



Πολυτεχνείο Κρήτης
Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Υδατικής Χημείας

Διπλωματική εργασία:

**«Ποσοτικός προσδιορισμός Πολυκυκλικών Αρωματικών
Υδρογονανθράκων με χρήση ακατέργαστων βιομηχανικών
πλαστικών»**



Χρυσάνθη-Ελισάβετ Νίκα

Εξεταστική Επιτροπή:

Ελευθερία Ψυλλάκη (επιβλέπουσα)

Νικόλαος Καλογεράκης

Μιχάλης Λαζαρίδης

Χανιά, Ιούλιος 2015

Ευχαριστίες

Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω την κυρία Ψυλλάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την πολύτιμη βοήθειά της όποτε την χρειαζόμουν. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τις φίλες και συναδέλφους μου Γκαμπριέλα Γκιώνη, Νάντια Δεμεντή, Ινώ Κουμή και Βίκυ Τσατσαμπά γιατί βρισκόντουσαν πάντα στο πλευρό μου όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την στήριξή τους και την πίστη τους σε εμένα. Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την πολύτιμη συνεργασία με την Ελίνα Γιαντζή για την καθοδήγηση και την βοήθεια που μου προσέφερε.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	5
1.1 Σκοπός.....	5
1.2 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (ΡΑΗ).....	6
1.2.1 Πηγές και Χρήσεις.....	7
1.2.2 Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες.....	8
1.2.3 Τοξικότητα.....	11
1.2.4 Τύχη στο Υδατικό Περιβάλλον.....	13
1.2.5 Ισχύουσα Νομοθεσία.....	16
1.3 Πλαστικά.....	17
1.3.1 Χαρακτηριστικά Πλαστικών Υλικών.....	18
1.3.2 Μικροπλαστικά	19
1.3.3 Pellets.....	20
1.3.4 Μικροπλαστικά ως Μέσο Μεταφοράς Ρύπων στο Θαλάσσιο Περιβάλλον.....	20
1.4 Τεχνικές Προετοιμασίας Δείγματος.....	22
1.5 Υγρή-Υγρή Εκχύλιση.....	23
1.6 SPME και LPME.....	24
1.7 Stir Bar Sorptive Extraction.....	26
1.8 Προτεινόμενη Μέθοδος Μικρο-εκχύλισης με χρήση pellets.....	27
1.8.1 Βελτιστοποίηση της μεθόδου και παράμετροι που την επηρεάζουν.....	28
1.9 Παθητική Δειγματοληψία Θαλασσινού Νερού.....	30
1.10 Επίπεδα ρύπανσης από ΡΑΗ σε θαλάσσια δείγματα.....	32
1.11 Χρωματογραφία.....	33
1.11.1 HPLC.....	34
2. Πειραματικό Μέρος.....	36
2.1 Υλικά.....	36
2.1.1 Αντιδραστήρια.....	36
2.1.2 Όργανα και συσκευές.....	37
2.2 Χαρακτηριστικά υδατικών περιβαλλοντικών δειγμάτων.....	37
2.3 Μέθοδος.....	37
2.4 Αναλύσεις με HPLC.....	38
3. Πειραματικά Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	39
3.1 Χρήση Ultrasound system στην εκχύλιση.....	39

3.2 Επιλογή οργανικού διαλύτη.....	40
3.3 Επιλογή του είδους των pellets.....	41
3.4 Επιλογή του αριθμού των πλαστικών pellets και επιλογή του όγκου του διαλύτη.....	42
3.5 Επιλογή του όγκου του υδατικού διαλύματος.....	43
3.6 Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης του υδατικού διαλύματος.....	44
3.7 Επιλογή του χρόνου ανάδευσης του οργανικού διαλύτη.....	45
3.8 Προσθήκη άλατος.....	46
3.9 Επιλογή του χρόνου ανάδευσης του υδατικού διαλύματος.....	47
3.10 Χρήση των βέλτιστων συνθηκών.....	48
3.11 Εφαρμογή βέλτιστων συνθηκών σε πραγματικά δείγματα.....	51
3.12 Εφαρμογή της μεθόδου σαν παθητικός τρόπος δειγματοληψίας.....	52
4. Συμπεράσματα.....	56
Βιβλιογραφία.....	57

1.Εισαγωγή

1.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός ορισμένων PAHs τα οποία απαντώνται σε υδατικά περιβάλλοντα και όχι μόνο και εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα. Ως τέτοια περιβάλλοντα μπορούν να θεωρηθούν τα νερά των ποταμών και των θαλασσών (παράκτια ύδατα και ύδατα λιμανιών). Πιο συγκεκριμένα μελετώνται το Naphthalene, το Pyrene και το Benzo[a]pyrene τα οποία βρίσκονται στην υδατική φάση. Η δράση των ουσιών αυτών ενδέχεται να φέρει αρνητικά αποτελέσματα στην υγεία των έμβιων οργανισμών. Αυτό συμβαίνει για τον λόγο ότι τα PAHs έχουν χαρακτηριστεί ως POPs από διεθνείς οργανισμούς και συγκεκριμένα το Benzo[a]pyrene είναι ευρέως γνωστό για την καρκινογενή του δράση.

Τα pellets είναι κατηγορία μικροπλαστικών και τα οποία αποτελούν την πρώτη ύλη στην βιομηχανία των θερμοπλαστικών. Τα pellets μπορούν να βρεθούν στο περιβάλλον είτε κατά την χρήση τους για την παραγωγή πλαστικών είτε εξαιτίας ατυχημάτων κατά τη μεταφορά τους. Τα συγκεκριμένα απορρίμματα μπορούν να μελετηθούν είτε ως πλαστικά αυτά καθαυτά είτε ως μέσο μεταφοράς υδρόφοβων ρύπων, έτσι αποτελούν απειλή για την θαλάσσια χλωρίδα και πανίδα.

Τα παραπάνω στοιχεία κάνουν ικανή την δημιουργία μίας μεθόδου προσδιορισμού των PAHs με την χρήση pellets. Η πρωτοτυπία της προτεινόμενης μεθόδου έγκειται στην ελαχιστοποίηση του χρόνου προετοιμασίας του δείγματος καθώς και στην απλότητα της ακολουθούμενης πειραματικής διαδικασίας, χωρίς απώλειες στην αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επίσης είναι μία μέθοδος οικονομική και η οποία χάρη στην απλότητά της μπορεί να χαρακτηριστεί είτε ως ενεργητική είτε ως παθητική μέθοδος προετοιμασίας του δείγματος.

1.2 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (PAH)

Τα πολυαρένια, γνωστότερα ως πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες ή ΠΑΥ (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) είναι οργανικές χημικές ουσίες οι οποίες αποτελούνται από τρεις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους, ενωμένων μεταξύ τους, έτσι ώστε ορισμένα άτομα άνθρακα ανήκουν σε δύο ή τρεις δακτυλίους. Μια τέτοια δομή αναφέρεται επίσης ως σύστημα συγκολλημένων (fused) δακτυλίων. Οι δακτύλιοι μπορεί να είναι τοποθετημένοι σε ευθεία γραμμή ή να σχηματίζουν γωνίες ή να δημιουργούν μια συστάδα (cluster). Ειδικότερα, ο όρος 'PAH' αναφέρεται στις ενώσεις που αποτελούνται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα και υδρογόνου (Βαλαβανίδης και Ευσταθίου, 2012).

Στην κατηγορία των PAHs περιλαμβάνονται οι εξής ουσίες:

1. Ναφθαλένιο (Naphthalene)
2. Ακεναφθυλένιο (Acenaphthylene)
3. Ακεναφθένιο (Acenaphthene)
4. Φλουορένιο (Fluorene)
5. Φαινανθρένιο (Phenanthrene)
6. Ανθρακένιο (Anthracene)
7. Πυρένιο (Pyrene)
8. Φλουορανθένιο (Fluoranthene)
9. Χρυσένιο (Chrysene)
10. Βενζο(α)πυρένιο (Benzo(a)pyrene, BaP)
11. Βενζο(β)φλουορανθένιο (Benzo(b)fluoranthene)
12. Βενζο(κ)φλουορανθένιο (Benzo(k)fluoranthene)
13. Ίνδενο(1,2,3-cd)πυρένιο (Indeno(1,2,3-cd)pyrene)
14. Διβενζο(α,η)ανθρακένιο (Dibenzo(a,h)anthracene)
15. Βενζο(γ,η,ι)περυλένιο (Benzo(g,h,i)perylene)
16. Βενζο(α)ανθρακένιο (Benzo(a)anthracene)

1.2.1 Πηγές και Χρήσεις

Τα PAHs παράγονται ανθρωπογενώς κατά την καύση καυσίμων, την ατελή καύση ή την πυρόλυση οργανικών υλικών, όπως το ξύλο, τα ορυκτά καύσιμα ή τα πλαστικά καθώς και από την ατελή καύση στερεών απορριμμάτων. Στις κυριότερες ανθρωπογενείς πηγές περιλαμβάνονται η βιομηχανία παραγωγής κωκ, η βιομηχανία αλουμινίου, η βιομηχανία επεξεργασίας ξύλου, η θέρμανση των κατοικιών και τα οχήματα. Καθώς λοιπόν παράγονται και από την καύση βενζίνης σε κινητήρες, έχουν εντοπισθεί σε απορροές δρόμων και νερό βροχής από περιοχές με έντονη οδική κυκλοφορία. Γενικά θεωρείται ότι παράγονται όταν μια οργανική ένωση εκτεθεί σε υψηλή θερμοκρασία ($> 700\text{ }^{\circ}\text{C}$) παρουσία οξυγόνου και βενζολίου, με τις μεγαλύτερες εκπομπές να συμβαίνουν κατά την καύση μεταξύ $750 - 850\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mastral et al., 2001). Άλλες ανθρωπογενείς πηγές θεωρούνται τα απόβλητα αποχέτευσης, διαρροές βυτιοφόρων που μεταφέρουν πετρέλαιο, οι ασφαλτοστρωμένοι δρόμοι μέσω των απορροών κ.α.

Εκτός όμως από τις ανθρωπογενείς πηγές, τα PAHs μπορούν να δημιουργηθούν και από φυσικές πηγές. Σε αυτές περιλαμβάνονται κυρίως οι πετρελαιοπηγές και οι διαρροές τους, τα φυτικά υπολείμματα, οι πυρκαγιές και η ηφαιστειακή δραστηριότητα (Yunker et al., 2002).

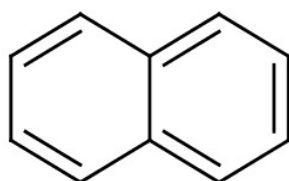
Τα PAHs χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα για την παραγωγή διαφόρων βιομηχανικών προϊόντων (κυρίως τα ναφθαλένιο, ανθρακένιο, φλουορένιο, φλουορανθένιο, φαινανθρένιο και πυρένιο), και ειδικότερα στην παραγωγή πολυμερών, βαφών, πηγμάτων, διασκορπιστικών, διαλυτών, εντομοκτόνων, πρόσθετων για ελαστικά. Στο εμπόριο κυκλοφορούν ως μίγμα (κρεοζοτέλαιο), με περιεκτικότητα σε PAHs μέχρι και 85%.

Οι ποικίλες πηγές και ευρεία χρήση τους τα καθιστά πολύ διαδεδομένα στο περιβάλλον. Η παρουσία τους, συνήθως με την μορφή σύνθετων μιγμάτων, έχει διαπιστωθεί σε εδάφη, ιζήματα, νερό, αέρα και τρόφιμα (Juhasz and Naidu, 2000).

1.2.2 Φυσικές και Χημικές Ιδιότητες

Τα PAHs είναι συνήθως χρωματισμένα κρυσταλλικά στερεά χαρακτηρίζονται από υψηλό σημείο βρασμού, χαμηλή τάση ατμών, πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό η οποία μειώνεται καθώς αυξάνεται το μοριακό βάρος. Το σημείο τήξης τους εξαρτάται από την ιδιαιτερότητα της ένωσης, αλλά γενικά είναι μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία δωματίου. Η τάση ατμού μειώνεται με αύξηση του μοριακού βάρους, δηλαδή τα PAHs χαμηλού μοριακού βάρους εξατμίζονται ευκολότερα. Είναι ιδιαίτερα λιπόφιλα και εύκολα διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες. Τα απλούστερα PAHs είναι το πενταλένιο, το ινδένιο και το ναφθαλένιο.

Naphthalene



Naphthalene

Αριθμός CAS: 91- 20 – 3

Συνώνυμα: «Λευκή πίσσα»

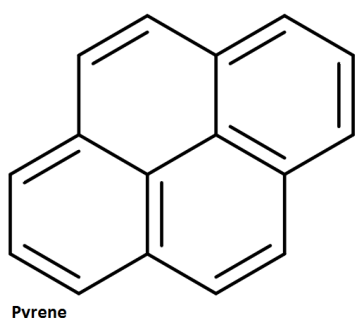
Χημικός τύπος: $C_{10}H_8$

Μοριακό βάρος: 128,18

Περιγραφή: Ανήκει στους πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες. Πρόκειται για λευκό κρυσταλλικό στερεό με την χαρακτηριστική οσμή της ναφθαλίνης. Το σημείο ζέσεως του είναι στους 218 °C ενώ το σημείο τήξεως του στους 80 °C. Η διαλυτότητα της στο νερό είναι 31 mg/L στους 25 °C, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού (K_{ow}) είναι 3,30, η τάση των ατμών του 11,33 Pa στους 25 °C

(Psillakis et al., 2013), ενώ η σταθερά του νόμου του Henry $4,80 \times 10^{-4} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mole}$ (Mackay and Shiu, 1981).

Pyrene



Αριθμός CAS: 129-00-0

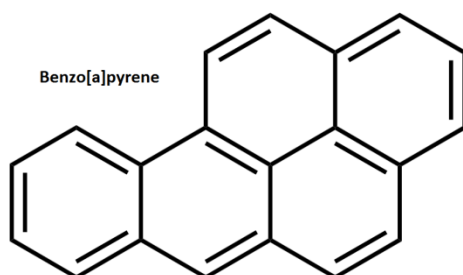
Συνώνυμα: benzo[def]phenanthrene

Χημικός τύπος: $\text{C}_{16}\text{H}_{10}$

Μοριακό βάρος: 202,1

Περιγραφή: Ανήκει στους αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες και αποτελείται από τέσσερις βενζολικούς δακτυλίους με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα επίπεδο αρωματικό σύστημα. Πρόκειται για ένα άχρωμο στερεό όμως σε πολλά δείγματα μπορεί να παρατηρηθούν ίχνη από κίτρινες προσμίξεις. Το σημείο ζέσεως του είναι στους $399\text{-}404\text{ }^{\circ}\text{C}$ ενώ το σημείο τήξεως του στους $156\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η διαλυτότητα της στο νερό είναι $135\text{ }\mu\text{g/L}$ στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού (K_{ow}) είναι 4,88, η τάση των ατμών του $5,99 \times 10^{-4}\text{ Pa}$ στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ozaki et al. 2015), ενώ η σταθερά του νόμου του Henry $1,09 \times 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mole}$ (Mackay and Shiu, 1981).

Benzo[a]pyrene



Αριθμός CAS: 50-32-8

Χημικός τύπος: $C_{20}H_{12}$

Μοριακό βάρος: 252,3

Περιγραφή: Είναι το μεγαλύτερο από τις δύο παραπάνω ενώσεις και έχει πέντε δακτυλίους, έχει επίσης εξασθενημένη αρωματική μυρωδιά. Το καθαρό benzo[a]pyrene είναι χλωμό κίτρινο και βρίσκεται ως ίνες ή ορθορομβικούς κρυστάλλους (The Merck Index). Το Benzo[a]pyrene είναι η μοναδική από τις παραπάνω ενώσεις που είναι γνωστή ως καρκινογόνος ουσία και ο τύπος του αποτελεί το «σήμα κατατεθέν» αυτής της τάξης των οργανικών ενώσεων. Το σημείο ζέσεως του είναι στους 312-495 °C ενώ το σημείο τήξεως του στους 179 °C. Η διαλυτότητα της στο νερό είναι 1,62 µg/L στους 25 °C, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού (K_{ow}) είναι 6,04, η τάση των ατμών του $7,31 \times 10^{-7}$ Pa στους 25 °C (Ozaki et al. 2015), ενώ η σταθερά του νόμου του Henry $4,65 \times 10^{-6}$ atm·m³/mole (Mackay and Shiu, 1981).

1.2.3 Τοξικότητα

Τα PAHs θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς περιβαλλοντικούς ρύπους τόσο εξαιτίας της δραστηριότητάς τους όσο και εξαιτίας της ευρείας διάδοσής τους καθώς οι ανθρωπογενείς αλλά και φυσικές πηγές τους είναι πολυάριθμες. Η Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος (USEPA) έχει χαρακτηρίσει 16 PAHs ως ρύπους υψηλής προτεραιότητας και 7 από αυτά έχουν θεωρηθεί ως πιθανότατα καρκινογόνα. Τα ευρωπαϊκά όργανα έχουν ταξινομήσει το benzo[a]pyrene και άλλα PAH ως καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και τοξικές για την αναπαραγωγή ουσίες. Το benzo[a]pyrene αποτελεί για την Ευρωπαϊκή Ένωση έναν αξιόπιστο ποιοτικό και ποσοτικό δείκτη για την παρουσία PAH (Οδηγία 2005/69/EK, 16/11/2005).

Τα PAH μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό είτε μέσω της αναπνευστικής οδού, είτε μέσω κατάποσης νερού ή φαγητού τα οποία περιέχουν PAH, είτε μέσω του δέρματος σε περίπτωση που έρθει αυτό σε επαφή με έδαφος που περιέχει PAH ή άλλα προϊόντα. Τα PAH διασπείρονται στο σώμα και στοχεύουν τους λιπώδεις ιστούς. Τα όργανα που προσβάλλονται κυρίως είναι οι πνεύμονες, το συκώτι και τα νεφρά.

Τα PAHs εμφανίζουν χαμηλό βαθμό οξείας τοξικότητας για τους ανθρώπους. Η οξεία τοξικότητά των PAHs είναι αντιστρόφως ανάλογη του μοριακού τους βάρους, έτσι το ναφθαλένιο, η ανθρακό-πισσα και τα προϊόντα της αποτελούν κίνδυνο για την υγεία. Η εισπνοή ναφθαλενίου προκαλεί συμπτώματα όπως πονοκεφάλους, ναυτία, εφίδρωση και εμετό, ενώ η επανειλημμένη επαφή του με το δέρμα προκαλεί ερύθημα και δερματίτιδα.

Πολλά PAHs έχει αποδειχθεί ότι είναι καρκινογόνα για τα ζώα. Στους ανθρώπους, η χρόνια έκθεση σε PAHs έχει συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου των πνευμόνων και του δέρματος και βάσει επιδημιολογικών μελετών, πιθανώς και με καρκίνο του λάρυγγα, του φάρυγγα, του γαστρεντερικού και του ουροποιητικού συστήματος.

Άλλα χρόνια προβλήματα υγείας σχετιζόμενα με την έκθεση σε PAHs, τα οποία παρουσιάζονται κυρίως σε παραγωγούς αιθάλης, είναι η μειωμένη ικανότητα αναπνοής, σκιές στην ακτινογραφία θώρακα και χρόνια βρογχίτιδα. Γενικά, η τοξικότητα των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων είναι αποτέλεσμα μάλλον μακροχρόνιας έκθεσης σε πολύπλοκα μίγματα αρωματικών

υδρογονανθράκων παρά στην απευθείας έκθεση σε ένα μόνο χαμηλής συγκέντρωσης μέλος της ομάδας (Irwin et al. 1997, EPA 2001).

Ειδικότερα το ναφθαλένιο έχει βρεθεί ότι είναι κατεξοχήν ερεθιστικό και με παρατεταμένη επαφή μπορεί να προκαλέσει κοκκινίλες και δερματίτιδα. Άμεση επαφή των ματιών με την σκόνη του προκαλεί ερεθισμούς ως και καταρράκτη. Συστηματική εισπνοή του μπορεί να προκαλέσει ενδοαγγειακή αιμολυσία. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι εκτεταμένη έκθεση στο πυρένιο οδηγεί σε νεφροπάθεια και άλλες παθήσεις των νεφρών. Επίσης μπορεί να μειωθεί το βάρος των νεφρών ή/και να αυξηθεί το βάρος του συκωτιού. Τέλος, η έκθεση σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από την προτεινόμενη οριακή τιμή του βενζο(α) πυρένιου στο νερό, για μικρό χρονικό διάστημα, προκαλεί καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων, που μπορεί να οδηγήσει σε αναιμία και επηρεασμό του ανοσοποιητικού συστήματος. Μακροχρόνια έκθεση εκτιμάται ότι μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.

Naphthalene: Έχει ταξινομηθεί από την 1986 EPA Guidelines for Carcinogen Risk Assessment (USEPA 1986) σαν κατηγορία C, σαν πιθανός παράγοντας ανθρώπινης καρκινογένεσης. Τα αποτελέσματα πειραμάτων έδειξαν ότι το naphthalene ευθύνεται για διάφορους τύπους καρκίνου όταν εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού αλλά δεν είναι βέβαιη η σύνδεση του με διάφορους τύπους καρκίνου όταν αυτό εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της στοματικής κοιλότητας.

Pyrene: Έχει ταξινομηθεί από την 1986 EPA Guidelines for Carcinogen Risk Assessment (USEPA 1986) σαν κατηγορία D, δηλαδή δεν είναι καταχωρημένη σαν παράγοντας ανθρώπινης καρκινογένεσης.

Benzo[a]pyrene: Έχει ταξινομηθεί από την 1986 EPA Guidelines for Carcinogen Risk Assessment (USEPA 1986) σαν κατηγορία B2, δηλαδή είναι πιθανός παράγοντας ανθρώπινης καρκινογένεσης.

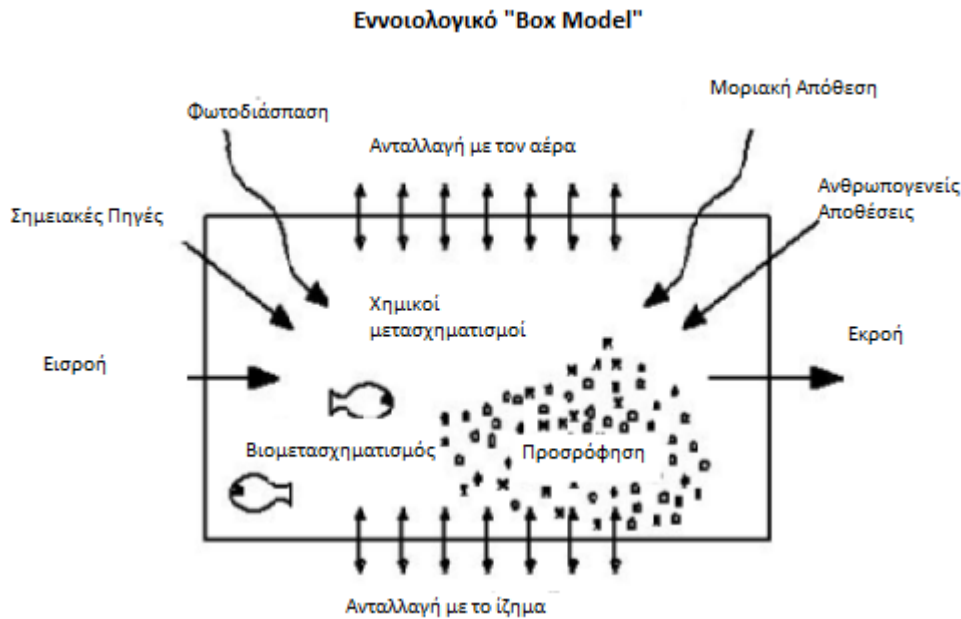
1.2.4 Τύχη στο Υδατικό Περιβάλλον

Τα ΡΑΗ που απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα, μπορεί να προσροφηθούν στην επιφάνεια αιωρούμενων σωματιδίων δίνοντας τους έτσι τη δυνατότητα να μεταφερθούν σε πολύ μεγάλες αποστάσεις πριν να επιστρέψουν στο έδαφος είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της βροχόπτωσης. Τα ΡΑΗ μπορούν να φτάσουν επίσης και στο υδρόβιο περιβάλλον μέσω διαφόρων πηγών που αναλύθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Τα ΡΑΗ που διαλύονται στο νερό μπορούν να προσληφθούν από τα φυτά και να επιστρέψουν στο νερό ή το χώμα με την αποσύνθεση των φυτών ή με την καύση τους.

Λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους, τα ΡΑΗ είναι ελάχιστα διασπάσιμα στο υδατικό περιβάλλον, για τον λόγο αυτό τα ιζήματα τείνουν να συσσωρεύουν αυτές τις χημικές ουσίες. Κάποια ΡΑΗ μπορούν επίσης να συσσωρευτούν στους ιστούς των θαλάσσιων οργανισμών, αν και τείνουν να μείνουν στα χαμηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας. Παρόλα αυτά, οι υψηλές συγκεντρώσεις των ΡΑΗs στους οργανισμούς μπορούν να εμφανιστούν όταν αυτοί εκτίθενται άμεσα στις υψηλές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον. Για παράδειγμα, υψηλές συγκεντρώσεις ΡΑΗs έχουν βρεθεί σε αστακούς στο λιμάνι του Σύννεϋ Nova Scotia και στα μύδια σε όλες τις ατλαντικές επαρχίες (Chemical Fact Sheets – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)). Συνήθως, σε μία ρυπασμένη περιοχή εμφανίζονται διάφορα ΡΑΗs μαζί, οπότε οι ιδιότητες και τα αποτελέσματα των μιγμάτων αυτών ποικίλουν σύμφωνα με το συνδυασμό των ενώσεων.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο κύκλος ζωής των ΡΑΗ στο υδατικό περιβάλλον.

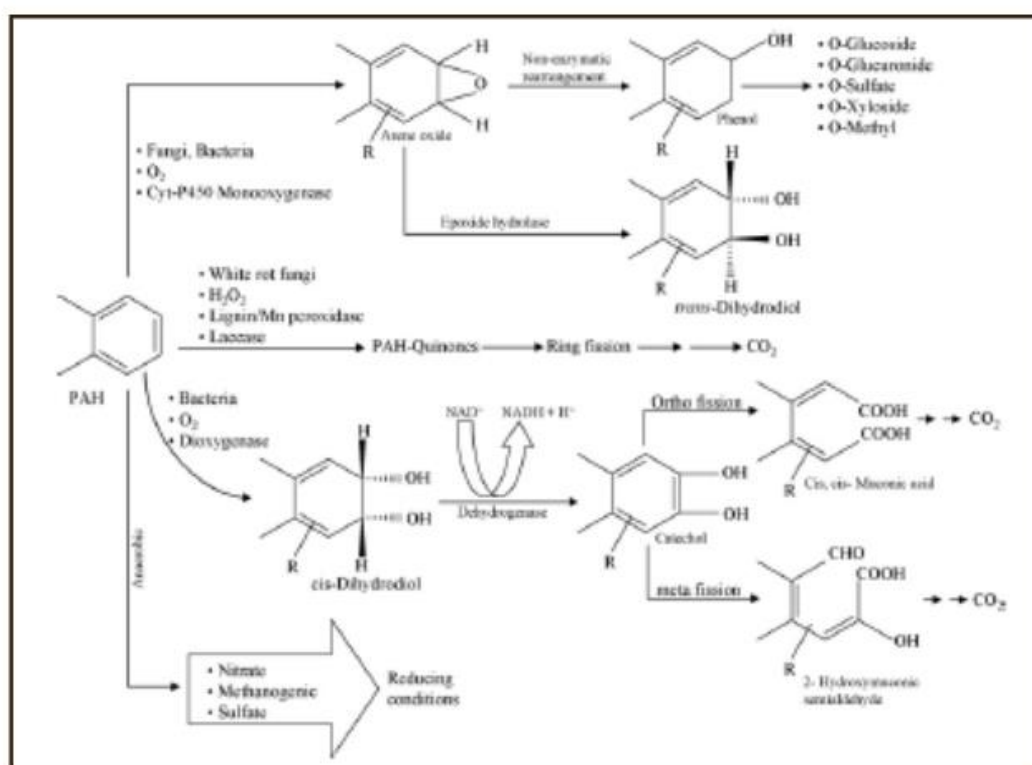


Σχήμα 1: Ο κύκλος ζωής των ΡΑΗ στο νερό (Καρκαλέτσης, 2005)

Η περιεκτικότητα σε ΡΑΗs που απαντώνται σε φυτά ή σε ζώα που ζουν στο νερό μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους στο χώμα ή στο νερό. Αυτό συμβαίνει καθώς οι συγκεκριμένες χημικές ουσίες είναι υδρόφοβες και έτσι ακολουθείται μία διαδικασία βιοσυσσώρευσης, βιοσυγκέντρωσης και βιομεγένθυσης αυτών στους υδρόβιους οργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, ο όρος της βιοσυσσώρευσης αναφέρεται στο καθαρό ποσό πρόσληψης των χημικών ουσιών από το περιβάλλον μέσω μιας ή όλων των διαθέσιμων διαδρομών (π.χ αναπνοή, τροφή, δέρμα). Ο όρος της βιοσυγκέντρωσης είναι πιο ειδικός καθώς αναφέρεται στην συσσώρευση μίας μόνο ουσίας από το νερό. Τέλος, όρος της βιομεγένθυσης ορίζεται ως η αύξηση της συγκέντρωσης των χημικών υπολειμμάτων στον ιστό του οργανισμού κυρίως ως αποτέλεσμα της διατροφικής συσσώρευσης. Εξαιτίας και πάλι των ιδιοτήτων των συγκεκριμένων χημικών ουσιών, υπάρχει μία τάση μικρής παραμονής τους στην υδάτινη στήλη και μεγάλης συσσώρευσής τους στα θαλάσσια ιζήματα ή προσρόφησής τους από αιωρούμενα σωματίδια. Επίσης, οι σταθερές Henry των συγκεκριμένων ουσιών αλλά και ο συντελεστής κατανομής τους (Pow) δείχνουν την τάση διαφυγής τους από τη μία φάση (υγρού) προς την άλλη (αέρια). Στον αέρα, τα ΡΑΗs μπορούν να φωτοδιασπαστούν σε άλλες χημικές ουσίες, γενικά σε μια περίοδο ημερών έως και εβδομάδων. Η διάσπασή τους όμως στο νερό διαρκεί γενικά από εβδομάδες έως

και μήνες ανάλογα με τη δομή τους. Αν και τα PAHs μπορούν να υποστούν πτητικοποίηση, φωτόλυση και χημική διάσπαση, η αποσύνθεσή τους από μικροοργανισμούς θεωρείται ως ο κυριότερος τρόπος αποδόμησής τους (Haritash & Kaushik, 2009, Yuan et al., 2001). Τα PAHs βιοαποικοδομούνται βιομετασχηματίζονται σε λιγότερο πολύπλοκους μεταβολίτες και με την ανοργανοποίησή τους (mineralization) παράγονται ανόργανα συστατικά, νερό και CO₂, στην περίπτωση που λαμβάνουν χώρα αερόβιες συνθήκες, ενώ για τις αναερόβιες συνθήκες παράγεται μεθάνιο (CH₄). Ο ρυθμός αποδόμησης τους εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων όπως το pH, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση οξυγόνου, το μικροβιακό πληθυσμό και το βαθμό εγκλιματισμού του, την ευκολία προσέγγισης των θρεπτικών, την χημική δομή του PAH, κ.α (Haritash & Kaushik, 2009).

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται ο ρυθμός αποδόμησης των PAH



Σχήμα 2: Μηχανισμοί αποδόμησης των PAH (Haritash & Kaushik, 2009)

Γενικά ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων, μυκήτων και αλγών είναι γνωστός για την ικανότητά του να αποδομεί τα PAHs. Τα περισσότερα από αυτά έχουν απομονωθεί από μολυσμένα με PAHs χώματα και ιζήματα. (Zhang et al., Wu et al., 2009)

Τα PAHs που έχουν στο μόριό τους δύο ή τρεις βενζολικούς δακτυλίους αποδομούνται σχετικά εύκολα από αερόβιους μικροοργανισμούς, αντίθετα για εκείνα με μεγαλύτερο μοριακό βάρος και συνεπώς περισσότερους βενζολικούς δακτυλίους έχουν παρατηρηθεί μικρότερα ποσοστά αποδόμησης.

1.2.5 Ισχύουσα Νομοθεσία

Ορισμοί:

«Επιφανειακά ύδατα»: είναι τα εσωτερικά ύδατα, εκτός των υπογείων υδάτων, τα μεταβατικά και τα παράκτια ύδατα.

«Εσωτερικά ύδατα»: είναι το σύνολο των στάσιμων ή των ρεόντων επιφανειακών υδάτων και όλα τα υπόγεια ύδατα, τα οποία βρίσκονται προς την πλευρά της ξηράς σε σχέση με τη γραμμή βάσης, από την οποία μετράται το εύρος των χωρικών υδάτων.

«Μεταβατικά ύδατα»: είναι συστήματα επιφανειακών υδάτων κοντά σε στόμια εκβολής ποταμών, τα οποία είναι εν μέρει αλμυρά λόγω της γειτνίασής τους με παράκτια ύδατα, αλλά τα οποία επηρεάζονται ουσιαστικά από ρεύματα γλυκών υδάτων.

«Παράκτια ύδατα»: είναι τα επιφανειακά ύδατα που βρίσκονται στην πλευρά της ξηράς μιας γραμμής, κάθε σημείο της οποίας βρίσκεται σε απόσταση ενός ναυτικού μιλίου προς τη θάλασσα από το πλησιέστερο σημείο της γραμμής βάσης από την οποία μετράται το εύρος των χωρικών υδάτων, και τα οποία, κατά περίπτωση, εκτείνονται μέχρι του απώτερου ορίου των μεταβατικών υδάτων.

Ευρωπαϊκά όρια για πόσιμο νερό

Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption.

Adopted by the Council, on 3 November 1998 :

Benzo[a]pyrene: 0,01 µg/L

PAHs: 0,1 µg/L

Πρότυπα Ποιότητας Περιβάλλοντος (ΠΠΠ)

Μέγιστη Επιτρεπόμενη Συγκέντρωση για επιφανειακά ύδατα ενδοχώρας:

Naphthalene: 130 µg/L

Pyrene: -

Benzo[a]pyrene: 0,27 µg/L

Μέγιστη Επιτρεπόμενη Συγκέντρωση για λοιπά επιφανειακά ύδατα:

Naphthalene: 130 µg/L

Pyrene: -

Benzo[a]pyrene: 0,027 µg/L

1.3 Πλαστικά

Τα πλαστικά είναι συνθετικά οργανικά πολυμερή τα οποία προέρχονται από μη ανανεώσιμες πηγές πρώτων υλών όπως το αργό πετρέλαιο, ο ορυκτός άνθρακας και το φυσικό αέριο. Παρόλο που εμφανίστηκαν πριν από έναν αιώνα περίπου, η ετήσια παραγωγή τους στις μέρες μας υπερβαίνει τους 280 εκατομμύρια τόνους σε παγκόσμιο επίπεδο (Plastic Europe, 2013). Τα πλαστικά είναι ελαφριά, σταθερά, ανθεκτικά και φθηνά υλικά, χαρακτηριστικά που τα καθιστούν κατάλληλα για την κατασκευή μεγάλου εύρους προϊόντων. Οι ίδιες όμως αυτές ιδιότητες των πλαστικών τα καθιστούν και πηγή κινδύνου για το περιβάλλον (Derraik, 2002).

1.3.1 Χαρακτηριστικά πλαστικών υλικών

Πολυαιθυλένιο (Polyethylene, PE)

Το PE είναι το πιο απλό πολυμερές από υδρογονάνθρακες και αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό που παρασκευάστηκε στην Αγγλία το 1933 με πολυμερισμό του αιθυλενίου. Το αιθυλένιο μπορεί να σχηματιστεί είτε με υδρογόνωση ακετυλενίου, είτε με αφυδάτωση αιθανόλης.

Υπάρχουν δύο κατηγορίες PE, χαμηλής (LDPE) και υψηλής πυκνότητας (HDPE). Τα PE χαμηλής πυκνότητας αποτελούνται από μόρια με διακλαδώσεις, ενώ τα PE υψηλής πυκνότητας είναι ουσιαστικά γραμμικά.

Πολυπροπυλένιο (Polypropylene, PP)

Το PP είναι το λιγότερο γνωστό βιομηχανικό πολυμερές. Προκύπτει από τον πολυμερισμό του προπυλενίου, με χρήση καταλύτη Ziegler-Natta. Το μονομερές προπυλένιο παράγεται από τη διύλιση του πετρελαίου. Το πολυπροπυλένιο εμφανίζει υψηλή ακαμψία, σκληρότητα και σταθερότητα με αποτέλεσμα να βρίσκει πολλές εφαρμογές στο εμπόριο. Είναι αδιάλυτο σε πολλούς γνωστούς διαλύτες σε θερμοκρασία δωματίου. Το PP βρίσκει εφαρμογή σε οικιακές συσκευές, όπως ψυγεία, ραδιόφωνα, και τηλεοράσεις. Χρησιμοποιείται, επίσης, σε κολλητικές ταινίες, σωλήνες, δοχεία φύλαξης, καλύμματα καθισμάτων, σχοινιά και δίχτυα.

Πολυαμίδια (Polyamides, PA)

Το PA είναι ένα ημι-κρυσταλλικό (semi-crystalline) πολυμερές. Υπάρχουν δύο είδη: τα PA που είναι κατασκευασμένα από ένα βασικό υλικό (PA 6) και αυτά που είναι κατασκευασμένα από δύο βασικά υλικά (PA 66). Τα PA δημιουργούνται είτε φυσικά (π.χ από μαλλί και μετάξι) είτε συνθετικά (π.χ από nylon).

Τα πολυαμίδια έχουν εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες και μπορεί να είναι είτε σκληρά και άκαμπτα είτε μαλακά και ελαστικά. Απορροφούν υγρασία και έχουν

εξαιρετική αντοχή στην τριβή και στην φθορά (slide and wear characteristics). Τα πολυαμίδια συνήθως χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία υφασμάτων και στην αυτοκινητοβιομηχανία.

1.3.2 Μικροπλαστικά

Τα πλαστικά απορρίμματα χωρίζονται στις εξής κατηγορίες: τα μάκροπλαστικά > 5 mm και τα μικροπλαστικά < 5 mm. Τα μικροπλαστικά σωματίδια αποτελούνται είτε από πλαστικά πολύ μικρού μεγέθους που χρησιμοποιούνται ως λειαντικό μέσο (scrubbers) σε προϊόντα όπως τα καλλυντικά, τα καθαριστικά, τα αφρόλουτρα, είτε από πλαστικά σφαιρίδια (pellets) τα οποία είναι η πρώτη ύλη στη βιομηχανία των θερμοπλαστικών τα οποία καταλήγουν στο περιβάλλον κατά την διεργασία παραγωγής των πλαστικών ή κατά την μεταφορά τους, είτε πλαστικά θραύσματα (plastic fragments) τα οποία προέρχονται από την διάσπαση μεγαλύτερων πλαστικών προϊόντων τα οποία συνήθως επιπλέουν στην θάλασσα. Τα δύο πρώτα θεωρούνται ως η κύρια πηγή των μικροπλαστικών στην θάλασσα ενώ η τρίτη θεωρείται ως δευτερεύουσα πηγή (Hidalgo-Ruz et al., 2012).

Η διάσπαση των μεγαλύτερων πλαστικών αντικειμένων οφείλεται σε φωτολυτικές, μηχανικές και βιολογικές διεργασίες. Τα πλαστικά υλικά φωτοδιασπώνται αργά και σε πολλά μικρά κομμάτια. Κατά την φωτοδιάσπαση το φως του ηλίου οξειδώνει τη χημική δομή με αποτέλεσμα το σπάσιμο των δεσμών, μειώνοντας έτσι το μοριακό βάρος των πολυμερών, ούτως ώστε τα πλαστικά υλικά να γίνονται εύθραυστα και να αποσυντίθενται. Η διάσπασή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενισχύεται από την δράση των κυμάτων και την τριβή τους με την ιζηματική ύλη. Επίσης ορισμένα πλαστικά είναι ευάλωτα στην βιοδιάσπαση από βακτήρια και μύκητες (Καλαφατά, 2010).

Σε διάφορες παραλίες παγκοσμίως έχουν ανιχνευτεί επίσης μικροπλαστικά που βρίσκουν εφαρμογή σε ρουχισμό (πολυεστέρες), σε συσκευασίες (PE, PP) και σε κάβους (PA) (Moore, 2008, Browne et al., 2007).

Τέλος, τα μικροπλαστικά που προέρχονται από προϊόντα οικιακής χρήσης, απόβλητα από μονάδες επεξεργασίας πλαστικών υλών και σαπούνια καταλήγουν στους υδατικούς αποδέκτες μέσω των λυμάτων και των υπονόμων με αποτέλεσμα

να συσσωρεύονται στο θαλάσσιο περιβάλλον (Moore, 2008, Browne et al., 2007).

1.3.3 Pellets

Τα pellets είναι η σημαντικότερη πρώτη ύλη στη βιομηχανία των θερμοπλαστικών. Το σχήμα τους είναι είτε κυλινδρικό είτε σφαιρικό με διάμετρο 1 – 5mm. Τα pellets καταλήγουν στο περιβάλλον κατά λάθος κατά την χρήση τους για την παραγωγή πλαστικών ή κατά την μεταφορά τους (runoff pellets). Ορισμένες εταιρίες πλαστικών (π.χ., ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΚΡΗΤΗΣ ΑΕ, Ηράκλειο Κρήτης) συλλέγουν τα pellets που έχουν διασκορπιστεί στους χώρους της εγκατάστασης, τα οποία αντιστοιχούν σε πολλούς τόνους υλικού κατά έτος και τα επαναχρησιμοποιούν. Οι επιπτώσεις των πλαστικών θαλάσσιων απορριμμάτων στο περιβάλλον μπορούν να μελετηθούν είτε ως πλαστικά αυτά καθαυτά είτε ως μέσο μεταφοράς των υδρόφοβων ρύπων στο νερό. Πέρα από την αισθητική υποβάθμιση, τα πλαστικά απορρίμματα, που συνήθως καταλήγουν να είναι μικρά σωματίδια, αποτελούν απειλή για την θαλάσσια χλωρίδα και πανίδα.

1.3.4 Μικροπλαστικά ως μέσο μεταφοράς ρύπων στο θαλάσσιο περιβάλλον

Η ανίχνευση οργανικών ενώσεων σε μικροπλαστικά δικαιολογείται με δύο τρόπους. Ο ένας είναι να γίνει η προσθήκη τους κατά την διαδικασία παραγωγής των pellets. Ο δεύτερος τρόπος αναφέρεται στους υδρόφοβους ρύπους που βρίσκονται στο υδατικό περιβάλλον. Οι υδρόφοβοι ρύποι προσκολλούνται στα pellets μέσω της διεργασίας της ρόφησης, όπου υδρόφοβα συστατικά προτιμούν να κατανέμονται στην μη πολική επιφάνεια των πλαστικών. Οι ασπόνδυλοι οργανισμοί δύνανται να καταπιούν τα σωματίδια πλαστικών και οι ρύποι που ροφούνται πάνω σε αυτά, μπορεί να περάσουν στην τροφική αλυσίδα (Cole et al., 2011).

Όταν τα μικροπλαστικά μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις, οι ρύποι που προσροφώνται σε αυτά απεικονίζουν την συνολική ρύπανση καθ' όλη την μεταφορά των μικροπλαστικών από την πηγή τους, και όχι μόνο την ρύπανση στην συγκεκριμένη περιοχή απ' όπου συλλέγονται. Η ανίχνευση συγκεκριμένων ρύπων σε συγκεκριμένη περιοχή μπορεί να υποδηλώνει την πηγή ή την διαδρομή μεταφοράς των μικροπλαστικών. Η λεπτομερής ανάλυση των προσροφημένων

ρύπων πιθανόν να παρέχει πληροφορίες για την πηγή τους ή για την διασπορά και μεταφορά τους (Mato et al., 2001).

1.4 Τεχνικές προετοιμασίας δείγματος

Η προετοιμασία του δείγματος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε πολλές μεθόδους χρωματογραφίας και φασματοσκοπίας, κυρίως στην περίπτωση ανάλυσης περίπλοκων δειγμάτων. Σε πολλά αναλυτικά συστήματα, ο χρόνος που απαιτείται για την προετοιμασία του δείγματος μπορεί να είναι πάνω από το 60% του συνολικού χρόνου. Τα σφάλματα που δημιουργούνται σε αυτό το βήμα αποτελούν την βασικότερη πηγή σφαλμάτων για ολόκληρη την διαδικασία, από την δειγματοληψία μέχρι την ανάλυση, με ποσοστό περίπου 30% επί του συνόλου ενώ μπορεί να φτάσει και το 75%, ιδιαίτερα στις μεθοδολογίες που αναπτύσσονται για την ανάλυση ιχνών (trace analysis). Μία βασική αιτία για τα σφάλματα αυτά είναι το γεγονός ότι η προετοιμασία του δείγματος εμπεριέχει και πολλά στάδια τα οποία γίνονται χειροκίνητα (τυχαία και συστηματικά σφάλματα). Συνεπώς, μια καλή προσέγγιση αποφυγής αυτών των σφαλμάτων είναι η ελαχιστοποίηση των βημάτων που ακολουθούνται για την προετοιμασία του δείγματος. (Somenath Mitra, 2004)

Σαν γενικός κανόνας, τα περισσότερα από τα στάδια της προετοιμασίας του δείγματος εμπεριέχουν και ένα βήμα εκχύλισης, το οποίο αποσκοπεί στην μεταφορά των αναλυτών (target analytes) σε μία φάση πιο συμβατή με το σύστημα του οργάνου, να συγκεντρωθούν οι διαλυμένες ουσίες εάν αυτές είναι παρούσες σε επίπεδα ιχνών στις πραγματικές μήτρες και να εξαλειφθούν οι ανεπιθύμητες παρεμβολές. Γι' αυτό τον λόγο και σε συμφωνία με τις αρχές της GAC (Green Analytical Chemistry), έχουν γίνει πολλές καινοτόμες προσεγγίσεις στις διάφορες τεχνικές προετοιμασίας του δείγματος οι οποίες έχουν οδηγήσει σε απλούστευση, σμίκρυνση και εύκολη μεταχείριση των συσκευών ανάλυσης, σε μεγάλη μείωση ακόμα και απουσία οργανικών τοξικών διαλυτών και σε μείωση του όγκου δείγματος που απαιτείται.

Για την ανάλυση ιχνών, πιο συγκεκριμένα, οι μέθοδοι που είναι βασισμένες στην προσρόφηση έχουν αποδειχθεί ότι είναι οι καλύτερες καθώς επιτρέπουν την απευθείας μικροεκχύλιση, ιδίως των πτητικών και ήμι-πτητικών ενώσεων, σχεδόν απ' όλους τους τύπους δείγματος, συμπεριλαμβανομένων των αέριων, των στερεών και των υγρών μητρών. Αυτές οι αναλυτικές τεχνικές οι οποίες γίνονται χωρίς την

χρήση διαλύτη ενισχύουν σημαντικά την εκλεκτικότητα και την ευαισθησία πριν από την εφαρμογή της χρωματογραφίας ή άλλων συνδυασμένων τεχνικών.

Αν και μερικές από τις πλέον διαδεδομένες μεθοδολογίες χρησιμοποιούν ενεργούς ή δυναμικούς τρόπους επεξεργασίας δείγματος (λόγου χάρη εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE)) , οι στατικοί ή παθητικοί τρόποι κερδίζουν όλο και μεγαλύτερη αποδοχή σχεδόν σε όλους τους επιστημονικούς κλάδους. (Nogueira, 2015)

1.5 Υγρή-υγρή Εκχύλιση

Εκχύλιση υγρού/υγρού ή απλά υγρή εκχύλιση (liquid-liquid extraction, LLE) είναι η διεργασία διαχωρισμού ενός συστατικού υγρού διαλύματος (δηλαδή μιας διαλυμένης ουσίας), δια επαφής και μεταφοράς μάζας αυτού σε άλλον ειδικό υγρό διαλύτη. Οι δύο υγρές φάσεις διαλύματος και ειδικού διαλύτη (ή απλά διαλύτη) πρέπει να είναι μη αναμίξιμες και διακριτές μεταξύ τους (Γεντεκάκης, 2010).

Η ανάλυση της διεργασίας υγρής εκχύλισης προϋποθέτει γνώση της ισορροπίας των φάσεων και των φαινομένων μεταφοράς μάζας. Για την επίτευξη διαχωρισμού είναι απαραίτητο το συστατικό που θέλουμε να διαχωρίσουμε να έχει διαφορετική διαλυτότητα στους δύο υγρούς διαλύτες, δηλαδή σε αυτόν που περιέχεται αρχικά και σε αυτόν που θα μεταφερθεί. Η διεργασία γίνεται κατά κανόνα σε στήλες όπου το υγρό μίγμα και ο διαλύτης ρέουν κατ' αντιρροή.

Η απλούστερη διεργασία υγρής εκχύλισης περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο όπου ο υγρός φορέας C (carrier), δηλαδή το υγρό μίγμα που εμπεριέχει διαλυμένη την προς διαχωρισμό ουσία A (solute) έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη S (solvent). Οι δύο διαλύτες, C και S, πρέπει να είναι κατά το δυνατόν μη αναμίξιμοι. Στη διάρκεια της διεργασίας η ουσία A θα μεταφερθεί από τον διαλύτη C στον διαλύτη S. Πλήρης μεταφορά είναι αδύνατον να επιτευχθεί, όμως εάν η τάση διάλυσης της ουσίας A στον διαλύτη S είναι ικανοποιητικά μεγαλύτερη από αυτή στον διαλύτη C, τότε με την ανάπτυξη διεργασιών εκχύλισης πολλαπλών σταδίων μπορεί να επιτευχθεί επαρκής μεταφορά και δηλαδή καλός διαχωρισμός.

Κρίσιμο σημείο στην διεργασία της υγρής εκχύλισης είναι η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη. Ο διαλύτης σε γενικές γραμμές πρέπει να είναι μη-τοξικός, φθηνός, εύκολα ανακυκλώσιμος, σχετικά μη αναμίξιμος με τα άλλα συστατικά της τροφοδοσίας με εξαίρεση το συστατικό προς διαχωρισμό και να έχει διαφορετική πυκνότητα με την τροφοδοσία ώστε να υφίσταται εύκολος διαχωρισμός των φάσεων.

Το βασικό μειονέκτημα LLE, συνίσταται στο γεγονός ότι απαιτεί μεγάλους όγκους διαλύτη και είναι και αρκετά χρονοβόρες. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι μικροεκχύλισης όπως η Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (solid phase microextraction, SPME) ή η Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (liquid phase microextraction, LPME) οι οποίες αναλύονται στην συνέχεια της παρούσας εργασίας.

1.6 SPME και LPME

Η ανάγκη για την εύρεση πιο γρήγορων και φθηνών τεχνικών εκχύλισης των ουσιών από το υπό εξέταση δείγμα οδήγησε, όπως ήδη αναφέρθηκε, στην ανάπτυξη των τεχνικών της μικροεκχύλισης. Οι τεχνικές μικροεκχύλισης μπορούν να θεωρηθούν ως μη διεξοδικές μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος, οι οποίες βασίζονται στη χρήση ενός πολύ μικρού όγκου από το εκχυλιστικό μέσο, συγκρινόμενες ως προς τον όγκο του δείγματος (Pawliszyn, Pedersen-Bjergaard, 2006). Χαρακτηρίζονται δε από τη βαρυσήμαντη συμβολή τους στη βελτίωση της απόδοσης ως προς την προετοιμασία του δείγματος, υιοθετώντας μια απλή και χρονικώς αποδοτική προσέγγιση. Παρά τις διάφορες τεχνικές μικροεκχύλισης που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία, η εμφάνιση της SPME το 1990 (Arthur, Pawliszyn, 1990) αποτέλεσε σημείο αναφοράς.

Η SPME είναι μία γρήγορη μέθοδος στην οποία δεν χρησιμοποιείται καθόλου οργανικός διαλύτης. Η συσκευή αποτελείται από ίνες (fibers) επικαλυμμένες με πολυμερή υλικά τα οποία επιτρέπουν την προσρόφηση των ουσιών-στόχων πάνω σε αυτά και προστατεύονται μέσα σε μία σύριγγα. Η προσρόφηση επιτυγχάνεται καθώς οι αναλυτές βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ του υδατικού διαλύματος, της

υπερκείμενης φάσης και του fiber. Επειδή οι αναλύτες που είναι προσροφημένοι στο fiber, μεταφέρονται άμεσα προς ανάλυση στην στήλη χρωματογραφίας επιτυγχάνονται πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης. Ωστόσο, παρά τα θετικά σημεία της SPME, προκύπτει το πρόβλημα ότι το fiber είναι πολύ εύθραυστο και έχει περιορισμένο χρόνο ζωής (Tsenga et al., 2014).

Η επακόλουθη βιομηχανική διάδοση της SPME σηματοδότησε την απαρχή μιας έντονης ερευνητικής δραστηριότητας στο πεδίο αυτό. Με το πέρας ορισμένων ετών, προτάθηκε στη βιβλιογραφία η μικροεκχύλιση με διαλύτη, γνωστή και ως LPME (Liu, Dasgupta, 1996 και Jeannot, Cantwell, 1997). Η καινοτομία της συνίσταται στην ελαχιστοποίηση της παραδοσιακής Υγρής – Υγρής Εκχύλισης, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του λόγου των όγκων της φάσης δέκτη προς τη φάση δότη (Psillakis, Kalogerakis, 2002). Η LPME έχει αναπτυχθεί με πολλές παραλλαγές όπως η Μικροεκχύλιση Μονής Σταγόνας (Single drop Microextraction, SDME), η hollow-fiber-protected liquid-phase microextraction (HF-LPME) και η solvent bar microextraction (SBME). Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούν μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη και έχουν υψηλή ευαισθησία όμως απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης προκειμένου να επιτευχθούν ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης (LOD) (Tseng et al., 2014).

Αυτές οι δύο μέθοδοι είναι οι πιο διαδεδομένες για την εκχύλιση των PAH από υδατικά διαλύματα. Τα πλεονεκτήματά τους είναι ότι συνδυάζουν ταχύτητα, απλότητα, χαμηλό κόστος και είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Επιπλέον, με τις τεχνικές αυτές καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση ρυπαντών σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα όπου συνήθως απαντώνται σε ίχνη.

1.7 Stir Bar Sorptive Extraction

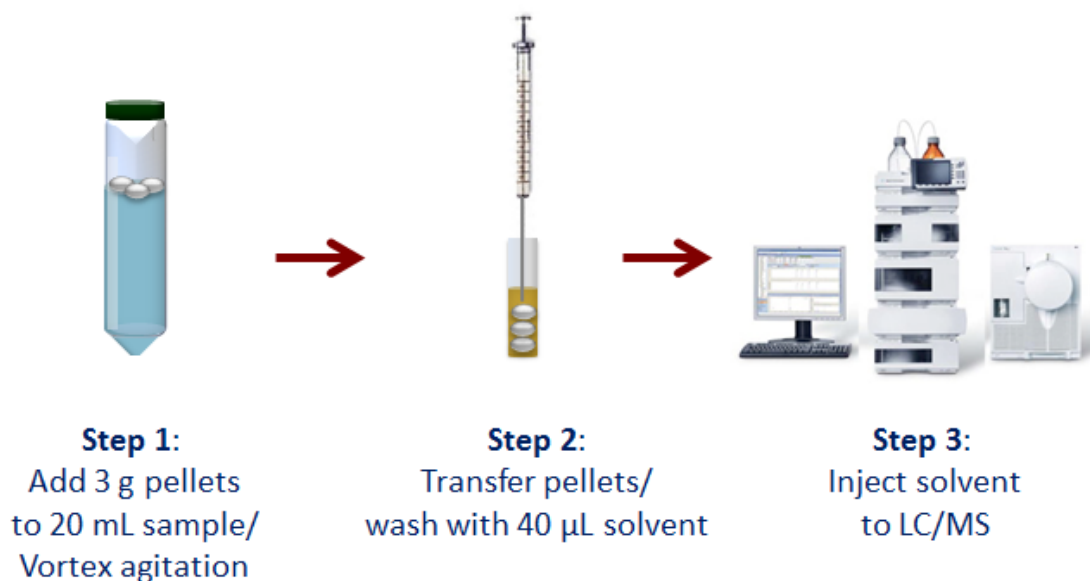
Η Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) είναι μία πρόσφατη μέθοδος βασισμένη στην προσρόφηση. Προτάθηκε από τον Baltussen και τους συνεργάτες του όταν κατά τύχη παρατηρήθηκε ότι η Teflon magnetic stir bar είχε την ικανότητα να συγκρατεί τους μη πολικούς διαλύτες κατά την διάρκεια πειραμάτων που εκτελούνταν σε υδατικά διαλύματα με την SPME μέθοδο. Αν και αυτές οι δύο μέθοδοι είναι βασισμένες στις ίδιες αρχές η SBSE παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία, μεγαλύτερη προσροφητική φάση, είναι πιο εύρωστη και έχει εφαρμοστεί αποτελεσματικά στην παρακολούθηση ιχνών των οργανικών ενώσεων που είναι σε προτεραιότητα σε πραγματικές μήτρες από διάφορα ερευνητικά πεδία.

Η συσκευή SBSE είναι γνωστή διεθνώς με το εμπορικό σήμα Twister και χρησιμοποιεί polydimethylsiloxane (PDMS) σαν πολυμερή φάση η οποία ουσιαστικά χρησιμεύει σαν μία προσροφητική επένδυση από σιλικόνη. Το PDMS επικαλύπτει μία μαγνητική αναδευόμενη μπάρα η οποία είναι ενσωματωμένη σε ένα γυάλινο περίβλημα. Η συσκευή τοποθετείται μέσα στο δείγμα το οποίο αναδεύεται πάνω σε μαγνητική πλάκα με την βοήθεια μαγνήτη που υπάρχει κάτω από την στρώση του PDMS και έτσι επιτυγχάνεται η εκχύλιση των αναλυτών στην πολυμερή φάση. Αυτή η μη-πολική πολυμερής φάση προωθεί υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων-στόχων και ο μηχανισμός συγκράτησης ουσιαστικά επιτυγχάνεται με δυνάμεις Van-der-Waals, ωστόσο μπορούν να δημιουργηθούν και δεσμοί υδρογόνου με τα άτομα οξυγόνου του PDMS αλλά αυτό εξαρτάται από την χημική δομή των αναλυτών που εμπλέκονται. Το PDMS παρουσιάζει ενδιαφέρουσα διάχυση και θερμο-σταθερές ιδιότητες επιτρέποντάς του να μπορεί να λειτουργεί σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Γι' αυτό τον λόγο η συγκεκριμένη τεχνική η οποία δεν χρησιμοποιεί καθόλου οργανικούς διαλύτες αρχικά είχε συνδεθεί με θερμική εκρόφηση η οποία συνοδευόταν από ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο (Gas Chromatograph). Ο ουσιώδης όγκος του PDMS που λαμβάνει μέρος παρέχει μικρότερη αναλογία φάσης ανάμεσα στην φάση προσρόφησης και στο δείγμα, παρέχοντας εξαιρετική χωρητικότητα και ποσοτικές ανακτήσεις από την SBSE, ειδικά για ουσίες οι οποίες παρουσιάζουν μη-πολικά χαρακτηριστικά. (J.M.F. Nogueira, 2015)

1.8 Προτεινόμενη Μέθοδος Μικρο-Εκχύλισης με Χρήση Pellets

Στην παρούσα εργασία γίνεται για πρώτη φορά η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μίας καινούριας μεθόδου μικροεκχύλισης η οποία ονομάζεται Plastic Pellets Sorptive Extraction (PPSE). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η ουσία προσροφάται στα pellets από την υδατική φάση και στην συνέχεια εκχυλίζεται από τα pellets μέσα στην οργανική φάση. Η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε ένα γρήγορο, απλό και ευαίσθητο μέσο προσυγκέντρωσης προκειμένου για την ανάλυση των PAH. Παρόλο που αρκετές έρευνες έχουν γίνει για την ανάλυση αυτών των ενώσεων χρησιμοποιώντας είτε LPME ή SPME συνδεδεμένες με υγρή ή αέρια χρωματογραφία, το βασικό πλεονέκτημα της παρούσας μεθόδου είναι ότι η ισορροπία αποκαθίσταται εντός μερικών λεπτών, αυξάνοντας επομένως την ακρίβεια και την ευαισθησία μειώνοντας ταυτόχρονα και το συνολικό χρόνο προετοιμασία του δείγματος. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το βήμα της προσρόφησης μπορεί να εφαρμοστεί είτε στο εργαστήριο (dynamic sampling mode), είτε απευθείας σε παράκτια ύδατα (passive sampling mode).

Σύμφωνα με την PPSE συγκεκριμένος αριθμός από pellets τοποθετείται σε ορισμένο όγκο υδατικού διαλύματος που περιέχει τις κύριες ενώσεις και ο οποίος περιέχεται σε ένα φιαλίδιο. Το κλειστό φιαλίδιο το οποίο περιέχει τα πλαστικά pellets και τις ενώσεις που μελετώνται αναδεύεται με τη βοήθεια συσκευής vortex οδηγώντας στην ταχύτερη προσρόφηση των υδρόφοβων PAH στα pellets. Στη συνέχεια τα pellets απομακρύνονται από το υδατικό διάλυμα και αφήνονται να στεγνώσουν για ένα διάστημα περίπου ενός λεπτού. Τα στεγνά πλέον pellets, τοποθετούνται εκ νέου, σε φιαλίδιο, προστίθεται συγκεκριμένος όγκος οργανικού διαλύτη και αναδεύεται με την βοήθεια συσκευής vortex παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο ταχύτερες κινητικές εκχύλισης των κύριων ενώσεων. Με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας η οργανική φάση απομακρύνεται από τα pellets και εισάγεται σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.



Σχήμα 4: PPSE

1.8.1 Βελτιστοποίηση της μεθόδου και παράμετροι που την επηρεάζουν

Επιλογή του οργανικού διαλύτη

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα στην βελτιστοποίηση της μεθόδου της μικροεκχύλισης. Ο οργανικός διαλύτης-δέκτης των κύριων ενώσεων πρέπει να έχει χαμηλή πτητικότητα για τον περιορισμό της εξάτμισής του από το διάλυμα, να είναι συμβατός με το σύστημα ανίχνευσης της HPLC και ελέγχεται η πολικότητα και οι ιδιότητες δεσμού υδρογόνου που αυξάνουν την ανάκτηση του αναλύτη στην οργανική φάση.

Επιλογή είδους από τα pellets

Το είδος του pellet που θα χρησιμοποιηθεί σαν πολυμερής φάση για την προσρόφηση των ενώσεων παίζει σημαντικό ρόλο. Το κάθε είδος πλαστικού παρουσιάζει διαφορετικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες τα οποία επηρεάζουν την ανάκτηση του εκάστοτε αναλύτη σε αυτά.

Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης

Η ανάδευση του διαλύματος χρησιμοποιείται για την επιτάχυνση της προσρόφησης των ενώσεων από την υδατική φάση στην πολυμερή φάση των pellets και για την επιτάχυνση της εκχύλισης από την πολυμερή φάση στην οργανική. Με την αύξηση της ταχύτητας έχουμε γρηγορότερη κίνηση των μορίων των ενώσεων που μελετούνται και συνεπώς και γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη ρόφηση από την υδατική στην στερεή φάση.

Επιλογή του όγκου της φάσης δότη και δέκτη

Ο όγκος του υδατικού διαλύματος και ο όγκος του οργανικού διαλύτη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου που ακολουθεί την εκχύλιση. Όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος του υδατικού διαλύματος τόσο μεγαλύτερη ποσότητα των χημικών ενώσεων προσροφάται από τα pellets, ενώ όσο μικρότερος είναι ο όγκος του οργανικού διαλύτη πραγματοποιείται μεγαλύτερη προσυγκέντρωση των ουσιών που αναλύονται στην οργανική φάση. Βέβαια, ο όγκος του οργανικού διαλύτη που θα ανακτηθεί πρέπει να είναι αρκετός για την εισαγωγή του στην αναλυτική συσκευή.

Επιλογή του χρόνου εκχύλισης

Η μεταφορά της μάζας εξαρτάται από τον χρόνο και ο ρυθμός της ελαττώνεται κατά την επίτευξη της ισορροπίας. Επειδή συνήθως η εκχύλιση είναι μία χρονοβόρα διαδικασία, κατά την επιλογή του χρόνου εκχύλισης λαμβάνονται υπόψη η επίτευξη ικανοποιητικής προσυγκέντρωσης σε χρόνο ο οποίος να είναι ικανοποιητικός και μικρότερος από τον χρόνο που διαρκεί η αναλυτική τεχνική.

Προσθήκη άλατος

Ανάλογα με τη φύση των ενώσεων που μελετούνται μερικές φορές η προσθήκη άλατος μπορεί να μειώσει τη διαλυτότητά τους στο νερό βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο την εκχύλιση. Η προσθήκη άλατος μπορεί να έχει θετική, αρνητική ή μηδενική επίδραση.

1.9 Παθητική δειγματοληψία θαλασσινού νερού

Η παρακολούθηση των οργανικών ρύπων στα θαλάσσια οικοσυστήματα είναι ακριβή και χρονοβόρα, αλλά απαιτείται από Διεθνείς συνθήκες και νομοθεσία όπως είναι οι Water Frame Directive (WFD, 2000/60/EC) και Marine Strategy Framework Directive (MSFD, 2008/56/EC). Εμπεριέχει συχνή δειγματοληψία (συχνότερα από μηνιαία) με εξειδικευμένα σκάφη για την έρευνα. Ανάλογα με το πρόγραμμα παρακολούθησης απαιτείται η συλλογή είτε θαλασσινού νερού, είτε ιζήματος είτε ζώντων οργανισμών ή μικροοργανισμών. Αυτά τα δείγματα συχνά αποτελούν πρόκληση για την αναλυτική μεθοδολογία καθώς πρώτον, οι ουσίες ενδιαφέροντος βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (επίπεδα ppt) και δεύτερον, η πολυπλοκότητα των μητρών μπορεί να οδηγήσει σε παρεμβολές. Τα δείγματα που προκύπτουν από σημειακή δειγματοληψία αντιπροσωπεύουν την κατάσταση του περιβάλλοντος σε συγκεκριμένο χώρο και χρόνο. Ωστόσο, το θαλάσσιο οικοσύστημα είναι ένα περίπλοκο και δυναμικό σύστημα που επηρεάζεται από παλίρροιες, ρεύματα, εκβολές ποταμών, σημειακές πηγές όπως λιμάνια, μαρίνες και δρομολόγια των πλοίων. Γι' αυτόν τον λόγο, αναλυτικές μετρήσεις των οργανικών μικρο-ρύπων σε θαλάσσια οικοσυστήματα είναι συχνά δύσκολο να ερμηνευτούν σε ένα γενικό πλαίσιο παρακολούθησης των τάσεων και της αξιολόγησης του περιβαλλοντικού κινδύνου (Monteyne et al., 2013).

Ένας τρόπος να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα παρακολούθησης είναι η χρήση των παθητικών δειγματοληπτών. Οι παθητικοί δειγματολήπτες αποτελούνται από μία φάση στην οποία οι οργανικοί ρύποι μπορούν να διαχυθούν. Αυτή η διαδικασία διάχυσης οδηγείται από την χημική δραστηριότητα των διαλυμένων ενώσεων μεταξύ του περιβάλλοντος και του δειγματολήπτη (Reichenberg and Mayer, 2006). Οι μικρο-ρύποι μεταφέρονται και ενσωματώνονται στους δειγματολήπτες μετά από μία χρονική περίοδο (από κάποιες εβδομάδες έως κάποιους μήνες). Με την σημειακή δειγματοληψία είναι εύκολο να χαθεί μία επεισοδιακή ρύπανση, αντίθετα με τους παθητικούς δειγματολήπτες μία τέτοια ρύπανση θα ανιχνευτεί. Οι ρύποι-στόχοι έχουν μεγάλη τάση να μεταφερθούν προς τους δειγματολήπτες και οι δειγματολήπτες τους συσσωρεύουν για μεγάλο χρονικό διάστημα ή μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καταφέρνουν οι

δειγματολήπτες να συγκεντρώσουν τις ενώσεις, επιτρέποντας τον εντοπισμό ακόμα και πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων των συγκεκριμένων ουσιών. Συγκριτικά με τις κλασικές μεθόδους δειγματοληψίας, το κόστος της ανάλυσης των παθητικών δειγματοληπτών είναι χαμηλότερο χάρη στην σχετικά απλή μεταχείριση του δείγματος, στις περιορισμένες παρεμβολές της μήτρας και στα αρκετά χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (Vrana et al., 2005; Greenwood et al., 2007; Allan et al. 2009). Καθώς οι παθητικοί δειγματολήπτες αντιπροσωπεύουν το ελεύθερα διαλυτό κλάσμα των ρυπαντών στο περιβάλλον, δημιουργείται μια ξεκάθαρη σχέση μεταξύ της βιοδιαθεσιμότητας και των μετρούμενων συγκεντρώσεων (Sijm et al., 2000; Huckins et al., 2006; Reinchenberg and Mayer, 2006) επομένως η σχέση της οξυζιμότητας των ουσιών απλοποιείται. Οι Allan et al. (2009) έδειξαν ότι οι μετρήσεις των υδρόφοβων οργανικών ρυπαντών στην ελεύθερα διαλυμένη φάση (freely dissolved phase) των θαλάσσιων οικοσυστημάτων είναι λιγότερο μεταβλητή απ' ό,τι στην ολική υδατική φάση γιατί επηρεάζονται από την περιεκτικότητα σε στερεά σωματίδια της ύλης. Αυτό σημαίνει ότι η συχνότητα της δειγματοληψίας μπορεί να μειωθεί με την χρήση παθητικών δειγματοληπτών. (E.Monteyne et al., 2013)

Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν ακατέργαστα βιομηχανικά πλαστικά πολυαιθυλενίου (PE pellets) τα οποία λειτούργησαν σαν παθητικοί δειγματολήπτες για PAH σε παραθαλάσσια ύδατα στο Νομό Χανίων. Συγκεκριμένα, στη μαρίνα της Νέας Χώρας τοποθετήθηκαν τα pellets και γινόταν δειγματοληψία και ανάλυση κάθε δώδεκα ώρες μέχρι να επιτευχθεί το σημείο ισορροπίας.

1.10 Επίπεδα ρύπανσης από ΡΑΗ σε θαλάσσια δείγματα

Παρουσιάζεται πίνακας με τα επίπεδα ΡΑΗ που εντοπίστηκαν σε διάφορες παραθαλάσσιες περιοχές μετά από μελέτη που εκπονήθηκε στον Ελλαδικό χώρο.

Περιοχή Μελέτης	Επίπεδα ΡΑΗ (ppb)
Θερμαϊκός Κόλπος	72
Θερμαϊκός Κόλπος	40
Σαρωνικός Κόλπος	75
Βόρειος Ευβοϊκός Κόλπος	51
Νότιος Ευβοϊκός Κόλπος	35
Κορινθιακός Κόλπος	52
Μαλιακός Κόλπος	32
Παγασητικός Κόλπος	51
Ποταμός Νέστος	37
Σαντορίνη	39
Αλόνησος	40
Λέσβος	25
Ρόδος	31
Γαύδος	31

Πίνακας 1: Επίπεδα ΡΑΗs στις διάφορες περιοχές μελέτης (Tsangaris et al., 2011)

Στην συνέχεια, παρουσιάζεται πίνακας με τα επίπεδα των συγκεκριμένων ΡΑΗ που μελετώνται στην παρούσα εργασία, τα οποία εντοπίστηκαν σε διάφορες παραθαλάσσιες περιοχές μετά από μελέτη που εκπονήθηκε στην Βόρειο-Δυτική Μεσόγειο. Μελετήθηκαν 22 παραθαλάσσιες περιοχές και 17 λιμάνια. Naphthalene εντοπίστηκε σε 4 παραθαλάσσιες περιοχές και σε 16 λιμάνια, Pyrene εντοπίστηκε σε 3 παραθαλάσσιες περιοχές και σε 15 λιμάνια, ενώ το Benzo[a]pyrene εντοπίστηκε σε 1 λιμάνι.

	Παράκτια Ύδατα (ppb)			Νερά Λιμανιών (ppb)		
PAH	Min	max	mean	min	max	mean
Naphthalene	0,0014	0,06	0,019	0,0008	0,066	0,0074
Pyrene	0,0007	0,0013	0,0011	0,0015	0,018	0,0033
Benzo[a]pyrene	Bdl	bdl	bdl	0,015	0,015	0,015

Πίνακας 2: Επίπεδα συγκεντρωμένων PAHs στην Βόριο-δυτική Μεσόγειο (Sánchez-Avila et al., 2012)

Bdl: κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε

1.11 Χρωματογραφία

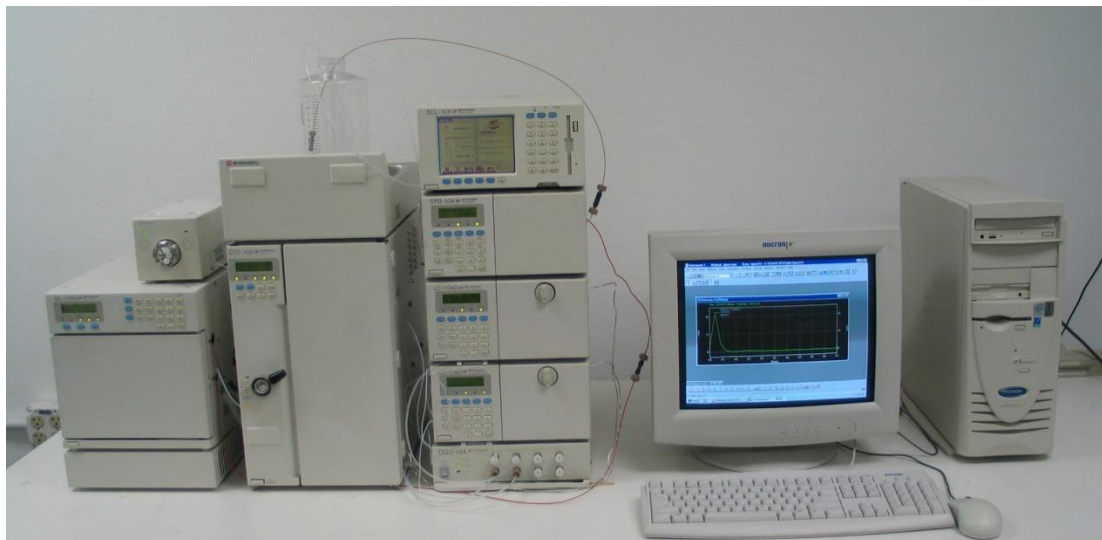
Οι μέθοδοι μικροεκχύλισης ακολουθούνται από μία μέθοδο διαχωρισμού του μίγματος προκειμένου στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των κύριων ενώσεων.

Η χρωματογραφία βασίζεται στην κατανομή των προς διαχωρισμό ουσιών εντός δύο φάσεων, όπου η μία φάση διατηρείται ακίνητη (στατική φάση), ενώ η δεύτερη βρίσκεται υπό συνεχή ροή (κινητή φάση).

Το προς διαχωρισμό μίγμα εισάγεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης στη στατική φάση. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά διαχωρίζονται. Οι διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρή ή αέρια) ή της στατικής (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα), ως προς το μηχανισμό στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός (προσρόφηση, ιοντοανταλλαγή, κατανομή, μέγεθος μορίων) και ως προς το μέσο στο οποίο έχει τοποθετηθεί η στατική φάση (στήλη, λεπτή στοιβάδα πάνω σε γυάλινη πλάκα, χαρτί). Οι κυριότερες διαχωριστικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των PAHs είναι αυτές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης

(HPLC) και της αέριας χρωματογραφίας (GC).

1.11.1 HPLC



Εικόνα 1: HPLC της Shimadzu

Η HPLC αποτελεί μια από τις πλέον αξιόπιστες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης, με ευρύτατη εφαρμογή στην επίλυση αναλυτικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων.

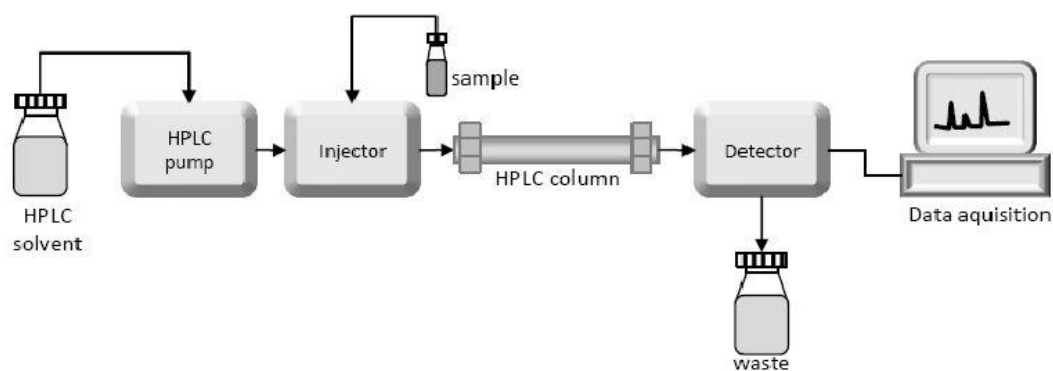
Το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με την βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκχυλίζονται το ένα μετά το άλλο. Η διέλευση της κινητής φάσης από τη χρωματογραφική στήλη καλείται έκλουση. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται σαν εκλουστικά πρέπει να απαερώνονται για την αποφυγή φυσαλίδων και ασταθούς πίεσεως στο σύστημα ροής. Υπάρχουν δύο τεχνικές έκλουσης, η ισοκρατική κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή και η βαθμιδωτή κατά την οποία η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται με σταθερό ρυθμό.

Το τελευταίο τμήμα της διάταξης HPLC είναι ο ανιχνευτής, ο οποίος μετρά μία χαρακτηριστική ιδιότητα του διαχωριζόμενου συστατικού, όπως π.χ. η απορρόφηση στο UV, ο φθορισμός, η ηλεκτρική αγωγιμότητα και ανάλογα με τη συγκέντρωσή του δίνει το κατάλληλο σήμα.

Ο ανιχνευτής συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την ολοκλήρωση του χρωματογραφήματος και τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των συστατικών του

μίγματος.

Η ανάλυση της HPLC μπορεί να είναι κανονικής φάσεως ή αντίστροφης. Στην περίπτωση της αντίστροφης φάσης η κινητή φάση είναι πολικός διαλύτης όπως νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, τετραϋδροφουράνιο ή μίγμα αυτών. Η στατική φάση είναι υδρογονάνθρακες με 18 ($C_{18}H_{38}$) ή 8 (C_8H_{18}) άτομα άνθρακα ή με διφαινύλια ή με ομάδες κυανίου κ.λ.π. που σχηματίζουν ένα υγρό υμένιο που προσροφάται ή δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια ενός στερεού υποστρώματος, συνήθως silica gel.



Σχήμα 3: Τρόπος λειτουργίας HPLC

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Υλικά

2.1.1 Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία δειγμάτων προς ανάλυση είναι τα παρακάτω:

1. Naphthalene του οίκου Sigma-Aldrich, καθαρότητας 98%
2. Pyrene του οίκου Sigma-Aldrich, καθαρότητας 98%
3. Benzo[a]pyrene του οίκου Sigma-Aldrich, καθαρότητας 98%
4. Anthracene-d₁₀ του οίκου Supelco
5. Ακετονιτρίλιο του οίκου Merk με βαθμό καθαρότητας για Υγρή Χρωματογραφία
6. Ακετόνη του οίκου Sigma-Aldrich

Τα πυκνά πρότυπα ήταν ακετονικά διαλύματα των 100 mg/L για τα Naphthalene, Pyrene και Benzo[a]pyrene. Τα πρότυπα εργασίας ετοιμάζονταν καθημερινά στα επιθυμητά επίπεδα συγκεντρώσεων και χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος EASYpureRF, το οποίο προμηθεύτηκε από την Barnstead/Thermolyne.

2.1.2 Όργανα – Συσκευές

1. Γυάλινο φιαλίδιο των 22 mL με βιδωτό πώμα
2. Lens cleaning tissue
3. Test tube του 1 mL
4. Γυάλινο φιαλίδιο των 2 mL, HPLC autosampler με καπάκι V-cap
5. Hamilton HPLC μικροσύριγγα των 100 μ L, μοντέλο 710 SNR
6. HPLC system της Shimadzu
7. Αναδευτήρας τύπου vortex (VELP scientifica, Nemco, Europe)
8. Ultrasound system, Branson 2510, USA

2.2 Χαρακτηριστικά υδατικών περιβαλλοντικών δειγμάτων

Τα δείγματα από ποταμό συλλέχθηκαν από τον Ποταμό Κοιλιάρη των Χανίων – Κρήτης (pH 7,5, Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD) = 20 mg/L, Ολικά Διαλυμένα Στερεά (TDS) = 100 mg/L). Τα δείγματα εκροής βιολογικού καθαρισμού συλλέχθηκαν από την Μονάδα Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων της πόλης των Χανίων (pH 7,6, COD = 15 mg/L, TDS = 508 mg/L) η οποία βρίσκεται στη βόριο-δυτική πλευρά της Κρήτης, εξυπηρετώντας περίπου 70.000 κατοίκους.

2.3 Μέθοδος

Σύμφωνα με τη μέθοδο, σε ένα φιαλίδιο χωρητικότητας 22 mL τοποθετήθηκαν τρία plastic pellets LDPE και προστέθηκαν 20 mL υδατικού δείγματος επιμολυσμένου με γνωστή συγκέντρωση όλων των κύριων ενώσεων. Το φιαλίδιο καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και με καπάκι και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση τύπου vortex για 5 min στις 3000 rpm. Κατόπιν, αφαιρέθηκαν τα τρία pellets και τοποθετήθηκαν σε "lens cleaning tissue" για να στεγνώσουν. Τα τρία στεγνά πλαστικά pellets τοποθετήθηκαν σε test tube φιαλίδιο του 1 mL και εισάχθηκαν σε αυτό 100 μ L ακετονιτρίλιου. Το κυλινδρικό φιαλίδιο αναδεύτηκε με τη χρήση vortex αναδευτήρα για 5 min στις 3000 rpm και ανακτήθηκαν 40 μ L της οργανικής φάσης

με την βοήθεια μικροσύριγγας. Η ανακτημένη ποσότητα αναλύθηκε σε σύστημα HPLC. Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

2.4 Αναλύσεις με HPLC-FLD

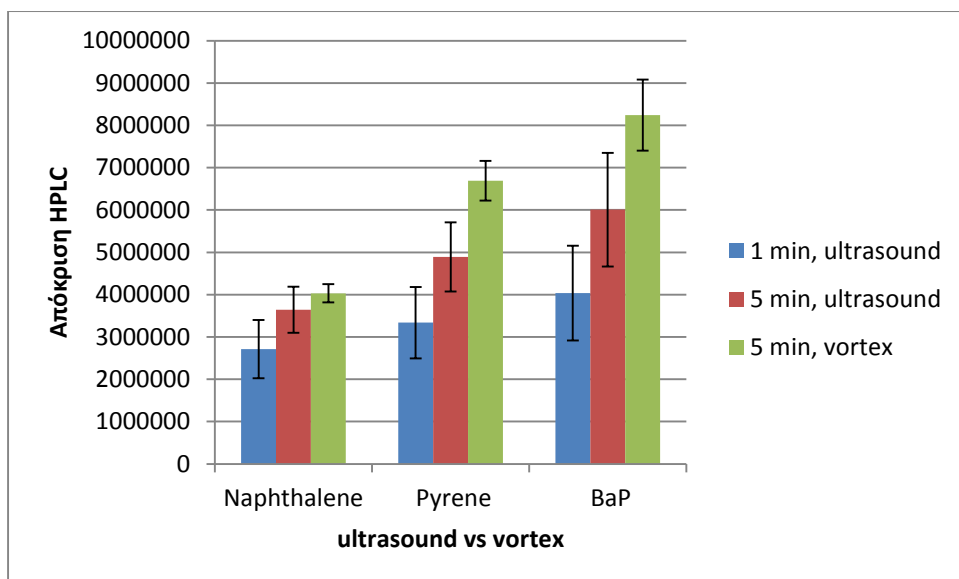
Για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση των κύριων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC κατασκευασμένο από τη Shimadzu και το οποίο περιλαμβάνει μία αντλία δύο διαλυτών και ένα ανιχνευτή φθορισμού (FLD). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν MZ-PAH C18 (250 mm x 3 mm x 5 μm). Η κινητή φάση ήταν μίγμα σε αναλογία 30:70 ακετονιτρίλιο:υπερκάθαρο νερό, με βαθμωτή έκλυση, κατά την οποία μετά τα 5 πρώτα min η αναλογία πήγαινε στο 100:0 όπου παρέμενε για 15 min και στα τελευταία 5 min η αναλογία επανερχόταν στην αρχική, και ροή 1 mL/min. Ο όγκος του δείγματος προς ανάλυση ήταν 20 μL και η ανίχνευση επιτεύχθηκε με ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης τα 270 nm και εκπομπής τα 330 nm για το Naphthalene, μήκος κύματος διέγερσης τα 236 nm και εκπομπής τα 398 nm για το Pyrene και μήκος κύματος διέγερσης τα 290 nm και εκπομπής τα 430 nm για το Benzo[a]pyrene. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 30 °C και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 25 min.

3. Πειραματικά αποτελέσματα και συζήτηση

Για τον σκοπό των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χωρίστηκε η προεπεξεργασία του δείγματος σε δύο μέρη. Το πρώτο βήμα αναφερόταν στην ρόφηση των υδρόφοβων PAHs από τα pellets ενώ το δεύτερο βήμα αφορούσε την εκρόφηση (εκχύλιση) των PAHs στον οργανικό διαλύτη. Για την βελτιστοποίηση της RPSE εξετάστηκαν και βελτιστοποιήθηκαν διάφορες παράμετροι, όπως η επιλογή χρήσης ultrasound ή vortex κατά το δεύτερο βήμα, το είδος και ο αριθμός των πλαστικών πελετών, ο όγκος του διαλύτη και του διαλύματος, ο διαλύτης εκχύλισης, ο χρόνος και η ταχύτητα ανάδευσης τόσο του υδατικού διαλύματος όσο και του οργανικού διαλύτη, και η προσθήκη άλατος.

3.1 Χρήση υπερήχων (Ultrasound system) στην εκχύλιση (βήμα 2)

Αρχικά έπρεπε να αποφασιστεί αν στο στάδιο της εκρόφησης (βήμα 2) θα γινόταν χρήση ultrasound ή συσκευής vortex. Έτσι, 20 mL υδατικού διαλύματος με 20% NaCl και επιμολυσμένο με 5 µg/L σε Naphthalene και 0,5 µg/L σε Pyrene και BaP προστίθονταν σε τρία PE pellets και αναδεύοντουσαν με την βοήθεια vortex (5 min, 3000 rpm) (βήμα 1). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά 100 µL ακετονιτριλίου και το μίγμα τοποθετούταν είτε στους υπέρηχους για δύο διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1 min και 5 min) είτε σε συσκευή vortex (3000 rpm, 5 min) (βήμα 2). Στη συνέχεια, 40 µL από την οργανική φάση συλλεγόντουσαν με την βοήθεια μικροσύριγγας για ανάλυση στην HPLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση υπερήχων ήταν λιγότερο αποτελεσματική από την χρήση του vortex. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε η χρήση vortex στο βήμα 2.



Διάγραμμα 1: Σύγκριση χρήσης ultrasound και vortex στον οργανικό διαλύτη

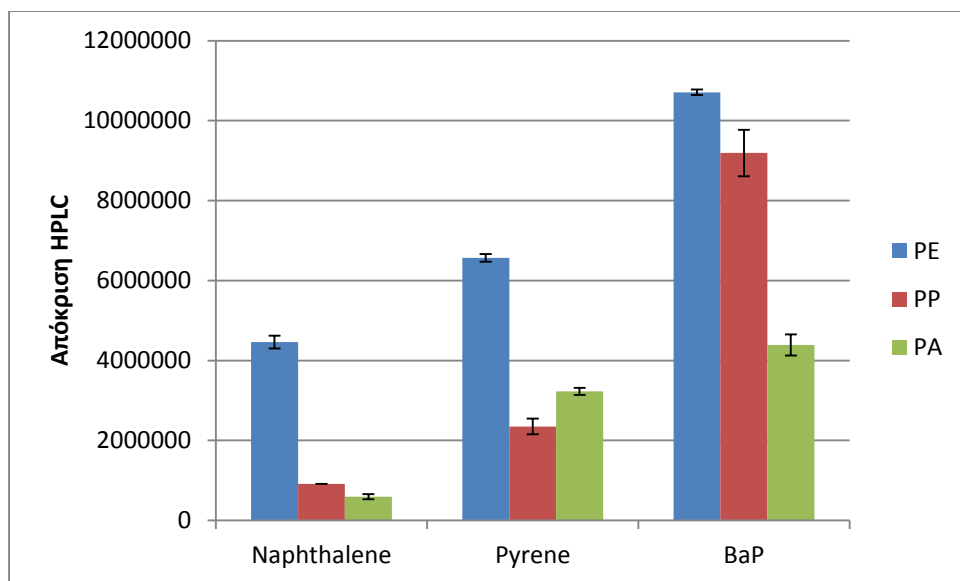
3.2 Επιλογή του οργανικού διαλύτη (βήμα 2)

Η επόμενη παράμετρος που ελέγχθηκε ήταν αυτή του οργανικού διαλύτη που θα χρησιμοποιούταν. Εξετάστηκαν έξι οργανικοί διαλύτες οι οποίοι διέφεραν ως προς την πολικότητά τους. Οι οργανικοί διαλύτες οι οποίοι μελετήθηκαν ήταν το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη, η 1-οκτανόλη, το n-εξάνιο, το τολουόλιο και η ισοπροπανόλη. Κάθε φορά 20 ml διαλύματος υπερκάθαρου νερού επιμολυσμένου με 10 $\mu\text{g/L}$ σε Naphthalene και 1 $\mu\text{g/L}$ σε Pyrene και BaP προστίθονταν σε τρία πλαστικά pellets PE τα οποία ζύγιζαν περίπου 0,0798 g και αναδευόντουσαν με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm) (βήμα 1). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά 100 μL του εκάστοτε διαλύτη και το μίγμα αναδευόταν ξανά με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm) (βήμα 2). Στη συνέχεια, 40 μL από την οργανική φάση συλλεγόντουσαν με την βοήθεια μικροσύριγγας για ανάλυση στην HPLC. Από τους οργανικούς διαλύτες που εξετάστηκαν, απορρίφθηκαν αμέσως η 1-οκτανόλη και το τολουόλιο καθώς ο χρόνος έκλουσης των συγκεκριμένων διαλυτών συνέπιπτε με τον χρόνο έκλουσης του Naphthalene. Η ισοπροπανόλη και η μεθανόλη έδειξαν χαμηλή ανάκτηση οπότε απορρίφθηκαν και αυτές. Το n-εξάνιο έδινε πολύ δυνατές κορυφές, με αποτέλεσμα να μπορούν να μειωθούν οι συγκεντρώσεις των ουσιών στα 5 $\mu\text{g/L}$ για το Naphthalene και στα 0,5 $\mu\text{g/L}$ για το Pyrene και το BaP. Επίσης με την χρήση του n-εξανίου σαν οργανικού διαλύτη μειωνόταν και ο χρόνος έκλουσης των ουσιών. Το πρόβλημα ήταν όμως ότι το n-εξάνιο δεν είναι συμβατό με την

κινητή φάση της HPLC οπότε για να υπερκεραστεί το πρόβλημα δοκιμάστηκε η εκχύλιση με n-εξάνιο και στη συνέχεια η αλλαγή του με ακετονιτρίλιο που όμως απέδιδε πολύ λιγότερο από την απευθείας εκχύλιση με ακετονιτρίλιο. Έτσι επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο σαν οργανικός διαλύτης για το συγκεκριμένο πείραμα.

3.3 Επιλογή του είδους των pellets

Διαθέσιμα για το πείραμα υπήρχαν τρία είδη pellets τα οποία είχαν προμηθευτεί από την εταιρεία ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΚΡΗΤΗΣ ΑΕ η οποία εδρεύει στο Ηράκλειο Κρήτης και αυτά ήταν τα pellets πολυαιθυλενίου χαμηλής πυκνότητας (LDPE), τα pellets πολυπροπυλενίου (PP) και τα pellets πολυαμιδίου (PA) τα οποία ήταν και τα μικρότερα σε μέγεθος. Επειδή το μέγεθός τους δεν ήταν το ίδιο η επιλογή για τον αριθμό των pellets που χρησιμοποιήθηκαν έγινε με βάση το βάρος τους. Τα 3 PE ζύγιζαν περίπου 0,0825 g οπότε χρησιμοποιήθηκαν 3 PP που ζύγιζαν και αυτά περίπου 0,0803 g και 7 PA τα οποία ζύγιζαν περίπου 0,0799 g. Έτσι 20 mL διαλύματος υπερκάθαρου νερού επιμολυσμένου με 10 µg/L σε Naphthalene και 1 µg/L σε Pyrene και BaP προστίθονταν στα τρία διαφορετικά είδη των pellets και αναδεύοντουσαν με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά 100 µL του ακετονιτρίλιου και το μίγμα αναδευόταν ξανά με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm). Στη συνέχεια, 40 µL από την οργανική φάση συλλεγόντουσαν με την βοήθεια μικροσύριγγας τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση στην HPLC. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, τα οποία παρατίθενται παρακάτω με τη μορφή πίνακα, έδειξαν μεγάλη διαφορά στην απόδοση των τριών ειδών pellets με φανερά το καλύτερο να είναι το PE το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για την συνέχιση των πειραμάτων.

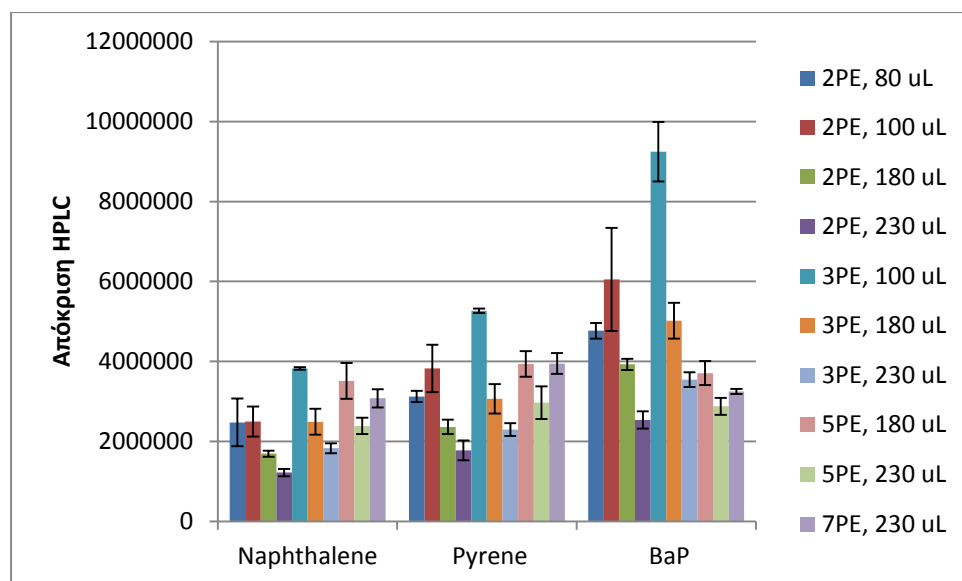


Διάγραμμα 2: Σύγκριση τριών ειδών pellets

3.4 Επιλογή του αριθμού των πλαστικών pellets και επιλογή του όγκου του διαλύτη

Στη συνέχεια εξετάστηκε ο αριθμός των PE pellets που θα χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τον όγκο του διαλύτη που απαιτείται. Οι συνδυασμοί αριθμού των pellets και όγκου του ακετονιτριλίου που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: δύο PE pellets με όγκο 80 μ L, 100 μ L, 180 μ L και 230 μ L, τρία PE pellets με όγκο 100 μ L, 180 μ L και 230 μ L, πέντε PE pellets με όγκο 180 μ L και 230 μ L και επτά PE pellets με όγκο 230 μ L. Η επιλογή των υπό εξέταση όγκων έγινε με βάση το μικρότερο δυνατό όγκο ο οποίος όμως καλύπτει πλήρως τα pellets, έτσι τα δύο pellets καλυπτόντουσαν εντελώς από 80 μ L ακετονιτριλίου, τα τρία pellets από 100 μ L, τα πέντε από 180 μ L και τα επτά από 230 μ L. Η μεθοδολογία ήταν η ίδια, 20 mL διαλύματος υπερκάθαρου νερού επιμολυσμένου με 10 μ g/L σε Naphthalene και 1 μ g/L σε Pyrene και BaP προστίθονταν στον διαφορετικό αριθμό των PE pellets και αναδευόντουσαν με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm) (βήμα 1). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά διαφορετικός όγκος του ακετονιτριλίου και το μίγμα αναδευόταν ξανά με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm) (βήμα 2). Στη συνέχεια, 40 μ L από την οργανική φάση συλλεγόντουσαν με την βοήθεια μικροσύριγγας τα οποία χρησιμοποιούντουσαν για ανάλυση στην HPLC.

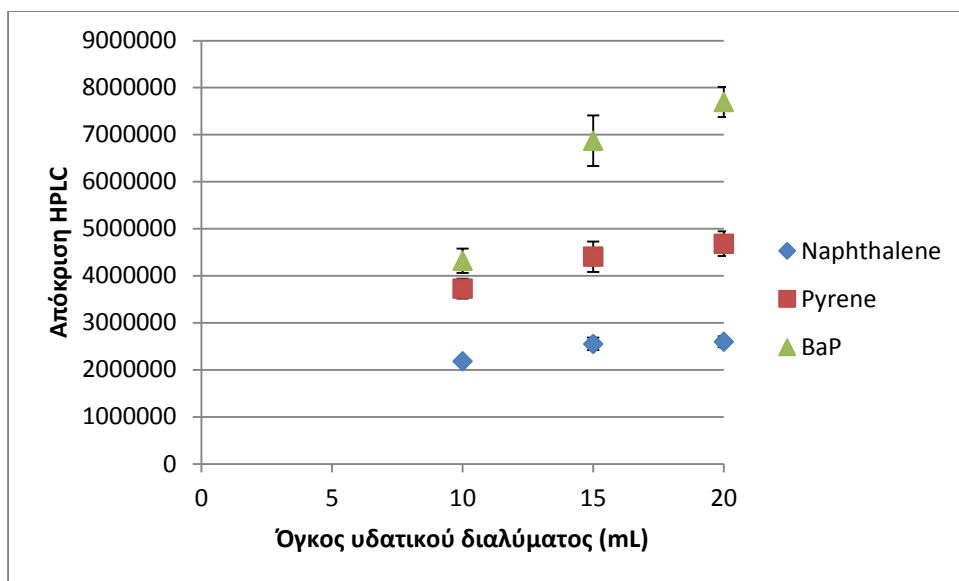
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι η βέλτιστη επιλογή ήταν η χρήση τριών PE pellets και 100 μL ακετονιτριλίου.



Διάγραμμα 3: Σύγκριση αριθμού pellets και όγκου οργανικού διαλύτη

3.5 Επιλογή του όγκου του υδατικού διαλύματος (βήμα 1)

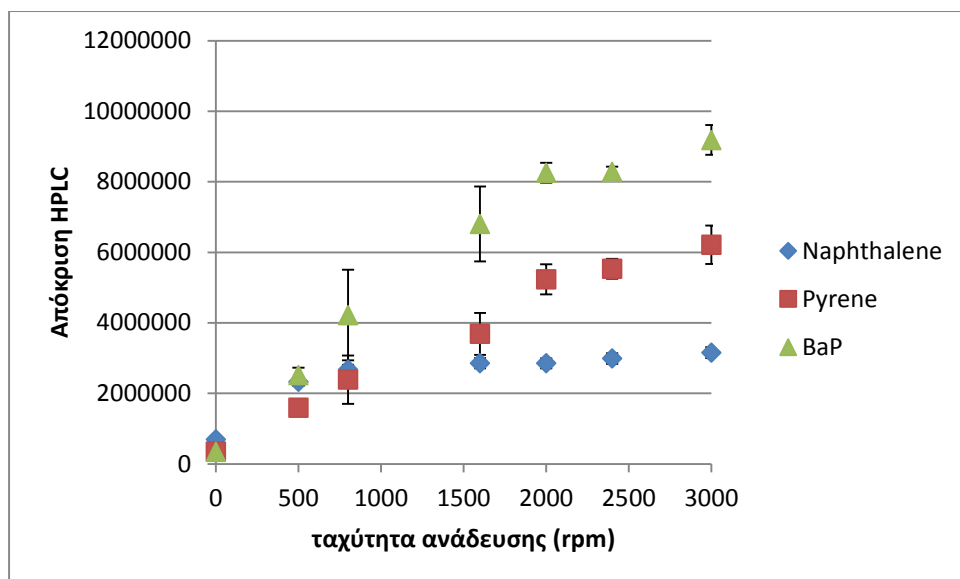
Περαιτέρω, μελετήθηκε η επίδραση του όγκου του υδατικού διαλύματος στην μέθοδο. Όγκοι υδατικού διαλύματος οι οποίοι κυμαίνονταν από 10 έως 20 mL επιμολυσμένοι με 10 $\mu\text{g/L}$ σε Naphthalene και 1 $\mu\text{g/L}$ σε Pyrene και BaP προστίθονταν σε τρία PE pellets τα οποία ζύγιζαν περίπου 0,0820 g και αναδευόντουσαν με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm) (βήμα 1). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά 100 μL ακετονιτριλίου και το μίγμα αναδευόταν ξανά με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm) (βήμα 2). Στη συνέχεια, 40 μL από την οργανική φάση συλλεγόντουσαν με την βοήθεια μικροσύριγγας για ανάλυση στην HPLC. Όπως αναμενόταν, αυξάνοντας τον όγκο του επιμολυσμένου υδατικού διαλύματος αυξανόταν εμφανώς η συνολική ποσότητα των κύριων ουσιών που εκχυλίζονταν αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο και την προσυγκέντρωση (L. Vidal et al., 2005). Ο όγκος των 20 mL υδατικού διαλύματος επιλέχθηκε για τα υπόλοιπα πειράματα.



Διάγραμμα 4: Σύγκριση διαφορετικών όγκων υδατικού διαλύματος

3.6 Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης του υδατικού διαλύματος (βήμα 1)

Το επόμενο βήμα ήταν η εξέταση της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης με το vortex από 0 έως 3000 rpm στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Προκειμένου αυτού, 20 mL υδατικού διαλύματος επιμολυσμένο με 10 µg/L σε Naphthalene και 1 µg/L σε Pyrene και BaP προστίθονταν σε τρία PE pellets και αναδεύοντουσαν με την βοήθεια vortex με διαφορετικές ταχύτητες (5min) (βήμα 1). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά 100 µL ακετονιτριλίου και το μίγμα αναδευόταν ξανά με την βοήθεια vortex (5min, 3000rpm) (βήμα 2). Στη συνέχεια, 40 µL από την οργανική φάση συλλεγόντουσαν με την βοήθεια μικροσύριγγας για ανάλυση στην HPLC. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, για το Naphthalene από τα 0 έως τα 800 rpm υπήρχε σημαντική αύξηση στην απόκριση του συστήματος, ενώ από τα 800 έως τα 3000 rpm δεν υπήρχε σημαντική επίδραση στην εκχύλιση. Ωστόσο, για το Pyrene και το Benzo[a]pyrene, όσο αυξανόταν η ταχύτητα τόσο αυξανόταν και η απόκριση του συστήματος. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα επιλέχθηκε η μέγιστη ταχύτητα του vortex, δηλαδή τα 3000 rpm.

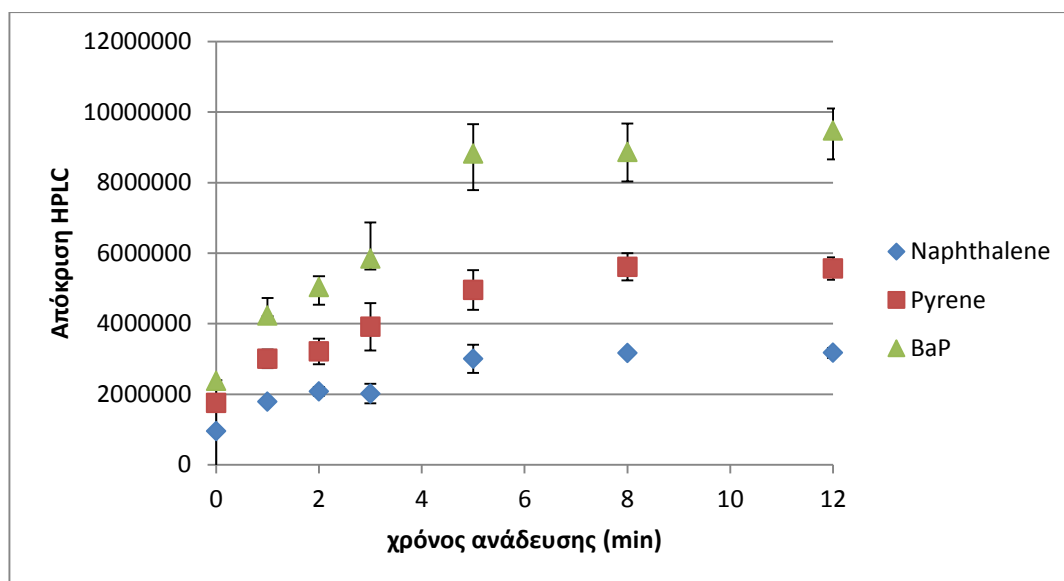


Διάγραμμα 5: Σύγκριση διαφορετικών ταχυτήτων ανάδευσης του υδατικού διαλύματος

3.7 Επιλογή του χρόνου ανάδευσης του οργανικού διαλύτη (βήμα 2)

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου ανάδευσης του οργανικού διαλύτη με την βοήθεια συσκευής vortex. Οι χρόνοι που μελετήθηκαν ήταν από 0 έως 12 λεπτά. 20 mL υδατικού διαλύματος επιμολυσμένο με 10 $\mu\text{g/L}$ σε Naphthalene και 1 $\mu\text{g/L}$ σε Pyrene και BaP προστίθονταν σε τρία PE pellets τα οποία ζύγιζαν περίπου 0,0813 g και αναδεύοντουσαν με την βοήθεια vortex (5min, 3000 rpm) (βήμα 1). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά 100 μL ακετονιτριλίου και το μίγμα αναδευόταν ξανά για διαφορετικούς χρόνους με την βοήθεια vortex (3000rpm) (βήμα 2). Στη συνέχεια, 40 μL από την οργανική φάση συλλεγότουσαν με την βοήθεια μικροσύριγγας για ανάλυση στην HPLC. Το σημείο 0 αντιστοιχούσε στην προσθήκη του διαλύτη στα pellets και στην άμεση ανάκτηση του χωρίς να χρησιμοποιηθεί vortex. Είναι αξιοσημείωτο ότι ακόμα και σε αυτά τα ελάχιστα λεπτά από την εισαγωγή του ακετονιτριλίου μέχρι την απευθείας ανάκτησή του προλάβει να λάβει χώρα εκχύλιση των ουσιών. Το Naphthalene από τα πέντε λεπτά είχε πιάσει ισορροπία, το ίδιο και το Pyrene. Το Benzo[a]pyrene καθυστερούσε περισσότερο να έρθει σε ισορροπία αλλά επιλέχθηκαν τα πέντε λεπτά σαν πιο αποδοτικός χρόνος ανάδευσης καθώς η μικρή διαφορά αυτή κρίθηκε

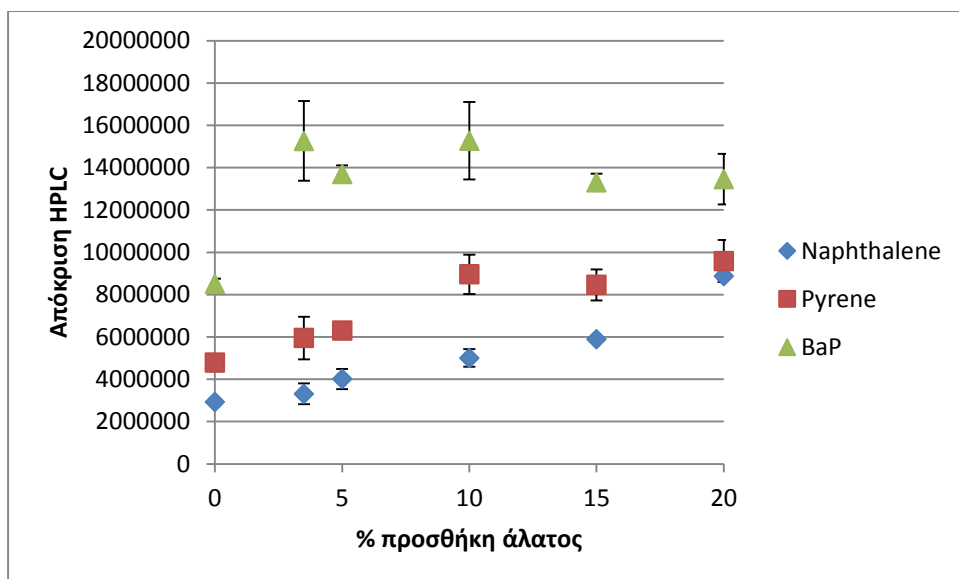
λιγότερο σημαντική συγκριτικά με τον επιπλέον χρόνο που θα απαιτούνταν για την επίτευξή της (επιπλέον 6 min vortex).



Διάγραμμα 6: Σύγκριση διαφρετικών χρόνων ανάδευσης οργανικού διαλύτη

3.8 Προσθήκη άλατος

Γενικά, ελάττωση της υδατοδιαλυτότητας των οργανικών ενώσεων, λόγω της παρουσίας διαλυμένου NaCl (salt – out effect), είναι αναμενόμενο να επηρεάσει θετικά την εκχύλιση αυτών των ενώσεων (E. Psillakis, N. Kalogerakis, 2002) . Η επίδραση του άλατος στην εκχύλιση μελετήθηκε και στην παρούσα εργασία σε χωριστή σειρά πειραμάτων, κατά την οποία 20 mL υδατικού διαλύματος συγκεντρώσεων 0 έως 20% NaCl και επιμολυσμένο με 10 µg/L σε Naphthalene και 1 µg/L σε Pyrene και BaP προστίθονταν σε τρία PE pellets τα οποία ζύγιζαν 0,0805 g και αναδευόντουσαν με την βοήθεια vortex (5min, 3000 rpm) (βήμα 1). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά 100 µL ακετονιτριλίου και το μίγμα αναδευόταν ξανά με την βοήθεια vortex (5 min, 3000rpm) (βήμα 2). Στη συνέχεια, 40 µL από την οργανική φάση συλλεγόταν με την βοήθεια μικροσύριγγας για ανάλυση στην HPLC. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη άλατος δρα θετικά στην εκχύλιση και των τριών PAH. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα κρίθηκε σαν βέλτιστη η προσθήκη 20% NaCl.

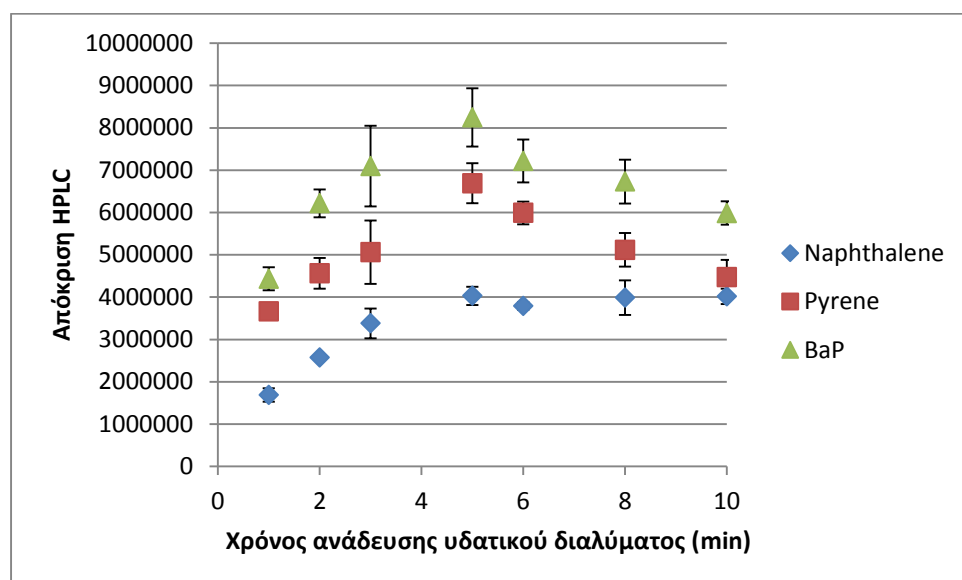


Διάγραμμα 7: Επίδραση άλατος

3.9 Επιλογή του χρόνου ανάδευσης του υδατικού διαλύματος (βήμα 1)

Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου ανάδευσης του υδατικού διαλύματος με την βοήθεια συσκευής vortex. Οι χρόνοι που μελετήθηκαν ήταν από 1 έως 10 λεπτά. Σε αυτή την περίπτωση, 20 mL υδατικού διαλύματος με 20% NaCl και επιμολυσμένο με 5 $\mu\text{g/L}$ σε Naphthalene και 0,5 $\mu\text{g/L}$ σε Pyrene και BaP προστίθονταν σε τρία PE pellets που ζύγιζαν περίπου 0,0799 g και αναδεύοντουσαν για διαφορετικούς χρόνους με την βοήθεια vortex (3000 rpm) (βήμα 1). Μετά το στέγνωμα των pellets γινόταν προσθήκη σε αυτά 100 μL ακετονιτριλίου και το μίγμα αναδευόταν ξανά με την βοήθεια vortex (5 min, 3000rpm) (βήμα 2). Στη συνέχεια, 40 μL από την οργανική φάση συλλεγόντουσαν με την βοήθεια μικροσύριγγας για ανάλυση στην HPLC. Το σημείο 0 αντιστοιχούσε στην προσθήκη του υδατικού στα pellets και στην άμεση ανάκτηση των pellets χωρίς να χρησιμοποιηθεί vortex. Το συγκεκριμένο σημείο είχε ελεγχθεί σε προηγούμενη φάση και είχε δείξει ότι δεν προλαβαίνει να γίνει προσρόφηση των ουσιών από τα pellets, γι' αυτό και αυτή η τιμή δεν έχει μπει στο διάγραμμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέχρι τα πέντε λεπτά ανάδευσης παρατηρούταν σημαντική αύξηση της απόκρισης του συστήματος και για τις τρεις ουσίες, ενώ μετά τα πέντε λεπτά ανταγωνιστική προσρόφηση στην

επιφάνεια είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του σήματος για τα πιο υδρόφοβα ΡΑΗs. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκαν τα πέντε λεπτά ανάδευσης σαν πιο κατάλληλος χρόνος.

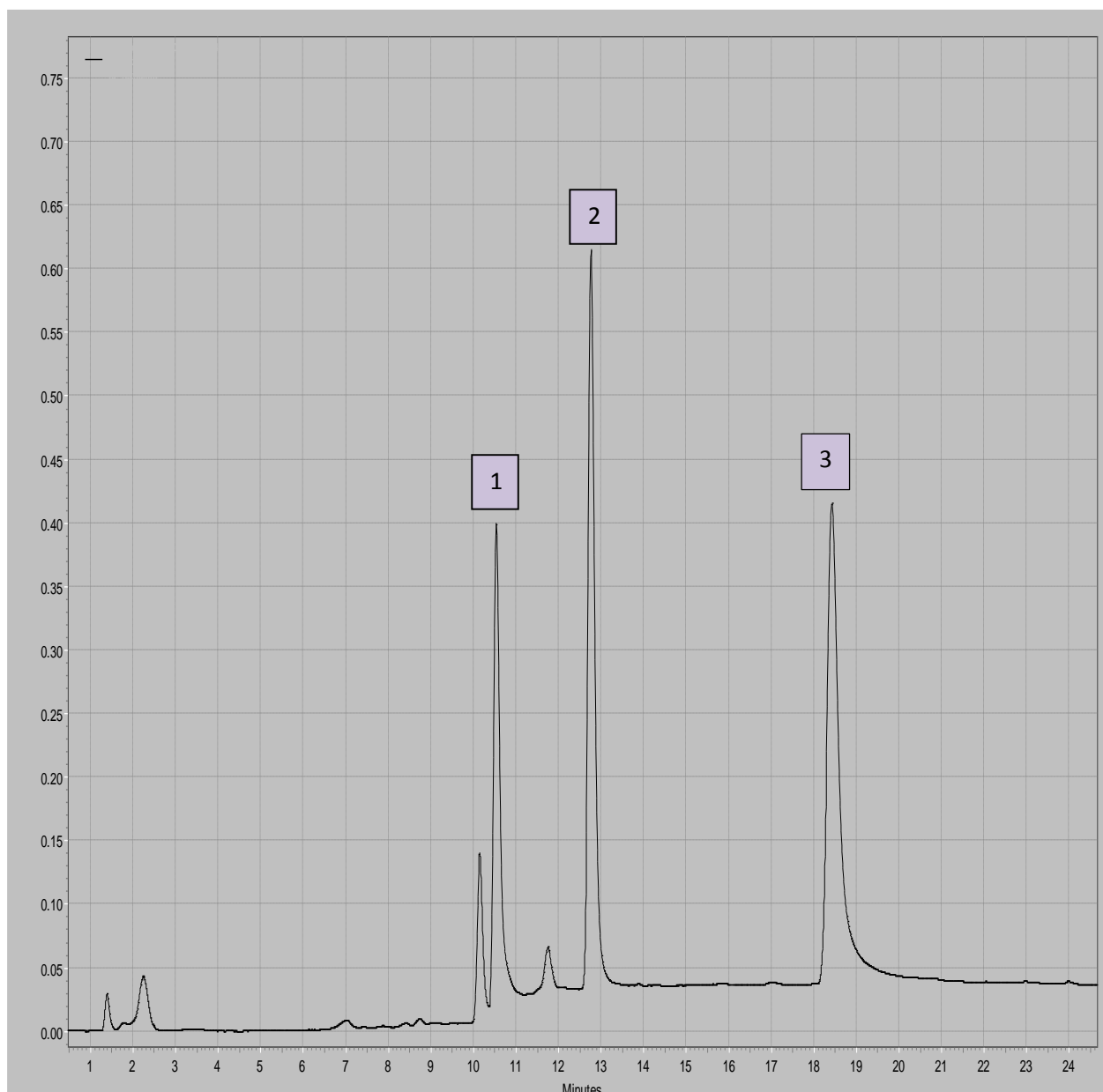


Διάγραμμα 8: Σύγκριση διαφορετικών χρόνων ανάδευσης του υδατικού διαλύματος

3.10 Χρήση των βέλτιστων συνθηκών

Στο διάγραμμα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του ταυτόχρονου διαχωρισμού των τριών κύριων ενώσεων. Η πρώτη ένωση η οποία εκλύεται είναι το Naphthalene (1) με χρόνο έκλουσης 10,5 min, η δεύτερη είναι το Pyrene (2) στα 12,8 min και τελευταία είναι το Benzo[a]pyrene (3) στα 18,4 min. Η κορυφή που εμφανίζεται πριν το Naphthalene αντιστοιχεί στο ακετονιτρίλιο. Το χρωματογράφημα αυτό αντιπροσωπεύει τις βέλτιστες συνθήκες: 20 mL υδατικού διαλύματος με 20% NaCl και επιμολυσμένο με 5 µg/L σε Naphthalene και 0,5 µg/L σε Pyrene και Benzo[a]pyrene εισήχθησαν σε τρία LDPE pellets. Μετά την ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια vortex (5 min, 3000 rpm) (βήμα 1), τα pellets αφαιρέθηκαν και τοποθετήθηκαν σε "lens cleaning tissue" για να στεγνώσουν. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε άλλα φιαλίδια του ενός mL και προστέθηκαν σε αυτά 100 µL ακετονιτρίλιου. Αναδεύτηκαν με την βοήθεια vortex (5 min, 3000 rpm) (βήμα

2) και 40 μL από την ακετονιτριλική φάση συλλέχθηκαν για την ανάλυση στην HPLC.



Διάγραμμα 9: Χρωματογράφημα στον HPLC-FLD των Naphthalene (1), Pyrene (2) και Benzo[a]pyrene (3)

Χρόνοι έκλουσης: (1): 10,5 min, (2): 12,8 min, (3): 18,4 min.

Η γραμμικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε σε δύο επίπεδα ευαισθησίας που διαθέτει η HPLC (low sensitivity, medium sensitivity) χρησιμοποιώντας πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων, για την χαμηλή ευαισθησία, που κυμαίνονταν από 10 έως

200 µg/L για το Naphthalene και από 1 έως 20 µg/L για το Pyrene και το Benzo[a]pyrene, επιμολυσμένων διαλυμάτων απιονισμένου νερού με 20% NaCl. Επίσης, για την γραμμικότητα της μεθόδου έγινε χρήση του Anthracene – d₁₀ σαν internal standard. Για το low sensitivity προστίθενται 5 µg/L στο υδατικό διάλυμα ενώ για την medium sensitivity προστίθενται 0,15 µg/L. Η γραμμικότητα της μεθόδου κρίθηκε άριστη για κάθε ουσία με συντελεστές συσχέτισης $r^2_{\text{Naphthalene}} = 0,9948$, $r^2_{\text{Pyrene}} = 0,9969$ και $r^2_{\text{Benzo[a]pyrene}} = 0,9934$ ($n = 2$) και τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν στην περιοχή των χαμηλών επιπέδων µg/L. Για την μέτρια ευαισθησία του οργάνου, αξιολογήθηκε η γραμμικότητα της μεθόδου χρησιμοποιώντας έξι επίπεδα συγκεντρώσεων τα οποία κυμαίνονταν από 0,05 µg/L έως 8 µg/L για το Naphthalene και από 0,005 µg/L έως 0,8 µg/L για το Pyrene και το Benzo[a]pyrene, επιμολυσμένων διαλυμάτων απιονισμένου νερού με 20% NaCl. Η γραμμικότητα της μεθόδου κρίθηκε άριστη για κάθε ουσία με συντελεστές συσχέτισης $r^2_{\text{Naphthalene}} = 0.99133$, $r^2_{\text{Pyrene}} = 0.99694$ και $r^2_{\text{Benzo[a]pyrene}} = 0.99863$ ($n = 2$) και τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν στην περιοχή των χαμηλών επιπέδων σε µg/L. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου, εκφρασμένη σαν σχετική τυπική απόκλιση (RSD), ελέγχθηκε με την εκτέλεση πέντε αναλύσεων διαλύματος απιονισμένου νερού επιμολυσμένου με 5 µg/L σε Naphthalene και 0,5 µg/L σε Pyrene και σε Benzo[a]pyrene και οι τιμές που πήρε ήταν 10,9, 4,5 και 26,8% αντίστοιχα ενώ για επιμόλυνση με 0,5 µg/L σε Naphthalene και 0,05 µg/L σε Pyrene και σε Benzo[a]pyrene οι τιμές που πήρε ήταν 12,2 , 13,2 και 18,2% αντίστοιχα. Η ακρίβεια της μεθόδου δια μέσου ημερών εκτιμήθηκε με διπλή ανάλυση υδατικού διαλύματος συγκεκριμένης συγκέντρωσης για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες. Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου σε τιμές RSD ήταν 7,3 για το Naphthalene, 15,3 για το Pyrene και 13,6 για το Benzo[a]pyrene αντιστοίχως. Για όλα τα παραπάνω πειράματα 20 mL υδατικού διαλύματος εισήχθησαν σε 3 PE pellets. Μετά από ανάδευση με vortex για 5 min και σε 3000 rpm και εισήχθησαν στα pellets 100 µL ακετονιτριλίου και αναδεύτηκαν εκ νέου με vortex για 5 min και σε 3000 rpm. Τέλος, 40 µL της οργανικής φάση συλλέχθηκαν για ανάλυση στην HPLC.

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) των κύριων ενώσεων υπολογίστηκαν και βρέθηκαν στην περιοχή των χαμηλών επιπέδων σε 3,4 ng/L για το Naphthalene, 3,5 ng/L ppt για το

Pyrene και 1,3 ng/L ppt για το Benzo[a]pyrene. Ο Brum et al. χρησιμοποιώντας LLE με HPLC-FLD για τα PAHs ανέφερε τιμές LOD 0,1 ng/L για το Naphthalene και 0,033 ng/L για το Pyrene και το Benzo[a]pyrene. Ο Garcia-Falcon et al. χρησιμοποιώντας SBSE με HPLC-FLD για τα PAHs ανέφερε τιμές LOD από 1 έως 22 ng/L και συγκεκριμένα για το Benzo[a]pyrene 1 ng/L.

3.11 Εφαρμογή βέλτιστων συνθηκών σε πραγματικά δείγματα

Η αποτελεσματικότητα των μεθόδων μικροεκχυλίσσεως επηρεάζεται από τη σύνθεση της μήτρας του δείγματος. Συνεπώς, δείγματα από εκροή βιολογικού καθαρισμού αστικών λυμάτων επιμολύνθηκαν με 0,5 µg/L σε Naphthalene και με 0,05 µg/L σε Pyrene και σε Benzo[a]pyrene και με 5 µg/L σε Naphthalene και με 0,5 µg/L σε Pyrene και σε Benzo[a]pyrene και αναλύθηκαν υπό τις βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου.

Ο μέσος όρος των μετρήσεων ($n = 5$) για κάθε ένωση σε κάθε επιμολυσμένο δείγμα συγκρίθηκε ως προς το μέσο όρο των τιμών δείγματος υπερκάθαρου νερού της ίδιας επιμόλυνσης προκειμένου να υπολογιστεί η σχετική ανάκτηση για κάθε μήτρα. Στα δείγματα εκροής βιολογικού παρατηρήθηκε μείωση στην εκχυλιζόμενη ποσότητα και άρα της ευαισθησίας στην περίπτωση του Pyrene και του Benzo[a]pyrene. Υποδεικνύεται λοιπόν, ότι οι δύσκολες μήτρες επηρεάζουν την απόδοση της μεθόδου. Σε αυτή την περίπτωση, θα πρέπει να εφαρμόζεται η μέθοδος σταθερής προσθήκης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

	WasteWater	
	Recovery 1 (%)	Recovery 2 (%)
Naphthalene	105,6	108,4
Pyrene	51,5	39,6
Benzo[a]pyrene	32,3	12,1

Πίνακας 3: Ανάκτηση των μητρών

Το Recovery 1 αναφέρεται στην επιμόλυνση με 0,5 µg/L σε Naphthalene και με 0,05 µg/L σε Pyrene και σε Benzo[a]pyrene και το Recovery 2 αναφέρεται στην επιμόλυνση με 5 µg/L σε Naphthalene και με 0,5 µg/L σε Pyrene και σε Benzo[a]pyrene

3.12 Εφαρμογή της μεθόδου σαν παθητικός τρόπος δειγματοληψίας

Σαν τελευταίο πείραμα για την συγκεκριμένη μέθοδο αποφασίστηκε να ελεγχθεί εάν μπορεί να εφαρμοστεί κατευθείαν στο πεδίο για το στάδιο της προσρόφησης των ρύπων από τη μήτρα. Η σκέψη αυτή προέκυψε χάρη στην μικρή πολυπλοκότητα της μεθόδου καθώς τα πλαστικά που χρησιμοποιούνται είναι πολύ εύκολο να μετακινηθούν και να τοποθετηθούν οπουδήποτε.

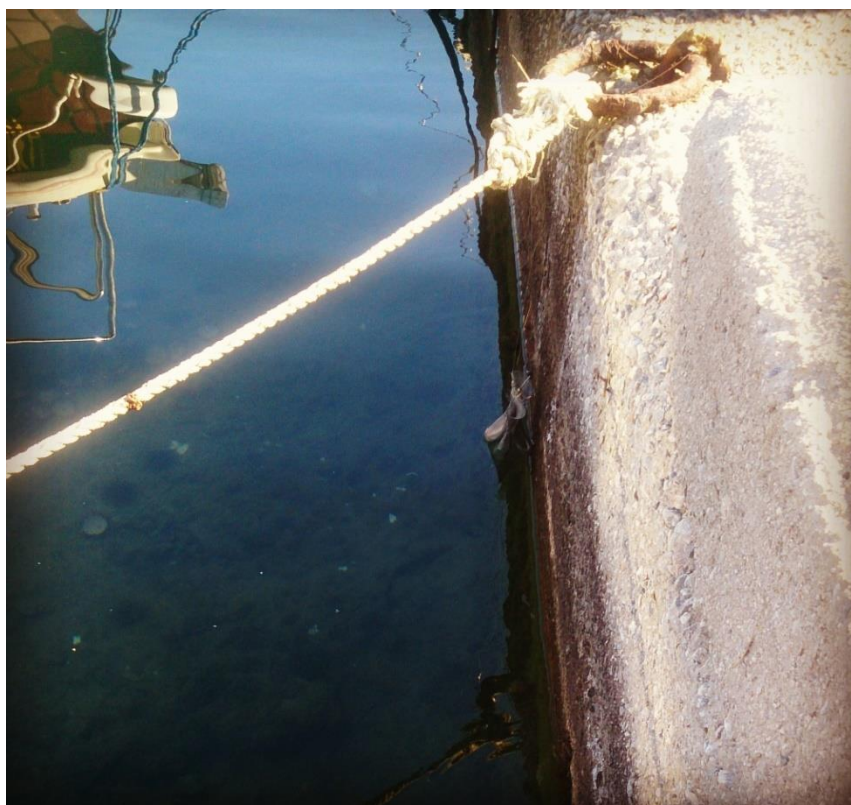
Έτσι σε μία ανοξείδωτη σήτα τοποθετήθηκαν 70 PE pellets και κλείστηκε στην συνέχεια με σύρμα σχηματίζοντας ένα πουγκί ώστε να μην μπορούν να διαφύγουν τα pellets κατά την διάρκεια του πειράματος. Το πουγκί αυτό τοποθετήθηκε στο λιμανάκι της Νέας Χώρας στο Νομό Χανίων και δέθηκε από την προβλήτα με σύρμα με τρόπο τέτοιο ώστε τα πλαστικά pellets να βρίσκονται στην επιφάνεια της θάλασσας.



Εικόνα 2: τα pellets μέσα στην ανοξείδωτη σήτα



Εικόνα 3: τα pellets κατά την τοποθέτησή τους στο λιμάνι



Εικόνα 4: τα pellets στο πεδίο

Κάθε δώδεκα ώρες (πρωί-βράδυ) γινόταν συλλογή έξι pellets και μεταφερόντουσαν στο εργαστήριο για το στάδιο της εκχύλισης και ανάλυσή τους. Στο εργαστήριο, 3 pellets τοποθετούνταν σε κυλινδρικό φιαλίδιο του 1 mL, γινόταν προσθήκη 100 μ L ακετονιτριλίου και αναδεύονταν με την βοήθεια vortex (5 min, 3000 rpm). Στη συνέχεια 40 μ L της οργανικής φάσης ανακτόντουσαν για ανάλυση στην HPLC. Και αυτά τα πειράματα γινόντουσαν εις διπλούν. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν για τέσσερις μέρες καθώς παρατηρήθηκε γρήγορη επίτευξη ισορροπίας των ουσιών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα, έδειξαν την επιτυχή δειγματοληψία PAH σε θαλάσσια δείγματα και η ισορροπία έδειξε να έχει επιτευχθεί από την πρώτη κιόλας μέρα.

	12 h (23:00)	24 h (11:00)	36 h (23:00)	48 h (11:00)	60 h (23:00)
Naphthalene	N.Q	N.Q	N.Q	N.Q	N.Q
Pyrene	N.Q	N.Q	N.Q	N.Q	N.Q
Benzo[a]pyrene	N.D	N.Q	N.Q	N.Q	N.Q

Πίνακας 4: Συγκενρώσεις των Naphthalene, Pyrene, Benzo[a]pyrene στο λιμάνι της Νέας Χώρας, Χανιά

Οι ώρες στον πίνακα αναφέρονται στο χρονικό διάστημα που πέρασε από την στιγμή της τοποθέτησης του πειράματος μέχρι την εκάστοτε δειγματοληψία ενώ στις παρενθέσεις αναγράφονται οι ακριβείς ώρες της δειγματοληψίας.

N.Q (not quantified): δεν έγινε ποσοτικός προσδιορισμός αλλά η συγκέντρωση βρίσκεται μεταξύ LOD και LOQ

N.D (not detected): δεν εντοπίστηκε

4. Συμπεράσματα

Η προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης συντελεί στην ανάπτυξη μεθόδων άμεσης προετοιμασίας δείγματος οι οποίες να είναι πολύ απλές, οικονομικές και μπορούν να πραγματοποιηθούν σε κλίμακα μικροποσοτήτων. Ο συνολικός χρόνος προετοιμασίας δείγματος είναι ελαχιστοποιημένος (αυξάνοντας τον αριθμό των αναλύσεων) χωρίς να επιβαρύνεται και η ευαισθησία της μεθόδου. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους μικροεκχύλισης η προτεινόμενη μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της αποκατάστασης της ισορροπίας σε σύντομο χρονικό διάστημα, μειώνοντας ταυτόχρονα και σφάλματα που μπορεί να προκύψουν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Ένα επιπλέον βασικό πλεονέκτημα, είναι επίσης ότι μπορεί να χαρακτηριστεί και ως ενεργητική αλλά και ως παθητική μέθοδος προετοιμασίας δείγματος.

Η PPSE είναι μία οικονομική και πολλά υποσχόμενη μέθοδος παρασκευής δείγματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση ιχνοποσοτήτων οργανικών ρυπαντών σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Βιβλιογραφία

Aboul-Kassim T.A.T, Simoneit B.R.T. Pollutant- Solid Phase Interactions, SPRINGER: USA (2001).

Arthur C.L., Pawliszyn J., 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Anal. Chem., 62, 2145-2148.

Bakir A., Rowland S.J., Thomson R.C., 2014. Enhanced desorption of persistent organic pollutants from microplastics under simulated physiological conditions. Elsevier, 185, 16-23.

Browne M.A, Galloway T., Thompson R.C, 2007. Microplastic – An Emerging Contaminant of Potential Concern? Integr. Environ. Assess Manag., 3, 559-61.

Brum D.M., Cassella R.J, Netto A.D.P., 2008. Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. Elsevier, 74, 1392-1399.

Cole M., Lindeque P., Halsband C., Galloway S.C., 2010. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Mar. Pollut. Bull., 62, 2588-2597.

David F., Sandra P., 2007. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. Elsevier, 1152, 54-69.

Derraik J.G.B., 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar.Pollut. Bull., 44, 842-852.

Garcia-Falcon M.S, Cancho-Grande B., Simal-Gandara J., 2004. Stirring bar sorptive extraction in the determination of PAHs in drinking waters. Elsevier, 38, 1679-1684.

Harbison R.D. Hamilton and Hardys Industrial Toxicology. Mosby: (1998).

Haritash A.K., Kaushik C.P., 2009. Biodegradation Aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of hazardous materials, 169, 1-15.

Hidalgo-Ruz V., Gutow L., Thompson R.C., Thiel M., 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environ. Sci. Technol.*, 64, 2782-2789.

Juhasz A., Naidu R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45, 57-88.

Kruger O., Kalbe U., Meißner K., Sobottka S., 2014. Sorption effects interfering with the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aqueous samples. *Elsevier*, 122, 151-156.

Liu H., Dasgupta P.K., 1996. Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Anal. Chem.*, 68, 1817-1821.

Mackay D., Shiu W.Y., 1981. A critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. University of Toronto.

Mastral et al., 2001. A review on polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environmental Science and Technology*, 34, 3051-3057.

Mato Y., Isobe T., Takada H., Kahnehiro H., Ohtake C., Kaminuma T., 2001. Plastic Resin Pellets as a Transport Medium for Toxic Chemicals in the Marine Environment. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 318-324.

Mitra S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Wiley- Interscience: New Jersey (2003).

Monteyne E., Roose P., Janssen C. R., 2013. Application of a silicone rubber passive sampling technique for monitoring PAHs and PCBs at three Belgian Coastal Harbours. *Elsevier*, 91, 390-398.

Moore C.J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 108, 131-139.

Nogueira J.M.F., 2015. Stir bar sorptive extraction – 15 years making sample preparation more environment friendly. *Elsevier*.

Ozaki N., Takamura Y., Kojima K., Kindaichi T., 2015. Loading and removal of PAHs in a wastewater treatment plant in a separated sewer system. Elsevier, 80, 337-345.

Popp P., Bauer C., Wennrich L., 2001. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. Elsevier, 436, 1-9.

Psillakis E., Kalogerakis N., 2002. Developments in single-drop Microextraction. Trends Anal, Chem., 21, 54-56.

Psillakis E., Yiantzi E., Kalogerakis N., 2013. Downsizing vacuum-assisted headspace solid phase microextraction. Elsevier, 1300, 119-126.

Sanchez-Avila J., Tauler R., Lacorte S., 2012. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk. Elsevier, 46, 50-62.

Sullivan J.B, Krieger G.R. Hazardous Materials Toxicology: Clinical Principles and Applications. Williams and Wilkins: (1992).

Tsangaris C., Hatzianestis I., Catsiki V.A, Kormas K.A, Strogyloudi E., Neofitou C., Andral B., Galgani F., 2011. Active biomonitoring in Greek coastal waters: Application of the integrated biomarker response index in relation to contaminant levels in caged mussels. Elsevier, 412-413, 359-365.

Tseng W.C, Chen P.-S., Huang S.D., 2014. Optimization of two different dispersive liquid - liquid microextraction methods followed by gas chromatography – mass spectrometry determination for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water. Elsevier, 120, 425-432.

Vidal L., Canals A., Kalogerakis N., Psillakis E., 2005. Headspace Single-Drop Microextraction for the Analysis of Chlorobenzenes in Water Samples. J. Chromatogr. A., 1089, 25-30.

Wu Y., He T., Zhong M., Zhang Y., Li E., Huang T. and Hu Z, 2009. Isolation of marine benzo[a]pyrene - Degrading *Ochrobactrum* sp. BAP5 and proteins characterization. *Journal of environmental sciences*, 21, 1446-1451.

Yiantzi E., Psillakis E., Tyrovola K., Kalogerakis N., 2010. Vortex-assisted liquid – liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. *Elsevier*, 80, 2057-2062.

Yunker M.B., Macdonald R.W. , Vingarza R., Mitchell R.H., Goyette D., Sylvestre S., 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry*, 33, 489-515.

Γεντεκάκης Ι. Φυσικές Διεργασίες, Ανάλυση και Σχεδιασμός. Κλειδάριθμος: Αθήνα (2010).

Καρκαλέτσης Θ., Μεταπτυχιακή Εργασία. Μελέτη της αποδόμησης των Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων (PAHs) με χρήση όζοντος. Πάτρα, 2005

Κομηνός Ξ., Δοντάς Σ., 2006. Οι Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες στο Περιβάλλον και στους Χώρους Εργασίας, Υγιεινή και Ασφάλεια της εργασίας. Τεύχος 16.

Integrated Risk Information System (IRIS), 2001. US EPA,

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), 2008. US EPA,

ΟΔΗΓΙΑ 2005/69/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 16ης Νοεμβρίου 2005, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΟΔΗΓΙΑ 2013/69/ΕΕ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 12^{ης} Αυγούστου 2013, Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Νόμος 3199/2003 «Προστασία και διαχείριση των υδάτων - Εναρμόνιση με την Οδηγία 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23ης Οκτωβρίου 2000». (ΦΕΚ Α΄ 280/9.12.2003)

Council Directive 98/83/EC, Adopted by the Council on 3 November 1998

Public Health Statement, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). ATSDR, 1995.