



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Διπλωματική Εργασία**

**“Δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου με χρήση μικροεκχύλισης υγρής  
φάσης υπό συνθήκες κενού”**



**Κουτέλα Νίκη**

Εξεταστική Επιτροπή

Καθηγήτρια Ελευθερία Ψυλλάκη (επιβλέπουσα)

Καθηγητής Νικόλαος Καλογεράκης

Καθηγητής Μιχαήλ Λαζαρίδης

Χανιά, Σεπτέμβριος 2017

### *Ευχαριστίες*

*Η παρούσα εργασία ξεκίνησε και τελείωσε μέσα στο ακαδημαϊκό έτος 2016-2017 στο Εργαστήριο Υδατικής Χημείας της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.*

*Θα ήθελα καταρχάς να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Ελευθερία Ψυλλάκη, για την πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τη στήριξή τους όλο αυτόν τον καιρό.*

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	6
1. Εισαγωγή.....	8
1.1. Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) .....	8
1.1.1. Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των PAHs.....	10
1.1.2. Πηγές εκπομπής PAHs.....	13
1.1.3. Τοξικότητα των PAHs.....	13
1.1.4. Κατανομή Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων στο Περιβάλλον	15
1.2. Ανάλυση δείγματος με Χρωματογραφία .....	17
1.2.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) .....	18
1.3. Εκχύλιση (Extraction) .....	20
1.4. Μικροεκχύλιση (Micro Extraction).....	21
1.4.1. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Micro Extraction, SPME) .....	21
1.4.1.1. Άμεση δειγματοληψία στερεάς φάσης (Direct SPME).....	22
1.4.1.2. Δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου στερεάς φάσης (Headspace SPME)	23
1.4.1.3. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού (Vac- HSSPME) .....	24
1.4.2. Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (Liquid Phase Micro Extraction, LPME) .....	30
1.4.2.1. Μικροεκχύλιση Σταγόνας σε Σταγόνα (Drop to Drop Micro Extraction) ....	31
1.4.2.2. Απευθείας Αιωρούμενου Σταγονιδίου Μικροεκχύλιση (Directly Suspended Droplet Micro Extraction, DSDME).....	31
1.4.2.3. Συνεχούς Ροής Μικροεκχύλιση (Continuous Flow Micro Extraction, CFME) .....	32
1.4.2.4. Απευθείας δειγματοληψία (Direct Immersion Micro Extraction, DI SDME)	32
1.4.2.5. Δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου μονής σταγόνας (Headspace single drop micro extraction, HSSDME).....	33
2. Πειραματικό μέρος.....	37
2.1. Εργαστηριακός Εξοπλισμός.....	37
2.1.1. Αντιδραστήρια.....	37
2.1.2. Όργανα και συσκευές.....	37
2.3. Πειραματική διαδικασία .....	38
2.2. Ανάλυση με HPLC – FLD .....	39

3.	Πειραματικά Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	40
3.1.	Προκαταρκτικές μελέτες .....	40
3.2.	Βελτιστοποίηση της μεθόδου .....	41
3.2.1.	Επίδραση της Θερμοκρασίας .....	41
3.2.2.	Επίδραση του χρόνου εκχύλισης .....	44
4.	Αξιολόγηση της μεθόδου .....	50
4.1.	Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα .....	54
5.	Συμπεράσματα.....	55
6.	Βιβλιογραφία.....	56

## Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1:	Οι 16 PAHs που βρίσκονται στην λίστα EPA .....	9
Εικόνα 2:	Φυσικοχημικές ιδιότητες των PAHs .....	12
Εικόνα 3:	Ταξινόμηση επιλεγμένων PAH από τους οργανισμούς προστασίας περιβάλλοντος με βάση την καρσινογένεση που προκαλούν .....	15
Εικόνα 4:	Σύστημα HPLC Shimadzu .....	19
Εικόνα 5:	Οργανολογία της HPLC .....	19
Εικόνα 6:	Πειραματική διάταξη της Direct SPME.....	22
Εικόνα 7:	Δειγματοληψία HSSPME.....	23
Εικόνα 8:	Διάγραμμα χρόνου συνάρτηση της μάζας που έχει εκχυλιστεί .....	25
Εικόνα 9:	Πειραματικά στάδια για την διεξαγωγή πειραμάτων με τη μέθοδο Vac- HSSPME .....	26
Εικόνα 10:	Αντίσταση φάσεων σε σχέση με την σταθερά Henry .....	28
Εικόνα 11:	Πειραματική διάταξη μεθόδου DSDME .....	31
Εικόνα 12:	Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης CFME .....	32
Εικόνα 13:	Πειραματική διάταξη άμεσης δειγματοληψίας SDME .....	33
Εικόνα 14:	Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης της δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου HSSDME.....	34
Εικόνα 15:	Τροποποιημένο πώμα με την ειδική θέση όπου τοποθετείται ο διαλύτης .....	38
Εικόνα 16:	Πειραματική διαδικασία Vac-HSSDME.....	39

## Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Διάγραμμα θερμοκρασίας για τις μεθόδους Vacuum HSSDME και Regular HSSDME .....	42
Διάγραμμα 2: Χρόνος εκχύλισης για θερμοκρασία 25°C Regular HSSDME.....	45
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα χρόνου εκχύλισης για Vac- HSSDME σε θερμοκρασία 25°C .....	45
Διάγραμμα 4: Χρόνος εκχύλισης Regular HSSDME στους 35°C.....	46
Διάγραμμα 5: Χρόνος εκχύλισης Vac-HSSDME στους 35°C.....	47
Διάγραμμα 6: Ναφθαλένιο χρόνος εκχύλισης 35°C .....	47
Διάγραμμα 7: Διάγραμμα γραμμικότητας για Vac-HSSDME .....	50
Διάγραμμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης για Regular HSSDME.....	51

## Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Βέλτιστες συνθήκες Vac-HSSDME και Regular HSSDME .....	49
Πίνακας 2: Όρια ανίχνευσης μεθόδου (LOD) για τη μέθοδο Vac-HSSDME.....	51
Πίνακας 3: Όρια ανίχνευσης μεθόδου (LOD) για τη μέθοδο regular HSSDME .....	52
Πίνακας 4: Τυπικό σφάλμα για Vac-HSSDME για 500 ng/L και 2500 ng/L .....	52
Πίνακας 5: Τυπικό σφάλμα για Regular HSSDME για 500 ng/L και 2500 ng/L.....	53

## Περίληψη

Η ρύπανση του περιβάλλοντος από επικίνδυνους ρύπους που απαντώνται σε μικρές συγκεντρώσεις, αποτελεί ένα μείζον θέμα καθώς μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές επιπτώσεις τόσο στην υγεία των ανθρώπων αλλά και στα οικοσυστήματα. Η ανίχνευση ιχνοποσοτήτων τέτοιων ρύπων είναι αντικείμενο σύγχρονης έρευνας και μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί διάφορες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων όπως αυτή της μικροεκχύλισης στερεής ή υγρής φάσης υπερκείμενου χώρου. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ερευνάται για πρώτη φορά η δυνατότητα χρήσης μιας νέας μεθόδου δειγματοληψίας ημι-πτητικών ενώσεων από την υπερκείμενη φάση σε υδατικά δείγματα με χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης υγρής φάσης σε συνθήκες χαμηλής πίεσης. Η νέα μέθοδος ονομάζεται μικροεκχύλιση μονής σταγόνας υπερκείμενου χώρου κάτω από συνθήκες κενού (vacuum assisted single drop microextraction, Vac-HSSDME) και επιτυγχάνει την ταχεία, αποτελεσματική αλλά και σε χαμηλές θερμοκρασίες εκχύλιση ημι-πτητικών ρύπων που είναι και οι πιο δύσκολοι να εκχυλιστούν. Οι οργανικοί ρύποι που χρησιμοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση της μεθόδου ήταν τρεις αντιπροσωπευτικές ενώσεις της ομάδας των Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονάνθρακων (PAHs). Τα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης της μεθόδου υπέδειξαν ως βέλτιστες συνθήκες: 20 mL οκτανόλης ως φάση δέκτη να κάνουν για 10 min δειγματοληψία του υπερκείμενου χώρου όγκου δείγματος 7 mL τοποθετημένα αεροστεγώς σε 22 mL φιαλίδια και κάτω από ανάδευση 500 rpm αλλά και στους 35 °C. Κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες η μέθοδος Vac-HSSDME, βρέθηκε να είναι γραμμική μέσα στο διάστημα συγκεντρώσεων 100 – 5000 ng/L με συντελεστής συσχέτισης πάνω από 0,999. Τα όρια ανίχνευσης για επιμολυσμένα υδατικά διαλύματα βρέθηκαν να κυμαίνονται από 37-160 ng/L. Η ακρίβεια της μεθόδου κυμαίνεται από 4,7 έως 9,2%. Σε όλη την πορεία της εργασίας τα αποτελέσματα σε κάθε στάδιο αλλά και απόδοση της μεθόδου συγκρίθηκαν με την συμβατική τεχνική δειγματοληψίας HSSDME υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δειγματοληψία υπό συνθήκες κενού επιταχύνει την μεταφορά αναλυτών με μικρές σταθερές Henry στην μικροσταγόνα και συμβάλλει στην ανάπτυξη ευαίσθητων και επαναλήψιμων μεθόδων. Πρόκειται για τη πρώτη

παγκόσμια ερευνητική εργασία που μελετά την δειγματοληψία HSSDME κάτω από συνθήκες κενού.

## Abstract

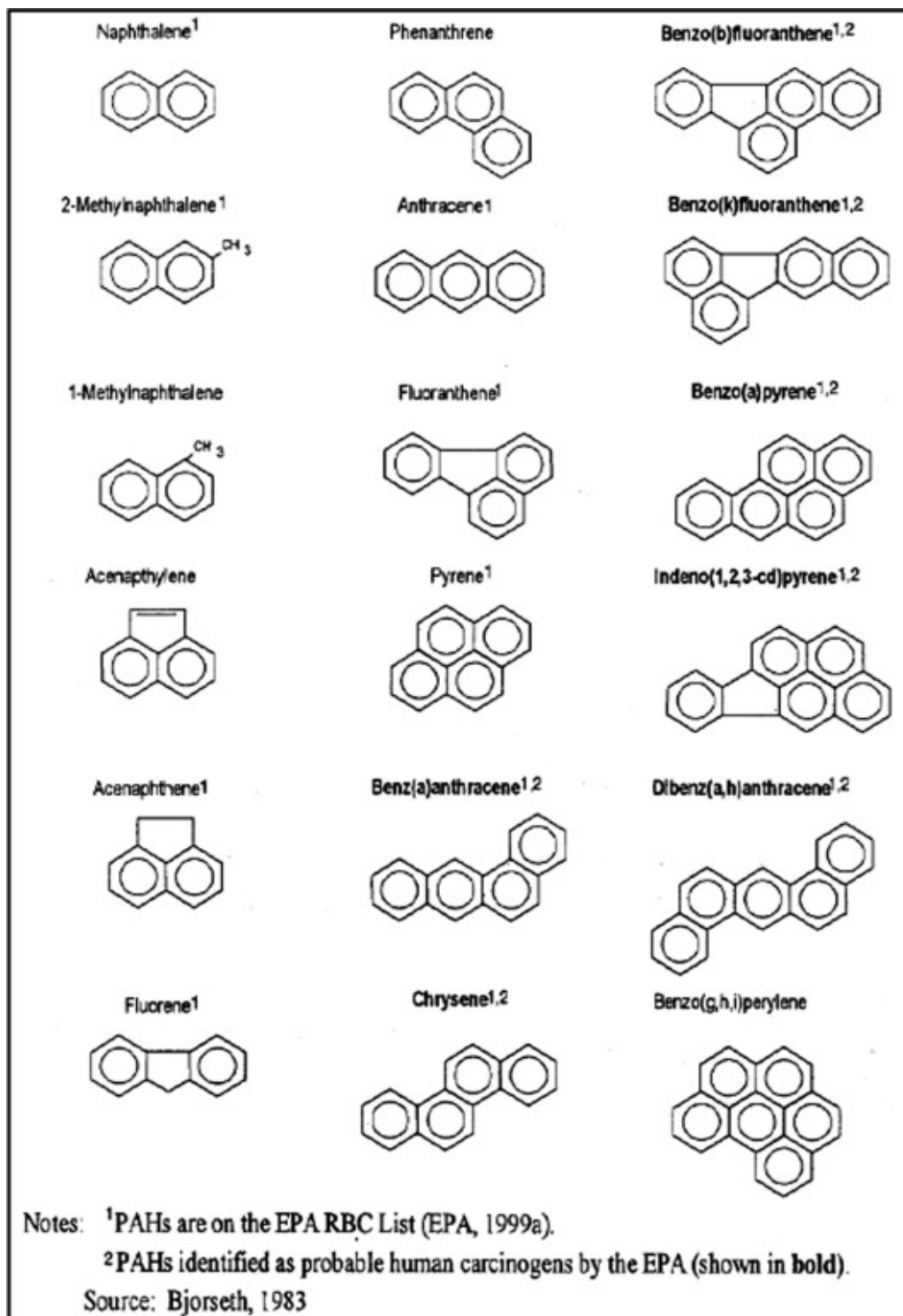
Environmental organic pollution is a critical issue. Many research efforts concentrate on the detection of trace amounts of these analytes. To the end, different sample preparation techniques have been proposed in the past including headspace solid or liquid phase micro extraction. The present thesis investigates applicability of a new method for sampling semi-volatile compounds from the headspace of aqueous sample. The new procedure is called vacuum assisted headspace single drop micro extraction (Vacuum HSSDME) and samples the headspace using micro volumes of organic solvents. The model target analytes were three representative Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) compounds. The method was optimized, and under the optimum conditions found (20  $\mu$ L of an octanol drop exposed for 10 min to the headspace of 7 mL samples in a 22 mL vial, stirred at 500 rpm and held at 35°C) it was found to be linear within the concentration range of 100 - 5000. The limits of detection for spiked water samples ranged from 37-160 ng/L and repeatability from 4,7 to 9,2%. Overall, Vac-HSSDME proved to be a fast and sensitive tool to be used for the extraction of analytes having a low Henry's law constant.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)

Οι πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (PAHs) είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από δύο ή περισσότερους συζευγμένους αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι περιέχουν στο μόριο τους μόνο άτομα άνθρακα και υδρογόνου. Οι δακτύλιοι είναι ενωμένοι μεταξύ τους έτσι ώστε ορισμένα από τα άτομα άνθρακα να ανήκουν σε δύο ή τρεις δακτυλίους. Είναι στερεής μορφής υδρογονάνθρακες που έχουν συνήθως άχρωμο ή λευκό, ή ωχρό κίτρινο χρώμα. Οι οργανικές αυτές ενώσεις ανήκουν στη κατηγορία των επίμονων οργανικών ρύπων (persistent organic pollutants, POPs) (1). Τα PAHs είναι ενώσεις που βρίσκονται στην ατμόσφαιρα, στο νερό και στο έδαφος παρουσιάζοντας αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον. Χαρακτηρίζονται για τις καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες ιδιότητες τους και η ευρεία κατανομή τους στο περιβάλλον ενέχει σοβαρούς κινδύνους για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Οι τοξικές αυτές επιδράσεις που προκαλούν στο περιβάλλον αλλά και στους οργανισμούς σε συνδυασμό με την μεγάλη συχνότητα εμφάνισής τους οδήγησε τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος Ηνωμένων Πολιτειών (Environmental Protection Agency, US EPA) να χαρακτηρίσει τα PAHs ως πρωταρχικής σημασίας ρύπους. Οι οργανικές αυτές ενώσεις μπορούν να σχηματιστούν είτε από βιολογικές διεργασίες είτε ως προϊόντα ατελούς καύσης από φυσικές είτε από ανθρωπογενείς πηγές (2). Στην εικόνα 1 παρουσιάζονται οι 16 πιο επικίνδυνοι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες σύμφωνα με τον EPA.





Εικόνα 1: Οι 16 PAHs που βρίσκονται στην λίστα EPA (2)

### 1.1.1. Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των PAHs

Οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων ποικίλουν ανάλογα με το μοριακό βάρος και την δομή τους. Τα PAHs είναι ημι-πτητικές οργανικές ενώσεις, τα οποία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος βρίσκονται σε στερεή μορφή και χαρακτηρίζονται από υψηλά σημεία τήξεως και βρασμού και χαμηλή πίεση ατμού. Η τάση ατμών μειώνεται με την αύξηση των δακτυλίων που υπάρχουν στην κάθε ένωση. Τα PAHs έχουν υψηλό λιποφιλικό χαρακτήρα και διαλύονται πιο εύκολα σε οργανικούς διαλύτες σε αντίθεση με το νερό. Η διαλυτότητά τους στο νερό σχετίζεται με τον αριθμό των δακτυλίων που έχουν στο μόριό τους, όσο πιο πολλοί δακτύλιοι τόσο πιο δύσκολη είναι η διάλυσή τους στο υδάτινο περιβάλλον. (3) Κάθε μία από τις ενώσεις αυτές χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό φάσμα απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Επίσης τα PAHs έχουν χαρακτηριστικά μήκη κύματος στο φθορίζομετρο. Μπορούν να ραγίσουν σε υψηλές θερμοκρασίες (50°C) και όταν εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία αλλά και σε ορατό φως. (4)

Πιο συγκεκριμένα για τις ενώσεις που επιλέχθηκαν ως μοντέλα (Naphthalene, Acenaphthene, Pyrene) για την μέθοδο υγρής μικροεκχύλισης υπερκείμενου χώρου κάτω από συνθήκες κενού αναλύονται τα χαρακτηριστικά τους και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

- **Naphthalene (Ναφθαλένιο)**

Το Ναφθαλένιο είναι λευκής κρυσταλλικής μορφής υδρογονάνθρακας και αποτελεί έναν από τους ο πιο απλούς πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες ο οποίος αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους. Ο χημικός του τύπος είναι  $C_{10}H_8$  με μοριακή μάζα (Mr) 128,1705 g/mol και πυκνότητα ( $\rho$ ) 1,14 g/cm<sup>3</sup>. Τα σημεία βρασμού και τήξης του ναφθαλενίου είναι 218°C και 80,26°C αντίστοιχα. Η πίεση ατμών του στους 25°C είναι 11,9 Pa. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού ( $K_{ow}$ ) είναι 2300 ενώ η σταθερά του νόμου του Henry ( $K_H$ ) είναι  $4,4 \cdot 10^{-4}$  atm·m<sup>3</sup>/mole.

- **Acenaphthene (Ακεναφθένιο)**

Το ακεναφθένιο είναι άχρωμος στερεής μορφής υδρογονάνθρακας. Ο χημικός του τύπος είναι  $C_{12}H_{10}$  με μοριακή μάζα (Mr) 154,212 g/mol και πυκνότητα ( $\rho$ ) 1,02g/cm<sup>3</sup>. Τα σημεία βρασμού και τήξης του ακεναφθενίου είναι 279 °C και 95 °C αντίστοιχα. Η πίεση ατμών του για θερμοκρασία 25°C είναι 0,50 Pa. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού ( $K_{ow}$ ) είναι 21000 και η σταθερά του νόμου του Henry ( $K_H$ ) είναι  $1,84 \cdot 10^{-4}$  atm·m<sup>3</sup>/ mole.

- **Pyrene (Πυρένιο)**

Το πυρένιο είναι κίτρινης κρυσταλλικής μορφής υδρογονάνθρακας, αποτελείται από τέσσερεις αρωματικούς δακτυλίους. Ο χημικός του τύπος είναι  $C_{16}H_{10}$  με μοριακή μάζα (Mr) 202,25 g/mol και πυκνότητα ( $\rho$ ) 1,27 g/cm<sup>3</sup>. Τα σημεία βρασμού και τήξης του πυρενίου είναι από 306 έως 404°C και 145°C αντίστοιχα. Η πίεση ατμών για το Πυρένιο είναι  $5,67 \cdot 10^{-4}$  Pa σε θερμοκρασία 25°C. Ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης – νερού ( $K_{ow}$ ) είναι  $2 \cdot 10^5$  και η τιμή της σταθεράς του νόμου του Henry ( $K_H$ ) είναι  $1,09 \times 10^{-5}$  atm·m<sup>3</sup>/ mole.

PAHs	Chemical formula	Chemical structure	Molecular weight (g mol <sup>-1</sup> )	Melting point (°C)	Boiling point (°C)	Density (g cm <sup>-3</sup> )	Solubility in water
Acenaphthalene	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>		154.21	95	96.2	1.222	0.4 mg/100 mL
Acenaphthylene	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>		152.20	92-93	265-275	0.8987	Insoluble
Anthracene	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>		178.23	218	340	1.25	Insoluble
Benzo(a)anthracene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>		228.2879	158	438	1.19	0.010 mg L <sup>-1</sup>
Benzo(a)pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>		252.31	179	495	1.24	0.2-6.2 µg L <sup>-1</sup>
Benzo(e)pyrene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>		252.31	178-179	310-312	1.286	6.3×10 <sup>-5</sup> mg L <sup>-1</sup>
Benzo(b)fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>		252.3093	168	-	1.286	0.0012 mg L <sup>-1</sup>
Benzo(ghi)perylene	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>		276.3307	278	500	1.378	2.6×10 <sup>-4</sup> mg L <sup>-1</sup>
Benzo(j)fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>		252.3093	165	-	1.286	6.76×10 <sup>-5</sup> mg L <sup>-1</sup>
Benzo(k)fluoranthene	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>		252.31	217	-	1.286	-
Chrysene	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>		228.28	254	448	1.274	Insoluble
Dibenz(ah)anthracene	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>		278.3466	262	-	1.232	5×10 <sup>-4</sup> mg L <sup>-1</sup>
Fluoranthene	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>		202.26	110.8	375	1.252	265 µg L <sup>-1</sup>
Fluorene	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub>		166.223	116-117	295	1.202	1.992 mg L <sup>-1</sup>
Indeno (1,2,3-cd) pyrene	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>		276.3	163.6	530		0.062 mg L <sup>-1</sup>
Phenanthrene	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>		178.23	101	332	1.18	1.6 mg L <sup>-1</sup>
Pyrene	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>		202.25	145-148	404	1.271	0.135 mg L <sup>-1</sup>

Εικόνα 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες των PAHs (5)

### 1.1.2. Πηγές εκπομπής PAHs

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες σχηματίζονται κυρίως από ατελή καύση ορυκτών καυσίμων ή οργανικών ουσιών. Η καύση μπορεί να προέρχεται είτε από ανθρωπογενείς είτε από φυσικές πηγές. Ως φυσικές πηγές παραγωγής PAHs θεωρούνται οι δασικές πυρκαγιές και οι εκρήξεις ηφαιστείων. Οι ανθρωπογενείς πηγές όπου παράγονται οι οργανικές αυτές ενώσεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, η πρώτη είναι η καύση υλικών για παραγωγή ενέργειας (άνθρακας, πετρέλαιο, αέριο, ξύλο) και η δεύτερη είναι η καύση για ελαχιστοποίηση των αποβλήτων. (6) Η καύση των οργανικών υλικών για παραγωγή ενέργειας δημιουργεί δύο ειδών πηγές εκπομπής PAHs τις κινητές και τις στατικές. Ως κινητές πηγές εκπομπής θεωρούνται τα μέσα μαζικής μεταφοράς και ως στατικές θεωρούνται αυτές που παράγουν ενέργεια είτε για άμεση χρήση μικρής κλίμακας, όπως η θέρμανση οικιακής χρήσης, είτε για παραγωγή ενέργειας μεγάλου ύψους για βιομηχανικές εφαρμογές. Επίσης ορισμένα από τα PAH χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα προϊόντα στη βιομηχανία για την παραγωγή προϊόντων όπως παραδείγματος χάρη το Ναφθαλένιο, το Ανθρακένιο και το Φαινανθρένιο. Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για την παραγωγή χρωστικών, λιπαντικών, πλαστικών και εντομοκτόνων. Ωστόσο, οι ποσότητες των PAH που παράγονται για εμπορική χρήση είναι πολύ λιγότερες από αυτές που δημιουργούνται κατά την ατελή καύση. Αξίζει να σημειωθεί ότι PAHs παράγονται ακόμη και από τον καπνό των τσιγάρων. (2)

Παρά το γεγονός ότι παράγονται από βιομηχανικές και αστικές περιοχές, υψηλές συγκεντρώσεις πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων παρατηρήθηκαν και σε αγροτικές περιοχές. Αυτό είναι συνέπεια των ιδιοτήτων τους καθώς προσροφούνται από τις επιφάνειες των αιωρούμενων σωματιδίων και έτσι μπορούν να μετακινούνται σε μεγάλες αποστάσεις πριν επιστρέψουν στο έδαφος ή στα επιφανειακά ύδατα μέσω της κατακρήμνισης. (7)

### 1.1.3. Τοξικότητα των PAHs

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι οργανικές ενώσεις μεγάλου περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος λόγω της συχνότητας εμφάνισής τους στο περιβάλλον αλλά και της καρκινογόνου και μεταλλαξιογόνου δράσης τους στους οργανισμούς. Για το λόγο αυτό ο Οργανισμός προστασίας του Περιβάλλοντος των

Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (United States Environmental Protection Agency, US EPA) έχει συμπεριλάβει στην λίστα με τους 129 πρωταρχικής σημασίας ρυπαντές και 16 από τα PAHs. Συγκεκριμένα οι ενώσεις αυτές είναι το Ακεναφθένιο, Ακεναφθυλένιο, το Ανθρακένιο, το Βενζο[α]ανθρακένιο, το Βενζο[α]πυρένιο, Βενζο[β]φθορανθένιο, το Βενζο[ζ,η,θ]περυλένιο, το Βενζο[κ]φθορανθένιο, το Διβενζ[α,η]ανθρακένιο, το Ινδενο[1,2,3-γδ]πυρένιο, το Ναφθαλένιο, το Πυρένιο, το Φαινανθένιο, το Φθαιρανθένιο, το Φθορένιο και το Χρυσένιο. (8) Από τα Ευρωπαϊκά όργανα το Βενζο[α]πυρένιο και άλλα PAHs έχουν ταξινομηθεί ως καρινογόνες και μεταλλαξιογόνες ουσίες για τους οργανισμούς.

Τα PAHs μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό είτε μέσω της αναπνευστικής οδού, είτε μέσω της κατανάλωσης τροφίμων και νερού που περιέχουν τις εν λόγω ενώσεις είτε μέσω του δέρματος, από επαφή με μολυσμένο έδαφος. Μετά την είσοδό τους στον οργανισμό διασπείρονται στο σώμα και στοχεύουν στους λιπώδεις ιστούς. Τα όργανα που προσβάλλονται κυρίως είναι οι πνεύμονες, το συκώτι και τα νεφρά. Η χρόνια έκθεση των ανθρώπων σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες μπορεί να προκαλέσει καρκίνο στους πνεύμονες, στο δέρμα και βάσει των αποτελεσμάτων από επιδημιολογικές μελέτες καρκίνο στο λάρυγγα, στο φάρυγγα και στο γαστρεντερικό σύστημα. (4)

Τα PAHs έχουν μέτρια έως υψηλή τοξικότητα στα πουλιά και στους υδάτινους οργανισμούς. Τα θηλαστικά μπορούν να απορροφήσουν PAHs από διάφορες οδούς, όπως είναι η δερματική επαφή και η εισπνοή. Τα φυτά μπορούν να απορροφήσουν αυτές τις ενώσεις μέσω των ριζών τους και να τις μεταφέρουν στα υπόλοιπα σημεία τους φυτού. Το ποσό της απορρόφησης εξαρτάται από την συγκέντρωση, την διαλυτότητα στο νερό, τον εδαφικό τύπο και την φωτοχημική κατάσταση. Υπάρχουν κάποια φυτά που περιέχουν ουσίες που μπορούν να τα προστατέψουν από αυτές τις ενώσεις και άλλα που τις χρησιμοποιούν για την ανάπτυξή τους. (2)

Order	Agency	PAH compound(s)	Carcinogenic classification	Reference
1	Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Benz(a)anthracene,</li> <li>• Benzo(b)fluoranthene,</li> <li>• Benzo(a)pyrene,</li> <li>• Dibenzo(a,h)anthracene, and</li> <li>• Indeno(1,2,3-c,d)pyrene</li> </ul>	Known animal carcinogens	ATSDR (1995)
2	International Agency for Research on Cancer (IARC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Benzo(a)anthracene and</li> <li>• Benzo(a)pyrene,</li> <li>• Benzo(a)fluoranthene, and</li> <li>• Ideno(1,2,3-c,d)pyrene.</li> <li>• Anthracene,</li> <li>• Benzo(g,h,i)perylene,</li> <li>• Benzo(e)pyrene,</li> <li>• Chrysene,</li> <li>• Fluoranthene,</li> <li>• Fluorene,</li> <li>• Phenanthrene, and</li> <li>• Pyrene</li> </ul>	Probably carcinogenic to humans  Possibly carcinogenic to humans  Not classifiable as to their carcinogenicity to humans	IARC (2010)
3	U.S. Environmental Protection Agency (EPA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Benz(a)anthracene,</li> <li>• Benzo(a)pyrene,</li> <li>• Benzo(b)fluoranthene,</li> <li>• Benzo(k)fluoranthene,</li> <li>• Chrysene,</li> <li>• Dibenzo(a,h)anthracene, and</li> <li>• Indeno(1,2,3-c,d)pyrene</li> <li>• Acenaphthylene,</li> <li>• Anthracene,</li> <li>• Benzo(g,h,i)perylene,</li> <li>• Fluoranthene</li> </ul>	Probable human carcinogens  Not classifiable as to human carcinogenicity	USEPA (2008)

Εικόνα 3: Ταξινόμηση επιλεγμένων PAH από τους οργανισμούς προστασίας περιβάλλοντος με βάση την καρκινογένεση που προκαλούν (4)

#### 1.1.4. Κατανομή Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων στο Περιβάλλον

- Ατμόσφαιρα

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες εισέρχονται στην ατμόσφαιρα μέσω της ατελούς καύσης οργανικών ουσιών. Οι μικρότερου μοριακού βάρους PAH κατανέμονται μεταξύ της αέριας φάσης και των σωματιδίων, αντίθετα τα PAH μεγαλύτερου μοριακού βάρους προσροφούνται στην επιφάνεια των αιωρούμενων σωματιδίων, δίνοντάς τους έτσι τη δυνατότητα να μετακινούνται σε μεγάλες αποστάσεις. Στην επιφάνεια του εδάφους τα PAHs επιστρέφουν μέσω της κατακρήμνισης. Οι PAHs είναι κατά κύριο λόγο αδρανείς ενώσεις. Ωστόσο, με την παρουσία του ηλιακού φωτός, μπορούν εύκολα να αποσυντεθούν σε οξυγονωμένους PAH. Η φωτοξείδωση γενικά συμβαίνει πολύ γρηγορότερα για τους ελεύθερους PAH συγκριτικά με τους προσροφημένους σε σωματίδια. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες σε ατμοσφαιρικά περιβάλλοντα μπορούν επίσης να αντιδράσουν εύκολα με οξείδια του αζώτου και να σχηματίσουν νιτρο-υποκατεστημένα πολυκυκλικά άλατα. (8)

- **Επιφανειακά νερά**

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΡΑΗ) εισέρχονται στο θαλάσσιο περιβάλλον από πολλές διαφορετικές πηγές συμπεριλαμβανομένων των επιφανειακών απορροών, ατμοσφαιρικών κατακρημνίσεων, βιομηχανικών απόβλητων, διαρροών πετρελαίου και θαλάσσιων μεταφορών. Λόγω των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, τείνουν να προσροφούνται στα αιωρούμενα σωματίδια καταλήγοντας στο ίζημα, να συσσωρεύονται στους ιστούς θαλάσσιων οργανισμών και να υπόκεινται σε διάφορες διεργασίες μετασχηματισμού, συμπεριλαμβανομένων των χημικών μετασχηματισμών, τη βιοαποικοδόμηση και τη φωτοχημική αποικοδόμηση. Ως αποτέλεσμα, οι οργανικές ενώσεις αυτές μπορεί να εμφανίζουν πολύ διαφορετικούς χρόνους ημι-ζωής στο θαλάσσιο περιβάλλον (9). Έχει παρατηρηθεί ότι η συγκέντρωση των ενώσεων αυτών σε παράκτιες περιοχές και σε εκβολές ποταμών είναι μεγαλύτερη από αυτές των θαλάσσιων νερών μακριά από τις παραλίες (7).

- **Υπόγεια νερά**

Τα ΡΑΗs στα υπόγεια ύδατα εισέρχονται είτε από μολυσμένα επιφανειακά νερά ή μέσω των στραγγισμάτων που παράγονται από χώρους υγειονομικής ταφής στερεών αποβλήτων είτε μολυσμένο έδαφος. Τα υπόγεια νερά φιλτράρονται φυσικά καθώς διέρχονται από τα στρώματα του εδάφους στα οποία προσροφούνται οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις ΡΑΗ στα υπόγεια ύδατα μπορούν να αυξηθούν μετά από περιόδους βροχόπτωσης, λόγω της μεταφοράς των ομβρίων στους υδροφορείς (7).

- **Πόσιμο νερό**

Στο πόσιμο νερό, η παρουσία των ενώσεων αυτών μπορεί να οφείλεται είτε σε ρύπανση επιφανειακών είτε υπόγειων υδάτων που χρησιμοποιούνται ως πηγές υδροληψίας, για την παραγωγή πόσιμου νερού. (7)

Οι ΡΑΗs είναι πανταχού παρόντες ρυπαντές που παράγονται κυρίως από ανθρωπογενείς και φυσικές πηγές, συμπεριλαμβανομένων των δασικών πυρκαγιών, της καύσης των ορυκτών καυσίμων και την άμεση απελευθέρωση του πετρελαίου και των προϊόντων του. Ο προσδιορισμός των ΡΑΗs στο νερό είναι



υψίστης σημασίας για την προστασία του περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας. Οι μέθοδοι αναλυτικού προσδιορισμού οφείλουν να είναι μεγάλης ευαισθησίας προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν οι ιχνοποσότητες αυτών των επικίνδυνων ενώσεων.

## **1.2. Ανάλυση δείγματος με Χρωματογραφία**

Η χρωματογραφία είναι μία μέθοδος διαχωρισμού διαλυμάτων. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ δύο φάσεων, τη στατική (η οποία παραμένει σταθερή μέσα στην χρωματογραφική στήλη) και την κινητή φάση (δηλαδή ο διαλύτης ο οποίος κινείται μέσα στην στήλη). Η στατική φάση αποτελείται από συνήθως ένα υγρό μεγάλου ιξώδους, χημικά δεσμευμένο στο εσωτερικό ενός τριχοειδούς σωλήνα ή στην επιφάνεια στερεών σωματιδίων με τα οποία έχει πληρωθεί η στήλη. Ανάλογα με την φύση της κινητής φάσης (αέρια ή υγρή) η χρωματογραφία ονομάζεται αέρια ή υγρή χρωματογραφία. Ο διαχωρισμός των συστατικών του διαλύματος γίνεται λόγω της διαφορετικής κατανομής των ενώσεων μέσω της στατικής και της κινητής φάσης. Τα συστατικά του δείγματος που κατακρατούνται πιο ισχυρά από τη στατική φάση κινούνται πιο αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διαχωριστούν από τα συστατικά που κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα.

Ανάλογα με την αρχή στην οποία στηρίζεται ο διαχωρισμός, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται σαν κατανομής, προσρόφησης, ιονανταλλαγής και αποκλεισμό μεγέθους.

Στην χρωματογραφία κατανομής ή χρωματογραφία υγρού-υγρού η στατική φάση αποτελείται από ένα λεπτό σώμα υγρού προσροφημένου στην επιφάνεια ενός αδρανούς υλικού. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στον διαφορετικό συντελεστή κατανομής των συστατικών ενός μίγματος σε ορισμένο σύστημα διαλυτών.

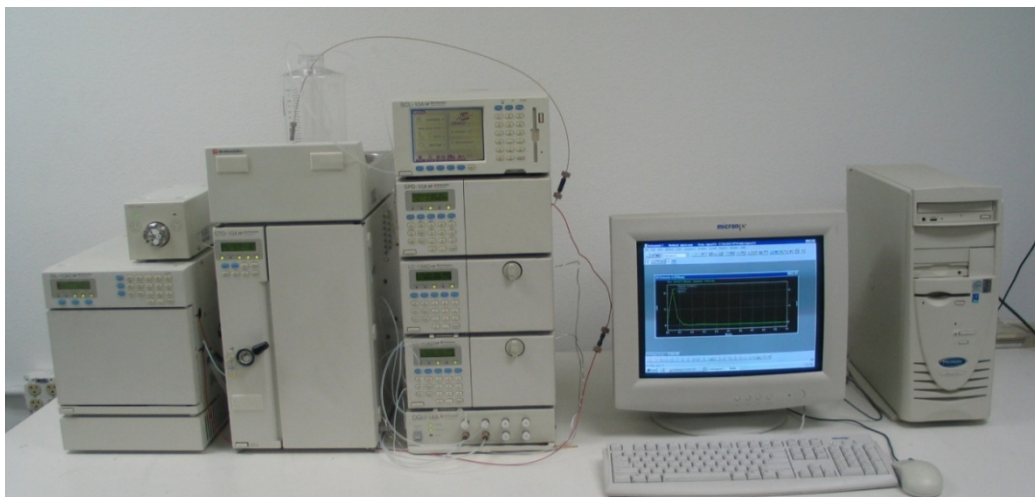
Στην χρωματογραφία προσρόφησης ή χρωματογραφία υγρού-στερεού, η κινούμενη φάση είναι υγρή και η στατική ένα λεπτό τριμμένο στερεό υλικό με προσροφητικές ιδιότητες. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των συστατικών του μίγματος πάνω στην επιφάνεια του στερεού.

Στην χρωματογραφία ιονανταλλαγής γίνεται διαχωρισμός του δείγματος λόγω διαφορετικής ιοντικής ισχύος των ενώσεων. Οι δυνάμεις συγκράτησης μεταξύ των συστατικών του μίγματος και της στερεής φάσης είναι ηλεκτροστατικής φύσης.

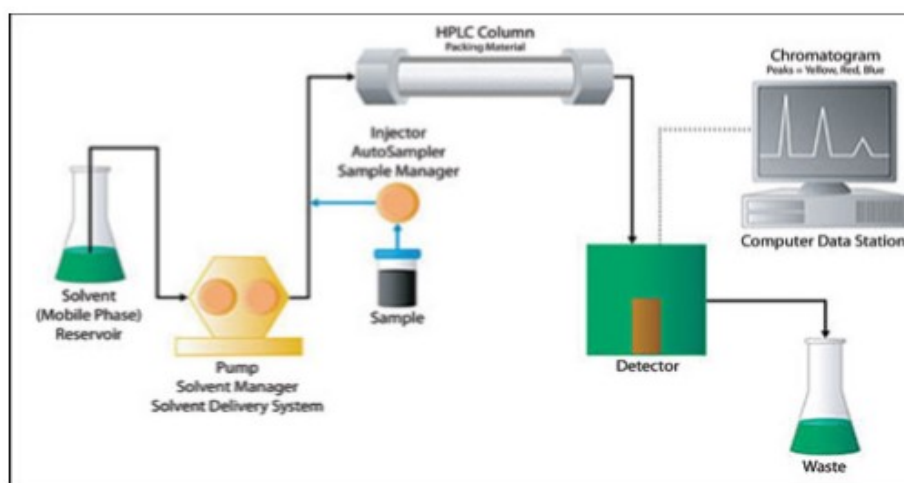
Τέλος στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των προς ανάλυση ενώσεων. Τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα από τη στήλη, ενώ τα μικρά μόρια καθυστερούν, καθώς εισέρχονται στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, και εξέρχονται αργότερα. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των πολυμερών. (10)

#### **1.2.1. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι μία μέθοδος διαχωρισμού διαλυμάτων. Η HPLC αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας καθώς χρησιμοποιεί υψηλές πιέσεις (μέχρι και 100 MPa ή 1000 bar) ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερος και γρηγορότερος διαχωρισμός του δείγματος. Ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης (όπου γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος) με ειδική μικροσύριγγα και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι ενώσεις του προς ανάλυση δείγματος κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Κάθε μία από τις ενώσεις που ανιχνεύεται απεικονίζεται στην οθόνη του ηλεκτρονικού υπολογιστή, με μία κορυφή και αυτό αποτελεί το χρωματογράφημα διαχωρισμού. Η ανίχνευση των εκλούμενων συστατικών αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρος και μπορεί να είναι είτε εκλεκτική είτε όχι, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Η αποθήκευση των αναλυτικών δεδομένων γίνεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. (10)



Εικόνα 4: Σύστημα HPLC Shimadzu



Εικόνα 5: Οργανολογία της HPLC (10)

Ένα σύστημα HPLC αποτελείται από :

- ❖ Δοχεία αποθήκευσης των διαλυτών
- ❖ Αντλία υψηλής πίεσης
- ❖ Μονάδα εισαγωγής δείγματος
- ❖ Χρωματογραφική στήλη
- ❖ Ανιχνευτής
- ❖ Σύστημα καταγραφής και αποθήκευσης δεδομένων
- ❖ Δοχείο αποβλήτων

Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται σχηματικά τα μέρη από τα οποία αποτελείται η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης.

### 1.3. Εκχύλιση (Extraction)

Η εκχύλιση είναι μία φυσική μέθοδος διαχωρισμού διαλυμάτων η οποία βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, που αναμιγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Η ευρύτητα της μεθόδου αυτής, οφείλεται στην απλότητα, στην ταχύτητα, στην ευελιξία και στη δυνατότητα εφαρμογής της σε δείγματα που περιέχουν είτε ίχνη, είτε μεγάλες ποσότητες μιας ουσίας. Η εκχύλιση είναι μια διεργασία που βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην βιομηχανία, είτε στην διαδικασία επεξεργασίας πρώτων υλών, είτε στον διαχωρισμό τελικών προϊόντων, είτε σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Στις τεχνικές εκχύλισης συμπεριλαμβάνονται η υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid – Liquid Extraction, LLE), η εκχύλιση στερεών με υγρό (Solid Liquid Extraction), και η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). (11)

Στην υγρή εκχύλιση τα συστατικά του διαλύματος διαχωρίζονται δια της επαφής και μεταφοράς μάζας σε έναν άλλον ειδικό διαλύτη. Οι δύο υγρές αυτές φάσεις θα πρέπει να είναι μη αναμίξιμες και διακριτές μεταξύ τους. Η εκχύλιση στερεού-υγρού είναι μία μέθοδος διαχωρισμού που χρησιμοποιείται κυρίως στην μεταλλουργική βιομηχανία και έχει ως στόχο την ανάκτηση κάποιου συστατικού από ένα στερεό μίγμα μέσω επαφής αυτού με ειδικό διαλύτη όπου και θα μεταφερθεί το εκχυλισμένο συστατικό. Η τεχνική της εκχύλισης στερεής φάσης χρησιμοποιεί ένα προσροφητικό υλικό το οποίο προσροφά τις ενώσεις από υδατικά διαλύματα. (11)

Η μέθοδος της υγρής εκχύλισης είναι μία κλασική μέθοδος διαχωρισμού διαλυμάτων ωστόσο έχει αρκετά μειονεκτήματα. Σε αυτά συγκαταλέγονται η χρήση μεγάλων ποσοτήτων διαλυτών υψηλής καθαρότητας, που είναι ακριβοί, τοξικοί και προκαλούν προβλήματα στο περιβάλλον. Επίσης η μέθοδος αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα. Αντίθετα η εκχύλιση στερεής φάσης μπορεί να χρησιμοποιεί πολύ πιο μικρές ποσότητες διαλύτη, χρειάζεται όμως ένα ακόμη στάδιο μείωσης του εκχυλισμένου όγκου. Η μέθοδος αυτή μπορεί να αυτοματοποιηθεί ωστόσο η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη και συνεπώς έχει επιπρόσθετα έξοδα. (12)

#### 1.4. Μικροεκχύλιση (Micro Extraction)

Η ανάγκη για την εύρεση πιο γρήγορων και οικονομικών μεθόδων εκχύλισης ενώσεων από τα υπό εξέταση δείγματα οδήγησε, στην ανάπτυξη των τεχνικών της μικροεκχύλισης. Η μικροεκχύλιση είναι μία μέθοδος διαχωρισμού διαλυμάτων όπου μειώνεται η κατανάλωση του εκχυλιστικού μέσου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του συνολικού κόστους της όλης διεργασίας, καθώς χρησιμοποιούνται πολύ μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη. Στις τεχνικές αυτές συμπεριλαμβάνονται η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro Extraction) και η υγρής φάσης μικροεκχύλιση (Liquid Phase Micro Extraction).

Στα πλεονεκτήματα και των δύο μεθόδων μικροεκχύλισης συμπεριλαμβάνονται η ταχύτητα, η απλότητα, το χαμηλό κόστος καθώς και ότι χαρακτηρίζονται ως φιλικές προς το περιβάλλον. Επιπλέον, με τις τεχνικές αυτές καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση ρυπαντών σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα όπου συνήθως απαντώνται σε ίχνη.

##### 1.4.1. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Micro Extraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης είναι μία γρήγορη μέθοδος δειγματοληψίας στην οποία δεν χρησιμοποιείται καθόλου οργανικός διαλύτης. Η SPME είναι μία τεχνική η οποία στηρίζεται σε ένα στερεό προσροφητικό υλικό (πολυμερές), με το οποίο είναι επικαλυμμένη ή ίνα πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (fused silica gel), το οποίο αποτελεί την εκχυλιστική φάση όπου εκχυλίζονται οι οργανικές ενώσεις (πτητικές και ημι-πτητικές) από τα διαλύματα. Η SPME μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλά πεδία της αναλυτικής χημείας παραδείγματος χάρη, σε αναλύσεις τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων. (13)

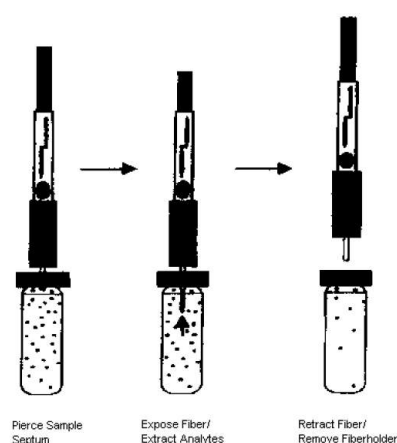
Στα πλεονεκτήματα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης συμπεριλαμβάνονται η απλότητά της, η αποτελεσματικότητά της και η ταχύτητα της ως μέθοδος δειγματοληψίας. Η SPME χαρακτηρίζεται ως μία φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος καθώς δεν χρησιμοποιείται κάποιος διαλύτης. Η μέθοδος αυτή έχει αρκετά μεγάλη ευαισθησία, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές συγκεντρώσεις από τους ρύπους. (13)

Το κύριο μειονέκτημα της SPME μεθόδου οφείλεται στην ίνα η οποία είναι πολύ ακριβή. Η διάρκεια ζωής της ίνας είναι περιορισμένη επειδή τα υλικά της στερεάς φάσης αποικοδομούνται με τη χρήση της. Επιπλέον, η μερική απώλεια της στερεάς φάσης της SPME μπορεί να οδηγήσει σε κορυφές που μπορούν να εκλουστούν μαζί με τις ενώσεις που αναλύονται, έτσι η ίνα να χάσει την γραμμικότητά της και να προκύπτουν μη αξιόπιστα αποτελέσματα. (13)

Η SPME αποτελεί μικρογραφία της εκχύλισης στερεάς φάσης και μπορεί να χωριστεί σε δύο είδη, την άμεση δειγματοληψία (Direct SPME) και την δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου (Headspace SPME).

#### 1.4.1.1. Άμεση δειγματοληψία στερεάς φάσης (Direct SPME)

Στην άμεση δειγματοληψία στερεάς φάσης, η ίνα βρίσκεται μέσα στο δείγμα σε όλη την διάρκεια της εκχύλισης, ώστε οι ουσίες να μεταφέρονται απευθείας από την μήτρα του δείγματος στην ίνα και ο χρόνος που απαιτείται για την αποκατάσταση της ισορροπίας του συστήματος μειώνεται σημαντικά με χρήση τεχνικών ανάδευσης. Σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η καταστροφή της ίνας από πολύπλοκες μήτρες με πολλές προσμίξεις. Στην εικόνα 6 παρουσιάζεται η διαδικασία της δειγματοληψίας με χρήση direct SPME.



Εικόνα 6: Πειραματική διάταξη της Direct SPME

#### 1.4.1.2. Δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου στερεάς φάσης (Headspace SPME)

Στην δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου στερεάς φάσης η ίνα εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος καθ' όλη την διάρκεια της δειγματοληψίας όπως φαίνεται στην εικόνα 7. Η δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου είναι αρκετά σημαντική διότι δίνει τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται σύνθετα είδη μήτρας διαλυμάτων και ρύθμισης του pH, χωρίς να καταστρέφεται η ίνα.



Εικόνα 7: Δειγματοληψία HSSPME

Η HSSPME αποτελεί ένα κλειστό σύστημα το οποίο στηρίζεται στην ισορροπία μεταξύ των τριών φάσεων, της υδατικής, της υπερκείμενης και της στερεάς φάσης. Στην μέθοδο αυτή οι ενώσεις-στόχοι θα πρέπει να διαπεράσουν δύο διεπιφάνειες που δημιουργούνται στο σύστημα (την διεπιφάνεια διαλύματος/υπερκείμενης φάσης και την διεπιφάνεια υπερκείμενης φάσης/ίνας) για να μεταφερθούν στην ίνα. (13)

Σε ένα κλειστό σύστημα τριών φάσεων, η HSSPME θεωρείται μία διεργασία πολλαπλών σταδίων καθώς περιλαμβάνει μεταφορά μάζας μεταξύ των τριών φάσεων και διαμέσου των δύο διεπιφανειών, του διαλύματος με την υπερκείμενη

φάση και της υπερκείμενης φάσης με την ίνα. Πριν την εισαγωγή της ίνας στο σύστημα θεωρείται ότι έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ διαλύματος και υπερκείμενου χώρου. Μετά το πέρας της περιόδου ισορροπίας του συστήματος η ίνα εκτίθεται στο σύστημα όπου προσροφά μόρια των ενώσεων-στόχων που βρίσκονται στην αέρια φάση. Ως συνέπεια αυτού του φαινομένου η συγκέντρωση των αναλυτών αρχίζει να μειώνεται στην αέρια φάση, η οποία αναπληρώνεται από την μεταφορά των ενώσεων από την υγρή στην αέρια φάση. Το περιοριστικό στάδιο για τις ημι-πτητικές ενώσεις αποτελεί η μεταφορά τους από το διάλυμα στον υπερκείμενο χώρο ενώ η μεταφορά μάζας από την υπερκείμενη φάση στην ίνα θεωρείται γρήγορη διαδικασία. (13) Πτητικές ενώσεις, με μεγάλη τιμή σταθεράς Henry, έχουν την τάση να μεταφέρονται από το διάλυμα στην υπερκείμενη φάση γρηγορότερα από τις ημι-πτητικές ενώσεις (14).

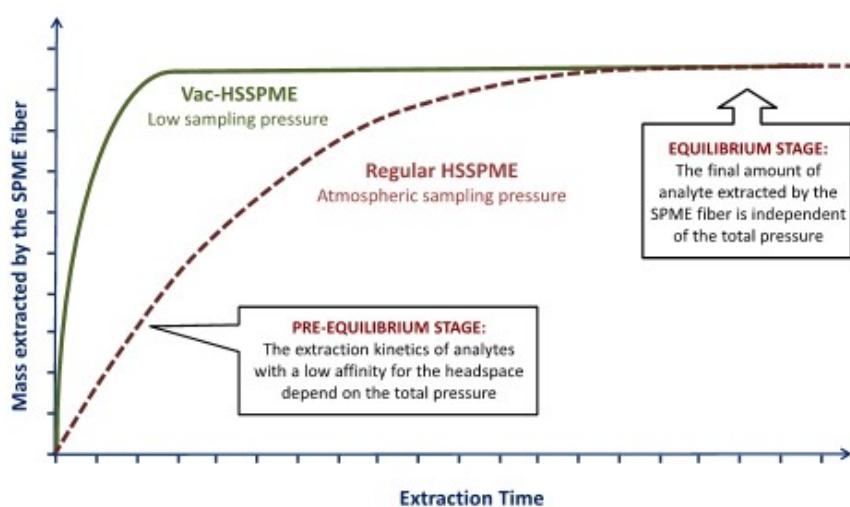
Στις περιπτώσεις που οι ενώσεις στόχοι είναι ημι-πτητικές μπορούν να διαφοροποιηθούν κάποιες παράμετροι οι οποίοι μπορούν να αυξήσουν την κινητική των ενώσεων αυτών ώστε να μεταφέρονται στην αέρια φάση πιο γρήγορα. Οι παράμετροι αυτοί μπορεί να είναι είτε η αύξηση της ανάδευσης είτε η αύξηση της θερμοκρασίας. Ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε αποσύνθεση των ενώσεων ή την δημιουργία παραπροϊόντων. (14) Αξίζει να σημειωθεί ότι μικρότεροι χρόνοι ισορροπίας και κατ'επέκταση δειγματοληψίας παρατηρούνται όταν υπάρχουν στο σύστημα συνθήκες κενού.

#### **1.4.1.3. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού (Vac- HSSPME)**

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού, είναι μία καινούρια μέθοδος δειγματοληψίας η οποία πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες χαμηλής πίεσης. Αν και οι συγκεντρώσεις ισορροπίας είναι ανεξάρτητες της ολικής πίεσης του φιαλιδίου, παρατηρήθηκε ότι η μείωση της πίεσης επιφέρει πριν το στάδιο της ισορροπίας την αύξηση της κινητικής των ημι-πτητικών ενώσεων. (15) Για τις ενώσεις αυτές η εφαρμογή της δειγματοληψίας υπερκείμενου χώρου στερεάς φάσης σε συνθήκες κενού (Vac-HSSPME) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αντίστασης στην μεταφορά μάζας των ενώσεων από την υγρή στην αέρια φάση.



Η Vac-HSSPME έχει υψηλότερη αποδοτικότητα και ευαισθησία σε μικρότερο χρονικό διάστημα και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες δειγματοληψίας σε σύγκριση με την δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου στερεής φάσης υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Το κύριο πλεονέκτημα αυτή της μεθόδου είναι η μείωση του χρόνου ισορροπίας και κατ' επέκταση δειγματοληψίας σε συνθήκες ήπιων θερμοκρασιών, επίσης αποκλείει τη δημιουργία διαφόρων προβλημάτων όπως είναι η αποσύνθεση των προς ανάλυση ενώσεων και τη δημιουργία συστατικών τα οποία μπορούν να δημιουργηθούν με την ψύξη της SPME ίνας. (13)

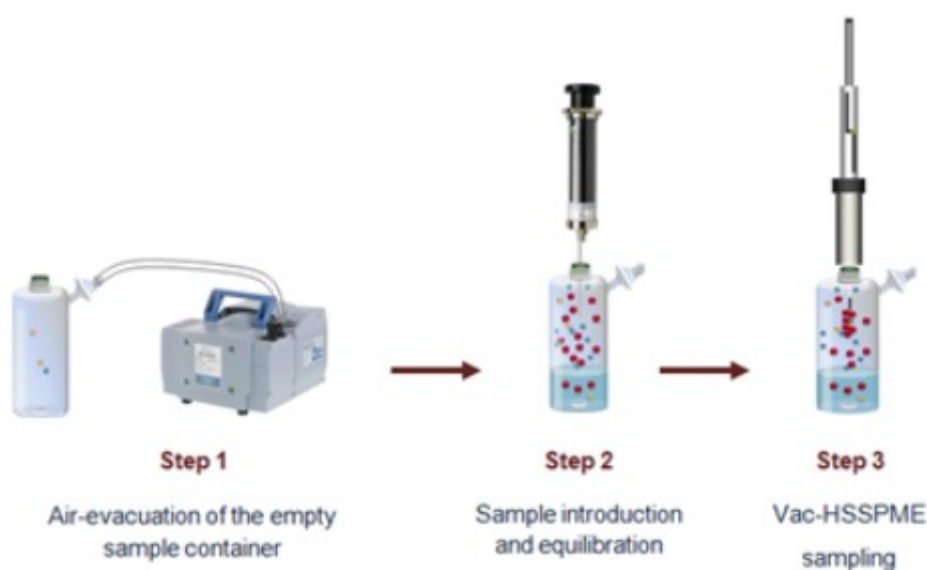


Εικόνα 8: Διάγραμμα χρόνου συνάρτηση της μάζας που έχει εκχυλιστεί (13)

Στην εικόνα 8 παρουσιάζεται το διάγραμμα του χρόνου εκχύλισης για τις μεθόδους HSSPME κάτω από συνθήκες χαμηλής και ατμοσφαιρικής πίεσης. Όπως φαίνεται στη μέθοδο Vac-HSSPME η ισορροπία του συστήματος αναμένεται να επέλθει σε πολύ πιο σύντομο χρονικό διάστημα συγκριτικά με την Regular HSSPME. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στη μέθοδο Vac-HSSPME να μειώνεται ο χρόνος δειγματοληψίας χωρίς να επηρεάζεται η απόδοση της μεθόδου. Ωστόσο ο χρόνος αποκατάστασης της ισορροπίας του συστήματος ή της ποσότητας που εκχυλίζεται από την ίνα δεν επηρεάζονται όταν στο διάλυμα προς ανάλυση οι ενώσεις στόχοι είναι πτητικές. Επομένως σε περιπτώσεις που οι ενώσεις στόχοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη πτητικότητα τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις δύο μεθόδους (Vac - HSSPME και Regular HSSPME) δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά. Η τεχνική Vac -HSSPME όμως αναμένεται να είναι ιδιαίτερα ωφέλιμη στην περίπτωση των

ημιπτητικών ενώσεων μιας και θα επιταχύνει τη δειγματοληψία τους προσφέροντας ταυτόχρονα μεγάλη ευαισθησία σε χαμηλές θερμοκρασίες. Να αναφερθεί εδώ ότι οι ενώσεις αυτές είναι παρουσιάζουν και το μεγαλύτερο βαθμό δυσκολίας στην ανάλυσή του και ως εκ τούτου η τεχνική Vac –HSSPME έρχεται να καλύψει αυτό το αναλυτικό κενό.

Τα πειραματικά στάδια της τεχνικής Vac–HSSPME είναι τα ίδια με τη συμβατική HSSPME με μόνη εξαίρεση την εισαγωγή ενός επιπλέον βήματος αφαίρεσης του αέρα πριν ή μετά την εισαγωγή του δείγματος. Στην εικόνα 9 δίνεται μια αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας που πρέπει να ακολουθηθεί στην περίπτωση που η εξαέρωση της συσκευής γίνεται πριν την εισαγωγή του υγρού δείγματος.



Εικόνα 9: Πειραματικά στάδια για την διεξαγωγή πειραμάτων με τη μέθοδο Vac-HSSPME

### Θεωρητικό υπόβαθρο Vac-HSSPME

Η διαδικασία της εξάτμισης οργανικών ενώσεων από υδάτινο περιβάλλον θεωρείται αντίδραση πρώτης τάξεως

$$C_s = C_s^0 e^{-kt} \quad (1)$$

Όπου οι όροι  $C_s$  ,  $k$  αποτελούν την μεταβολή της συγκέντρωσης της ένωσης προς τον χρόνο ( $t$ ) και την σταθερά ταχύτητας της εξάτμισης αντίστοιχα.

Ολοκληρώνοντας την εξίσωση (1) ως προς το χρόνο, η εξίσωση που προκύπτει εκφράζει τη μεταβολή της συγκέντρωσης της ένωσης στη διεπιφάνεια που δημιουργείται μεταξύ της αέριας φάσης και του δείγματος.

$$V_s \frac{dC_s}{dt} = -K_L A (C_s - C_i) \quad (2)$$

Όπου  $C_i$  είναι η συγκέντρωση της ένωσης στην διεπιφάνεια αέριας φάσης και δείγματος,  $A$  είναι η διεπιφάνεια της αέριας φάσης και του δείγματος,  $K_L$  ο ολικός συντελεστής μεταφοράς μάζας μεταξύ της διεπιφάνειας και  $V_s$  είναι ο όγκος του δείγματος.

Η ολοκλήρωση της εξίσωσης (2) καταλήγει σε μία νέα εξίσωση η οποία συνδέει τη σταθερά ταχύτητας της εξάτμισης ( $k$ ) με τον συντελεστή της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και υδάτινης φάσης μέσα στη περιοχή της διεπιφάνειας ( $K_L$ ).

$$k = \frac{K_L}{L} \quad (3)$$

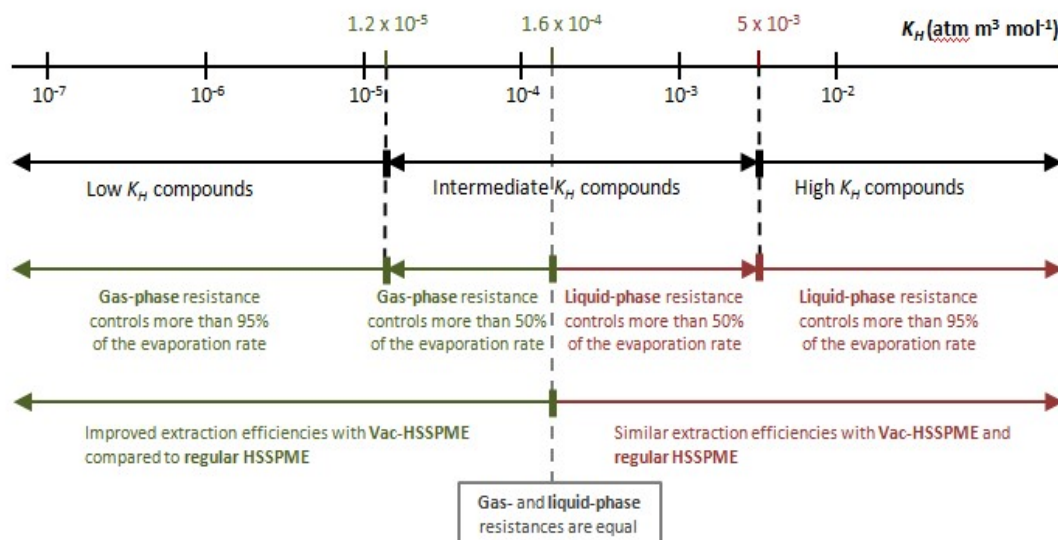
Όπου το  $L$  είναι το βάθος τους διαλύματος μέσα σε δοχείο με ομοιόμορφη κατανομή.

Ο Liss και ο Stater και αργότερα ο Mackay με τον Leinonen ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τον συντελεστή της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και της υδάτινης φάσης μέσα στη ζώνη της διεπιφάνειας ( $K_L$ ). Ο αναφερόμενος συντελεστής περιγράφεται από την εξίσωση, η οποία βασίζεται στην θεωρία των δύο φάσεων (two-film theory), στο μοντέλο πλήρους ανάδευσης του συστήματος (flux-matching boundary condition) και στην υπόθεση ότι η συνολική αντίσταση στην μεταφορά μάζας προέρχεται είτε από το λεπτό στρώμα της αέριας φάσης είτε της υγρής ή και από τα δύο στρώματα που είναι παρακείμενα στην ζώνη της διεπιφάνειας δείγματος/υπερκείμενης φάσης.

$$K_L = \left[ \frac{1}{k_L} + \frac{RT}{K_H k_g} \right]^{-1} \quad (4)$$

Όπου  $k_L$  είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην υδάτινη φάση,  $K_H$  είναι η σταθερά του η σταθερά του Henry και  $k_g$  είναι ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση. (14)

Οι πτητικές ενώσεις μεταφέρονται πιο γρήγορα στην αέρια φάση καθώς έχουν μεγάλη τιμή σταθεράς Henry ( $K_H$ ) και τάση ατμών. Στις περιπτώσεις των ημιπτητικών ενώσεων, όπου χαρακτηρίζονται από μικρές τιμές  $K_H$  και χαμηλή τάση ατμών η αδιάστατη σταθερά Henry ( $K_H/RT$ ) η οποία δείχνει σε ποια φάση η ένωση θα βρίσκει τη μεγαλύτερη δυσκολία για να τη διαπεράσει.



Εικόνα 10: Αντίσταση φάσεων σε σχέση με την σταθερά Henry (13)

Όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 10 ενώσεις με υψηλή τιμή  $K_H$  (τιμές  $K_H$  μεγαλύτερη από  $\sim 5 \times 10^{-3} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) η μεγαλύτερη αντίσταση στην μεταφορά μάζας είναι η υδατική φάση, ενώ για μικρές τιμές του συντελεστή Henry ( $1.2 \times 10^{-5}$  ή  $1.6 \times 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ) η αντίσταση στη μεταφορά μάζας από το διάλυμα στον υπερκείμενο χώρο είναι η αέρια φάση. Σε ενδιάμεσες τιμές σταθεράς Henry η αντίσταση οφείλεται και στις δύο φάσεις. (14)

Ο μοριακός συντελεστής διάχυσης στην αέρια φάση ( $D_g$ ) της ένωσης- στόχου είναι ανεξάρτητος της πολικότητας των ενώσεων και αντιστρόφως ανάλογος της ολικής

πίεσης (P). Η σχέση για τον υπολογισμό του  $D_g$  από τους Fuller–Schettler–Giddings παρουσιάζεται από τη σχέση (5)

$$D_g = \frac{0.001 * T^{1.75} \sqrt{(1/M_{air}) + (1/M_c)}}{P \left[ (\sum V_{air})^{\frac{1}{3}} + (\sum V_c)^{\frac{1}{3}} \right]^2} \quad (5)$$

Όπου T είναι η απόλυτη θερμοκρασία,  $M_{air}$  και  $M_c$  είναι τα μοριακά βάρη για τον αέρα και την οργανική ένωση αντίστοιχα, P είναι η ολική πίεση,  $V_{air}$  και  $V_c$  είναι οι γραμμομοριακοί όγκοι του αέρα και της ένωσης αντίστοιχα. Ο συντελεστής μεταφοράς μάζας ( $k_g$ ) είναι σχετίζεται ανάλογα με τη μοριακή διάχυση των ενώσεων ( $D_g$ ) υψωμένη στην δύναμη n που παίρνει τιμές 1/2, 2/3, 1. (14)

Η χρήση προ εκκενωμένης φιάλης πριν την εισαγωγή του δείγματος οδηγεί στην μείωση της ολικής πίεσης του κλειστού συστήματος. Αυτό έχει ως συνέπεια, με τη προϋπόθεση ότι η θερμοκρασία παραμένει σταθερή, να αυξηθεί ο συντελεστής της μοριακής διάχυσης ( $D_g$ ) των ημι-πτητικών ενώσεων. Η αύξηση του  $D_g$  οδηγεί σε αύξηση του συντελεστή μεταφοράς ( $K_L$ ), καθώς σχετίζονται ανάλογα, και στη συνέχεια αύξηση του συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση ( $k_g$ ). Επομένως στην περίπτωση των ημι-πτητικών ενώσεων η διαδικασία της εξάτμισης από την υδατική φάση στην υπερκείμενη φάση εξαρτάται από τον συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση και ο ρυθμός εξάτμισης αυξάνεται με την μείωση της πίεσης του συστήματος. (14)

Η δειγματοληψία με τη μέθοδο Vac-HSSPME πριν το σύστημα φτάσει σε ισορροπία οδηγεί σε πιο γρήγορη εξάτμιση των ενώσεων από το υδατικό διάλυμα, διότι μειώνεται η συγκέντρωσή τους στην υπερκείμενη φάση λόγω της προσρόφησής τους από την ίνα κατά το στάδιο της δειγματοληψίας. Αυτό αποδεικνύει ότι το καθοριστικό στάδιο για όλη την διεργασία της HSSPME είναι η μεταφορά της μάζας από το υδατικό δείγμα στην υπερκείμενη αέρια φάση και γι αυτό στη Vac-HSSPME μέθοδο η ισορροπία επέρχεται ταχύτερα υπό συνθήκες κενού σε σύγκριση με αυτή υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. (14)

#### 1.4.2. Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (Liquid Phase Micro Extraction, LPME)

Η μικρό εκχύλιση υγρής φάσης είναι μία μέθοδος διαχωρισμού μια διαλυμένης ουσίας σε έναν διαλύτη και βασίζεται στην διαφορετική κατανομή της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη είναι δηλαδή μία μικρογραφία της υγρής εκχύλισης. Η LPME είναι πολύ δημοφιλής λόγω του χαμηλού κόστους, της απλότητας και της χρήσης απλού εργαστηριακού εξοπλισμού (16). Πολλές από αυτές τις τεχνικές προσφέρονται επίσης για την ολοκλήρωση της αυτοματοποίησης και της ανάλυσης συνεχούς ροής. Καθώς η LPME περιλαμβάνει τη χρήση πολύ μικρών ποσοτήτων διαλύτη για την εκχύλιση, θεωρείται ως πράσινη αναλυτική μέθοδος δειγματοληψίας. Η LPME έχει αναπτυχθεί με πολλές παραλλαγές όπως είναι η άμεση SDME (DI-SDME), η υπερκείμενου χώρου δειγματοληψία SDME (HS-SDME), η μικροεκχύλιση σταγόνας σε σταγόνα (DDME), η απευθείας αιωρούμενου σταγονιδίου μικροεκχύλιση (DSDME) και η συνεχούς ροής μικροεκχύλισης (CFME) (17).

Η LPME αποτελεί μία γρήγορη και απλή μέθοδος δειγματοληψίας, ενώ το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της είναι ότι χρειάζονται πολύ μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη καθώς και η χρήση απλού εργαστηριακού εξοπλισμού. Επιπλέον, με τις τεχνικές αυτές καθίσταται πλέον δυνατή η ανάλυση ρυπαντών σε πραγματικά περιβαλλοντικά δείγματα όπου συνήθως απαντούνται σε ίχνη (16).

Παρ' όλα αυτά, κάθε αναλυτική μέθοδος δεν έχει μόνο πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Σε αυτά συγκαταλέγονται η πτητικότητα του διαλύτη, η μερική υδατοδιαλυτότητα και ο περιορισμένος όγκο της σταγόνας του διαλύτη. Ο περιορισμένος όγκος της σταγόνας μπορεί να είναι ένα κρίσιμο πρόβλημα, δεδομένου ότι η SDME είναι μια διαδικασία ισορροπίας και η ισορροπία εξαρτάται, εν μέρει, από την αναλογία των όγκων (του διαλύτη προς το δείγμα) (17).

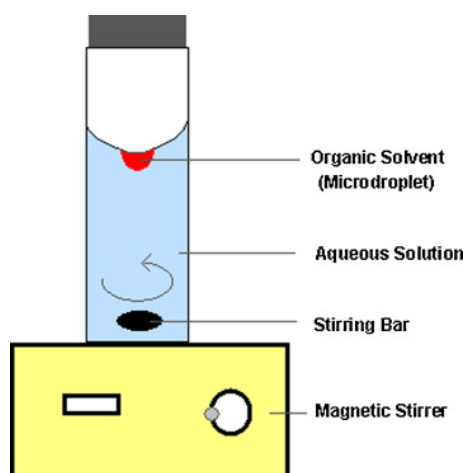
#### 1.4.2.1. Μικροεκχύλιση Σταγόνας σε Σταγόνα (Drop to Drop Micro Extraction)

Η μέθοδος DDME είναι μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τεχνική για την ανάλυση δειγμάτων για τα οποία είναι διαθέσιμοι περιορισμένοι όγκοι. Με αυτή την τεχνική έχουν εξαχθεί με επιτυχία δείγματα αίματος, ορού και ούρων, με όγκους μικρότερους από 7  $\mu\text{L}$ . Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια απλή, γρήγορη και χαμηλού κόστους τεχνική για την εκχύλιση και τον καθαρισμό πολύ μικρών βιολογικών δειγμάτων από πολύπλοκες μήτρες.

#### 1.4.2.2. Απευθείας Αιωρούμενου Σταγονιδίου Μικροεκχύλιση (Directly Suspended Droplet Micro Extraction, DSDME)

Το DSDME (εικόνα 11), όπως και το DI-SDME, είναι μια τεχνολογία μικροεκχύλισης δύο φάσεων υγρού-υγρού. Η διαφορά είναι ότι, για στο DI-SDME, ο διαλύτης αιωρείται εντός ενός υγρού δείγματος στο τέλος μιας σύριγγας ή άλλης συσκευής δειγματοληψίας, ενώ για το DSDME, η ανάδευση του συστήματος παράγει ένα συμμετρικά περιστρεφόμενο πεδίο γύρω από τον συμμετρικό άξονα του μικροσταγονιδίου. Παρά το γεγονός ότι η μικροσταγόνα αφήνεται ελεύθερη, εξακολουθεί να υφίσταται με τη μορφή μονής σταγόνας. Με την παρέλευση ενός προκαθορισμένου χρονικού διαστήματος η οργανική φάση δέκτης απομακρύνεται με τη βοήθεια μικρο-σύριγγας και στη συνέχεια οδηγείται στο όργανο για ανάλυση.

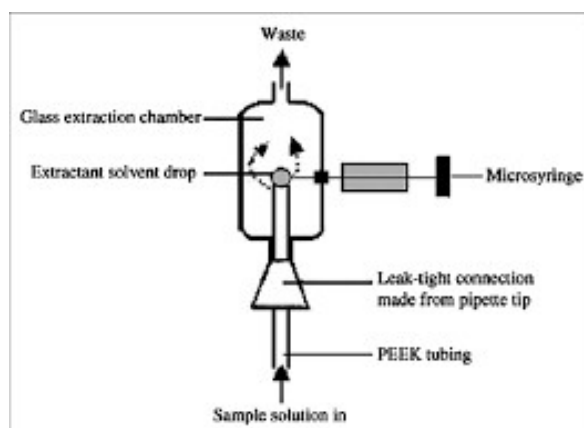
(17)



Εικόνα 11: Πειραματική διάταξη μεθόδου DSDME

#### 1.4.2.3. Συνεχούς Ροής Μικροεκχύλιση (Continuous Flow Micro Extraction, CFME)

Σε αυτή τη μέθοδο (εικόνα 12), η σταγόνα του εκχυλιζόμενου διαλύτη εισάγεται με μια συμβατική μικροσύριγγα σε έναν γυάλινο θάλαμο και συγκρατείται στην άκρη της εξόδου ενός συνδεδεμένου σωλήνα PTFE (πολυτετραφθοροαιθυλενίου, Teflon). Το διάλυμα του δείγματος ρέει μέσα από αυτόν τον σωλήνα και την γυάλινη μονάδα εκχύλισης στα απόβλητα, η σταγόνα διαλύτη αλληλεπιδρά συνεχώς με το διάλυμα του δείγματος και η εκχύλιση πραγματοποιείται ταυτόχρονα. Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται υψηλότερος συντελεστής συγκέντρωσης από ότι στην στατική μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LPME), γιατί η σταγόνα του διαλύτη βρίσκεται συνεχώς σε επαφή με το δείγμα. (17)



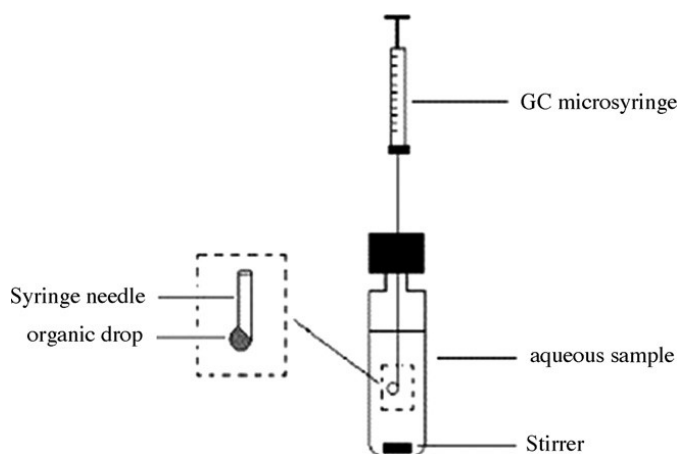
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης CFME (12)

#### 1.4.2.4. Απευθείας δειγματοληψία (Direct Immersion Micro Extraction, DI SDME)

Στην μέθοδο direct SDME (εικόνα 13) η σταγόνα του οργανικού διαλύτη τοποθετείται με τη βοήθεια μικροσύριγγας μέσα στο διάλυμα για όλη την διάρκεια της εκχύλισης. Σε αυτή τη μέθοδο υπάρχουν δύο μη αναμίξιμες υγρές φάσεις η υδατική και η οργανική. Κατά τη διεργασία της μικροεκχύλισης γίνεται μεταφορά μάζας από την υδατική στην οργανική φάση. Οι ενώσεις στόχοι μεταφέρονται από το υδατικό διάλυμα στην σταγόνα του οργανικού διαλύτη μέχρις ότου επέλθει η



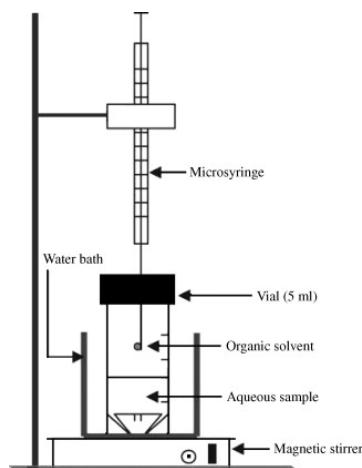
θερμοδυναμική ισορροπία ή σταματήσει η εκχύλιση. Μετά το τέλος της δειγματοληψίας η οργανική φάση οδηγείται στο όργανο για ανάλυση. (18)



Εικόνα 13: Πειραματική διάταξη άμεσης δειγματοληψίας SDME (12)

#### 1.4.2.5. Δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου μονής σταγόνας (Headspace single drop micro extraction, HSSDME)

Η HSSDME (εικόνα 14) αφορά ένα κλειστό σύστημα όπου η σταγόνα του οργανικού διαλύτη κρατείται πάνω από το υδατικό διάλυμα με τη βοήθεια μικροσυρίγγας για όλη την διάρκεια της δειγματοληψίας. Σε αυτή την τεχνική υγρής μικροεκχύλισης οι ενώσεις-στόχοι διανέμονται μεταξύ τριών φάσεων, του υδατικού διαλύματος, του υπερκείμενου χώρου και του οργανικού διαλύτη και διαμέσου δύο διεπιφανειών (νερού/υπερκείμενη φάση και υπερκείμενη /οργανική φάση). (12) Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πτητικές και ημι- πτητικές ενώσεις.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης της δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου HSSDME (19)

Η HSSDME είναι μία απλή και γρήγορη μέθοδος δειγματοληψίας. Αποτελεί μία οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, καθώς χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες οργανικών διαλυτών οι οποίοι είναι τοξικοί για το περιβάλλον και απλός εργαστηριακός εξοπλισμός. Στην μέθοδο αυτή ο οργανικός διαλύτης δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τη μήτρα του διαλύματος και αυτό έχει ως συνέπεια να μην επηρεάζεται από αυτήν. (17)

Στα μειονεκτήματα της HSSDME μεθόδου συμπεριλαμβάνεται στη δυσκολία των ημι-πτητικών ενώσεων να διαπεράσουν την διεπιφάνεια της υδατικής/υπερκείμενης φάσης, στον μικρό όγκο και τη πτητικότητα του οργανικού διαλύτη. Για την αύξηση της συγκέντρωσης αναλυτών στη σταγόνα του οργανικού διαλύτη και συνεπώς της αύξηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου οι παράμετροι που μπορούν να τροποποιηθούν, είναι η θερμοκρασία και η ανάδευση (17).

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση των ενώσεων στόχων στον υπερκείμενο χώρο. Τέτοιες μέθοδοι είναι η HSSDME υποβοηθούμενη από υπερήχους, η HSSDME υποβοηθούμενη από απόσταξη μικροκυμάτων και η HSSDME εκκενωμένης μικροσύριγγας. Επίσης η μέθοδος αυτή έχει αυτοματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη όπου αποτελεί μία αποτελεσματική μέθοδο για εκχύλιση υπερκείμενου χώρου. (17)

Η μικροεκχύλιση μονής σταγόνας υπερκείμενου χώρου είναι η προτεινόμενη μέθοδος για την δειγματοληψία πτητικών ενώσεων από υγρά (νερού, ελαίου) ή στερεά διαλύματα (φυτικά, φαρμακευτικά) (17). Πιο συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση πτητικών ενώσεων όπως το τουλουένιο, το βενζόλιο, το αιθυλοβενζόλιο και το ξυλένιο (BTEx) από υδατικά διαλύματα και για την δειγματοληψία αλκοολών από δείγματα μπύρας. (12)

### **Θεωρητικό υπόβαθρο**

Αν υποθεθεί ότι υπάρχει ισορροπία μεταξύ των τριών εμπλεκόμενων φάσεων, η ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας που εκχυλίζεται από την σταγόνα του διαλύτη θα δίνεται από τη σχέση (6)

$$C_s^\infty = \frac{K_{sh}K_{hw}V_wV_s}{K_{sh}K_{hw}V_s + K_{hw}V_h + V_w} C_w^o \quad (6)$$

Όπου  $C_w^o$  είναι η αρχική συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα νερού, οι όροι  $V_w$ ,  $V_h$  και  $V_s$  είναι όγκοι του διαλύματος, του υπερκείμενου χώρου και της σταγόνας του οργανικού διαλύτη αντίστοιχα. Ο όρος  $C_o$  είναι η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο διάλυμα. (16)

Οι  $K_{hw}$  και  $K_{sh}$  είναι σταθερές ισορροπίας κατανομής για την αναλυόμενη ουσία μεταξύ του υπερκείμενου χώρου/διαλύματος και οργανικού διαλύτη/υπερκείμενου χώρου. Οι οποίοι υπολογίζονται από τις σχέσεις (7) και (8)

$$K_{hw} = \frac{C_h^\infty}{C_w^\infty} \quad (7)$$

$$K_{sh} = \frac{C_s^\infty}{C_h^\infty} \quad (8)$$

Όπου  $C_h^\infty$ ,  $C_w^\infty$ ,  $C_s^\infty$  οι συγκεντρώσεις ισορροπίας της αναλυόμενης ουσίας στον υπερκείμενο χώρο, στην υδατική και στον οργανική φάση αντίστοιχα.

Οι μερικές πιέσεις και οι συγκεντρώσεις ισορροπίας είναι ανεξάρτητες από τη συνολική πίεση καθώς οι συντελεστές κατανομής/σταθερά Henry επηρεάζονται μόνο σε υψηλές πιέσεις ( $P > 500$  kPa).

Συνεπώς, στην ισορροπία η ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας που εκχυλίζεται, αναμένεται να είναι ίδια και υπό συνθήκες μειωμένης ή κανονικής πίεσης κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας.

Συγκριτικά οι δύο μέθοδοι της HSSPME και η HSSDME έχουν παρόμοιες δυνατότητες όσον αφορά την ακρίβεια και την ταχύτητα της δειγματοληψίας, ωστόσο η HSSDME έχει επιπλέον πλεονεκτήματα. Η επιλογή των διαλυτών είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τις περιορισμένες στερεές φάσεις που υπάρχουν για την μέθοδο της SPME. Το κόστος των διαλυτών είναι μικρότερο καθώς χρησιμοποιούνται ελάχιστες ποσότητες, αντίθετα η SPME ίνα είναι αρκετά ακριβή. (12)

### **Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας**

Στις μέρες μας έχουν αναπτυχθεί αρκετές νέες μέθοδοι δειγματοληψίας με χρήση της τεχνικής υγρής και στερεάς φάσης μικροεκχύλισης. Οι νέες τεχνικές συγκεντρώνουν πλήθος από επιθυμητά χαρακτηριστικά ιδιότητες όπως μικρότερος χρόνος δειγματοληψίας, χαμηλό κόστος, μικρή απαίτηση σε διαλύτες και ολοκλήρωση μέσα σε λίγα βήματα. Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να μελετηθεί για πρώτη φορά η δειγματοληψία ημι-πτητικών ενώσεων υπερκείμενου χώρου με χρήση υγρής μικροεκχύλισης κάτω από συνθήκες κενού. Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση της μεθόδου ήταν οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και πιο συγκεκριμένα οι ενώσεις στόχοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Ναφθαλένιο, το Ακεναφθένιο και το Πυρένιο.

## 2. Πειραματικό μέρος

### 2.1. Εργαστηριακός Εξοπλισμός

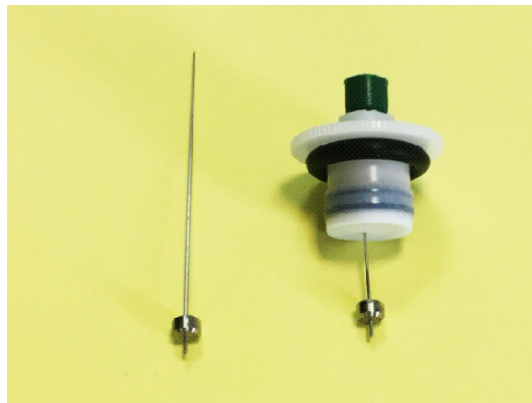
#### 2.1.1. Αντιδραστήρια

- Naphthalene του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) και καθαρότητας 99+%
- Acenaphthene του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) και καθαρότητας 99%
- Pyrene του οίκου Fluka και καθαρότητας  $\geq 99\%$
- Ακετόνη του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) και καθαρότητας 99.5%
- Ακετονιτρίλιο οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) καθαρότητας για υγρή χρωματογραφία
- 1-Octanol Riedel-dehaen, Sigma-Aldrich

Τα πυκνά πρότυπα διαλύματα των τριών πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων παρασκευάστηκαν σε ακετόνη και ήταν συγκέντρωσης 100 mg/L το κάθε ένα. Για τα καθημερινά διαλύματα χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος Barnstead EASYpureRF, το οποίο προμηθεύτηκε από την Thermo Scientific (Dubuque, USA).

#### 2.1.2. Όργανα και συσκευές

- Γυάλινο φιαλίδιο των 22 mL με τροποποιημένο πώμα που κλείνει αεροστεγώς εικόνα 15
- Αντλία κενού Vacuubrand (Wertheim, Germany)
- Μαγνήτακια 10 mm 5 mm Sigma-Aldrich
- Gastight σύριγγα των 10 mL
- Hamilton μικροσύριγγα των 100  $\mu\text{L}$
- Συσκευή ανάδευσης και θέρμανσης Heidolph MR-Standard (Germany)
- Γυάλινο φιαλίδιο των 250  $\mu\text{L}$
- HPLC system της Shimadzu



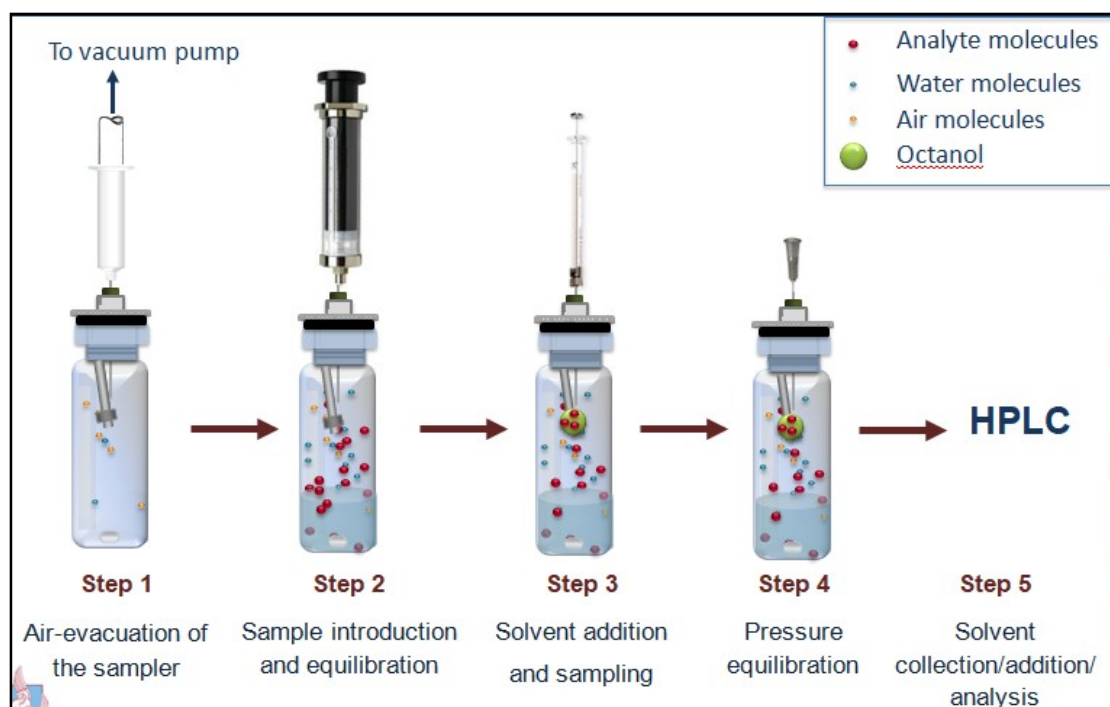
Εικόνα 15: Τροποποιημένο πώμα με την ειδική θέση όπου τοποθετείται ο διαλύτης

### 2.3. Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν δύο μέθοδοι η μικροεκχύλιση υπερκειμένου χώρου μονής σταγόνας κάτω από συνθήκες κενού (Vac-HSSDME) και κάτω από συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (regular HSSDME). Και στις δύο περιπτώσεις ακολουθήθηκαν τα ίδια πειραματικά στάδια, ωστόσο στην μέθοδο Vac-HSSDME χρειάστηκε να γίνει εκκένωση του αέρα στο φιαλίδιο πριν την εισαγωγή του δείγματος.

Στην περίπτωση εκχύλισης με χρήση regular HSSDME σε ένα φιαλίδιο χωρητικότητας 22 mL τοποθετήθηκαν 7mL από το υδατικό διάλυμα το οποίο είχε επιμολυνθεί με 10  $\mu\text{g/L}$  από τα PAHs (Ναφθαλένιο, Ακεναφθένιο και Πυρένιο) και ένας μικρός μαγνήτης για την ανάδευση. Στην συνέχεια έγινε για 10 min ανάδευση του διαλύματος για να επέλθει ισορροπία. Κατόπιν τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια μικροσύριγγας 20 $\mu\text{L}$  οκτανόλης πάνω στην ειδική θέση που ήταν τοποθετημένη στο ειδικά τροποποιημένο καπάκι (εικόνα 15) και έπειτα έγινε ανάδευση του συστήματος για 10 min ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση. Μετά το πέρας της εκχύλισης η σταγόνα του οργανικού διαλύτη μαζί με τις ενώσεις-στόχους που είχαν εκχυλιστεί τοποθετούνταν προσεκτικά σε γυάλινα φιαλίδια χωρητικότητας 250  $\mu\text{L}$  όπου αναμειγνύονταν με 40  $\mu\text{L}$  ακετονιτριλίου. Τέλος 40 $\mu\text{L}$  από το τελικό διάλυμα εισάγονταν με τη βοήθεια μικροσύριγγας στην HPLC για ανάλυση. Κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Στην περίπτωση της πειραματικής διαδικασίας για την Vac-HSSDME όπως φαίνεται και στην εικόνα 16 προστέθηκε ένα επιπλέον βήμα αυτό της εκκένωσης του αέρα από το φιαλίδιο πριν την εισαγωγή του υγρού δείγματος.



Εικόνα 16: Πειραματική διαδικασία Vac-HSSDME

## 2.2. Ανάλυση με HPLC – FLD

Η ποσοτικοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το σύστημα HPLC κατασκευασμένο από τη Shimadzu (Kyoto, Japan), το οποίο περιλαμβάνει μία αντλία δύο διαλυτών και ένα ανιχνευτή φθορισμού (FLD). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Macherey-Nagel C18 (250 mm x 3 mm x 5 μm) από Macherey-Nagel (Germany). Η κινητή φάση ήταν μίγμα ακετονιτρίλιο : υπερκάρθαρο νερό σε αναλογία 85:15, και ροή 1 mL/min. Ο όγκος του δείγματος προς ανάλυση ήταν 40 μL και η ανίχνευση επιτεύχθηκε με ανιχνευτή φθορισμού με μήκος κύματος διέγερσης τα 280 nm και εκπομπής τα 355 nm για το Naphthalene και το Acenaphthene και με μήκος κύματος διέγερσης τα 236 nm και εκπομπής τα 398 nm για το Pyrene. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 25°C και ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 12 min.

### 3. Πειραματικά Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 3.1. Προκαταρκτικές μελέτες

Τα προκαταρκτικά πειράματα για τον προσδιορισμό του κατάλληλου διαλύτη, και των όγκων σταγόνας και δείγματος πραγματοποιήθηκαν σε διαλύματα συγκεντρώσεων 10  $\mu\text{g/L}$  για κάθε μία από τις ενώσεις-στόχους (Naphthalene, Acenaphthene, Pyrene) και σε θερμοκρασία δωματίου 25°C. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε τρεις φορές.

Οι οργανικοί διαλύτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην μέθοδο της μικροεκχύλισης μονής σταγόνας υπερκείμενου χώρου, πρέπει να έχουν μεγάλο ιξώδες ώστε να μπορούν να μείνουν στην ειδική μεταλλική θέση πάνω από το διάλυμα για όλη την διάρκεια της εκχύλισης. Από τους πιο σημαντικούς παράγοντες είναι και η χαμηλή πτητικότητα του διαλύτη, προκειμένου να μην εξατμίζεται κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Τέλος, ο διαλύτης που θα επιλεγεί θα πρέπει να είναι συμβατός με το σύστημα της χρωματογραφίας που θα χρησιμοποιηθεί. Στην παρούσα εργασία προκειμένου να επιλεγθεί ο κατάλληλος οργανικός διαλύτης για την βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες δυο ιοντικά υγρά και η οκτανόλη. Και οι δύο διαλύτες διαθέτουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά ώστε να μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλοι για την μέθοδο αυτή. Ωστόσο τα ιοντικά υγρά απορρίφθηκαν διότι ο χρόνος έκλουσής τους συνέπιπτε με τον χρόνο έκλυσης των ενώσεων στόχων με αποτέλεσμα να μη μπορεί να επιτευχθεί ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων στόχων. Αντίθετα η οκτανόλη κατέληξε σε δυνατά σήματα στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα κάνοντας την τον κατάλληλο διαλύτη για την βελτιστοποίηση και των δύο μεθόδων, Regular και Vacuum HSSDME.

Εν συνεχεία μελετήθηκε ο όγκος του υδατικού διαλύματος σε εύρος τιμών 5-10 mL. Η μελέτη όγκων μεγαλύτερων από 10 mL δεν ήταν εφικτή μιας και η ανάδευση επηρέαζε έμμεσα τον οργανικό διαλύτη με αποτέλεσμα οι μετρήσεις να μην έχουν επαναληψιμότητα. Τα αποτελέσματα από τη σειρά αυτή πειραμάτων έδειξαν ότι ο όγκος του δείγματος δεν επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα της εκχύλισης και για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν τα 7 mL.



Η επιρροή του όγκου της σταγόνας του οργανικού διαλύτη στην απόδοση της εκχύλισης μελετήθηκε σε εύρος τιμών 10 mL-20 mL. Τιμές όγκου κάτω από τη βέλτιστη τιμή είχαν ως αποτέλεσμα την μείωση της ποσότητας των ενώσεων που εκχυλίζονταν. Αντίθετα μεγαλύτερες τιμές όγκου δεν μπορούσαν να κρατηθούν στην ειδική θέση πάνω από το διάλυμα και έπεφταν στο υδατικό κατά τη διάρκεια του πειράματος ή κατά την διάρκεια συλλογής της σταγόνας για την ανάλυση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η βέλτιστη τιμή του όγκου της σταγόνας ήταν 20mL και αυτός όγκος σταγόνας επιλέχθηκε για όλα τα επόμενα πειράματα.

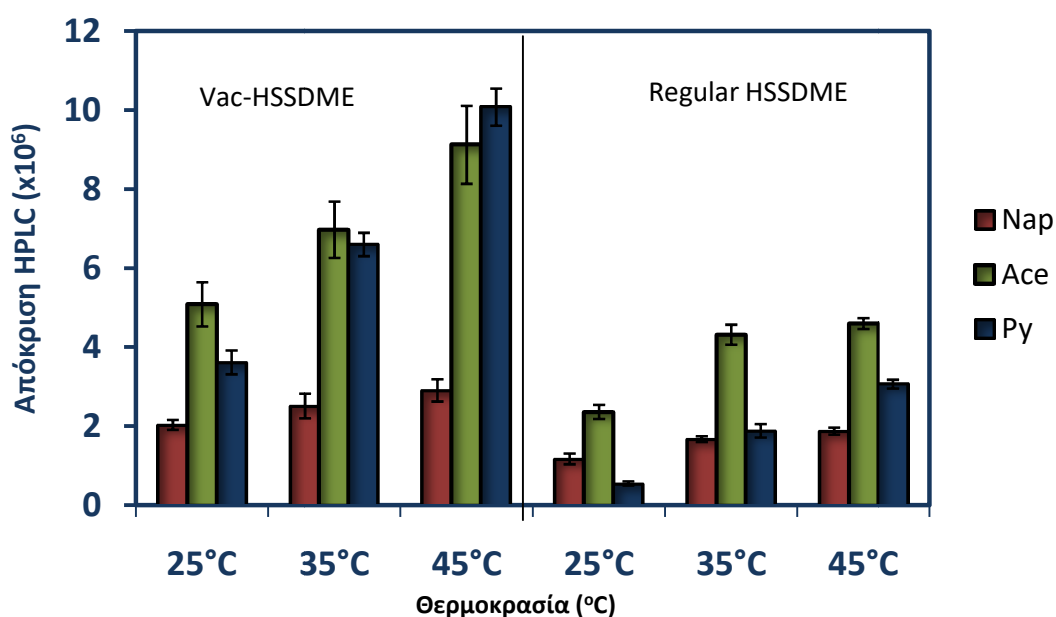
Η επιλογή του ρυθμού ανάδευσης του συστήματος είναι πολύ σημαντική καθώς βοηθά να επέλθει ταχύτερα ισορροπία. Η ανάδευση του διαλύματος είναι ένας παράγοντας ο οποίος προωθεί την μετακίνηση των ενώσεων από το υδατικό διάλυμα στην υπερκείμενη φάση όπου στη συνέχεια θα προσροφηθούν από τον οργανικό διαλύτη. Η μελέτη για την ταχύτητα ανάδευσης έγινε σε εύρος τιμών από 0 έως 1000 rpm. Μικρή ταχύτητα ανάδευσης δεν μπορεί να επιφέρει σε σύντομο χρονικό διάστημα την ισορροπία στο σύστημα, ενώ μεγαλύτερη ταχύτητα ανάδευσης από την βέλτιστη οδηγεί σε κακή επαναληψιμότητα της μεθόδου διότι η γρήγορη ανακίνηση του διαλύματος δημιουργεί γρήγορη ανάδευση και στον υπερκείμενο χώρο. Η βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης που επιλέχθηκε ήταν τα 500rpm.

## **3.2. Βελτιστοποίηση της μεθόδου**

### **3.2.1. Επίδραση της Θερμοκρασίας**

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες καθώς επηρεάζει θετικά τους συντελεστές διάχυσης και τις σταθερές του νόμου Henry των ενώσεων, οδηγώντας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στον υπερκείμενο χώρο και σε μικρότερους χρόνους ισορροπίας. Ο συνδυασμός της αύξησης της θερμοκρασίας και μειωμένης πίεσης στο σύστημα, αναμένεται να ενισχύσει ακόμα περισσότερο την κινητική της εκχύλισης. Στην περίπτωση της HSSDME η χαμηλή πίεση στο σύστημα βοηθά και στη μεταφορά των ενώσεων από τον υπερκείμενο χώρο στον οργανικό διαλύτη. Οι δύο αυτές παράμετροι (χρήσης κενού και αύξηση της θερμοκρασίας) συμβάλλουν στην περαιτέρω βελτίωση της κινητικής της μεθόδου HSSDME και κατ' επέκταση στην απόδοσή της.

Τα πειράματα της θερμοκρασίας για τις μεθόδους vacuum και regular HSSDME έγιναν για τον ίδιο χρόνο εκχύλισης 10 min, τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η μέθοδος Vac-HSSDME παρουσιάζει εμφανώς καλύτερα αποτελέσματα για όλες τις θερμοκρασίες σε σύγκριση με την regular HSSDME. Αυτό συμβαίνει διότι η χρήση της τεχνικής προ εκκενωμένου φιαλιδίου συμβάλλει στην γρηγορότερη μεταφορά των ημι πτητικών ενώσεων από το υδατικό διάλυμα στην υπερκείμενη φάση. Από το διάγραμμα 1 παρατηρήθηκε ότι τα υψηλότερα αποτελέσματα και για τις δύο μεθόδους προέκυψαν από τη θερμοκρασία των 45°C. Ωστόσο και στις δύο μεθόδους HSSDME σε θερμοκρασίες πάνω από 35°C δημιουργούνταν υδρατμοί στα τοιχώματα του φιαλιδίου λόγω διαφοράς θερμοκρασίας του περιβάλλοντος χώρου και του συστήματος, με συνέπεια τα αποτελέσματα που προέκυπταν να μην έχουν τόσο καλή επαναληψιμότητα όσο στις θερμοκρασίες 25°C και 35°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία και για τις δύο μεθόδους επιλέχθηκε η τιμή των 35°C.



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα θερμοκρασίας για τις μεθόδους Vacuum HSSDME και Regular HSSDME

Όπως αναμενόταν και στην περίπτωση της Regular HSSDME, η θέρμανση του δείγματος βελτίωσε την απόδοση της μεθόδου όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας επέφερε αύξηση της σταθεράς Henry των ενώσεων. Ωστόσο, όταν η δειγματοληψία γίνεται υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης η απόκριση του μηχανήματος ήταν πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της Vac-HSSDME για όλες τις θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν. Πιο συγκεκριμένα από το διάγραμμα 1 για τη μέθοδο Regular HSSDME παρατηρείται ότι η εκχύλιση του Ναφθαλενίου (Nap) δεν επηρεάζεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας όσο οι άλλες δύο ενώσεις. Αυτό συμβαίνει διότι το Nap έχει μεγαλύτερη σταθερά Henry και η μεταφορά του από την υδατική στην υπερκείμενη φάση είναι γρήγορη. Το Ακεναφθένιο (Ace) και το Πυρένιο (Py) ενώ έχουν πιο μικρή τιμή σταθεράς Henry, παρουσιάζουν τα υψηλότερα αποτελέσματα διότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνεται η σταθερά αυτή με αποτέλεσμα οι ενώσεις αυτές να μεταφέρονται πιο γρήγορα στην αέρια φάση.

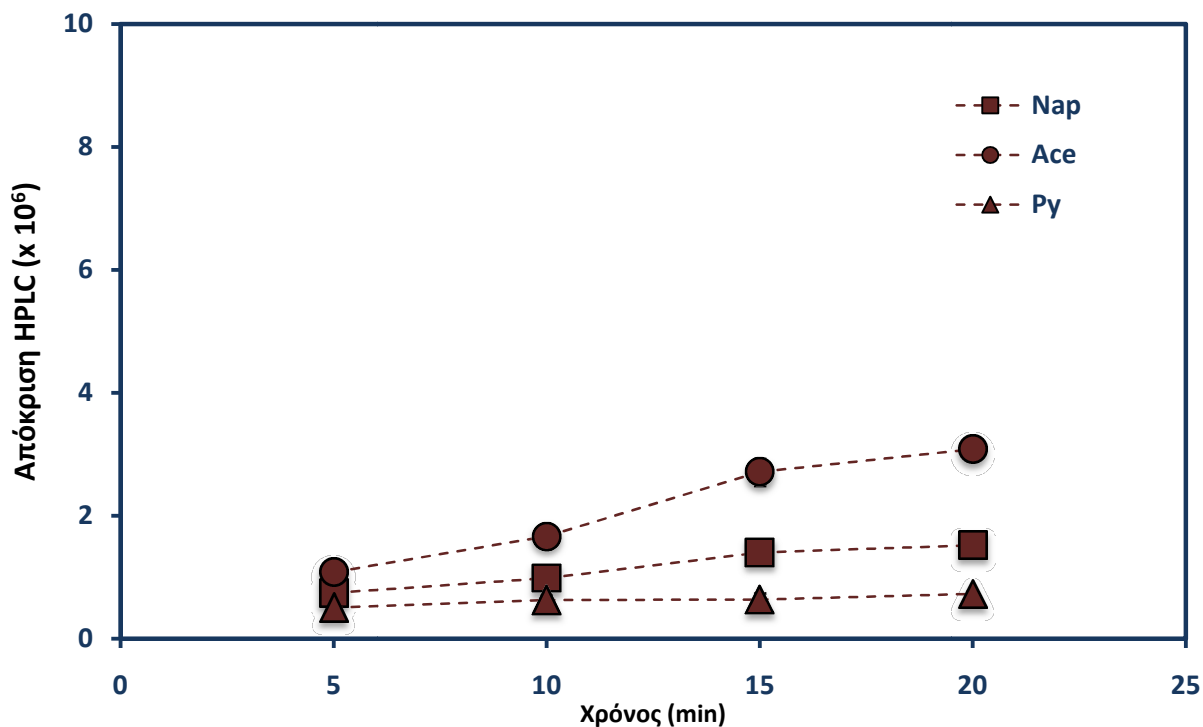
Στην μέθοδο Vac-HSSDME από το διάγραμμα 1 φαίνεται η θετική επίδραση της χαμηλής πίεσης στο σύστημα για όλες τις θερμοκρασίες συγκριτικά με τη Regular HSSDME. Πιο συγκεκριμένα παρατηρείται ότι το Nap δεν έχει σημαντική αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας διότι έχει την μεγαλύτερη σταθερά Henry κατά συνέπεια η δυσκολία του για να μεταφερθεί στην υπερκείμενο χώρο οφείλεται κυρίως στην υδατική φάση. Η αντίσταση αυτή μπορεί να μειωθεί με αύξηση του ρυθμού ανάδευσης. Η ένωση αυτή έχει μικρό συντελεστή κατανομής οκτανόλης νερού κατά συνέπεια δεν προσροφάται ικανοποιητικά στην οκτανόλη. Ωστόσο η αύξηση του σήματος του ναφθαλενίου που παρατηρείται, οφείλεται στη χαμηλή πίεση του συστήματος, καθώς οδηγεί στην γρηγορότερη μεταφορά του από τον υπερκείμενο χώρο στην σταγόνα του οργανικού διαλύτη. Το ακεναφθένιο και το πυρένιο έχουν αρκετά χαμηλές τιμές σταθεράς Henry επομένως η χαμηλή πίεση στο σύστημα οδηγεί στην μείωση της αντίστασης αέριας φάσης κατά συνέπεια στη γρηγορότερη μεταφορά τους από την υδατική στην υπερκείμενη φάση. Η αύξηση της θερμοκρασίας και η μειωμένη πίεση στο σύστημα επηρεάζουν θετικά τις ενώσεις αυτές όπως παρουσιάζεται και στο διάγραμμα 1.

Από τη σειρά αυτή των πειραμάτων αποφασίστηκε να επιλεχθεί ως βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας οι 35°C και για τις δυο μεθοδολογίες (Vac-HSSDME και Regular HSSDME).

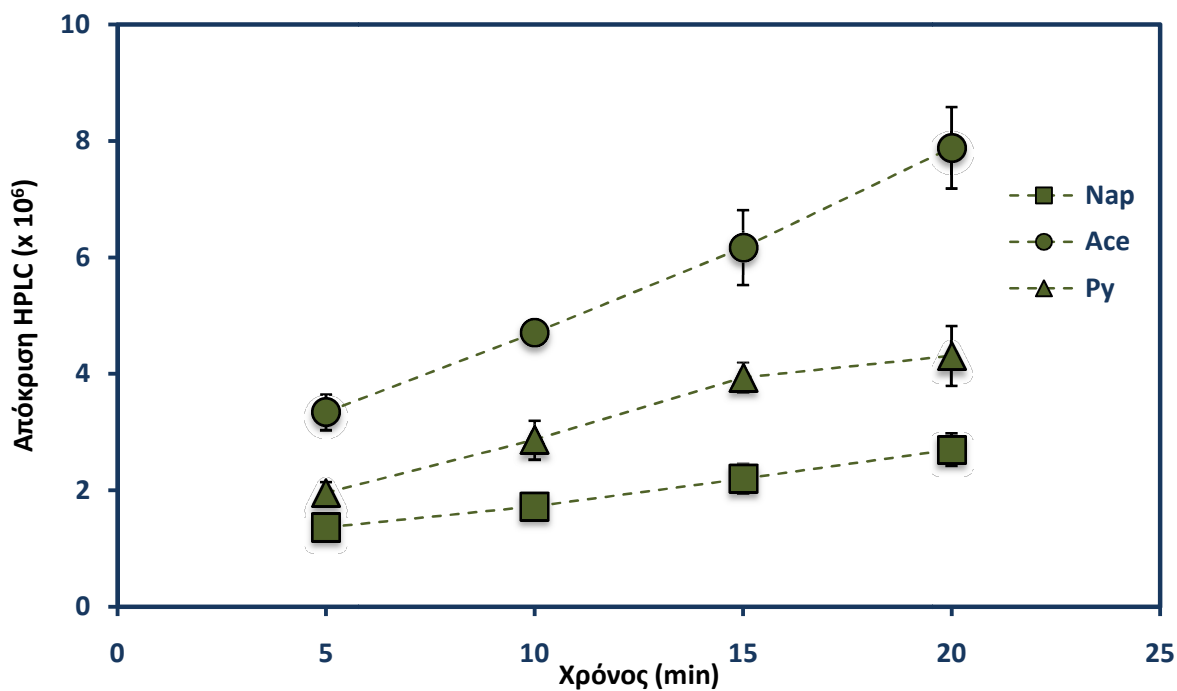
### 3.2.2. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης

Τα πειράματα του χρόνου εκχύλισης έγιναν σε θερμοκρασία 25°C και 35°C για την επιλογή του βέλτιστου χρόνου δειγματοληψίας. Οι χρόνοι που μελετήθηκαν ήταν τα 5, 10, 15 και 20 min. Μεγαλύτεροι χρόνοι δεν ήταν δυνατό να αποδώσουν επαναλήψιμα αποτελέσματα λόγω της μείωσης του όγκου της σταγόνας του οργανικού διαλύτη στις θερμοκρασίες αυτές.

Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα 2 και 3 η απόδοση της Vac-HSSDME είναι συγκριτικά καλύτερη από αυτή της Regular, διότι η ποσότητα που εκχυλίστηκε με την Vacuum μέθοδο είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την Regular για τους ίδιους χρόνους δειγματοληψίας. Στην θερμοκρασία αυτή όπως φαίνεται στα διαγράμματα του χρόνου εκχύλισης (2 και 3) υπάρχει και για τις τρεις ενώσεις αύξηση του σήματος με την πάροδο του χρόνου, συνεπώς δεν έχει επέλθει ισορροπία στο σύστημα στο χρονικό διάστημα που μελετήθηκε.



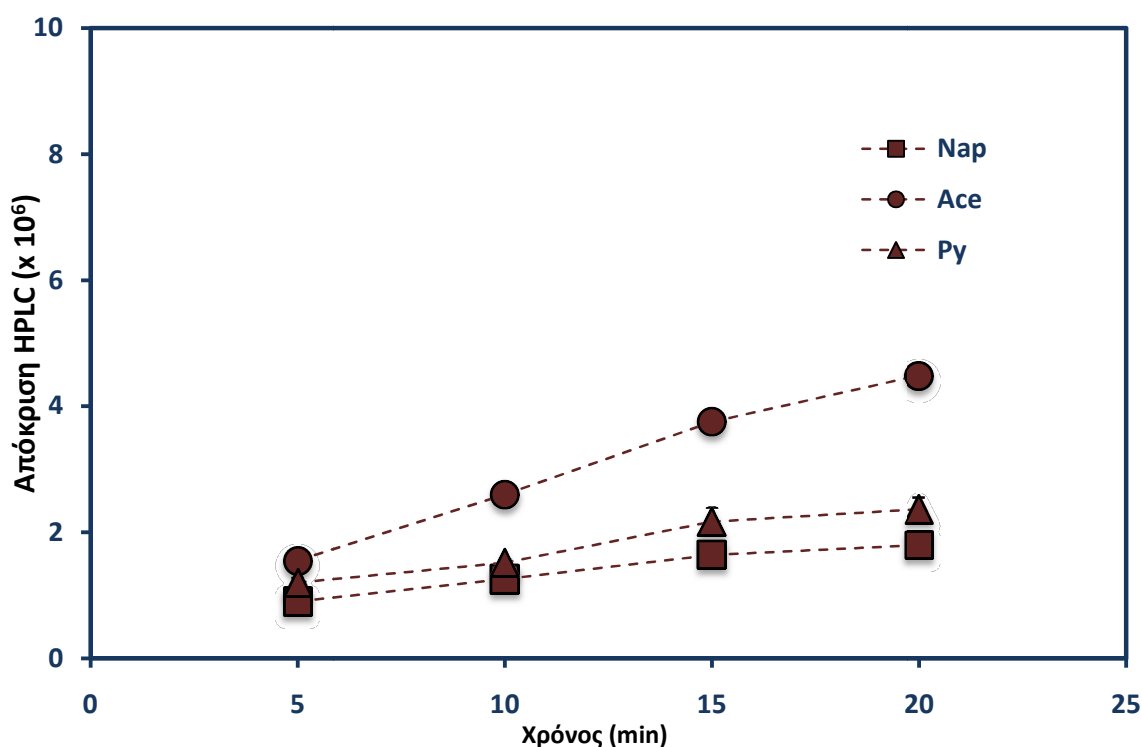
Διάγραμμα 2: Χρόνος εκχύλισης για θερμοκρασία 25°C Regular HSSDME



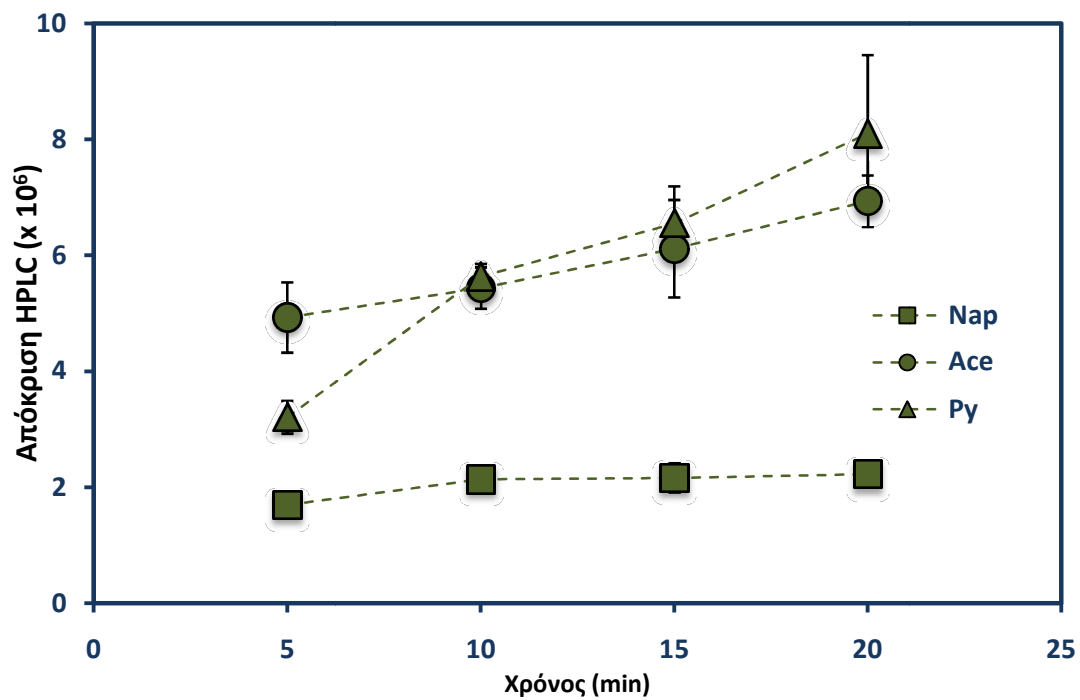
Διάγραμμα 3: Διάγραμμα χρόνου εκχύλισης για Vac-HSSDME σε θερμοκρασία 25°C

Από τα διαγράμματα χρόνου εκχύλισης 4 και 5, για την θερμοκρασία των 35°C, παρατηρείται σημαντική αύξηση της εκχυλιζόμενης ποσότητας με την πάροδο του χρόνου και για τις δύο μεθόδους HSSDME, δηλαδή στο σύστημα δεν έχει επέλθει

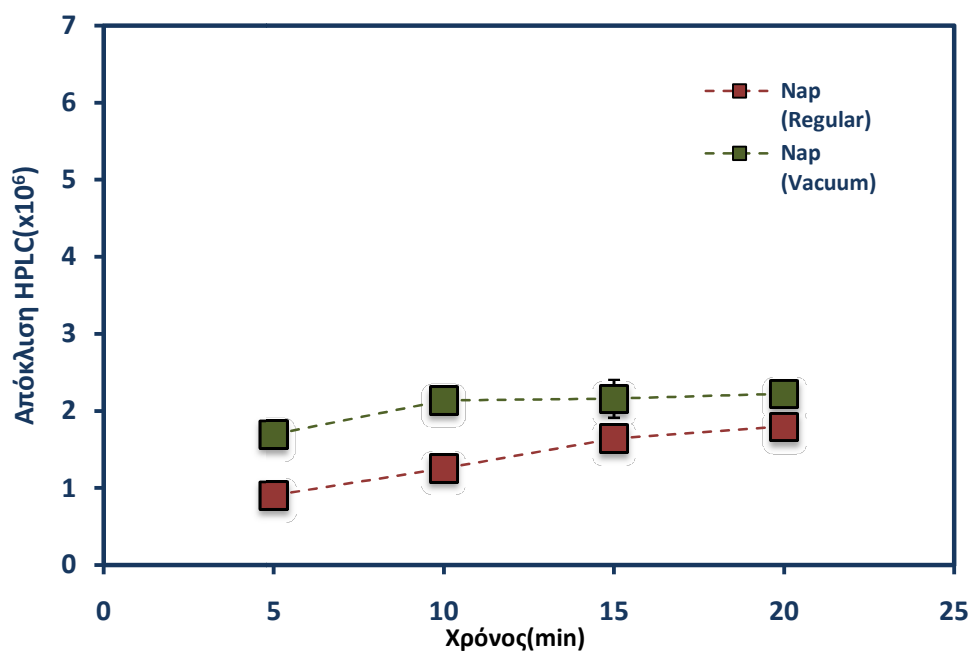
ισορροπία ακόμη. Επίσης παρατηρείται και αύξηση των αποτελεσμάτων συγκριτικά με τη θερμοκρασία 25°C διότι αυξήθηκε η θερμοκρασία. Και σε αυτή τη περίπτωση φαίνεται ότι η Vac-HSSDME έχει μεγαλύτερη απόδοση συγκριτικά με την Regular. Πιο συγκεκριμένα στην μέθοδο Vac-HSSDME (διάγραμμα 5) φαίνεται ότι οι ενώσεις Ace και Py δεν έχουν φτάσει σε ισορροπία για το χρονικό διάστημα που μελετάται, αντίθετα το Nap εικάζεται ότι έχει φτάσει σε ισορροπία διότι μετά τα 10 λεπτά το σήμα παραμένει αμετάβλητο. Στην μέθοδο Regular HSSDME (διάγραμμα 4) παρατηρείται ότι μετά τα 20 λεπτά το Nap πλησιάζει την ισορροπία. Επομένως στην μέθοδο Vac-HSSDME σε θερμοκρασία 35°C το ναφθαλένιο έχει φτάσει σε ισορροπία μέσα σε 10 min αντίθετα για την ίδια θερμοκρασία η ένωση αυτή για να στάση στο στάδιο της ισορροπία χρειάζεται 20min. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι η χαμηλή πίεση στο σύστημα οδηγεί σε ταχύτερη ισορροπία τους συστήματος, μικρότερους χρόνους δειγματοληψίας και μεγαλύτερη απόδοση.



Διάγραμμα 4: Χρόνος εκχύλισης Regular HSSDME στους 35°C



Διάγραμμα 5: Χρόνος εκχύλισης Vac-HSSDME στους 35°C



Διάγραμμα 6: Ναφθαλένιο χρόνος εκχύλισης 35°C

Συνολικά από τα διαγράμματα που αφορούν τη μελέτη επίδρασης του χρόνου εκχύλισης στην εκχύλιση (διαγράμματα 2, 3, 4 και 5) και στις δύο θερμοκρασίες, η Vac-HSSDME βελτίωσε δραματικά την κινητική της εκχύλισης συγκριτικά με τη regular HSSDME για όλες τις ενώσεις-στόχους που εξετάστηκαν. Ειδικότερα η χαμηλή πίεση στο σύστημα για τις ενώσεις Ακεναφθένιο και Πυρένιο, είχε σαν αποτέλεσμα μια αναμφισβήτητα θετική επίδραση στην μεταφορά τους από την υδατική στην υπερκείμενη φάση. Οι δύο αυτές ενώσεις δεν έφτασαν σε ισορροπία σε καμία από τις δύο μεθόδους, ωστόσο η θετική επίδραση των συνθηκών χαμηλής πίεσης στη δειγματοληψία παρέμεινε αξιοσημείωτα σημαντική ακόμη και μετά από 20 λεπτά δειγματοληψίας. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα 2, 3, 4 και 5 η ποσότητα των αναλυτών που εκχυλιζόταν στη μέθοδο Vac-HSSDME ήταν πολύ μεγαλύτερη συγκριτικά με τη regular HSSDME. Αυτό συμβαίνει διότι η μείωση της ολικής πίεσης τους συστήματος επιφέρει αύξηση του συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση ( $k_g$ ) των ημι πτητικών ενώσεων και επομένως γρηγορότερη μεταφορά τους στην υπερκείμενη φάση. Πιο συγκεκριμένα στα διαγράμματα 2, 3, 4 και 5 παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος που διαρκεί η δειγματοληψία τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποσότητα των αναλυτών που εκχυλίζεται. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο σύστημα δεν έχει επέλθει ισορροπία για το χρονικό διάστημα που μελετήθηκε και στις δύο θερμοκρασίες και στις δύο μεθόδους. Από τα διαγράμματα χρόνου εκχύλισης προς την εκχυλιζόμενη ποσότητα παρατηρείται σε κάθε περίπτωση, ότι η θετική επίδραση της χαμηλής πίεσης είναι εμφανής σε όλους τους χρόνους και στις δύο θερμοκρασίες, μιας και η ενίσχυση του σήματος παραμένει σημαντική ακόμη και στα 20 λεπτά.

Συμπερασματικά βάσει των αποτελεσμάτων από τα πειράματα της βελτιστοποίησης, οι βέλτιστες συνθήκες που προέκυψαν για τις μεθόδους Regular HSSDME και Vac-HSSDME (πίνακας 1) είναι 7 mL διαλύματος, 20  $\mu$ L οργανικού διαλύτη (οκτανόλη) και ρυθμός ανάδευσης στα 500 rpm. Η βέλτιστη θερμοκρασία και για τις δύο μεθόδους είναι η 35°C. Ο χρόνος εκχύλισης για τη μέθοδο Vac-HSSDME είναι 10 min ενώ για την Regular HSSDME ήταν τα 20 min.

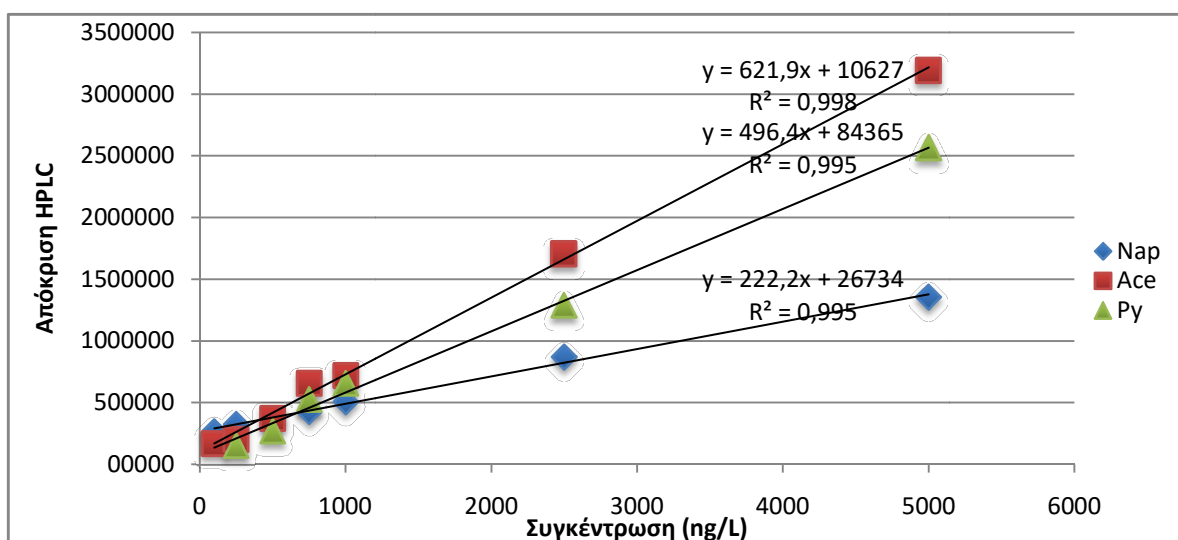


Πίνακας 1: Βέλτιστες συνθήκες Vac-HSSDME και Regular HSSDME

Παράμετρος	Vac-HSSDME	Regular HSSDME
Διαλύτης	Οκτανόλη	
Όγκος δείγματος	7 mL	7mL
Όγκος διαλύτη	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Ανάδευση	500 rpm	500 rpm
Θερμοκρασία	35°C	35°C
Χρόνος εκχύλισης	10 min	20min

#### 4. Αξιολόγηση της μεθόδου

Τα πειράματα για την αξιολόγηση της μεθόδου έγιναν στις βέλτιστες συνθήκες που επιλέχθηκαν από τα πειραματικά αποτελέσματα. Όσον αφορά τη γραμμικότητα της μεθόδου για τη μέθοδο Vac-HSSDME ερευνήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων 100 ng/L έως 5000 ng/L για Nap και Ace ενώ για Py το εύρος των συγκεντρώσεων ήταν από 250 ng/L έως 5000 ng/L. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα της γραμμικότητας για την μέθοδο Vac-HSSDME παρουσιάζονται στο διάγραμμα 7. Από τους συντελεστές συσχέτισης ( $R^2$ ) οι οποίοι είναι 0,995, 0,998 και 0,995 για Nap, Ace και Py αντίστοιχα, παρατηρείται ότι η γραμμικότητα της μεθόδου είναι άριστη. Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης (limit of detection; LOD), όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 2 είναι για το Nap 37 ng/L, για το Ace είναι 57 ng/L και για το Py είναι 160 ng/L.

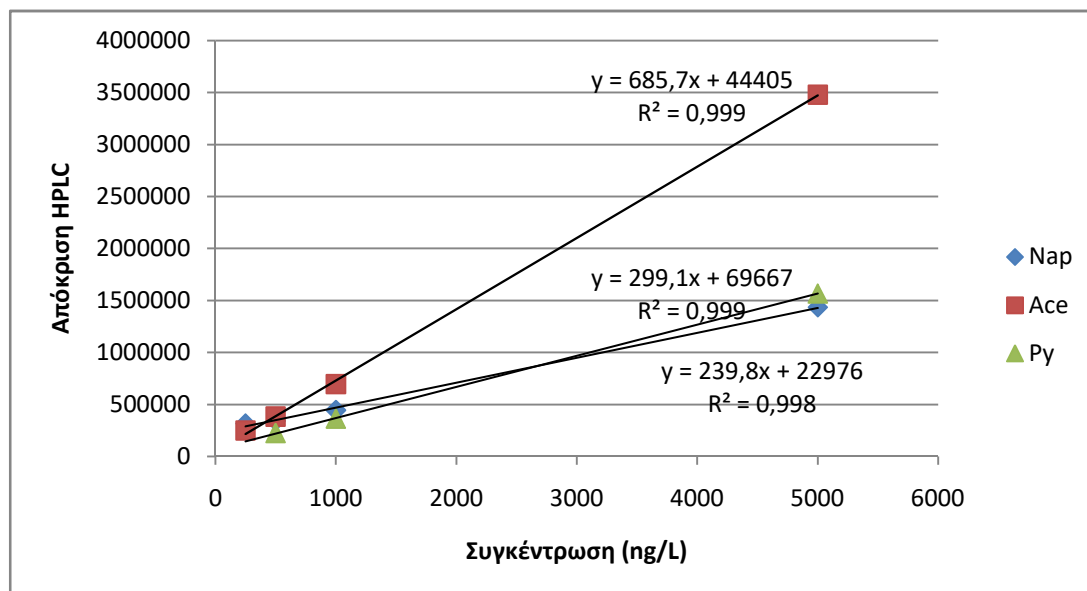


Διάγραμμα 7: Διάγραμμα γραμμικότητας για Vac-HSSDME

Πίνακας 2: Όρια ανίχνευσης μεθόδου (LOD) για τη μέθοδο Vac-HSSDME

Ένωση	LOD
Nap	37 ng/L
Ace	57 ng/L
Py	160 ng/L

Για τη regular HSSDME, η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε για εύρος συγκεντρώσεων από 250 ng/L έως 5000 ng/L για τις ενώσεις Nap, Ace ενώ για το Py το εύρος των συγκεντρώσεων ήταν από 500 ng/L έως 5000 ng/L. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα της γραμμικότητας για την μέθοδο Regular HSSDME παρουσιάζονται στο διάγραμμα 8. Από τους συντελεστές συσχέτισης (R) οι οποίοι είναι 0,998, 0,999 και 0,999 για Nap, Ace και Py αντίστοιχα, παρατηρείται ότι η γραμμικότητα της μεθόδου είναι άριστη. Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 3, για το Nap είναι 78 ng/L για το Ace είναι σε συγκέντρωση 100 ng/L ενώ για το Py είναι 222 ng/L.



Διάγραμμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης για Regular HSSDME

Πίνακας 3: Όρια ανίχνευσης μεθόδου (LOD) για τη μέθοδο regular HSSDME

Ένωση	LOD
Nap	78 ng/L
Ace	100 ng/L
Py	222 ng/L

Όπως φαίνεται από τους πίνακες 2 και 3 για την μέθοδο Vac-HSSDME τα κατώτερα όρια ανίχνευσης για όλες τις ενώσεις είναι μικρότερα από τα αντίστοιχα για την regular HSSDME. Επομένως η μέθοδος Vac-HSSDME ανιχνεύει μικρότερες συγκεντρώσεις από τους ρύπους συγκριτικά με την regular HSSDME.

Η επαναληψιμότητα της κάθε μεθόδου, εκφρασμένη σαν σχετική τυπική απόκλιση (RSD), αξιολογήθηκε με την εκτέλεση τεσσάρων πειραματικών αναλύσεων σε συγκεντρώσεις 500 ng/L και 2500 ng/L και σε θερμοκρασία 35°C. Για τη μέθοδο Vac-HSSDME τα πειράματα της επαναληψιμότητας έγιναν για χρόνο εκχύλισης 10 min. Για τη συγκέντρωση 500 ng/L η σχετική τυπική απόκλιση για κάθε μία από τις ενώσεις Ναφθαλένιο, Ακεναφθένιο και Πυρένιο ήταν αντίστοιχα 4,9%, 4,7% και 9,2%. Όσον αφορά την συγκέντρωση 2500 ng/L τα αποτελέσματα της σχετικής τυπικής απόκλισης ήταν για το Ναφθαλένιο 8%, για το Ακεναφθένιο 6,9% και για το Πυρένιο 8,8%. Τα συγκεντρωτικά στοιχεία με τα RSD παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Τυπικό σφάλμα για Vac-HSSDME για 500 ng/L και 2500 ng/L

Ένωση	RSD (500 ng/L)	RSD (2500 ng/L)
Nap	4,9%	8%
Ace	4,7%	6,9%
Py	9,2%	8,8%

Τα πειράματα για την επαναληψιμότητα της μεθόδου Regular HSSDME πραγματοποιήθηκαν σε χρόνο δειγματοληψίας 20 min. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την σχετική τυπική απόκλιση από τα πειράματα που έγιναν για την συγκέντρωση 500 ng/L ήταν για 6,2%, 7% και 12,4% για τις ενώσεις Ναφθαλένιο, Ακεναφθένιο και Πυρένιο αντίστοιχα. Όσον αφορά τη συγκέντρωση 2500 ng/L τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τις ενώσεις- στόχους ήταν 5,2% για Ναφθαλένιο, 6% για Ακεναφθένιο και 7% για το Πυρένιο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Τυπικό σφάλμα για Regular HSSDME για 500 ng/L και 2500 ng/L

Ένωση	RSD (500 ng/L)	RSD (2500 ng/L)
Nap	6,2%	5,2%
Ace	7%	6%
Py	12,4%	7%

#### 4.1. Εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα

Στη δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου ο οργανικός διαλύτης δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το διάλυμα, επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση των αναλυτών στόχων από πολύ σύνθετα διαλύματα.

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, στα υδατικά διαλύματα έχουν την τάση να προσροφούνται στα σωματίδια που υπάρχουν στο νερό λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους. Πειραματικά αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι τα αποτελέσματα της Vac-HSSDME δεν επηρεάζονται από τη μήτρα του διαλύματος αν δεν υπάρχουν αιωρούμενα σωματίδια σε αυτή όπου θα προσροφηθούν τα PAHs. Πιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα πειραματικών μετρήσεων που έγιναν σε πραγματικά δείγματα νερού όπως είναι πόσιμο νερό και νερό από την εκροή εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων, τα οποία είχαν επιμολυνθεί με PAHs, συγκρίθηκαν με αποτελέσματα των μετρήσεων του υπερκάθαρου νερού ίδιας συγκέντρωσης και έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική αλλαγή στα αποτελέσματα, μιας και οι σχετικές ανακτήσεις ήταν σε εύρος 97-100% σε σχέση με αυτές από το υπερκάθαρο νερό. Επομένως στη μέθοδο Vac-HSSDME η μήτρα του διαλύματος δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

## 5. Συμπεράσματα

Η νέα μέθοδος δειγματοληψίας από την υπερκείμενη φάση ημι-πτητικών ενώσεων από υδατικά διαλύματα με χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης υγρής φάσης κάτω από συνθήκες κενού που μελετάται στην παρούσα εργασία, αποτελεί μία πολύ αποτελεσματική μέθοδος όπου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων καθώς αποτελεί μία απλή, γρήγορη τεχνική, ικανή να ανιχνεύσει πολύ μικρές συγκεντρώσεις από οργανικούς ρύπους. Η Vac-HSSDME αποτελεί μία απλή, οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος δειγματοληψίας καθώς χρησιμοποιεί μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη και απλό εργαστηριακό εξοπλισμό. Με τη χρήση προ εκκενωμένου φιαλιδίου μειώνεται η ολική πίεση του συστήματος, με συνέπεια τη μείωση της αντίστασης που βρίσκουν οι ημι-πτητικές ενώσεις στην αέρια φάση, έτσι αυξάνεται η μεταφορά τους από την υδατική στην υπερκείμενη φάση. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μείωση του χρόνου ισορροπίας του συστήματος και κατ' επέκταση της δειγματοληψίας συγκριτικά με την μέθοδο Regular HSSDME ακόμη και σε ήπιες θερμοκρασίες. Η μέθοδος Vac-HSSDME υπερτερεί συγκριτικά με την Regular HSSDME διότι έχει πολύ καλή ευαισθησία και ακρίβεια και υψηλότερη απόδοση σε μικρότερους χρόνους δειγματοληψίας και κάτω από μέσες θερμοκρασίες.

## 6. Βιβλιογραφία

1. MALISZEWSKA-KORDYBACH, B. Sources, concentrations, fate and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment. Part A: PAHs in air. Polish journal of environmental studies, 1999, 8: 131-136.
2. ABDEL-SHAIFY, Hussein I.; MANSOUR, Mona SM. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egyptian Journal of Petroleum, 2016, 25.1: 107-123.
3. SKUPINSKA, Katarzyna; MISIEWICZ, Irena; KASPRZYCKA-GUTTMAN, Teresa. Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. Acta Pol Pharm, 2004, 61.3: 233-240.
4. KIM, Ki-Hyun, et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. Environment international, 2013, 60: 71-80.
5. PANDEY, Pooja; PATHAK, Hardik; DAVE, Saurabh. Microbial ecology of hydrocarbon degradation in the soil: a review. Research Journal of Environmental Toxicology, 2016, 10.1: 1.
6. WILD, Simon R.; JONES, Kevin C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. Environmental pollution, 1995, 88.1: 91-108.
7. MANOLI, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1999, 18.6: 417-428.
8. TAMAKAWA, Katsumi. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Comprehensive Analytical Chemistry, 2008, 51: 599-651.
9. ZHOU, J. L.; MASKAOUI, K. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China. Environmental Pollution, 2003, 121.2: 269-281.
10. **Ψυλλάκη, Ελευθερία.** Σημειώσεις μαθήματος "'Ελεγχος Ρύπανσης Νέρων".
11. **Γεντεκάκης, Ιωάννης.** *Φυσικές Διεργασίες.* s.l. : Κλειδάριθμος.
12. XU, Li; BASHEER, Chanbasha; LEE, Hian Kee. Developments in single-drop microextraction. Journal of Chromatography A, 2007, 1152.1: 184-192.
13. PSILLAKIS, Eleftheria. Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction: A tutorial review. Analytica Chimica Acta, 2017.
14. PSILLAKIS, Eleftheria, et al. Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction: Improved extraction of semivolatiles by non-equilibrium headspace sampling under reduced pressure conditions. Analytica chimica acta, 2012, 742: 30-36.



15. YIANTZI, Evangelia; KALOGERAKIS, Nicolas; PSILLAKIS, Elefteria. Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in solid samples. *Analytica chimica acta*, 2015, 890: 108-116.
16. SHARIATI-FEIZABADI, Shahab; YAMINI, Yadollah; BAHRAMIFAR, Naader. Headspace solvent microextraction and gas chromatographic determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 489.1: 21-31.
17. KOKOSA, John M. Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 71: 194-204.
18. PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21.1: 54-64.
19. FIAMEGOS, Yiannis C.; STALIKAS, Constantine D. Theoretical analysis and experimental evaluation of headspace in-drop derivatisation single-drop microextraction using aldehydes as model analytes. *Analytica chimica acta*, 2007, 599.1: 76-83.
20. SAMANTA, Sudip K.; SINGH, Om V.; JAIN, Rakesh K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, 2002, 20.6: 243-248.
21. WANG, Zhen, et al. Correlations between physicochemical properties of PAHs and their distribution in soil, moss and reindeer dung at Ny-Ålesund of the Arctic. *Environmental pollution*, 2009, 157.11: 3132-3136.