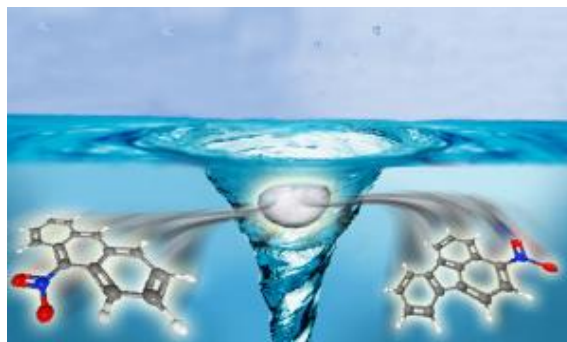


ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



«Καινοτόμος Ανάλυση Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων σε υδατικά δείγματα με χρήση Μικροεγχύλισης Στερεάς Φάσης τύπου “Arrow” υπό συνθήκες κενού»

ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ ΕΛΕΝΗ

Τριμελής Επιτροπή:

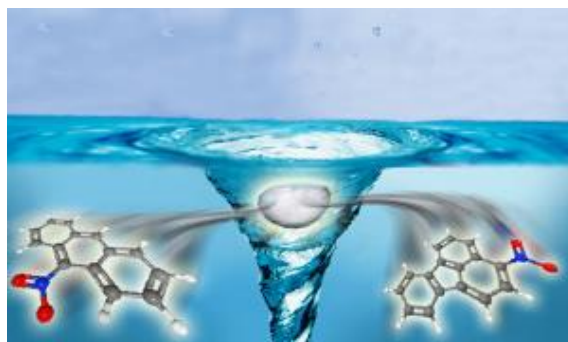
1. Καθ. Ελευθερία Ψυλλάκη (Επιβλέπτουσα)
2. Επίκουρος Καθ. Απόστολος Γιαννής
3. Δρ. Κωνσταντίνα Τυροβολά - ΕΔΙΠ

Χανιά, Σεπτέμβριος 2023



TECHNICAL UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF CHEMICAL AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING

THESIS



«A novel method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water using Vacuum-assisted SPME Arrow»

ANAGNOSTOU ELENI

Examination committee:

1. Professor Eleftheria Psillakis (supervisor)
2. Assistant Professor Apostolos Giannis
3. Dr Konstantina Tirovola

Chania, September 2023

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	8
1.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ)	8
1.1.1 Ιδιότητες	9
1.1.2 Σταθερά του Henry-Πτητικότητα	10
1.1.3 Συντέλεσής Λιποφιλίας K_{ow} (P)	11
1.1.4 Πηγές ΠΑΥ	11
1.1.5 Επιπτώσεις στην υγεία	12
1.2 Προετοιμασία Δείγματος	13
1.2.1 Τεχνικές Εκχύλισης (Extraction Techniques)	13
1.2.2 Τεχνικές Μικροεκχύλισης (Microextraction Techniques)	14
1.2.3 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME)	14
1.2.4 Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης στον υπερκείμενο χώρο (Headspace SPME, HS-SPME)	17
1.2.5 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού (Vac-HS-SPME)	20
1.2.6 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης με την χρήση βέλους (SPME Arrow)	26
1.3 Αέρια Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)	27
1.3.1 Βασικές Αρχές	27
1.3.2 Αναλυτική Διαδικασία	28
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30
2.1 Υλικά, Εργαστηριακός Εξοπλισμός και Διαδικασίες	30
2.1.1 Διάλυμα Ενώσεων Στόχων (Stock Solution)	30
2.1.2 Διαδικασία Vac-HS-SPME	31
2.1.3 Διαδικασία HS-SPME	33
2.1.4 Ανάλυση GS-MS	34
2.1.5 Καθαρισμός φιαλιδίων, πωμάτων και εξοπλισμού	35
2.1.6 Παράγοντες Βελτιστοποίησης και Παράμετροι Μεθόδου	35
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
3.1 Επίδραση Θερμοκρασίας	37

3.2	Επίδραση Χρόνου Εκχύλισης.....	39
3.3	Αξιολόγηση των βελτιστοποιημένων διαδικασιών Vac SPME Arrow και HS-SPME Arrow.....	43
3.4	Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα νερού	46
3.5	Συμπεράσματα	47
4.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Επίδραση της Θερμοκρασίας δειγματοληψίας στην εκχύλιση τριών πρότυπων ΠΑΥ από το νερό χρησιμοποιώντας την τεχνική SPME Arrow σε συνθήκες μειωμένης αλλά και κανονικής πίεσης. Πειραματικές συνθήκες: 5 mL υδατικών δειγμάτων εμπλουτίστηκαν με 5 $\mu\text{g/L}$ μίγμα ΠΑΥ, 15 λεπτά χρόνος δειγματοληψίας, 350 rpm ταχύτητα ανάδευσης. Ορισμένες μπάρες σφάλματος είναι πολύ μικρές για να είναι ορατές σε σύγκριση με το φυσικό μέγεθος του συμβόλου. 39

Διάγραμμα 2: Προφίλ Χρόνου εκχύλισης για τους τρεις ΠΑΥ στους 40°C α) υπό κενό και β) συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και στους 60°C γ) υπό κενό και δ) συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Πειραματικές συνθήκες: 5 mL υδατικών δειγμάτων εμπλουτίστηκαν με 5 $\mu\text{g/L}$ μίγμα ΠΑΥ, 350 rpm ταχύτητα ανάδευσης. Ορισμένες μπάρες σφάλματος είναι πολύ μικρές για να είναι ορατές σε σύγκριση με το φυσικό μέγεθος του συμβόλου..... 42

Διάγραμμα 3: Καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε ΠΑΥ με χρήση Vac SPME Arrow..... 44

Διάγραμμα 4: Καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε ΠΑΥ με χρήση HS-SPME Arrow 45

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ξεκινώντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ψυλλάκη Ελευθερία, η οποία μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Υδατικής Χημείας του Πολυτεχνείου Κρήτης και να ζήσω την συναρπαστική εμπειρία διεξαγωγής ερευνητικών πειραμάτων, υπό την στήριξη, βοήθεια και καθοδήγηση της. Σημαντικό ρόλο στην εμπειρία αυτή, έπαιξε η υποψήφια Διδάκτωρ του εργαστηρίου Πατεράκη Αγγελική, η οποία μου προσέφερε απλόχερα τον χρόνο, τις γνώσεις, την υπομονή της και ήταν πάντα εκεί να με βοηθήσει στις εύκολες αλλά και δύσκολες στιγμές, κρατώντας πάντα το κλίμα του εργαστηρίου ευχάριστο και άνετο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δυο μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Απόστολο Γιαννή και κ. Κωνσταντίνα Τυροβολά, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην εργασία μου. Τελειώνοντας την πενταετή μου φοίτηση στο τμήμα των Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης, είμαι σίγουρη ότι τίποτα δεν θα ήταν το ίδιο χωρίς τους φίλους και τους ανθρώπους που με στήριξαν, με βοήθησαν να εξελιχθώ και πίστεψαν σε εμένα από την αρχή. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ αλλά και τα εύσημα των επιτευγμάτων μου συμπεριλαμβανομένου αυτής της εργασίας ανήκουν δικαιωματικά στην οικογένεια μου, τον μπαμπά, την μαμά και τον αδελφό μου, οι οποίοι ήταν οι πρώτοι υποστηρικτές της προσπάθειάς μου, με ενέπνεαν και μου έδιναν δύναμη καθημερινά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε υδατικά δείγματα με σκοπό την ανίχνευση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων οι οποίοι θεωρούνται ευρέως διαδεδομένοι περιβαλλοντικοί ρύποι. Ο προσδιορισμός αυτών των οργανικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενόργανης ανάλυσης και πιο συγκεκριμένα με την εφαρμογή Αέριας Χρωματογραφίας συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry; GC MS). Η απομόνωση των ενώσεων-στόχων επιτεύχθηκε εφαρμόζοντας την τεχνική της Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης τύπου "Arrow" υπό συνθήκες κενού, γνωστή και ως Vacuum Assisted Headspace Solid Phase Microextraction Arrow (Vac-HS-SPME Arrow). Η παραπάνω μέθοδος βελτιστοποιήθηκε μελετώντας την επίδραση των παραγόντων της θερμοκρασίας (extraction temperature) και του χρόνου εκχύλισης (extraction time) ως προς τον ρυθμό εκχύλισης- απόδοσης των ενώσεων-στόχων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την επικράτηση συνθηκών κενού συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης (HS-SPME Arrow). Αναλυτικότερα, η χρήση της Vac SPME Arrow απέδωσε γρηγορότερους ρυθμούς εκχύλισης με εφαρμογή ήπιας θέρμανσης για μικρότερο χρόνο δειγματοληψίας σε σχέση με την HS-SPME Arrow. Επιπλέον, η εφαρμογή του κενού ευνόησε σημαντικά την εκχύλιση των λιγότερο ημιπτητικών ΠΑΥ, ενώ τέλος σημαντικά επιτεύγματα προέκυψαν αναφορικά με την εκχύλιση των ενώσεων ΠΑΥ υψηλής πτητικότητας. Πιο συγκεκριμένα, ο αναλύτης Nap παρουσίασε γρηγορότερο ρυθμό εκχύλισης παρουσία κενού έναντι 1atm, γεγονός που μέχρι πρότινος δεν είχε παρατηρηθεί πειραματικά με την χρήση SPME ίνας, ούτε αναμενόταν με βάση το προτεινόμενο θεωρητικό μοντέλο two film. Η παρουσία συνθηκών χαμηλής πίεσης φάνηκε να συντελεί στον υπερκερασμό της αντίστασης που εμφανίζει το αέριο φιλμ μεταξύ υπερκείμενου χώρου και ροφητικής φάσης και το γεγονός αυτό πιθανότατα κατέστη εφικτό να παρατηρηθεί κατά τη χρήση SPME Arrow και όχι ίνας SPME, λόγω της μεγαλύτερης ροφητικής επιφάνειας που διαθέτει. Ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης των ενώσεων Nap, Phe, Flu βρέθηκαν τα 15min εκχύλισης κατά την εφαρμογή ήπιας θερμοκρασίας των 40°C για την Vac SPME Arrow, ενώ για την HS-SPME Arrow απαιτήθηκε η θέρμανση στους 60°C για τον ίδιο χρόνο δειγματοληψίας. Συνεπώς, η βελτιστοποιημένη μέθοδος Vac SPME Arrow απέδωσε 1,5, 2 και 2,5 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία στην εκχύλιση των Nap, Phe και Flu αντίστοιχα, αλλά και ευρύτερη γραμμικότητα, χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, καλύτερη επαναληψιμότητα από ότι η HS-SPME Arrow. Τέλος η επίδραση του υποστρώματος (Matrix Effect) στην απόδοση της μεθόδου αξιολογήθηκε με την εκτέλεση πειραμάτων ανάκτησης των ΠΑΥ σε πραγματικά υδατικά δείγματα, αποκαλύπτοντας ελάχιστη επίδραση της μήτρας στις εκχυλίσσεις. Όλα τα παραπάνω, επιβεβαιώνουν τον χαρακτηρισμό της τεχνικής Vac-HS-SPME Arrow ως μια εύκολα εφαρμόσιμη, βιώσιμη αλλά και οικονομική πρακτική, λαμβάνοντας υπόψιν την ανθεκτικότητα του Arrow σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό αναλύσεων, η οποία δύνανται να χρησιμοποιηθεί τόσο σε περιβαλλοντικές και βιολογικές αναλύσεις αλλά και αναλύσεις τροφίμων επιτυγχάνοντας άριστη επίδοση.

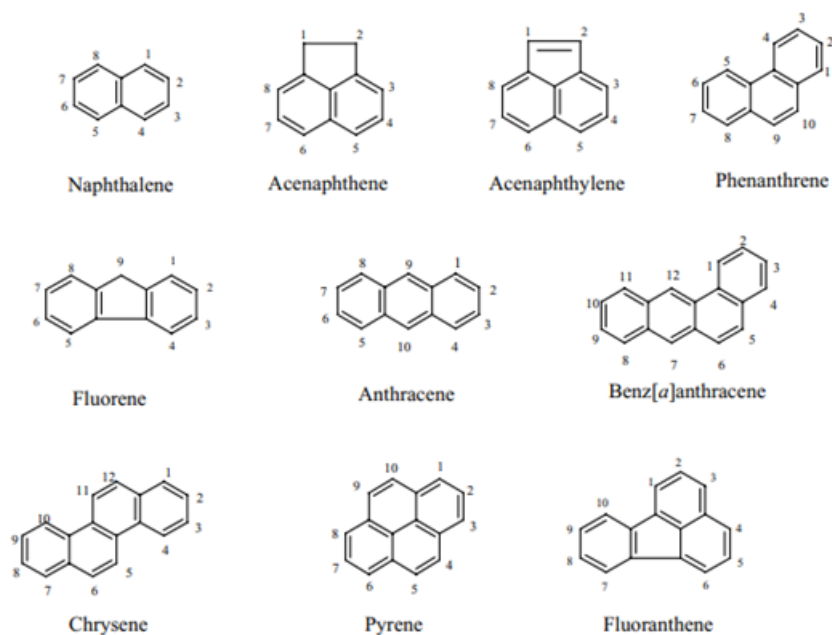
ABSTRACT

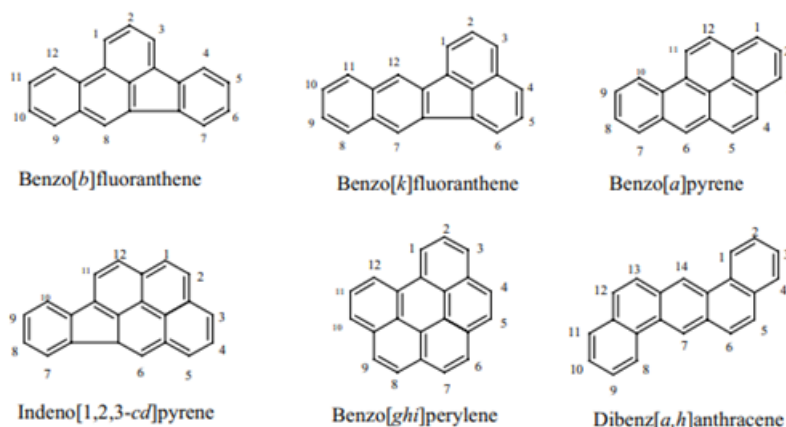
In this thesis, analyses were carried out on aqueous samples in order to detect polycyclic aromatic hydrocarbons, which are considered widespread environmental pollutants. The determination of these organic compounds was carried out using instrumental analysis and more specifically by applying Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC MS). The isolation of the target compounds was achieved by using the Solid Phase Microextraction Arrow technique under vacuum conditions, also termed as Vacuum Assisted Headspace Solid Phase Microextraction Arrow (Vac-HS-SPME Arrow). The above method was optimized by investigating the effect of the factors of extraction temperature and extraction time on the extraction efficiency of the target compounds. The results obtained under vacuum conditions were compared with those obtained under atmospheric pressure conditions (HS-SPME Arrow). In more detail, the use of Vac SPME Arrow resulted in faster extraction rates when milder sampling temperatures for a shorter sampling time were applied compared to HS-SPME Arrow. Furthermore, the application of vacuum significantly favored the extraction of less semi-volatile PAHs, while finally significant achievements were obtained regarding the extraction of PAH compounds of high volatility. In particular, the Nap analyte showed a faster extraction rate in the presence of vacuum compared to 1atm, which was not observed experimentally using SPME fiber until recently, nor expected based on the proposed theoretical two film model. Thanks to low-pressure conditions, the gas-phase resistance between the headspace and sorbent phase was overcome, and this fact was possible to be observed when using the high capacity SPME Arrow sorbent rather than SPME fiber. The optimum extraction conditions for Nap, Phe, Flu compounds were found to be 15min of extraction combined with the mild temperature of 40oC for Vac SPME Arrow, while HS-SPME Arrow required heating at 60oC for the same sampling time. Therefore, the optimized Vac SPME Arrow method performed 1.5, 2- and 2.5-times higher sensitivity in the extraction of Nap, Phe and Flu respectively, but also wider linearity, lower detection limits, better repeatability than HS-SPME Arrow. Finally, the effect of the substrate (Matrix Effect) on the performance of the method was evaluated by performing PAH recovery experiments on real aqueous samples, revealing minimal effect of the matrix on extractions. All the above, confirms the characterization of the Vac-HS-SPME Arrow technique as an easily applicable, sustainable and economical practice, considering the robustness of Arrow combined with the large number of analyses, which can be used in both environmental and biological analyses and food analyses achieving excellent performance.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

1.1 Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ)

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες αποτελούν οργανικές ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από δύο ή περισσότερους συντηγμένους αρωματικούς δακτυλίους ατόμων άνθρακα και υδρογόνου και ως επί το πλείστον είναι άχρωμες, λευκές ή ανοιχτοκίτρινες στερεές ενώσεις. Είναι μια πανταχού παρούσα ομάδα αρκετών εκατοντάδων χημικά συγγενικών ενώσεων, περιβαλλοντικά ανθεκτικές με διάφορες δομές και ποικίλη τοξικότητα. Οι μοριακές διατάξεις των αρωματικών δακτυλίων στο χώρο μπορεί να είναι γραμμικές, γωνιακές ή σε συστάδες. [1] Με βάση τον αριθμό των δακτυλίων που υπάρχουν στις ενώσεις, αυτές ταξινομούνται σε ΠΑΥ ελαφρού μοριακού βάρους (δύο ή τρεις αρωματικούς δακτυλίους) και σε ΠΑΥ υψηλού μοριακού βάρους (τέσσερις ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους). Ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, εκπέμπονται είτε σε αέρια φάση (LMW PAHs) είτε σε σωματιδιακή μορφή (HMW PAHs) [2]. Σε γενικές γραμμές, οι ΠΑΥ εισέρχονται στο περιβάλλον μέσω διαφόρων οδών και βρίσκονται συνήθως ως μείγμα που περιέχει δύο ή περισσότερες από αυτές τις ενώσεις. Έτσι, ανιχνεύονται συνήθως στον αέρα, το έδαφος και το νερό. Στην ατμόσφαιρα, μπορούν να υποστούν φωτοδιάσπαση και να αντιδράσουν με άλλους ρύπους, όπως το διοξείδιο του θείου, οξείδια του αζώτου και το όζον. Λόγω των ευρέως διαδεδομένων πηγών και των επίμονων χαρακτηριστικών τους, οι ΠΑΥ διαχέονται μέσω της ατμόσφαιρας μεταφοράς και υπάρχουν σχεδόν παντού. Οι άνθρωποι εκτίθενται σε μείγματα ΠΑΥ σε αέρια ή σωματιδιακές φάσεις στον ατμοσφαιρικό αέρα και η μακροχρόνια έκθεση τους σε υψηλές συγκεντρώσεις ΠΑΥ συνδέεται με δυσμενή προβλήματα υγείας. Έτσι, οι μελέτες σχετικά με τους ΠΑΥ σε σωματιδιακή ύλη (PM) στον ατμοσφαιρικό αέρα, έχουν γίνει αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Ο Οργανισμός Προστασίας του Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (USEPA) ανακήρυξε 16 ΠΑΥ ως ρύπους προτεραιότητας το 1983 με βάση την ύπαρξη των υψηλότερων συγκεντρώσεων, τη μεγαλύτερη έκθεση, την ανθεκτική φύση και την τοξικότητά τους. [3]





Εικόνα 1: Χημικές δομές των 16 PAHs της λίστας προτεραιότητας ρυπαντών της US EPA [3]

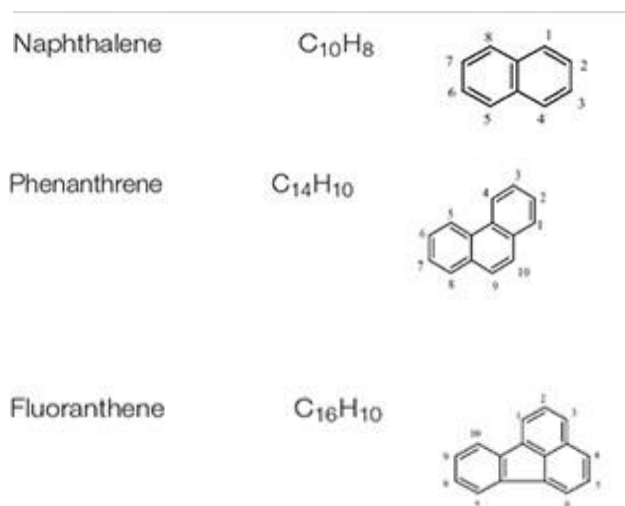
1.1.1 Ιδιότητες

Γενικότερα, οι ΠΑΥ χαρακτηρίζονται από χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, χαμηλή πίεση ατμών και υψηλά σημεία τήξης και βρασμού, ανάλογα με τη δομή τους [2]. Πιο συγκεκριμένα, αυτοί με αυξημένο μοριακό βάρος τείνουν να έχουν μειωμένη διαλυτότητα στο νερό και αυξημένη λιποφιλικότητα, με αποτέλεσμα να είναι πολύ διαλυτοί σε οργανικούς διαλύτες. Εκδηλώνουν επίσης, διάφορες ιδιότητες όπως η αντοχή στη θερμότητα, η αγωγιμότητα, η ικανότητα εκπομπής και αντοχή στη διάβρωση, καθιστώντας τις πιο ανθεκτικές ενώσεις. [4]

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η συμπεριφορά τριών αντιπροσωπευτικών πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων: Naphthalene (Nap), Phenanthrene (Phe), και Fluoranthene (Flu), οι ιδιότητες των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές Ιδιότητες Ενώσεων Στόχων (25°C), EPI Suite™-Estimation Program Interface | US EPA

Ένωση	Μοριακό Βάρος (g mol ⁻¹)	Τάση ατμών (mm Hg)	K_H (atm m ³ mol ⁻¹)	Log K_{OA}	Log K_{OW}	Πιο άφθονο ιόν (m/z)
Nap	128,17	0,085	$4,4 \times 10^{-4}$	5,19	3,30	128,00
Phe	178,23	0,000121	$4,23 \times 10^{-5}$	7,57	4,46	178,00
Flu	202,26	$9,22 \times 10^{-6}$	$8,86 \times 10^{-6}$	8,88	5,16	202,00



Εικόνα 2: Χημική Δομή-Τύπος Ενώσεων Στόχων

1.1.2 Σταθερά του Henry-Πτητικότητα

Η κατανομή μιας οργανικής ένωσης στο υπό εξέταση σύστημα το οποίο αποτελείται από μια αέρια και μια υδατική φάση σε ισορροπία, περιγράφεται από το συντελεστή κατανομής αέρας-νερό, ο οποίος είναι γνωστός και ως σταθερά του νόμου του Henry (K_H). Πιο συγκεκριμένα, ως σταθερά Henry ορίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης μιας ένωσης στην αέρια φάση προς την συγκέντρωση αυτής στην υδατική φάση, υπό συνθήκες ισορροπίας.[5] Η συγκέντρωση των ενώσεων στην αέρια και στην υδατική φάση δίνονται συνήθως υπό τη μορφή της μερικής πίεσης P_i (atm) και της μοριακότητας C_w (mol/L) αντίστοιχα, και συνεπώς η σταθερά Henry σε (atm/L/mol) θα υπολογίζεται από την σχέση:

$$K_H = \frac{P_i}{C_w}$$

Με πιο απλά λόγια, η σταθερά Henry δείχνει πόσο μεγαλύτερη είναι η τάση διαφυγής (fugacity) της ένωσης όταν αυτή υφίσταται υπό μορφή αερίου, σε σχέση με την αντίστοιχη τάση διαφυγής της ένωσης όταν αυτή βρίσκεται διαλυμένη στο νερό. Συνεπώς, γίνεται κατανοητό ότι οι ενώσεις που παρουσιάζουν μεγάλη πτητικότητα και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, θα έχουν υψηλή σταθερά K_H και θα έχουν την τάση να μεταφέρονται από την υδατική στην αέρια φάση [5]. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, οι υπο μελέτη ενώσεις παρουσιάζουν αρκετά χαμηλή σταθερά του νόμου του Henry, γεγονός που καθιστά δυσκολότερη (αλλά όχι ανέφικτη) την μεταφορά τους από την υδατική στην αέρια φάση. Έτσι κρίνεται απαραίτητη η διερεύνηση και βελτιστοποίηση των συνθηκών, των παραμέτρων και των τεχνικών κάτω από τις οποίες θα πραγματοποιηθεί αυτή η μετάφορα, με απώτερο στόχο την αποτελεσματικότερη ανάλυση συμπεριφοράς των ενώσεων στόχων.

1.1.3 Συντελεστής Λιποφιλίας K_{ow} (P)

Ο συντελεστής λιποφιλίας αποτελεί ένα δείκτη ο οποίος καθορίζει τον λιποφιλικό ή μη χαρακτήρα μιας ένωσης. Η σημασία του εντοπίζεται στο γεγονός ότι μέσω του λιποφιλικού χαρακτήρα μιας ένωσης παρέχονται χρήσιμες πληροφορίες για την περιβαλλοντική συμπεριφορά μιας ένωσης όπως για παράδειγμα την πρόσληψης της από οργανισμούς ή την προσρόφηση της σε στερεά που περιέχουν οργανική ύλη. Στην πράξη, ο λιποφιλικός χαρακτήρας μιας ένωσης εκτιμάται μέσω της τάσης της ένωσης να κατανέμεται μεταξύ οκτανόλης και νερού. Έτσι ορίζεται από τον λόγο:

$$K_{ow} = \frac{A_{οκτ}}{A_{νερό}}$$

Όπου:

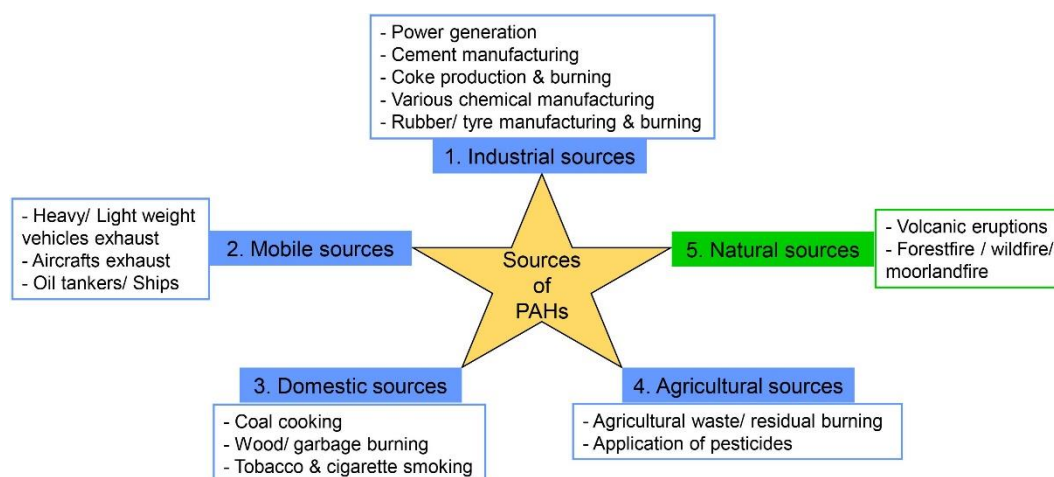
- $[A_{οκτ}]$, $[A_{νερό}]$ είναι οι συγκεντρώσεις της A στην οκτανόλη και στο νερό αντίστοιχα.
- Η συγκέντρωση $[A]_{ΔΕΝ}$ πρέπει να επηρεάζει την τιμή του K_{ow} .
- Οι μετρήσεις γίνονται σε $T = 20-25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι όσο η τιμή του συντελεστή λιποφιλίας μιας ένωσης αυξάνεται, τόσο μειώνεται και η διαλυτότητα της στο νερό. **[5]**

1.1.4 Πηγές ΠΑΥ

Οι πηγές προέλευσης των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων κατατάσσονται κυρίως σε δύο κατηγορίες: στις ανθρωπογενείς και τις φυσικές πηγές εκπομπών. Όσον αφορά τις φυσικές πηγές εκπομπών, αυτές αποτελούν οι ηφαιστειακές εκρήξεις, οι δασικές πυρκαγιές και οι πυρκαγιές σε ελώδεις περιοχές που προκαλούνται από κεραυνούς. Στην πραγματικότητα όμως, οι ανθρωπογενείς πηγές εκπομπών είναι οι κύριοι καθοριστικοί παράγοντες της ρύπανσης από ΠΑΥ, και μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις τύπους εκπομπών , δηλαδή σε βιομηχανικές, κινητές, οικιακές και γεωργικές πηγές. Η κύρια πηγή εκπομπών ΠΑΥ είναι η ατελής καύση από διάφορες βιομηχανικές δραστηριότητες, όπως η αποτέφρωση αποβλήτων, η παραγωγή σιδήρου και χάλυβα, η παραγωγή αλουμινίου, η παραγωγή τσιμέντου, η επεξεργασία άνθρακα, η παραγωγή βαφών, οι βιομηχανίες ασφάλτου, η παραγωγή ελαστικών από καουτσούκ, η παραγωγή μυκητοκτόνων και εντομοκτόνων, τα καυσάερια από διυλιστήρια και η παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας **[6,7]**. Άλλες βιομηχανικές πηγές εκπομπών αποτελούν η αεριοποίηση του άνθρακα, οι κλίβανοι οξυγόνου, οι κινητήρες ντίζελ και οι βενζινοκίνητοι κινητήρες μεγάλων μηχανημάτων. Οι κινητές πηγές εκπομπών περιλαμβάνουν τα καυσάερια από αεροσκάφη, πλοία, τρένα και εκτός δρόμου βαρέα και ελαφρά οχήματα **[7,8]**. Οι οικιακές πηγές εκπομπών περιλαμβάνουν οικιακές δραστηριότητες όπως η καύση σκουπιδιών, η καύση άνθρακα και ξύλου, το μαγείρεμα σε καυστήρες πετρελαίου ή αερίου και οι σόμπες κηροζίνης **[9]**. Οι γεωργικές πηγές εκπομπών αφορούν την καύση βιομάζας και γεωργικών αποβλήτων, ιδίως όταν η καύση πραγματοποιείται υπό μη βέλτιστες συνθήκες **[8]**.

Όπως είναι κατανοητό, η ρύπανση από ΠΑΥ σε μια αγροτική περιοχή οφείλεται κυρίως σε οικιακές και γεωργικές πηγές, ενώ σε μια αστική περιοχή σε βιομηχανικές, κινητές και οικιακές πηγές. Η συγκέντρωση τους είναι υψηλότερη το χειμώνα εξαιτίας της ατελούς καύσης ορυκτών καυσίμων η οποία προέρχεται από την αυξημένη θέρμανση των κατοικιών, αλλά και της χαμηλότερης φωτοαποικοδόμησης και αδυναμίας διάχυσής τους λόγω ατμοσφαιρικών συνθηκών, όπως οι ήρεμοι άνεμοι και η χαμηλή θερμοκρασία [10].



Εικόνα 3: Διάφορες Πηγές ΠΑΥ [6]

1.1.5 Επιπτώσεις στην υγεία

Η βιολογική παρακολούθηση της έκθεσης σε ΠΑΥ έχει πρωταρχικό ενδιαφέρον, λόγω της ευρείας διάχυσης αυτών των ενώσεων και της τοξικολογικής τους συνάφειας. Ωστόσο, οι επιπτώσεις των μεμονωμένων ΠΑΥ στην υγεία δεν είναι ακριβώς ίδιες. Ορισμένοι ΠΑΥ είναι γνωστοί ως καρκινογόνοι παράγοντες, μεταλλαξιογόνοι και τερατογόνοι και συνεπώς αποτελούν σοβαρή απειλή για την υγεία και την ευημερία του ανθρώπου. Η σημαντικότερη αναμενόμενη επίπτωση στην υγεία από την εισπνεόμενη έκθεση σε ΠΑΥ είναι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα.

Οι επιπτώσεις των ΠΑΥ στην ανθρώπινη υγεία εξαρτώνται κυρίως από τη διάρκεια και την οδό έκθεσης, την ποσότητα ή τη συγκέντρωση των ΠΑΥ που εκτίθεται κανείς, καθώς και από τη σχετική τοξικότητα τους. Μια ποικιλία άλλων παραγόντων μπορεί επίσης να επηρεάσει την υγεία, συμπεριλαμβανομένων υποκειμενικών παραγόντων όπως η προϋπάρχουσα υγεία και η ηλικία. Η ικανότητα των ΠΑΥ να προκαλούν βραχυπρόθεσμες επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων δεν είναι σαφής. Ενδεικτικά, η συστηματική έκθεση σε υψηλά επίπεδα μειγμάτων ρύπων που περιέχουν ΠΑΥ έχουν ως αποτέλεσμα συμπτώματα όπως ερεθισμό των ματιών, ναυτία, έμετο και διάρροια.

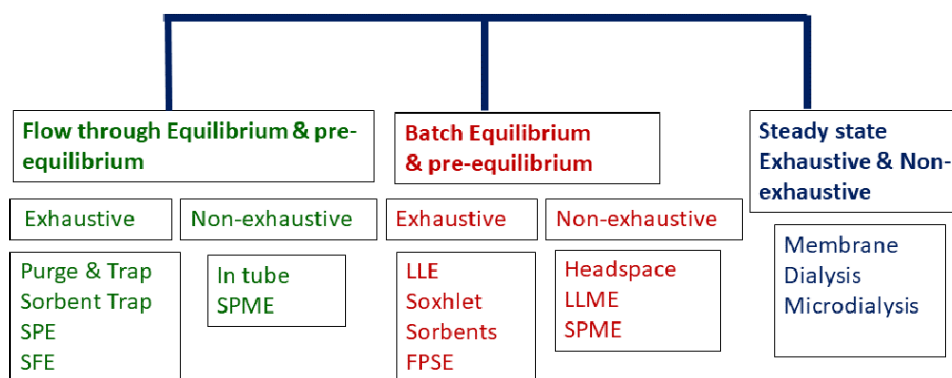
Επιπτώσεις στην υγεία από τη μακροχρόνια ή χρόνια έκθεση σε ΠΑΥ μπορεί να περιλαμβάνουν μειωμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, καταρράκτη, νεφρικές και ηπατικές βλάβες, αναπνευστικά προβλήματα, συμπτώματα που μοιάζουν με άσθμα και ανωμαλίες της πνευμονικής λειτουργίας. Η επανειλημμένη επαφή με το δέρμα μπορεί να προκαλέσει ερυθρότητα και φλεγμονή του δέρματος. Πιο συγκεκριμένα, το ναφθαλένιο, μπορεί να προκαλέσει την καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων εάν εισπνευστεί σε μεγάλες ποσότητες. [1]

1.2 Προετοιμασία Δείγματος

Η αναλυτική διαδικασία απαρτίζεται από ένα σύνολο καλά καθορισμένων βημάτων: δειγματοληψία, προετοιμασία δείγματος, διαχωρισμός ουσιών, ποσοτικοποίηση και ανάλυση των δεδομένων. Κάθε βήμα επηρεάζει ξεχωριστά σημαντικούς αναλυτικούς παράγοντες, όπως η ακρίβεια και η ταχύτητα ανάλυσης. Όσον αφορά τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση έχει αποδειχθεί βελτίωση μέσω της χρήσης οργάνων όπως οι αέριοι χρωματογράφοι. Σε αντίθεση, το βήμα της προετοιμασίας του δείγματος είναι το πιο χρονοβόρο και απαιτητικό σε σχέση με τα υπόλοιπα, καθώς απαιτεί συχνά και την χρήση οργανικών διαλυτών. Συνεπώς, παρουσιάζεται η ανάγκη χρήσης νέων διαθέσιμων τεχνικών οι οποίες χρησιμοποιούν ελάχιστα ή και καθόλου οργανικούς διαλύτες.

1.2.1 Τεχνικές Εκχύλισης (Extraction Techniques)

Η εκχύλιση αποτελεί μια κλασσική μέθοδο διαχωρισμού η οποία βασίζεται στην ισορροπία κατανομής της μεταφερόμενης ουσίας μεταξύ δύο ελάχιστα αναμιγνυόμενων φάσεων. Στην χημεία, χρησιμοποιείται για την απομόνωση ή συγκέντρωση των επιθυμητών διαλυτών, αλλά και για την απομάκρυνση ουσιών οι οποίες ενδέχεται να εμποδίσουν την ανάλυση. Βασικά πλεονεκτήματα της είναι η απλότητα, η ταχύτητα και η ευελιξία. Οι διάφορες μορφές της ταξινομούνται ανάλογα με το εκχυλιστικό μέσο και την φάση του δότη. Ενδεικτικά, αυτές είναι: η εκχύλιση στερεών με υγρό, η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) και η εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid – Liquid Extraction, LLE). Παρακάτω παρουσιάζεται ένα σχηματικό διάγραμμα των διαφόρων τεχνικών εκχύλισης (Εικόνα 4). [5,11]



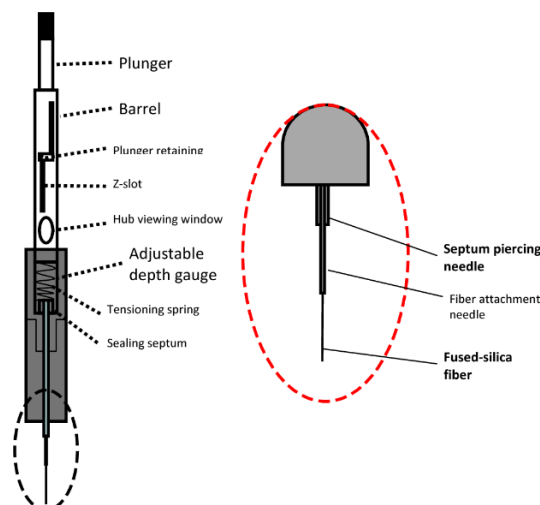
Εικόνα 4: Τεχνικές Εκχύλισης (Semantic Scholar)

1.2.2 Τεχνικές Μικροεκχύλισης (Microextraction Techniques)

Με την πάροδο των χρόνων, η ανάγκη για απλούστευση των αρχικών τεχνικών εκχύλισης αλλά και βελτιστοποίησης της διαδικασίας προετοιμασίας δείγματος οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνικών, οι οποίες αποτελούν ουσιαστικά σμίκρυνση των ήδη υπαρχόντων. Οι τεχνικές μικροεκχύλισης, όπως ονομάζονται, στοχεύουν στην μειωμένη κατανάλωση εκχυλιστικού μέσου αλλά την ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας του δείγματος, συμβάλλοντας έτσι στην μείωση του συνολικού κόστους. Ακόμα σημαντικότερο επίτευγμα χρήσης τους, αποτελεί η επιταχυνόμενη μεταφορά μάζας κατά την διαδικασία ρόφησης – εκρόφησης του αναλυτικού οργάνου, εμποδίζοντας έτσι την έμφραξη του από προσμίξεις. Οι δύο βασικότερες τεχνικές μικροεκχύλισης είναι η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME) και η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME). [5,12]

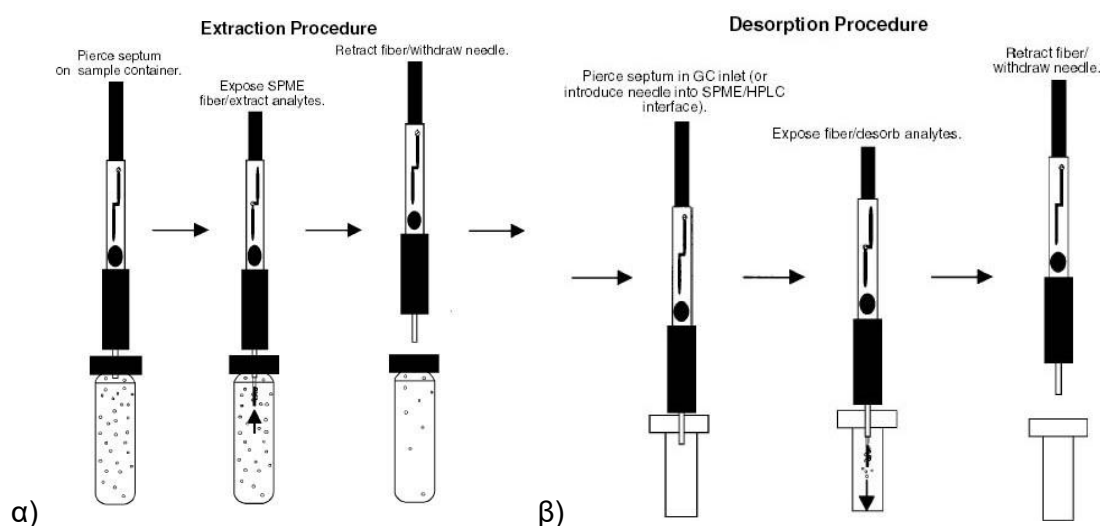
1.2.3 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME).

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) αποτελεί καινοτομία των τεχνικών μικροεκχύλισης, καθώς αναπτύχθηκε από τον J. Pawliszyn και την εργαστηριακή του ομάδα στο πανεπιστήμιο του Waterloo στον Καναδά το 1989, σε μια προσπάθεια να διευκολυνθεί η ταχεία εκχύλιση αναλυτών από μικρούς όγκους δειγμάτων. Στην πραγματικότητα, η πρώτη εμπορευματοποίηση της συσκευής SPME έγινε από την "Supelco" το 1993. Η ευρεία διάδοση της SPME στον επιστημονικό χώρο οφείλεται στην δυνατότητα τόσο της πραγματοποίησης της δειγματοληψίας, απομόνωσης και εισαγωγής του δείγματος σε ένα στάδιο, όσο και της εφαρμογής της εκχύλισης πτητικών και ημιπτητικών ουσιών από ποικιλία δειγμάτων (υγρά, υψηλού ιξώδους αέρια απουσία διαλύτη αλλά και ζωντανούς οργανισμούς). Αναλυτικότερα, για την υλοποίηση της χρησιμοποιείται μια συσκευή δειγματοληψίας (SPME holder), αποτελούμενη από μια τριχοειδή ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica), στην επιφάνεια της οποίας βρίσκεται το υλικό που πραγματοποιεί την ρόφηση (στατική φάση ή φάση εκχύλισης). Επιπλέον, η ίνα συνδέεται με ένα ατσάλινο έμβολο και μια συσκευή για την συγκράτηση της. Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται αναλυτικά η συσκευή. [5,13]

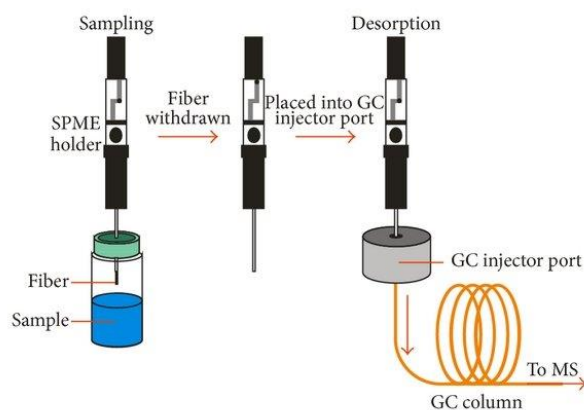


Εικόνα 5: Συσκευή δειγματοληψίας SMPE - SPME fiber [14]

Όσον αφορά την διαδικασία, αυτή αποτελείται από δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η δειγματοληψία (εκχύλιση), η οποία είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί τόσο με απευθείας εμβάπτιση στο διάλυμα (κυρίως για μη πτητικές ουσίες) που περιέχει το φιαλίδιο προς ανάλυση, όσο και στον υπερκείμενο χώρο αυτού (για πτητικές ουσίες). Έτσι, η ίνα που αρχικά βρίσκεται μέσα στην σύριγγα μικροεκχύλισης (holder) για να είναι προστατευμένη, εισάγεται στο σύστημα διαπερνώντας το ελαστικό πώμα σιλικόνης (septum) του φιαλιδίου και αφού εκτεθεί, παραμένει στο σύστημα για ένα χρονικό διάστημα το οποίο καθορίζεται από τον χρόνο που απαιτείται για την δέσμευση του αναλύτη. Με το πέρας αυτού του διαστήματος, η ίνα επιστρέφει στο holder με κίνηση του εμβόλου προς τα επάνω και εξέρχεται από το δείγμα. Κατά το δεύτερο στάδιο, η σύριγγα εισέρχεται στον αέριο χρωματογράφο, όπου και εξάγεται η ίνα με σκοπό την θερμική εκρόφηση και μέτρηση των ουσιών που είχαν δεσμευτεί στο προηγούμενο στάδιο. Η κινητή φάση της αέριας χρωματογραφίας παρασύρει τους αναλύτες προς την χρωματογραφική στήλη όπου διαχωρίζονται και απεικονίζονται με την μορφή χρωματογραφήματος. Συνεπώς, τα δυο απλά αυτά στάδια εξασφαλίζουν την αποφυγή απώλεια των αναλυτών και την ευκολία εφαρμογής της τεχνικής.[11,13]



Εικόνα 6: α) Στάδιο εκχύλισης β) Στάδιο εκρόφησης [14]



Εικόνα 7: Συνοπτικό Διάγραμμα Διαδικασίας ([15])

Η αρχή λειτουργίας της SPME βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη ανάμεσα στην στατική φάση της ίνας και την υδατική φάση του δείγματος. Έτσι δημιουργείται ένα σύστημα δύο ή τριών φάσεων ανάλογα με τον τρόπο που εφαρμόζεται η SPME (απευθείας ή στον υπερκείμενο χώρο). Το σύστημα δύο φάσεων αποτελείται από την εκχυλιστική φάση της ίνας και το δείγμα, ενώ στο σύστημα των τριών προστίθεται και η αέρια φάση στην οποία είναι εκτίθεται η ίνα (πάνω από την υδατική). Όταν επέλθει ισορροπία στην συγκέντρωση του αναλύτη μεταξύ των δύο ή τριών φάσεων, θεωρείται ότι η μεταφορά μάζας του έχει ολοκληρωθεί και η δειγματοληψία έχει τελειώσει. Η ισορροπία που προκύπτει περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση δυναμικής απορρόφησης [16,17]:

$$n = \frac{k_{fs} * V_f * V_s * C_o}{k_{fs} * V_f + V_s}$$

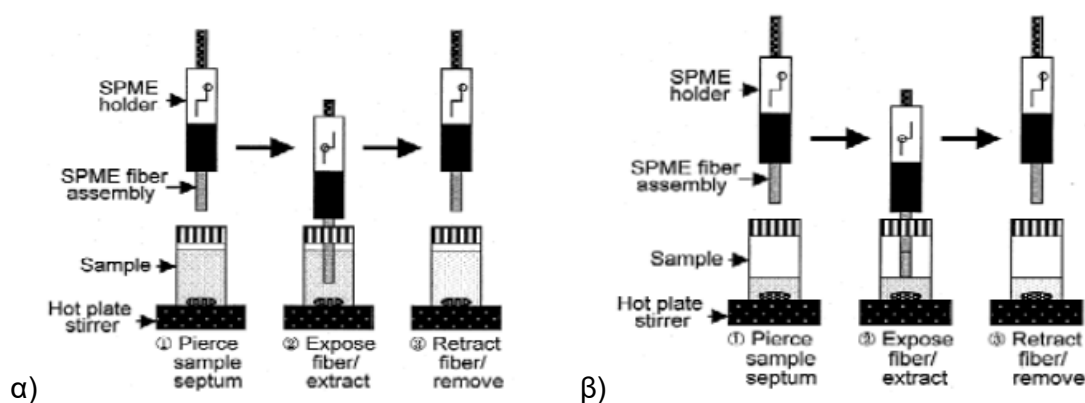
Όπου:

- n: ο αριθμός των γραμμομορίων που εκχυλίζονται από την επικάλυψη της ίνας στην ισορροπία
- k_{fs} : η σταθερά κατανομής της επικάλυψης της ίνας προς το δείγμα
- V_f : ο όγκος επικάλυψης της ίνας
- V_s : ο όγκος του δείγματος
- C_o : η αρχική συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας στο δείγμα

Από την παραπάνω εξίσωση παρατηρείται ότι η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται είναι ανάλογη με την συγκέντρωση αυτού στο υπό εξέταση δείγμα. Επίσης, είναι αντιληπτό ότι ο όγκος της εκχυλιζόμενης φάσης είναι πολύ μικρός σε σχέση με τον όγκο του δείγματος, ο οποίος μπορεί να απαλειφθεί από την εξίσωση, συμπεραίνοντας έτσι την ανεξαρτησία της εκχύλισης του αναλύτη από αυτόν.[11] Αξίζει να αναφερθεί ότι η παραπάνω εξίσωση αφορά κυρίως υγρά περιβλήματα της ίνας όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), όμως χρησιμοποιείται και για στερεά, αλλά για μικρές συγκεντρώσεις ουσιών, έτσι ώστε να μην κορεστεί η πορώδης επίστρωση. Οι εμπορικά διαθέσιμοι τύποι ινών που υπάρχουν, διαφέρουν ανάλογα με το υλικό της στατικής φάσης και το πάχος και επιλέγονται σύμφωνα με το είδος της υπό εξέτασης ουσίας. Ενδεικτικά, για πτητικές ενώσεις χρησιμοποιείται μεγαλύτερο πάχος επίστρωσης και συνήθως μη πολικές στατικές φάσεις (μη πολικές ουσίες στην πλειοψηφία τους).[5,11]

Συμπερασματικά, η SPME παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων όπως η απλότητα, η ευκολία, το μειωμένο κόστος χρήσης, η αυτοματοποίηση, η υψηλή ευαισθησία, η απουσία οργανικών διαλυτών (οικολογική) και η επιτάχυνση κατά την διαδικασία της εκχύλισης και εκρόφησης. Επιπρόσθετα, εφαρμοζόμενη σε μεγάλη ποικιλία αναλυτών διαφορετικών μητρών, εμφανίζει χαμηλά όρια ανίχνευσής και υψηλή ακρίβεια. Ταυτόχρονα όμως, όπως είναι εύλογο εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα τα περισσότερα από τα οποία αφορούν την ίνα. Αναλυτικότερα, οι φθορές στην επιφάνεια της ίνας λόγω της έκθεσης σε πολύπλοκες μήτρες, των υψηλών θερμοκρασιών ή της ανάδευσης κατά την χρήση, συντελούν στον μειωμένο χρόνο ζωής της. Ακόμα ένα μειονέκτημά αφορά την ύπαρξη μικρού όγκου της εκχυλιζόμενης φάσης, γεγονός που περιορίζει την εφαρμογή της. Τέλος, προβλήματα που σχετίζονται με πολύπλοκες μήτρες και μερική απώλεια της στατικής φάσης μειώνουν την ευαισθησία, ακρίβεια, επαναληψιμότητα και οδηγούν σε μειωμένη γραμμικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις.[5,13,17]

Στην SPME, η δειγματοληψία είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος, αφορά την απευθείας εμβάπτιση της ίνας στην μήτρα (*Direct SPME*) με σκοπό την άμεση μεταφορά των ενώσεων στόχων από αυτήν στο ροφητικό υλικό και συνήθως εφαρμόζεται για ελάχιστα ή καθόλου πτητικές ενώσεις, σε ορισμένη θερμοκρασία και ταυτόχρονη ανάδευση. Ο δεύτερος πραγματοποιείται όμοια με τον πρώτο, αλλά με την διαφορά ότι η ίνα καλύπτεται από προστατευτική μεμβράνη ειδικού πολυμερούς (*MembraneProtection SPME*) η οποία καθυστερεί την φθορά της και αυξάνει την επιλεκτικότητα της. Ειδικότερα, χρησιμοποιείται στην περίπτωση βρώμικων και πολύπλοκων μητρών και απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο για την αποκατάσταση της ισορροπίας αφού οι αναλύτες πρέπει πρώτα να περάσουν την μεμβράνη έτσι ώστε να ροφηθούν. Ο τρίτος τρόπος, περιλαμβάνει την έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο χώρο της μήτρας (*HeadSpace SPME*). [5,13,17]

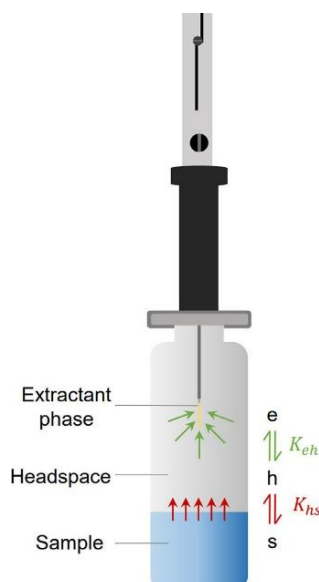


Εικόνα 8: Τρόποι Δειγματοληψίας SPME: α) Direct SPME β) HeadSpace SPME (ΑΠΘ)

1.2.4 Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης στον υπερκείμενο χώρο (HeadSpace SPME, HS-SPME)

Ο συγκεκριμένος τρόπος δειγματοληψίας, αναφέρεται στην δειγματοληψία από τον υπερκείμενο χώρο του υπό μελέτη δείγματος και χρησιμοποιείται για ανάλυση περίπλοκων μητρών καθώς και πτητικών ή ημιπτητικών ουσιών. Αναλυτικότερα, οι ουσίες που πρόκειται να αναλυθούν, εξαιτίας της πτητικότητάς τους, μεταφέρονται από το δείγμα στην αέρια φάση (ισορροπία κλειστού συστήματος) στην οποία είναι εκτεθειμένη η επικαλυμμένη ίνα. Στην συνέχεια, οι αναλύτες δεσμεύονται σταδιακά από την ίνα, ενώ ταυτόχρονα συνεχίζεται η μεταφορά μάζας από την υδατική στην αέρια φάση, μέχρις ότου το σύστημα φτάσει σε μια νέα ισορροπία (τριπλό σύστημα ισορροπίας). Η ισορροπία των τριών αυτών φάσεων περιγράφεται μέσω της κινητικής θεωρίας και θεωρίας ισορροπίας. Η ποσότητα των ουσιών που εκχυλίζονται εξαρτάται τόσο από τον όγκο της υπερκείμενης αέριας φάσης αλλά και από τους λόγους κατανομής μεταξύ της φάσης ατμών και του υγρού δείγματος καθώς επίσης και μεταξύ της φάσης ατμών και του στρώματος πολυμερούς της ίνας. Συνεπώς γίνεται κατανοητή η ύπαρξη δύο διεπιφανειών: η διεπιφάνεια της μήτρας με την υπερκείμενη φάση και η διεπιφάνεια της υπερκείμενης φάσης με την εκχυλιστική φάση της ίνας. [5,16]

Μεταξύ των φάσεων της δεύτερης διεπιφάνειας πραγματοποιείται σχετικά γρήγορα η μεταφορά της μάζας εξαιτίας των πολύ μεγαλύτερων συντελεστών διάχυσης στην αέρια φάση από ότι στην υγρή ($10^4 - 10^5$ φορές μεγαλύτεροι). Αυτό συμβαίνει καθώς υπάρχει ένα στρώμα προστασίας από τα μόρια του νερού (fluid shieling) αλλά και επειδή ο ρυθμός διάχυσης των αναλυτών στην υγρή μήτρα είναι αργός. Κάθε ένωση στόχος χαρακτηρίζεται από ένα συντελεστή διάχυσης και μια σταθερά κατανομής τα οποία καθορίζουν την πορεία της ένωσης κατά την διαδικασία της εκχύλισης. [5]



Εικόνα 9: Σύστημα τριών φάσεων (Sematic Scholar)

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η ίνα δεν έρχεται σε επαφή με το δείγμα προς ανάλυση και κατ' επέκταση με ορισμένες μη πτητικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους που δύνανται να περιέχει, με αποτέλεσμα την αποτροπή προσρόφησης τους στην ίνα, την προστασία της και αύξηση της διάρκειας ζωής της. Έτσι, η τεχνική αυτή δύνανται να χρησιμοποιηθεί σε πολύπλοκα δείγματα όπως τρόφιμα αλλά και δείγματα βιολογικής ή περιβαλλοντικής προέλευσης. Αντίθετα, η μέθοδος περιορίζεται όταν οι ενώσεις στόχοι είναι ημιπτητικές, καθώς παρουσιάζεται δυσκολία στην μεταφορά μάζας στην υπερκείμενη φάση η οποία εξαρτάται από τον συντελεστή διάχυσης των αναλυτών, επιδρώντας στον χρόνο εκχύλισης. Για την αντιμετώπιση αυτής της δυσκολίας εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές κατεργασίας του δείγματος όπως ανάδευση, αύξηση της θερμοκρασίας ή χρήση αλατος στο υγρό δείγμα. [5,16]

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι για την βελτιστοποίηση της μεθόδου, ελέγχονται ποικίλοι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα και την ευαισθησία της. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της εκχύλισης εξαρτάται από : το υλικό επικάλυψης της ίνας, τον τρόπο έκθεσης της, τον χρόνο δειγματοληψίας και εκρόφησης, τη θερμοκρασία δειγματοληψίας και εκρόφησης, τον ρυθμό ανάδευσης του δείγματος, την ιοντική ισχύ του διαλύματος (εξαρτάται από την ουσία), το pH του δείγματος, το είδος των αναλυτών (πτητικότητα, πολικότητα), τον όγκο του δείγματος και της υπερκείμενη φάσης, την αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα και τέλος τη σταθερά κατανομής και τον συντελεστή διάχυσης του εκάστοτε αναλύτη που μεταφέρεται από το δείγμα στο υλικό επικάλυψης της ίνας. [13,18]

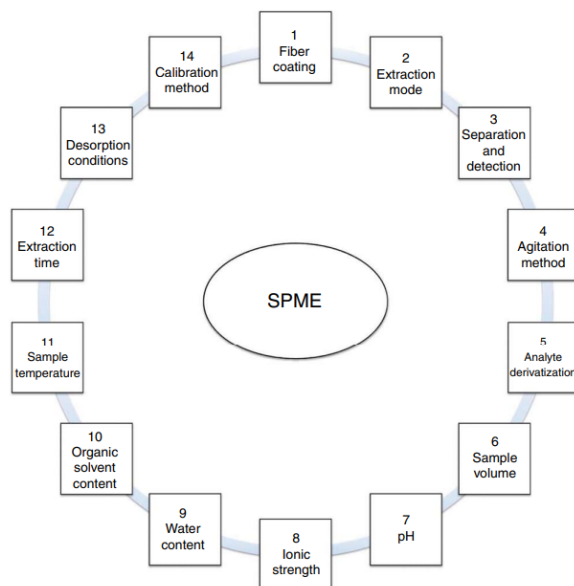
Το υλικό επικάλυψης της ίνας αποτελεί σημαντικό παράγοντα της τεχνικής καθώς επηρεάζει την εκλεκτικότητα και την ανθεκτικότητα της. Στο εμπόριο υπάρχει ποικιλία διαθέσιμων υλικών τα οποία μπορεί να είναι πολικά (PA) ή μη πολικά (PDMS). Επιπλέον, ανάλογα με τον τρόπο δέσμευσης του αναλύτη μπορεί να είναι υγρά (δέσμευση με απορρόφηση, PDMS, PA, PEG) ή στερεά (δέσμευση με προσρόφηση, DVB/CAR/PDMS, DVB/PDMS). Όσο πιο μεγάλο είναι το πάχος της επικάλυψης αυξάνεται η δεσμευμένη ποσότητα του αναλύτη αλλά και ο χρόνος εκχύλισης. Ενδεικτικά, μεγαλύτερα πάχη επικάλυψης χρησιμοποιούνται για τις περισσότερες πτητικές ενώσεις, ενώ για τις λιγότερο πτητικές χρησιμοποιούνται μικρότερα. [5,13,18]

Ο όγκος του δείγματος που θα αναλυθεί επηρεάζει άμεσα τον όγκο της αέριας φάσης από την οποία γίνεται η δειγματοληψία αλλά και την ευαισθησία και ακρίβεια της μεθόδου. Για παράδειγμα, μεγάλος όγκος υπερκείμενης φάσης συνεπάγεται και γρηγορότερη μεταφορά του αναλύτη σε αυτήν αλλά και μείωση της ακρίβειας και ευαισθησίας της τεχνικής. [5,13,18]

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι ημιπτητικές ενώσεις εξαιτίας της χαμηλής σταθεράς Henry που παρουσιάζουν, σε χαμηλές θερμοκρασίες παρουσιάζουν χαμηλή συγκέντρωση και μεγάλο χρόνο εκχύλισης. Συνεπώς, αυξάνοντας την θερμοκρασία, αυξάνεται και η σταθερά Henry και κατά συνέπεια ο συντελεστής κατανομής αέριου-υγρού της ουσίας. Αντίθετα, η ποσότητα της ουσίας που εκχυλίζεται στην ισορροπία μειώνεται. [5,13,18]

Όσον αφορά την ανάδευση αυτή κρίνεται απαραίτητη έτσι ώστε να επιταχυνθεί ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη της ισορροπίας υγρής- αέριας φάσης. Ουσιαστικά, η συνεχόμενη και σταθερή ανάδευση επιτυγχάνει την συνεχή ανανέωση της επιφάνειας με νέα μόρια. [5,13,18]

Τέλος, το είδος του δείγματος προς ανάλυση επηρεάζει άμεσα την ακρίβεια και ευαισθησία της μεθόδου. Η ύπαρξη χουμικών ενώσεων, το ποσοστό της διαλυμένης οργανικής ύλης στην μήτρα αλλά και η διαλυτότητα στο νερό ενδέχεται να επηρεάσουν σημαντικά την δειγματοληψία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιρροή της μήτρας είναι προφανώς μεγαλύτερη στην άμεση δειγματοληψία από αυτή του υπερκείμενου χώρου. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη ανταγωνιστικών πτητικών ενώσεων μπορεί να εμποδίσει την προσρόφηση του αναλύτη στόχου στην ίνα. [5,13,18]

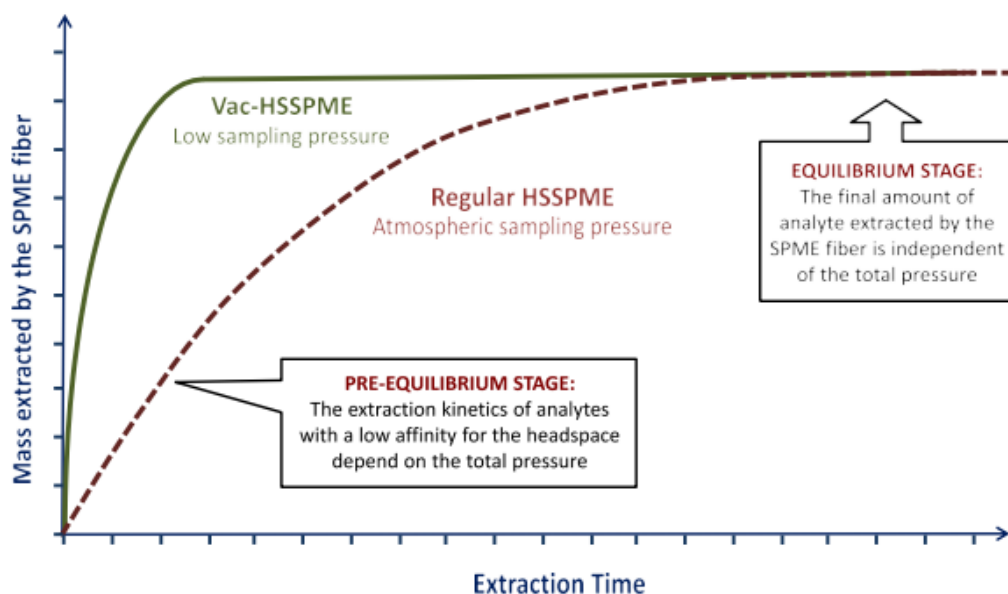


Εικόνα 10: Τυπικές Παράμετροι και βήματα της SPME που απαιτούν βελτιστοποίηση[19]

1.2.5 Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού (Vac-HS-SPME)

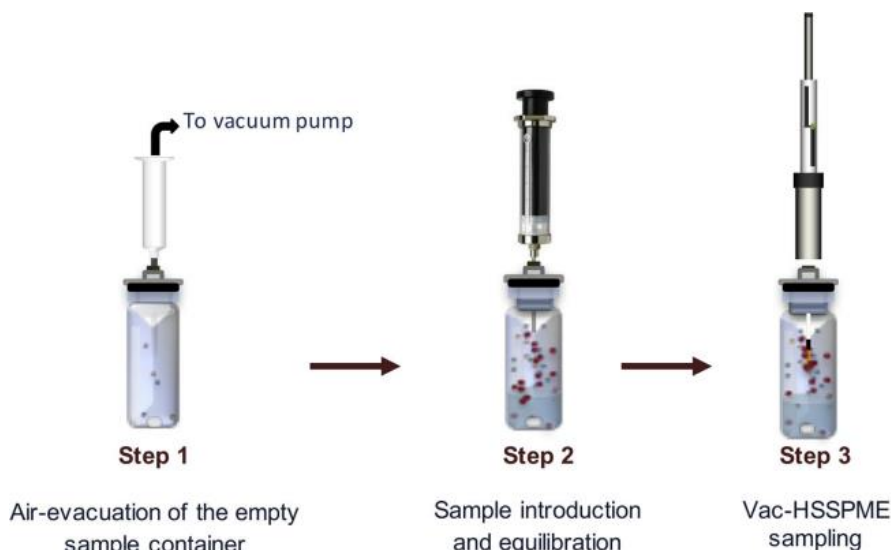
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου των ημιπτητικών αναλυτών απαιτεί εκτεταμένο χρόνο επίτευξης ισορροπίας εξαιτίας της χαμηλής συγγένειας τους με την αέρια φάση. Μέχρι σήμερα, έχουν ακολουθηθεί διάφορες στρατηγικές για την μείωση του χρόνου εξισορρόπησης κατά την HS-SPME με συνηθέστερη την θέρμανση του δείγματος. [19] Παρά την ευρεία χρήση της, αυτή η προσέγγιση δεν είναι πάντα αποτελεσματική καθώς μπορεί να οδηγήσει σε αποσύνθεση του δείγματος ή στην δημιουργία άλλων ανεπιθύμητων συστατικών.

Μια εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί η δειγματοληψία στον υπερκείμενο χώρο υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης. Η προσέγγιση αυτή βρέθηκε ότι επιταχύνει σημαντικά την κινητική της εκχύλισης των αναλυτών με μεγάλους χρόνους επίτευξης ισορροπίας σε ατμοσφαιρική πίεση. Η θετική επίδραση του κενού, μελετήθηκε για πρώτη φορά για την HS-SPME από τους Brunton et al. (2001) και αργότερα επιβεβαιώθηκε από τους Darrouzes et al. και Groenewold et al. (2005). Το 2012 οι Psillakis et al. παρουσίασαν το θεωρητικό μοντέλο που περιγράφει την θετική επίδραση των συνθηκών μειωμένης πίεσης στην δειγματοληψία HS-SPME των αναλυτών με χαμηλή σταθερά Henry. Το μοντέλο αυτό επαληθεύτηκε πειραματικά όταν δείγματα νερού εισήχθησαν για πρώτη φορά σε προ-εκκενωμένα δοχεία [20,21]. Η ύπαρξη συνθηκών χαμηλής πίεσης δεν αναμενόταν να αυξήσει την ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται από την ίνα SPME αλλά βελτίωσε σημαντικά την κινητική της εκχύλισης των ενώσεων με χαμηλή K_H (Εικόνα 11). Εκτός από την ταχύτητα της εκχύλισης, η ικανότητα της Vac-HSSPME να εμφανίζει υψηλή απόδοση σε ήπιες θερμοκρασίες ήταν ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό που απέκλεισε προβλήματα τα οποία μπορεί να συναντώνται με την κανονική HSSPME. [22]



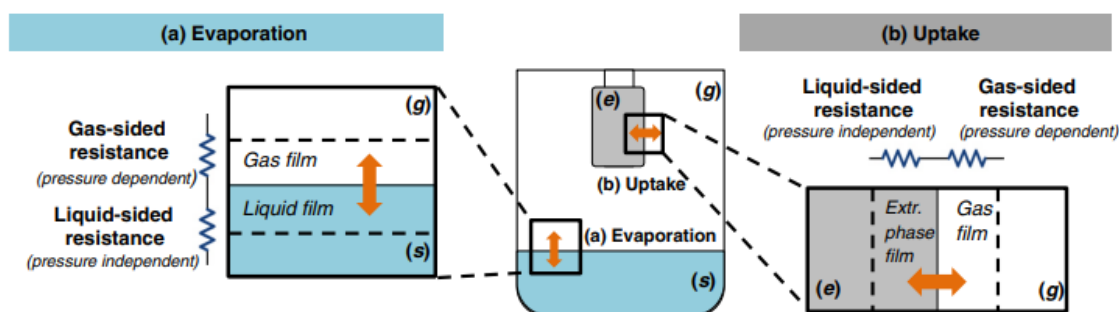
Εικόνα 11: Καμπύλη χρόνου εκχύλισης ημιπτητικών ενώσεων με την τεχνική της HSSPME (κόκκινη γραμμή) και με την Vac-HSSPME (πράσινη γραμμή) [22]

Η Vac-HS-SPME έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε μια ποικιλία μητρών, συμπεριλαμβανομένων στερεών και σύνθετων μητρών τροφίμων, όπως κρασί [11], γαλακτοκομικά προϊόντα [23] και έξτρα παρθένο ελαιόλαδο [24]. Στην πράξη, η τεχνική διατηρεί την απλότητα της HS-SPME και το μόνο επιπλέον βήμα που απαιτείται είναι αυτό της εκκένωσης του αέρα από το δοχείο του δείγματος πριν ή μετά την εισαγωγή του δείγματος [22]. Για υγρά δείγματα, όπως στην παρούσα μελέτη, η εκκένωση του αέρα πραγματοποιείται πριν την εισαγωγή του υγρού δείγματος, στην συνέχεια το δείγμα εισάγεται με μια σύριγγα και αφήνεται να ισορροπήσει πριν πραγματοποιηθεί η δειγματοληψία από τον υπερκείμενο χώρο. (Εικόνα 12)



Εικόνα 12: Βήματα διαδικασίας Vac-HSPME για υγρά δείγματα [22]

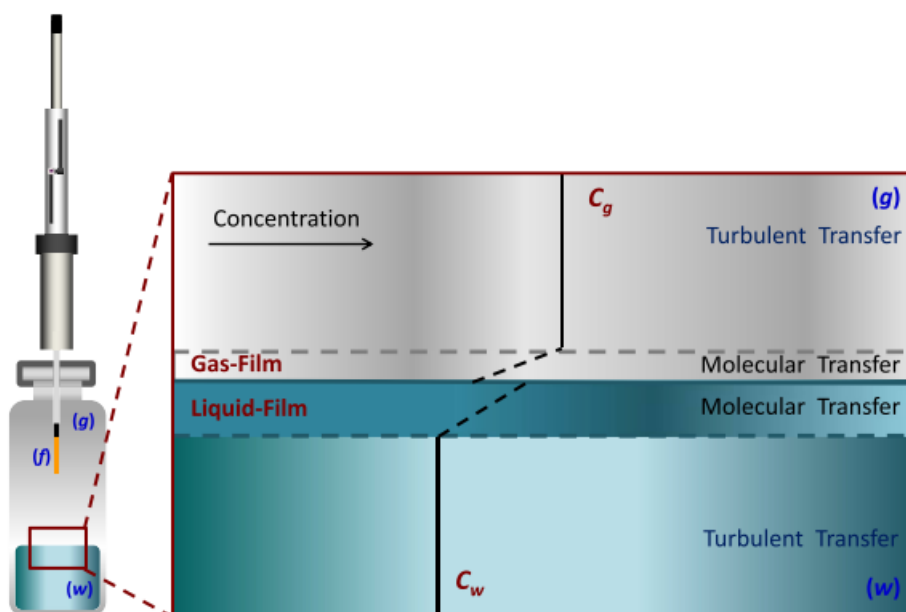
Με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης του κενού στην δειγματοληψία υπερκείμενου χώρου, αυτή θα διερευνηθεί στο κάθε στάδιο της διαδικασίας HS-SPME ξεχωριστά. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 13 το σύστημα χωρίζεται στο βήμα της εξάτμισης (δείγμα-υπερκείμενος χώρος) και στο βήμα της πρόσληψης του αναλύτη (υπερκείμενος χώρος-φάση εκχύλισης ίνας). Κάθε βήμα μπορεί να είναι γρήγορο ή αργό ανάλογα με τις ιδιότητες του αναλύτη, της μήτρας και της φάσης εκχύλισης, ενώ το πιο αργό βήμα θα καθορίσει τη συνολική ταχύτητα της διαδικασίας εκχύλισης. [25]



Εικόνα 13: Αναπαράσταση των επιμέρους συστημάτων της HS-SPME: (α) το στάδιο της εξάτμισης και (β) η πρόσληψη του αναλύτη από τη φάση εκχύλισης. Οι διάφοροι τύποι αντιστάσεων ερμηνεύονται με βάση την θεωρία των δύο υμενίων, όπου (s), (g) και (e) είναι το δείγμα, το αέριο και η φάση εκχύλισης.[25]

Επίδραση της πίεσης στο στάδιο της εξάτμισης πριν την επίτευξη ισορροπίας

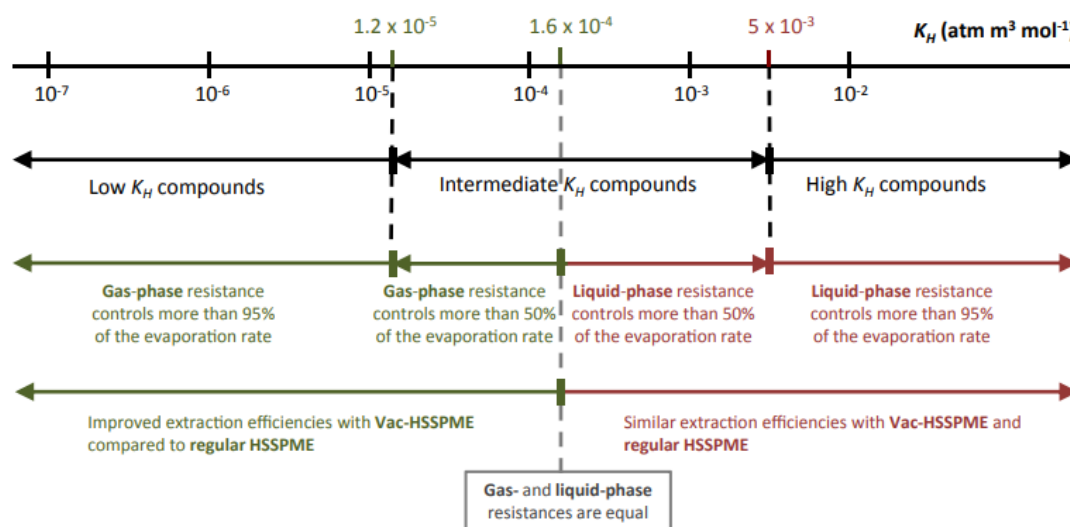
Όσον αφορά το στάδιο της εξάτμισης από υγρά δείγματα προτού επέλθει ισορροπία (pre-equilibrium stage), αυτό αρχικά εξηγήθηκε με βάση το μοντέλο των δύο υμενίων (two-film model, Εικόνα 14) το οποίο θέτει την ύπαρξη δύο ενδιάμεσων στρωμάτων (υγρό και αέριο φιλμ) στην διεπιφάνεια μεταξύ δείγματος και υπερκείμενης φάσης. Ανάλογα με τις ιδιότητες του αναλύτη, η αντίσταση μπορεί να βρίσκεται στο υγρό φιλμ, στο αέριο φιλμ ή σε συνδυασμό και των δύο. Σύμφωνα με το μοντέλο που διαμορφώθηκε [20], για αναλύτες των οποίων οι ρυθμοί εξάτμισης ελέγχονται από την αντίσταση στο λεπτό υμένιο αερίου (χαμηλή τιμή σταθεράς Henry), η ισορροπία θα εγκαθίσταται ταχύτερα όταν η δειγματοληψία πραγματοποιείται σε συνθήκες κενού. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η μείωση της πίεσης δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια του σταδίου προ-ισορροπίας της HSSPME θα μειώσει την αντίσταση της αέριας φάσης αυξάνοντας τους συντελεστές διάχυσης και μεταφοράς μάζας στο αέριο φιλμ και συνεπώς τους συνολικούς συντελεστές μεταφοράς μάζας αυτών των αναλυτών. Ταυτόχρονα, για αναλυτές με υψηλή τιμή K_H , η αντίσταση της υγρής φάσης θα κυριαρχήσει και η μείωση της πίεσης δειγματοληψίας δεν θα επηρεάσει τη διαδικασία HSSPME, δεδομένου ότι αυτό το είδος αντίστασης φάσης είναι ανεξάρτητο από τις συνθήκες πίεσης στον υπερκείμενο χώρο.[22]



Εικόνα 14: Αναπαράσταση του μοντέλου των δύο υμενίων της διεπιφάνειας αερίου-υγρού όπου: (w), (g) και (f) είναι οι φάσεις του νερού, του αερίου και της ίνας SPME και C_g και C_w είναι οι συγκεντρώσεις στην αέρια φάση και στην υδάτινη φάση αντίστοιχα[22]

Σε πρόσφατη έκθεση, οι Zhakupbekova et al. [26] χρησιμοποίησαν τον δεύτερο νόμο διάχυσης του Fick για να διατυπώσουν το στάδιο αυτό. Παρόλο που αυτή η προσέγγιση ήταν επιτυχής στην περιγραφή της εξάρτησης από την πίεση, φάνηκε λιγότερο διαφωτιστική στη σύνδεση των ιδιοτήτων του συστήματος με την επίδραση του κενού. Έτσι, προτάθηκε ένα απλό κριτήριο για την πρόβλεψη της επίδρασης του κενού στους ρυθμούς εξάτμισης, το οποίο υποθέτοντας γρήγορη πρόσληψη του αναλύτη από τη φάση εκχύλισης, θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της επίδρασης της χαμηλής πίεσης στη συνολική κινητική της εκχύλισης [21].

Σύμφωνα με αυτό το κριτήριο, πραγματοποιείται σύγκριση της τιμής K_H του αναλύτη με εμπειρικές τιμές κατωφλίου οι οποίες προκύπτουν από το μοντέλο των δύο φιλμ. Εφόσον η τιμή K_H του αναλύτη είναι κάτω από τις τιμές κατωφλίου που έχουν αναφερθεί, η δειγματοληψία Vac-HSSPME μπορεί να είναι επωφελής για ημιπτητικά καθώς και πτητικά αναλυτικά στοιχεία. Ενδεικτικά, η εκχύλιση των αναλυτών με σταθερά του νόμου του Henry μικρότερη από $1,6 \times 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, θα είναι ταχύτερη κατά τη δειγματοληψία υπό κενό σε σύγκριση με την ατμοσφαιρική πίεση, ενώ για τους αναλυτές με K_H μεγαλύτερη από $1,6 \times 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, οι συνθήκες κενού δεν θα επηρεάσουν σημαντικά τους ρυθμούς εκχύλισής τους. Η δειγματοληψία υπό συνθήκες κενού δεν θα επηρεάσει την κινητική της εκχύλισης των αναλυτών με τιμή K_H μεγαλύτερη από $5 \times 10^{-3} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. Το κριτήριο K_H όπως ονομάζεται, διατυπώθηκε για πρώτη φορά για την HS-SPME και υποθέτει ότι η επίτευξη ισορροπίας μεταξύ υπερκείμενου χώρου και της φάσης της ίνας είναι γρήγορη. Παρακάτω στην Εικόνα 15 συσχετίζονται αναλυτικά οι διάφορες περιοχές K_H με τη θέση της αντίστασης φάσης στους ρυθμούς εξάτμισης και την προβλεπόμενη επίδραση της χαμηλής πίεσης δειγματοληψίας στην HSSPME.[22,25]



Εικόνα 15: Εύρος της σταθεράς του νόμου του Henry και συσχέτιση με τη θέση της αντίστασης στους ρυθμούς εξάτμισης και την προβλεπόμενη επίδραση του κενού στη δειγματοληψία HSSPME σε δείγματα νερού [22]

Επίδραση της πίεσης στο στάδιο της εξάτμισης μετά την επίτευξη ισορροπίας

Αντιθέτως, σε συνθήκες ισορροπίας του συστήματος, σύμφωνα με την θερμοδυναμική θεωρία, οι μερικές πιέσεις και οι συγκεντρώσεις ισορροπίας είναι ανεξάρτητες από τη συνολική πίεση, δεδομένου ότι οι συντελεστές κατανομής/σταθερές του νόμου του Henry επηρεάζονται μόνο σε υψηλές πιέσεις λειτουργίας. Ως εκ τούτου, η θεωρία προβλέπει ότι η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται από την ίνα σε ισορροπία θα είναι η ίδια είτε η δειγματοληψία γίνεται με Vac-HSSPME είτε με κανονική HSSPME.[22]

Επίδραση της πίεσης στο στάδιο της πρόσληψης του αναλύτη

Όσον αφορά το στάδιο της πρόσληψης του αναλύτη από την ίνα, θεωρείται σχετικά γρήγορη διαδικασία σε σχέση με το στάδιο της εξάτμισης των ουσιών από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο. Ωστόσο, μπορεί να μετατραπεί σε αργό βήμα στη συνολική κινητική της εκχύλισης και να οδηγήσει σε μεγάλους χρόνους επίτευξης ισορροπίας, ανάλογα με τις ιδιότητες και την γεωμετρία της εκχυλιστικής φάσης αλλά και τις ιδιότητες των υπό εξέταση ενώσεων. Με βάση αυτό, το κριτήριο K_H που θεσπίστηκε για την πρόβλεψη της επίδρασης της χαμηλής πίεσης δειγματοληψίας στο βήμα εξάτμισης, θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή, καθώς η υπόθεση της γρήγορης εξισορρόπησης μεταξύ του υπερκείμενου χώρου και της φάσης εκχύλισης μπορεί να μην ικανοποιείται. Αυτό σημαίνει ότι σε περιπτώσεις όπου η απορρόφηση του αναλύτη από τη φάση εκχύλισης είναι το αργό βήμα της εκχύλισης, η δειγματοληψία υπό κενό μπορεί να είναι επωφελής ακόμη και αν ο αναλύτης δεν πληροί το κριτήριο K_H [27,28]. Σημειώνεται ότι οι αναλυτές που ικανοποιούν το κριτήριο K_H μπορεί να επωφεληθούν από πρόσθετη επιτάχυνση κατά την πρόσληψη του αναλύτη και αυτό εξαρτάται από την κατανομή του αναλύτη μεταξύ του υπερκείμενου χώρου και της φάσης εκχύλισης. [27,28].

Βελτιστοποίηση πειραματικών παραμέτρων κατά την Vac-HSSPME

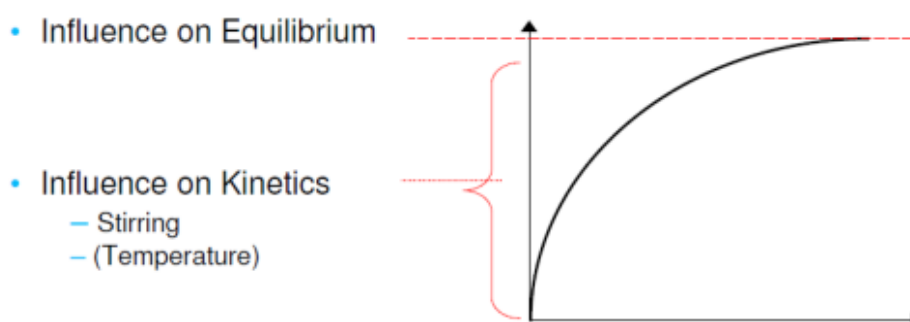
Πρακτικά, η επίδραση του κενού μπορεί επιτυχώς να συνδεθεί με τις επιδράσεις άλλων πειραματικών παραμέτρων που συνήθως λαμβάνονται υπόψη κατά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Η επιλογή των βέλτιστων συνθηκών εξαρτάται από τη φύση και την πολυπλοκότητα του προς ανάλυση δείγματος και από τις ιδιότητες των αναλυτών και της φάσης εκχύλισης.

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία αποτελεί μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που πρέπει να ελέγχονται κατά την υλοποίηση της μεθόδου. Σε θερμοκρασία δωματίου, μόνο οι πτητικοί αναλυτές μεταφέρονται αποτελεσματικά μέσω της αέριας φάσης στη φάση εκχύλισης, ενώ για τους ημιπτητικούς, το δείγμα θερμαίνεται με σκοπό την αποτελεσματική αύξηση των συγκεντρώσεών τους στον υπερκείμενο χώρο και τη μείωση των χρόνων εξισορρόπησης. Σύμφωνα με τη θεωρία, η θέρμανση του δείγματος υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης θα πρέπει να βελτιώσει περαιτέρω την κινητική της εξώθησης [20]. Όμως, αυτό δεν επαληθεύεται πάντα πειραματικά και διαπιστώνεται ότι οι υψηλότερες θερμοκρασίες δειγματοληψίας υπό κενό μειώνουν την αποδοτικότητα εκχύλισης σε σύγκριση με την ατμοσφαιρική πίεση. Το φαινόμενο σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα υγρασίας κατά τη θέρμανση του δείγματος και παρουσιάζεται πιο έντονα όταν χρησιμοποιείται απορροφητικός τύπος ίνας SPME (PDMS). Ανεξάρτητα από την επίδραση της θερμοκρασίας, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η υιοθέτηση της προσέγγισης κενού μπορεί να εξαλείψει την ανάγκη θέρμανσης του δείγματος. Στις περισσότερες βελτιστοποιημένες διαδικασίες, οι αποδόσεις εκχύλισης που επιτεύχθηκαν υπό κενό και σε ήπια θερμοκρασία δειγματοληψίας ήταν παρόμοιες με εκείνες που επιτεύχθηκαν υπό κανονικές συνθήκες και σε πολύ υψηλότερη θερμοκρασία δείγματος [11,29]. Παράλληλα, η θέρμανση του δείγματος σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να μειώσει την επίδραση του κενού καθώς η πίεση ατμών των αναλυτών αυξάνεται εκθετικά με τη θερμοκρασία και η θέρμανση του δείγματος θα αυξήσει τη συνολική πίεση στο εσωτερικό του δοχείου δείγματος [2].

Χρόνος εκχύλισης

Η Vac-HSSPME επιταχύνει σημαντικά την κινητική της εκχύλισης των αναλυτών που παρουσιάζουν μεγάλους χρόνους εξισορρόπησης υπό ατμοσφαιρική πίεση. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε πειραματικά ότι οι βέλτιστοι χρόνοι δειγματοληψίας σε συνθήκες χαμηλής πίεσης είναι συνήθως μειωμένοι κατά το ήμισυ σε σύγκριση με την κανονική διαδικασία, μεγιστοποιώντας τον αριθμό των εκχυλισμένων δειγμάτων και εξοικονομώντας χρόνο [11,27,30]. Σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται φάση εκχύλισης προσροφητικού τύπου, συνιστάται να διατηρούνται σύντομοι χρόνοι εκχύλισης για την ελαχιστοποίηση της επίδρασης της ανταγωνιστικής προσρόφησης [30]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ταχύτερη απορρόφηση των αναλυτών που λαμβάνει χώρα υπό κενό εντείνει την ανταγωνιστική εκτόπιση των αναλυτών χαμηλότερου μοριακού βάρους και των πιο πτητικών αναλυτών που υπάρχουν σε διαλύματα πολλαπλών συστατικών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, καταγράφηκε μετάβαση από αργή σε γρήγορη εξισορρόπηση κατά τη μειωμένη πίεση δειγματοληψίας και φανερώθηκε διακριτά η φύση των δύο σταδίων της διαδικασίας HSSPME εντός των εξεταζόμενων χρόνων δειγματοληψίας [21,31,32]. Για ενώσεις με χαμηλές τιμές K_H και μεγάλες τιμές K_{ow} , αναμένονταν μεγάλοι χρόνοι εξισορρόπησης και επομένως η θετική επίδραση των συνθηκών μειωμένης πίεσης ήταν έντονη ακόμη και για παρατεταμένους χρόνους δειγματοληψίας [21,29,31,32].

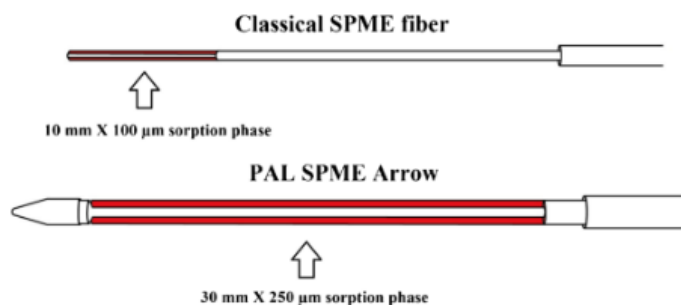


Εικόνα 16: Προφίλ χρόνου εκχύλισης μιας ένωσης στόχου [5]

1.2.6 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης με την χρήση βέλους (SPME Arrow)

Η τεχνολογία SPME Arrow αναπτύχθηκε με σκοπό να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα που σχετίζονται με την απόδοση της ίνας (fiber). Πιο συγκεκριμένα, το SPME Arrow μπορεί να παρέχει τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους καλύτερη ευαισθησία, καθώς φέρει μεγαλύτερο όγκο ροφητικού υλικού. Επιπλέον, ο σχεδιασμός και η δομή αυτού του νέου είδους συσκευής εκχύλισης βελτιώνουν σημαντικά την ευρωστία και τη μηχανική αντοχή της. Η διαφορά ουσιαστικά, βρίσκεται στο σχήμα της ίνας, το άκρο της οποίας μοιάζει με βέλος, διεισδύοντας ευκολότερα μέσα στο φιαλίδιο και τα septa του αέριου χρωματογράφου, καθώς η πίεση εφαρμόζεται πιο ομοιόμορφα. Προφανώς, η διάμετρος του βέλους SPME είναι μεγαλύτερη από την κλασική SPME (1,5 mm σε σύγκριση με περίπου 0,7 mm), γεγονός που οδηγεί σε μικρότερη κάμψη, όταν το δείγμα αναδεύεται και εκχυλίζεται ταυτόχρονα. Η αναλυτική απόδοση του SPME Arrow σε συνδυασμό με GC-MS έχει αποδειχθεί πρόσφατα για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων των ενώσεων γεύσης και οσμής σε δείγματα επιφανειακών υδάτων, και έχει επίσης κερδίσει το ενδιαφέρον σε μερικές ακόμη εφαρμογές για διάφορες μήτρες και αναλυτές [33–35]. Ωστόσο, η SPME Arrow ως μια νέα τεχνική μικροεκχύλισης χωρίς διαλύτες, έχει μελετηθεί μόνο για περιορισμένο αριθμό αναλυτών και ως εκ τούτου η εύρεση της βέλτιστης συμπεριφοράς της, αλλά και οι επιπτώσεις των σημαντικών βελτιώσεων της (όσον αφορά τον όγκο του απορροφητικού υλικού και τη μηχανική σταθερότητα) σε σύγκριση με την κλασική SPME, αξίζουν περαιτέρω επιστημονικής διερεύνησης. [35]

Στην παρούσα μελέτη ωστόσο, χρησιμοποιήθηκε μια βελτιστοποιημένη και πλήρως αυτοματοποιημένη μορφή της, επανομαζόμενη ως PAL (Prep And Load solution) SPME Arrow. Αναλυτικότερα, η δομή του PAL SPME Arrow περιλαμβάνει μια ράβδο από ανοξείδωτο χάλυβα η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό και κατά μήκος όλης της συσκευής, συνδέοντας το άνω μέρος με το στερεό κάτω άκρο. Η εσωτερική ράβδος έχει ρόλο σταθεροποιητή, συγκρατώντας την φάση ρόφησης, η οποία είναι προσκολλημένη κυλινδρικά γύρω από την εσωτερική ράβδο, όπως φαίνεται στην εικόνα 17. Η ειδική σχεδίαση της συσκευής PAL SPME Arrow επιτρέπει την ήπια διείσδυση του βέλους στο septa που υπάρχει στο σύστημα εισαγωγής του αέριου χρωματογράφου αλλά και σε αυτό που υπάρχει στο φιαλίδιο του δείγματος. Η ύπαρξη του βέλους στο κάτω άκρο της συσκευής, αποτρέπει την έκθεση της ροφητικής φάσης κατά την διαδικασία μεταφοράς της, μειώνοντας τον κίνδυνο φθοράς της. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό και αποτελεί μια βασική ειδοποιός διαφορά της συσκευής SPME Arrow έναντι της κλασικής SPME συσκευής. Στην δεύτερη περίπτωση η ίνα πρέπει να ανασυρθεί (retraction) στο εσωτερικό της συσκευής και γενικότερα ο εξωτερικός τριχοειδής σωλήνας που περικλείει την ίνα (outer capillary) να είναι εκτεθειμένος σε περισσότερο δυνητικά δυσμενείς επιδράσεις, όπως οι μολύνσεις από τον αέρα του περιβάλλοντος. Επιπρόσθετα, ο εξωτερικός τριχοειδής σωλήνας αντιμετωπίζει μια σημαντική αντίσταση κατά το στάδιο της διείσδυσης σε σχέση με την κλειστή κατάσταση του PAL SPME Arrow, κατά την οποία ο εξωτερικός τριχοειδής σωλήνας του PAL Arrow ακουμπά το στερεό βέλος, δημιουργώντας μια «ομοιογενή» κλειστή ίνα.[34]



Εικόνα 17: Μορφή PAL SPME Arrow [34]



Εικόνα 18: Συσκευή PAL SPME Arrow (PAL System)

1.3 Αέρια Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)

1.3.1 Βασικές Αρχές

Εφόσον έχει πραγματοποιηθεί η πρόσληψη των αναλυτών μέσω της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME), ακολουθεί το στάδιο της αέριας χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας, με σκοπό την ανάλυση των ενώσεων στόχων. Η αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μάζας (GC-MS) αποτελείται από δύο πολύ ισχυρές αναλυτικές τεχνικές: την αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography) και τη φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry). Συνήθως, οι δύο τεχνικές λαμβάνουν χώρα σε σειρά καθώς το αναλυτικό όργανο αποτελείται από έναν αέριο χρωματογράφο ο οποίος συνδέεται μέσω μιας θερμαινόμενης γραμμής μεταφοράς στο φασματόμετρο μάζας.

Η *αέρια χρωματογραφία* είναι μια αναλυτική τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των χημικών συστατικών ενός δείγματος μίγματος και στη συνέχεια την ανίχνευσή τους για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους. Οι ανιχνευτές GC χρησιμοποιούνται συχνά για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα και προϊόντα πετρελαίου. Ωστόσο, είναι περιορισμένοι ως προς τις πληροφορίες που παρέχουν καθώς αυτές είναι συνήθως δισδιάστατες δίνοντας τον χρόνο κατακράτησης στην αναλυτική στήλη και την απόκριση του ανιχνευτή.

Η ταυτοποίηση βασίζεται στη σύγκριση του χρόνου κατακράτησης των κορυφών σε ένα δείγμα με εκείνες από πρότυπα γνωστών ενώσεων, που αναλύονται με την ίδια μέθοδο. Συνεπώς, η αέρια χρωματογραφία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνη της για την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων, για αυτό συνδέεται με την φασματομετρία μάζας (MS). Το αναλυτικό όργανο MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοναδικός ανιχνευτής ή η εκροή της στήλης μπορεί να μοιραστεί μεταξύ του ανιχνευτή MS και GC.

Η *φασματομετρία μάζας* είναι μια αναλυτική τεχνική η οποία μετρά τον λόγο μάζας προς το φορτίο (m/z) των φορτισμένων σωματιδίων με σκοπό τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους, της στοιχειακής σύνθεσης, καθώς και για την αναγνώριση των χημικών δομών των μορίων. Τα δεδομένα από ένα GC-MS είναι τρισδιάστατα, παρέχοντας φάσματα μάζας τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση της ταυτότητας ή την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων. (*Technology Networks, Analysis and Separations*)

1.3.2 Αναλυτική Διαδικασία

Παρακάτω, παρουσιάζονται αναλυτικά τα στάδια της διαδικασίας ανάλυσης των ενώσεων-στόχων. Αρχικά, το δείγμα εισάγεται στο θερμαινόμενο στόμιο εισαγωγής του αέριου χρωματογράφου (injector) με την βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη. Εφόσον το δείγμα είναι σε υγρή μορφή, τα συστατικά του εξατμίζονται στη θερμαινόμενη είσοδο του GC και συμπαρασυρόμενα από το φέρον αέριο διαχωρίζονται κατά μήκος της ειδικής στήλης. Το φέρον αέριο, το οποίο είναι συνήθως υδρογόνο (H_2) ή ήλιο (He), οδηγείται από τη φιάλη υψηλής πίεσης στην στήλη μέσα από ρυθμιστές παροχής. Ο διαχωρισμός των συστατικών πραγματοποιείται με βάση τις διαφορές κατανομής τους μεταξύ της κινητής φάσης (φέρον αέριο) και της υγρής σταθερής φάσης που συγκρατείται εντός της στήλης, ή για τα πιο πτητικά αέρια, την προσρόφησή τους από μια στερεή σταθερή φάση. Μετά το διαχωρισμό, τα ουδέτερα μόρια εκκλύονται στο φασματομέτρο μάζας μέσω μιας θερμαινόμενης γραμμής μεταφοράς.

Εντός του φασματομέτρου μάζας, τα ουδέτερα μόρια του δείγματος αρχικά ιονίζονται συνήθως με ιονισμό ηλεκτρονίων (EI). Αναλυτικότερα, τα αέρια μόρια της ένωσης βομβαρδίζονται με επιταχυνόμενη δέσμη ηλεκτρονίων (70 eV) και συγκρούμενα με ηλεκτρόνια του μορίου παράγονται κατιονικές ρίζες (φορτισμένα σωματίδια). Αυτός ο ιονισμός υψηλής ενέργειας μπορεί να οδηγήσει σε ένα ασταθές μοριακό ιόν και η περίσσεια ενέργειας μπορεί να χαθεί μέσω κατακερματισμού. Η διάσπαση των δεσμών μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια ενός ριζικού ή ουδέτερου μορίου ή να δημιουργήσει μοριακές αναδιατάξεις. Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα έναν πολύ μεγάλο αριθμό ιόντων διαφορετικών μαζών, με βαρύτερο το μοριακό ιόν και θραύσματα ιόντων διαφόρων χαμηλότερων μαζών.

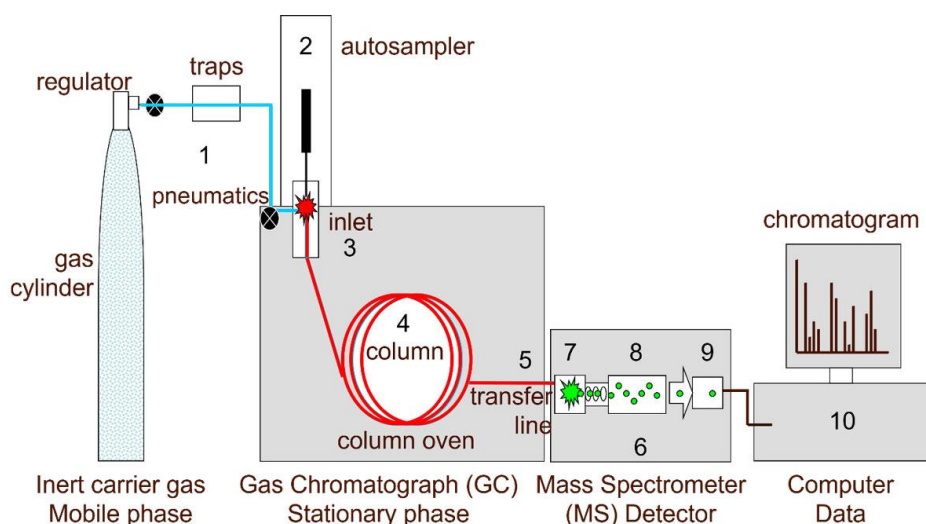
Το επόμενο βήμα είναι ο διαχωρισμός των ιόντων διαφορετικών μαζών, ο οποίος επιτυγχάνεται με βάση το m/z τους από τον αναλυτή μαζών. Γενικά, υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι αναλυτών μάζας. Η ανάλυση μάζας είναι η ικανότητα του αναλυτή να διαχωρίζει ιόντα με πολύ μικρές διαφορές στα m/z . Τα όργανα μοναδιαίας ανάλυσης μάζας μπορούν να διαχωρίσουν μόνο τις ονομαστικές μάζες ή αυτές με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου, ενώ τα όργανα υψηλής ανάλυσης μάζας (HRMS) μπορούν να τις διαχωρίσουν με ακρίβεια τεσσάρων ή πέντε δεκαδικών ψηφίων.

Ο πιο συνηθισμένος τύπος οργάνου μοναδιαίας ανάλυσης μάζας είναι το τετράπολο, το οποίο είναι όργανο σάρωσης που μεταβάλλει την τάση ώστε να επιτρέπει μόνο στα ιόντα ενός συγκεκριμένου m/z να έχουν σταθερή τροχιά μέσω των τεσσάρων πόλων για να φθάσουν στον ανιχνευτή ιόντων.

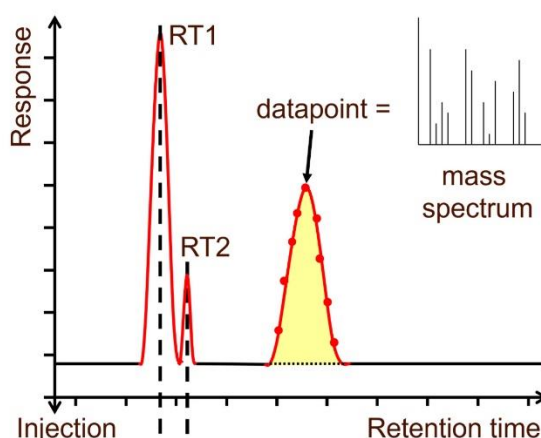
Τα όργανα τετράπολου χρησιμοποιούνται με δύο διαφορετικούς τρόπους λειτουργίας:

- Λειτουργία πλήρους σάρωσης, κατά την οποία λαμβάνονται όλα τα ιόντα σε ένα εύρος μαζών, χρήσιμη για την ταυτοποίηση αγνώστων, την ανάπτυξη μεθόδων και την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση αναλυτών υψηλότερης συγκέντρωσης.
- Λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (SIM), όπου λαμβάνονται μόνο επιλεγμένα ιόντα που αντιπροσωπεύουν την ένωση-στόχο, χρήσιμη για την ανάλυση ιχνών, καθώς επιτυγχάνεται υψηλότερη ευαισθησία, αλλά μόνο των αναλυτών-στόχων.

Αφού τα ιόντα διαχωριστούν από τον αναλυτή μάζας με βάση το m/z τους, φθάνουν στον ανιχνευτή ιόντων, όπου το σήμα ενισχύεται από έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων ή μια πλάκα πολλαπλών καναλιών. Το σήμα καταγράφεται από το λογισμικό λήψης σε υπολογιστή με σκοπό την παραγωγή ενός χρωματογραφήματος και ενός φάσματος μάζας για κάθε σημείο δεδομένων. Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται σχηματικά η διαδικασία που περιεγράφηκε. (Technology Networks, Analysis and Separations)



Εικόνα 1 : Οργανολογία αέριας χρωματογραφίας μάζας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (Technology Networks)



Εικόνα 19: Τελικό Χρωματογράφημα ιόντων που προκύπτει από το GS-MS (Technology Networks)

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά, Εργαστηριακός Εξοπλισμός και Διαδικασίες

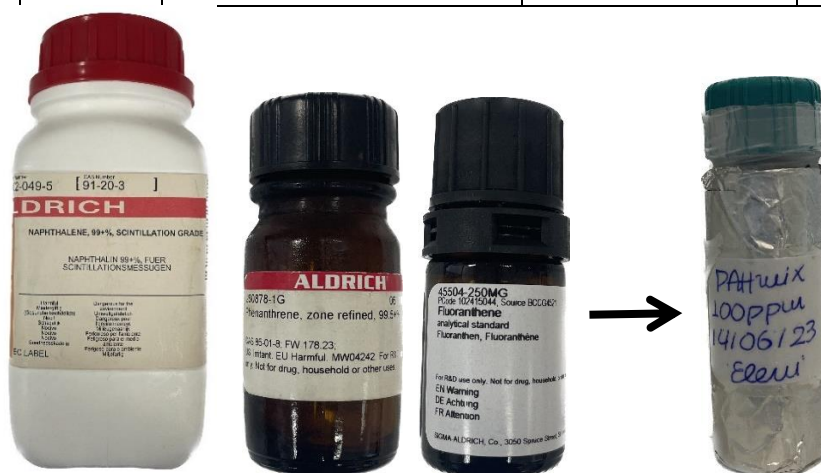
2.1.1 Διάλυμα Ενώσεων Στόχων (Stock Solution)

Για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος, χρησιμοποιήθηκαν τρεις πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥ) σε στερεή μορφή. Αυτοί είναι το ναφθαλένιο (Nap), το φαινανθρένιο (Phe) και το φλουορανθένιο (Flu). Κάθε ένας είχε καθαρότητα μεγαλύτερη από 99% και αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία) (Εικόνα 20).

Αρχικά, ζυγίστηκε συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε ΠΑΥ, η οποία διαλύθηκε σε ακετονιτρίλιο (Acetonitrile, pesticide-grade; Merck, Darmstadt, Germany), δημιουργώντας διάλυμα 5ml από κάθε ΠΑΥ. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε ένα μίγμα και των τριών ενώσεων, συγκέντρωσης $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (ppm), χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε διάλυμα ΠΑΥ (Πίνακας 2) με την βοήθεια μικροσύριγγας, το οποίο αραιώθηκε σε ακετονιτρίλιο. Το διάλυμα των ενώσεων στόχων φυλασσόταν σε γυάλινο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα και σφραγιζόταν με parafilm μετά την χρήση. Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιούταν καθημερινά για την προετοιμασία εμβολιασμένων δειγμάτων νερού και όταν δεν χρησιμοποιούνταν αποθηκευόταν στο σκοτάδι στους -18°C . Το απιονισμένο νερό που χρησιμοποιούνταν παρασκευαζόταν χρησιμοποιώντας ένα σύστημα καθαρισμού νερού Barnstead EASYpure II που αγοράστηκε από τη Thermo Scientific (Dubuque, ΗΠΑ).

Πίνακας 2: Συγκέντρωση και Ποσότητες Διαλυμάτων ΠΑΥ

	Ζυγισμένη Ποσότητα (mg)	Συγκέντρωση (ppm)	VPAHmix (μL)
Nap	50,6	10064	49,6
Phe	50,4	10024	49,8
Flu	50	10000	50

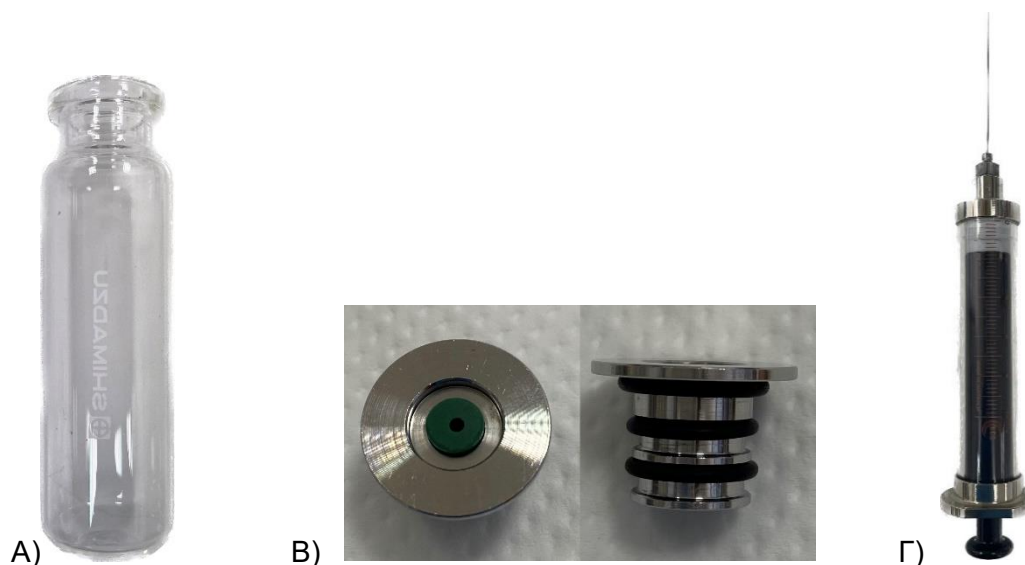


Εικόνα 20: ΠΑΥ και Παρασκευή Πρότυπου Διαλύματος (Stock Solution)

2.1.2 Διαδικασία Vac-HS-SPME

Για όλες τις εκχυλίσεις υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης, χρησιμοποιήθηκε ένα γυάλινο φιαλίδιο (crimp vial) των 20ml, το καπάκι του οποίου είναι μεταλλικό και σχεδιάστηκε και κατασκευάστηκε από την καθηγήτρια Ε. Ψυλλάκη (ETAS, Κρήτη, Ελλάδα) έτσι ώστε να διατηρεί συνθήκες χαμηλής πίεσης στο εσωτερικό του φιαλιδίου. Τα συγκεκριμένα πώματα διέθεταν άνοιγμα στο εσωτερικό τους το οποίο χρησιμοποιούνταν για την υποδοχή ενός κυλινδρικού διαφράγματος (septum) Thermogreen® LB-1 με μισή οπή (Supelco), το οποίο μπορούσε να διαπερνάτε από το βέλος SPME αρκετές φορές χωρίς να καταστρέφεται ανεπανόρθωτα. Το συγκριτικό πλεονέκτημα του εν λόγω πώματος είναι ότι χάρη στις μαγνητικές του ιδιότητες επιτρέπει την εύκολη μεταφορά των φιαλιδίων μέσω του ρομποτικού βραχίονα του αυτόματου δειγματολήπτη, εξασφαλίζοντας μια πλήρως αυτοματοποιημένη διαδικασία προετοιμασίας, απομόνωσης και ανάλυσης των δειγμάτων. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, μειώνοντας το συνολικό κόστος της ανάλυσης.

Αρχικά, πραγματοποιούνταν η εκκένωση του φιαλιδίου από τον αέρα για 30 δευτερόλεπτα με τη χρήση μιας μονάδας άντλησης Vacuubrand VP 2 Autovac (Wertheim, Γερμανία - 7 mbar ~ 0,007 atm ultimate vacuum without gas ballast) η οποία είναι ειδικά διαμορφωμένη και προσαρμοσμένη με μια υποδερμική σύριγγα στην άκρη του σωλήνα της αντλίας κενού για την εισαγωγή της στο πώμα του φιαλιδίου. Στην συνέχεια, αφού το μίγμα εισαγόταν σε ένα λουτρό υπερήχων για την ομογενοποίηση του, με την χρήση μιας σύριγγας gastight (10ml, SGE, Αυστραλία), εισαγότουσαν στο φιαλίδιο 5ml εμπλουτισμένου υδατικού δείγματος PAHmix 5 µg/L. Αφού τα δείγματα τοποθετούνταν στο δίσκο του αυτόματου δειγματολήπτη, αφηνότουσαν αρχικά να εξισορροπηθούν με τον υπερκείμενο χώρο για 10 λεπτά υπό ανάδευση (350 rpm) και σε θερμοκρασία ίση με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση. Τέλος, πραγματοποιούνταν η έκθεση του βέλους SPME στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα υπό ανάδευση (350 rpm) και σε επιλεγμένη θερμοκρασία δειγματοληψίας. Το βέλος SPME που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα είχε σταθερή φάση PDMS πάχους 100 µm (εξωτερική διάμετρος 1,1 mm) και παραχωρήθηκε ευγενικά από την Restek, Bellefonte, ΗΠΑ.



Εικόνα 21: Εξοπλισμός για διαδικασία Vac-HS-SPME: A) γυάλινο φιαλίδιο 20ml B) μεταλλικό καπάκι με κυλινδρικό διάφραγμα στο εσωτερικό του Γ) σύριγγα gastight



Εικόνα 22: Μονάδα άντλησης Vacuubrand VP 2 Αυτονακ



Εικόνα 23: Διαδικασία Εκκένωσης Φιαλιδίου

2.1.3 Διαδικασία HS-SPME

Όσον αφορά την διαδικασία εκχύλισης SPME Arrow υπό συνθήκες κανονικής πίεσης, η διαφορά βασίζεται στην παράλειψη του βήματος της εκκένωσης του αέρα. Τα φιαλίδια που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούν γυάλινα βιδωτά φιαλίδια (screw vial) υπερκείμενης φάσης των 20 mL και διαστάσεων 22x75 mm (Restek, USA). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν βιδωτά μεταλλικά πώματα με ανοικτή κορυφή των 18 mm τα οποία διέθεταν 17,5 mm κόκκινο διάφραγμα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE)/σιλικόνης πάχους 1,5 mm (Restek). Το δείγμα τοποθετούνταν στο φιαλίδιο χρησιμοποιώντας ένα σιφώνιο πλήρωσης των 5ml.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας δειγματοληψίας, το βέλος SPME ανασυρόταν από τον αυτόματο δειγματολήπτη και μεταφερόταν στο σύστημα εισαγωγής του GC-MS όπου εκεί γινόταν η θερμική εκρόφηση των αναλυτών (250 °C για 5 λεπτά) και στην συνέχεια ο διαχωρισμός και η ανάλυση τους στο GC/MS. Όλες οι εκχυλίσεις εκτελέστηκαν εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση μονάδας αυτόματου δειγματολήπτη AOC 6000 της Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Πριν από την έναρξη οποιασδήποτε αναλυτικής ακολουθίας, το βέλος SPME προετοιμαζόταν για 5 λεπτά θερμαίνοντας το στους 260°C. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι “κενές” αναλύσεις εκτελούνταν περιοδικά για να διασφαλιστεί η απουσία μεταφοράς επιμολύνσεων μεταξύ των εκτελέσεων.



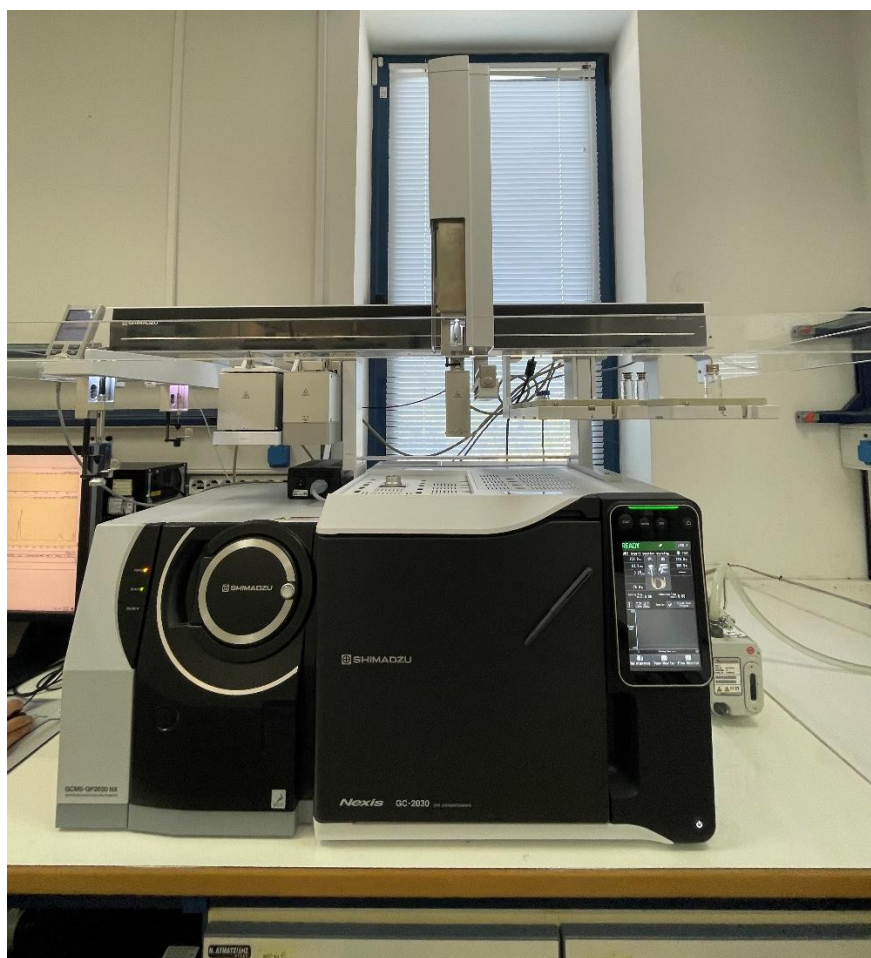
Εικόνα 24: Σιφώνι Πλήρωσης για διαδικασία HS-SPME



Εικόνα 25: Τοποθετημένα φιαλίδια προς ανάλυση

2.1.4 Ανάλυση GS-MS

Το τελευταίο βήμα της διαδικασίας αποτελεί η ανάλυση, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός GC2030 της Shimadzu, συνδεδεμένου με ένα QP2020 NX, το οποίο ήταν επιπλέον εξοπλισμένο με έναν αυτόματο δειγματολήπτη AOC 6000, όλα αγορασμένα από την Shimadzu Corporation. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με ρυθμό ροής $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Επιπλέον, η στήλη που είναι υπεύθυνη για τον διαχωρισμό των ενώσεων αποτελεί τριχοειδή στήλη $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm i.d.} \times 0,25 \mu\text{m d}_f$ J&W DB5-MS που αγοράστηκε από την Agilent, Santa Clara-CA, ΗΠΑ. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου του GC ήταν: 75°C για 2 λεπτά, αυξανόμενο στους 150°C με ρυθμό $25^\circ\text{C}/\text{min}$ όπου διατηρήθηκε για 2 λεπτά και στη συνέχεια αυξήθηκε στους 240°C με ρυθμό $10^\circ\text{C}/\text{min}$ όπου διατηρήθηκε για 9 λεπτά. Ο εισαγωγέας ρυθμίστηκε στους 250°C στη λειτουργία splitless. Όσον αφορά το MS, αυτό λειτούργησε σε λειτουργία σάρωσης από 70 έως 250 m/z με χρόνο αποκοπής διαλύτη (solvent cut time) 1 λεπτό. Οι θερμοκρασίες της πηγής ιόντων (ion source temperature) και της διεπαφής (interface temperature) ρυθμίστηκαν στους 200 και 220°C αντίστοιχα. Η ολοκλήρωση των κορυφών και η γραμμικότητα αξιολογήθηκαν με το πιο άφθονο ιόν για κάθε ΠΑΥ (Πίνακας 1) με την χρήση του λογισμικού GCMS Postrun Analysis έκδοση 4.53P1 (Shimadzu Corporation).



Εικόνα 26: Όργανο GC-MS με αυτόματο δειγματολήπτη AOC 6000 (Shimadzu Corporation)

2.1.5 Καθαρισμός φιαλιδίων, πωμάτων και εξοπλισμού

Με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων και εισβολής ανεπιθύμητων χημικών ουσιών κατά την διάρκεια των αναλύσεων, όλα τα φιαλίδια, τα πώματα και ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε πλενόταν μετά από κάθε χρήση. Αναλυτικότερα, οι ογκομετρικές φιάλες στις οποίες παρασκευαζόντουσαν τα διαλύματα καθημερινά, τα ποτήρια ζέσης, τα σιφώνια πλήρωσης αλλά και τα φιαλίδια των δειγμάτων πλένονταν με απιονισμένο νερό και στην συνέχεια με υπερκάρη ακετόνη, ενώ τα πώματα μόνο με απιονισμένο νερό. Η μικρό σύριγγα που χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή των εμβολιασμένων διαλυμάτων νερού (Εικόνα 27) πλενόταν πριν και μετά από κάθε χρήση πρώτα με υπερκάρη ακετόνη και στην συνέχεια με ακετονιτρίλιο στο οποίο είχε διαλυθεί και το μίγμα των υδρογονανθράκων που παρασκευάστηκε. Τέλος, η σύριγγα gastight που χρησιμοποιούνταν για την εισαγωγή του δείγματος στο φιαλίδιο με το κενό πριν από κάθε χρήση ξεπλενόταν με το εκάστοτε διάλυμα προς ανάλυση και μετά από κάθε χρήση με υπερκάρη ακετόνη.



Εικόνα 27:Μικροσύριγγα 100µL

2.1.6 Παράγοντες Βελτιστοποίησης και Παράμετροι Μεθόδου

Η τεχνική της Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης τύπου “Arrow” υπό συνθήκες κενού, (Vacuum Assisted Headspace Solid Phase Microextraction Arrow, Vac-HS-SPME Arrow), βελτιστοποιήθηκε μελετώντας την επίδραση των παραγόντων της θερμοκρασίας (extraction temperature) και του χρόνου εκχύλισης (extraction time) ως προς τον ρυθμό εκχύλισης- απόδοσης των ενώσεων-στόχων.

Πίνακας 3: Παράγοντες Βελτιστοποίησης της τεχνικής Vac-HS-SPME Arrow

Παράγοντες Βελτιστοποίησης	
Θερμοκρασία εκχύλισης (°C)	40, 50, 60
Χρόνος εκχύλισης (min)	2, 5, 10, 15, 30, 45, 60

Πίνακας 4: Παράμετροι Αυτόματου Δειγματολήπτη

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΠΤΗ	
Sample	5mL 5ppb PAH mix spiked in ultra pureH ₂ O
Fiber	ARROW PDMS 100μm , 1.1mm
Conditioning time, temperature	5 min , 250°C
Agitator Speed	350rpm
Stirrer Speed	350rpm
Equilibrium time	10 min
Desorption time	5 min
Post conditioning time	5 min
Sample Vial Depth	40 mm
Analysis time	26 min
Sample Vial PenetrationSpeed	20 mm/s
Injector Penetration Speed	100 mm/s

Πίνακας 5: Παράμετροι Αέριας Χρωματογραφίας

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ GC		
Injector Temperature	250oC	
Injection Mode	Splitless	
Column flow	1 mL/min	
Split Ratio	20	
Column	DB-5 30mx0.25mmx0.25μm	
GC OVEN TEMPERATURE PROGRAM		
RATE (oC/min)	TEMPERATURE (oC)	HOLD (min)
-	75	2
25	150	2
10	240	9

Πίνακας 6: Παράμετροι Φασματομετρίας Μάζας

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ MS		
Ion Source Temperature (°C)	200	
Interface Temperature (°C)	220	
Solvent cut time (min)	1	
Scan	Start	End
Time (min)	1	25
m/z	70	250

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, όπως έχει ήδη αναλυθεί, μελετήθηκαν διάφοροι παράμετροι, με απώτερο σκοπό την *βελτιστοποίηση* της χρησιμοποιούμενης τεχνικής Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης τύπου “Arrow” υπό συνθήκες κενού (Vac-HS-SPME Arrow), για την απομόνωση των τριών ενώσεων στόχων. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν αφορούν κυρίως την θερμοκρασία (*Extraction Temperature*) και τον χρόνο εκχύλισης (*Extraction Time*). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την επικράτηση συνθηκών κενού συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης (HS-SPME Arrow). Η παραπάνω μεθοδολογία προετοιμασίας και ανάλυσης δειγμάτων επικυρώθηκε, ελέγχοντας την γραμμικότητα της μεθόδου (*Linearity*), δηλαδή κατασκευάζοντας καμπύλη αναφοράς (*Calibration Curve*) για κάθε ένωση-στόχο. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων εκφράστηκαν σε $\mu\text{g/L}$ (ppb). Επιπλέον, υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (*LOD* και *LOQ*) για κάθε ΠΑΥ. Η ακρίβεια (*Precision*) των αποτελεσμάτων εκτιμήθηκε πραγματοποιώντας πειράματα επαναληψιμότητας (*Repeatability*) της Vac-HS-SPME-Arrow. Τέλος, αξιολογήθηκε η επίδραση του υποστρώματος (*Matrix Effect*) στην απόδοση της μεθόδου, εκτελώντας πειράματα ανάκτησης των ΠΑΥ σε πραγματικά υδατικά δείγματα, όπως νερού βρύσης, βροχής και από ποτάμι.

3.1 Επίδραση Θερμοκρασίας

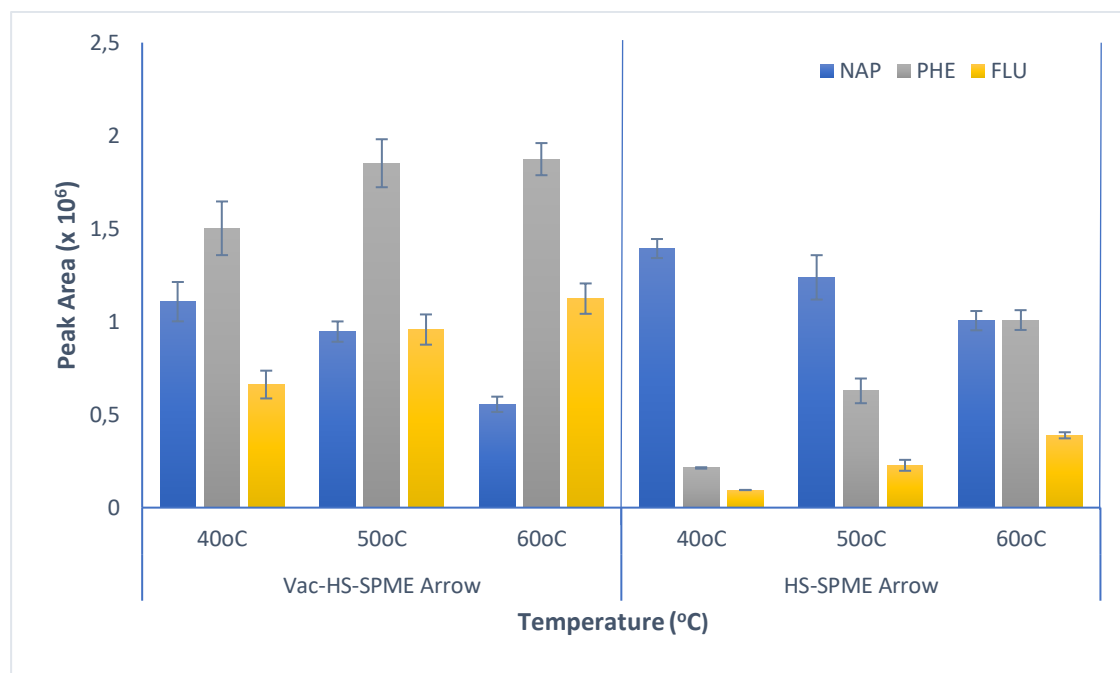
Η θερμοκρασία, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που ερευνάται κατά την υλοποίηση της Vac HS-SPME Arrow. Όπως έχει ήδη αναλυθεί, για ημιπτητικές ουσίες, η θέρμανση του δείγματος κρίνεται απαραίτητη με σκοπό την αποτελεσματική αύξηση των συγκεντρώσεών τους στον υπερκείμενο χώρο και τη μείωση των χρόνων εξισορρόπησης. Ταυτόχρονα όμως, η υπερβολική αύξησή της μπορεί να μειώσει τη συγγένεια των αναλυτών με το ροφητικό υλικό. Για την επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας τόσο σε συνθήκες κενού όσο και κανονικής πίεσης, αξιολογήθηκαν διάφορες θερμοκρασίες δειγματοληψίας κυμαινόμενες από 40 °C έως 60 °C, με το χρόνο δειγματοληψίας (*extraction time*) να ορίζεται στα 15 λεπτά. Τα υδατικά δείγματα εμπλουτίστηκαν με 5 $\mu\text{g/L}$ μίγμα ΠΑΥ, ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση όλων των αναλυτών ακόμη και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες κατά τη δειγματοληψία σε κανονική πίεση. Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όπως αυτά προέκυψαν από την εκτέλεση των εν λόγω πειραμάτων σε θερμοκρασίες 40°C, 50 °C και 60 °C με χρήση της *Vac-HS-SPME Arrow* αλλά και της *HS-SPME Arrow*. Με μια πρώτη ματιά, φαίνεται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης επιτυγχάνονται καλύτεροι ρυθμοί εκχύλισης για όλους σχεδόν τους ΠΑΥ κατά την επικράτηση και των δύο συνθηκών πίεσης.

Ξεκινώντας με την εκχύλιση σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, εφαρμόζοντας στο δείγμα ήπια θέρμανση (40°C), παρατηρείται μεγάλος ρυθμός εκχύλισης για την ένωση Nap ο οποίος οφείλεται στην μεγάλη πτητικότητά της. Η μέτρια προς χαμηλή πτητικότητα του Phe και του Flu είναι υπεύθυνη για την αργή μεταφορά της μάζας τους από το υδατικό δείγμα στον υπερκείμενο χώρο, προκαλώντας πολύ μικρότερους ρυθμούς εκχύλισης από το Nap. Όπως ήταν αναμενόμενο, η θέρμανση του δείγματος στους 50°C και 60°C βελτίωσε τον ρυθμό εκχύλισης του Phe και του Flu, αφού η άνοδος της θερμοκρασίας αυξάνει τους συντελεστές διάχυσης τους με αποτέλεσμα να μεταφέρεται μεγαλύτερη ποσότητα αυτών από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο και τελικά στο υλικό προσρόφησης της ίνας. Αντίθετα, η άνοδος της θερμοκρασίας είχε αρνητική επίδραση στο ρυθμό εκχύλισης του Nap. Σε γενικές γραμμές, το PDMS αποτελεί αδύναμο ροφητή για το Nap και στο παρελθόν έχουν καταγραφεί αποκλίσεις στη συμπεριφορά του με την αύξηση της θερμοκρασίας, καθώς ο αναλύτης απελευθερώνεται εκ νέου στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος.

Στην συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι κατά την επικράτηση συνθηκών μειωμένης πίεσης η επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας στις ενώσεις στόχους ήταν παρόμοια με αυτή κατά την επικράτηση συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης. Όμως, οι ρυθμοί εκχύλισης που καταγράφονται και στις τρεις θερμοκρασίες παρουσία κενού είναι πολύ μεγαλύτεροι σχεδόν για όλες τις ενώσεις στόχους σε σχέση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που πάρθηκαν σε συνθήκες 1atm. Συνεπώς, γίνεται άμεσα αντιληπτή η υψηλότερη ευαισθησία που επιτυγχάνεται κατά την δειγματοληψία σε συνθήκες κενού για όλους σχεδόν τους ΠΑΥ σε κάθε θερμοκρασία εκχύλισης έναντι των συνθηκών ατμοσφαιρικής πίεσης. Επίσης, καλύτεροι ρυθμοί εκχύλισης καταγράφηκαν από αναλύτες που χαρακτηρίζονται με χαμηλή τιμή K_H , και κατά την εφαρμογή ήπιας θέρμανσης. Αναλυτικότερα, σε θερμοκρασία 40°C η απόδοση εκχύλισης για τις ενώσεις Phe και Flu ήταν περίπου 7 φορές μεγαλύτερη υπό κενό σε σχέση με αυτή σε κανονική πίεση, ενώ στους 50°C η βελτίωση της εκχυλιστικής απόδοσης μειώθηκε σε 3 και 4 φορές αντίστοιχα. Όσον αφορά τους 60°C, η απόδοση μειώθηκε περεταίρω σε 2 και 3 φορές αντίστοιχα. Σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο two film, η θετική επίδραση των συνθηκών χαμηλής πίεσης είναι εντονότερη για αναλύτες με τιμή K_H μικρότερη από $1,6 \times 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (όπως είναι ο Phe και ο Flu), καθώς η μείωση της πίεσης κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας μειώνει την αντίσταση της αέριας φάσης αυξάνοντας τους συντελεστές διάχυσης και μεταφοράς μάζας στο αέριο φιλμ και συνεπώς τους συνολικούς συντελεστές μεταφοράς μάζας αυτών των αναλυτών. Με βάση την βιβλιογραφία, η Vac HS-SPME εμφανίζει καλύτερη επίδοση, καταγράφοντας για τις ημιπτητικές ενώσεις καλύτερους ρυθμούς εκχύλισης σε σχέση με συνθήκες 1atm, κατά την εφαρμογή ήπιας θέρμανσης κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Η συνδυαστική θετική επίδραση κενού και υψηλής θερμοκρασίας που αναμένεται με βάση την θεωρία, δεν επιβεβαιώνεται πάντα πειραματικά και αυτό σχετίζεται με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ενώσεων στόχων. [21,27] Έτσι λοιπόν και στα παρούσα πειραματικά αποτελέσματα, η βελτίωση που παρατηρήθηκε στους ρυθμούς εκχύλισης των ΠΑΥ παρουσία συνθηκών κενού συγκριτικά με τις συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης ήταν καλύτερη όταν το κενό συνδυάστηκε με την επιβολή ήπιας θέρμανσης (40°C).

Όσον αφορά την θερμοκρασία δειγματοληψίας, παρατηρήθηκε μικρότερη βελτίωση της απόδοσης εκχύλισης υπό συνθήκες κενού με την αύξηση της, σε σχέση με την βελτίωση που προκάλεσε η αύξηση της σε συνθήκες 1 atm. Το φαινόμενο σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα υγρασίας κατά τη θέρμανση του δείγματος και παρουσιάζεται πιο έντονα όταν χρησιμοποιείται απορροφητικός τύπος ίνας SPME (PDMS). Επιπλέον, η θέρμανση του δείγματος σε υψηλές θερμοκρασίες μειώνει την επίδραση του κενού καθώς η πίεση ατμών των αναλυτών αυξάνεται εκθετικά με τη θερμοκρασία και η θέρμανση του δείγματος θα αυξήσει τη συνολική πίεση στο εσωτερικό του δοχείου δείγματος. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, η αποτελεσματικότητα εκχύλισης του Nap μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας τόσο σε συνθήκες κενού όσο και ατμοσφαιρικής πίεσης, ενώ παράλληλα φαίνεται ότι η επικράτηση συνθηκών μειωμένης πίεσης ήταν αναποτελεσματική για τον συγκεκριμένο αναλύτη. Αυτό συμβαίνει, καθώς το Nap χαρακτηρίζεται από ενδιάμεση τιμή K_H ($4,4 \times 10^{-4} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) με αποτέλεσμα η αντίσταση της υγρής φάσης να κυριαρχεί και η μείωση της πίεσης δειγματοληψίας να μην επηρεάζει τη διαδικασία HSSPME, δεδομένου ότι αυτό το είδος αντίστασης φάσης είναι ανεξάρτητο από τις συνθήκες πίεσης στον υπερκείμενο χώρο. Επιπλέον, έχει γίνει αναφορά στο γεγονός απόκλισης της συμπεριφοράς του Nap στα διάφορα πειράματα, εξαιτίας της μειωμένης συγγένειας του με την ροφητική φάση PDMS.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, ως βέλτιστη θερμοκρασία επιλέχθηκε η ήπια θερμοκρασία των 40°C καθώς σε συνδυασμό με τις συνθήκες μειωμένης πίεσης, κρίθηκε επαρκής έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη ευαισθησία για όλους τους αναλύτες. Το παραπάνω αποτέλεσμα, επιβεβαιώνει ότι η υιοθέτηση της προσέγγισης του κενού μπορεί να εξαλείψει την ανάγκη θέρμανσης του δείγματος, καθώς οι αποδόσεις εκχύλισης που επιτεύχθηκαν υπό κενό και σε ήπια θερμοκρασία δειγματοληψίας (40°C) ήταν 1,5 (Nar) και 2 (Phe και Flu) φορές μεγαλύτερες από εκείνες που επιτεύχθηκαν υπό κανονικές συνθήκες και σε πολύ υψηλότερη θερμοκρασία δείγματος (60°C), επισημαίνοντας έτσι την βιωσιμότητα της αναπτυσσόμενης μεθόδου.



Διάγραμμα 1: Επίδραση της Θερμοκρασίας δειγματοληψίας στην εκχύλιση τριών πρότυπων ΠΑΥ από το νερό χρησιμοποιώντας την τεχνική SPME Arrow σε συνθήκες μειωμένης αλλά και κανονικής πίεσης. Πειραματικές συνθήκες: 5 mL υδατικών δειγμάτων εμπλουτίστηκαν με 5 µg/L μίγμα ΠΑΥ, 15 λεπτά χρόνος δειγματοληψίας, 350 rpm ταχύτητα ανάδευσης. Ορισμένες μπάρες σφάλματος είναι πολύ μικρές για να είναι ορατές σε σύγκριση με το φυσικό μέγεθος του συμβόλου.

3.2 Επίδραση Χρόνου Εκχύλισης

Ο χρόνος εκχύλισης αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό παράγοντα ο οποίος ερευνάται κατά την υλοποίηση της αναπτυσσόμενης μεθόδου. Όπως έχει αποδειχθεί πειραματικά, η εφαρμογή συνθηκών κενού επιταχύνει σημαντικά την κινητική της εκχύλισης των αναλυτών που παρουσιάζουν μεγάλους χρόνους εξισορρόπησης υπό ατμοσφαιρική πίεση, αποδίδοντας υψηλότερες ευαισθησίες σε μικρότερους χρόνους. Για την διερεύνηση της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης, δημιουργήθηκε το προφίλ του χρόνου εκχύλισης για τους τρεις ΠΑΥ σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες δειγματοληψίας (40°C και 60°C). Για τον σκοπό αυτό, μετρήθηκε η απόκριση των ΠΑΥ για κάθε θερμοκρασία ξεχωριστά και για χρόνο δειγματοληψίας 2, 5, 10, 15, 30 και 60 λεπτά.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2, ξεκινώντας με τους 40°C, η εκχύλιση του Nap υπό κενό φτάνει σε συνθήκες ισορροπίας στα 5 πρώτα λεπτά, ενώ σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης απαιτούνται 15 λεπτά εκχύλισης. Το παραπάνω πειραματικό αποτέλεσμα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η εκχύλιση του Nap παρακωλύεται κατά το στάδιο της απορρόφησής του στην ροφητική φάση του SPME Arrow, γεγονός που μέχρι πρότινος δεν είχε παρατηρηθεί κατά την χρήση της ίνας SPME. Πιο συγκεκριμένα, με βάση το προτεινόμενο κριτήριο K_H , κατά την επικράτηση συνθηκών χαμηλής πίεσης δεν αναμενόταν σημαντική βελτίωση στο ρυθμό εκχύλισης του Nap σε σχέση με συνθήκες 1atm, δεδομένου ότι πρόκειται για ένα αναλύτη με ενδιαμέση τιμή K_H , ο οποίος δεν εμφανίζει κάποια αντίσταση από το αέριο φιλμ που υπάρχει πάνω από την επιφάνεια του υδατικού δείγματος κατά το στάδιο της εξάτμισης.

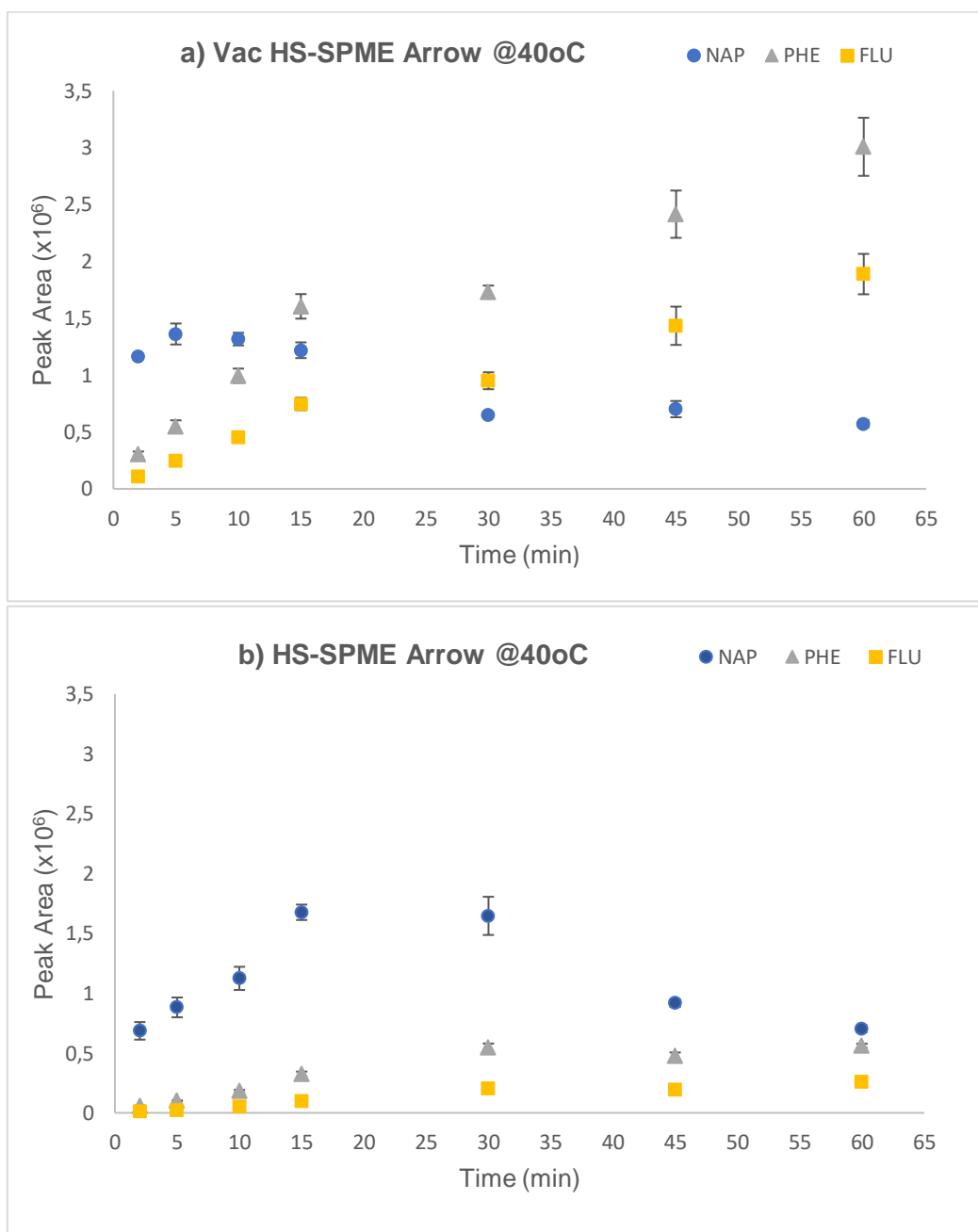
Όμως, η ίνα SPME διαθέτει μικρό όγκο εκχυλιστικής επιφάνειας και στην περίπτωση του Nap, αυτό που είχε παρατηρηθεί ήταν ότι το στάδιο ρόφησης του αναλύτη από την ίνα είναι γρήγορο και δεν αποτελεί εμπόδιο. Εδώ όμως, η θετική επίδραση του κενού για σύντομους χρόνους εκχύλισης, αποδεικνύει ότι ή απορρόφηση από το SPME Arrow ήταν στην πραγματικότητα το περιοριστικό βήμα στην εκχύλιση του Nap. Συνεπώς, η θεωρητική πρόβλεψη ότι η αντίσταση που εμφανίζεται λόγω του στρώματος αέρος αναμενόταν να ελέγχει την πρόσρόφηση του αναλύτη μπορεί να εξαιρεθεί σε μεγάλο βαθμό κατά τη δειγματοληψία υπό κενό, οδηγώντας σε συντομότερους χρόνους εξισορρόπησης. Για μεγάλους χρόνους εκχύλισης, παρατηρείται μείωση της εκχυλιζόμενης ποσότητας του Nap, η οποία όπως προαναφέρθηκε οφείλεται στην αδυναμία ρόφησης του Nap από το PDMS.

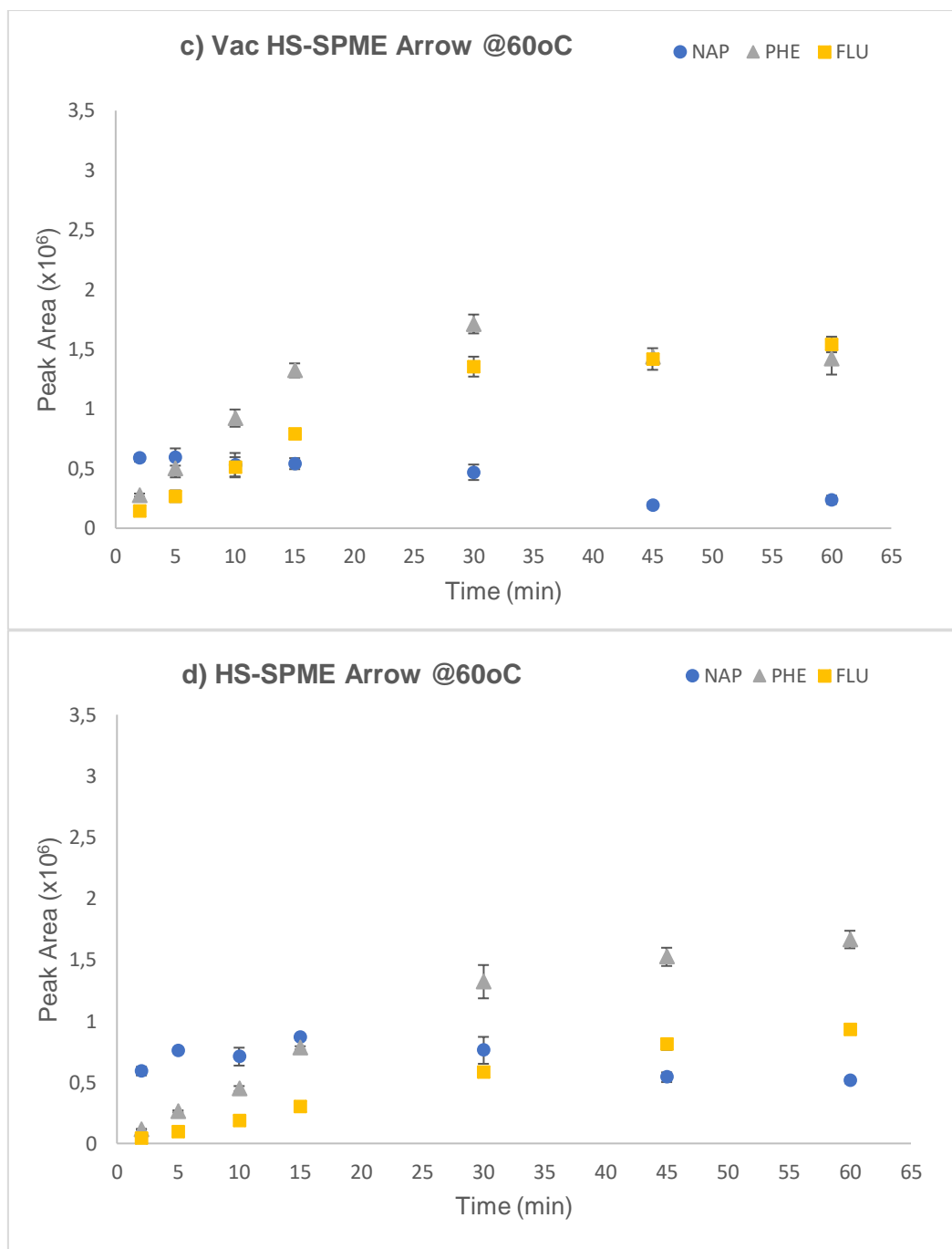
Όσον αφορά τους Phe και Flu, παρατηρείται ότι δεν επιτυγχάνεται ισορροπία στους 40 °C εντός των χρόνων δειγματοληψίας που εξετάστηκαν. Οι μικρές τιμές K_H τους, σε συνδυασμό με τις μεγάλες τιμές K_{OA} , υποδηλώνουν ότι τα στάδια εξάτμισης από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο και πρόσληψης του αναλύτη ήταν αργά, έχοντας ως αποτέλεσμα μεγάλους χρόνους εξισορρόπησης. Παρ' όλα αυτά, η βελτίωση του ρυθμού εκχύλισης του Phe και Flu παραμένει σημαντική κατά την επικράτηση συνθηκών μειωμένης πίεσης ακόμη και στα 60 λεπτά, όπου καταγράφεται περίπου 5 και 7 φορές αύξηση των σημάτων σε σύγκριση με την κανονική πίεση.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε το προφίλ του χρόνου εκχύλισης στους 60°C. Παρατηρώντας το Διάγραμμα 2, επιβεβαιώνεται η εξάρτηση της κινητικής της εκχύλισης SPME από την θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, στους 60°C φαίνεται ότι για το Nap η ισορροπία αποκαθίσταται γρηγορότερα από ότι στους 40°C (2 λεπτά), γεγονός που δείχνει την βελτίωση της κινητικής της εκχύλισης. Όσον αφορά τους Phe και Flu, η ισορροπία φαίνεται να επιτυγχάνεται στα 30 λεπτά δειγματοληψίας υπό κενό, ενώ σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης τα σήματα συνεχίζουν να αυξάνονται μη φθάνοντας σε ισορροπία, γεγονός που υποδηλώνει ταχύτερο ρυθμό μεταφοράς μάζας του αναλύτη στην αέρια φάση. Παρόλα αυτά όμως, συγκρίνοντας τις αποκρίσεις των αναλυτών κατά την Vac HS-SPME Arrow και στις δύο θερμοκρασίες, φαίνεται πως τα εμβαδά κορυφής τους στους 60°C είναι μειωμένα ή σχεδόν ίδια με αυτά που επιτυγχάνονται στους 40°C, κάτι που μπορεί να δηλώνει απώλεια συγγένειας για την φάση εκχύλισης εκτός από ταχύτερο ρυθμό εξάτμισης με την αύξηση της θερμοκρασίας. Όπως αναμενόταν, με την αύξηση της θερμοκρασίας μειώθηκε η θετική επίδραση του κενού στην εκχύλιση των αναλυτών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το εμβαδό κορυφής για τον μεγαλύτερο χρόνο δειγματοληψίας της κανονικής εκχύλισης (60 λεπτά) στους 60°C είναι αρκετά κοντά στο εμβαδό κορυφής που επιτυγχάνεται με μόλις 15 λεπτά δειγματοληψίας με την εκχύλιση υπό κενό στους 40°C, διαπίστωση που υποτετραπλασιάζει τον χρόνο εκχύλισης και τετραπλασιάζει τον αριθμό των αναλύσεων κατά την διάρκεια της ημέρας.

Αποσκοπώντας όμως, στην μεγιστοποίηση της εκχυλιζόμενης ποσότητας των αναλυτών, βρέθηκε ότι για τον ίδιο χρόνο εκχύλισης (15 λεπτά), στους 40°C η Vac HS-SPME παρέχει 1,5 , 2 και 2,5 φορές καλύτερη ευαισθησία από την κανονική εκχύλιση στους 60°C των Nap , Phe και Flu αντίστοιχα. Συνεπώς, ενώ για την συμβατική διαδικασία HS-SPME Arrow οι βέλτιστες συνθήκες βρέθηκαν στους 60°C και 15 λεπτά εκχύλισης, τα αποτελέσματα των πειραμάτων βελτιστοποίησης για την Vac SPME Arrow οδήγησαν στην επιλογή της θερμοκρασίας των 40°C και χρόνου δειγματοληψίας των 15 λεπτών ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης για όλους τους αναλυόμενους ΠΑΥ.





Διάγραμμα 2: Προφίλ Χρόνου εκχύλισης για τους τρεις ΠΑΥ στους 40°C a) υπό κενό και b) συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και στους 60°C c) υπό κενό και d) συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Πειραματικές συνθήκες: 5 mL υδατικών δειγμάτων εμπλουτίστηκαν με 5 μg/L μίγμα ΠΑΥ, 350 rpm ταχύτητα ανάδευσης. Ορισμένες μπάρες σφάλματος είναι πολύ μικρές για να είναι ορατές σε σύγκριση με το φυσικό μέγεθος του συμβόλου.

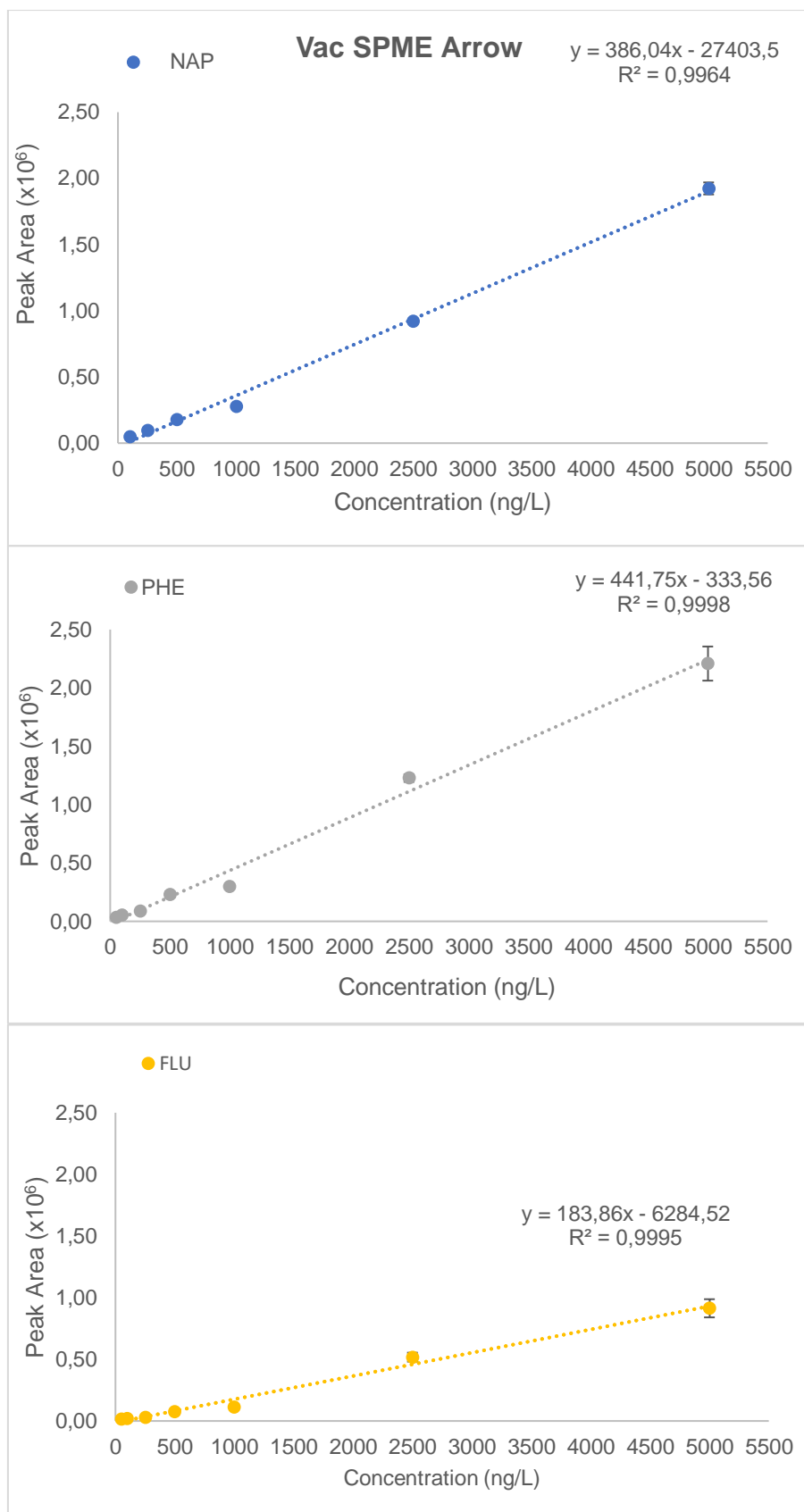
3.3 Αξιολόγηση των βελτιστοποιημένων διαδικασιών Vac SPME Arrow και HS-SPME Arrow

Η αξιολόγηση των δυο μεθόδων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ποικίλα αναλυτικά μεγέθη τα οποία παρέχουν ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με την απόδοση της κάθε μεθόδου, όπως το γραμμικό εύρος (Linear range), το όριο ανίχνευσης της κάθε ουσίας (LOD), τους συντελεστές προσδιορισμού τους (R^2), αλλά και την επαναληψιμότητα η οποία εκφράστηκε ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD). Τα πειράματα εκτελέστηκαν στις βέλτιστες συνθήκες, όπως αυτές βρέθηκαν παραπάνω για κάθε μέθοδο. Αναλυτικότερα, για την Vac-SPME Arrow η θερμοκρασία εκχύλισης ορίστηκε στους 40°C και ο χρόνος εκχύλισης στα 15 λεπτά, ενώ για την HS-SPME Arrow η θερμοκρασία εκχύλισης ορίστηκε στους 60°C και ο χρόνος εκχύλισης στα 15 λεπτά. Και για τις δυο μεθόδους χρησιμοποιήθηκαν 5 mL υδατικών δειγμάτων και η ταχύτητα ανάδευσης ήταν 350 rpm. Στον Πίνακα 7 παρατίθενται τα επιλεγμένα μεγέθη για κάθε συνθήκη πίεσης.

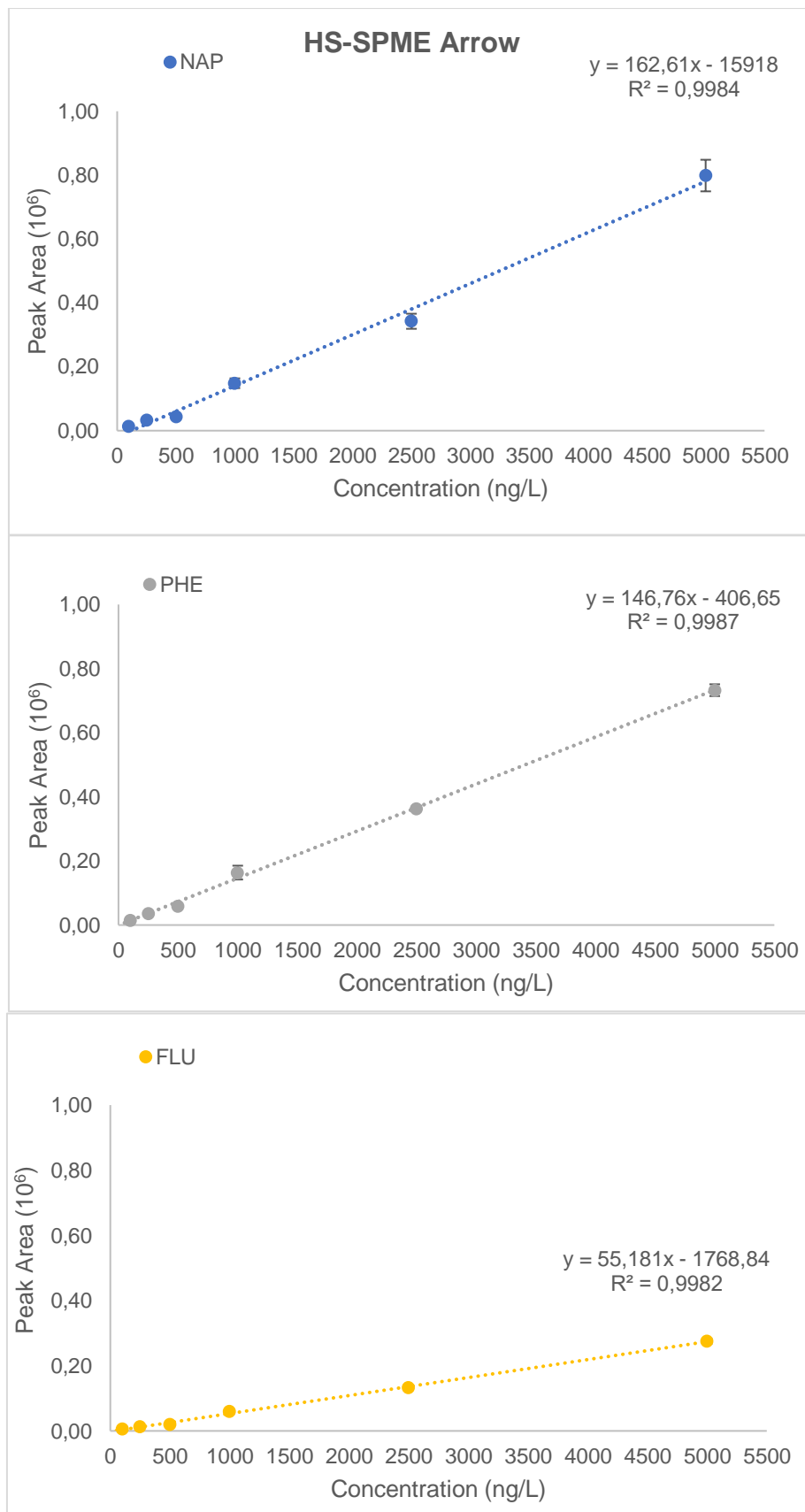
Πίνακας 7: Αναλυτικά μεγέθη αξιολόγησης των Vac SPME Arrow (40°C, 15 min) και HS-SPME Arrow (60°C, 15min)

Analyte	Vac-SPME Arrow				HS-SPME Arrow			
	Linear Range	R^2	LOD (ng/L)	RSD (%)	Linear Range	R^2	LOD (ng/L)	RSD (%)
Nap	100-5000	0,9964	99	6,65	100-5000	0,9984	94	8,05
Phe	50-5000	0,9998	28	8,24	100-5000	0,9987	70	6,53
Flu	50-5000	0,9995	43	2,88	100-5000	0,9982	60	5,9

Για την εύρεση του γραμμικού εύρους της κάθε μεθόδου πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσες υδατικών δειγμάτων εμπλουτισμένα με ΠΑΥ σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 50 ng/L μέχρι και 5000 ng/L. Η καμπύλη για την Vac SPME Arrow δείχνει καλή γραμμικότητα σε όλο το εύρος των δοκιμαζόμενων συγκεντρώσεων για όλους σχεδόν τους ΠΑΥ με τους συντελεστές προσδιορισμού να διαμορφώνονται μεταξύ 0,9964 και 0,9998 (Διάγραμμα 3). Αντίθετα, η καμπύλη για την HS-SPME Arrow παρουσιάζει καλή γραμμικότητα μόνο για το εύρος 100-5000 ng/L με συντελεστές προσδιορισμού μεταξύ 0,9982 και 0,9987 (Διάγραμμα 4). Συνεπώς, η Vac SPME Arrow απέδωσε ευρύτερα γραμμικά εύρη για τους Phe και Flu σε σύγκριση με την HS-SPME Arrow, ενώ για το Nap το γραμμικό εύρος ήταν το ίδιο και για τις δύο μεθόδους.



Διάγραμμα 3: Καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε ΠΑΥ με χρήση Vac SPME Arrow



Διάγραμμα 4: Καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε ΠΑΥ με χρήση HS-SPME Arrow

Το LOD αποτελεί ουσιαστικά την μικρότερη ποσότητα κάθε αναλύτη η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με κάθε μέθοδο, και υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη το λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N) ίσο με 3,3. Όσον αφορά την Vac SPME Arrow, το LOD βρέθηκε 99 ng/L για το Nap, 28 ng/L για το Phe και 43 ng/L για το Flu ενώ για την HS-SPME Arrow βρέθηκε 94 , 70 και 60 ng/L αντίστοιχα. Όπως γίνεται αντιληπτό, χαμηλότερα όρια ανίχνευσης βρέθηκαν με την χρήση της Vac SPME Arrow. Η βελτίωση των LOD φαίνεται να είναι εντονότερη για τους Phe και Flu καθώς σε αντίθεση με το Nap, οι εν λόγω αναλύτες εκχυλίστηκαν σε συνθήκες προ-ισορροπίας, αποδεικνύοντας έτσι την σημασία των συνθηκών κενού ως παράμετρο για την αύξηση της ευαισθησίας.

Για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας των μεθόδων, εκτελέστηκαν 5 διαδοχικές εκχυλίσσεις σε συγκέντρωση 1000 ng/L στις βέλτιστες συνθήκες κάθε μεθόδου. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Οι χαμηλότερες τιμές RSD που προέκυψαν για την πλειοψηφία των ενώσεων, με την χρήση της Vac SPME Arrow, συνάδουν με προηγούμενες μελέτες οι οποίες ανέφεραν καλύτερη επαναληψιμότητα υπό συνθήκες κενού.[25]

3.4 Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα νερού

Με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης της μήτρας στην εκχύλιση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες κενού διαδοχικές αναλύσεις δειγμάτων νερού βρύσης (tap water), νερού από ποτάμι (river water) , αλλά και νερού βροχής (rain water) τα οποία εμπλουτίστηκαν με 1000 ng/L μίγμα ΠΑΥ. Τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα εμπλουτισμένα δείγματα υπερκάθαρου νερού που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα προηγούμενα στάδια της έρευνας και υπολογίστηκε η σχετική ανάκτηση κάθε αναλύτη (RR%) (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Σχετική Ανάκτηση ενώσεων στόχων από νερό βρύσης, ποταμιού και βροχής

	TAP WATER		RIVER WATER		RAIN WATER	
	RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)	RR (%)	RSD (%)
NAP	97,3	3,78	82,6	8,45	93,2	7,83
PHE	89,3	5,38	98,6	8,92	96,7	6,95
FLU	106,4	5,88	117,3	9,93	114,0	4,33

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, οι σχετικές ανακτήσεις υποδηλώνουν μια πολύ μικρή επίδραση της μήτρας στην εκχύλιση (βρίσκονται πολύ κοντά στο 100%) η οποία όμως λαμβάνοντας υπόψιν και τις σχετικές τυπικές αποκλίσεις που προέκυψαν είναι σχεδόν αμελητέα. Επίσης, τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες που χρησιμοποιούν δειγματοληψία υπό κενό [27,32].

3.5 Συμπεράσματα

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως σκοπό τον προσδιορισμό πρότυπων ενώσεων ΠΑΥ σε υδατικά δείγματα με την χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης Vac-HS-SPME Arrow. Η συγκεκριμένη προσέγγιση βελτιστοποιήθηκε μελετώντας την επίδραση του χρόνου και θερμοκρασίας εκχύλισης και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Η Vac-HS-SPME Arrow αποδείχθηκε μια γρήγορη και ενεργειακά προτιμητέα τεχνική για την προετοιμασία και απομόνωση ενώσεων ΠΑΥ, παρουσιάζοντας υψηλή ευαισθησία κατά την εφαρμογή ήπιας θερμοκρασίας. Γρηγορότεροι ρυθμοί εκχύλισης καταγράφηκαν παρουσία κενού σε σχέση με την παρουσία 1atm. Επιπλέον το κενό ευνόησε σημαντικά την εκχύλιση των λιγότερο ημιπτητικών ΠΑΥ, ενώ τέλος σημαντικά επιτεύγματα προέκυψαν αναφορικά με την εκχύλιση των ενώσεων ΠΑΥ υψηλής πτητικότητας. Πιο συγκεκριμένα, ο αναλύτης Nap παρουσίασε γρηγορότερο ρυθμός εκχύλισης παρουσία κενού έναντι 1atm, γεγονός που μέχρι πρότινος δεν είχε παρατηρηθεί πειραματικά με την χρήση SPME ίνας, ούτε αναμενόταν με βάση το προτεινόμενο θεωρητικό μοντέλο two film. Η παρουσία συνθηκών χαμηλής πίεσης φάνηκε να συντελεί στον υπερκερασμό της αντίστασης που εμφανίζει το αέριο φιλμ μεταξύ υπερκείμενου χώρου και ροφητικής φάσης και το γεγονός αυτό πιθανότατα κατέστη εφικτό να παρατηρηθεί κατά τη χρήση SPME Arrow και όχι ίνας SPME, λόγω της μεγαλύτερης ροφητικής επιφάνειας που διαθέτει. Ως βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης των ενώσεων Nap, Phe, Flu αποδείχθηκαν τα 15min κατά την εφαρμογή ήπιας θερμοκρασίας των 40°C. Η βελτιστοποιημένη μέθοδος Vac SPME Arrow απέδωσε ευρύτερη γραμμικότητα, χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, καλύτερη επαναληψιμότητα και μεγαλύτερη ευαισθησία για τους αναλύτες από ότι η HS-SPME Arrow. Τέλος, η μέθοδος Vac-SPME Arrow που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα νερού, τα οποία συγκρίθηκαν με τα δείγματα υπερκάθαρου νερού, αποκαλύπτοντας ελάχιστη επίδραση της μήτρας στις εκχυλίσσεις. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η χρήση SPME τύπου Arrow αποτελεί μια πιο οικονομική προσέγγιση και αυτό οφείλεται στην μεγάλη ανθεκτικότητα που εμφανίζει το Arrow. Η συγκεκριμένη εργασία περιλάμβανε την πραγματοποίηση ενός μεγάλου αριθμού αναλύσεων, όλες εκ των οποίων πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία χωρίς να παρατηρηθεί μείωση στην απόδοσης του SPME Arrow.

Συμπερασματικά, η εφαρμογή συνθηκών κενού είναι μια βιώσιμη και εύκολα εφαρμόσιμη πρακτική για την εκχύλιση ημιπτητικών ενώσεων σε ήπιες συνθήκες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σημαντική αύξηση της ευαισθησίας, μπορεί να εφαρμοστεί όχι μόνο στους ΠΑΥ, αλλά να επεκταθεί και σε πτητικές ενώσεις αλλά και άλλες μήτρες, δεδομένου ότι παρέχει βελτιωμένα αποτελέσματα σε ήπιες συνθήκες και μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση ενώσεων που δεν υπάρχουν σε κανονική ατμοσφαιρική πίεση. Τελικά, τα πλεονεκτήματα, οι επιδόσεις και τα χαρακτηριστικά της προσέγγισης Vac SPME Arrow θα την καθιερώσουν ως ένα πολύτιμο εργαλείο σε μελλοντικές εφαρμογές που σχετίζονται με τα τρόφιμα, τη γεύση, περιβαλλοντικές και βιολογικές αναλύσεις.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, Egypt. J. Pet. 25 (2016) 107–123.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- [2] Y. Guo, K. Wu, X. Huo, X. Xu, Sources, distribution, and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons, J. Environ. Health. 73 (2011) 22–25.
- [3] J. Yan, L. Wang, P.P. Fu, H. Yu, Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list, Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 557 (2004) 99–108.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.10.004>.
- [4] M. Akyüz, H. Çabuk, Gas-particle partitioning and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Zonguldak, Turkey, Sci. Total Environ. 408 (2010) 5550–5558.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.063>.
- [5] Αντωνία Μουσουράκη, Διερεύνηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού.. “Vac--HSSPME,” Πολυτεχνείο Κρήτης, 2012.
- [6] A. Mojiri, J.L. Zhou, A. Ohashi, N. Ozaki, T. Kindaichi, Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments, Sci. Total Environ. 696 (2019) 133971.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>.
- [7] K. Srogi, Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review, Environ. Chem. Lett. 5 (2007) 169–195.
<https://doi.org/10.1007/s10311-007-0095-0>.
- [8] K. Ravindra, R. Sokhi, R. Van Grieken, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation, Atmos. Environ. 42 (2008) 2895–2921.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>.
- [9] A.R. Johnsen, U. Karlson, Diffuse PAH contamination of surface soils: Environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation, Appl. Microbiol. Biotechnol. 76 (2007) 533–543. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1045-2>.
- [10] K. Miura, K. Shimada, T. Sugiyama, K. Sato, A. Takami, C.K. Chan, I.S. Kim, Y.P. Kim, N.H. Lin, S. Hatakeyama, Seasonal and annual changes in PAH concentrations in a remote site in the Pacific Ocean, Sci. Rep. 9 (2019) 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47409-9>.
- [11] Μ. Βακιντή, Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό συνθήκες κενού για προσδιορισμό αλογονοανισολών σε δείγματα κρασιού., Πολυτεχνείο Κρήτης, 2019.
- [12] J. Moreda-Piñeiro, A. Moreda-Piñeiro, Recent Advances in the Combination of Assisted Extraction Techniques, Compr. Anal. Chem. 76 (2017) 519–573.
<https://doi.org/10.1016/bs.coac.2016.12.002>.
- [13] H. Lord, J. Pawliszyn, Evolution of solid-phase microextraction technology, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00535-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00535-5).

- [14] S. Cheng, Development of a Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) Procedure for the Determination of Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) in Activated Sludge by GC-FID, (2009) 1–58.
- [15] K. Schmidt, I. Podmore, Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer, *J. Biomarkers*. 2015 (2015) 1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/981458>.
- [16] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Headspace Solid-Phase Microextraction, (1993) 1843–1852.
- [17] C. Ross, J. Pawliszyn, Extraction - Solid-Phase Microextraction, *Encycl. Anal. Sci.* Second Ed. (2004) 608–616. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00687-7>.
- [18] E. Yiantzi, K. Murtada, K. Terzidis, J. Pawliszyn, E. Psillakis, Vacuum-assisted headspace thin-film microextraction: Theoretical formulation and method optimization for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples, *Anal. Chim. Acta*. 1189 (2022) 339217. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339217>.
- [19] S. Risticvic, H. Lord, T. Górecki, C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Protocol for solid-phase microextraction method development, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 122–139. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.179>.
- [20] E. Psillakis, E. Yiantzi, L. Sanchez-Prado, N. Kalogerakis, Vacuum-assisted headspace solid phase microextraction: Improved extraction of semivolatiles by non-equilibrium headspace sampling under reduced pressure conditions, *Anal. Chim. Acta*. 742 (2012) 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.01.019>.
- [21] E. Psillakis, A. Mousouraki, E. Yiantzi, N. Kalogerakis, Effect of Henry's law constant and operating parameters on vacuum-assisted headspace solid phase microextraction, *J. Chromatogr. A*. 1244 (2012) 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.006>.
- [22] E. Psillakis, Vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction: A tutorial review, *Anal. Chim. Acta*. 986 (2017) 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.06.033>.
- [23] M. Sýkora, E. Vítová, H.H. Jeleń, Application of vacuum solid-phase microextraction for the analysis of semi-hard cheese volatiles, *Eur. Food Res. Technol.* 246 (2020) 573–580. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03426-x>.
- [24] S. Mascrez, E. Psillakis, G. Purcaro, A multifaceted investigation on the effect of vacuum on the headspace solid-phase microextraction of extra-virgin olive oil, *Anal. Chim. Acta*. 1103 (2020) 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.12.053>.
- [25] E. Psillakis, The effect of vacuum: an emerging experimental parameter to consider during headspace microextraction sampling, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 5989–5997. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02738-x>.
- [26] A. Zhakupbekova, N. Baimatova, B. Kenessov, A critical review of vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction for environmental analysis, *Trends Environ. Anal. Chem.* 22 (2019) e00065. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00065>.
- [27] N. Solomou, C. Bicchi, B. Sgorbini, E. Psillakis, Vacuum-assisted headspace

- sorptive extraction: Theoretical considerations and proof-of-concept extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples, *Anal. Chim. Acta.* 1096 (2020) 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.050>.
- [28] E. Psillakis, N. Koutela, A.J. Colussi, Vacuum-assisted headspace single-drop microextraction: Eliminating interfacial gas-phase limitations, *Anal. Chim. Acta.* 1092 (2019) 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.056>.
- [29] M.L. Glykioti, E. Yiantzi, E. Psillakis, Room temperature determination of earthy-musty odor compounds in water using vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction, *Anal. Methods.* 8 (2016) 8065–8071. <https://doi.org/10.1039/c6ay02210c>.
- [30] M.J. Trujillo-Rodríguez, V. Pino, E. Psillakis, J.L. Anderson, J.H. Ayala, E. Yiantzi, A.M. Afonso, Vacuum-assisted headspace-solid phase microextraction for determining volatile free fatty acids and phenols. Investigations on the effect of pressure on competitive adsorption phenomena in a multicomponent system, *Anal. Chim. Acta.* 962 (2017) 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.056>.
- [31] E. Yiantzi, N. Kalogerakis, E. Psillakis, Design and testing of a new sampler for simplified vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction, *Anal. Chim. Acta.* 927 (2016) 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.001>.
- [32] E. Psillakis, E. Yiantzi, N. Kalogerakis, Downsizing vacuum-assisted headspace solid phase microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1300 (2013) 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.009>.
- [33] W. Kaziur, A. Salemi, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, Automated determination of picogram-per-liter level of water taste and odor compounds using solid-phase microextraction arrow coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 2653–2662. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01711-7>.
- [34] A. Kremser, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, PAL SPME Arrow - Evaluation of a novel solid-phase microextraction device for freely dissolved PAHs in water, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 943–952. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9187-z>.
- [35] W. Kaziur-Cegla, A. Salemi, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, Optimization and validation of automated solid-phase microextraction arrow technique for determination of phosphorus flame retardants in water, *J. Chromatogr. A.* 1626 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461349>.