βρέθηκε ότι ήταν 20μl για διάλυμα δέκτη 25μl, επιφέροντας μια τιμή 0.8 για το λόγο  $V_{org}/V_a$  [12,19].

Σύμφωνα με την εξίσωση (14) για υψηλούς συνολικούς συντελεστές κατανομής  $K_{a/d}$  και μειωμένους λόγους όγκων  $V_d/V_a$ , επιτυγχάνονται αυξημένες ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων συστατικών. Έτσι μια αύξηση στο συνολικό συντελεστή κατανομής θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανάκτησης. Επίσης για μια ορισμένη τιμή του  $K_{a/d}$ , αυξημένες ανακτήσεις επιτυγχάνονται μόνο όταν η τιμή του  $K_{a/org}$  είναι υψηλή, εξασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο ότι τα προσδιοριζόμενα συστατικά δεν θα παγιδευτούν στην οργανική φάση και θα επανεκχυλιστούν με επιτυχία στην υδατική φάση του δέκτη. Επιπλέον για συγκεκριμένες τιμές των  $K_{a/org}$ ,  $K_{org/d}$  και συνεπώς και του  $K_{a/d}$ , η ανάκτηση αυξάνεται με την μείωση του λόγου των όγκων  $V_d/V_a$  [12].

Αυτό επιτυγχάνεται, όπως αναφέραμε και στην LPME δύο φάσεων, με την μείωση του όγκου του διαλύματος του δότη ή/και με την αύξηση του όγκου της φάσης του δέκτη. Γενικά στην LPME τριών φάσεων ποσοτική εκχύλιση μπορεί να επιτευχθεί για υψηλές τιμές του  $K_{a/d}$  και εξασφαλίζοντας ότι ο λόγος  $V_d/V_a$  είναι αρκετά χαμηλός. Υψηλότερες τιμές του λόγου  $V_d/V_a$  και/ή χαμηλότερες τιμές του  $K_{a/d}$  θα έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένες ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών κατά την εκχύλιση [12].

Η μελέτη των μεταβολών του παράγοντα εμπλουτισμού σε συνάρτηση με τους συντελεστές κατανομής  $K_{org/d}$  και  $K_{a/d}$ , για διαφορετικές τιμές του λόγου  $V_d/V_a$  μπορεί να οδηγήσει σε ορισμένα συμπεράσματα. Έτσι προκύπτει ότι αυξημένος εμπλουτισμός επιτυγχάνεται με την εξασφάλιση υψηλής τιμής του  $K_{a/d}$  για τα προσδιοριζόμενα συστατικά. Επιπρόσθετα ο εμπλουτισμός είναι πιο ευαίσθητος στην τιμή του  $K_{a/org}$ , αφού αυτή η τιμή εξασφαλίζει την μεταφορά της ουσίας από την οργανική φάση στην φάση του δέκτη. Επίσης αυξημένες τιμές εμπλουτισμού επιτυγχάνονται με την αύξηση του λόγου  $V_d/V_a$ . Αυτό πραγματοποιείται με την αύξηση του όγκου του διαλύματος του δότη και/ή με την μείωση του όγκου της φάσης του δέκτη. Γενικά υψηλοί παράγοντες εμπλουτισμού εξασφαλίζονται με την ύπαρξη χαμηλών τιμών για το  $K_{a/d}$  και διατηρώντας υψηλό το λόγο  $V_d/V_{org}$  [12].

Η επιτυχημένη εφαρμογή της LPME τριών φάσεων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον καθορισμό της σύστασης των διαλυμάτων δότη και δέκτη. Υψηλές τιμές  $K_{a/d}(>>1)$  μπορούν να επιτευχθούν όταν τα προσδιοριζόμενα συστατικά στην φάση του δέκτη μετατρέπονται, μέσω αντιδράσεων (πρωτονίωση, συμπλοκοποίηση), σε σωματίδια που έχουν πολύ μικρή συγγένεια με την οργανική φάση. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η επανεκχύλιση των συστατικών από το διάλυμα που δρα ως δέκτης στο διάλυμα που συμπεριφέρεται ως δότης. Έτσι με την LPME τριών φάσεων επιτυγχάνεται η εκχύλιση όξινων ή βασικών ενώσεων όταν έχουμε χαμηλές τιμές  $K_{org/d}$ , εφόσον οι τιμές του  $K_{a/org}$  είναι υψηλές. Πάντα διατηρείται η απαίτηση για υψηλές τιμές  $K_{a/d}$ . Αυτό έχει πολύ μεγάλη σημασία, διότι η περιοχή εφαρμοσιμότητας της μεθόδου LPME μπορεί να επεκταθεί και σε

ιοντικά συστατικά, απλά με την μετατροπή της μεθόδου από LPME δύο φάσεων σε LPME τριών φάσεων [12,19].

Από διάφορες μελέτες έχει προκύψει ότι η LPME τριών φάσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί για μια μεγάλη ποικιλία φάσεων του δέκτη. Διαλύματα 10mM HCl και 10Mm H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> αποτελούν πολύ καλές υδατικές φάσεις, σε αντίθεση με τα φωσφορικά άλατα. Αυτές οι δύο ενώσεις παρέχουν αρκετά χαμηλό pH κατά την διάρκεια της μεθόδου, αν και στερούνται ρυθμιστικής ικανότητας. Αντιθέτως τα ισχυρά όξινα φωσφορικά άλατα παρέχουν εξαιρετικά αποτελέσματα, λόγω της σχετικά υψηλής ρυθμιστικής τους ικανότητας. Στην LPME τριών φάσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες φάσεις δέκτη που βασίζονται σε όξινα διαλύματα [20,26].

### **2.3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ LPME ΔΥΟ ΦΑΣΕΩΝ ΜΕ ΤΗΝ LPME ΤΡΙΩΝ ΦΑΣΕΩΝ**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι μέθοδοι LPME δύο φάσεων και τριών φάσεων απαιτούν μεγάλους συντελεστές κατανομής ( $K_{org/d}$  και  $K_{a/d}$  αντίστοιχα). Γενικά μεγάλες τιμές του  $K$  αντιστοιχούν σε μέτρια ή πολύ υδροφοβικές ενώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν όξινες ή βασικές ομάδες, ή ουδέτερες ενώσεις παρόμοιας υδροφοβικότητας. Σχετικά με την LPME τριών φάσεων, είναι απαραίτητη η μετατροπή των ουσιών που εκχυλίζονται στην φάση του δέκτη σε ουσίες που θα έχουν πολύ μικρή έλξη με την οργανική φάση. Οι προσδιοριζόμενες ουσίες παγιδεύονται μέσω χημικών αντιδράσεων, όπως είναι η πρωτονίωση ή η συμπλοκοποίηση. Έτσι αποτρέπεται η επανεκχύλιση των ουσιών από το διάλυμα του δέκτη στο διάλυμα του δότη. Με την LPME τριών φάσεων επιτυγχάνεται η εκχύλιση ουσιών που έχουν χαμηλή τιμή  $K_{org/d}$  εφόσον η τιμή του  $K_{a/org}$  και του  $K_{a/d}$  είναι υψηλές. Ωστόσο η LPME τριών φάσεων μπορεί να εφαρμοστεί για περιορισμένο αριθμό ουσιών, διότι η εκχύλιση ουδέτερων υδροφοβικών ενώσεων αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την εφαρμογή της μεθόδου για ενώσεις που περιέχουν όξινες ή βασικές ομάδες. Στην LPME δύο φάσεων δεν χρησιμοποιούνται χημικές αντιδράσεις για την παγίδευση των προσδιοριζόμενων ουσιών και η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης περιορίζεται από το λόγο κατανομής  $K_{org/d}$  [19,21].

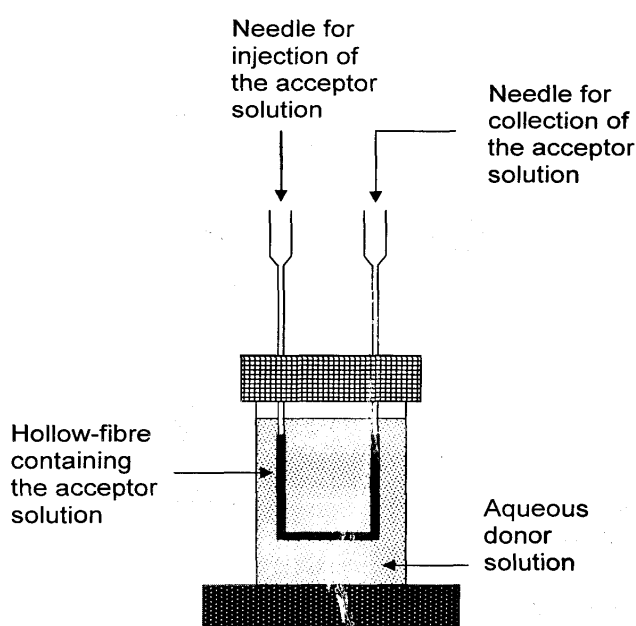
Επιπλέον στην LPME δύο φάσεων το τελικό εκχύλισμα είναι μια οργανική φάση, γεγονός που κάνει συμβατή την τεχνική με την αέρια χρωματογραφία (GC) ή με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Αντιθέτως η LPME τριών φάσεων συνδυάζεται συνήθως με την HPLC ή με την τεχνική της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE), αφού η φάση του δέκτη είναι υδατική [19].

## **2.4 ΔΙΑΤΑΞΗ ΤΗΣ ΙΝΑΣ**

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι για την διάταξη της ίνας κατά την διάρκεια της εκχύλισης με την LPME δύο φάσεων ή τριών φάσεων : η διάταξη Α και Β.

Στην διάταξη Α (Εικόνα 4) δύο συμβατικές ιατρικές βελόνες εισάγονται μέσω διαφράγματος και τα δύο άκρα συνδέονται με ένα κομμάτι ίνας (hollow fiber). Το μήκος της ίνας ποικίλλει από 4cm έως 8cm .

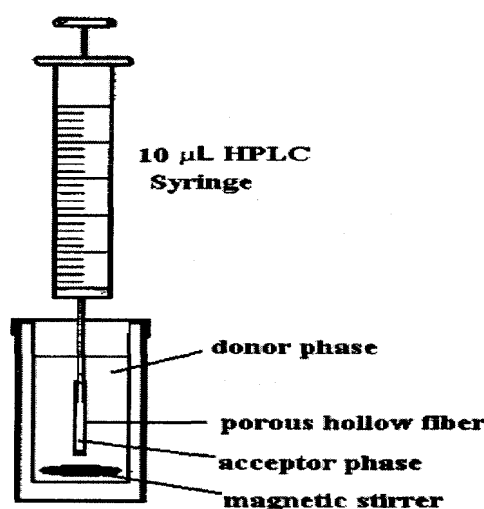
Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ίνες μεγαλύτερου μήκους (έως και 27cm) και σε αυτές τις περιπτώσεις η κοίλη ίνα τυλίγεται με στερεό στήριγμα. Όταν χρησιμοποιείται η LPME δύο φάσεων ή τριών φάσεων η ίνα αρχικά βυθίζεται για μερικά δευτερόλεπτα σε οργανικό διαλύτη, έτσι ώστε να ακινητοποιήσει τον διαλύτη στους πόρους της. Αφού εμποτιστεί, η ίνα βυθίζεται στο διάλυμα του δότη. Το διάλυμα του δέκτη εισάγεται στην κοιλότητα της ίνας, με την βοήθεια μικροσύριγγας, και όταν ολοκληρωθεί η εκχύλιση το διάλυμα του δέκτη συλλέγεται σε μπουκαλάκια, είτε εξασκώντας μικρή πίεση στην βελόνα εισόδου είτε με την χρήση μικροσύριγγας. Έπειτα το διάλυμα του δέκτη υποβάλλεται σε ανάλυση [12,21].



**Εικόνα 6: Διάταξη Α της ίνας (hollow fiber)**

Στην διάταξη Β μόνο η μία άκρη της ίνας χρησιμοποιείται για εισαγωγή/συλλογή του δέκτη και η άλλη κρέμεται πάνω από το διάλυμα του δότη. Αυτό πραγματοποιείται με την χρήση της άκρης της βελόνας μιας μικροσύριγγας ως στήριγμα για την ίνα (Εικόνα 6). Σε αυτή την περίπτωση η μικροσύριγγα στηρίζει την ίνα, εισάγει/συλλέγει το διάλυμα του δέκτη και χρησιμοποιείται για την εισαγωγή του δείγματος στα όργανα ανάλυσης. Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο μπορούμε να πετύχουμε την διάταξη Β είναι να χρησιμοποιήσουμε ένα φιαλίδιο με μεμβράνη στο καπάκι του ως στήριγμα για την ίνα. Σε αυτή την περίπτωση ένας μεταλλικός σωλήνας τοποθετείται στο κέντρο του μπουκαλιού για να διευκολύνει την εισαγωγή και το δέσιμο της ίνας στο μπουκάλι. Η συλλογή του δέκτη γίνεται με την βοήθεια μικροσύριγγας [12,21].

Γενικά όταν χρησιμοποιείται η διάταξη Β η ελεύθερη άκρη της ίνας σφραγίζεται με την χρήση φλόγας. Πριν βυθιστεί στο διάλυμα του δότη, θα πρέπει η ίνα να τοποθετηθεί μέσα σε οργανικό διαλύτη για να πετύχουμε τον εμποτισμό της [21].



*Εικόνα7 : Διάταξη Β της ίνας (hollow fiber)*

## 2.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ LPME

### 2.5.1 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ LPME ΣΤΗΝ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ

Η μέθοδος LPME χρησιμοποιείται στον τομέα της Βιοϊατρικής για τον προσδιορισμό διαφόρων ουσιών σε βιολογικά υγρά (αίμα, ούρα, σάλιο, πλάσμα). Η μέθοδος της μικροεκχύλισης συνδέεται με τα διάφορα όργανα ανάλυσης (GC, CE, HPLC), τα οποία παρέχουν τιμές για τα όρια ανίχνευσης σε χαμηλή κλίμακα ( $\mu\text{g/l}$ ) ακόμα και όταν πραγματοποιείται εκχύλιση μικρών όγκων βιολογικών δειγμάτων. Αυτό οφείλεται στον αποτελεσματικό εμπλουτισμό των προσδιοριζόμενων συστατικών. Με την LPME επιτυγχάνεται πλήρης καθαρισμός του δείγματος, αφού αφαιρούνται από την φάση του δέκτη μακρομόρια και άλλες ενώσεις που είναι πιθανό να δημιουργήσουν προβλήματα στην ανάλυση. Η LPME δύο φάσεων με την χρήση της διάταξη Α ή Β συνέβαλε στις διάφορες βιοϊατρικές αναλύσεις, όμως οι περισσότερες στηρίχθηκαν στην LPME τριών φάσεων (διάταξη Α). Στον Πίνακα 6 φαίνονται οι βιοϊατρικές χρήσεις και οι πειραματικές συνθήκες [12,19,22].

### 2.5.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ LPME ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Η χρήση της LPME για τον προσδιορισμό ουσιών που μολύνουν το περιβάλλον σε διάφορα δείγματα έχει ως αποτέλεσμα υψηλούς παράγοντες εμπλουτισμού των προσδιοριζόμενων ουσιών, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, και την αύξηση της εκλεκτικότητας λόγω της φύσης της ίνας (ικανότητα διαχωρισμού). Έτσι αποφεύγεται η εκχύλιση μεγάλων μορίων και αιωρούμενης ύλης. Σε όλες τις δημοσιεύσεις στον τομέα της περιβαλλοντικής



ανάλυσης χρησιμοποιείται η διάταξη B για την ίνα. Η χρησιμοποίηση της LPME δύο φάσεων ή τριών φάσεων εξαρτάται από την χημική φύση των προσδιοριζόμενων συστατικών. Η LPME δύο φάσεων συνδεδεμένη με GC χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε υδάτινα δείγματα και αιωρήματα, μικροβιοκτόνων στο θαλασσινό νερό, PAHs και φθαλικών σε υδάτινα δείγματα. Η LPME τριών φάσεων, συνδεδεμένη με υγρό χρωματογράφο, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό νιτροφαινόλων στο νερό και σε θαλασσινά νερά και αρωματικών αμίνων σε υδάτινα δείγματα. Οι διάφορες αναλύσεις σχετικά με το περιβάλλον, με την χρήση της LPME, απέδειξαν ότι πρόκειται για μια γρήγορη τεχνική μεγάλης ακρίβειας, ευαισθησίας και χαμηλού κόστους. Επιπλέον με την LPME επιτυγχάνεται υψηλός εμπλουτισμός και αποτελεσματικός καθαρισμός του δείγματος, ακόμα και στην περίπτωση πολύπλοκων δειγμάτων. Στον Πίνακα 3 φαίνονται οι περιβαλλοντικές εφαρμογές και οι σημαντικότερες πειραματικές συνθήκες [12,23,24].

Οι εφαρμογές της ανεπτυγμένης μεθόδου LPME αυξάνονται συνεχώς. Πρόσφατα η τεχνική χρησιμοποιήθηκε στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων και συγκεκριμένα για την ανίχνευση διαφόρων ουσιών στο αγελαδινό γάλα. Για αυτή την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε LPME τριών φάσεων συνδεδεμένη με HPLC και η διάταξη B για την ίνα. Αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε εξαιρετικά απλή και αποτελεσματική, μια και το δείγμα του γάλακτος προετοιμάστηκε εύκολα, χωρίς να απαιτούνται διαδικασίες αποβουτύρωσης [24].

Στον Πίνακα 6 που ακολουθεί αναφέρονται οι σημαντικότερες εφαρμογές της LPME (είτε δύο φάσεων, είτε τριών φάσεων) για την ανάλυση διαφόρων ουσιών, για την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων και τροφίμων. Αναφέρεται σε κάθε περίπτωση η διάταξη της ίνας που χρησιμοποιείται, η σύνθεση των διαλυμάτων δότη και δέκτη, ο οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται, η μέθοδος ανάλυσης, τα όρια ανίχνευσης για Σήμα/Θόρυβο=3 [12].

Application Target analytes	Sampling mode	Config. <sup>a</sup>	Donor solution composition	Organic solvent	Acceptor solution composition	Analytical method	Limits of Detection <sup>b</sup>
<b>Drug analysis</b> Diazepam, <i>N</i> -desmethyldiazepam	Two-phase	A	3.5 ml urine pH = 7.5	<i>n</i> -octanol	3 µl butyl acetate: <i>n</i> -octanol (1:1 v:v)	GC/NPD	0.020-0.115 nmol/ml
			3 ml plasma 0.2 ml MeOH		hexyl ether : <i>n</i> -octanol (1:3 v:v)		
<b>Drug analysis</b> Diazepam, Prazepam,	Two-phase	A	1.5 ml plasma pH=5.5	<i>n</i> -octanol	15 µl <i>n</i> -octanol	GC/NPD	2 ng/ml (S/N=2)
Methamphetamine, Naproxen,	<b>Three-phase</b>	A	2.5 ml plasma (made alkaline)	<i>n</i> -octanol	25 µl aqueous (acidic)	CE/UV	3 ng/ml (S/N=2)
			4 ml urine (made acidic)		25 µl aqueous (basic)		1 ng/ml (S/N=2)
Citalopram, <i>N</i> -desmethylocitalopram			1.5 ml plasma (made alkaline)	<i>n</i> -octanol	25 µl aqueous (acidic)	HPLC/RF	0.7 ng/ml (S/N=2)

<b>Drug analysis</b> Promethazine, Methadone, Haloperidol	Two-phase	A	1 ml urine or plasma (made alkaline)	Dihexyl ether	25 µl dihexyl ether	GC/FID	Not reported
	Three-phase	A	1 ml urine or plasma (made alkaline)	Dihexyl ether	25 µl aqueous (acidic)	CE/UV	
	Three-phase	A	2.5 ml urine or plasma (made alkaline)	<i>n</i> -octanol	25 µl aqueous (acidic)	CE/UV	5 ng/ml
<b>Drug analysis</b> Methamphetamine	Three-phase	A	2.5 ml urine, plasma or whole blood (made alkaline)	Hexyl ether	25 µl aqueous (acidic)	CE/UV	2 ng/ml (citalopram)
	Three-phase	A	2.5 ml water samples (made acidic)	Dihexyl ether	25 µl aqueous (basic)	CE/UV	1 ng/ml (naproxen)
	Three-phase	A	2.5 ml urine (made acidic)		25 µl aqueous (acidic) 25% MeOH		
<b>Drug analysis</b> Citalopram hydrobromide, <i>N</i> -desmethy/citalopram hydrochloride <b>Drug analysis</b>	Three-phase	A	1 ml plasma (made alkaline)	Hexyl ether	25 µl aqueous (acidic)	CE/UV	5-5.5 ng/ml

Amphetamines and analogues	Three-phase	A	0.5 ml urine/whole blood (made alkaline)	Dihexyl ether	25 µl aqueous (acidic)	FIA/MS/MS CE/UV	Urine 2-100 ng/ml
<b>Drug analysis</b> Methadone, Amphetamine, Haloperidol	<b>Three-phase</b>	A	0.25-1 ml plasma (made alkaline) 5-50% MeOH	Dihexyl ether	25 µl aqueous (acidic) HCl	CE/UV	Blood 0.4-14 ng/ml
<b>Drug analysis</b> Basic drugs	<b>Three-phase</b>	A	4 ml water (made alkaline)	Dihexyl ether	25 µl aqueous (acidic)	CE/UV	Not reported
<b>Drug analysis</b> <i>R</i> - and <i>S</i> -Mianserin	<b>Three-phase</b>	A	0.5 plasma (made alkaline)	Dihexyl ether	25 µl aqueous (acidic)	CE/UV	Not reported
<b>Drug analysis</b> 11-nor- $\Delta^9$ - tetrahydrocannabinol-9- carboxylic acid	<b>Two-phase</b>	B	8 ml urine (made alkaline)	Octane	20 µl derivatising reagent : octane	GC/PDHID	1 ng/ml
<b>Drug analysis</b> Cocaine and its metabolites	<b>Two-phase</b>	B	8 ml urine (made alkaline)	Chloroform	10 µl chloroform	GC/PDHID	11-48 ng/ml
<b>Drug analysis</b> Cocaine and its metabolites	<b>Two-phase</b>	B	2 ml saliva (made alkaline)	Chloroform	10 µl chloroform	GC/PDHID	6-28 ng/ml

Amino alcohols	Three-phase	B	3.5 ml water or urine (made alkaline)	<i>n</i> -octanol	10 µl aqueous (acidic)	CE/UV	0.08-0.5 µg/l
<b>Environmental</b> Triazine herbicides	Two-phase	B	3 ml water or slurry 10% NaCl	Toluene	3 µl toluene	GC/MS	0.04-0.18 ng/ml (MS-SIM)
<b>Environmental</b> Organochlorine pesticides	Two-phase	B	5 ml seawater pH=2 3% NaCl	Toluene	5 µl toluene	GC/MS	0.013-0.059 ng/ml (MS-SIM)
<b>Environmental</b> Fluoranthene, Pyrene	Two-phase	B	3 ml water	<i>n</i> -octanol	3 µl <i>n</i> -octanol	GC/MS	Not reported
<b>Environmental</b> Phthalates	Two-phase	B	5 ml water	Toluene	3 µl toluene	GC/MS	0.005-0.1 ng/ml (MS-SIM)
<b>Environmental</b> Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (soil)	Two-phase	B	1 g soil, 7 ml acetone, 15 ml water		8 µl octane	GC/FID	0.13-0.22 mg/kg
<b>Environmental</b> Aromatic amines	Three-phase	B	4 ml water (made alkaline) 20% NaCl 2% acetone	Dihexyl ether	4 µl aqueous (acidic) 18-crown-6 ether	HPLC/UV	0.05-0.1 ng/ml

**Environmental**

Nitrophenols	Three-phase	B	2.5 ml water seawater (made alkaline)	or	<i>n</i> -octanol	2 µl aqueous (acid)	cLC/UV	0.5-1.0 ng/ml
<b>Food analysis</b>								
Phenoxy herbicides	Three-phase	B	8 ml bovine milk (made acidic)		<i>n</i> -octanol	7 µl aqueous (basic)	HPLC/UV	0.5 ng/ml

---

## 2.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ LPME-ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

### 2.6.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΙΝΑΣ

Οι ίνες που χρησιμοποιούνται στην LPME πρέπει να είναι υδροφοβικές και συμβατές με τον οργανικό διαλύτη. Σε όλες τις αναφορές που έχουν δημοσιευθεί αναφέρεται η χρήση τριχοειδών μεμβρανών από πολυπροπυλένιο. Ο πιο συνηθισμένος τύπος αυτών των ινών έχει εσωτερική διάμετρο της τάξης των 600μm που είναι συμβατή με τον όγκο του δέκτη (μl) που απαιτείται για την μικροεκχύλιση [12].

Το πάχος των τοιχωμάτων (200μm) παρέχει μηχανική σταθερότητα και διευκολύνει την προετοιμασία για εκχύλιση. Τέλος το ονομαστικό και μέγιστο μέγεθος των πόρων (0.2μm και 0.64μm αντίστοιχα) των τριχοειδών μεμβρανών εξασφαλίζει αποτελεσματικό μικροφιλτράρισμα, μια και επιτρέπει την διείσδυση μέσω των πόρων της ίνας μόνο των μικρών μορίων (προσδιοριζόμενα συστατικά), ενώ παρεμποδίζεται η είσοδος των μεγάλων μορίων και της αιωρούμενης ύλης. Επίσης χρησιμοποιείται και ένας άλλο είδος ίνας από πολυπροπυλένιο στην LPME, το οποίο έχει μικρότερη εσωτερική διάμετρο (330μm) και μικρότερο πάχος τοιχωμάτων (150μm). Καθώς αυτή η ίνα είναι λεπτότερη από την προηγούμενη που περιγράψαμε, το μήκος πρέπει να είναι διπλάσιο, έτσι ώστε να μπορεί να δεχτεί παρόμοιο όγκο του διαλύματος του δέκτη. Επιπλέον η περιοχή επαφής ανάμεσα στην κοίλη ίνα και το διάλυμα του δείγματος διπλασιάζεται και ο χρόνος που απαιτείται για να επιτευχθεί ισορροπία, κατά την διάρκεια της εκχύλισης, μειώνεται στο μισό [12].

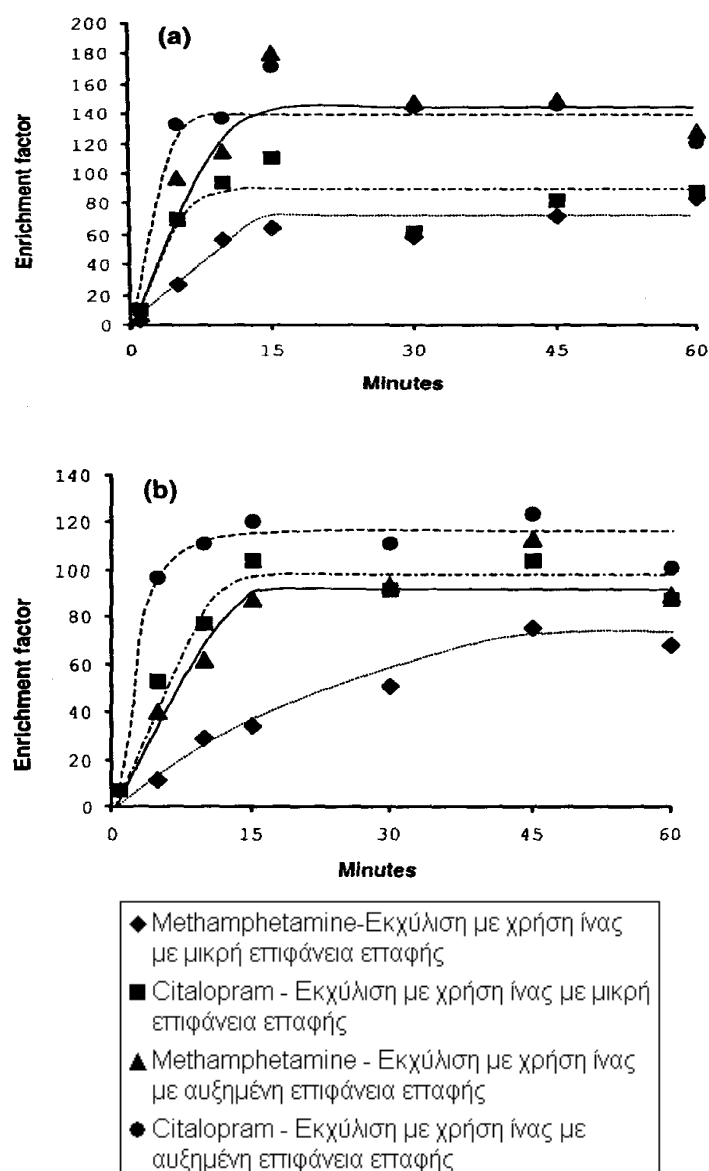
Σε αρκετές περιπτώσεις η κοίλη ίνα χωρίζεται σε τμήματα, ώστε να αποφευχθούν οι μεταβολές του μήκους. Τέτοιες διακυμάνσεις αποδείχθηκε ότι επηρεάζουν σημαντικά την εκχύλιση, κυρίως στην περίπτωση της LPME δύο φάσεων. Αντιθέτως η LPME τριών φάσεων αποδείχθηκε ότι δεν επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις του μήκους της ίνας. Ωστόσο συνιστάται η προσθήκη εσωτερικού προτύπου, για την αντιστάθμιση των διαφόρων πειραματικών παραμέτρων που μπορεί να διαφέρουν από δείγμα σε δείγμα [19].

Επίσης θα πρέπει να αναφερθεί ότι είναι πολύ σημαντική η ύπαρξη ενός σταδίου καθαρισμού, πριν από τη χρήση των ινών. Η απομάκρυνση των οργανικών ουσιών που προκαλούν μόλυνση και δημιουργούν προβλήματα στην ανάλυση, πραγματοποιείται με την χρήση υπερήχων (ανάμειξη με ακετόνη για λίγα λεπτά) [19].

Έχει αποδειχτεί ότι η αύξηση της επιφάνειας επαφής της κοίλης ίνας με το διάλυμα του δείγματος, οδηγεί σε μείωση του χρόνου εκχύλισης και και επηρεάζει σημαντικά και τον παράγοντα εμπλουτισμού. Αυτό οφείλεται στην αύξηση του εμβαδού της μεμβράνης και στην μείωση του πάχους των τοιχωμάτων της ίνας. Τα αποτελέσματα αυτής της αύξησης δεν ήταν τόσο σημαντικά για υδάτινα δείγματα, ενώ ήταν ιδιαίτερα σημαντικά για βιολογικά δείγματα, όπου οι χρόνοι ισορροπίας μειώθηκαν κατά ένα συντελεστή περίπου ίσο με 2. Επίσης η μικρότερη εσωτερική διάμετρος της ίνας με το

αυξημένο εμβαδόν επαφής συνέβαλε στην μείωση των χρόνων εκχύλισης [28].

Επιπλέον οι παράγοντες εμπλουτισμού που επιτεύχθηκαν με την χρήση της ίνας με το αυξημένο εμβαδόν επαφής ήταν υψηλότεροι από τους παράγοντες εμπλουτισμού που επιτεύχθηκαν με την κανονική ίνα. Στην Εικόνα 8 φαίνονται τα διαγράμματα των παραγόντων εμπλουτισμού με τους χρόνους εκχύλισης για τις ουσίες : citalopram και methamphetamine για κάθε ίνα [28].



**Εικόνα8:** Διαγράμματα των παραγόντων εμπλουτισμού με τους χρόνους εκχύλισης για τις ουσίες citalopram, methamphetamine, με την χρήση δύο διαφορετικών ινών σε δείγμα (a) νερού και (b)ούρων



## 2.6.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΤΗ

Η επιλογή του κατάλληλου οργανικού διαλύτη έχει πολύ μεγάλη σημασία για την βελτιστοποίηση της LPME δύο και τριών φάσεων. Γενικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι μη-υδατοδιαλυτοί διαλύτες στο νερό που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την πολικότητα και την διαλυτότητα τους στο νερό. Επίσης είναι δυνατή η χρήση μείγματος διαλυτών. Η τελική επιλογή του οργανικού διαλύτη πρέπει να βασίζεται σε διάφορους παράγοντες. Έτσι ο διαλύτης που θα επιλέξουμε θα πρέπει να έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ώστε να αποφεύγεται η διάλυση στην υδατική φάση [21].

Επίσης θα πρέπει να έχει χαμηλή πτητικότητα, έτσι ώστε να περιορίζεται η εξάτμιση του κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Επιπλέον θα πρέπει να παρέχει υψηλή διαλυτότητα για τις προσδιοριζόμενες ουσίες, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η επαύξηση της εκχύλισης. Στις περιπτώσεις που η LPME δύο φάσεων συνδέεται με αέριο χρωματογράφο (GC), ο οργανικός διαλύτης πρέπει να έχει εξαιρετική χρωματογραφική συμπεριφορά. Στην LPME τριών φάσεων ο διαλύτης που θα επιλέξουμε θα πρέπει να εξασφαλίζει υψηλές τιμές για τον συντελεστή  $K_{org/d}$  και κυρίως για τον  $K_{a/org}$ . Η υψηλή τιμή του  $K_{a/org}$  έχει μεγάλη σημασία, μια και παρεμποδίζει την παγίδευση των προσδιοριζόμενων ουσιών στην οργανική φάση και μειώνει την επανεκχύλιση στο υδατικό διάλυμα του δότη [19,21].

Επιπρόσθετα ο διαλύτης θα πρέπει να έχει τέτοια πολικότητα που να ταιριάζει με αυτήν της ίνας από πολυπροπυλένιο, ώστε να μπορεί εύκολα να ακινητοποιηθεί στους πόρους της ίνας. Στην LPME τεράστια σημασία έχει ο εμποτισμός του διαλύτη, καθώς πραγματοποιείται η εκχύλιση στην επιφάνεια του ακινητοποιημένου διαλύτη. Αποτελεσματικός οργανικός εμποτισμός επιτυγχάνεται συνήθως με την βύθιση των τμημάτων της κοίλης ίνας στον οργανικό διαλύτη για μερικά δευτερόλεπτα, πριν από τη χρήση τους. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι στην LPME τριών φάσεων προστίθεται συνήθως ένα ακόμα στάδιο για την μείωση της πυκνότητας της οργανικής φάσης και την αύξηση της εκχύλισης. Κατά την διάρκεια αυτού του βήματος, η κοίλη ίνα, έπειτα από τον εμποτισμό της, βυθίζεται στο νερό για λίγα δευτερόλεπτα, ώστε με την βοήθεια των υπερήχων (ultrasonication) να απομακρυνθούν οι μικρές σταγόνες του οργανικού διαλύτη που έχουν απομείνει στην εξωτερική πλευρά της κοίλης ίνας [23,25].

Οι πιο συνηθισμένοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην LPME (είτε δύο φάσεων είτε τριών φάσεων) είναι οι εξής : n-octanol, Dihexyl ether, Hexyl ether, Octane, Chloroform, Toluene [12].

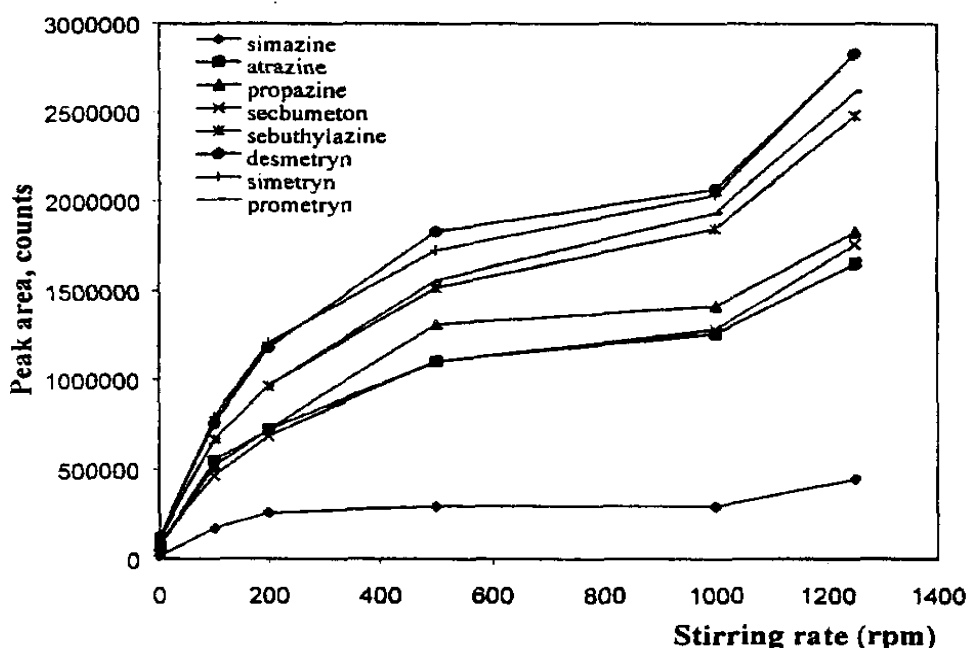
## 2.6.3 ΑΝΑΔΕΥΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το δείγμα ανακινείται με στόχο την επιτάχυνση της κινητικής της εκχύλισης. Η αύξηση της ταχύτητας (ρυθμού) ανάδευσης του διαλύματος του δότη έχει ως αποτέλεσμα την επαύξηση της εκχύλισης, μια και διευκολύνεται η διάχυση, μέσω της κοινής επιφάνειας με την ίνα, του προσδιοριζόμενου συστατικού. Επιπλέον η αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης βελτιώνει την επαναληψιμότητα της εκχύλισης [24].

Στην LPME το διάλυμα του δέκτη εγκλωβίζεται μέσα στην κοίλη ίνα και μπορεί να αντέξει πολύ υψηλές ταχύτητες ανάδευσης. Τόσο στην LPME δύο φάσεων όσο και στην LPME τριών φάσεων, η χρήση μαγνητικού αναδευτήρα ή δόνησης αυξάνει σημαντικά την εκχύλιση. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του δείγματος, είναι δυνατή η χρήση της μέγιστης ταχύτητας ανάδευσης. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι η μέγιστη ταχύτητα ανάδευσης προκαλεί το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα, οι οποίες έχουν την τάση να προσκολλώνται στην επιφάνεια της κοίλης ίνας. Αυτές οι φυσαλίδες αέρα επιταχύνουν την εξάτμιση του διαλύτη και συμβάλλουν στην εξαγωγή ανακριβών μετρήσεων. Η δόνηση του δείγματος συντελεί στην αύξηση της εκχύλισης και έχει το πλεονέκτημα ότι αποκλείει την πιθανότητα μόλυνσης του δείγματος, λόγω της επικάλυψης των μαγνητικών αναδευτήρων με Teflon. Κατά τη χρήση της δόνησης, δεν έχει αναφερθεί εξάτμιση του διαλύτη στην εκχύλιση[12,24].

Στην Εικόνα 9 απεικονίζεται η γραφική παράσταση των κορυφών του χρωματογραφήματος διαφόρων ουσιών με τις ταχύτητες ανάδευσης. Παρατηρούμε ότι η ανάδευση αυξάνει σημαντικά το διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ουσιών στην οργανική φάση και για ταχύτητα 1000 rpm έχουμε τις μέγιστες τιμές. Όταν η ταχύτητα είναι 1250rpm (ένας μικρός όγκος του διαλύματος μπορεί να αναδευτεί σε τόσο υψηλή ταχύτητα) σχηματίζονται φυσαλίδες αέρα, οι οποίες μπορούν να προσκολληθούν στην επιφάνεια της ίνας και να επιταχύνουν την εξάτμιση του διαλύτη [26].

Τέλος η χρήση πολλαπλών οργάνων δόνησης επιτρέπει την ταυτόχρονη εκχύλιση πάνω από 30 δειγμάτων, εξασφαλίζοντας την εξαγωγή ακριβών αποτελεσμάτων [12].



Εικόνα 9: Επίδραση της ανάδευσης στην αποδοτικότητα της εκχύλισης

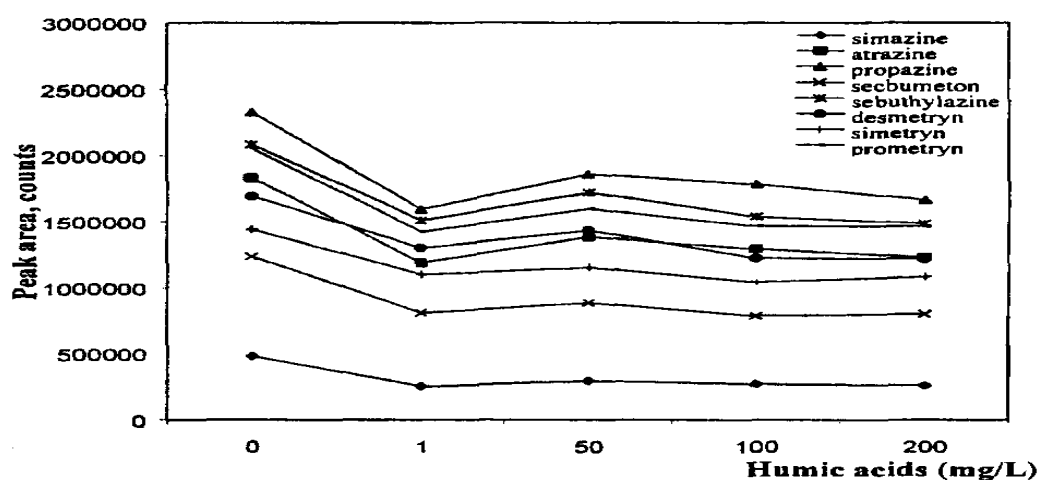
#### 2.6.4 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΛΑΤΟΣ

Η προσθήκη άλατος στο δείγμα, που εξαρτάται από την φύση των συστατικών που μελετάμε, μπορεί να προκαλέσει μείωση της διαλυτότητας τους και επομένως αύξηση της εκχύλισης. Αυτό οφείλεται στο αποτέλεσμα του salting out, όπου λιγότερα μόρια νερού είναι διαθέσιμα για την διάλυση των μορίων των ενώσεων που αναλύονται, μια και έχουν την τάση να σχηματίζουν ένυδρες σφαίρες γύρω από τα ιόντα του άλατος. Παρόλα αυτά πολικές ουσίες μπορεί να αλληλεπιδράσουν ηλεκτροστατικά με τα ιόντα του άλατος, περιορίζοντας έτσι την εκχύλιση, μια και μειώνεται η ικανότητά τους για μεταφορά μάζας [12,25].

Τόσο στην LPME δύο φάσεων όσο και στην LPME τριών φάσεων, οι επιδράσεις της προσθήκης άλατος στο διάλυμα του δότη, πριν από την εκχύλιση, έχουν μελετηθεί. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανάλογα με το είδος των ουσιών που μελετάμε, μια αύξηση της ιοντικής ισχύς του υδατικού διαλύματος μπορεί να έχει διάφορες συνέπειες στη εκχύλιση : μπορεί να την αυξήσει , να μη την επηρεάσει ή ακόμα και να την περιορίσει [12, 21].

#### 2.6.5 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Έχουν γίνει πειράματα σχετικά με την επίδραση των οργανικών οξέων στην LPME. Από την Εικόνα10 μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η προσθήκη οργανικών οξέων δεν μειώνει σημαντικά τις ουσίες που εκχυλίζονται, όταν εισάγεται 1mg/l. Παρατηρούμε ότι οι καμπύλες των κορυφών (που αντικατοπτρίζουν την αποδοτικότητα της εκχύλισης) παραμένουν σχεδόν σταθερές, καθώς οι συγκεντρώσεις των οργανικών οξέων αυξάνουν (1-200mg/L). Αντιθέτως στην SPME η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης μειώνεται σημαντικά, όταν η συγκέντρωση των οξέων είναι πάνω από 100mg/L. Αυτή η διαφορά οφείλεται στην εκλεκτικότητα της μεμβράνης της κοίλης ίνας. Οι πόροι της μεμβράνης επιτρέπουν στις προσδιοριζόμενες ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους να διαχέονται, ενώ παρεμποδίζουν την είσοδο των ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους. Έτσι τα οργανικά οξέα, που έχουν πολύ μεγάλο μοριακό βάρος, δεν μπορούν να εκχυλιστούν στον οργανικό διαλύτη [26].



Εικόνα10: Επίδραση της προσθήκης οργανικών οξέων στην LPME

## 2.6.6 ΟΓΚΟΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΔΟΤΗ ΚΑΙ ΔΕΚΤΗ

Στα προηγούμενα κεφάλαια έγινε διεξοδική συζήτηση σχετικά με την επίδραση των διαφορετικών όγκων στους παράγοντες εμπλουτισμού και στις ανακτήσεις. Επίσης για τον προσδιορισμό των βέλτιστων όγκων που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφοροι παράγοντες. Αρχικά, ανάλογα με το είδος του δείγματος που εκχυλίζεται, υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο όγκος του διαλύματος του δότη περιορίζεται. Για παράδειγμα όταν έχουμε δείγματα σάλιου, ένας περιορισμένος όγκος είναι διαθέσιμος (της τάξης των 2-5ml) και για την μεγιστοποίηση της εκχύλισης θα πρέπει να ρυθμίζεται κατάλληλα ο όγκος του διαλύματος του δέκτη. Όταν χρησιμοποιούμε την διάταξη Β (Εικόνα 6) είναι προτιμότερη η χρήση μακρών και στενών φιαλιδίων, έτσι ώστε να μεγιστοποιήσουμε την περιοχή της επιφάνειας της ίνας που είναι εκτεθειμένη στο διάλυμα του δείγματος [22].

Επιπλέον όσο πιο μεγάλος είναι ο όγκος του διαλύματος του δέκτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, τόσο πιο μεγάλος είναι και ο αριθμός των ουσιών που ανακτώνται και, ανάλογα με την τεχνική ανάλυσης, η ένεση που χρησιμοποιείται. Μπορούμε να έχουμε και υψηλότερα ή χαμηλότερα όρια για τους όγκους που εισάγονται. Αυτό εξαρτάται από την τεχνική ανάλυσης που συνδέεται με την LPME. Για παράδειγμα ο ελάχιστος όγκος του διαλύματος του δέκτη, για τον οποίο είναι δυνατή η πραγματοποίηση συνεχόμενων ενέσεων με την μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) είναι 25 μl. Αντιθέτως τα όργανα της GC δεν είναι συμβατά με τόσο μεγάλους όγκους και η ανάλυση γίνεται με ενέσεις 1μl. Είναι όμως δυνατή η εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ουσιών με μεγαλύτερο όγκο διαλύματος δέκτη και τη χρήση ενός μέρους του για την ανάλυση με GC. Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία (GC) και την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE), όγκοι 10-25μl είναι αποδεκτοί για την ανάλυση με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) [12,22].

Τέλος η διάταξη της κοίλης ίνας μπορεί να επηρεάσει τον όγκο της φάσης του δέκτη. Η πλειοψηφία των αναφορών σχετικά με την διάταξη Α (Πίνακας 6) χρησιμοποιούν την LPME τριών φάσεων και μεγαλύτερους όγκους διαλυμάτων του δέκτη. Από την άλλη μεριά η πλειοψηφία των μελετών σχετικά με την διάταξη Β (Πίνακας 6) χρησιμοποιούν την LPME δύο φάσεων και μειωμένους όγκους της φάσης του δέκτη. Γενικά μεγάλοι όγκοι των διαλυμάτων του δέκτη δεν είναι κατάλληλοι για την διάταξη Β, λόγω του ότι αυτή η διάταξη της κοίλης ίνας έχει ένα τμήμα που κρέμεται. Είναι φανερό ότι το μήκος της τριχοειδούς ίνας από πολυπροπυλένιο θα πρέπει να ρυθμιστεί με βάση τον όγκο του διαλύματος του δέκτη που εισάγεται στην κοιλότητά της [12].

## 2.6.7 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ pH

Η ρύθμιση του pH μπορεί να αυξήσει την εκχύλιση, μια και ο διαχωρισμός της ισορροπίας επηρεάζει την διαλυτότητα των όξινων/βασικών προσδιοριζόμενων συστατικών. Τόσο στην LPME δύο φάσεων όσο και στην LPME τριών φάσεων έχει αποδειχτεί ότι η αλλαγή του pH στο υδατικό

διάλυμα του δότη προκαλεί αυξημένη προσυγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας [12].

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως ο καθορισμός της σύστασης των φάσεων του δότη και του δέκτη έχει πολύ μεγάλη σημασία, μια και οδηγεί σε αυξημένους λόγους κατανομής και εξασφαλίζει υψηλούς συντελεστές εμπλουτισμού και ανάκτησης για τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Αυτό επιτυγχάνεται με την ρύθμιση του pH στο υδατικό διάλυμα και στο διάλυμα του δότη. Έτσι για παράδειγμα όταν μελετούμε όξινες ενώσεις το pH του υδατικού διαλύματος του δότη ρυθμίζεται στην όξινη περιοχή τιμών, ώστε να αποϊονιστούν οι κύριες ενώσεις, να μειωθεί η διαλυτοτητά τους μέσα στο δείγμα και να εξασφαλιστεί αποτελεσματική μεταφορά στην οργανική φάση. Στην συνέχεια το pH του διαλύματος του δέκτη ρυθμίζεται στην βασική περιοχή τιμών, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός των προσδιοριζόμενων ουσιών στην οργανική φάση και να διασφαλιστεί η επιτυχία της εκχύλισης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον ιονισμό των ουσιών και την εξασφάλιση υψηλής διαλυτότητας των ενώσεων που βρίσκονται στην φάση του δέκτη παρά στην οργανική φάση. Από διάφορες μελέτες προκύπτει ότι η εκχύλιση των όξινων ενώσεων αυξήθηκε με την ρύθμιση του pH της φάσης του δέκτη στην βασική περιοχή τιμών (LPME τριών φάσεων, διάταξη Α). Ανάλογες παρατηρήσεις μπορούν να γίνουν και για βασικές ενώσεις. Επίσης μελέτες σχετικά με τις βασικές προσδιοριζόμενες ενώσεις απέδειξαν ότι η εκχύλιση επαυξάνεται με την προσαρμογή της τιμής του pH της φάσης του δέκτη στην όξινη περιοχή τιμών (LPME τριών φάσεων, διάταξη Α). Επομένως, όταν απαιτείται, είναι πολύ σημαντικό να προσδιορίζονται οι βέλτιστες τιμές του pH των διαλυμάτων δότη και δέκτη, οι οποίες εξασφαλίζουν αυξημένη εκχύλιση [12,24,27].

Έχει αποδειχθεί ότι το pH της φάσης του δέκτη επηρεάζει σημαντικά τις ανακτήσεις και την εκλεκτικότητα. Σε χαμηλό pH η εκχύλιση είναι καθολική, ενώ η εκλεκτικότητα αυξάνεται σε υψηλότερες τιμές pH. Επομένως οι αδύναμες βάσεις πρέπει να εκχυλίζονται σε χαμηλές τιμές pH, ενώ οι ισχυρές βάσεις σε υψηλότερες τιμές pH, γεγονός που συμβάλλει στην αύξηση της εκλεκτικότητας [12].

#### **2.6.8 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ**

Η μεταφορά της μάζας είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από τον χρόνο και ο ρυθμός της μειώνεται όσο το σύστημα πλησιάζει τις συνθήκες ισορροπίας. Η ισορροπία (είτε η εκχύλιση είναι πλήρης, είτε χρησιμοποιείται ως τεχνική προσυγκέντρωσης) επιτυγχάνεται ύστερα από έκθεση, για μεγάλο χρονικό διάστημα, του διαλύματος του δέκτη στο δείγμα. Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου είναι πολύ σημαντική η επαλήθευση των χρόνων εκχύλισης των βασικών ενώσεων, ώστε να βρούμε τον χρόνο ύστερα από τον οποίο επιτυγχάνεται πρακτικά η ισορροπία. Αν και αυξημένοι χρόνοι έκθεσης του διαλύματος του δέκτη συμβάλλουν στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, δεν είναι πάντοτε πρακτική η χρήση εκτεταμένων χρόνων εκχύλισης. Συνήθως επιλέγουμε χρόνους μικρότερους από τον χρόνο χρωματογραφίας, για να εξασφαλίσουμε ακριβή ανάλυση του δείγματος. Επίσης θα πρέπει να αναφέρουμε ότι όταν εργαζόμαστε στο υψηλότερο

τμήμα των χρόνων εκχύλισης, είναι απαραίτητη η σταθερή και ακριβής χρονομέτρηση για να έχουμε αποτελέσματα μεγάλης ακρίβειας. Σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένοι χρόνοι εκχύλισης (ταυτόχρονη εκχύλιση μεγάλου αριθμού δειγμάτων) επιτεύχθηκε υψηλή εξαγωγή δειγμάτων [12].

Μείωση του χρόνου εκχύλισης είναι πάντοτε επιθυμητή και έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες σχετικά με τα αποτελέσματα μιας τέτοιας μείωσης. Έχει αποδειχτεί ότι ο χρόνος εκχύλισης εξαρτάται από την ίνα που χρησιμοποιείται. Έτσι η μείωση του χρόνου εκχύλισης μπορεί να επιτευχθεί με την αύξηση της επιφάνειας επαφής της κοίλης ίνας με το διάλυμα του δείγματος. Δύο ίνες από πολυπροπυλένιο που είχαν διαφορετικές επιφάνειες επαφής, χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση δειγμάτων σάλιου, ούρων και ανθρώπινου αίματος. Προέκυψε ότι με την χρήση της ίνας που είχε μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής, οι χρόνοι εκχύλισης των παραπάνω ουσιών μειώθηκαν (κατά ένα συντελεστή 2). Αυτή η μείωση είχε ως αποτέλεσμα την επίτευξη ισορροπίας μόλις σε 15min. Άρα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι παρά τα πλεονεκτήματα που έχουν οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης, η μείωση τους μπορεί να οδηγήσει σε ακριβή αποτελέσματα, μέσω της γρηγορότερης επίτευξης ισορροπίας [28].

#### **2.6.9 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΥΡΟΥΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ**

Η αλλαγή των συνθηκών εκχύλισης επηρεάζει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου καθώς και τον χρόνο αποκατάστασης της ισορροπίας. Έτσι συνιστάται να ελέγχεται ο χρόνος της εκχύλισης, που υπολογίζεται κατά την πραγματοποίηση της, πριν από τον καθορισμό της περιοχής γραμμικότητας. Οι ίνες που χρησιμοποιούνται στην LPME, λόγω του ότι είναι τριχοειδείς μεμβράνες από πολυπροπυλένιο, εμφανίζουν μια ικανότητα μεγάλου εύρους γραμμικής εμβέλειας. Υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες το προσδιοριζόμενο συστατικό έχει πολύ μεγάλη συγγένεια με την επιφάνεια και μπορεί να υπάρξει κορεσμός ή ακόμα χαμηλές συγκεντρώσεις του συστατικού. Σε αυτές τις περιπτώσεις η γραμμική εμβέλεια μπορεί να επεκταθεί με την μείωση του χρόνου εκχύλισης [28].

#### **2.6.10 ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΤΗΣ LPME**

Η LPME είναι μια γρήγορη και πολύ αποτελεσματική τεχνική προετοιμασίας των δειγμάτων πριν από την ανάλυσή τους. Παρέχει αποτελέσματα μεγάλης ακρίβειας και οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ακρίβειά της είναι οι ακόλουθοι [12] :

- Όγκοι των δειγμάτων δότη και δέκτη
- Συνθήκες ανάδευσης
- Διαστάσεις της ίνας (μέγεθος των πόρων, εσωτερική διάμετρος)
- Συστατικά του περιβάλλοντος του δείγματος (αλάτι, οργανικά οξέα)
- Σωστός εμποτισμός της ίνας με οργανικό διαλύτη
- Χρόνος που μεσολαβεί ανάμεσα στην εκχύλιση και την ανάλυση
- Απώλεια των συστατικών (διείσδυση μέσα στο Teflon)
- Θέση της ίνας κατά την διάρκεια της έγχυσης
- Σταθερότητα της απόκρισης του ανιχνευτή

## 2.7 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ LPME ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

### 2.7.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ LPME ΜΕ ΤΗΝ SPME

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) είναι μια απλή μέθοδο, δεν χρησιμοποιείται διαλύτης για την εφαρμογή της, και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί. Έχει χρησιμοποιηθεί σε μια μεγάλη ποικιλία εφαρμογών, μια και επιτρέπει την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ουσιών σε ένα στάδιο, είτε από το υδάτινο δείγμα είτε από την υπερκείμενη αέρια φάση πάνω από αυτές. Η LPME έχει το βασικό πλεονέκτημα της απλότητας και θεωρείται ως μια τεχνική που δεν εξαρτάται από το διαλύτη. Αν και πρόκειται για μια μέθοδο off-line, το χαμηλό της κόστος επιτρέπει την ταυτόχρονη εκχύλιση πάνω από 30 δειγμάτων. Ωστόσο δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα ανάλυση υπερκείμενου χώρου [12].

Η βασική αρχή της μεθόδου SPME στηρίζεται στο διαχωρισμό των προσδιοριζόμενων ουσιών ανάμεσα στο αρχικό δείγμα (υδάτινη φάση του δέκτη) και σε μια ακίνητη φάση επικαλυμμένη με πολυμερές υλικό (στερεή φάση του δέκτη) σε ένα από διοξείδιο του πυριτίου (silica). Υπάρχουν διάφορα είδη ινών για την SPME, μια και η εκλεκτικότητα της μεθόδου σχετικά με τις διάφορες κατηγορίες ενώσεων, εξαρτάται από την πολικότητα και από το πάχος του λεπτού στρώματος στην φάση επίστρωσης. Οι ίνες που χρησιμοποιούνται στην SPME είναι αρκετά ακριβές και έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής, καθώς έχουν την τάση να αλλοιώνονται λόγω αυξημένης χρήσης. Επίσης το μήκος και το είδος της επίστρωσης διαφέρει από ένα σε ένα και παρατηρούνται διαφορές και στον εμπλουτισμό της προσδιοριζόμενης ουσίας. Πριν χρησιμοποιήσουμε μια ίνα για πρώτη φορά, απαιτείται θερμική προσαρμογή στις υπάρχουσες συνθήκες. Ακόμα και όταν πραγματοποιηθεί προσεχτικά αυτό το βήμα, υπάρχει η πιθανότητα μερικής απώλειας της επίστρωσης γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση επιπρόσθετων κορυφών κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Έτσι επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό η απόδοση της μεθόδου [14].

Επιπλέον έχει αναφερθεί σε αρκετές περιπτώσεις σχετικά με την SPME, συμπαράσυρση (επιμόλυνση δείγματος από προηγούμενο) του δείγματος μεταξύ των διαδικασιών ανάλυσης, γεγονός που οδηγεί σε εσφαλμένα αποτελέσματα [14].

Αντιθέτως στην LPME το χαμηλό κόστος των ινών, επιτρέπει την χρήση κάθε ίνας για μια μόνο εκχύλιση. Η πιθανότητα συμπαράσυρσης των δειγμάτων περιορίζεται σημαντικά, λόγω της φύσης της κοίλης ίνας και εξασφαλίζεται έτσι υψηλή ικανότητα αναπαραγωγής, μια και η χημεία της κάθε εκχύλισης δεν επηρεάζεται από την προηγούμενη χρήση της. Επιπλέον, πριν από την χρήση της ίνας, ένα γρήγορο στάδιο καθαρισμού απομακρύνει τις ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση και να δημιουργήσουν προβλήματα στην ανάλυση. Ωστόσο, καθώς τα τμήματα της ίνας κόβονται, είναι πολύ πιθανή η εμφάνιση διακυμάνσεων στο μήκος. Επίσης είναι πολύ πιθανές και οι

διακυμάνσεις του πάχους των τοιχωμάτων, οι οποίες μπορεί να μεταβάλλουν τον εμπλουτισμό, κυρίως όταν χρησιμοποιείται η LPME δύο φάσεων [12,29].

Ένα βασικό πλεονέκτημα της LPME έναντι της SPME είναι το μικρό μέγεθος των πόρων, το οποίο εξασφαλίζει μικροφιλτράρισμα και αποδίδει πολύ καθαρές εκχυλίσσεις. Για αυτό το λόγο αφαιρούνται οι ενώσεις που δεν είναι συμβατές με την τεχνική ανάλυσης καθώς και τμήμα των μη επιθυμητών για προσδιορισμό ουσιών. Αυτό το είδος της εκλεκτικής εκχύλισης απλοποιεί την προετοιμασία του δείγματος και συμβάλλει στην εξοικονόμηση χρόνου και στην εξαγωγή ακριβών αποτελεσμάτων. Αντιθέτως όταν χρησιμοποιείται η SPME σε πολύπλοκα δείγματα, απαιτείται ένα στάδιο προεπεξεργασίας του δείγματος (π.χ φιλτράρισμα) ή τροποποίηση της μεθόδου προετοιμασίας του δείγματος (π.χ η χρήση SPME με προστασία μεμβράνης). Αυτό γίνεται για να προστατευθεί η εύθραυστη ίνα από την σωματιδιακή ύλη και τα μεγάλα μόρια. Οποιαδήποτε φθορά ή ζημιά της ίνας, οδηγεί σε ανακριβείς μετρήσεις. Σε περιπτώσεις που έχουμε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων ή ρύθμιση του pH στο διάλυμα του δείγματος, έχουν αναφερθεί ζημιές στην ίνα της SPME που οδηγούν και πάλι σε ανακριβείς μετρήσεις. Αυτό δεν συμβαίνει στην LPME όπου η ιοντική ισχύς του διαλύματος του δείγματος και οι υψηλές ή χαμηλές τιμές του pH δεν επηρεάζουν την επαναληψιμότητα της μεθόδου ή την κατάσταση της κοίλης ίνας. Παρόλα αυτά σε ορισμένες περιπτώσεις η προσθήκη αλάτων (κυρίως στην LPME δύο φάσεων) επηρεάζει την κινητική της εκχύλισης και δεν αποδίδει ουσιαστική αύξηση στην απόκριση του οργάνου ανάλυσης, όπως συμβαίνει με την SPME [12,14,25].

### **2.7.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ LPME ΜΕ ΤΗΝ SDME**

Η μέθοδος SDME (μικροεκχύλιση μικρο-σταγόνας), όπου η μικροσταγόνα βρίσκεται στην άκρη μικροσύριγγας, έχει πολλά κοινά στοιχεία με την LPME δύο φάσεων. Αν και η SDME είναι μια γρήγορη, απλή και χαμηλού κόστους τεχνική εκχύλισης, απαιτεί πολύ προσεκτικούς και λεπτομερείς χειρισμούς, μια και έχουν αναφερθεί προβλήματα όπως είναι η εκτόπιση της σταγόνας ή προβλήματα που σχετίζονται με την σταθερότητα της σταγόνας [12].

Σχετικά με πολύπλοκα δείγματα επιβάλλεται η ύπαρξη ενός επιπρόσθετου σταδίου φιλτραρίσματος του διαλύματος του δείγματος. Η ευαισθησία και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων στις αναπτυγμένες μεθόδους SDME κυμαίνονται σε χαμηλό βαθμό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι παρατεταμένοι χρόνοι εκχύλισης και μεγάλες ταχύτητες ανάδευσης οδηγούν σε διάλυση ή εκτόπιση της σταγόνας [12].

Στην LPME η οργανική φάση (δέκτης) προστατεύεται από την ίνα και η παρουσία τριχοειδούς ίνας επιβραδύνει την διάλυση του οργανικού διαλύτη στο κύριο διάλυμα. Για αυτό η χρησιμοποίηση υψηλών ταχυτήτων ανάδευσης και εκτεταμένων χρόνων εκχύλισης στην LPME έχει ως αποτέλεσμα την βελτίωση της ικανότητας αναπαραγωγής και της ευαισθησίας της μεθόδου. Ένας άλλος παράγοντας που συμβάλλει στην βελτίωση της ευαισθησίας LPME είναι ότι το εμβαδόν επιφάνειας για την διάταξη LPME δύο φάσεων είναι μεγαλύτερο από το σφαιρικό εμβαδόν επιφάνειας που χρησιμοποιείται στην SDME. Αν αυξήσουμε την περιοχή επαφής ανάμεσα στο διάλυμα του



δότη και στο διάλυμα του δέκτη (οργανική φάση), αυξάνεται και η ταχύτητα εκχύλισης της ουσίας που αναλύεται [23,25].

Επιπρόσθετα στην LPME η οργανική φάση προστατεύεται από την ίνα, περιορίζοντας έτσι την ανάγκη για φιλτράρισμα του δείγματος όταν έχουμε πολύπλοκα δείγματα. Στην SDME είναι απαραίτητο το φιλτράρισμα των σωματιδίων, μια και έχουν την τάση να συγκρούονται με την σταγόνα, προκαλώντας την εκτόπιση της. Σχετικά με την εκχύλιση υπερκείμενου χώρου, προκύπτει από τις αναφορές ότι αυτή είναι δυνατή με την SDME, ενώ στην περίπτωση της LPME δεν έχει ακόμα μελετηθεί [25].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (GC)

#### 3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να συνδυαστεί με την τεχνική LPME με στόχο τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό μιας μεγάλης ποικιλίας οργανικών ενώσεων. Αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους χημικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται σήμερα και η διάδοση της είναι ταχύτατη. Είναι μια αποτελεσματική, γρήγορη και σχετικά οικονομική τεχνική διαχωρισμού και με την χρήση διαφόρων ανιχνευτών οδηγεί σε ακριβή αποτελέσματα. Για την επίτευξη αναλύσεων υψηλής ακρίβειας απαιτείται μια πολύ μικρή ποσότητα δείγματος. Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να επιτύχει τον διαχωρισμό ενός δείγματος στα συστατικά του, καθώς επίσης και τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό καθενός από αυτά. Έτσι απλουστεύεται η αναγνώριση και η μέτρηση της ποσότητας των συστατικών. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική ανάλυση αερίων και πτητικών υλικών. Στη συνέχεια εξαπλώθηκε η χρήση της και σήμερα έχει πολλές εφαρμογές στην βιομηχανία, στον έλεγχο ποιότητας διαφόρων περιβαλλοντικών δειγμάτων κ.α [34].

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός ενώσεων μπορεί να αναλυθεί με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Έχει υπολογιστεί ότι το 10-20% των ευρύτερα γνωστών ενώσεων μπορεί να αναλυθεί με αυτή την τεχνική. Γενικά μια ένωση μπορεί να διαχωριστεί και να αναλυθεί με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας, εφόσον έχει επαρκή πτητικότητα, θερμική σταθερότητα και μοριακό βάρος μικρότερο από 1000. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό αερίων, μη ιονισμένων υγρών, στερεών οργανικών μορίων και πολλών οργανομεταλλικών ενώσεων, ενώ δεν μπορεί να διαχωρίσει μακρομόρια, οργανικά και ανόργανα άλατα [34].

Η αέρια χρωματογραφία παρουσιάζει ευαισθησία και εκλεκτικότητα σε πολλές εφαρμογές και μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Μια ουσία μπορεί να αναλυθεί με αυτή την μέθοδο, εφόσον είναι αρκετά πτητική σε θερμοκρασία έως 400°C και παραμένει σε υψηλές θερμοκρασίες σε αέρια κατάσταση χωρίς να διασπάται ή να αντιδρά με άλλες ουσίες. Η δομή και το μοριακό βάρος κάθε ένωσης αποτελούν ενδείξεις για την πτητικότητά της και κατά συνέπεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως ενδείξεις για το αν είναι κατάλληλη η ένωση να αναλυθεί με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας [34].

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιεί είτε υγρή είτε στερεή στατική φάση. Τα προσδιοριζόμενα συστατικά διαχωρίζονται μέσω της διαφορικής τους διανομής μεταξύ των δύο φάσεων. Ο χρόνος παραμονής κάθε συστατικού εξαρτάται από την πτητικότητά του και την ποσότητα αλληλεπίδρασης με την στατική φάση. Η πτητικότητα μπορεί να αυξηθεί και ο χρόνος παραμονής να μειωθεί με θέρμανση της στήλης από 50-300 °C. Ο τελικός διαχωρισμός ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος επηρεάζεται από την στατική φάση της στήλης, τη δομή της ένωσης, την θερμοκρασία του φούρνου και σε ορισμένες

περιπτώσεις από τις διαστάσεις της στήλης και το φέρον αέριο που την διατρέχει [34].

### 3.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Τα τελευταία 25 χρόνια η βιβλιογραφία σχετικά με την αέρια χρωματογραφία παρουσιάζει τεράστια αύξηση και είναι αρκετά δύσκολο να αναφέρουμε όλες τις εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας που εκτείνονται σε πολλούς επιστημονικούς τομείς. Οι σημαντικότερες εφαρμογές της είναι οι ακόλουθες :

- Τα αέρια (από τα καυσαέρια των αυτοκινήτων) που μολύνουν τον ατμοσφαιρικό αέρα αναλύονται επιτυχώς με την αέρια χρωματογραφία. Αυτή η ανάλυση έχει βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση των διεργασιών καύσης και στην βελτίωση του συστήματος παροχής καυσίμων των αυτοκινήτων.
- Τα τελευταία χρόνια γίνονται μεγάλες προσπάθειες για την παρασκευή αερίων καυσίμων από τα απόβλητα και άλλες άχρηστες ουσίες. Η ανάλυση των προϊόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί με την αέρια χρωματογραφία.
- Σε περιπτώσεις πολύπλοκων δειγμάτων ο διαχωρισμός των ουσιών που απαιτείται, πριν από την εφαρμογή άλλων τεχνικών, γίνεται με την αέρια χρωματογραφία.
- Πολύ σημαντικές είναι και οι βιοιατρικές εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας, μια και χρησιμοποιείται για την ποιοτική και την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ουσιών.
- Τέλος τεράστια είναι η συμβολή της αέριας χρωματογραφίας στην ανάλυση χημικών ουσιών. Έτσι χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό εκατοντάδων υδρογονανθράκων στην βενζίνη, για την ανάλυση παραφινικών και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) καθώς και για την ανάλυση ιχνών εντομοκτόνων σε φρούτα και λαχανικά [35].

### 3.3 ΘΕΩΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

#### 3.3.1 ΧΡΟΝΟΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ

Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να διατρέξει όλο το μήκος της χρωματογραφικής στήλης ονομάζεται χρόνος συγκράτησης (retention time) και δίνεται από την σχέση:  $t_R = L/u \cdot (1+k') = t_M \cdot (1+k')$ , όπου  $k'$  είναι ο παράγοντας χωρητικότητας και  $t_M$  ο χρόνος που χρειάζεται ένα μόριο της κινητής φάσης για να διατρέξει όλο το μήκος της στήλης. Στην αέρια χρωματογραφία ένα μικρό ποσό αέρα εισάγεται στην στήλη μαζί με το δείγμα. Ο αέρας διέρχεται από τη στήλη με την ίδια ταχύτητα με την οποία διέρχεται και το φέρον αέριο (κινητή φάση), γιατί το άζωτο και το οξυγόνο του αέρα δεν προσροφούνται από τις περισσότερες ακίνητες φάσεις. Επομένως  $t_M$  είναι ο χρόνος που χρειάζεται ο αέρας για να διατρέξει το μήκος της στήλης [35].

### 3.3.2 ΟΓΚΟΣ ΣΥΓΚΡΑΤΗΣΗΣ

Πολλές φορές είναι πιο βολικό να μετρήσουμε τον όγκο της κινητής φάσης που χρειάζεται για την πλήρη έκλουση των συστατικών του δείγματος. Αν η ογκομετρική ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ( $F$ ) είναι σταθερή τότε ο όγκος συγκράτησης  $V_R$  δίνεται από την σχέση :  $V_R = t_R * F$  [35].

### 3.3.3 ΙΔΑΝΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Στην ιδανική χρωματογραφία οι ζώνες των συστατικών που ονομάζονται επίσης και κορυφές έκλουσης (peaks) δεν παρουσιάζουν τάση διεύρυνσης και επομένως η κατανομή κάθε συστατικού με τον χρόνο ή τον όγκο στην έξοδο είναι ίδια με την κατανομή στην είσοδο. Επειδή η κατανομή εισόδου είναι συνήθως μια οξεία συμμετρική κορυφή, στο ιδανικό χρωματογράφημα θα εμφανίζονται οξείες συμμετρικές κορυφές που είναι διαχωρισμένες μεταξύ τους, ακόμα και αν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά [35].

### 3.3.4 ΜΗ ΙΔΑΝΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Στην πραγματικότητα η χρωματογραφία δεν είναι ποτέ ιδανική και οι ζώνες των συστατικών, οι οποίες στην είσοδο της στήλης είναι οξείες, διευρύνονται καθώς διέρχονται μέσα από την στήλη. Η διεύρυνση των κορυφών έκλουσης έχει σημαντικές συνέπειες στην χρωματογραφία. Έτσι γειτονικές κορυφές έκλουσης που αντιστοιχούν σε ουσίες με παραπλήσιες τιμές του  $K$  δεν διαχωρίζονται τέλεια γιατί αλληλεπικαλύπτονται. Ο μηχανισμός της διεύρυνσης των κορυφών έκλουσης έχει μελετηθεί από δύο θεωρίες : τη θεωρία των πλακών και τη θεωρία της ταχύτητας [35].

### 3.3.5 ΘΕΩΡΙΑ ΤΩΝ ΠΛΑΚΩΝ

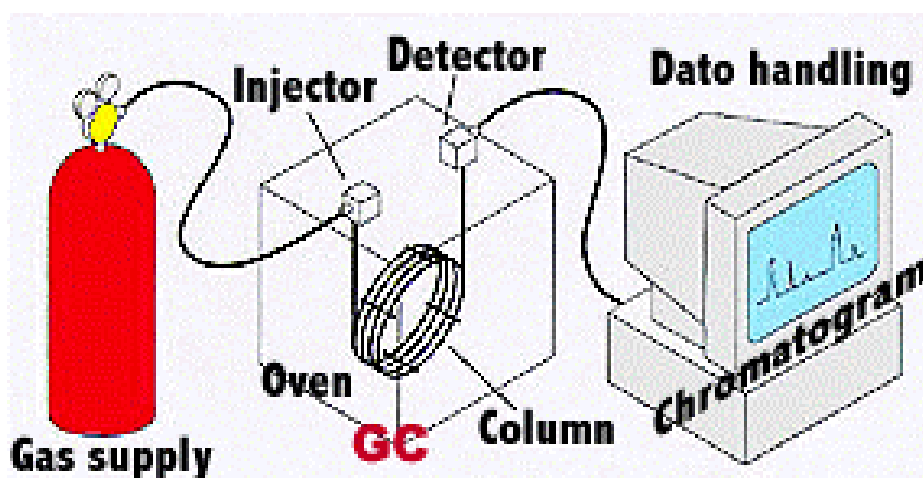
Η θεωρία των πλακών βασίζεται στην ομοιότητα που υπάρχει στις διεργασίες μιας χρωματογραφικής στήλης και μιας στήλης κλασματικής απόσταξης. Υποθέτουμε ότι μια χρωματογραφική στήλη αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό παρόμοιων τμημάτων ή θεωρητικών πλακών, σε καθένα από τα οποία υπάρχει ισορροπία. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών  $n$  μιας στήλης προσδιορίζεται από το χρωματογράφημα, σύμφωνα με την σχέση :  $n = (4t_R / W)^2$ . Το πλάτος της κορυφής  $W$  μετριέται μεταξύ των τομών των εφαπτομένων με την γραμμή βάσης. Επειδή το  $n$  είναι αδιάστατο, τα  $t_R$  και  $W$  πρέπει να μετρηθούν στις ίδιες μονάδες. Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών μιας στήλης είναι συνάρτηση του τρόπου πλήρωσης, της φύσης της ουσίας, της ταχύτητας ροής, της θερμοκρασίας, της μεθόδου εισαγωγής του δείγματος και άλλων μεταβλητών. Επομένως το  $n$  είναι μόνο ένας προσεγγιστικός αριθμός χρήσιμος για συγκριτικούς σκοπούς, που περιγράφει την απόδοση μιας στήλης (column efficiency). Για έναν ορισμένο χρόνο συγκράτησης, όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή του  $n$ , τόσο πιο στενές είναι οι κορυφές έκλουσης και τόσο πιο πολύ προσεγγίζουμε την ιδανική συμπεριφορά [35].

### 3.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ

Η συσκευή ενός αέριου-χρωματογράφου φαίνεται στην Εικόνα 10. Το φέρον αέριο περιέχεται σε χαλύβδινους κυλίνδρους με μεγάλη πίεση και παρέχεται στην συσκευή με έναν ή περισσότερους ρυθμιστές πίεσης, που ρυθμίζουν την ταχύτητα ροής. Το δείγμα εισάγεται σε ένα θερμαινόμενο θάλαμο είτε με μια σύριγγα που τρυπάει ένα λεπτό ελαστικό δίσκο, αν είναι υγρό, είτε με μια ειδική βαλβίδα, αν είναι αέριο. Το φέρον αέριο μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος μέσα στην στήλη όπου διαχωρίζονται το ένα μετά το άλλο και διέρχονται από τον ανιχνευτή, που στέλνει ένα σήμα στον καταγραφέα [Α].

Η στήλη, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος και ο ανιχνευτής βρίσκονται μέσα σε ένα θερμοστατούμενο φούρνο, αν και τα δύο τελευταία μπορούν να θερμανθούν ξεχωριστά. Υπάρχουν αναρίθμητες τροποποιήσεις κάθε βασικού χαρακτηριστικού του αέριου χρωματογράφου και ένα πλήθος από όργανα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο σε μια μεγάλη περιοχή τιμών, ανάλογα με τις ειδικές εφαρμογές τους [Α].

Τα βασικά μέρη του αέριου χρωματογράφου είναι : το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, μια στήλη και ένας ανιχνευτής. Το είδος της στήλης και του υλικού πλήρωσης που θα χρησιμοποιηθούν καθώς και η θερμοκρασία που θα επιλέξουμε, εξαρτώνται από τα δείγματα που επιθυμούμε να αναλύσουμε. Το φέρον αέριο (που αποτελεί την κινητή φάση της αέριας χρωματογραφίας) διέρχεται από τη στήλη διαχωρισμού με σταθερή ροή. Μια μικρή ποσότητα του δείγματος εισάγεται, μέσω του συστήματος εισαγωγής, στο ρεύμα του φέροντος αερίου πριν από τη στήλη διαχωρισμού. Το δείγμα (είτε είναι αέριο είτε είναι υγρό) εξατμίζεται αμέσως λόγω της υψηλής θερμοκρασίας και οι ατμοί αναμειγνύονται με το φέρον αέριο και προωθούνται μέσω της στήλης. Το φέρον αέριο μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος στην στήλη, όπου και πραγματοποιείται ο διαχωρισμός. Η στήλη επικαλύπτεται εσωτερικά από στατική φάση (αποτελείται από πορώδες μέσο) και τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται ανάμεσα σε αυτή και την κινητή φάση (φέρον αέριο). Αυτή η διαδικασία καθορίζει την λειτουργία του αέριου χρωματογράφου [Α,35].



*Εικόνα 11: Βασικά χαρακτηριστικά ενός αέριου χρωματογράφου*

Η κατανομή των μορίων του δείγματος μεταξύ των δύο φάσεων ελέγχεται από μια σταθερά ισορροπίας, που ονομάζεται συντελεστής κατανομής και

συμβολίζεται με  $K$ . Η ισορροπία είναι δυναμική, δηλαδή τα μόρια της ουσίας θα κινούνται γρήγορα από την μια φάση στην άλλη και αντίστροφα. Οι συγκεντρώσεις της ουσίας στις δύο φάσεις και ο συντελεστής κατανομής θα συνδέονται μεταξύ τους με το γνωστό νόμο της κατανομής:  $K = C_s / C_M$ , όπου οι δείκτες  $S$  και  $M$  αναφέρονται στην ακίνητη και την κινητή φάση αντίστοιχα. Η κατανομή που πραγματοποιείται ανάμεσα στις δύο φάσεις έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της ταχύτητας με την οποία κάθε συστατικό διασχίζει την στήλη [35].

Έτσι όλα τα συστατικά του δείγματος ξεκινούν την ίδια χρονική στιγμή από την ίδια θέση της στήλης, αλλά καθένα από αυτά κινείται με διαφορετική ταχύτητα λόγω του διαφορετικού συντελεστή κατανομής. Μετά από ορισμένο χρόνο, τα συστατικά του δείγματος βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις της χρωματογραφικής στήλης και έτσι διαχωρίζονται μεταξύ τους. Τα συστατικά που έχουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια με την στατική φάση συγκρατούνται από αυτή και εξέρχονται από την στήλη σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Αντιθέτως τα συστατικά που έχουν μικρότερη χημική συγγένεια με την στατική φάση, εξέρχονται από την στήλη σε σύντομο χρονικό διάστημα. Σε μια σταθερή θέση της χρωματογραφικής στήλης, στην έξοδο της, τα διάφορα συστατικά του δείγματος εμφανίζονται σε διαφορετικούς χρόνους και ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές παράγουν ένα ηλεκτρικό σήμα, ανάλογο της ποσότητας που εξέρχεται, το οποίο καταγράφεται. Τελικά τα συστατικά διαχωρίζονται μεταξύ τους [35].

Η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή έναντι του χρόνου ονομάζεται χρωματογράφημα. Σε αυτό το γράφημα κάθε κορυφή έκλουσης (peak) σε μια οριζόντια βασική γραμμή αντιστοιχεί σε ένα συστατικό του δείγματος. Σε πολλές περιπτώσεις υπάρχουν και ανεπιθύμητες κορυφές που είναι «ακαθαρσίες» ή «ξένες ουσίες» που έχουν εντοπιστεί [35].

Ο χρόνος που εμφανίζεται κάθε κορυφή είναι χαρακτηριστικός για τις ουσίες του δείγματος, εφόσον οι συνθήκες της ανάλυσης παραμένουν σταθερές. Σε αυτό το γεγονός στηρίζεται η ταυτοποίηση κάθε ένωσης που εξετάζουμε. Συγκρίνοντας το χρόνο έκλουσης των προσδιοριζόμενων ουσιών με το χρόνο έκλουσης γνωστών ενώσεων πετυχαίνουμε την ποιοτική ανάλυση των συστατικών. Το εμβαδόν της περιοχής που καλύπτει η κορυφή είναι συνήθως ανάλογο με την ποσότητα του συστατικού του δείγματος που διέρχεται από τον ανιχνευτή και μετατρέπεται σε συγκέντρωση της ένωσης που περιέχεται στο δείγμα. Έτσι πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση κάθε ένωσης. Τα δεδομένα για ποσοτική και ποιοτική ανάλυση προέρχονται από την θέση των κορυφών έκλουσης και την περιοχή που περικλείουν. Η βάση γραμμής καταγράφεται ως μια ευθεία οριζόντια γραμμή, όταν η στήλη διαρρέεται μόνο από το φέρον αέριο [A,35].

### 3.5 ΦΕΡΟΝ ΑΕΡΙΟ

Το φέρον αέριο αποτελεί την κινητή φάση της αέριας χρωματογραφίας και μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος μέσα στην στήλη, όπου και γίνεται ο διαχωρισμός. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αέριο υψηλής καθαρότητας, έτσι ώστε το σήμα του ανιχνευτή να μην έχει μεγάλο θόρυβο. Επίσης πρέπει να είναι και χημικά αδρανές, ώστε να μην αλληλεπιδρά με τα συστατικά του δείγματος. Επιπρόσθετα δεν πρέπει να είναι τοξικό ή εύφλεκτο για να αποφευχθούν τα οποιαδήποτε προβλήματα σε περίπτωση διαρροής. Τα αέρια που χρησιμοποιούνται συνήθως για αυτό το σκοπό είναι : το υδρογόνο ( $H_2$ ), το ήλιο ( $He$ ), το άζωτο ( $N_2$ ) και το αργό ( $Ar$ ). Τα αέρια αυτά είναι σχετικώς φθηνά, υπάρχουν στο εμπόριο και δεν είναι επικίνδυνα, εκτός από το  $H_2$  που είναι εύφλεκτο και απαιτεί ειδικές προφυλάξεις, μια και υπάρχει η πιθανότητα να αναμειχθεί με το δείγμα και να σχηματιστούν υδρογονωμένα συστατικά, τα οποία δίνουν επιπλέον κορυφές έκλουσης. Επίσης, επειδή τα αέρια αυτά είναι χημικά αδρανή, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του δείγματος και των μορίων του φέροντος αερίου μπορούν να αγνοηθούν (εκτός αν η πίεση είναι μεγάλη). Έτσι ο συντελεστής κατανομής ενός συστατικού προσδιορίζεται αποκλειστικά από την πτητικότητα του στην ακίνητη φάση [B].

Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται από τον τύπο της στήλης και του ανιχνευτή (πρέπει να ανιχνεύει τα συστατικά που βρίσκονται στο φέρον αέριο σε πολύ μεγάλη αραίωση) καθώς και από την κατάσταση καθαρότητας στην οποία βρίσκεται. Τα χαρακτηριστικά του ανιχνευτή είναι δυνατόν να ευνοούν μερικά αέρια έναντι άλλων. Έτσι για ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας προτιμάται η χρήση  $H_2$  ή  $He$  λόγω της υψηλότερης θερμικής αγωγιμότητας τους που αυξάνει την ευαισθησία. Το  $H_2$  και το  $He$  έχουν τους μικρότερους συντελεστές διάχυσης και εμφανίζουν καλύτερη απόδοση διαχωρισμού σε σχέση με αέρια υψηλότερου μοριακού βάρους ( $N_2, CO_2$ ) [B].

Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται το ήλιο ( $He$ ) ως φέρον αέριο. Η καθαρότητα του φέροντος αερίου είναι πάρα πολύ σημαντική, μια και ίχνη ακαθαρσιών μπορεί να προκαλέσουν θόρυβο στο σήμα του ανιχνευτή. Η χρήση φέροντος αερίου με δίοδο μέσα από μια παγίδα με ζεόλιθο υπό ψύξη (molecular sieve) είναι πολύ αποτελεσματική, μια και συντελεί στην αφαίρεση κάθε ίχνους υγρασίας που υπάρχει σε αρκετά μεγάλο ποσοστό στα αέρια του εμπορίου. Τέλος ο τύπος του φέροντος αερίου και η ταχύτητα ροής του επηρεάζουν το χρόνο κατακράτησης και την διακριτική ικανότητα του χρωματογραφήματος [A,B].

#### 3.5.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΡΟΗΣ ΦΕΡΟΝΤΟΣ ΑΕΡΙΟΥ

Το φέρον αέριο βρίσκεται μέσα σε φιάλη που είναι εφοδιασμένη με ρυθμιστή πίεσης. Έτσι επιτυγχάνεται η διέλευση του αερίου μέσα από την στήλη με σταθερή ροή. Σε περιπτώσεις που έχουμε υψηλούς ρυθμούς εισαγωγής του φέροντος αερίου, το ποσοστό εισαγωγής του δείγματος πραγματοποιείται με αργούς ρυθμούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απόδοσης και καθιστά απαραίτητη τη χρήση στήλης μεγαλύτερης διαμέτρου. Όταν το ποσοστό του δείγματος που εισάγεται είναι μικρό, η μεταφορά του στη στήλη είναι πολύ γρήγορη. Έτσι έχουμε αύξηση της απόδοσης, αλλά ταυτόχρονα

δεν επιτυγχάνεται η εξάτμιση των όλων των συστατικών του δείγματος. Η αξιοπιστία και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων σχετίζεται άμεσα με την διατήρηση της ροής του φέροντος αερίου σε σταθερό ρυθμό. Για την επίτευξη σταθερής ροής χρησιμοποιείται ένας ελεγκτής πίεσης ή ένας ελεγκτής ροής που διασφαλίζουν σταθερή ροή, ανεξάρτητα από τις μεταβολές του προγράμματος της θερμοκρασίας [B].

- Ο ελεγκτής ροής διατηρεί σταθερό το ρυθμό του φέροντος αερίου, μέσω του ανοίγματος από διαφορικές πιέσεις. Η μεμβράνη μετακινείται προς τα πάνω μέσω ενός ελατηρίου και προς τα κάτω μέσω δύο ασκούμενων πιέσεων. Κάθε μεταβολή της πίεσης εξόδου προκαλεί ανισορροπία στη μεμβράνη, με αποτέλεσμα την μετακίνηση της βελόνας που σταθεροποιεί την ροή. Η ροή μέσα στην στήλη οφείλεται στη διαφορά πίεσης ανάμεσα στην είσοδο και την έξοδο της στήλης. Οι ρυθμιστές πίεσης διατηρούν την πίεση  $P_1$  σταθερή (μεταξύ 10 και 50psig), ενώ η πίεση στην έξοδο  $P_4$  είναι η ατμοσφαιρική, αν και μπορεί να αυξηθεί περιορίζοντας την διάμετρο της οπής εξόδου. Σε μερικά όργανα οι ρυθμιστές της ροής μεταβάλλουν αυτόματα την πίεση εισόδου για να διατηρήσουν μια σταθερή ταχύτητα ροής, αλλά στα περισσότερα όργανα υποτίθεται ότι μια σταθερή πίεση εισόδου είναι επαρκής [B].
- Ο ελεγκτής πίεσης διατηρεί σταθερή την πτώση πίεσης στο άνοιγμα, ρυθμίζοντας την ροή του φέροντος αερίου. Η επιθυμητή πίεση επιλέγεται με την προσαρμογή μιας βίδας που μεταβάλλει την τάση στη μεμβράνη και με αυτό τον τρόπο αλλάζει η ροή του φέροντος αερίου [B].

### 3.6 ΦΟΥΡΝΟΣ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ

Ο φούρνος περιλαμβάνει το θάλαμο εισαγωγής του δείγματος, την στήλη και τον ανιχνευτή. Η θερμοκρασία του φούρνου (θερμοκρασία της στήλης) διατηρείται σε υψηλά επίπεδα (50-350°C). Η θερμοκρασία της στήλης ελέγχεται από τον φούρνο με κυκλοφορία αέρα γύρω από τον θερμαντήρα και διασκορπισμό του από έναν ανεμιστήρα. Ακόμα και μικρές διακυμάνσεις της θερμοκρασίας μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της απόδοσης και σε παραμόρφωση των κορυφών έκλουσης. Η ομοιομορφία της θερμοκρασίας μέσα στον φούρνο εξαρτάται από την γεωμετρία του φούρνου, τους αισθητήρες και από την ανάμειξη και κυκλοφορία του αέρα. Ο διαχωρισμός των κορυφών οφείλεται στις τριχοειδείς στήλες, λόγω των λεπτών τοιχωμάτων που μεταφέρουν την διακύμανση των θερμοκρασιών στη στήλη [34].

Η επιλογή της περιοχής των θερμοκρασιών όπου θα γίνουν οι αναλύσεις των ουσιών εξαρτάται από τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά τους. Έτσι σε υψηλότερες θερμοκρασίες τα συστατικά του δείγματος εκκλούνται ταχύτερα σε σχέση με το διαχωρισμό τους, ενώ σε χαμηλότερες τα συστατικά παραμένουν για μικρό χρονικό διάστημα στην αέρια φάση, με συνέπεια η έκλουση να διαρκεί περισσότερο χρόνο και να οδηγεί σε καλύτερο διαχωρισμό [30].



### 3.6.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΦΟΥΡΝΟΥ

Η σωστή ρύθμιση της θερμοκρασίας του φούρνου έχει ιδιαίτερη σημασία για την ύπαρξη αποτελεσμάτων μεγάλης ακρίβειας και αξιοπιστίας. Υπάρχουν δύο ειδών αναλύσεις : η ισοθερμική και η προγραμματισμένη ανάλυση, με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των δειγμάτων που αναλύονται [B].

- **Ισοθερμική Ανάλυση :** Κατά την διάρκεια αυτής της ανάλυσης η θερμοκρασία του φούρνου παραμένει σταθερή. Η ανάλυση αυτή είναι απαραίτητη για δείγματα με σημείο βρασμού περιορισμένου εύρους. Ο χρόνος απόκρισης των ενώσεων στο χρωματογράφημα επηρεάζεται άμεσα από την μεταβολή της θερμοκρασίας του φούρνου. Έτσι η ύπαρξη υψηλότερων ή χαμηλότερων θερμοκρασιών από την κατάλληλη θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση γρήγορων ή πιο αργών χρόνων απόκρισης. Το ίδιο παρατηρείται και με το ύψος των κορυφών έκλουσης (αυξάνεται ή μειώνεται) καθώς και με τον διαχωρισμό των κορυφών [B].
- **Προγραμματισμένη Ανάλυση :** Η θερμοκρασία του φούρνου διαμορφώνεται με βάση το πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου, όπου η θερμοκρασία ξεκινά από μια χαμηλή τιμή και αυξάνεται σταδιακά. Αρχικά το πρόγραμμα έχει μια ισόθερμη περιοχή θερμοκρασίας, στην οποία ο αέριος-χρωματογράφος είναι έτοιμος για την εισαγωγή του δείγματος [B].

Στη συνέχεια πραγματοποιούνται διαδοχικές θερμοκρασιακές αυξήσεις, μια τελική ισοθερμική περίοδος και μια αυτόματη μείωση της θερμοκρασίας. Έτσι τελικά έχουμε επαναφορά στις αρχικές συνθήκες και εισαγωγή του νέου δείγματος [B].

Η Προγραμματισμένη ανάλυση επιλέγεται για ανάλυση δειγμάτων, τα οποία περιέχουν πολλά συστατικά με σημεία βρασμού μεγάλου εύρους. Πολύ μεγάλη σημασία έχει η επιλογή του προγράμματος θερμοκρασίας λειτουργίας της στήλης, μια και καθορίζει την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού καθώς και τον χρόνο ανάλυσης [B].

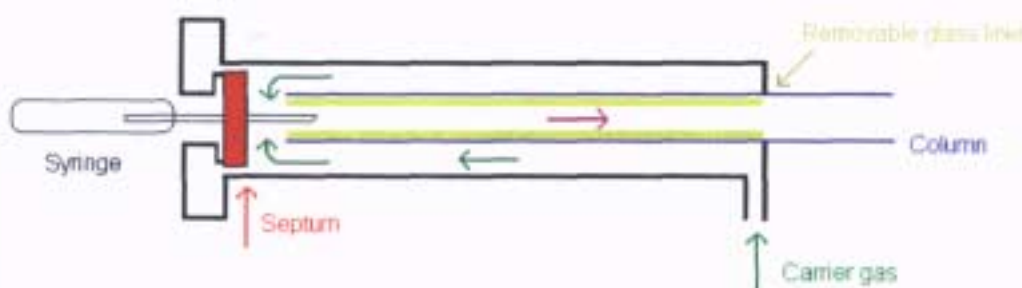
Η θερμοκρασία φούρνου αυξάνεται σταδιακά, έτσι ώστε να διαχωριστεί κάθε ένωση σε χρόνο έκλουσης που αντιστοιχεί στην ιδανική θερμοκρασία της. Η αρχική θερμοκρασία ρυθμίζεται έτσι ώστε να μπορούν να διαχωριστούν οι ενώσεις με χαμηλό σημείο βρασμού, ενώ η τελική θερμοκρασία, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει τη μέγιστη επιτρεπτή θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης, ρυθμίζεται έτσι ώστε η τελευταία κορυφή έκλουσης (με το υψηλότερο σημείο βρασμού) να είναι αρκετά ευδιάκριτη. Αυτό το πρόγραμμα θερμοκρασίας επιτρέπει το διαχωρισμό των δειγμάτων που περιέχουν συστατικά με υψηλή και χαμηλή πτητικότητα. Ένα βασικό μειονέκτημα αυτού του προγράμματος είναι η πορεία της γραμμής βάσης (οι διακυμάνσεις του σταθερού σήματος που παρατηρείται κατά την ανίχνευση της κινητής φάσης) και ο θόρυβος (διακυμάνσεις στο σήμα) λόγω απώλειας στατικής φάσης από το φέρον αέριο σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες [35].

### 3.7 ΘΑΛΑΜΟΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Στην αέρια χρωματογραφία, όπως και στα άλλα είδη χρωματογραφίας, η εισαγωγή του δείγματος πρέπει να γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα και στο μικρότερο δυνατό όγκο. Ο θάλαμος του δείγματος πρέπει να θερμαίνεται για την γρήγορη εξαέρωση των υγρών δειγμάτων και να έχει τέτοια μορφή ώστε το φέρον αέριο να μεταφέρει το δείγμα στη στήλη. Αυτές οι προϋποθέσεις είναι απαραίτητες για την ύπαρξη σωστών αποτελεσμάτων. Σε μερικά όργανα το δείγμα εισάγεται αμέσως στην είσοδο της στήλης (on-column injection), εκτός αν το σημείο βρασμού είναι πολύ υψηλό [35].

Η ποσότητα του δείγματος που εισάγεται, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, από τους οποίους οι πιο σημαντικοί είναι οι ακόλουθοι : η αρχική συγκέντρωση, η χωρητικότητα της στήλης, η ευαισθησία του ανιχνευτή. Στις περισσότερες περιπτώσεις ένας χρωματογράφος χρησιμοποιεί υγρά δείγματα από 0.1-10  $\mu\text{l}$  και αέρια δείγματα από 1-10  $\mu\text{l}$ . Η τριχοειδής στήλη χρειάζεται πολύ μικρότερα δείγματα της τάξης των  $10^{-3}$  ως  $10^{-2}$   $\mu\text{l}$ . Για την εισαγωγή τόσο πολύ μικρών δειγμάτων στη στήλη, χρησιμοποιείται μια ειδική τεχνική διαχωρισμού, κατά την οποία μόνο ένα μικρό κλάσμα του εισαγόμενου δείγματος χρησιμοποιείται, ενώ το υπόλοιπο οδηγείται στην ατμόσφαιρα. Ακριβείς μετρήσεις των δειγμάτων αυτού του μεγέθους είναι αμφισβητήσιμες και πιθανόν τα μεγαλύτερα σφάλματα στην ποσοτική ανάλυση να οφείλονται σε αυτόν τον λόγο [35].

Από τον θάλαμο εισαγωγής του δείγματος πραγματοποιείται η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με τέτοιο τρόπο ώστε να καταλαμβάνει το μικρότερο δυνατό πλάτος σε αυτήν. Για την επίτευξη καλοσχηματισμένων κορυφών στο χρωματογράφημα, απαιτείται η εισαγωγή του μικρότερου δυνατού όγκου δείγματος, όσο το δυνατόν πιο γρήγορα στον εισαγωγέα. Το εσωτερικό του θερμαινόμενου μεταλλικού εισαγωγέα περιέχει ένα γυάλινο κυλινδρικό τμήμα, έτσι ώστε να να περιοριστούν οι αλληλεπιδράσεις των συστατικών του δείγματος με τα μεταλλικά μέρη. Το φέρον αέριο εισάγεται στον εισαγωγέα από το πάνω μέρος του και μέσω κατάλληλης σύριγγας, η οποία διατρύπτει το ελαστικό πώμα, εισάγεται και το δείγμα στον ίδιο χώρο. Στους περισσότερους εισαγωγείς υπάρχει μια οδός καθαρισμού του πώματος (οδός septum), από την οποία διέρχεται συνεχώς φέρον αέριο με μικρή ταχύτητα. Έτσι επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των μη πτητικών συστατικών που μπορεί να παραμένουν στον εισαγωγέα και να τον μολύνουν [35].

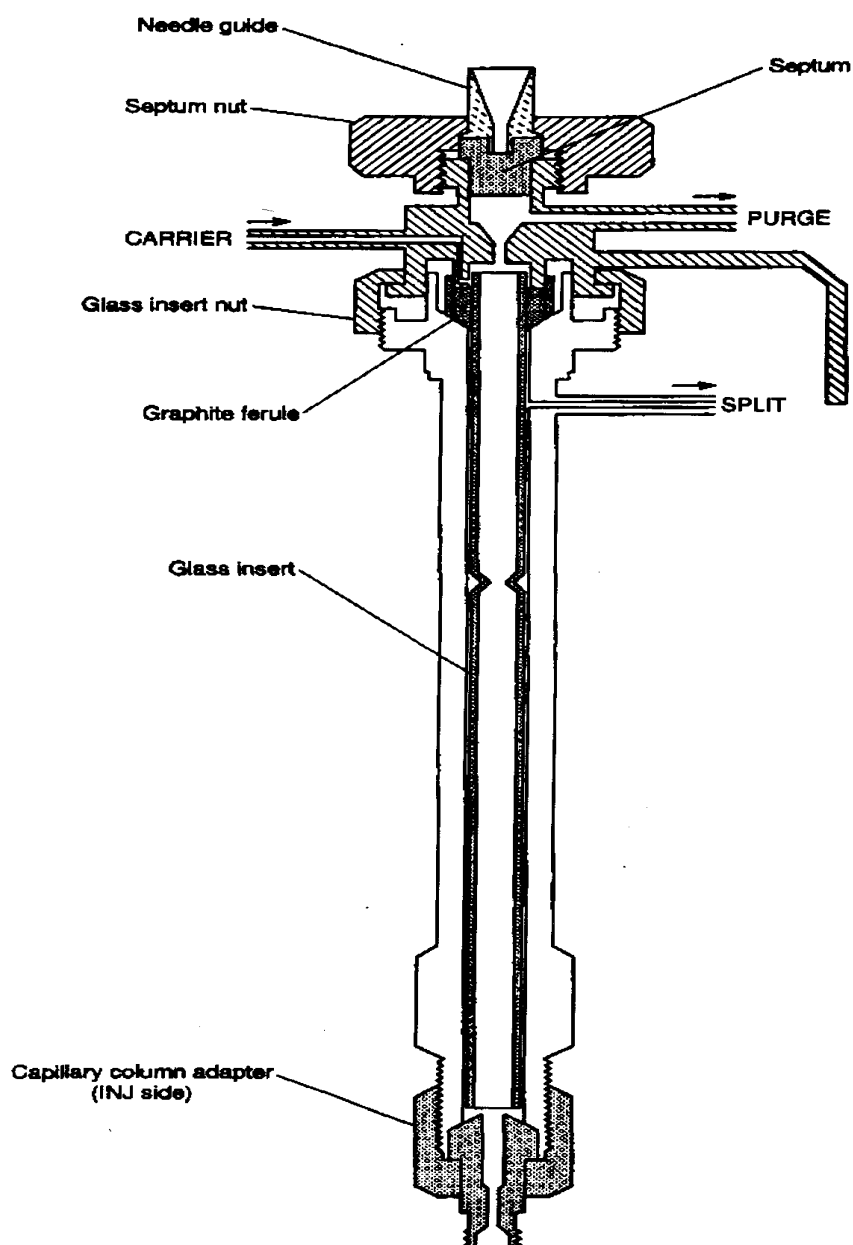


Εικόνα 12: Τυπικός εισαγωγέας δείγματος σε συστήματα αέριας χρωματογραφίας

Στις εργαστηριακές αναλύσεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος : GC-17A. Για αυτό τον τύπο αέριου χρωματογράφου υπάρχουν 6 διαθέσιμα συστήματα εισαγωγής : ο εισαγωγέας διαχωρισμού (Split Injection System), ο εισαγωγέας χωρίς διαχωρισμό (Splitless Injection System), ο εισαγωγέας άμεσης εισαγωγής (Direct Injection System), το σύστημα εισαγωγέα πεπληρωμένης στήλης (Packed Column Injection System), ο εισαγωγέας απευθείας έγχυσης δείγματος στην είσοδο της στήλης (On-Column Injection System), ο εισαγωγέας εξάτμισης με προγραμματισμένη θερμοκρασία (Programmed Temperature Vaporizer Injection System). Στις εργαστηριακές αναλύσεις χρησιμοποιούνται συνήθως ο εισαγωγέας διαχωρισμού και ο εισαγωγέας χωρίς διαχωρισμό [31].

- Εισαγωγέας Διαχωρισμού : Είναι μια τεχνική κατάλληλη για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων πτητικών ενώσεων, παρουσία μεγάλων ποσοτήτων μη πτητικών ουσιών. Αυτό το είδος του εισαγωγέα χρησιμοποιείται για την εισαγωγή πολύ μικρών δειγμάτων στην στήλη και είναι κατάλληλο για δείγματα με λίγα συστατικά. Η εξάτμιση του δείγματος δημιουργεί μια πίεση και αλλάζει το ιξώδες του μείγματος : φέρον αέριο-δείγμα με αποτέλεσμα να στέλνει μεγαλύτερη αναλογία των πολύ πτητικών συστατικών στην στήλη. Αυτό είναι το σημαντικότερο πρόβλημα που δημιουργεί αυτός ο διαχωρισμός. Επίσης δεν επιτυγχάνονται ακριβείς μετρήσεις των δειγμάτων αυτού του μεγέθους και για αυτό προτιμάται η χρήση αυτού του εισαγωγέα για ποιοτική ανάλυση και όχι τόσο για ποσοτική [B].
- Εισαγωγέας Χωρίς Διαχωρισμό :Αυτός ο εισαγωγέας είναι κατάλληλος για ιχνοανάλυση στοιχείων και αποφεύγεται η χρήση του για δείγματα υψηλών συγκεντρώσεων. Βασικό χαρακτηριστικό του είναι η υψηλή ευαισθησία και η αποδεκτή επαναληψιμότητά του. Παρά το γεγονός αυτό, η ακρίβεια των χρόνων έκλουσης είναι μικρότερη από ότι με τον εισαγωγέα διαχωρισμού και η βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες [B].

Στις περισσότερες αναλύσεις έχουμε συνδυασμό των δύο εισαγωγέων (Εικόνα 13). Στο κάτω μέρος του εισαγωγέα υπάρχει βαλβίδα, η οποία επιτρέπει την εκλεκτική διέλευση αερίου από την οδό διαχωρισμού (split). Κατά την εισαγωγή του δείγματος και για ένα μικρό χρονικό διάστημα η βαλβίδα παραμένει κλειστή με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται η διέλευση αερίου από την οδό διαχωρισμού, ενώ η στήλη διατηρείται κατά 10-30°C λιγότερο από το σημείο βρασμού του διαλύτη. Έτσι όλη η ποσότητα του δείγματος που εισάγεται, αναμειγνύεται με το φέρον αέριο και μεταφέρεται στην στήλη με πολύ μικρή ταχύτητα ροής (τόση είναι και η ταχύτητα μέσα στη στήλη). Μετά από την πάροδο ορισμένου χρονικού διαστήματος ( το οποίο και καθορίζουμε) η βαλβίδα ανοίγει (purge on) και ένα μέρος του φέροντος αερίου χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του διαφράγματος. Στην συνέχεια ο εισαγωγέας συμπεριφέρεται ως εισαγωγέας διαχωρισμού [B].



**Εικόνα 13: Θάλαμος εισαγωγής δείγματος με ή /και χωρίς διαχωρισμό (Split/Splitless)**

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει ιδιαίτερη εξάπλωση η χρήση συστημάτων αυτόματης εισαγωγής μεγάλου αριθμού δειγμάτων στην στήλη. Έτσι ελέγχονται και ρυθμίζονται με μεγάλη ακρίβεια η ποσότητα και η ταχύτητα εισαγωγής του δείγματος, με στόχο την εξάλειψη κάθε μορφής σφαλμάτων [30].

### 3.8 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ

Στα πρώτα χρόνια της δεκαετίας του 1980 χρησιμοποιούνταν κυρίως πεπληρωμένες γυάλινες ή μεταλλικές σωληνοειδείς στήλες για τις αναλύσεις διαφόρων ενώσεων σε αέριο χρωματογράφο. Αργότερα εμφανίστηκαν οι σωληνοειδείς στήλες που ήταν επικαλυμμένες με διοξείδιο του πυριτίου και εξαπλώθηκε η χρήση τους λόγω της υψηλής απόδοσής τους. Σήμερα κάποια συστήματα αέριας χρωματογραφίας είναι συμβατά με πεπληρωμένες στήλες και άλλα με τριχοειδείς στήλες [35].

- Οι πεπληρωμένες στήλες αποτελούνται από το υλικό σωλήνωσης της στήλης, το υλικό πλήρωσης ή υπόστρωμα και την υγρή στατική φάση. Έχουν εσωτερική διάμετρο 2-3 mm και μήκος 1-20 m. Κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα ή γυαλί [Α].

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτών των στηλών είναι τα εξής : έχουν μεγάλο χρόνο ζωής, είναι εύχρηστες, είναι κατάλληλες για δύσκολους διαχωρισμούς, παρουσιάζουν μεγάλη χωρητικότητα και κατασκευάζονται σχετικά εύκολα. Αντιθέτως δεν συνιστώνται για ιχνοαναλύσεις παρά μόνο για δείγματα μεγάλων όγκων [Α].

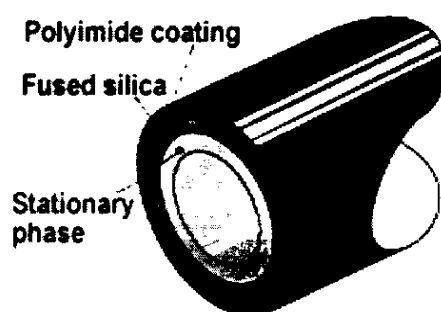
- Οι τριχοειδείς στήλες έχουν μικρότερη πτώση πίεσης συγκριτικά με τις πεπληρωμένες και επομένως μπορούν να κατασκευαστούν με μεγαλύτερο μήκος (15-60m). Η εσωτερική διάμετρος τους έχει τιμές 0.2-1.2 mm και το μήκος τους είναι συνήθως 10-50 m. Οι στήλες λυγίζονται σε σχήμα U ή W ή σε σπείρες ανάλογα με τον φούρνο. Οι μικρές στήλες κατασκευάζονται συνήθως από γυαλί, ενώ οι μεγαλύτερες κατασκευάζονται από χαλκό, αργίλιο ή από ανοξείδωτο χάλυβα, γιατί διευκολύνει το λύγισμα που μπορεί να γίνει και μετά το γέμισμα της στήλης. Όσο αυξάνει η εσωτερική διάμετρος και το πάχος της στατικής φάσης, τόσο μειώνεται η απόδοση. Οι τριχοειδείς στήλες έχουν καλύτερη διακριτική ικανότητα από τις πεπληρωμένες και χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα για τον διαχωρισμό πολύπλοκων μειγμάτων. Έτσι παρατηρείται μια πολύ μεγάλη εξάπλωση στη χρήση των τριχοειδών στηλών, παρά το γεγονός ότι είναι σχετικά ακριβές [Α].



*Εικόνα 14: Τριχοειδή στήλη επικαλυμμένη με  $\text{SiO}_2$*

Γενικά οι κορυφές που εμφανίζονται σε ένα χρωματογράφημα επηρεάζονται άμεσα από τις διαστάσεις της τριχοειδούς στήλης. Έτσι το μήκος και η διάμετρος της στήλης επηρεάζουν την διακριτική ικανότητά της, το πάχος

επιδρά στον χρόνο κατακράτησης και η στατική φάση επηρεάζει τον διαχωρισμό των κορυφών. Στην Εικόνα 15 απεικονίζεται μια κάθετη διατομή τριχοειδούς στήλης [34].



*Εικόνα 15: Κάθετη τομή τριχοειδούς στήλης*

Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι αποτελείται από 3 στρώματα : το εξωτερικό περίβλημα, το αδρανές υπόστρωμα Οξειδίου του Πυριτίου και τη στατική φάση.

- 1) **Εξωτερικό Περίβλημα (polyimide coating)** : Το εξωτερικό περίβλημα είναι επικαλυμένο με στρώμα πολυιμιδίου, ώστε να επιτυγχάνεται η προστασία του από οποιασδήποτε μορφής θραύσεις και διαβρώσεις. Παράλληλα αυξάνεται η διάρκεια ζωής της στήλης και διατηρείται η ευκαμψία σε θερμοκρασίες μικρότερες από 350 °C. Επιστρώσεις από αλουμίνιο χρησιμοποιούνται όταν έχουμε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, μια και είναι θερμικά σταθερές. Οι επιστρώσεις από πολυιμίδια γεμίζουν τα κενά του οξειδίου του πυριτίου, που εμφανίζονται σε αρκετές περιπτώσεις, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την δημιουργία ελαττωματικών θέσεων. Στήλες που είναι κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα αντέχουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με τις προηγούμενες , έχουν μεγαλύτερη ενεργότητα και αντοχή και κατά συνέπεια κόβονται αρκετά δύσκολα και εγκαθίστανται δύσκολα στο φούρνο του χρωματογράφου. Σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται και στήλες από βοριοπυριτική ύαλο, οι οποίες όμως είναι πολύ εύθραυστες και άκαμπτες [A].
- 2) **Αδρανές Υπόστρωμα Οξειδίου του Πυριτίου( fused silica tubing)** : Είναι ένα συνθετικό γυαλί τύπου quartz, το οποίο περιέχει ίχνη από μεταλλικά οξείδια που είναι απαραίτητα για την ελαχιστοποίηση της δραστηρότητάς του. Σε κανονική λειτουργία πρέπει να αλληλεπιδρά αμελητέα με τα συστατικά του δείγματος. Το μη επεξεργασμένο οξείδιο του πυριτίου είναι πολύ δραστικό, λόγω της παρουσίας silanols ομάδων (Si-O-H), οι οποίες διακρίνονται για την μεγάλη ευχέρεια με την οποία σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με άλλες ενώσεις. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εμφανίζονται στο χρωματογράφημα αλλοιωμένες κορυφές, που έχουν μειωμένο μέγεθος και ουρές λόγω καθυστέρησης στο χρόνο έκλουσης. Επομένως είναι απαραίτητη η απενεργοποίηση του οξειδίου του πυριτίου, έτσι ώστε όλες οι ενεργές ομάδες silanols να μετατραπούν σε μη ενεργές.

Με την πάροδο του χρόνου όμως η στήλη χάνει μέρος της αδράνειας της και αυτή είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία [A].

**3) Στατική Φάση (stationary phase) :** Λέγοντας στατική φάση εννοούμε μόρια πολυμερούς που καλύπτουν εσωτερικά την επιφάνεια της τριχοειδούς στήλης με ένα λεπτό και ομοιογενές στρώμα. Τα μόρια αυτά συγκρατούνται πάνω στο υπόστρωμα με κάποιο τύπο χημικού δεσμού, είναι πολύ ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες και είναι μη ενεργά. Σε ορισμένες περιπτώσεις η στατική φάση είναι μείγμα δύο ή περισσότερων από τα πολυμερή που δημιουργούνται από τους διάφορους υποκαταστάτες του πυριτίου. Ιδιαίτερη σημασία έχει η χημική δομή της στατικής φάσης, γιατί έρχεται σε άμεση επαφή με τα συστατικά του δείγματος και επηρεάζει τον διαχωρισμό τους. Επομένως για την επίτευξη ενός πολύ καλού διαχωρισμού, πρέπει να επιλέγουμε την κατάλληλη στατική φάση [A].

Η στατική φάση των περισσότερων στηλών που υπάρχουν στο εμπόριο είναι στερεής ή υγρής φάσης. Η πολύ μεγάλη πληθώρα υγρών φάσεων (τουλάχιστον 700 υπάρχουν στο εμπόριο) δημιουργεί κάποια προβλήματα στην επιλογή. Παρακάτω αναφέρονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά της στερεής και της υγρής στατικής φάσης [35].

- **Στερεή Στατική Φάση :** Οι στατικές φάσεις πορώδους επιφάνειας (porous layer open tubular, PLOT) είναι στήλες στερεής στατικής φάσης. Η στήλη στερεής φάσης, η οποία πληρώνεται εσωτερικά από πορώδες στερεό με μεγάλη επιφάνεια, είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό αέριων ή πτητικών ενώσεων, μια και επιτυγχάνει μεγάλη συγκράτηση. Η στερεή φάση συγκρατείται στο υπόστρωμα με χημικό δεσμό και ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος πραγματοποιείται μέσω της μερικής και εκλεκτικής προσρόφησης αερίου-στερεού. Γενικά οι μακριές αλυσίδες των μορίων της στατικής φάσης πρέπει να συγκρατούνται τόσο στην επιφάνεια της στήλης όσο και μεταξύ τους με χημικό δεσμό ανάμεσα σε άτομα άνθρακα. Έτσι αυξάνεται το μήκος και η σταθερότητα της στήλης [34].
- **Υγρή Στατική Φάση :** Υπάρχουν τρία είδη υγρής στατικής φάσης, με βάση τους υποκαταστάτες του πυριτίου: η πολική, η μη πολική και η ειδική. Οι πολικές φάσεις περιέχουν διάφορων ειδών πολικές ομάδες όπως είναι τα αλογόνα, τα υδροξύλια, οι εστέρες. Με αυτόν τον τύπο της υγρής φάσης οι πολικές ουσίες του δείγματος αντιδρούν ισχυρά. Οι μη πολικές φάσεις δεν περιέχουν υποκατάστατο υπεύθυνο για αλληλεπίδραση διπόλου ή δεσμούς υδρογόνου. Επομένως οι προσδιοριζόμενες ουσίες διαχωρίζονται με βάση την πτητικότητά τους. Τέλος οι ειδικές φάσεις παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στην παρουσία οξυγόνου, κυρίως σε υψηλές θερμοκρασίες. Η χρήση τους περιορίζεται σε στενά όρια θερμοκρασίας και οποιαδήποτε υπέρβαση αυτών των ορίων μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή τους. Τέλος σε μια στήλη υγρής στατικής φάσης η κατανομή βασίζεται στην διαλυτότητα των ουσιών στην υγρή φάση [34].

### 3.9 ΜΟΛΥΝΣΗ ΑΕΡΙΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που προκαλεί την μείωση της απόδοσης του αέριου χρωματογράφου είναι η μόλυνση του εισαγωγέα δείγματος και της τριχοειδούς στήλης. Η μόλυνση προέρχεται κυρίως από υπολείμματα μη πτητικών ενώσεων που συσσωρεύονται στα τοιχώματα της στήλης. Έτσι προκύπτουν χρωματογραφήματα με μη συμμετρικές κορυφές και έντονες διακυμάνσεις στη γραμμή βάσης [30].

Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με συστηματικό έλεγχο και αντικατάσταση του διαφράγματος (septum) και του σημείου εισόδου-ευθυγράμμισης (glass liner), όποτε χρειαστεί. Επιπλέον η αραίωση των πολύπλοκων δειγμάτων πριν από την ανάλυση, συντελεί στην επίτευξη αποτελεσμάτων μεγάλης ακρίβειας και στην προστασία του αέριου χρωματογράφου [B].

### 3.10 ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

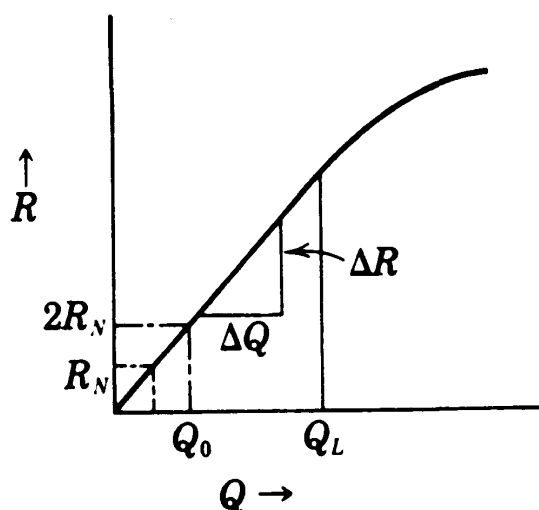
Όλοι οι διαχωρισμοί που γίνονται μέσα στην στήλη πρέπει να ανιχνευτούν και να καταγραφούν. Ο ανιχνευτής ελέγχει την εξαγωγή των συστατικών του δείγματος που αναλύονται, ανιχνεύει και καταγράφει όλους τους διαχωρισμούς που γίνονται μέσα στη στήλη. Ένας ανιχνευτής πρέπει να ανταποκρίνεται αμέσως στις πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και κατά συνέπεια να διακρίνεται από υψηλή ευαισθησία και γρήγορη ταχύτητα απόκρισης. Επιπλέον πρέπει να αγνοεί το μεγάλο ποσό του φέροντος αερίου και να ανιχνεύει και τα μικρότερα ίχνη κάθε συστατικού που περιέχεται στο φέρον αέριο. Οι ουσίες που εκλύονται από την στήλη εισάγονται στον ανιχνευτή και έτσι δημιουργείται ένα ηλεκτρικό σήμα που ονομάζεται απόκριση ανιχνευτή. Μετά την ενίσχυση της απόκρισης του ανιχνευτή, καταγράφεται σε χρωματογράφημα συναρτήσεως του χρόνου. Η ποσότητα της ουσίας που εισάγεται καθορίζει το μέγεθος του σήματος. Έτσι όσο μεγαλύτερη ποσότητα εισάγεται, τόσο πιο ισχυρό είναι το σήμα [35].

Η επιλογή του ανιχνευτή εξαρτάται κυρίως από την γραμμική περιοχή της καμπύλης απόκρισης και το όριο ανίχνευσης. Ο ανιχνευτής έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει και τα μικρότερα ίχνη από κάθε συστατικό που εισάγεται και να αγνοεί το φέρον αέριο που μεταφέρει αυτά τα συστατικά. Ένας ιδανικός ανιχνευτής πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά [35] :

- 1) Ομοιόμορφη απόκριση για όλες τις ουσίες
- 2) Χαμηλό όριο ανίχνευσης
- 3) Γραμμική απόκριση για μια εκτεταμένη περιοχή συγκεντρώσεων
- 4) Μικρό χρόνο απόκρισης
- 5) Μικρό εσωτερικό όγκο
- 6) Καλή κατασκευή και υψηλή ασφάλεια
- 7) Μικρή ένταση θόρυβο
- 8) Μεγάλη σταθερότητα



Μεγάλη σημασία έχει επίσης το κόστος του ανιχνευτή καθώς και η λειτουργία του, που πρέπει να είναι απλή και όσο το δυνατόν λιγότερο χρονοβόρα. Η εκλεκτική απόκριση του ανιχνευτή μπορεί να συμβάλλει στην ανίχνευση συστατικών σε ίχνη, που δεν διαχωρίστηκαν πλήρως από το κύριο συστατικό. Γενικά είναι χρήσιμη η γραφική παράσταση της απόκρισης ή του χρωματογραφικού σήματος,  $R$ , έναντι της μετρούμενης ποσότητας,  $Q$ , που φαίνεται στην Εικόνα 16 [35].



*Εικόνα 16: Καμπύλη απόκρισης ενός ανιχνευτή*

Τα βασικότερα κοινά χαρακτηριστικά των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στα συστήματα αέριων χρωματογράφων είναι τα ακόλουθα :

- **Ελάχιστο Όριο Ανίχνευσης (Limit of Detection-LOD) :** Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης είναι η μικρότερη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να ανιχνευτεί. Προσδιορίζεται από το θόρυβο του ανιχνευτή,  $R_N$ , και θεωρούμε ότι ένα σήμα ίσο με  $2R_N$  μπορεί να διακριθεί από το θόρυβο του υποστρώματος. Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης ( $Q_0$  στο σχήμα) αντιστοιχεί στο  $2R_N$  και η κλίση της καμπύλης  $\Delta R/\Delta Q$  ορίζει την ευαισθησία του ανιχνευτή. Έτσι μια κορυφή που ανιχνεύεται στο χρωματογράφημα θεωρούμε ότι αντιστοιχεί σε ουσία που διέρχεται από τη στήλη, εφόσον ο λόγος Σήμα/Θόρυβος υποστρώματος έχει τιμή μεγαλύτερη από 3-4.15 [34].

Γενικά πρέπει να επισημανθεί ότι ένας «ευαίσθητος» ανιχνευτής ίσως να μην έχει το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης, γιατί μπορεί να παρουσιάζει μεγάλο θόρυβο. Η απαίτηση της νομοθεσίας για «μηδενική αντοχή» των μολυσματικών ουσιών στο περιβάλλον (π.χ των καρκινογενών ουσιών) είναι αδύνατο να εφαρμοστεί, εκτός αν αναφέρεται η μέθοδος ανίχνευσης. Για τον ανιχνευτή «μηδέν αντοχή» σημαίνει ποσό μικρότερο από το ανιχνεύσιμο με την καλύτερη διαθέσιμη τεχνική [35].

- **Εκλεκτικότητα** : Υπάρχουν ανιχνευτές που είναι ειδικοί για ορισμένες ουσίες. Μερικοί ανιχνευτές δίνουν για ορισμένες ουσίες ενός δείγματος μεγάλη απόκριση και για άλλες μικρή. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι ανιχνευτές δεν δίνουν καθόλου απόκριση για κάποιες ουσίες. Οι ουσίες που δεν εμφανίζουν κανένα σήμα περνούν μέσα από την στήλη και τον ανιχνευτή και επηρεάζουν το τελικό χρωματογράφημα, χωρίς να γίνεται αντιληπτή αυτή η επίδραση [34].
- **Θερμοκρασία** : Η θερμοκρασία του ανιχνευτή πρέπει να είναι αρκετά υψηλή, ώστε να αποφεύγεται η συμπύκνωση ουσιών στην επιφάνειά του που μπορεί να οδηγήσει σε μόλυνση του ανιχνευτή. Φυσικά αυτές οι θερμοκρασίες πρέπει να είναι χαμηλότερες από τις θερμοκρασίες του φούρνου, γιατί τότε η στήλη γίνεται πολύ εύθραυστη [34].
- **Εύρος Γραμμικής Απόκρισης** : Είναι η περιοχή στην οποία ο ανιχνευτής συμπεριφέρεται γραμμικά. Σε αυτή την περιοχή η συγκεντρώνση μιας ουσίας είναι ανάλογη με το εμβαδόν της αντίστοιχης κορυφής που εμφανίζεται στο χρωματογράφημα. Όσο μεγαλύτερο είναι το εύρος μιας περιοχής τόσο πιο υψηλές είναι οι συγκεντρώσεις των ουσιών που ανιχνεύονται [34,B].
- **Νεκρός Όγκος** : Είναι ο χώρος από την έξοδο της στήλης μέχρι το σημείο που γίνεται η ανίχνευση. Όσο περισσότερο χρόνο βρίσκονται τα συστατικά του δείγματος σε αυτό το χώρο, τόσο περισσότερο αλλοιώνεται η μορφή του τελικού χρωματογραφήματος, με εμφάνιση ουρών στις κορυφές, μείωση του μεγέθους και διαπλάτυνση τους [34].
- **Βοηθητικό Αέριο** : Το βοηθητικό αέριο στους οποίους πρέπει να είναι μεγάλη η ροή του αερίου που τους διαρρέει για να λειτουργήσουν. Η ροή του φέροντος αερίου που εξέρχεται από την τριχοειδή στήλη είναι συνήθως μικρότερη από την ροή του αερίου που διαρρέει τους ανιχνευτές. Έτσι το βοηθητικό αέριο συναντά το φέρον αέριο στην έξοδο της στήλης και εισέρχονται στον ανιχνευτή. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η επιθυμητή ροή [34].

Στα σύγχρονα συστήματα αέριας χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται κυρίως δύο ειδών ανιχνευτές : οι διαφορικοί ανιχνευτές (differential detectors) και οι ολοκληρωμένοι ανιχνευτές (integral detectors). Οι διαφορικοί ανιχνευτές μετρούν στιγμιαίες συγκεντρώσεις ή στιγμιαίες ταχύτητες εμφάνισης των συστατικών, ενώ οι ολοκληρωμένοι ανιχνευτές αθροίζουν τα στιγμιαία σήματα και παρέχουν το ολικό ποσό που έχει μετρηθεί μέχρι μια συγκεκριμένη στιγμή. Τα σήματα των διαφορικών ανιχνευτών ολοκληρώνονται στην ποσοτική ανάλυση, ενώ τα σήματα των ολοκληρωμένων ανιχνευτών διαφορίζονται, έτσι ώστε να διευκολύνουν την ποιοτική ανάλυση[1]. Οι ανιχνευτές μπορούν επίσης να διακριθούν σαν καταστροφικοί (destructive) ή μη καταστροφικοί (nondestructive), ανάλογα με το αν μπορούμε ή όχι να συλλέξουμε αμετάβλητα τα συστατικά του δείγματος για περαιτέρω μελέτη [35].

Οι πιο διαδεδομένοι ανιχνευτές αέριας χρωματογραφίας που υπάρχουν στο εμπόριο είναι οι εξής : ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD), ο ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων (ECD), ο ανιχνευτής φλόγας υδρογόνου (FID), ο ανιχνευτής φωτιοιονισμού (PID). Σε πολλές περιπτώσεις η αέρια χρωματογραφία συνδυάζεται με τεχνικές φασματοσκοπίας ή ηλεκτροχημείας. Ένας τέτοιος συνδυασμός είναι η Αέρια Χρωματογραφία-Φασματογράφος Μάζας (GC-MS) που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις των δειγμάτων. Στο Κεφάλαιο που ακολουθεί γίνεται μια ανάλυση της φασματομετρίας μάζας και της σύζευξης GC/MS [35].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS)

#### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική φασματοσκοπική τεχνική που έχει ως κύριο σκοπό το διαχωρισμό ουσιών και ενώσεων, με βάση την μάζα τους. Η φασματομετρία μάζας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση μιας μεγάλης ποικιλίας δειγμάτων (πρωτείνες, πολυμερή, στοιχεία). Τα «θεμέλια» της φασματομετρίας μάζας μπορούν να αναζητηθούν στην πρωτοποριακή εργασία των J.J.Thomson και F.W.Aston στα εργαστήρια του πανεπιστημίου του Cambridge (1897). Το 1898 ο Wien απέδειξε ότι τα θετικά ηλεκτρόνια αποκλίνουν περνώντας μέσα από ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία. Μια δεκαετία αργότερα ο Thompson, χρησιμοποιώντας απλή μαγνητική απόκλιση, απέδειξε την ύπαρξη δύο ισοτόπων του νέου. Από το 1918 ο Aston και ο Dempster είχαν κατασκευάσει ερευνητικά όργανα ικανά όχι μόνο να διαχωρίζουν τα διάφορα ισότοπα, αλλά και να πραγματοποιούν ακριβείς ποσοτικές μετρήσεις. Αυτή η εργασία απέφερε στον Thomson και στους συναδέλφους του 7 βραβεία Νόμπελ στον τομέα της φυσικής και της χημείας και συνέβαλε στην εμφάνιση της φασματομετρίας μάζας [C].

Οι πρώτοι φασματογράφοι μάζας εμφανίστηκαν στο εμπόριο γύρω στο 1940 και χρησιμοποιήθηκαν στην βιομηχανία πετρελαίου, κυρίως για την οργανική ανάλυση χαμηλών μαζών. Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποίησαν τον ηλεκτρικό ιονισμό, για την παραγωγή ιόντων. Το 1948 στο Manchester κατασκευάστηκε ο πρώτος εμπορικός φασματογράφος μάζας (MS-2). Το όργανο αυτό είχε πολύ περιορισμένη ανάλυση και μέγιστη ανάλυση μάζας της τάξης του 300. Την ίδια περίπου χρονική στιγμή ανακαλύφθηκε και η φασματομετρία μάζας, στην οποία η διάκριση των ιοντικών θραυσμάτων βασίζεται στο διαφορετικό «χρόνο πτήσης» (σταθερής διαδρομής). Πρόκειται για την γνωστή φασματομετρία μάζας time-of-flight (TOF-MS). Στις αρχές της δεκαετίας του 1950 άρχισαν να γίνονται κατανοητά τα χαρακτηριστικά του διαχωρισμού των ιόντων, αλλά εξακολουθούσαν να υφίστανται οι περιορισμοί στην ανάλυση των μαζών. Λίγα χρόνια αργότερα πραγματοποιήθηκε με μεγάλη επιτυχία η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων μέσω της τεχνικής αέριας χρωματογραφίας-φασματογράφου μάζας. Αυτό σηματοδότησε την τεράστια εξάπλωση του φασματογράφου μάζας σε πολλούς επιστημονικούς τομείς [C].

Σήμερα ο σχεδιασμός των οργάνων είναι τόσο ανεπτυγμένος, που επιτρέπει την εξέταση κάθε είδους υλικού. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία φασματογράφων μάζας από ανιχνευτές benchtop για την αέρια χρωματογραφία, μέχρι και επιταχυντές. Οι τεχνικές απόκτησης δεδομένων με τους υπολογιστές έχουν δώσει μια νέα διάσταση στη φασματομετρία μάζας, περιορίζοντας τους μακροχρόνιους υπολογισμούς που απαιτούνται συνήθως. Η φασματομετρία μάζας παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την δομή των διαφόρων ενώσεων [C].

Παρακάτω αναφέρονται ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά της φασματομετρίας μαζών, σχετικά με την χημική δομή των ενώσεων :

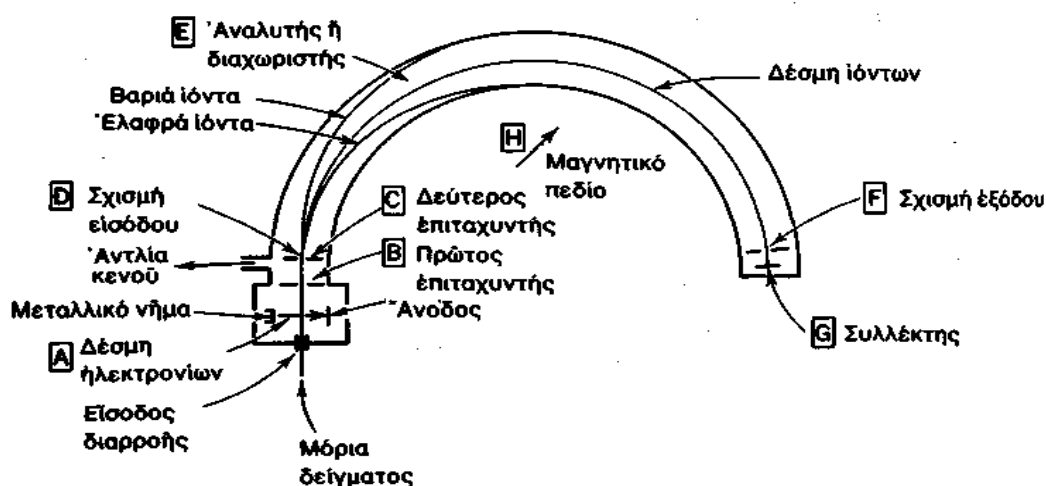
1. Οι ακριβείς και αξιόπιστες μετρήσεις μαζών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σωστή αντιστοίχιση των διαφόρων ενώσεων με τους εμπειρικούς τύπους.
2. Τα υπολείμματα των θρυμματισμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό δειγμάτων σε σχέση με την βάση δεδομένων που υπάρχει.
3. Ο ελεγχόμενος θρυμματισμός μέσω της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση της δομής νέων ενώσεων.
4. Οι κορυφές που παρατηρούνται συνήθως σε ένα φάσμα, μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες για τις διάφορες χημικές ενώσεις.
5. Η μεγάλη ποσότητα ισοτόπων που χρησιμοποιείται στην φασματομετρία μάζας συμβάλλει στην απόκτηση πληροφοριών σχετικά με τα στοιχεία που αποτελούν μια ένωση [C].

#### **4.2 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΑΣ**

Η φασματομετρία μαζών είναι μια «οικογένεια» πολύ ισχυρών τεχνικών χαρακτηρισμού της μοριακής δομής, που βασίζονται στον ιονισμό των μορίων, στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και στην παρατήρηση της σχετικής έντασης του ιονικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο  $m/z$ . Η απλή χρήση των οργάνων στην φασματομετρία μάζας, έχει συμβάλει στην εξάπλωση της. Έτσι χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους μεγάλων μακρομορίων, για την παρατήρηση των διαφόρων τροποποιήσεων και της αλληλουχίας των πρωτεϊνών καθώς και για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μακρομορίων. Με την φασματομετρία μάζας μπορούν να πραγματοποιηθούν τρεις διαφορετικές λειτουργίες : η παραγωγή, ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των ιόντων. Ο φασματογράφος μάζας παράγει ιόντα και τα διαχωρίζει στην αέρια φάση, σύμφωνα με το λόγο : μάζα/φορτίο ( $m/z$ ). Όλα τα είδη των φασματογράφων μάζας έχουν την ικανότητα να προσδιορίζουν το λόγο  $m/z$  των ιόντων, παρά το γεγονός ότι οι αρχές στις οποίες στηρίζεται η λειτουργία τους καθώς και τα είδη των πειραμάτων που βασίζονται στην χρήση τους διαφέρουν σημαντικά [35,C].

Η λειτουργία ενός φασματογράφου μάζας βασίζεται στα ακόλουθα βήματα : εισαγωγή του δείγματος, ιονισμός, ανάλυση μαζών, ανίχνευση ιόντων, ανάλυση στοιχείων (Εικόνα 17). Τα δείγματα μπορούν να εισαχθούν σε αέρια, υγρή, ή στερεή κατάσταση. Στις τελευταίες δύο περιπτώσεις η εξάτμιση πραγματοποιείται είτε πριν από τον ιονισμό, είτε ταυτόχρονα μαζί του. Πολλές τεχνικές ιονισμού μπορούν να παράγουν φορτισμένα μόρια στην αέρια φάση, όπως ο ηλεκτρικός ιονισμός (EI), ο χημικός ιονισμός (CI), καθώς και μια ποικιλία τεχνικών εκρόφησης (FAB,ES) [C].

Οι φασματογράφοι μάζας λειτουργούν σε μειωμένη πίεση, έτσι ώστε να αποτραπούν οι συγκρούσεις των ιόντων με τα υπόλοιπα μόρια στην συσκευή ανάλυσης, κατά την διάρκεια της μεταφοράς από την πηγή των ιόντων στον ανιχνευτή. Το κενό πρέπει να είναι τέτοιο ώστε το μέσο ελεύθερο μήκος της πορείας ενός ιόντος, δηλαδή η μέση απόσταση που διανύει ένα ιόν πριν συγκρουστεί με ένα αέριο μόριο, να είναι μεγαλύτερο από την απόσταση ανάμεσα στην πηγή και τον ανιχνευτή. Έτσι σε μια πίεση  $5 \cdot 10^{-5}$  torr το μέσο ελεύθερο μήκος της πορείας ενός ιόντος είναι περίπου 1 μέτρο. Επομένως η εισαγωγή του δείγματος στο φασματογράφο μάζας απαιτεί συνήθως την εμφάνιση μιας σχετικά μεγάλης πτώσης πίεσης. Έχουν επινοηθεί διάφορα μέσα για την επίτευξη αυτού του σκοπού. Τα αέρια δείγματα μπορούν να συνδεόνται απευθείας με το όργανο και να εισάγονται μέσω μιας βελόνας. Τα υγρά και τα στερεά δείγματα μπορούν να εισάγονται μέσω διαφόρων διαφραγμάτων. Κατά την σύνδεση τεχνικών συνεχής εισαγωγής, όπως είναι η αέρια χρωματογραφία (GC), η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE), είναι απαραίτητη η ύπαρξη ειδικής σύνδεσης για να αποφευχθεί η εμφάνιση υπερβολικού φορτίου αερίου. Όταν μορφοποιηθούν τα ιόντα μπορούν να επιταχυνθούν και να συντονιστούν, μέσω ηλεκτρικών και μαγνητικών πεδίων [35,C].



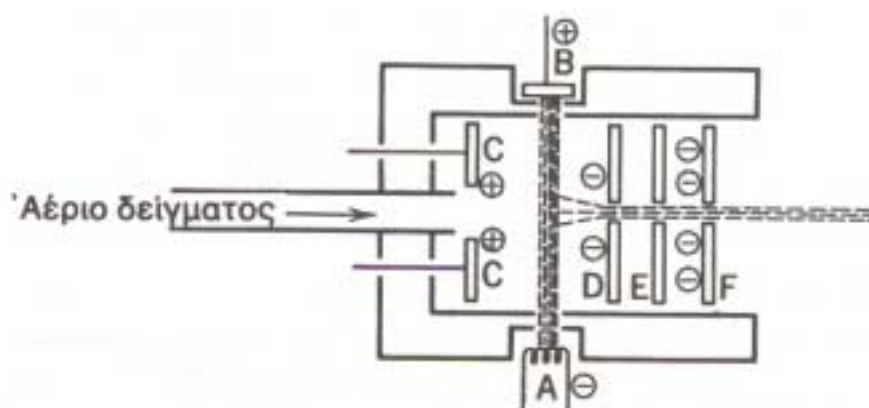
*Εικόνα 17: Σχηματικό διάγραμμα ενός φασματογράφου μάζας με απόκλιση 180°. Το μαγνητικό πεδίο είναι κάθετο στο επίπεδο του χαρτιού.*

Οι επιμέρους τεχνικές διαφοροποιούνται ως προς τους τρόπους ιονισμού των εξεταζόμενων μορίων και διάκρισης των επιμέρους λόγων  $m/z$ . Οι σημαντικότερες τεχνικές φασματομετρίας μάζας είναι οι ακόλουθες : η φασματομετρία μαζών ηλεκτροψεκασμού (ES-MS), κατά την οποία ο ιονισμός των μορίων πραγματοποιείται με ηλεκτροψεκασμό, η φασματομετρία μαζών μέσω βομβαρδισμού με ταχεία άτομα (FAB-MS), με την οποία επιτυγχάνεται ιονισμός σχετικά μεγάλων μορίων χωρίς την θραύση τους, η φασματομετρία μαζών στην οποία η διάκριση των ιονικών θραυσμάτων βασίζεται στο διαφορετικό «χρόνο πτήσης» (TOF-MS), η συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS), η φασματομετρία μαζών πρωτογενούς ιονισμού (EI-MS), κατά την οποία πραγματοποιείται ιονισμός των μορίων μέσω της σύγκρουσης τους με

ηλεκτρόνια και η φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιονισμού (SI-MS), κατά την οποία επιτυγχάνεται ιονισμός σχετικά μεγάλων μορίων χωρίς την θραύση τους. Παρακάτω γίνεται ανάλυση της φασματομετρίας μαζών πρωτογενούς ιονισμού, που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για την ανάλυση των δειγμάτων [32].

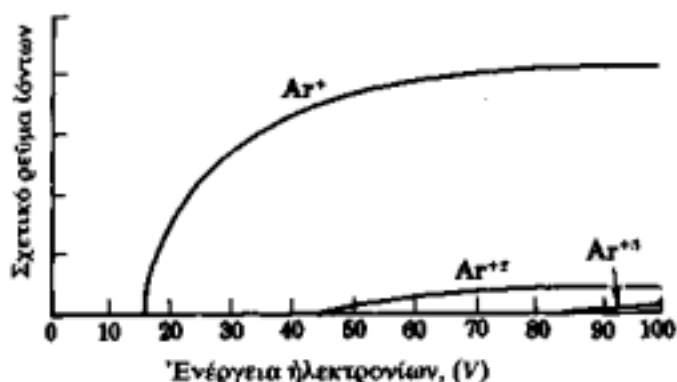
#### 4.3 ΙΟΝΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΑ (ΕΙ)

Μια απλή πηγή ιόντων απεικονίζεται στην Εικόνα 18. Τα μόρια του δείγματος κινούνται εξαιτίας της διαφοράς πίεσης κατά μήκος της εισόδου διαρροής που είναι  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  torr περίπου. Ένα ηλεκτρικά θερμαινόμενο μεταλλικό νήμα A παράγει ηλεκτρόνια τα οποία επιταχύνονται από την άνοδο B και έτσι δημιουργείται μια δέσμη ηλεκτρονίων, η οποία διασταυρώνεται με την ροή των μορίων του δείγματος. Θετικά φορτισμένα ιόντα παράγονται από την σύγκρουση των μορίων με τα ηλεκτρόνια. Τα ιόντα κινούνται από το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται μεταξύ των θετικά φορτισμένων πλακών C και των αρνητικά φορτισμένων D. Οι ενδιάμεσες πλάκες E εστιάζουν την δέσμη των ιόντων, ενώ οι πλάκες F προκαλούν την επιτάχυνση των ιόντων της δέσμης [35].



*Εικόνα 18: Σχηματικό διάγραμμα πηγής με ηλεκτρονιακή κρούση*

Η ενέργεια της δέσμης των ηλεκτρονίων ρυθμίζεται από το δυναμικό της ανόδου B. Το δυναμικό ιονισμού των περισσότερων οργανικών ενώσεων είναι περίπου 10eV. Με την μικρή αυτή ενέργεια, η αρχική διεργασία είναι η παραγωγή ενός φορτισμένου ιόντος με φορτίο +1. Έτσι :  $M + e^- = M^+ + 2e^-$ . Το φάσμα μάζας περιέχει μια απλή κορυφή που ανταποκρίνεται στο αρχικό μόριο. Αυξάνοντας την ενέργεια της ηλεκτρονιακής δέσμης, θα προκύψει ένα περισσότερο διεγερμένο ιόν, το οποίο θα διασπαστεί αν είναι σύνθετο ή θα συγκρουστεί με ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 19. Στις περισσότερες εφαρμογές η δέσμη των ηλεκτρονίων έχει ενέργεια από 50 έως 70eV. Η δέσμη αυτή δίνει τα πιο αναπαραγώγιμα φάσματα. Η δημιουργία ιόντων με φορτίο +2 είναι σπάνια ακόμα και σε αυτό το δυναμικό [35].



*Εικόνα 19: Η απόδοση παραγωγής ιόντων αργού σαν συνάρτηση της ενέργειας της δέσμης ηλεκτρονίων.*

Η διαφορά δυναμικού μεταξύ C και D (Εικόνα 18) είναι μόνο λίγα volts, αλλά είναι αρκετή για να απομακρύνει τα θετικά ιόντα από την δέσμη των ηλεκτρονίων. Έτσι τα θετικά ιόντα φτάνουν στο ηλεκτρόδιο D με μεταβαλλόμενη, αλλά σχετικά μικρή κινητική ενέργεια. Ουσιαστικά η όλη επιτάχυνση προκαλείται από τα ηλεκτρόδια D και F, τα οποία έχουν μια διαφορά δυναμικού από μερικές εκατοντάδες έως μερικές χιλιάδες volts [35].

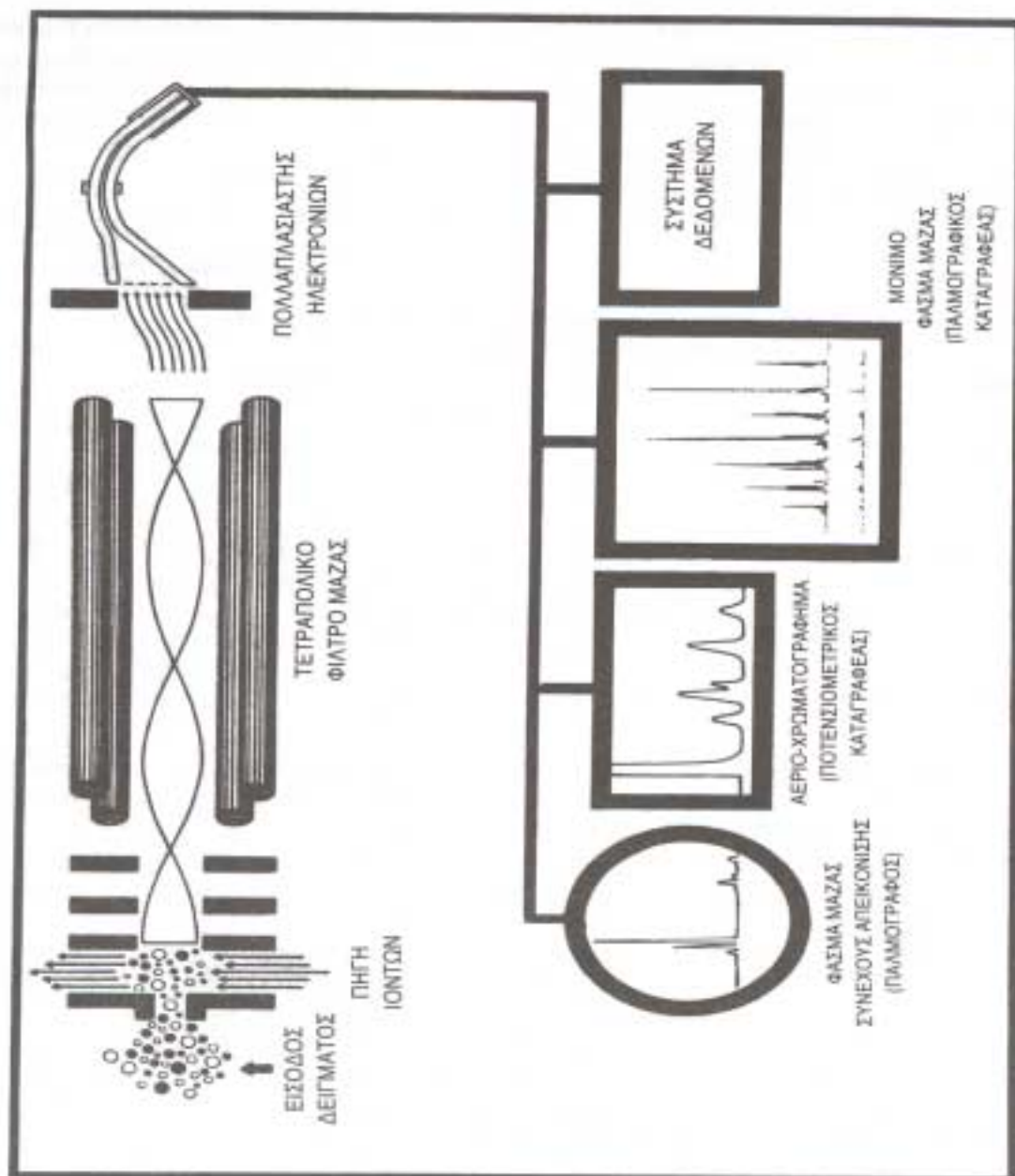
Σε δεδομένο δυναμικό επιτάχυνσης όλα τα απλά φορτισμένα ιόντα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια, που εκφράζεται από την σχέση : Κινητική ενέργεια =  $\frac{1}{2}mu^2 = eV$ , όπου  $m$  η μάζα του ιόντος,  $u$  η ταχύτητα,  $e$  το ηλεκτρονιακό φορτίο και  $V$  το δυναμικό επιτάχυνσης. Μια μονοενεργειακή δέσμη ιόντων είναι απαραίτητη για έναν καλό διαχωρισμό [35].

Το μέρος του φασματομέτρου μάζας όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με τις μάζες τους, ονομάζεται αναλυτής. Για την διασάφηση της δομής δεν είναι πάντοτε απαραίτητες μετρήσεις με όργανα μεγάλης διακριτικής ικανότητας. Οι μετρήσεις με τέτοια όργανα είναι συνήθως απαραίτητες για την εύρεση του μοριακού ιόντος  $M^+$  και τον προσδιορισμό του μοριακού τύπου. Για παράδειγμα ένα όργανο μεγάλης διακριτικής ικανότητας μπορεί να διακρίνει μεταξύ  $C_{16}H_{22}O_2$ , M.B246.1620 και  $C_{17}H_{26}O$ , M.B 246.1984, ή μεταξύ  $^{12}C$ , μάζας 13.078 και  $^{13}C$ , μάζας 13.0034. Μια άλλη απαίτηση είναι η ποσότητα των διερχόμενων ιόντων. Αυτές οι δύο απαιτήσεις είναι ασυμβίβαστες. Όσο μεγαλύτερος είναι ο διαχωρισμός, τόσο μικρότερο είναι το ιονικό ρεύμα. Συνήθως ο κατασκευαστής καταλήγει σε έναν συμβιβασμό που ταιριάζει καλύτερα στις ανάγκες. Τα διάφορα είδη των φασματογράφων μάζας διαφέρουν κυρίως στον τρόπο διαχωρισμού των ιόντων. Έτσι με βάση αυτό το κριτήριο διακρίνουμε τα ακόλουθα είδη διαχωρισμού : μαγνητική απόκλιση απλής εστίασης, διπλή εστίαση, κυκλοειδής εστίαση, τετραπολικά φίλτρα μάζας, χρόνος πτήσης [35].



#### 4.3.1 ΤΕΤΡΑΠΟΛΙΚΑ ΦΙΛΤΡΑ ΜΑΖΑΣ

Στο εργαστήριο χρησιμοποιείται φασματόμετρο μάζας, στο οποίο ο διαχωρισμός γίνεται με την χρήση τετραπολικών φίλτρων μάζας. Ο μηχανισμός διαχωρισμού αυτής της τεχνικής χρησιμοποιεί τέσσερις παράλληλες ράβδους τοποθετημένες έτσι ώστε οι άξονές τους να είναι στις κορυφές ενός τετραγώνου (Εικόνα 20). Η δέσμη των ιόντων επιταχύνεται στο κέντρο αυτής της διευθέτησης κατά μήκος του άξονα z. Το ένα ζεύγος από τα διαγωνίως αντίθετα ηλεκτρόδια διατηρείται σε  $+V_{dc}$  volts και το άλλο ζεύγος σε  $-V_{dc}$  volts. Μια εναλλασσόμενη τάση ραδιοσυχνοτήτων (rf) υπερτίθεται στο πρώτο ζεύγος των ηλεκτροδίων, και μια δεύτερη τάση rf (με διαφορά φάσης  $180^\circ$  από την πρώτη) εφαρμόζεται στο δεύτερο ζεύγος. Τα περισσότερα από τα ιόντα που εισέρχονται στο τετραπολικό φίλτρο θα πάλλονται με ένα αυξανόμενο πλάτος και θα προσκρούουν σε ένα από τα ηλεκτρόδια. Πάντως, μόνον ένας ορισμένος λόγος  $m/e$  (που καθορίζεται από το δυναμικό και την συχνότητα rf) μπορεί να περάσει τελείως μέσα από τον αναλυτή και να ανιχνευθεί. Σαρώνοντας την συχνότητα rf ή το δυναμικό dc, μπορούμε να πάρουμε ένα φάσμα μάζας. Τέτοια συστήματα μπορούν να λειτουργήσουν μόνο με συνθήκες μικρής διακριτικής ικανότητας, αλλά παράγουν γραμμικά φάσματα συγκρινόμενα με τα εκθετικά φάσματα μάζας των οργάνων μαγνητικής σάρωσης [35].



Εικόνα 20. Σχηματικό διάγραμμα τετραπολικού αναλυτή μάζας και εξαρτήματα για την απεικόνιση των δεδομένων

#### 4.3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΙΟΝΤΩΝ

Για την συλλογή των ιόντων και την καταγραφή χρησιμοποιούνται κυρίως η ηλεκτρονική μέθοδος και η φωτογραφική μέθοδος. Στην ηλεκτρονική μέθοδο (η οποία χρησιμοποιείται και στο εργαστήριο) οι διαχωρισμένες δέσμες των ιόντων συλλέγονται διαδοχικά από έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων, του οποίου το σήμα ενισχύεται και καταγράφεται από όργανα, όπως είναι οι καταγραφείς με φωτογραφικό χαρτί και οι μικροί υπολογιστές. Οι τελευταίοι χρησιμοποιούνται πολύ σήμερα και κάνουν γρήγορες σαρώσεις σε μια περιοχή μάζας από 1-1000. Τέτοια συστήματα απόκτησης δεδομένων είναι ικανά να αποθηκεύουν πληροφορίες πολύ γρήγορα για μελλοντική χρήση και γραφική παράσταση [35].

#### 4.3.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η χρήση των ηλεκτρονικών υπολογιστών με τους φασματογράφους μάζας αυξάνει ταχύτητα εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των πληροφοριών που μπορούν να δώσουν οι φασματογράφοι μεγάλης διαχωριστικής ικανότητας. Η χρήση του υπολογιστή είναι απαραίτητη, όταν ο φασματογράφος μάζας συνδυαστεί με αέριο χρωματογράφο(GC). Ένα συνηθισμένο αέριο-χρωματογράφημα περιέχει περίπου 20 κορυφές. Ακόμα συνηθίζουμε να παίρνουμε τρία φάσματα μάζας για κάθε κορυφή, ένα στην ανοδική πλευρά της κορυφής, ένα κοντά στο μέγιστο και ένα στην καθοδική πλευρά της κορυφής [35].

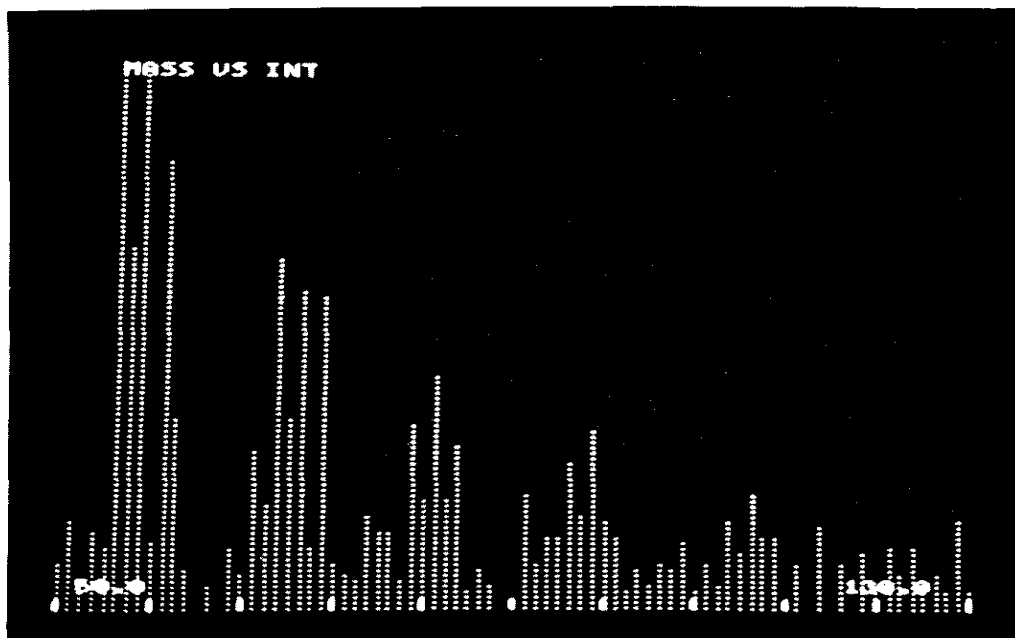
Το πρώτο βήμα, όπως και στη χρωματογραφία, είναι η δειγματοληψία από την έξοδο του φασματογράφου για να ληφθεί η ένταση και η μάζα κάθε κορυφής. Λόγω της μεγάλης ταχύτητας παραγωγής δεδομένων του φασματογράφου μάζας, η ταχύτητα λήψης των μετρήσεων είναι δυνατόν να φθάνει τις 40.000 μετρήσεις/sec. Η ταχύτητα αυτή είναι πολλές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από αυτή που χρειάζεται για την είσοδο των δεδομένων στην αέρια χρωματογραφία [35].

Αρχικά βαθμολογείται η κλίμακα της μάζας με τη βοήθεια μιας πρότυπης ένωσης, όπως λ.χ. της υπερφθοροκιροζίνης. Ο υπολογιστής παράγει μια πολυωνυμική σχέση μεταξύ των γνωστών αριθμών μαζών της πρότυπης ουσίας και του μαγνητικού πεδίου του φασματογράφου, που μετρίεται με έναν ειδικό ανιχνευτή ή με το χρόνο σάρωσης, ανάλογα με το είδος του φασματογράφου μάζας. Αμέσως μετά, μετατρέποντας τις αντίστοιχες μετρήσεις του μαγνητικού πεδίου ή του χρόνου σάρωσης, είναι δυνατός ο υπολογισμός της μάζας που αντιστοιχεί στο μέγιστο κάθε κορυφής του δείγματος [35].

Υπάρχουν πολλοί τρόποι υπολογισμού του μέγιστου της κορυφής. Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε έναν αναλογικό ή ψηφιακό διαφοριστή που παράγει ένα μηδενικό σήμα στο μέγιστο της κορυφής και με τον τρόπο αυτόν ειδοποιεί τον υπολογιστή. Άλλοι τρόποι υπολογισμού του μέγιστου είναι ο υπολογισμός του κέντρου της κορυφής στο ήμισυ του ύψους ή ακόμα ο υπολογισμός της καμπύλωσης της κορυφής. Στους φασματογράφους μάζας με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα οι κορυφές είναι πολύ στενές και κατέχουν μικρό μόνο

μέρος της συνολικής γραμμής βάσης. Για το σκοπό αυτό καθορίζεται μια οριακή τιμή έντασης, κάτω από την οποία τα σήματα αγνοούνται, και με τον τρόπο αυτό μειώνεται σημαντικά ο αριθμός των δεδομένων που χρειάζονται επεξεργασία [35].

Το επόμενο βήμα είναι η παρουσίαση του φάσματος μάζας σε μια μορφή αποδεκτή από τον ερευνητή. Συνήθως γίνεται κανονικοποίηση του φάσματος βαθμολογώντας την ένταση της εντονότερης ή βασικής κορυφής με 100 και κλιμακώνοντας τις υπόλοιπες κορυφές με κατάλληλο τρόπο. Η κλίμακα της μάζας γραμμικοποιείται επίσης, και το προκύπτον φάσμα μάζας μπορεί πλέον να εκτυπωθεί με τη μορφή πίνακα ή με τη μορφή γραφικής παράστασης. Η τελευταία μπορεί να εκτυπωθεί από έναν εκτυπωτή γραμμών ή από ένα σχεδιαστή, ή να αποτυπωθεί στην οθόνη μιας λυχνίας καθοδικών ακτινών (CRT) με τη μορφή της Εικόνας 20 [35].



*Εικόνα 21: Φάσμα μάζας με μικρό διαχωρισμό σε οθόνη CRT.*

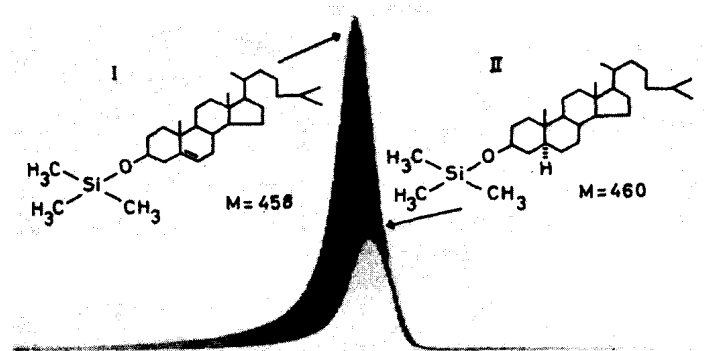
Η γραφική παράσταση είναι η κανονική μορφή παρουσίασης των φασμάτων με μικρό διαχωρισμό, αλλά δεν είναι ικανοποιητική για τα φάσματα με μεγάλο διαχωρισμό, όπου οι περισσότερες κορυφές διαφέρουν μόνο κατά μερικά χιλιοστά μονάδων μάζας. Για τα φάσματα μεγάλου διαχωρισμού χρησιμοποιείται συνήθως ο πίνακας στοιχείων (element map). Ο πίνακας αυτός αναφέρει σε κάθε στήλη εκείνα τα ιόντα που έχουν τον ίδιο αριθμό έτεροατόμων. Στο παράδειγμα της Εικόνας 2 τα ιόντα της στήλης 1 δεν περιέχουν ούτε άζωτο, ούτε οξυγόνο. Η σχετική ένταση κάθε ιόντος σε λογαριθμική κλίμακα σημειώνεται με έναν αριθμό από παύλες. Τα ιόντα της στήλης 2 περιέχουν ένα άτομο οξυγόνου και της στήλης 3 περιέχουν δυο άτομα οξυγόνου. Ο μοριακός τύπος βρίσκεται πάντα στην κάτω δεξιά γωνία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για μερικές ενώσεις ακόμα και οι πίνακες των στοιχείων είναι δύσκολοι στη χρήση τους. Ο πίνακας π.χ. για μια ένωση που

περιέχει τέσσερα άτομα αζώτου και έξι οξυγόνου θα χρειαζόταν τριανταπέντε στήλες [35].

#### 4.3.4 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η δημιουργία του πίνακα από τον υπολογιστή προϋποθέτει τον προσδιορισμό της μάζας κάθε κορυφής με μεγάλη ακρίβεια. Η στοιχειακή σύσταση κάθε κορυφής μπορεί τότε να βρεθεί, αφού πρώτα ο υπολογιστής δημιουργήσει όλους τους δυνατούς συνδυασμούς των στοιχείων (συνήθως περιορίζονται στα C, H, O, N), που αντιστοιχούν με ακρίβεια μερικών χιλιοστών της μονάδας μάζας σε μια συγκεκριμένη μάζα και επιλέξει από αυτές εκείνη που ταιριάζει καλύτερα [35].

Έτσι ολοκληρώνεται η αρχική επεξεργασία των δεδομένων, αν και πολλές φορές για ειδικούς σκοπούς χρησιμοποιούνται διαφορετικές μορφές εξόδου και αποτελεσμάτων. Ένα παράδειγμα είναι ή δημιουργία των χρωματογραφημάτων ειδικού ιόντος (specific-ion chromatogram), όπως αυτό που φαίνεται στην Εικόνα 22. Στην Εικόνα αυτή έχουν καταγραφεί τα ρεύματα των ιόντων που αντιστοιχούν στις μάζες 458 και 460 σε συνάρτηση με το χρόνο, δείχνοντας έτσι ότι μια χρωματογραφική κορυφή περιέχει στην πραγματικότητα δύο μη διαχωρισμένα συστατικά του δείγματος [35].



Εικόνα 22: Αέριο χρωματογράφημα ειδικού ιόντος.

Το επόμενο βήμα είναι η ταυτοποίηση της ένωσης, η οποία γίνεται συνήθως έμμεσα επειδή ο υπολογιστής χρειάζεται πολύ χρόνο. Οι μέθοδοι αναγνώρισης του φάσματος μάζας με υπολογιστή κατατάσσονται σε τρεις κυρίως περιοχές: στο ψάξιμο της βιβλιοθήκης, στις μεθόδους που χρησιμοποιούν τους εμπειρικούς κανόνες διάσπασης και στη μέθοδο που η μηχανή προσπαθεί να μάθει (learning machine) [32,35].

Ο πιο ευθύς τρόπος αναγνώρισης ενός αγνώστου φάσματος μάζας είναι να το συγκρίνουμε με φάσματα από μια βιβλιοθήκη φασμάτων αναφοράς. Με τη λύση αυτή όμως υπάρχουν δυο κύρια προβλήματα. Το πρώτο προέρχεται από το γεγονός ότι το φάσμα της άγνωστης ένωσης συχνά δεν περιέχεται ανάμεσα στα χιλιάδες φάσματα που υπάρχουν στις συλλογές π.χ. του API (American Petroleum Institute) ή του A.S.T.M. (American Society for Testing Materials). Επιπλέον, χρειάζεται μεγάλη προσοχή στη χρήση φασμάτων που προέρχονται από διαφορετικές πηγές. Αυτό συμβαίνει γιατί οι σχετικές

εντάσεις των κορυφών που παίρνονται για την ίδια ένωση από δυο φασματογράφους μάζας, μπορεί να διαφέρουν κατά ένα συντελεστή μεγαλύτερο του 100 προς 1 από το ένα άκρο του φάσματος μέχρι το άλλο [32,35].

Οι ερευνητές που χρησιμοποιούν αυτή τη μέθοδο, φτιάχνουν συνήθως οι ίδιοι τις βιβλιοθήκες τους με έναν περιορισμένο αριθμό ενώσεων που τους ενδιαφέρει. Το δεύτερο κύριο πρόβλημα είναι ο μεγάλος αριθμός των δεδομένων που χρειάζεται να επεξεργασθούν για την έρευνα μερικών χιλιάδων φασμάτων. Ένας τρόπος για να λυθεί αυτό το πρόβλημα είναι να χρησιμοποιηθούν οι εντονότερες κορυφές κάθε φάσματος, έτσι ώστε να μειωθεί ο χρόνος έρευνας.. Μια τροποποίηση της μεθόδου αυτής είναι η εκλογή των δύο εντονότερων κορυφών σε διαδοχικές περιοχές του φάσματος που έχουν πλάτος 14 μονάδες μάζας. Ο αριθμός αυτός εκλέχτηκε γιατί αντιστοιχεί σε διαφορά μιας μονάδας  $\text{CH}_2$ . Με τον τρόπο αυτό ελαττώνονται και τα προβλήματα που προκύπτουν από τη σύγκριση φασμάτων που έχουν ληφθεί με διαφορετικού είδους φασματογράφους [35].

Μια γενικότερη λύση, που δεν περιορίζεται στις ενώσεις των οποίων τα φάσματα είναι γνωστά, είναι η χρήση των μεθόδων που εφαρμόζουν οι ειδικοί που ασχολούνται με τη φασματογραφία μάζας. Για την ερμηνεία του παρατηρούμενου τρόπου διάσπασης πολλών ενώσεων χρησιμοποιούνται διάφοροι τυποποιημένοι εμπειρικοί κανόνες. Οι πρώτοι ερευνητές ερμήνευαν τα φάσματα μάζας με διάφορα στάδια που τους υπαγόρευε η διαίσθηση τους. Τα στάδια αυτά δεν έχουν βεβαίως περιληφθεί στα προγράμματα αναγνώρισης του υπολογιστή. Ο υπολογιστής όμως εξακολουθεί να έχει ένα κύριο πλεονέκτημα έναντι της ανθρώπινης σκέψης, τη διαρκή λειτουργία του [35].

Μια από τις περισσότερες ενδιαφέρουσες μεθόδους που βασίζονται στη μέθοδο αναγνώρισης των θραυσμάτων είναι το ευριστικό πρόγραμμα DENDRAL, πού αναπτύχθηκε από τον Lederberg και τους συνεργάτες του στο Πανεπιστήμιο του Stanford. Το πρώτο βήμα σε αυτή τη μέθοδο είναι ο προσδιορισμός των δραστικών ομάδων που υπάρχουν στο μόριο, από το φάσμα μάζας με μικρό διαχωρισμό. Το επόμενο βήμα είναι η ανάπτυξη ενός τέλει καταλόγου με όλα τα απαραίτητα σταθερά ισομερή χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα DENDRAL. Σε κάθε ένα από τα υπόλοιπα ισομερή προσδιορίζονται τα μοριακά βάρη και οι εντάσεις των κορυφών των πιθανών θραυσμάτων με τη βοήθεια των εμπειρικών κανόνων διάσπασης. Τα προβλεπόμενα φάσματα συγκρίνονται με τα πραγματικά και τα ισομερή εκείνα που ταιριάζουν με τα πειραματικά δεδομένα κατατάσσονται με σειρά προτεραιότητας [35].

#### **4.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΓΡΑΦΟΥ ΜΑΖΑΣ**

Κατά τη διάρκεια της σάρωσης ενός φάσματος μάζας χάνεται σημαντικός χρόνος στην εξέταση περιοχών που δεν παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες. Τέτοια είναι τα διαστήματα μεταξύ των κορυφών και τα σημεία στις πλευρές των κορυφών. Στους φασματογράφους μάζας τετραπολικής ροπής, η κανονική συνεχή σάρωση μπορεί να αντικατασταθεί από ένα σύστημα

βηματικής σάρωσης, το οποίο ελέγχεται από τον υπολογιστή. Σε κάθε βήμα η τάση του φασματογράφου μεταβάλλεται, έτσι ώστε η θέση του φάσματος να μετατοπίζεται στο μέσο του επόμενου αριθμού μάζας. Τότε το σήμα εξόδου του φασματογράφου ολοκληρώνεται για ένα προκαθορισμένο χρόνο, αυξάνοντας έτσι την ένταση του σήματος εξόδου και κατά συνέπεια την ευαισθησία. Παρόλα αυτά οι χρόνοι σάρωσης μπορούν να παραμείνουν μικροί αφού ο αριθμός των βημάτων της σάρωσης είναι ίσος μόνο με τον αριθμό των ατομικών μονάδων μάζας της περιοχής του φάσματος [35].

#### **4.5 ΣΥΖΕΥΞΗ GC/MS**

Η τεχνική της Αέριας Χρωματογραφίας-Φασματογράφου Μάζας (GC-MS) χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα στα αναλυτικά εργαστήρια και παρουσιάζει τεράστια εξάπλωση, μια και συμβάλλει στην επίτευξη αναλύσεων και αποτελεσμάτων μεγάλης ακρίβειας. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία εξάπλωση της μεθόδου, διότι η ύπαρξη άλλων τεχνικών περιορίζει την χρήση της. Έτσι αυτή η τεχνική έχει πολλές εφαρμογές, μερικές από τις οποίες είναι οι ακόλουθες : ανάλυση των εντομοκτόνων σε υδάτινα δείγματα, ανάλυση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) σε υδάτινα δείγματα και σε ιζήματα, ανάλυση διαφόρων ουσιών σε βιολογικά δείγματα, ανάλυση των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) σε περιβαλλοντικά δείγματα, ανάλυση (PCBs) σε ιζήματα [32].

Υπάρχουν 5 διαφορετικές προσεγγίσεις για την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, κοινό χαρακτηριστικό των οποίων είναι η χρήση τριχοειδών στηλών. Έτσι διακρίνουμε : την τεχνική GC-MS που βασίζεται στο γρήγορο πρόγραμμα των θερμοκρασιών, την τεχνική LP-GC-MS, την τεχνική GC-SMB-MS όπου έχουμε υψηλές ταχύτητες του φέροντος αερίου, την τεχνική GC-GC-MS που βασίζεται στο πρόγραμμα των πιέσεων και την τεχνική microbore GC-MS. Παρακάτω αναλύεται η τεχνική GC-MS που βασίζεται στο πρόγραμμα των θερμοκρασιών [32].

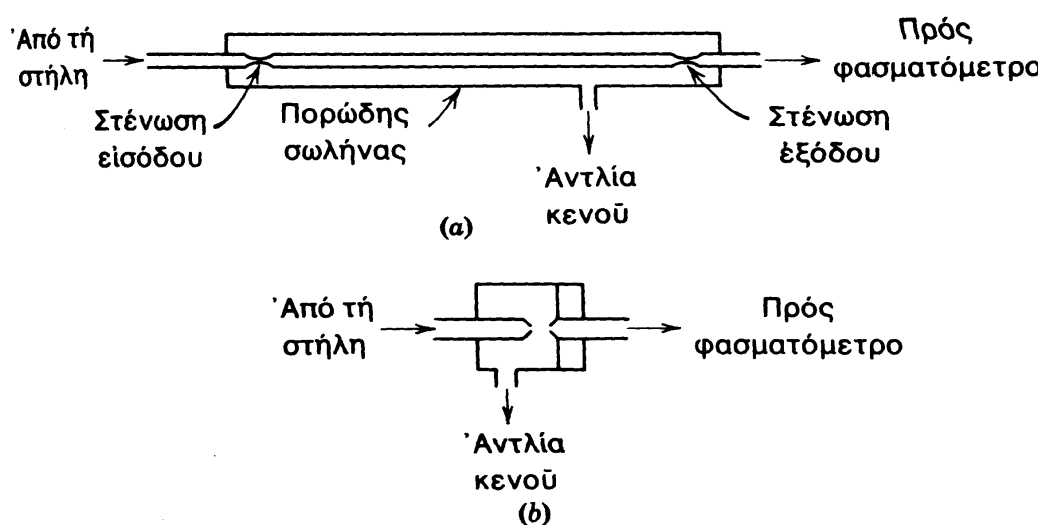
##### **4.5.1 GC/MS (fast temperature programming)**

Αυξάνοντας την τάξη των θερμοκρασιών προγραμματισμού, μπορούμε να επιτύχουμε την αύξηση της ταχύτητας του διαχωρισμού στον αέριο χρωματογράφο, χωρίς την χρήση ειδικών οργάνων. Η τεχνική του γρήγορου προγραμματισμού θερμοκρασιών συνδυάζεται συνήθως με άλλες τεχνικές, για την μείωση του χρόνου ανάλυσης. Γρηγορότερες αλλαγές των θερμοκρασιών οδηγούν (Blumberg, Klee) στην εξαγωγή ενώσεων με υψηλότερες θερμοκρασίες, σε μειωμένη ικανότητα διαχωρισμού, σε σημαντική θερμική κατάλυση των ευαίσθητων προσδιοριζόμενων συστατικών [32].

##### **4.5.2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΕΡΙΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΟ**

Τα διαχωρισμένα συστατικά στο ρεύμα έκλουσης ενός αερίου χρωματογράφου μπορούν να τροφοδοτηθούν κατευθείαν στο θάλαμο ιονισμού. Με τριχοειδείς στήλες το φέρον αέριο δεν δημιουργεί πρόβλημα, επειδή η κανονική ταχύτητα ροής είναι 2ml/min περίπου, πράγμα το οποίο ρυθμίζεται εύκολα από το σύστημα άντλησης του φασματογράφου μάζας.

Με πεπληρωμένες στήλες, όπου οι ταχύτητες ροής ξεπερνούν συνήθως τα 20ml/min, πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας μοριακός διαχωριστής για να απομακρύνει το μεγαλύτερο μέρος από το φέρον αέριο. Στο ένα είδος διαχωριστή που φαίνεται στην Εικόνα 23, το αέριο έκλουσης περνάει μέσα από έναν πορώδη σωλήνα που τοποθετείται σε ένα θάλαμο κενού. Το ήλιο διαχέεται εύκολα μέσα από το πορώδες γυαλί και το υδρογόνο μέσα από το πορώδες παλλάδιο. Τα βαρύτερα μόρια του δείγματος συνεχίζουν προς την είσοδο του φασματογράφου μάζας. Ακόμα και οι μικρότερες κορυφές ενός αέριου χρωματογράφου αποτελούν ικανοποιητικό ποσό δείγματος για ανάλυση από το φασματογράφο μάζας [35].



**Εικόνα 23:** Σχηματικά διαγράμματα διαχωριστών μορίων για την σύνδεση αέριου χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας. (α) Πορώδης σωλήνας (b) Ακροφύσιο από γυαλί.

#### 4.6 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ GC/MS

Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας είναι μια πολύ σημαντική αναλυτική τεχνική και έχει πάρα πολλές εφαρμογές. Παρά το γεγονός αυτό ένας σχετικά μικρός αριθμός πτητικών, θερμικά σταθερών ενώσεων υπόκειται σε αυτή την τεχνική. Ένας αυξανόμενος αριθμός προσδιοριζόμενων ουσιών, που περιλαμβάνει θερμικά ασταθείς ενώσεις καθώς και ουσίες ανεπαρκούς πτητικότητας, αναλύεται με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας-φασματογράφου μάζας (LC-MS). Το βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής GC-MS, με την χρήση ιονισμού με ηλεκτρόνια (EI), είναι η ικανότητα της να προσδιορίζει ενώσεις με βάση τον εκτεταμένο αριθμό ενώσεων που είναι γνωστές από την βιβλιογραφία. Παρόλα αυτά η τεχνική φασματομετρίας μαζών πρωτογενούς ιονισμού (EI-MS) παρουσιάζει συχνά έλλειψη του μοριακού ιόντος  $M^+$  και αυτό το μειονέκτημα επηρεάζει σημαντικά την ανάλυση του δείγματος. Έτσι τις περισσότερες φορές απαιτείται μια επιπρόσθετη ανάλυση με χημικό ιονισμό (CI). Αυτά τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνική GC-MS έχουν γίνει πλέον προφανή, λόγω της πρόσφατης ανάπτυξης της τεχνολογίας των τριχοειδών στηλών, όπου η τάξη



των θερμοκρασιών των στηλών της GC αυξάνεται σταδιακά. Οι λιγότερο πτητικές ενώσεις έχουν την τάση να είναι πιο εύθραυστες και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να είναι θερμικά ασταθείς. Επιπλέον για να αποφευχθεί η εμφάνιση κορυφών με ουρές και η μόλυνση των προσδιοριζόμενων ουσιών, θα πρέπει να αυξηθεί η θερμοκρασία της πηγής των ιόντων, γεγονός που προκαλεί μείωση της σχετικής αφθονίας των μοριακών ιόντων για όλα τα δείγματα. Έτσι παρατηρείται πιο γρήγορη ανάπτυξη της LC-MS σε σχέση με την GC-MS, παρά το μεγάλο κόστος της και την πολύπλοκη χρήση της [32].

## **5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ LPME-GC/MS**

### **5.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ**

#### **5.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Σε αυτή την εργασία συλλέχθηκαν 6 δείγματα επιφανειακού νερού από διάφορες τοποθεσίες του Νομού Χανίων, ώστε να αναλυθούν και να προσδιοριστεί το περιεχόμενό τους σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε μία χρονική περίοδο, τον Μάιο του 2003.

Πραγματοποιήθηκε μια διερεύνηση της ύπαρξης πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε νερά που χρησιμοποιούνται για κολύμβηση ή αλιεία. Έτσι το πρώτο σημείο δειγματοληψίας ήταν το λιμάνι της πόλης των Χανίων (στην παλιά πόλη). Στο λιμάνι πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε δύο σημεία, μπροστά από τα μαγαζιά και τις ταβέρνες, ώστε να μελετηθεί η ύπαρξη τοξικών και καρκινογενών ουσιών όπως είναι τα PAHs. Η επιλογή αυτού του σημείου στηρίχθηκε στο γεγονός ότι πρόκειται για μια ιδιαίτερα πολυσύχναστη περιοχή και παρατηρείται μια αύξηση της μόλυνσης των νερών τα τελευταία χρόνια. Το δεύτερο σημείο δειγματοληψίας ήταν η παραλία της Σούδας που βρίσκεται δίπλα στην ιχθυόσκαλα. Δείγματα συλλέχθηκαν από δύο σημεία : από μια προβλήτα για βάρκες που βρίσκεται κοντά στην ιχθυόσκαλα και ανάμεσα από τις βάρκες που βρίσκονται στην ιχθυόσκαλα. Η επιλογή αυτής της περιοχής έγινε με βάση το γεγονός ότι πρόκειται για μια περιοχή που δέχεται τις επεξεργασμένες εκροές από δύο αγωγούς λυμάτων που καταλήγουν στην θάλασσα, πολύ κοντά στην ιχθυόσκαλα. Επιπλέον η ύπαρξη πολλών αλιευτικών σκαφών στην ιχθυόσκαλα ήταν ο λόγος που συλλέχθηκε και ένα δείγμα από την περιοχή που βρίσκονται αυτά, δίπλα στην ιχθυόσκαλα. Το τρίτο σημείο δειγματοληψίας ήταν η παραλία του Μαραθίου. Το Μαραθί απέχει 17χιλιόμετρα από την πόλη των Χανίων και η παραλία του προσελκύει μεγάλο αριθμό τουριστών κάθε χρόνο. Βρίσκεται στον κόλπο της Σούδας και η συλλογή δειγμάτων από αυτή την περιοχή έχει πολύ μεγάλη σημασία, διότι παρατηρείται αυξημένη χρήση της παραλίας για κολύμβηση. Κοντά στην παραλία του Μαραθίου βρίσκεται και η Αμερικάνικη Βάση και κατά συνέπεια με αυτή την δειγματοληψία μπορεί να γίνει έλεγχος του βαθμού μόλυνσης της περιοχής με τοξικές και επικίνδυνες ουσίες. Δείγματα συλλέχθηκαν από τρία σημεία κοντά στην παραλία.

#### **5.1.2 ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Η συλλογή των δειγμάτων νερού πραγματοποιήθηκε σε καθαρά, γυάλινα φιαλίδια των 100mL με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να αποφευχθεί η επαφή του νερού με οτιδήποτε που θα μπορούσε να αλλοιώσει την σύστασή του.

Πριν κλειστεί το φιαλίδιο με το πλαστικό καπάκι, καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο προκειμένου να μην έρθει σε επαφή το νερό με το πλαστικό πώμα και προσκολληθούν PAHs σε αυτό.

Μετά την συλλογή των δειγμάτων, τοποθετήθηκαν στο εσωτερικό ενός φορητού ψυγείου χωρητικότητας 50l, στο οποίο είχαν τοποθετηθεί παγοθήκες για να διατηρηθεί η θερμοκρασία του στους 0°C σε όλη την διάρκεια της δειγματοληψίας. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και τοποθετήθηκαν στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Εκεί παρέμειναν για 24 ώρες μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση τους.

### **5.1.3 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ**

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 13 Μαΐου του 2003. Οι καιρικές συνθήκες ήταν πολύ καλές. Η θερμοκρασία ήταν στους 22°C και επικρατούσε ηλιοφάνεια όλες τις προηγούμενες μέρες. Τα δείγματα των επιφανειακών νερών συλλέχθηκαν σε διάστημα 2 ωρών. Παρακάτω γίνεται μια μικρή περιγραφή των σημείων δειγματοληψίας μαζί με κάποιες φωτογραφίες.

#### **1<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας**

Δείγμα νερού συλλέχθηκε από το παλιό λιμάνι της πόλης των Χανίων και συγκεκριμένα μπροστά από τα μαγαζιά που βρίσκονται στο δεξιό τμήμα του λιμανιού. Το νερό είχε καλή διαύγεια και δεν παρατηρήθηκαν αιωρούμενα στερεά.



*Εικόνα 24: Παλιό λιμάνι της πόλης των Χανίων*

#### **2<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας**

Δείγμα νερού συλλέχθηκε από το λιμάνι της πόλης των Χανίων και συγκεκριμένα κοντά στο Ναυτικό Μουσείο, στο αριστερό τμήμα του λιμανιού. Το νερό δεν είχε καλή διαύγεια και παρατηρήθηκαν αιωρούμενα στερεά.



*Εικόνα 25: Παλιό λιμάνι της πόλης των Χανίων (κοντά στο Ναυτικό Μουσείο)*

### **3<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας**

Δείγμα νερού συλλέχθηκε από μια προβλήτα για βάρκες που βρίσκεται δίπλα στην ιχθυόσκαλα στην περιοχή της Σούδας. Κάτω από το σημείο της δειγματοληψίας και σε βάθος περίπου 2m υπήρχε αγωγός αποβλήτων διαμέτρου περίπου 40cm. Το νερό ήταν αρκετά διαυγές και παρατηρήθηκε η ύπαρξη μικρής ποσότητας αιωρούμενων σωματιδίων.



*Εικόνα 26: Λιμανάκι δίπλα στην ιχθυόσκαλα της Σούδας*

### **4<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας**

Δείγμα νερού συλλέχθηκε από σημείο δεξιά της ιχθυόσκαλας, όπου βρίσκονται τα αλιευτικά σκάφη. Το χρώμα του νερού ήταν ελαφρώς γκρίζο και παρατηρήθηκαν αιωρούμενα στερεά.



*Εικόνα 27: Σημείο προσάραξης βαρκών στην ιχθυόσκαλα της Σούδας*

#### **5° σημείο δειγματοληψίας**

Δείγμα νερού συλλέχθηκε από την παραλία του Μαραθίου, σε μικρή απόσταση από το σημείο κολύμβησης. Το νερό είχε πολύ καλή διαύγεια και δεν παρατηρήθηκε η ύπαρξη σωματιδιακής ύλης στο εσωτερικό του.



*Εικόνα 28: Εξωτερικό τμήμα της παραλίας του Μαραθίου*

#### **6° σημείο δειγματοληψίας**

Δείγμα νερού συλλέχθηκε από την παραλία του Μαραθίου, στο αριστερό τμήμα της. Το νερό είχε πολύ καλή διαύγεια και δεν παρατηρήθηκαν αιωρούμενα στερεά σωματίδια.



*Εικόνα 29: Παραλία Μαραθίου*

### **7<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας**

Δείγμα νερού συλλέχθηκε κοντά στο σημείο προσάραξης των βαρκών, στην παραλία του Μαραθίου. Το χρώμα του νερού ήταν γκρίζο και παρατηρήθηκαν αιωρούμενα στερεά.



*Εικόνα 30: Σημείο προσάραξης βαρκών στην παραλία του Μαραθίου*

## **5.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΩΝ ΡΑΗs**

Το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό των ΡΑΗs είναι η λήψη των δειγμάτων και η διατήρηση της ακεραιότητάς τους πριν από την ανάλυσή τους. Η στρατηγική της δειγματοληψίας εξαρτάται από την φύση του δείγματος. Το πόσιμο νερό έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε αιωρούμενα στερεά και κατά συνέπεια είναι απλό ως δείγμα, σε αντίθεση με τα νερά ποταμών, λιμνών καθώς και τα παράκτια νερά που παρουσιάζουν πολύ μεγαλύτερη χρονική και χωρική ετερογένεια. Η μέθοδος δειγματοληψίας πρέπει να απεικονίζει την γνωστή ή αναμενόμενη μεταβλητότητα του συστήματος [1].

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι τα ακόλουθα : ανοξειδωτος χάλυβας, PTFE, βοριοπυριτικό γυαλί. Τα πιο κατάλληλα δοχεία για δειγματοληψία και γενικά για την διαχείριση των οργανικών ενώσεων είναι τα δοχεία από βοριοπυριτικό γυαλί και κεχριμπάρι και των οποίων η κορυφή περιστοιχίζεται από PTFE. Η μεγάλη χρησιμότητα αυτών των δοχείων οφείλεται στους εξής λόγους [1] :

- Τα πλαστικά όπως το πολυαιθυλένιο και το πολυπροπυλένιο απελευθερώνουν διάφορες ενώσεις (φθαλικοί εστέρες) στο δείγμα, οι οποίες προκαλούν προβλήματα στην χρωματογραφική ανάλυση
- Πολλά πλαστικά είναι πορώδη σε πτητικές ενώσεις, γεγονός που οδηγεί σε πιθανές απώλειες κατά την μεταφορά και την αποθήκευση
- Η επιφάνεια των πλαστικών διευκολύνει τον σχηματισμό μικροβιακών αποικιών και αυξάνει την βιοδιάσπαση ορισμένων ουσιών

Τα περισσότερα υλικά προσροφούν οργανικές ενώσεις και γι' αυτό το λόγο απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην κατασκευή του εξοπλισμού της δειγματοληψίας. Η χρήση αυτόματων δειγμάτων είναι προς το παρόν δύσκολη, διότι ο διαθέσιμος στο εμπόριο εξοπλισμός δεν σχεδιάζεται για την δειγματοληψία ιχνών συγκεντρώσεων ή για την δειγματοληψία αιωρούμενων στερεών. Πολύ μεγάλη σημασία έχει η τοποθέτηση και ο προσανατολισμός του δοχείου, κατά την εισαγωγή του δείγματος, σε σχέση με την ροή του νερού [1].

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον καθαρισμό των συσκευών που ελαχιστοποιεί την μόλυνση των δειγμάτων. Για την ανάλυση ιχνών οργανικών ενώσεων (<μg/l), όπως είναι τα PAHs στα φυσικά νερά, οι διαδικασίες καθαρισμού απαιτούν προσεχτικό σχεδιασμό. Εκτός από την πλύση των συσκευών και των γυαλικών με απορρυπαντικό και νερό, απαιτείται και ξέπλυμα με ακετόνη και εξάνιο για την απομάκρυνση πολικών και μη πολικών ενώσεων. Εναλλακτικά μη ογκομετρικό βοριοπυριτικό γυαλικό μπορεί να θερμανθεί στους 400°C για 1 ώρα. Όσον αφορά την αποθήκευση, τα δείγματα αποθηκεύονται συνήθως στους 4°C για λιγότερο από 7 μέρες. Σχετικά με την απευθείας δειγματοληψία, η επιτυχημένη εφαρμογή στερεών προσροφητικών, για την εκχύλιση ιχνών οργανικών ενώσεων διαλυμένων στο νερό, παρέχει την δυνατότητα αυτοματοποίησης της εκχύλισης κατά την επιτόπου δειγματοληψία. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει το πέρασμα γνωστού όγκου νερού απευθείας από το υδάτινο σύστημα, μέσω κατάλληλης στήλης SPE (εκχύλιση στερεής φάσης) [1].

Έτσι περιορίζονται κατά ένα μεγάλο βαθμό τα προβλήματα που συνδέονται με απώλειες των ουσιών που μελετάμε στην επιφάνεια των δοχείων. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα είναι ότι τα δείγματα στην SPE μπορούν να σταθεροποιηθούν σε αποθήκευση στους -20 °C μέχρι να εξαχθούν με κατάλληλο διαλύτη. Τα κυριότερα προβλήματα σχετίζονται με τα αιωρούμενα στερεά κατά την δειγματοληψία και με την αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος [1].



### **5.2.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Πριν από τον αναλυτικό προσδιορισμό των PAHs σε εκχυλίσματα δειγμάτων, είναι απαραίτητος ο καθαρισμός των δειγμάτων όταν είναι αρκετά μολυσμένα. Ο καθαρισμός δεν είναι απαραίτητος για σχετικά καθαρά δείγματα. Ο βαθμός στον οποίο είναι απαραίτητος εξαρτάται από την εκλεκτικότητα του τελικού βήματος της ανίχνευσης. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι καθαρισμού που χρησιμοποιούνται είναι απλές μέθοδοι SPE μαζί με διάφορες προσροφητικές φάσεις [1].

### **5.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ PAHs ΜΕ ΤΗΝ LPME**

Ο προσδιορισμός των ιχνών των PAHs σε περιβαλλοντικά δείγματα έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων μεθόδων είτε για την ανάκτηση και τον καθαρισμό είτε για την επίτευξη μεγαλύτερης εκλεκτικότητας και ευαισθησίας κατά τον προσδιορισμό. Έτσι τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντική ανάπτυξη της υγρής μικροεκχύλισης (LPME) για την ανάκτηση των PAHs σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η LPME αποτελεί μια γρήγορη και απλή μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων, πριν από την ανάλυσή τους και παρέχει αποτελέσματα μεγάλης ακρίβειας για τον προσδιορισμό των PAHs. Ωστόσο είναι απαραίτητοι οι διάφοροι έλεγχοι σχετικά με την ποιότητα των δειγμάτων και τα πρότυπα βαθμονόμησης για να εντοπιστεί η ύπαρξη τυχόν σφαλμάτων που προέρχονται από το όργανο ανάλυσης ή από τα συστατικά του δείγματος, εκτός από την προσδιοριζόμενη ουσία. Η χρήση πρότυπων μεθόδων δεν εξασφαλίζει την ακρίβεια και την ορθότητα των αποτελεσμάτων, εφόσον δεν υπάρχει σωστή διαδικασία βαθμονόμησης και για αυτό το λόγο πρέπει πάντα να γίνονται οι απαιτούμενοι έλεγχοι [1].

## **5.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ LPME-GC/MS**

### **5.3.1 ΟΡΓΑΝΑ**

Σε αυτή την εργασία τα δείγματα αναλύονται με εφαρμογή της μεθόδου μικροεκχύλισης υγρής φάσης (LPME) και αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μαζών (GC/MS). Πριν την έναρξη των πειραμάτων, η ίνα (hollow fiber) προετοιμάστηκε κατάλληλα (conditioning) στη διάταξη εισαγωγής του δείγματος του GC σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή της. Το όργανο αέριας χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μαζών ήταν το GCMS-QP5050A της Shimadzu Corporation (Japan), εφοδιασμένο με μηχανισμό έγχυσης διαμοιρασμού/μη διαμοιρασμού (split/splitless). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοχημικών Διεργασιών & Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος, στο Πολυτεχνείο Κρήτης.

### **5.3.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΙΝΑΣ**

Η επιλογή της ίνας βασίζεται στο γεγονός ότι πρέπει να είναι υδροφοβική και συμβατή με τον οργανικό διαλύτη που χρησιμοποιείται. Η ίνα που επιλέχθηκε είναι μια τριχοειδής μεμβράνη από πολυπροπυλένιο (Accurel Q 3/2) και αποκτήθηκε από την Membrana (Wuppertal, Germany). Το σύστημα στήριξης



της ίνας αποκτήθηκε από την Supelco. Το πάχος των τοιχωμάτων της ίνας είναι 200μm, η εσωτερική της διάμετρος 600μm και το μέγεθος των πόρων 0.2μm. Πριν από την χρήση της η ίνα καθαρίστηκε σε ακετόνη για μερικά δευτερόλεπτα, ώστε να απομακρυνθούν οι ουσίες που θα μπορούσαν να την μολύνουν. Έπειτα απομακρυνόταν από το διάλυμα του διαλύτη και αφηνόταν για να στεγνώσει εντελώς. Στη συνέχεια χωρίστηκε με προσοχή σε τμήματα, καθένα από τα οποία είχε μήκος 1.3cm.

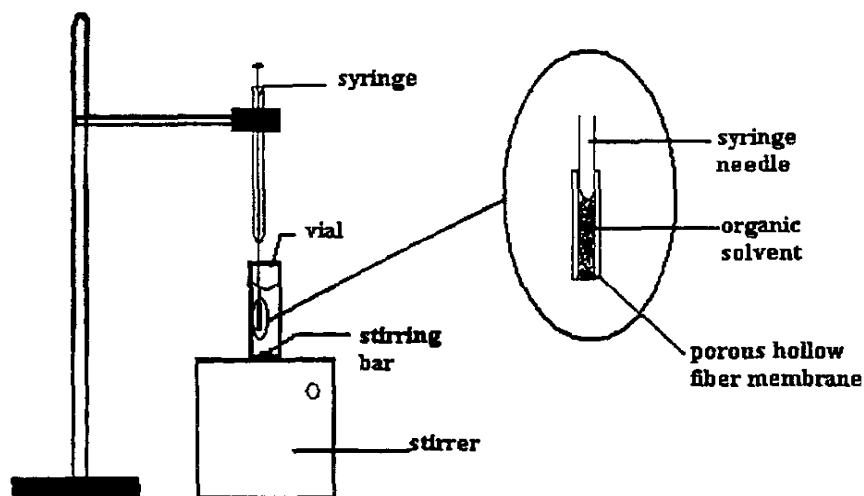
### 5.3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ LPME

Η σύζευξη της LPME με την GC/MS παρέχει την δυνατότητα αποτελεσματικής προετοιμασίας των δειγμάτων και συντελεί στον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των PAHs.

Στο φιαλίδιο που περιείχε το δείγμα, τοποθετούνταν ένας μαγνήτης με γυάλινη επικάλυψη, ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση μορίων PAHs σε αυτόν. Όση ώρα διαρκούσε η εκχύλιση, το διάλυμα αναδεύονταν στις 1000 στροφές/λεπτό μέσω ενός Heidolph, MR 3001 ( Heidolph-Germany). Το φιαλίδιο καλυπτόταν με αλουμινόχαρτο, προκειμένου να αποφευχθεί η απώλεια των ουσιών που περιείχε το δείγμα καθώς και η πιθανή ρύπανση του δείγματος.

Το σύστημα υποδοχής και στήριξης της ίνας εφαρμόζονταν πάνω στο φιαλίδιο, το οποίο είναι σκεπαζόταν με αλουμινόχαρτο, και ταυτόχρονα στηριζόταν στον ορθοστάτη και γινόταν ηλεκτρική ανάδευση του δείγματος στα 1000rpm (Εικόνα 30 ). Στην συνέχεια ακολουθούσε η μέθοδος της LPME με την χρήση τριχοειδούς ίνας (hollow fiber). Παρακάτω γίνεται αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας.

Μια αεροστεγής σύριγγα 10μl (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) Model 1701RNR με ευθεία άκρη βελόνας (μήκος : 5.1cm, ονομαστική διάμετρο : 0.071cm, εσωτερική διάμετρο : 0.015cm) χρησιμοποιόταν για την εισαγωγή της φάσης του δέκτη και για την στήριξη της κοίλης ίνας. Μια ποσότητα 3 μl οργανικού διαλύτη, μη-υδατοδιαλυτού, τοποθετούνταν στην σύριγγα καθώς και 3.4 μl νερού. Έπειτα η άκρη της βελόνας της σύριγγας εισερχόταν στην ίνα, η οποία στην συνέχεια βυθιζόταν στον οργανικό διαλύτη για 10 min, ώστε να εξασφαλιστεί το γέμισμα των πόρων με το διαλύτη της εκχύλισης. Ύστερα από τον εμποτισμό του διαλύτη, η μικροσύριγγα εισερχόταν στην ίνα και με νερό απομακρυνόταν οποιαδήποτε ποσότητα οργανικού διαλύτη βρισκόταν στο εσωτερικό της. Στη συνέχεια η ίνα απομακρυνόταν από τον οργανικό διαλύτη και βυθιζόταν αμέσως στο υδατινό δείγμα, το οποίο βρισκόταν υπό ανάδευση. Έπειτα το έμβολο (plunger) αποσυρόταν και η ποσότητα των 3μl της οργανικής φάσης εισερχόταν στην ίνα. Η χρήση στηρίγματος και σφιχτήρα εξασφάλιζε την σταθερότητα της κοίλης ίνας. Ύστερα από εκχύλιση για ορισμένο χρονικό διάστημα (20min) σε θερμοκρασία δωματίου, ο οργανικός διαλύτης αποσυρόταν στην μικροσύριγγα και στη συνέχεια εισερχόταν στο GC/MS για ανάλυση. Λόγω του χαμηλού κόστους για κάθε εκχύλιση χρησιμοποιούνταν καινούρια ίνα. Στο σχήμα 31 απεικονίζεται το σύστημα της μεθόδου LPME.



*Εικόνα 31: Σύστημα στήριξης και υποδοχής της ίνας.*

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την ανάλυση όλων των δειγμάτων. Όλα τα γυάλινα μέρη που χρησιμοποιήθηκαν (φιάλες, σύριγγες κ.λ.π.) ξεπλένονταν με υπερκάθαρο νερό, ακετόνη καθαρότητας 99.8+% (Merck, Darmstadt-Germany) και ακετονιτρίλιο-CH<sub>3</sub>CN καθαρότητας 99.8+% (Merck, Darmstadt-Germany) με τη σειρά που αναφέρονται και στέγνωναν σε φούρνο με θερμοκρασία 90°C για τουλάχιστον 20 λεπτά. Το απιονισμένο νερό που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων προήλθε από το EasyPure RF της Barnstead/Thermolyne (Iowa, USA).

#### 5.3.4 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ GC/MS

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στον αέριο χρωματογράφο-φασματογράφο μάζας Shimadzu GC-17A (Version 3) QP5050A (Εικόνα 31). Για την ανάλυση των PAHs με GC/MS έγινε η επιλογή ενός σετ ρυθμίσεων του αέριου χρωματογράφου και του ανιχνευτή μάζας προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία των αναλύσεων, σε συμφωνία με ανάλογες δημοσιευμένες εργασίες. Η θερμοκρασία του χώρου εισαγωγής του δείγματος ήταν 270°C (injector temperature). Ο αέριος χρωματογράφος λειτούργησε χωρίς διαμορισμό (splitless mode), για 5 λεπτά (sampling time), ενώ χρησιμοποιήθηκε καθυστέρηση του διαλύτη για 8 min. Η κολόνα που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των PAHs ήταν μία HP-5MS (Agilent Technologies) μήκους 30 m με εσωτερική διάμετρο 0.25 mm και πάχους φιλμ 0.25 μm. Για την πλήρωση της στήλης χρησιμοποιήθηκε : Poly (14% cyanopropylphenyl/86%dimethylsiloxane) Το φέρον αέριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ήλιο (>99.999% καθαρότητα) με ροή 1.2ml/min. Η πίεση του φέροντος αερίου ήταν 99 kPa.

Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ήταν 60°C για 1 λεπτό και στη συνέχεια ρυθμίστηκε στους 300°C με ρυθμό αύξησης 10°C/min. Σε αυτή τη

θερμοκρασία παρέμενε για 5λεπτά. Η θερμοκρασία αλληλεπίδρασης ρυθμίστηκε στους 310°C Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η θερμοκρασία της στήλης σε συνάρτηση με το χρόνο. Το εύρος των μαζών που αναλύθηκε ήταν μεταξύ 50 και 350 amu. Ο ιονισμός επιτεύχθηκε με τη μέθοδο πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI-70eV), ενώ η τάση του ανιχνευτή ήταν 1.40kV.

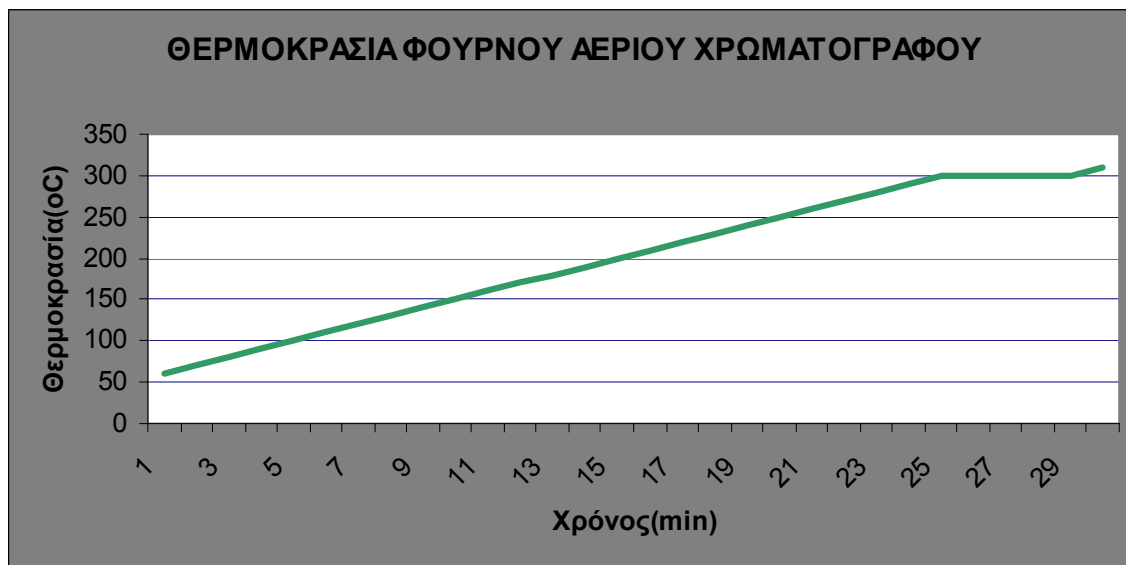


**Εικόνα 32: Shimadzu GC-17A (Version 3) QP5050A**

Με βάση την βιβλιογραφία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος (SIM), μια και αποτελεί ένα ευαίσθητο εργαλείο για τις ποσοτικές μετρήσεις. Τα PAHs ελέγχθηκαν σύμφωνα με τους λόγους m/z των σημαντικότερων ιόντων, τα οποία επιλέξαμε. Πριν από την ποσοτικοποίηση με την μέθοδο SIM, χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των λόγων m/z ( m/z: 50-465) για τον προσδιορισμό όλων των βασικών ενώσεων, με βάση τα φάσματα της μάζας τους (mass spectra) και τους χρόνους κατακράτησής τους στον αέριο χρωματογράφο.

Γενικά τα όρια ανίχνευσης (LODs) υπολογίζονται από τις καμπύλες βαθμονόμησης (καμπύλες αναφοράς), οι οποίες καθορίζουν την γραμμικότητα, και σύμφωνα με τα κριτήρια των Winefordner και Long. Η τιμή της κλίσης των καμπυλών αναφοράς (b) και το τυπικό σφάλμα του ανεξάρτητου όρου της παλινδρόμησης ( $S_b$ ) για κάθε προσδιοριζόμενο συστατικό τοποθετούνται στην εξίσωση :  $LOD = \frac{3S_b}{b}$  και έτσι προκύπτουν τα όρια ανίχνευσης. Στην συγκεκριμένη εργασία δεν υπολογίστηκαν τα LODs, μια και πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των PAHs και δεν έγινε βαθμονόμηση του GC/MS.

Τα όργανα του αέριου χρωματογράφου GC απαιτούν την χρήση ενός λεπτού διαφράγματος, μέσω του οποίου γίνεται η εισαγωγή του υγρού δείγματος. Αν και χρησιμοποιήθηκε ένα θερμοανθεκτικό διάφραγμα (Thermogreen LB-2, Supelco), η λεπτή βελόνα της μικροσύριγγας (10-μl Hamilton, Model 1701RNR) κατέστρεφε το διάφραγμα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την μόλυνση των PAHs, λόγω του ότι μικρά πολυμερή κομμάτια εισέρχονταν στο σημείο εισόδου του εισαγωγέα του GC. Επίσης παρατηρήθηκε διαρροή του φέροντος αερίου και «ξένες» κορυφές. Αυτό το πρόβλημα αντιμετωπίζεται αν τρυπηθεί το διάφραγμα πριν από την χρήση του.



*Εικόνα 33 : Διάγραμμα θερμοκρασίας στήλης με το χρόνο*

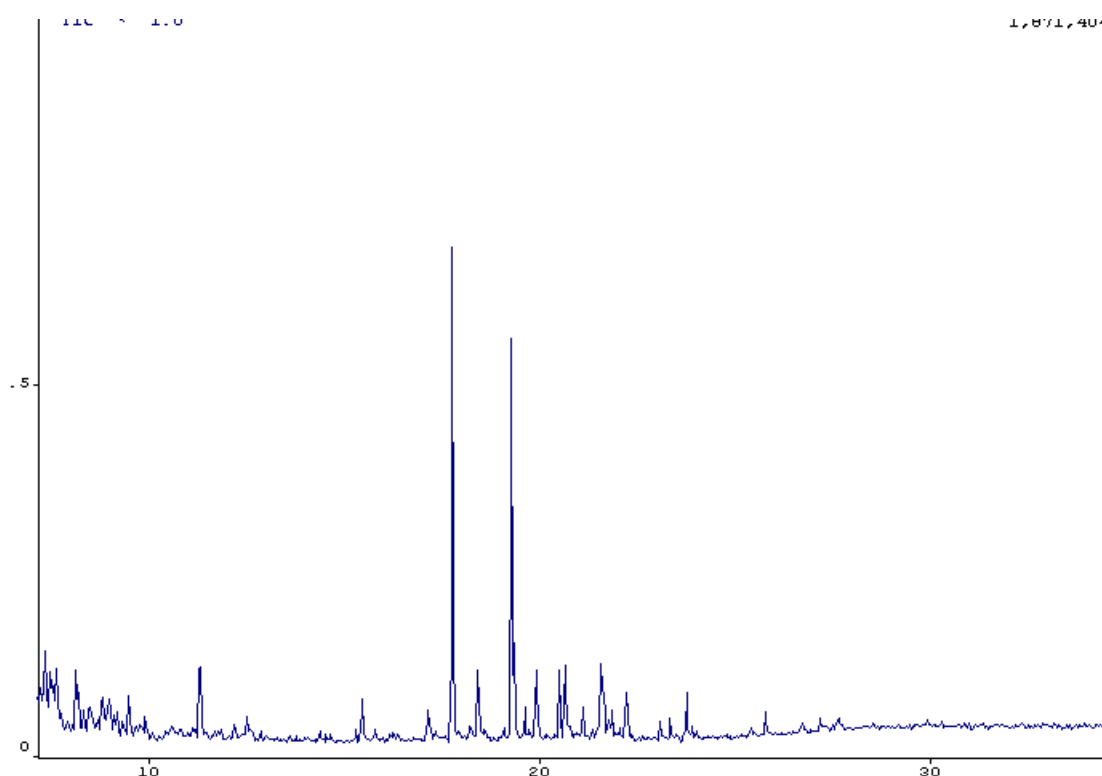
## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ PAHs ΣΤΑ ΥΔΑΤΙΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

### 6.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των PAHs στα δείγματα νερού που συλλέχθηκαν και επιπλέον αναφέρονται και οι υπόλοιπες οργανικές ενώσεις που ανιχνεύθηκαν, έτσι ώστε να προκύψουν κάποια συμπεράσματα για την ποιότητα των υδάτων που αναλύθηκαν.

#### 1<sup>ο</sup>, 2<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας

Στα δείγματα που ελήφθησαν από το λιμάνι της πόλης των Χανίων, δεν ανιχνεύθηκαν PAHs, παρά μόνο άλλες οργανικές ενώσεις όπως εστέρες (Cyclohexyl Ester) και οξέα (Recalcionic Acid), με ποσοστό εμπιστοσύνης μεγαλύτερο του 90%. Επίσης διαπιστώθηκε και η ύπαρξη Benzyl-Butyl-Phthalate. Στην Εικόνα 32 απεικονίζεται το χρωματογράφημα που προέκυψε για το υδατικό δείγμα από το λιμάνι των Χανίων.



*Εικόνα 34: Χρωματογράφημα για το δείγμα από λιμάνι*

#### 3<sup>ο</sup>, 4<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας

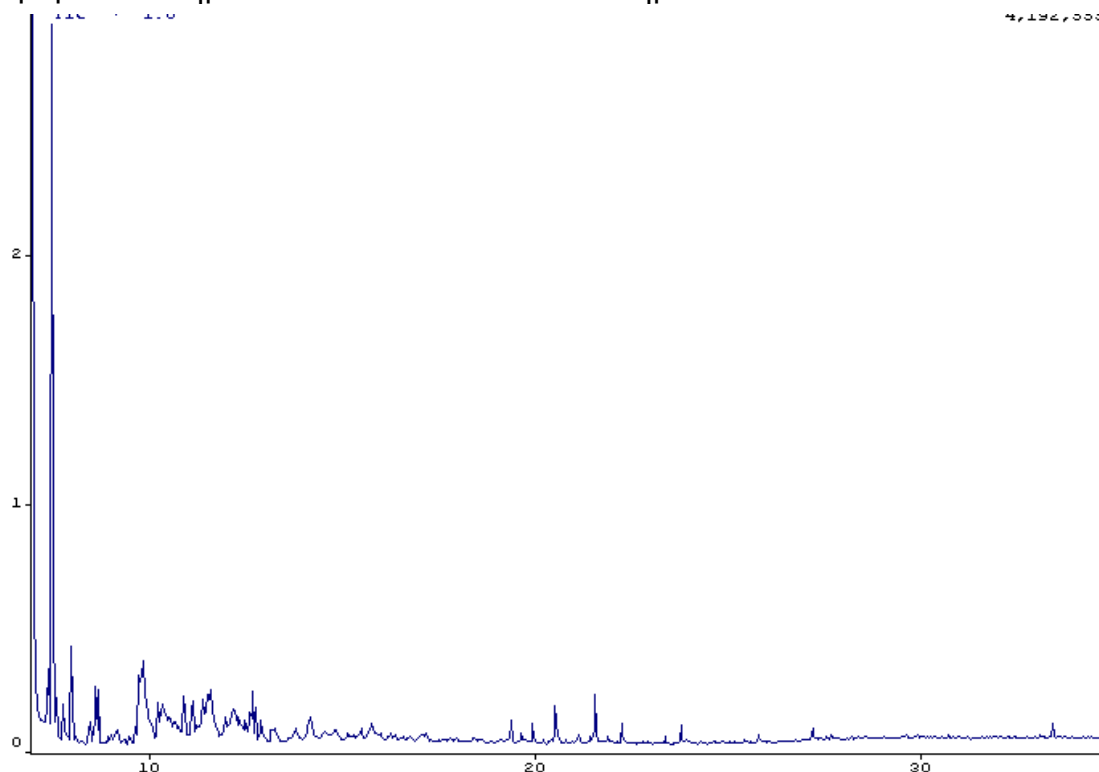
Στα δείγματα που ελήφθησαν παραπλεύρως της ιχθυόσκαλας της Σούδας, δεν ανιχνεύθηκαν PAHs. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα PAHs καθιζάνουν λόγω της υδροφοβικότητά τους και του σχετικά μεγάλου μοριακού βάρους τους. Επίσης δεν ανιχνεύθηκαν άλλες οργανικές ενώσεις.

## **5<sup>ο</sup>, 6<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας**

Σε αυτά τα δύο σημεία δειγματοληψίας (στην παραλία του Μαραθίου) δεν ανιχνεύθηκαν PAHs, ούτε άλλες οργανικές ενώσεις.

## **7<sup>ο</sup> σημείο δειγματοληψίας**

Στο υδατικό δείγμα που συλλέχθηκε από το σημείο προσάραξης των βαρκών στην παραλία του Μαραθίου, ανιχνεύθηκαν τόσο PAHs όσο και κάποιες άλλες οργανικές ενώσεις. Τα PAHs που ανιχνεύθηκαν είναι τα εξής : Naphthalene, Indeno(1,2,3-cd)pyrene και Phenalene (τα οποία έχουν σχετικά μεγάλη τοξικότητα). Επίσης ανιχνεύθηκαν τα ακόλουθα φθαλικά : Benzyl Butyl Phthalate και DNP με ποσοστό εμπιστοσύνης μεγαλύτερο του 90%. Επιπλέον ανιχνεύθηκαν παράγωγα του βενζολίου (Benzene-propyl, Benzene-1,2,3 trimethyl, Benzene- 1-ethyl, 2-methyl) καθώς και οι ενώσεις : Benzyl Alcohol, Biphenyl με ποσοστό εμπιστοσύνης μεγαλύτερο του 90%. Πρόκειται για αρωματικές ενώσεις, οι οποίες σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορούν να επιβαρύνουν σημαντικά το θαλάσσιο οικοσύστημα.



*Εικόνα 35:Χρωματογράφημα για το δείγμα από παραλία Μαραθίου*

## **6.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

### **6.2.1 ΛΙΜΑΝΙ ΧΑΝΙΩΝ**

Θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο ποιοτικός προσδιορισμός που πραγματοποιήθηκε δεν παρέχει ουσιαστικά στοιχεία για την μόλυνση των περιοχών από όπου συλλέχθηκαν τα δείγματα. Ωστόσο μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για την προέλευση των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν

και για τις πιθανές επιπτώσεις τους στους υδρόβιους οργανισμούς και στον άνθρωπο. Έτσι στα δείγματα που συλλέχθηκαν από το λιμάνι των Χανίων δεν ανιχνεύθηκαν PAHs, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε καθίζηση των PAHs λόγω της υδροφοβικότητάς τους. Επιπρόσθετα η χαμηλή διαλυτότητα των PAHs έχει ως αποτέλεσμα την συνένωσή τους με την σωματιδιακή ύλη και την τελική εναπόθεσή τους στο ίζημα. Η ανίχνευση άλλων οργανικών ενώσεων (Recaionic Acid, Cyclohexyl Ester) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν θα πρέπει να αγνοείται ο κίνδυνος ρύπανσης της περιοχής και κρίνεται απαραίτητη μια συστηματική προσπάθεια προστασίας της θαλάσσιας περιοχής στο λιμάνι των Χανίων. Η παρουσία των παραπάνω ενώσεων στα επιφανειακά νερά μπορεί να οφείλεται στην μόλυνση των υδάτων από διάφορα αντικείμενα και στην πιθανή εισροή αποβλήτων (υγρών ή στερεών) από τα μαγαζιά που βρίσκονται στο λιμάνι. Η ύπαρξη φθαλικών ενώσεων (που αποτελούν πλαστικοποιητές που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πολυμερών υλικών) μπορεί να οφείλεται σε διάφορες πλαστικές συσκευασίες (πλαστικές σακούλες) ή άλλα πλαστικά αντικείμενα που ρυπαίνουν την θάλασσα. Κατά την δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκε αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η επαφή του δείγματος με το πλαστικό πώμα, που θα είχε ως αποτέλεσμα την μόλυνση του δείγματος. Επομένως είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση περαιτέρω δειγματοληψίας από διάφορα σημεία της θαλάσσιας περιοχής του λιμανιού των Χανίων και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων που θα ανιχνευθούν, ώστε να εξαχθούν συγκεκριμένα συμπεράσματα για την ποιότητα των υδάτων.

Επιπλέον θα πρέπει να ληφθούν αυστηρά μέτρα και να επιβληθούν ποινές για όσα μαγαζιά μολύνουν την θαλάσσια περιοχή και να πραγματοποιηθεί μια οργανωμένη προσπάθεια για την προστασία των επιφανειακών νερών

### **6.2.2 ΙΧΘΥΟΣΚΑΛΑ ΣΟΥΔΑΣ**

Στα δύο δείγματα που ελήφθησαν από αυτή την περιοχή δεν ανιχνεύθηκαν οργανικές ενώσεις. Όπως είναι φυσικό μια δειγματοληψία σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή δεν μπορεί να δώσει σαφή στοιχεία για το βαθμό ρύπανσης της περιοχής. Η ύπαρξη ενός αγωγού λυμάτων που καταλήγει στην θάλασσα, επιφορτίζει την περιοχή με μεγάλες ποσότητες PAHs και άλλες οργανικές ενώσεις (όπως έχει προκύψει από παλιότερες μελέτες) και θα πρέπει να ληφθούν συγκεκριμένα μέτρα για την αντιμετώπιση της ρύπανσης στην περιοχή.

### **6.2.3 ΠΑΡΑΛΙΑ ΜΑΡΑΘΙΟΥ**

Από τα υδάτινα δείγματα που ελήφθησαν από την παραλία του Μαραθίου, μόνο στο δείγμα που συλλέχθηκε κοντά στο σημείο προσάραξης των βαρκών ανιχνεύθηκαν PAHs και άλλες οργανικές ενώσεις. Η παρουσία των PAHs (τα οποία έχουν τοξικές και καρκινογόνες ιδιότητες) μπορεί να οφείλεται σε απόβλητα που προέρχονται από τις στρατιωτικές βάσεις που βρίσκονται κοντά στην περιοχή. Επιπλέον η διαρροή καυσίμων από τις βάρκες που μετακινούνται στην περιοχή συμβάλλει στην αύξηση των συγκεντρώσεων των PAHs. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το δείγμα συλλέχθηκε σε πολύ κοντινό σημείο από τις βάρκες και επομένως η ύπαρξη μικρών ποσοτήτων

πετρελαίου, λόγω διαρροής, συντέλεσε στην εμφάνιση ποσοτήτων PAHs, μια και όπως έχει ήδη αναφερθεί το πετρέλαιο περιέχει υψηλά επίπεδα PAHs.

Επιπρόσθετα η ανίχνευση και άλλων οργανικών ενώσεων μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη αρκετών σκαφών καθώς και σε μια γενικότερη μόλυνση των θαλάσσιων υδάτων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες περιλαμβάνουν μια σειρά ενώσεων που βασίζονται στο δακτύλιο του βενζολίου. Το βενζόλιο είναι υγρός, πτητικός υδρογονάνθρακας και αποτελεί την βασική δομή μιας οικογένειας πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, που είναι στερεά στις συνήθεις συνθήκες. Τα παράγωγα του βενζολίου που ανιχνεύθηκαν (Benzene-propyl, Benzene-1,2,3 trimethyl, Benzene 1-ethyl,2-methyl) μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της θαλάσσιας ρύπανσης, ανάλογα με τις συγκεντρώσεις τους και η παρουσία τους μπορεί να οφείλεται σε απόβλητα βιοτεχνιών που παρασκευάζουν διαλύτες ή βαφικές ύλες και οι οποίες βρίσκονται κοντά στην περιοχή του Μαραθίου καθώς και στο πλούσιμο των πολεμικών πλοίων που πραγματοποιείται στην περιοχή. Όπως έχει ήδη προαναφερθεί κοντά στην παραλία του Μαραθίου βρίσκονται στρατιωτικές βάσεις όπου πολύ συχνά προσαράζουν πολεμικά πλοία και μεγάλα αεροπλανοφόρα. Έτσι η ύπαρξη διαρροών πετρελαίου έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία αρωματικών υδρογονανθράκων (ιδιαίτερα μεταλλαξιογόνοι και επικίνδυνοι) στα επιφανειακά νερά, οι οποίοι έχουν τοξική δράση και επηρεάζουν σημαντικά το υδάτινο οικοσύστημα. Επιπλέον αυτές οι ουσίες παραμένουν στους υδρόβιους οργανισμούς και με την αλυσίδα της διατροφής, μπορεί να παρατηρηθεί σημαντική συσσώρευσή τους στους ανώτερους ζωικούς οργανισμούς. Τα PAHs προκαλούν σημαντικές βλάβες στα ψάρια (ανωμαλίες στην ανάπτυξη, διαταραχές στις διαδικασίες αναπαραγωγής, μεταλλάξεις, καρκίνοι) και κατά συνέπεια είναι απαραίτητη η απομάκρυνσή τους.

Επιπλέον το πλούσιμο των πολεμικών πλοίων επιβαρύνει σημαντικά την θαλάσσια περιοχή του Μαραθίου, μια και μεταφέρονται στα επιφανειακά νερά διάφορες ουσίες (παράγωγα βενζολίου, Biphenyl) λόγω της απώλειας του χρώματος των πλοίων. Οι βαφικές ύλες συμβάλλουν στην εμφάνιση PAHs και γενικά αρωματικών υδρογονανθράκων, οι οποίοι μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις. Ένα σχετικά μεγάλο τμήμα της θαλάσσιας περιοχής κοντά στην Αμερικανική Βάση είναι υπό στρατιωτική επιτήρηση, γεγονός που διευκολύνει την απόρριψη αποβλήτων και την μεταφορά τους (λόγω διασποράς και συμμεταφοράς) στην ευρύτερη περιοχή. Η ύπαρξη εγκαταστάσεων επεξεργασίας των αποβλήτων στην Βάση μπορεί να μην επαρκεί για την αποτελεσματική και πλήρη επεξεργασία τους και κατά συνέπεια να επιβαρύνεται το θαλάσσιο οικοσύστημα.

Η ανίχνευση φθαλικών ενώσεων (Benzyl Butyl Phthalate και DNP) οφείλεται στην μόλυνση της θαλάσσιας περιοχής από πλαστικά και πολυμερή υλικά. Γενικά τα φθαλικά έχουν χαμηλή τοξικότητα και μόνο σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στο υδάτινο οικοσύστημα.

Επομένως είναι απαραίτητος ένας πλήρης ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος σε δείγματα που θα προέρχονται από την ευρύτερη θαλάσσια περιοχή του



Μαραθίου, έτσι ώστε να ανιχνευθεί η ύπαρξη πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και γενικότερα τοξικών ή καρκινογενών ενώσεων και να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα για τον περιορισμό της μόλυνσης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός παρέχει την δυνατότητα σύγκρισης των συγκεντρώσεων των ουσιών που θα ανιχνευθούν με τα

Επιπλέον είναι επιτακτική η ανάγκη ουσιαστικού ελέγχου των πηγών που προκαλούν την μόλυνση της περιοχής με τοξικές και μεταλλαξιογόνες ουσίες. Έτσι θα πρέπει να ληφθούν αρκετά δείγματα από την περιοχή κοντά στην Αμερικανική Βάση, ώστε να διαπιστωθεί ο βαθμός ρύπανσης που οφείλεται στο πλύσιμο των πλοίων και στα απόβλητά της. Θα πρέπει να ληφθούν αυστηρά μέτρα, να επιβληθούν πρόστιμα και γενικά να ενισχυθεί η περιβαλλοντική νομοθεσία.

Τέλος θα πρέπει όλοι να αντιληφθούν την τεράστια σημασία του περιβάλλοντος και συγκεκριμένα των επιφανειακών υδάτων και να μην ρυπαίνουν τα θαλάσσια νερά, μια και η ανίχνευση πλαστικοποιητών αποδεικνύει την ανθρώπινη αμέλεια και την έλλειψη ευαισθητοποίησης σχετικά με την προστασία των υδάτινων πόρων.

## A. ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] E. Manoli, C. Samara, Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, (1999)5.
- [2] E. Manoli, PhD Thesis, Aristotle University of Thessaloniki, 1998.
- [3] K. Maskaoui, J. L. Zhou, H.S. Hong, Z.L. Zhang, Contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Jiulong river estuary and Western Xiameng sea, China, *Environmental Pollution*, 118, (2002) 109-122.
- [4] E. Lipiatou, I. Tolosa, R. Simo, I. Bouloubassi, J. Dachs, S. Marti, M. A. Sicre, J.M. Bayona, J. O. Grimalt, A. Salot, J. Albaiges, Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean sea, *Deep-Sea Research II*, 44, (1997) 881-905.
- [5] Marcia Caruso Bicego, Rolf Roland Weber, Rosane Goncalves Ito, Aromatic Hydrocarbons on surface waters of Admiralty bay, King George island, Antarctica, *Marine Pollution Bulletin*, 32, (1996) 549-553.
- [6] E. Lipiatou, I. Tolosa, R. Simo, I. Bouloubassi, J. Dachs, S. Marti, M. A. Sicre, J.M. Bayona, J. O. Grimalt, A. Salot, J. Albaiges, *Top. Stud. Oceanogr.* 44 (1997) 882.
- [7] R. Gotz, O.H Bauer, P. Friesel, K. Roch, *Chemosphere* 36 (1998) 2103.
- [8] L.H. McGarthy, T.G. Williams, G.R. Stephens, J. Peddle, K. Robertson, D.J. Gregor, *Sci. Tot. Environ.* 197 (1997) 21.
- [9] J. Dachs, J.M. Bayona, C. Raoux, J. Albaiges, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 682.
- [10] Jon Knutzen, Effects on marine organisms from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and other constituents of waste water from aluminium smelters with examples from Norway, *The Science of the Total Environment*, 163, (1995) 107-122.
- [11] J.L. Beltran, R. Ferrer, J. Guiteras, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 19 (1996) 477
- [12] Eleftheria Psillakis, Nicolas Kalogerakis, Developments in Liquid-Phase Microextraction, *Trends in Analytical Chemistry*, in press (2003)
- [13] J. Namiesnik, B. Zygmunt, A. Jastrzebska, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 405.
- [14] Eleftheria Psillakis, Nicolas Kalogerakis, *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 113
- [15] Eleftheria Psillakis, Nicolas Kalogerakis, *Trends in Analytical Chemistry*, 21, (2002) 53-63
- [16] M. Ma, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 388
- [17] J.A. Jonsson, L. Mathiasson, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 495.
- [18] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2650

- [19] T.S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 3.
- [20] S. Pedersen-Bjergaard, T.S. Ho, K.E. Rasmussen Fundamental studies in 3-phase LPME, *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 141-146
- [21] L. Zhao, L. Zhu, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 239
- [22] L. de Jager, A.R.J. Andrews, *Anal. Chem. Acta*, 21856 (2002) 1
- [23] Eleftheria Psillakis, Nicolas Kalogerakis, *submitted to J. Chromatogr. A* (2002)
- [24] L. Zhu, K.H. Ee, L. Zhao, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 335
- [25] G. Shen, H.K. Lee, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 648
- [26] G. Shen, H.K. Lee, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 650-654
- [27] S. Pedersen-Bjergaard, T.S. Ho, K.E. Rasmussen, *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 141
- [28] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Reduction of extraction times in LPME, *J. Chromatogr. B*, 760 (2001) 219-226
- [29] S. Andersen, T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 303
- [30] G.A.Eiceman., Instrumentation of Gas Chromatography, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- [31] Gas Chromatograph, GC-17A Ver.3 *User's Manual.*, Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Division, Kyoto, Japan 1995
- [32] Alexander B. Fialkov, Alexander Gordin, Aviv Amirav, *J. Chromatogr. A*, 991 (2003) 217-240

## **B. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [33] Β.Γκέκας, Ν. Φραντζεσκάκη, Ε.Κατσιβελα, Τεχνολογίες Επεξεργασίας Τοξικών και Επικίνδυνων Αποβλήτων, Εκδόσεις Τζιόλα (2002) 293-307
- [34] Ευσταθίου-Χατζηγιάννου., *Ενόργανες Τεχνικές*, Πανεπ. Εκδόσεις Αθηνών, Αθήνα, 1992
- [35] Pecsok, Shields, Cairns, McWilliam, *Modern Methods of Chemical Analysis*, Απόδοση στα. Ελληνικά: Σ.Βολιώτης, Εκδόσεις Γ.Α. Πνευματικός, Αθήνα 1980

## **Γ. ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ**

[A] [http:// gc.discussing.info](http://gc.discussing.info)

[B] [http:// chemed.chem.purdue.edu](http://chemed.chem.purdue.edu)

[C] [http:// ms.discussing.info](http://ms.discussing.info)