



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Προσδιορισμός PFOS με χρήση υγρής
μικροεκχύλισης συζευγμένης με LC/MS

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ



Εξεταστική Επιτροπή

Ψυλλάκη Ελευθερία (Επιβλέπουσα)

Γκέκας Βασίλειος

Διαμαντόπουλος Ευάγγελος

Χανιά

13/10/2008

Ευχαριστίες

Θα ήθελα πρώτη να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ.Ψυλλάκη Ελευθερία για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της διπλωματικής εργασίας.

Ύστερα θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη συνεχή βοήθεια και τις συμβουλές τους τη Δρ. Τυροβολά Κωνσταντίνα και τον Ivan P. Roman Falco που συντέλεσαν για να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές κ.Γκέκα και κ. Διαμαντόπουλο που με τη σειρά τους συντελούν στην ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Περιεχόμενα

Θεωρητικό μέρος

1. Περίληψη
2. Εισαγωγή
 - 2.1 Υπερφθοριωμένες Ενώσεις (Perfluorinated Compounds : PFCs)
 - 2.1.1 Ιδιότητες Ένωσης PFOS
 - 2.1.2 Χρήσεις Ένωσης PFOS
 - 2.1.3 Πηγές Ένωσης PFOS
3. Τοξικότητα
4. Περιβαλλοντικό Πρόβλημα
 - 4.1 Παρουσία ένωσης PFOS σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων
 - 4.2 Παρουσία ένωσης PFOS σε ζωντανούς οργανισμούς
 - 4.3 Τρόποι Μεταφοράς PFOS σε απομακρυσμένες περιοχές
 - 4.4 Παρουσία PFOS σε ανοιχτές θάλασσες
 - 4.5 Παρουσία PFOS στην ατμόσφαιρα
 - 4.6 Επιδράσεις στην Ανθρώπινη Υγεία
5. Προβλήματα Ανάλυσης Ένωσης PFOS
6. Τρόποι Ανάλυσης
 - 6.1 Υγρή – Υγρή Εκχύλιση (liquid-liquid extraction , LLE)
 - 6.2 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid-phase microextraction - SPME)
 - 6.3 Πλεονεκτήματα μεθόδου Υγρής – Υγρής εκχύλισης έναντι Εκχύλισης Στερεής Φάσης
 - 6.4 Μέθοδος Έγχυσης Μεγάλου Όγκου (Large - Volume Injection)
7. Μικρό-εκχύλιση (microextraction)
 - 7.1 Προτεινόμενη μέθοδος Μικρό-εκχύλισης
 - 7.2 Θεωρητικό Υπόβαθρο μικρό-εκχύλισης
 - 7.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)
8. Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry)
 - 8.1 Διαδικασία Ιονισμού
 - 8.2 Electrospray Ionization
 - 8.3 Τετράπολο (Quadrupole)
9. Πειραματικό Μέρος
 - 9.1 Αντιδραστήρια
 - 9.2 Όργανα – Συσκευές
 - 9.3 Χαρακτηριστικά Υδατικών Περιβαλλοντικών Δειγμάτων
 - 9.4 Πειραματική Προετοιμασία Δειγμάτων
 - 9.5 Οργανολογία
10. Αποτελέσματα – Συζήτηση
 - 10.1 Βελτιστοποίηση LC/MS (Δυναμικού)
 - 10.2 Βελτιστοποίηση Διασύνδεσης και Παραμέτρων Ανίχνευσης MS
 - 10.3 Βελτιστοποίηση Μεθόδου: Παράμετροι που επηρεάζουν τη μέθοδο υγρής μικρό-εκχύλισης
 - 10.3.1 Επιλογή οργανικού διαλύτη
 - 10.3.2 Επίδραση του pH
 - 10.3.3 Προσθήκη Άλατος

- 10.3.4 Επιλογή Όγκου Διαλύτη
 - 10.3.5 Επιλογή Όγκου Υδατικού Διαλύματος
 - 10.3.6 Επιλογή Χρόνου Ανάδευσης
 - 10.3.7 Επιλογή Ταχύτητας Ανάδευσης
 - 11. Απόδοση της Μεθόδου (Method Performance)
 - 11.1 Γραμμικότητα (Linearity)
 - 11.2 Επαναληψιμότητα Μεθόδου (Repeatability)
 - 12. Εφαρμογή Βέλτιστων Συνθηκών σε Περιβαλλοντικά Δείγματα
 - 13. Συμπεράσματα
 - 14. Μελλοντικές Κατευθύνσεις
- Βιβλιογραφία

1.Περίληψη

Η συγκεκριμένη έρευνα ασχολείται με μια ομάδα ανθρωπογενών οργανικών ενώσεων γνωστή ως Υπερφθοριωμένες Ενώσεις (Perfluorinated Compounds - PFCs), που περιέχουν άτομα άνθρακα φθορίου αλλά και και πιο συγκεκριμένα με το το υπερφθορο-οκτανοϊκό οξύ (Perfluorooctanoic acid - PFOA) και το υπερφθοροοκτανοσουλφονικό οξύ (Perfluorooctane Sulfonate – PFOS) τα οποία και βρίσκονται συχνότερα αλλά και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο περιβάλλον.

Κατασκευάζονται για παραπάνω από 50 χρόνια καθώς διαθέτουν ιδιότητες που τις καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμες για πολλές εφαρμογές στον εμπορικό τομέα. Οι ιδιότητες αυτές αφορούν τη μοναδική απωθητικότητα των ενώσεων τόσο για το νερό (υδρόφοβες) όσο και για τα λίπη (λιπόφοβες) γεγονός που τις καθιστά χρήσιμες στην προστασία επιφανειών, στην αποφυγή λεκέδων, στη δημιουργία αδιάβροχων υφασμάτων, σε υλικά συσκευασίας τροφίμων αλλά και ως χημικά στον πυροσβεστικό αφρό.

Ανησυχία όμως έχει προκαλέσει τα τελευταία χρόνια η μεγάλη ανθεκτικότητα της ένωσης PFOS στη βιοδιάσπαση, στη χημική διάσπαση αλλά και στο μεταβολισμό υπό συνθήκες περιβάλλοντος. Τα παραπάνω έχουν ως αποτέλεσμα την έντονη βιοσυσσωρευτικότητα τους και το αυξανόμενο βιομεγεθυντικό δυναμικό τους. Έτσι συγκεντρώσεις της ένωσης εντοπίζονται στο περιβάλλον δηλαδή στον αέρα, το νερό, τα ιζήματα και τη λάσπη κατεργασμένων αποβλήτων και όχι μόνο κοντά σε περιοχές με έντονη βιομηχανική ανάπτυξη αλλά και σε πολύ απομακρυσμένες όπως περιοχές των πόλων. Επίσης εντοπίζονται τόσο στον οργανισμό των ζώων αλλά και στο αίμα και σε ζωτικά όργανα των ανθρώπων όπως το συκώτι με αποδεδειγμένες τοξικές επιπτώσεις στο ήπαρ και τον ορό του αίματος.

Δημιουργήθηκε έτσι η ανάγκη εύρεσης μιας αναλυτικής μεθόδου με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, με γρήγορη επίτευξη της ισορροπίας και μικρό χρόνο αναμονής για την ανάλυση. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε με χρήση μιας νέας και πολλά υποσχόμενης τεχνικής στον τομέα της προετοιμασίας των δειγμάτων, της

υγρής μικρό-εκχύλισης του διαλύτη με σκοπό την ανάλυση της ένωσης PFOS σε περιβαλλοντικά δείγματα. Χρησιμοποιήθηκε για το σκοπό αυτό Υγρή Χρωματογραφία/Φασματομετρία Μάζας (Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry – LC/MS) , μια αναλυτική τεχνική με μεγάλο εύρος εφαρμογών όπως περιβαλλοντικές αναλύσεις.

2. Εισαγωγή

2.1 Υπερφθοριωμένες Ενώσεις (Perfluorinated Compounds : PFCs)

Η παγκόσμια προσοχή αυξάνεται ολοένα και επικεντρώνεται πάνω σε μία ομάδα ανθρωπογενών οργανικών ενώσεων γνωστές ως Υπερφθοριωμένες Ενώσεις ή αλλιώς Perfluorinated Compounds (**PFCs**). Οι πιο γνωστές ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι το υπερφθορο-οκτανοϊκό οξύ (Perfluorooctanoic acid - PFOA) και το υπερφθοροοκτανοσουλφονικό οξύ (Perfluorooctane Sulfonate – PFOS) καθώς αυτές βρίσκονται συνήθως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Γενικά οι φθοριωμένες οργανικές ενώσεις αποτελούν ξεχωριστή ομάδα χημικών ενώσεων που περιέχουν άτομα άνθρακα αλλά και φθορίου. Χαρακτηρίζονται από μία υδρόφοβη αλκυλική αλυσίδα με αρκετά μεγάλο εύρος μήκους, συνήθως από 4 έως και 16 άτομα άνθρακα όπου περιέχονται άτομα φθορίου (Υδρόφοβη ουρά : $F(CF_2)_n-R$), η οποία είναι συνήθως συνδεδεμένη με υδρόφιλη κεφαλή[2] . Το φθόριο -ένα από τα πέντε αλογόνα του περιοδικού συστήματος- διαθέτει τη μεγαλύτερη δύναμη επαγωγικής ήλεκτρο- απωθητικότητας εξαιτίας της μεγάλης ηλεκτραρνητικότητας του [12].

2.1.1 Ιδιότητες Ενώσεων PFCs - PFOS

Μόλις το άτομο άνθρακα ενωθεί με το φθόριο η ένωση PFOS καθίσταται σχεδόν ακατάλυτη αφού το μόριο γίνεται ιδιαίτερα ανθεκτικό (στην πραγματικότητα ο δεσμός μεταξύ άνθρακα και φθορίου (C-F) αποτελεί τον πιο ισχυρό δεσμό που είναι γνωστός στην οργανική χημεία [12]) και έτσι σχηματίζεται πολύ ισχυρός ομοιοπολικός δεσμός. Με τον τρόπο αυτό εξηγείται η υψηλή σταθερότητα της ένωσης PFOS, εξαιτίας της θερμικής και χημικής αδράνειας της, αλλά και η υψηλή πολικότητα της [5]. Ακόμη οι μακρομοριακές ενώσεις PFCs διαθέτουν χαμηλή διαλυτότητα σε πολικούς και μη, διαλύτες καθώς και υψηλή πυκνότητα αλλά και συμπιεστότητα σε σύγκριση με τους ισοδύναμους υδρογονάνθρακες.

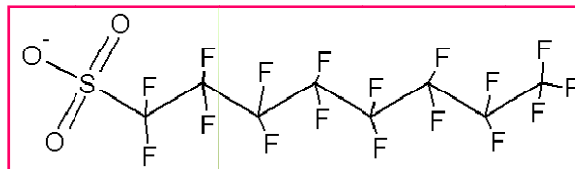
Μάλιστα οι περισσότερες ενώσεις είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές και παρουσιάζουν πολύ μεγάλες αντοχές στην υδρόλυση, στη φωτόλυση, στη βίο-διάσπαση, τη μικροβιολογική αλλά και χημική διάσπαση και στο μεταβολισμό υπό συνθήκες περιβάλλοντος. Παρουσιάζουν σταθερότητα ακόμη στη θερμότητα, στα οξέα, στις βάσεις και στην αναγωγή ή οξειδωση από άλλους συντελεστές. Είναι επίσης εξαιρετικά ανθεκτικές σε χημικές επιθέσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκεί που συμβατικές επιφανειοδραστικές ουσίες δε θα επιβίωναν.

Οι ενώσεις PFCs μειώνουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις πολύ αποτελεσματικότερα την επιφανειακή τάση από άλλες ουσίες και επιτυγχάνουν μοναδικό καταμερισμό και προσροφητική συμπεριφορά. Δρουν ως καταλύτες στον ολιγομερισμό και στον πολυμερισμό σε περιπτώσεις όπου άλλες ενώσεις θα είχαν διασπαστεί (υψηλές θερμοκρασίες, πολύ όξινες συνθήκες κτλ) [1].

Σε υδατικά συστήματα η υδρόφοβη ουρά, συνδυασμένη με την έλξη της υδρόφιλης κεφαλής, προς το νερό δίνει αφορμή στην ανάπτυξη των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων των ενώσεων αυτών. Είναι γνωστό ότι οι ενώσεις αυτές κινούνται στη διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ αέρα και νερού και έτσι μειώνουν την επιφανειακή τάση των υδατικών διαλυμάτων δραματικά [10]. Οι αμφιφιλικές ενώσεις έχουν την εγγενή δυνατότητα να σχηματίζουν

μεμβράνες και να διαχωρίζονται στην κοινή επιφάνεια ανάλογα με την προτίμηση τους στο νερό.

Η ανιονική δομή της ένωσης PFOS (με μικρή τάση διαφυγής μέσω πτητικοποίησης) φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 1: Ανιονική Δομή ένωσης PFOS [30]

2.1.2 Χρήσεις Ένωσης PFOS

Οι ενώσεις PFCs κατασκευάζονται για περισσότερο από 50 χρόνια είτε συνθετικά είτε μέσω της διάσπασης του μεταβολισμού άλλων φθοριωμένων χημικών ενώσεων. Μόλις απορροφηθούν από το υπόστρωμα, παρατηρείται ότι οι ενώσεις PFCs διαθέτουν μοναδική απωθητικότητα τόσο ενάντια στο νερό (υδρόφοβες) όσο και στο λάδι αλλά και στα λίπη (λιπόφοβες) γεγονός που τις καθιστά ιδανικές για ορισμένες εμπορικές χρήσεις, κυρίως αυτές που απαιτούν προστατευτικές ιδιότητες επιφανειών όπως για παράδειγμα η αποφυγή και δημιουργία λεκέδων.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ως προστατευτικά επιφανειών όπως χαρτί ή χαρτόνι, συσκευασίες τροφίμων, υλικά κατασκευής κιβωτίων για τρόφιμα, δέρμα, χαλιά (ή υλικό για χαλιά και μοκέτες), υλικά για ταπετσαρία, υλικά για κατασκευές και υφάσματα, καλυπτικά υφασμάτων, υφάσματα για παλτό αλλά και για αδιάβροχα μπουφάν καθώς και σε πολλές άλλες εφαρμογές όπως βαφές ή λιπαντικά, ακόμα και σε εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα και ζιζανιοκτόνα. Επίσης βρίσκονται σε καλλυντικά, λακ (σπρέι μαλλιών), βερνίκια νυχιών και όχι μόνο, αρωματικά αποσμητικά χώρων, συγκολλητικές ουσίες και γράσα [1,2]. Χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσα αντιδρώντα και ως βοηθητικά μέσα για την παραγωγή φθοριωμένων πολυμερών, ψυκτικά αλλά και αγροχημικά [19].

Επίσης βρίσκονταν ως χημικά στον πυροσβεστικό αφρό και στον αφρό κατάσβεσης (aqueous film forming foam) σε πυρκαγιές από καύσιμα υδρογονανθράκων [8] κατά κύριο λόγο από το 1965 έως το 1975. Την περίοδο αυτή οι ενώσεις χρησιμοποιούνταν πολύ έντονα: από το στρατό (π.χ. σε βάσεις αεροσκαφών ή επί των πλοίων) σε παρασκευή λαδιών και αερίων καυσίμων, στα διυλιστήρια καθώς και σε αεροδρόμια παγκοσμίως. Γίνονταν άλλωστε και τακτικά ασκήσεις με πυροσβεστικούς αφρούς που περιείχαν την ένωση PFOS, οι οποίες περιλάμβαναν απευθείας απελευθέρωση και εκπομπή της τόσο σε εδάφη όσο και σε ύδατα. Το αποτέλεσμα ήταν η εκτεταμένη εισαγωγή των ενώσεων στο περιβάλλον τόσο σε βιομηχανικές περιοχές αλλά και σε πολύ απομακρυσμένες (χαρακτηριστικά παραδείγματα ο αγωγός στην Αλάσκα μετά το 1977, στρατιωτικές βάσεις σε βόρειες περιοχές της Αρκτικής) από λάδια ανεφοδιασμού πλοίων [18]. Επίσης βρίσκουν εφαρμογή σε διακοσμητική επιχρωμίωση, σκληρή επιχρωμίωση και επιμετάλλωση πλαστικών [12]. Ακόμη βρίσκονται ως εμπεριέχοντα συστατικά σε εμπορικά προϊόντα όπως καθαριστικά, απολυμαντικά ή γυαλιστικά πατωμάτων αλλά και σε σαμπουάν. Έχουν εντοπιστεί και σε μαγειρικά σκεύη αντι-κολλητικού τύπου (σκεύη με το εμπορικό όνομα TEFAL) προκειμένου να παρέχουν τις αποθητικές τους ιδιότητες σε κηλίδες, λάδι, λεκέδες και νερό.

Στις παραπάνω εφαρμογές οι ενώσεις PFCs παρουσιάζουν μοναδικές ιδιότητες που τις έχουν κάνει τόσο δημοφιλείς και τις καθιστούν αναντικατάστατες σε πολλές περιπτώσεις όσον αφορά το βιομηχανικό τομέα. Επίσης εξηγούν την περιβαλλοντική σταθερότητα και το βιοσυσσωρευτικό αλλά βιομεγεθυντικό δυναμικό των ενώσεων PFC εκ των οποίων η ένωση Υπερφθοροοκτανοσουλφονικό οξύ (Perfluorooctane Sulfonate - PFOS) είναι από τις πιο διαδεδομένες καθώς εντοπίζεται πολύ συχνά τόσο στο περιβάλλον δηλαδή στον αέρα, στο νερό, σε ιζήματα, σε λάσπη κατεργασμένων αποβλήτων, όσο και στα ζώα και στο ανθρώπινο αίμα. Δείγματα των ενώσεων αυτών έχουν βρεθεί κοντά σε τοποθεσίες παραγωγής τους αλλά και πολύ μακρύτερα από αυτές όπως για παράδειγμα ακόμα και σε πολικές περιοχές!

2.1.3 Πηγές Ένωσης PFOS

Απελευθέρωση της ένωσης PFOS στο περιβάλλον μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά τη διάρκεια οποιουδήποτε σταδίου του κύκλου ζωής ενός προϊόντος που περιέχει ενώσεις PFCs : όταν η ένωση συντίθεται, όταν ενσωματώνεται στο προϊόν, κατά τη διανομή του προϊόντος στους καταναλωτές, κατά τη χρήση του προϊόντος από τους καταναλωτές καθώς και κατά την τελική του διάθεση [1]. Για παράδειγμα η ένωση PFOS ήταν βασικό συστατικό του Scotchguard, προστατευτικού μέσου για υφάσματα που παράγεται από την 3M για την προστασία υλικών από λεκέδες [12]. Άλλωστε κατά τη διάρκεια των ετών 2000-2002 ποσότητα 5 εκατομμυρίων kg / year (κιλών ανά έτος) της ένωσης αυτής παράχθηκε, ενώ το 40% προήλθε από τη Βόρειο Αμερική [15].

Επίσης υλικά που αποτελούν δυνητικές πηγές της ένωσης PFOS είναι η παραγωγή προϊόντων όπως ηλεκτρονικά ή ηλεκτρικά προϊόντα, τσιπ ηλεκτρικών κυκλωμάτων, μητρικές κάρτες για υπολογιστές, ηλεκτρικά τμήματα για άλλα προϊόντα, πλαστικά αγαθά, βαφές και υφάσματα [5]. Πιθανές επίσης πηγές της ένωσης PFOS σε υδάτινα οικοσυστήματα είναι η απόθεση των αφρών κατάσβεσης πυρκαγιών αλλά και η κατευθείαν απόρριψη τους στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής παραγωγικής διαδικασίας, όπως περιγράφηκε ανωτέρω [18]. Μία έμμεση πηγή εκπομπών των ενώσεων στο περιβάλλον είναι η διάσπαση πολυμερικών προϊόντων κατά τη χρήση τους (sewage treatment plant sludge from laundering textiles) [18].

Άλλωστε, σκόπιμες ή μη εκκενώσεις και αποθέσεις λυμάτων αλλά και οι διαδοχικές ακόλουθες μετατροπές έχουν ως αποτέλεσμα την παρουσία ποικιλίας ενώσεων PFCs στα υπόγεια, επιφανειακά αλλά και πόσιμα ύδατα καθώς και στο νερό των ωκεανών. Αυτές οι διαδοχικές ακόλουθες μετατροπές έχουν πιθανή προέλευση τη διάσπαση άλλων πρόδρομων ενώσεων και ρύπων στις χημικές ενώσεις PFC και PFOS, οι οποίες και θεωρούνται τα τελικά προϊόντα στα στάδια διάσπασης [3].

3. Τοξικότητα

Η ένωση PFOS θεωρείται δυνητική για τοξικότητα και καρκινογένεση σε πειράματα πάνω σε ζώα αλλά έχει και αρκετά μεγάλους χρόνους ημιζωής σε ανθρώπους. Αυτό συμβαίνει καθώς θεωρείται πιθανό ότι υγιείς άνθρωποι εκτίθενται στις ενώσεις αυτές μέσω ποικίλων ημερήσιων δραστηριοτήτων [7]. Οι προαναφερθέντες συγκεντρώσεις στις οποίες οι ενώσεις εντοπίζονται στο περιβάλλον δεν είναι επικίνδυνα τοξικές αυτές καθ' αυτές, όμως μπορούν να εμπλουτιστούν στο ανθρώπινο σώμα δηλαδή στο αίμα και το συκώτι, εξαιτίας της υψηλής βιοσυσσωρευτικότητας τους υπό συνθήκες περιβάλλοντος [4].

Πιο αναλυτικά σε ποντίκια ο χρόνος ημιζωής τους είναι 100 ημέρες, σε μαϊμούδες είναι 200 ημέρες ενώ στους ανθρώπους κυμαίνεται σε μερικά χρόνια [19]. Αναλυτικότερα σε μαϊμούδες χρόνια έκθεση στις ενώσεις PFOS οδηγεί σε αξιοσημείωτο χάσιμο βάρους συνοδευόμενο από τοξικότητα του ήπατος, μείωση της χοληστερόλης του ορού αίματος και ορμονών του θυρεοειδή.

Ο συνδυασμός ρύπανσης από PFOS μεγάλης ποικιλίας ειδών, περιλαμβανομένων των ανθρώπων και ανησυχητικών τοξικολογικών δεδομένων οδήγησε την 3M - επιχείρηση με ηγετική θέση στην παγκόσμια αγορά - να σταματήσει την παραγωγή PFOS το 2000 [12].

4. Περιβαλλοντικό Πρόβλημα

Οι ενώσεις PFCs (επιφανειοδραστικές - απορρυπαντικές ουσίες)πιθανώς να έχουν γίνει γνωστές από υλικά ή εμπορικά είδη όπως τα Teflon ή Gore-Tex. Οι αντικολλητικές ικανότητες του Teflon οφείλονται επίσης στη δομή του πολυμερούς, που αποτελείται από έλικα με τα άτομα φθορίου στην επιφάνεια και του άνθρακα στο εσωτερικό του ελικοειδούς σκελετού. Η επιφάνεια είναι εξαιρετικά αδρανής και λεία με αποτέλεσμα τα υλικά ρέουν χωρίς να μπορούν να διεισδύσουν σε αυτήν και να επηρεάσουν την υφή της [20].

Έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται στο περιβάλλον με την απόρριψη λυμάτων σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα, καθώς τα λύματα περιέχουν πολύ ευρύ φάσμα φορτίου οργανικών ρύπων ανθρωπογενούς προέλευσης, το οποίο και μεταβάλλεται συνεχώς ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία των λυμάτων και της ιλύος, την τοποθεσία και την εποχή.

4.1 Παρουσία ένωσης PFOS σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων

Μεταξύ των διαφόρων ουσιών που περιέχονται στα απόβλητα, η ένωση PFOS είναι αυτή που έχουν τη μεγαλύτερη τάση να συγκεντρώνεται και να συσσωρεύεται σε αυτά αφού εξαιτίας της αμφιφιλικής φύσης της απορροφάται στην επιφάνεια υπολειμμάτων σωματιδιακής ύλης ή μπορεί να καθιζάνει από το διάλυμα κατά την παρουσία μεταλλικών ιόντων όπως ασβέστιο Ca^{2+} ή Μαγνήσιο Mg^{2+} [6]. Τυπικά μόνο το 25% των ενώσεων PFCs που εισάγεται σε ένα σύστημα διαχείρισης αποβλήτων μπορεί να απομακρυνθεί κατά την πρωτοβάθμια επεξεργασία ενώ οι ενώσεις που απορροφήθηκαν από την ιλύ εξέρχονται στην αρχική τους μορφή ή μερικώς διασπασμένες και ύστερα καταλήγουν στη δευτεροβάθμια επεξεργασία. Εξαιτίας των περιορισμένων μεταβολικών διεργασιών στις οποίες συμμετέχει, η ένωση PFOS δεν είναι διασπάσιμη ύστερα από αναερόβιες συνθήκες και έτσι η ιλύς ύστερα από την αναερόβια επεξεργασία καταλήγει πλούσια σε ενώσεις PFCs και PFOS.

Άλλωστε η ιλύς αποβλήτων αποτελεί μία πιθανή διαδρομή των ενώσεων PFCs και των προϊόντων μεταβολισμού τους για την εισαγωγή τους

στα περιβαλλοντικά οικοσυστήματα. Αυτό συμβαίνει μετά την επεξεργασία της καθώς για τη μετέπειτα διάθεση της οι πλέον αποδεκτοί τρόποι είναι η εναπόθεση της ιλύος σε γεωργικές περιοχές ή σε χωματερές. Εξαιτίας όμως της πολικότητας και της κινητικότητας της ένωσης PFOS, κατά τη διάθεση της κινητοποιείται εκ νέου και φθάνει στο έδαφος ή στο χώμα χωρίς να διασπαστεί ή μεταφέρεται τόσο σε υπόγεια όσο και σε επιφανειακά ύδατα ανεπηρέαστη [6].

Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί το γεγονός ότι πειραματικές μετρήσεις έχουν δείξει ότι οι συνηθισμένες μέθοδοι επεξεργασίας του νερού δεν εξαλείφουν αποτελεσματικά τις ενώσεις PFCs – PFOS ή έστω σε ικανοποιητικό βαθμό ακόμα και αν τοποθετηθούν φίλτρα ενεργού άνθρακα στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας του νερού [4].

4.2 Παρουσία ένωσης PFOS σε ζωντανούς οργανισμούς

Η ένωση PFOS έχει εντοπιστεί στο περιβάλλον σε νερά ποταμών, και άλλα επιφανειακά ύδατα, ωκεανούς, στην ιζηματογένεση, στο νερό βροχής, νερό θαλάσσης, πόσιμο νερό, καθώς και στους ιστούς μεγάλης ποικιλίας ειδών ζώων όπως θαλάσσια θηλαστικά, ψάρια και πουλιά παγκοσμίως. Για παράδειγμα επιστήμονες το 2005 δημοσίευσαν ότι η βροχή στην περιοχή Winnipeg περιέχει την ουσία PFOS ενώ το τμήμα αλιείας του Winnipeg από μετρήσεις κατέληξε στο γεγονός ότι η ένωση PFOS αγγίζει τα 0.59 ng/l [19] .

Πιο αναλυτικά ένωση PFOS έχει βρεθεί σε θηλαστικά όπως φώκιες, ενυδρίδες γένους *Lutra* (δυτικές Ηνωμένες Πολιτείες), δελφίνια, φάλαινες αλλά και πολικές αρκούδες σε μεγάλο γεωγραφικό εύρος : από Καναδικές και Νορβηγικές Αρκτικές περιοχές έως και πιο βιομηχανικές περιοχές όπως η Φλόριντα και η Βαλτική θάλασσα. Επίσης έχει εντοπιστεί σε δελφίνια, κορμοράνους, γεράκια και θαλασσοαετούς της Βαλτικής και άλμπατρος, από την Αρκτική μέχρι τα μέσα του Ειρηνικού [12], αλλά και σε γαρίδες και θαλάσσιες χελώνες (3.20 ng/ml) [15]. Άλλωστε σύμφωνα με έκθεση του WWF

κάθε χρόνο πολλά κατοικίδια πουλιά θεωρείται ότι πεθαίνουν από την εισπνοή Teflon (που χρησιμοποιείται για εσωτερική επένδυση σε ρούχα) [14].

Από τα θηλαστικά με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε ηπατικούς ιστούς είναι οι πολικές αρκούδες (έως 6340ng/g υγρού δείγματος), οι φώκιες (έως 1100 ng/g υγρού δείγματος) και φάλαινες της Βαλτικής(*Phocoena phocoena relicta*) (έως 1149 ng/g υγρού δείγματος) , καθώς και δελφίνια στις Ηνωμένες Πολιτείες (έως και 1520 ng/g υγρού δείγματος).

Το εύρος συγκεντρώσεων PFOS μεταξύ των ειδών έγκειται σε διαφορές μεταξύ τους όπως είναι διαφορές στις διατροφικές συνήθειες, στο μεταβολισμό, στις αποδημητικές διαδρομές, η κατάταξη στην τροφική αλυσίδα αλλά και χρονικές ή χωρικές διαφορές.

Χαρακτηριστικά σε φάλαινες οι συγκεντρώσεις της ένωσης PFOS αποδεικνύονται να μειώνονται από το συκώτι > στα νεφρά > μύες > εγκέφαλο > ως το λίπος τους . Παράλληλα η γαλακτογονία πιθανό να είναι η κύρια οδός μεταφοράς της ένωσης PFOS μεταξύ της μητέρας και των απογόνων της. Αντίστοιχα μετρήσεις σε αρπακτικούς γλάρους τρεφόμενους με απορρίμματα (*glaucus gull*) κατατάσσουν τις συγκεντρώσεις PFOS ως εξής ξεκινώντας από τη μεγαλύτερη: πλάσμα > συκώτι $\approx$ αυγά > εγκέφαλο . Έρευνες σε Αρκτικές Περιοχές της Νορβηγίας θεωρούν πιθανή τη μακρομοριακή κινητοποίηση και μεταφορά PFOS από το θηλυκό στα αυγά κατά τη χρονική διάρκεια του γρήγορου σχηματισμού των αυγών [9].

Επιπρόσθετα, έρευνες σε μαϊμούδες δείχνουν ότι προκαλεί βλάβες στο συκώτι και τους πνεύμονες, παγκρεατίτιδα, μείωση των ορμονών του θυρεοειδή και γενικότερη ορμονική διαταραχή και σε μερικές περιπτώσεις ακόμα και θάνατο [19].

4.3 Τρόποι Μεταφοράς PFOS σε απομακρυσμένες περιοχές

Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί έτσι ώστε να εξηγηθεί η μεταφορά των ενώσεων PFOS σε περιοχές της αρκτικής: έμμεσα μέσω της ατμοσφαιρικής μεταφοράς και άμεσα μέσω των ρευμάτων των ωκεανών. Η ατμοσφαιρική μεταφορά περιλαμβάνει τη μεταφορά πτητικών πρόδρομων χημικών ενώσεων οι οποίες μετατρέπονται ή «υποβιβάζονται» σε ενώσεις PFCs και PFOS. Άλλωστε η ύπαρξη της ένωσης PFOS στο νερό της βροχής αλλά και στο χιόνι υποδηλώνει την ατμοσφαιρική παρουσία τους [18]. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την άμεση μεταφορά των αυτούσιων ενώσεων PFC και PFOS στην Αρκτική μέσω της μεταφοράς των ωκεανών. Μετρήσεις σε νερά ωκεανών, όπως ο Ειρηνικός, τόσο επιφανειακά όσο και μεγαλύτερου βάθους έως και 4400 μέτρων υποδεικνύουν την παρουσία της ένωσης PFOS [18]. Μεταφέρεται στα μεγαλύτερα βάθη μέσω των φυσικών καθοδικών κινήσεων του νερού ή μέσω σωματιδίων που την περιέχουν, τα οποία καθιζάνουν. Πιθανότατα η ένωση αυτή μεταφέρεται σε τόσο απομακρυσμένες περιοχές με συνδυασμό και των δύο μηχανισμών [11].

Πιο αναλυτικά, μετρήσεις [21] σε επιφανειακά ύδατα στο Βόρειο Ατλαντικό ωκεανό και στον κεντρικό Ατλαντικό δείχνουν ότι η ένωση PFOS βρίσκεται εκεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από ότι στο Νότιο Ειρηνικό ή στον Ινδικό ωκεανό. Οι συγκεντρώσεις της ένωσης στο Βόρειο Ατλαντικό κυμαίνονται από 8.6 έως 36 pg/l ενώ στον κεντρικό Ατλαντικό κυμαίνονται από 13 έως 73 pg/l. Συγκριτικά, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της ένωσης PFOS που βρέθηκαν στον Ατλαντικό ωκεανό είναι 15 φορές μεγαλύτερες από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις που εντοπίστηκαν στο Νότιο Ειρηνικό και στον Ινδικό ωκεανό.

Αυτή η αξιοσημείωτη διαμήκης διαφορά των συγκεντρώσεων είναι αναμενόμενη καθώς πολύ μεγάλες ποσότητες ενώσεων PFC γενικά, έχουν παραχθεί και χρησιμοποιηθεί στη Βόρειο Αμερική. Αυτές οι υψηλές συγκεντρώσεις στο Βόρειο Ατλαντικό Ρεύμα (North Atlantic Current – NAC) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ένωση PFOS μεταφέρεται από τα επιφανειακά

ύδατα του Βόρειου Ατλαντικού Ρεύματος σε μεγαλύτερα βάθη εξαιτίας της μεταγωγής θερμότητας από τα επιφανειακά νερά.

Ένωση PFOS δε βρέθηκε στα επιφανειακά ύδατα του Ανταρκτικού ωκεανού, γεγονός που εξηγείται από την απομόνωση των νερών της Ανταρκτικής από τις υδάτινες μάζες του Βόρειου Ημισφαιρίου. Το γεγονός αυτό συνάδει με έρευνες που αποδεικνύουν υψηλές συγκεντρώσεις της ένωσης PFOS σε θαλασσοπούλια από το Βόρειο Ημισφαίριο ενώ αντίστοιχα στην Ανταρκτική τα επίπεδα συγκεντρώσεων στα θαλάσσια πτηνά ήταν μόλις στα όρια ανίχνευσης. Γενικά τα νερά των ωκεανών αποτελούν περιβάλλον τριών διαστάσεων και έτσι η παρακολούθηση των ενώσεων μόνο στην επιφάνεια δίνει λιγοστές πληροφορίες για την παγκόσμια κίνηση της ένωσης PFOS.

4.4 Παρουσία PFOS σε ανοιχτές θάλασσες

Στην Ιαπωνική θάλασσα οι συγκεντρώσεις στα επιφανειακά δείγματα νερού ήταν ~15 pg/l και μειώνονται στα ~2 pg/l σε βάθος των 1000 μέτρων. Σε βάθη μεγαλύτερα των 1500 μέτρων οι συγκεντρώσεις είναι χαμηλότερες ή ακριβώς στο όριο ανίχνευσης του 1 pg/l. Γενικά σε βάθη της τάξης των 4000 μέτρων οι συγκεντρώσεις των ενώσεων αυτών είναι αμελητέες. Όμως οι ενώσεις PFOS που καταλήγουν στα επιφανειακά νερά του κεντρικού Ατλαντικού ωκεανού έχουν μεγάλους χρόνους παραμονής εξαιτίας της απομόνωσης των επιφανειακών υδάτων από τα πιο βαθιά αλλά και στην κυκλοφορία της υδάτινης μάζας από το Gulf Stream και το Βόρειο Ατλαντικό Ρεύμα [21], γεγονός που εξηγεί επίσης το ότι τα δείγματα από τον κεντρικό Ατλαντικό παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Δείγματα από τη Θάλασσα Λαμπραντόρ -η οποία είναι γνωστή για την κρίσιμη θέση της για την παγκόσμια κυκλοφορία των υδάτων των ωκεανών και γενικά για την επιρροή της στο κλίμα της γης- υποδηλώνουν υψηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων PFOS στην επιφάνεια του νερού και σταθερές συγκεντρώσεις ως τα 2000 μέτρα. Εάν ο όγκος του υδάτινου αποδέκτη της Θάλασσας Λαμπραντόρ θεωρηθεί σταθερός τότε 620 kg (1.7kg/day) υπολογίζεται ότι μεταφέρονται στα βαθιά νερά των ωκεανών κάθε χρόνο.

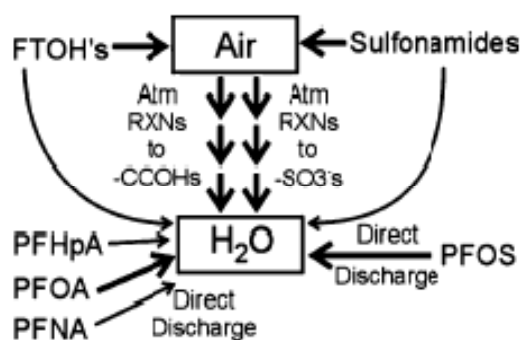
Επίσης σχετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις σε ιζήματα από ότι στα επιφανειακά ύδατα υποδηλώνουν διασπορά της ένωσης PFOS από ατμοσφαιρική δίοδο μέσω υγρής απόθεσης ιζήματος. Η διαλυτότητα της ένωσης PFOS στο νερό είναι 570 mg/l και εξαιτίας αυτής της υψηλής διαλυτότητας τα ύδατα των ανοιχτών ωκεανών θεωρούνται τελικός αποδέκτης της. Εξαιτίας λοιπόν της υψηλής διαλυτότητας (δε διαφεύγουν στον αέρα), της ανιχνευσιμότητας στα ανοιχτά νερά των ωκεανών, της συσσωρευτικότητας και μη βιο-διαθεσιμότητας τους οι ενώσεις αυτές διαθέτουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για να αποτελέσουν ωκεανικούς, οργανικούς χημικούς δείκτες.

4.5 Παρουσία PFOS στην ατμόσφαιρα

Σε συνδυασμό με την υδατική μεταφορά, η διάσπαση πτητικών πρόδρομων ενώσεων και η απευθείας απελευθέρωσή τους στην ατμόσφαιρα, εύλογα καθιστά υδατικά σωματίδια αεροζόλ ως υποψήφια για τη μεταφορά και απελευθέρωση αυτών των ενώσεων στην ατμόσφαιρα αλλά και στα επιφανειακά ύδατα.

Οι ενώσεις PFCs και PFOS μπορεί να αντιπροσωπεύουν μικρό ποσοστό του οργανικού περιεχομένου που βρίσκεται στα ατμοσφαιρικά αερολύματα αλλά όσον αφορά τις ενώσεις αυτές ως σύνολο μπορούν να αποτελέσουν μεγάλο κλάσμα. Επειδή οι μακρομοριακές ενώσεις PFCs δεν είναι ιδιαίτερα διαλυτές στο νερό, τα ατμοσφαιρικά σωματίδια αερολύματα έχουν τη δυνατότητα να τις συγκεντρώνουν, να τις μεταφέρουν και να τις διανείμουν ανά την τροπόσφαιρα συνεισφέροντας έτσι στην αυξανόμενη περιβαλλοντική διανομή. Ακόμη, οι ενώσεις PFCs μπορούν να σταθεροποιούν τα οργανικά σωματίδια στη μεσόφαση (διαχωριστική επιφάνεια) μεταξύ αέρα και νερού. Έτσι αυτό σημαίνει ότι τα μόρια υποβάλλονται σε περαιτέρω χημικές διεργασίες στην κοινή επιφάνεια αέρος-νερού, γεγονός που δε θα συνέβαινε χωρίς την παρουσία των ενώσεων αυτών.

Παρακάτω παραθέτονται διαγραμματικά αυτοί οι πιθανοί τρόποι διανομής PFOS στο περιβάλλον [17-18] από την αρχή παραγωγής τους, έμμεσοι και άμεσοι.



Εικόνα 2 [17]: Πιθανοί Τρόποι Διανομής PFOS στο περιβάλλον.

4.6 Επιδράσεις στην Ανθρώπινη Υγεία

Κατά γενική παραδοχή ο τρόπος εισαγωγής στο ανθρώπινο σώμα όσον αφορά τις ενώσεις PFCs και ειδικότερα της PFOS, πραγματοποιείται μέσω της τροφής και πόσιμων υγρών (όχι μόνο του νερού) που είτε είναι εξαρχής ρυπασμένα είτε ρυπάνθηκαν εκ των υστέρων από τα υλικά συσκευασίας των τροφίμων [4].

Πιο αναλυτικά, έρευνες που μελετούν την ένωση PFOS σε ποικιλία συσκευασιών τροφίμων όπως περιτύλιγμα χάμπουργκερ, δοχεία για τηγανιτές πατάτες, κουτιά από πίτσες, πλαστικά πιάτα και οδοντικό νήμα αποδεικνύουν την ύπαρξη τους όχι μόνο στα προαναφερθέντα υλικά αλλά κυρίως σε υλικά συσκευασίας τροφίμων που δεν επηρεάζονται από τα λιπαρά συστατικά [20] ή υλικά συσκευασίας ποπκόρν που προορίζονται για φούρνους μικροκυμάτων.

Ειδικά τότε οι συγκεντρώσεις της ένωσης φθάνουν σε τόσο υψηλά επίπεδα μέσα στην τροφή ώστε καταναλώνοντας μία τέτοια σακούλα το μήνα για ένα χρόνο, η συγκέντρωση PFOS στο ανθρώπινο αίμα φθάνει ως το 20% του συνολικού μέσου όρου συγκέντρωσης που μπορεί να παρατηρηθεί στον ανθρώπινο σώμα. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της πολύ γρήγορης θέρμανσης του

ποπκόρν από πολύ υψηλή θερμοκρασία στο φούρνο μικροκυμάτων (πάνω από 200°C) αλλά και την παρουσία λαδιού μαζί με την τροφή.

Είναι επίσης κοινός μολυσματικός παράγοντας του ανθρώπου - πράγματι, καθένας από μας φέρει κατά πάσα πιθανότητα PFOS στο σώμα του. Από μελέτη εξέτασης αίματος που διεξήγαγε το WWF το 2004, η οποία εξέτασε 47 άτομα από 17 χώρες, περιλαμβανομένων 39 μελών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου, βρέθηκαν PFOS και έξι άλλες υπερφθοριωμένες ενώσεις σε καθένα από τα 47 άτομα που εξετάστηκαν.

Ύστερα οι περισσότεροι Αμερικανοί διαθέτουν 4-5 ppb ενώσεων PFCs και πιο συγκεκριμένα PFOA στο αίμα τους [15,29]. Παρόλα αυτά διαθέτουμε πολύ λίγες πληροφορίες για την τοξικο-κινητική συμπεριφορά των ενώσεων και τη διαδρομή τους στον ανθρώπινο οργανισμό, αφού μετά την κατάποση τους απλά τις εντοπίζουμε στο συκώτι (εντεροηπατική – enterohepatic κυκλοφορία της ένωσης) , στο πλάσμα ενώ δεν υπάρχει καμία απόδειξη μεταβολισμού τους από κανένα ζωντανό οργανισμό. Είναι ισχυρά συνδεδεμένες με το πρωτεϊνικό κλάσμα του αίματος κυρίως με λευκωματίνες (αλβουμίνες) και σε μικρότερο βαθμό με β-λιποπρωτεΐνες [16].

Παράλληλα έρευνα σε ανθρώπους από τις Ηνωμένες Πολιτείες, την Κολομβία, τη Βραζιλία, το Βέλγιο, την Ιταλία, Πολωνία, Ινδία, Μαλαισία και την Κορέα μέτρησε τη συγκεντρώσεις PFOS στον οργανισμό τους και παρατηρήθηκε ότι οι υψηλότερες τιμές ήταν αυτές των ατόμων από τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Πολωνία (έως και 164 ng/ml). Οι χαμηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στην Ινδία (< 3 ng/ml) ενώ στην Κορέα, το Βέλγιο, τη Μαλαισία, τη Βραζιλία, την Ιταλία και την Κολομβία ήταν μέτριες (3-29 ng/ml).

Προκαταρκτική επιδημιολογική έρευνα σε εργάτες εγκαταστάσεων εργοστασίου αλλά και σε κατοίκους κοντά σε αυτό, οι οποίοι εκτίθενται σε ενώσεις PFCs υποδεικνύουν την πιθανότητα αυξανόμενου ρυθμού εμφάνισης καρκίνου του προστάτη σε νεαρούς άνδρες αλλά και γυναικολογικούς καρκίνους σε κοπέλες καθώς και πιο ασυνήθιστες μορφές καρκίνου (λέμφωμα non-Hodgkin's, λευχαιμία και πολλαπλά μυελώματα). Παρατηρήθηκαν δηλαδή και σε έρευνα του Yeung [3] διαφορές στις επιπτώσεις της ένωσης PFOS

ανάλογα με το φύλο καθώς αρσενικά άτομα είχαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στον οργανισμό τους. Παράλληλα σε έγκυες γυναίκες ηλικίας 17-37 ετών, εντοπίστηκε PFOS σε συγκεντρώσεις από 4.9 έως 17.6 ng/ml ενώ σε εμβρυϊκά δείγματα το εύρος ήταν από 1.6 έως 5.3 ng/ml. Επόμενο λοιπόν ήταν να υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ συγκεντρώσεων στο μητρικό αίμα και του ομφάλιου λώρου [15].

Η μετάβαση όμως της ένωσης PFOS στο μητρικό γάλα είναι περιορισμένη και οι συγκεντρώσεις στο ανθρώπινο γάλα είναι πολύ μικρότερες από το μητρικό πλάσμα ή ορό (έως και 10 φορές μικρότερη συγκέντρωση) αλλά μπορεί όμως να υπάρξει έκθεση των νεογνών στις ενώσεις μέσω του θηλασμού. Βάσει των αποτελεσμάτων έρευνας στη Γερμανία, μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό νεογνού μέσου βάρους 5 κιλών μέσω του θηλασμού συγκεντρώσεις από 0.10μg PFOS/ημέρα έως και 0.27 μg PFOS/ημέρα [16].

Σειρά ερευνών στην Ιαπωνία εισηγείται και αποδεικνύει την ύπαρξη σχέσης μεταξύ των επιπέδων συγκέντρωσης PFOS στους υδάτινους πόρους και στο ανθρώπινο αίμα των κατοίκων που διαμένουν στις πιο βαριά βιομηχανοποιημένες περιοχές της χώρας. Αντίστοιχα σε περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής ενώσεις PFOA και PFOS συσχετίστηκαν με την κατανάλωση ρυπασμένου νερού από πηγάδια, αλλά και φρούτα ή λαχανικά φυτεμένα σε εκάστοτε κήπους ιδιωτών σε συγκεκριμένη ρυπασμένη περιοχή. Επίσης έχει τεκμηριωθεί ότι η ένωση PFOS είναι πανταχού παρούσα σε υδατικές τροφικές αλυσίδες και τείνει να συγκεντρώνεται σε ψάρια που ενδεχομένως να καταναλωθούν από ανθρώπους [13].

Σύμφωνα με έκθεση του WWF η τοξική αυτή ένωση, μπορεί να προκαλέσει σοβαρές δυσλειτουργίες, όπως καρκίνο, καταστροφή του ανοσοποιητικού συστήματος, προβλήματα συμπεριφοράς, ορμονικές διαταραχές, ακόμα και εκθήλυνση [14].

5. Προβλήματα Ανάλυσης Ένωσης PFOS

Κατά τη διάρκεια αναλύσεων της ένωσης PFOS έχουν παρατηρηθεί βασικά χαρακτηριστικά αυτής τα οποία αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες στην επιτυχή ανάλυση της. Διακρίνεται από μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες οι οποίες οδηγούν σε έλλειψη σταθερότητας (π.χ. εξάτμιση) με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγάλη προσοχή από το προσωπικό για τη διεκπεραίωση της ανάλυσης.

Επίσης προσοχή απαιτείται καθώς κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της ανάλυσης είναι δυνατό να εμφανιστεί επιμόλυνση γεγονός που καθιστά την ανάλυση αυτή μη εμπιστεύσιμη.

Είναι δυνατό να βρεθούν πολύπλοκα μίγματα ισομερών και όμοιων ενώσεων μαζί με τις πολυφθοριωμένες ενώσεις αλλά να παρατηρηθεί και καταστολή ιόντων.

6. Τρόποι Ανάλυσης

Μια από τις πιο γνωστές τεχνικές διαχωρισμού είναι η εκχύλιση, η οποία βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων που αναμιγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους.

Οι δύο παραδοσιακές μέθοδοι για την απομόνωση και το διαχωρισμό ουσιών από υδατικά δείγματα είναι η υγρό – υγρό εκχύλιση και η εκχύλιση Στερεής Φάσης.

6.1 Υγρή – Υγρή Εκχύλιση (liquid-liquid extraction , LLE)

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος διαχωρισμού με εκχύλιση είναι η υγρή – υγρή εκχύλιση (liquid-liquid extraction , LLE), δηλαδή η εκχύλιση ενός διαλύματος ουσιών με ένα υγρό διαλύτη. Βασίζεται στην κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών που πρακτικά δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Έτσι η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο υγρών φάσεων κατά ορισμένη αναλογία και αποκαθίσταται ισορροπία, όταν η ελεύθερη ενέργεια της

διαλυμένης ουσίας είναι ίδια και στις δύο φάσεις. Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε συνδυασμός δύο διαλυτών, συνήθως όμως η μία από τις δύο φάσεις είναι ένα υδατικό διάλυμα, ενώ η άλλη ένας οργανικός διαλύτης.

Η υγρή – υγρή εκχύλιση (LLE) είναι μια μέθοδος που επιβάλλεται σε αρκετές βασικές αναλυτικές μεθόδους για τον προσδιορισμό περιβαλλοντικών ρύπων. Παρόλα αυτά παρατηρούνται πολλά προβλήματα κατά τη χρήση της όπως για παράδειγμα ότι είναι χρονοβόρα καθώς απαιτούνται πολλά στάδια για την εφαρμογή της με αποτέλεσμα τις απώλειες αναλυτών κατά τη διαδικασία εκχύλισης αλλά και την αύξηση των πιθανοτήτων λάθους εκ μέρους του προσωπικού κατά την πειραματική διαδικασία.

Είναι ακόμα πιθανό κατά τη διεξαγωγή της εκχύλισης να δημιουργούνται γαλακτώματα τα οποία εμποδίζουν τον αυτοματισμό της μεθόδου. Επίσης χρησιμοποιούνται πολύ μεγάλες ποσότητες τοξικών διαλυτών οι οποίοι θέτουν κινδύνους για την υγεία του προσωπικού και των χρηστών της μεθόδου και καταλήγουν στην παραγωγή επικίνδυνων εργαστηριακών αποβλήτων, γεγονός που προσθέτει επιπλέον κόστος στη διαχείριση των αποβλήτων αυτών.

6.2 Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid-phase microextraction - SPME)

Το 1990 μια καινούρια μέθοδος, όπου δε χρησιμοποιούνται καθόλου διαλύτες, έγινε γνωστή ως μικρό-εκχύλιση στερεής φάσης (solid-phase microextraction - SPME). Με τη μέθοδο αυτή μία λεπτή ίνα (fiber) είναι συγχωνευμένη με μία στατική φάση και εκτίθεται στο επιθυμητό δείγμα ή στον υπερκείμενο αέριο χώρο και τότε οι αναλυόμενες ουσίες καταμερίζονται από το δείγμα στην επίστρωση της ίνας [27]. Ύστερα από την εκχύλιση (ή προσυγκέντρωση για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα), η ίνα μεταφέρεται στη (ζεστή) πύλη του οργάνου αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography – GC) ή στο όργανο Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας (HPLC) για ανάλυση. Χαρακτηριστικό της μεθόδου αυτής είναι ότι η μικρό-εκχύλιση και η έγχυση (injection) είναι ενσωματωμένες στην ίδια ίνα ελαχιστοποιώντας έτσι

το χρόνο ανάλυσης. Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) είναι ότι οι ίνες που χρησιμοποιούνται έχουν πολύ μεγάλο κόστος και περιορισμένο χρόνο ζωής αφού με τη χρήση αλλοιώνεται. Η μερική απώλεια της στατικής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφών που συνεκλούνται μαζί με τις προσδιοριζόμενες ουσίες επηρεάζοντας έτσι την ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου [27]. Επιπρόσθετα, όταν η μέθοδος μικρό-εκχύλισης στερεής φάσης (SPME) συνενώνεται με μηχανήμα αέριας χρωματογραφίας (GC), παρατηρείται ότι τα δείγματα συχνά συμπαρασύρονται κατά τη διάρκεια των εγχύσεων για ορισμένες προσδιοριζόμενες ενώσεις γεγονός που είναι δύσκολο να απαλειφθεί ακόμη και σε αυξημένες θερμοκρασίες εκρόφησης.

6.3 Πλεονεκτήματα μεθόδου Υγρής – Υγρής εκχύλισης έναντι Εκχύλισης Στερεής Φάσης

Η μέθοδος υγρής – υγρής εκχύλισης (LLE) όμως διαθέτει πλεονεκτήματα έναντι της μεθόδου Εκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid- Phase Extraction - SPE). Αρχικά έχει φανεί από αναλύσεις ότι με τη μέθοδο υγρής – υγρής εκχύλισης (LLE) μπορούν να πραγματοποιηθούν εκχυλίσματα και για μακρομοριακές ενώσεις PFS ($> C_6$) σε αντίθεση με τη μέθοδο SPE με την οποία παρατηρείται πολύ χαμηλή ανάκτηση των μακρομοριακών ενώσεων. Έστω ακόμη ένα πλεονέκτημα της μεθόδου υγρής – υγρής εκχύλισης (LLE) είναι ότι υδατικά διαλύματα τα οποία περιέχουν αιωρούμενη σωματιδιακή ύλη μπορούν να εκχειλιστούν χωρίς να έχει προηγηθεί φιλτράρισμα του διαλύματος. Έτσι μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του υδατικού αλλά και σωματιδιακού κλάσματος στο νερό ενώ αν ζητείται μόνο το περιεχόμενο της υδατικής φάσης τότε τα δείγματα μπορούν να φιλτραριστούν [2].

Με τη μέθοδο της Εκχύλισης Στερεής Φάσης (SPE) παρατηρούνται προβλήματα επιμόλυνσης τα οποία προέρχονται από δύο κυρίως πηγές: είτε από το όργανο που χρησιμοποιείται για την ανάλυση είτε κατά τη αναλυτική διαδικασία. Αυτό συμβαίνει όταν υπάρχει επαφή των οργάνων που

χρησιμοποιούνται στην ανάλυση με εργαλεία του εργαστηρίου τα οποία έχουν κατασκευαστεί ή περιέχουν φθοροπολυμερή ή άλλες παρεμφερείς ενώσεις [1].

6.4 Μέθοδος Έγχυσης Μεγάλου Όγκου (Large - Volume Injection)

Έχει προταθεί επίσης από πολλούς αναλυτές [1], η χρήση της μεθόδου Large - Volume Injection στην οποία το μοναδικό βήμα προετοιμασίας του δείγματος είναι η φυγοκέντριση. Η χρήση της επιτυγχάνει την αύξηση ευαισθησίας αφού πραγματοποιείται κατά σειρά με μεγάλο όγκο δειγμάτων και έτσι μπορεί να δώσει χαμηλά όρια ανίχνευσης των ενώσεων.

7. Μικρό-εκχύλιση (microextraction)

Η μικρό-εκχύλιση σταγόνας διαλύτη αντιπροσωπεύει μια σημαντική εξέλιξη στον τομέα της αναλυτικής χημείας και αποτελεί μια νέα και πολλά υποσχόμενη τεχνική προετοιμασίας των δειγμάτων. Ενώ διάφορες μορφές μικρό-εκχύλισης είχαν αρχικά δημοσιευτεί στη βιβλιογραφία, η μέθοδος της Εκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase extraction - SPME) το 1990 αποτέλεσε σημείο αναφοράς και η διαδοχική εμπορευματοποίηση της έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω προσπάθειες έρευνας στον τομέα [28]. Αργότερα η μικρό-εκχύλιση διαλύτη (γνωστή ως μικρό-εκχύλιση υγρής φάσης ή LPME) εμφανίστηκε στη βιβλιογραφία και έχει βασιστεί στην παραδοσιακή υγρό – υγρό εκχύλιση (LLE) , όμως ελαττώνεται κατά πολύ η αναλογία της οργανικής με την υδατική φάση . Η μεταφορά μάζας της αναλυόμενης ουσίας από την υδατική στην οργανική φάση συνεχίζεται έως ότου επέλθει θερμοδυναμική ισορροπία ή διακοπεί η μικρό-εκχύλιση. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε μία σταγόνα από ένα μη υδατοδιαλυτό οργανικό διαλύτη αιωρούμενη από την άκρη μιας μικρό-σύριγγας, για την εκχύλιση των ζητούμενων ενώσεων από υδατικό δείγμα και η συγκεκριμένη μέθοδος ονομάστηκε Μικροεκχύλιση Μονής Σταγόνας (Single Drop Microextraction = SDME) [28].

Η διαδικασία της μικρό-εκχύλισης δεν είναι εξαντλητική και άλλωστε μόνο μικρό κλάσμα των αναλυτών εκχυλίζεται και προορίζεται για ανάλυση [27]. Οι γενικές απαιτήσεις για την προετοιμασία των δειγμάτων της μεθόδου είναι η χρήση ενός οργανικού διαλύτη (φάση εκχυλιστικού αντιδραστηρίου, δηλαδή του συστατικού στο οποίο οφείλεται η εκχύλιση – extractant phase) ο οποίος δεν είναι αναμίξιμος με το νερό(υδατικό διάλυμα) και αναλυτών που είναι περισσότεροι διαλυτοί στη φάση του εκχυλιστικού αντιδραστηρίου παρά στο υδατικό διάλυμα. Οι μεθοδολογίες που προκύπτουν από αυτήν την προσέγγιση χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- τη μικρό-εκχύλιση μονής σταγόνας όπου η φάση εκχύλισης είναι μία σταγόνα ενός μη αναμίξιμου με το νερό διαλύτη αιωρούμενη σε υδατικό διάλυμα και
- τη μικρό-εκχύλιση κάνοντας χρήση μη αναμίξιμων με το νερό υγρών λεπτών στρωμάτων περιλαμβάνοντας την μικρό-εκχύλιση υγρής φάσης (LPME).

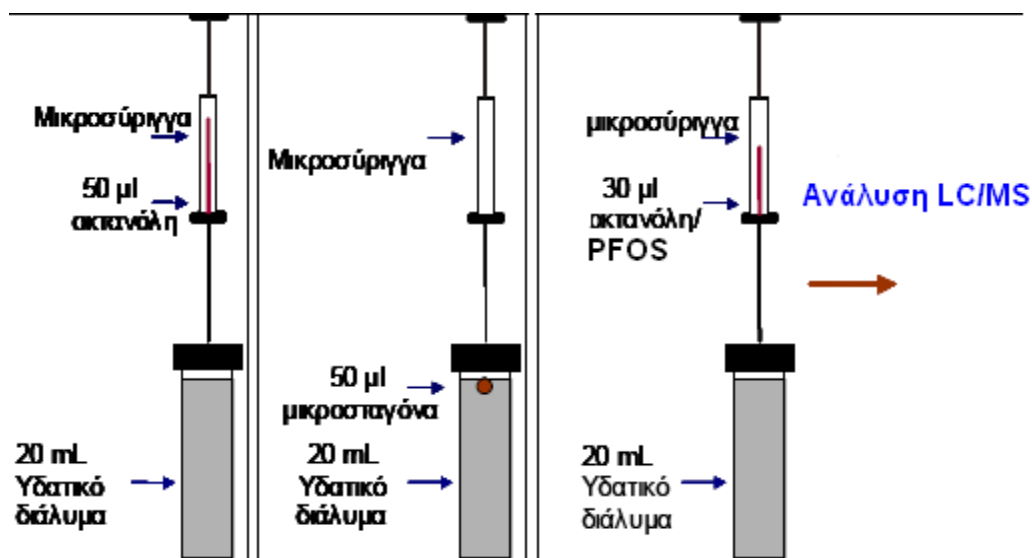
7.1 Προτεινόμενη μέθοδος Μικρό-εκχύλισης

Αρχικά μία σταγόνα ενός διαλύτη μη αναμειγνυόμενου με το νερό λαμβάνεται από την άκρη της σύριγγας έτσι ώστε να εκχυλιστούν οι αναλυόμενες ουσίες από το υδατικό διάλυμα. Η παρούσα εργασία ερευνά την εφαρμοσιμότητα αυτής της νέας μεθόδου μικρό-εκχύλισης του διαλύτη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της ουσίας Υπερφθοροοκτανοσουλφονικό οξύ (PFOS) σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού.

Πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής είναι οι υψηλές ταχύτητες προετοιμασίας των δειγμάτων, η πολύ γρήγορη επίτευξη ισορροπίας (μέσα σε μερικά λεπτά) αλλά και της διαδικασίας της μικρό-εκχύλισης.

Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται τόσο η ακρίβεια της μεθόδου αλλά και η ευαισθησία της [22]. Είναι πολύ απλή και είναι συζευγμένη με υγρή χρωματογραφία γεγονός που προσθέτει ακόμη ένα πλεονέκτημα : το μικρό χρόνο αναμονής για την ανάλυση.

Παρακάτω παρατίθεται σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της μικρό-εκχύλισης:



Εικόνα 3: Απεικόνιση της διαδικασίας μικρό-εκχύλισης

7.2 Θεωρητικό Υπόβαθρο μικρό-εκχύλισης

Η διαδικασία της μικρό-εκχύλισης πραγματοποιείται εξαιτίας της διαφοράς συγκέντρωσης των αναλυτών μεταξύ των δύο μη αναμίξιμων υγρών φάσεων (υδατικής και οργανικής). Η μεταφορά μάζας των αναλυτών από την υδατική φάση (δείγμα) στην οργανική φάση συνεχίζεται έως ότου επιτευχθεί η θερμοδυναμική ισορροπία ή σταματήσει η εκχύλιση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω [22,27].

Εάν συμβολίσουμε ως $C_{A,aq}$ και $C_{A,o}$ τη συγκέντρωση των αναλυτών στην υδατική και στην οργανική φάση αντίστοιχα τότε για το δείγμα πριν και μετά την προσθήκη της οργανικής φάσης θα ισχύει :

$$C_{A,aq} V_{aq} + C_{A,o} V_o = C_{A,aq,0} V_{aq} \quad (1)$$

Όπου $C_{aq,0}$ είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα πριν την προσθήκη της οργανικής φάσης και V_{aq} είναι ο όγκος της υδατικής φάσης.

Όταν επέλθει η ισορροπία τότε η εξίσωση (1) γίνεται :

$$C_{A,aq,eq} V_{aq} + C_{A,o,eq} V_o = C_{A,aq,0} V_{aq} \quad (2)$$

Υπό τις συνθήκες ισορροπίας ο συντελεστής κατανομής, K_A , είναι ίσος με το λόγο των συγκεντρώσεων $C_{A,o,eq} / C_{A,aq,eq}$. Δεδομένου ότι η οργανική φάση που χρησιμοποιείται είναι η οκτανόλη τότε ο συντελεστής K_A είναι ίσος με το συντελεστή κατανομής στο σύστημα οκτανόλης – ύδατος ($K_{A,ow}$) και μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση ισορροπίας του αναλύτη στη οργανική φάση ως εξής :

$$C_{A,o,eq} = \frac{K_{A,ow} C_{A,aq,0} V_{aq}}{V_{aq} + K_A V_o} \quad (3)$$

Η ισορροπία δυναμικής μάζας του αναλύτη στην οργανική φάση τότε δίνεται από :

$$\frac{d(C_{A,o} V_o)}{dt} = k_o A_o [K_{A,ow} C_{A,aq} - C_{A,o}] \quad (4)$$

όπου k_o είναι ο ολικός συντελεστής μεταφοράς μάζας, A_o είναι η ολική περιοχή επιφάνειας των σταγόνων της οργανικής φάσης, $K_{A,ow}$ είναι ο συντελεστής κατανομής στο σύστημα οκτανόλης ύδατος του αναλύτη στις δύο φάσεις στις συνθήκες ισορροπίας και V_o είναι ο τελικός όγκος των σταγόνων της οργανικής φάσης.

Η εξίσωση (4) μπορεί να λυθεί όταν η διάλυση της οργανικής φάσης είναι αμελητέα στην απόδοση,

$$C_{A,o}(t) = C_{A,o,eq} [1 - e^{-\lambda t}] \quad (5),$$

όπου λ είναι η σταθερά ταχύτητας η οποία δίνεται ,

$$\lambda = \frac{k_o A_i}{V_o} \left(1 + \frac{K_{A,ow} V_o}{V_{aq}} \right) \quad (6)$$

Όσο μεγαλύτερη η τιμή της σταθεράς ταχύτητας, τόσο πιο γρήγορα επιτυγχάνεται η ισορροπία [22]. Η εξίσωση (6) υποδηλώνει ότι η ισορροπία επιτυγχάνεται ταχύτερα όταν ο όγκος του δείγματος, V_{aq} , είναι μεγαλύτερος ή ο όγκος της οργανικής φάσης V_o είναι μικρότερος ή όταν η ολική περιοχή διεπιφάνειας A_i είναι μεγαλύτερη. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί αυξάνοντας τη ανάδευση. Γενικά, το αποτέλεσμα της ανάδευσης είναι ο σχηματισμός μιας δίνης, το σχήμα και το μέγεθος της οποίας εξαρτάται από την περιστροφική

ταχύτητα του αναδευτήρα. Σε υψηλές ταχύτητες, όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στην παρούσα έρευνα, ουσιαστικά αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη θρυμματίση της σταγόνας οδηγώντας σε διασπορά της σε μικρότερα σταγονίδια στην υδατική φάση. Παρόλο που αυτό μοιάζει το αντίθετο, αυτή η θρυμματίση ευνοεί τη διεργασία καθώς οι μέθοδοι μικροεκχύλισης διαλύτη είναι μέθοδοι ισορροπίας και η μεταφορά μάζας στη φάση του οργανικού αποδέκτη είναι περιοριστικός παράγοντας. Οι μικρές σταγόνες οδηγούν τις κύριες ενώσεις προς την ισορροπία γρηγορότερα εξαιτίας της μικρότερης απόστασης διάχυσης και της μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας και σ'αυτή την περίπτωση η μοριακή διάχυση θεωρείται κυρίαρχη.

7.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία αποτελεί μια από τις πλέον αξιόπιστες μεθόδους ενόργανης ανάλυσης με ευρύτατη εφαρμογή στην επίλυση αναλυτικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων [28]. Το τελευταίο τμήμα μιας διάταξης HPLC είναι ο ανιχνευτής ο οποίος μετρά μια χαρακτηριστική ιδιότητα του διαχωριζόμενου συστατικού, όπως για παράδειγμα η απορρόφηση στο UV, ο φθορισμός, η ηλεκτρική αγωγιμότητα και ανάλογα με τη συγκέντρωση του δίνει και το κατάλληλο σήμα. Ο ανιχνευτής συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την ολοκλήρωση του χρωματογραφήματος και τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων των συστατικών του μίγματος.

8. Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry)

Η Φασματοσκοπία Μάζας ανακαλύφθηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και έκτοτε αποτελεί μέθοδο ρουτίνας για την αναλυτική χημεία. Παρέχει πληροφορίες για τη μοριακή μάζα μιας χημικής ένωσης αλλά και για τη δομή της. Αυτό σημαίνει ότι παρέχει φάσμα της μάζας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αναγνωριστεί μια χημική ένωση. Τα παραπάνω δε σημαίνουν ότι μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τις χημικές ιδιότητες της υπό εξέτασης ένωση [24].

Κατά την φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry) χρησιμοποιείται διαφορετική αναλογία μάζα ανά φορτίο (m/z) ιονισμένων ατόμων, τμημάτων μορίων ή ολόκληρα μόρια για να γίνει η μεταξύ τους διάκριση [25]. Επίσης, η φασματομετρία μάζας είναι χρήσιμη για ποσοτικοποίηση ατόμων ή μορίων, αλλά και για τον καθορισμό πληροφοριών για την χημική τους συμπεριφορά και την μοριακή τους δομή. Τα μόρια έχουν ξεχωριστό τρόπο διάσπασης, γεγονός που παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αναγνώριση των συστατικών τους. Η ταυτοποίηση των ενώσεων που αναλύονται με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας, γίνεται μέσω του χρόνου κατακράτησης (retention time), ο οποίος είναι χαρακτηριστικός για κάθε ένωση.

Ο γενικός τρόπος λειτουργίας αυτών των αναλυτών είναι αρχικά ο σχηματισμός ιόντων, ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με την θέση τους ή τον χρόνο εμφάνισής τους που εξαρτάται από την αναλογία m/z τους και τέλος εύρεση της ποιότητας των ιόντων για κάθε αναλογία m/z .

8.1 Διαδικασία Ιονισμού

Γενικά ένα ιόν αποτελεί ένα φορτισμένο άτομο ή μόριο και ιονισμός είναι η διαδικασία μεταφοράς φορτίου σε ουδέτερα φορτισμένα μέρη. Είναι διαδικασία που απαιτεί ενέργεια, τη λεγόμενη Ενέργεια Ιονισμού. Αυτή μπορεί να είναι κινητική (ταχεία σωματίδια όπως ηλεκτρόνια ιόντα ή ουδέτερα), θερμική ενέργεια όπως υψηλή θερμοκρασία, χημική ενέργεια από χημικές

αντιδράσεις, ενέργεια ακτινοβολίας αλλά και ηλεκτρική ενέργεια από ισχυρά ηλεκτρικά πεδία [24].

Η τεχνική αυτή ουσιαστικά είναι ο βομβαρδισμός ατόμων ή μορίων με ηλεκτρόνια τα οποία μεταφέρουν αρκετή ενέργεια για να μετακινηθεί μόνο ένα ηλεκτρόνιο από το άτομο ή μόριο. Περισσότερη ενέργεια από την απαιτούμενη οδηγεί σε θραύση του μοριακού ιόντος με πιθανή διάλυση των χημικών δεσμών. Η υψηλή θερμοκρασία (που ισοδυναμεί με περισσότερη ενέργεια) υποστηρίζει τη θραύση του μοριακού ιόντος. Είναι προφανές ότι οι μονοί δεσμοί σπάνε ευκολότερα από ότι οι διπλοί ή αρωματικοί δακτύλιοι. Τα αποτελέσματα θραύσης πολλών μορίων παράγουν ένα χαρακτηριστικό διάγραμμα απεικόνισης το οποίο αποτελεί το φάσμα (spectra) .

8.2 Electrospray Ionization

Η υπόσχεση μιας περισσότερο γενική ή οικουμενική δυνατότητα ανάλυσης με οργανολογία LC/MS ήρθε στη δεκαετία του 1980 όταν πραγματοποιήθηκε έρευνα από τον John Fenn (Yale University) που αποδείκνυε ότι μπορούσε να υπάρξει ιοντισμός μορίων με ηλεκτροψεκασμό. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή ως Electrospray Ionization (ESI) [23].

Επειδή λοιπόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας στην εκλούμενη ουσία της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Ανάλυσης (HPLC) και επειδή δεν απαιτείται πτητικότητα των ενώσεων η τεχνική του ESI έχει μεγάλο εύρος εφαρμοσιμότητας.

Κατά τη διαδικασία του ιοντισμού μορίων με ηλεκτροψεκασμό η παραγωγή των ιόντων ξεκινά με φορτισμένους πολικούς αναλύτες μέσα στο εκλούμενο διάλυμα της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Καθώς η εκλούμενη ουσία περνά μέσα από την άκρη της σύριγγας στην οποία έχει εφαρμοστεί υψηλή διαφορά τάσης, εξέρχεται με περίσσιο φορτίο, το οποίο και ασκεί δύναμη στην υγρή επιφάνεια όπου και σχηματίζει λεπτά στερεά μέσα σε αέριο (αερόλυμα-aerosol). Καθώς τα σταγονίδια του αεροζόλ εξατμίζονται στην ατμοσφαιρική πίεση, το μέγεθος των σταγονιδίων μειώνεται και το φορτίο μεταφέρεται στην επιφάνεια.

Μόλις οι απωθητικές δυνάμεις ξεπεράσουν τη επιφανειακή τάση (όριο Rayleigh – Rayleigh limit) το σταγονίδιο εκρήγνυται, παράγοντας πληθυσμό μικρότερων επίσης φορτισμένων σωματιδίων. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως ότου η δύναμη του ηλεκτρικού πεδίου της επιφάνειας του σταγονιδίου είναι επαρκής ώστε να ξεπεράσει την ενέργεια διαλύτωσης (solvation energy) των αναλυμένων ιόντων. Όταν τα αναλυόμενα σταγονίδια αεροζόλ φτάσουν αυτή την κρίσιμη διάσταση (περίπου 10 nm) τα αναλυόμενα ιόντα εξάγονται από αυτά.

8.3 Τετράπολο (Quadrupole)

Αποτελεί το πλέον χρησιμοποιούμενο φίλτρο επιλογής δεδομένου λόγου μάζας/φορτίου m/z στα σύγχρονα φασματομέτρα μαζών. Αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ράβδους συνδεδεμένες μεταξύ τους ανά δύο ηλεκτρικά. Κάθε ζεύγος υπόκειται σε σύνθετη τάση αποτελούμενη από μία σταθερή και μία υψίσυχνη(στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων) συνιστώσα. Μεταξύ τους οι υψίσυχνες συνιστώσες διαφέρουν κατά 180° . Κατά τη σάρωση μεταβάλλονται οι τιμές και των δύο συνιστωσών. Για δεδομένες τιμές τους μόνο ιόντα δεδομένου λόγου m/z μπορούν να διέλθουν από το φίλτρο(δηλαδή να ταξιδέψουν καθ' όλο το μήκος του τετραπόλου χωρίς να) ενώ όλα τα άλλα εκτρέπονται και προσπίπτουν στις ράβδους όπου και εκφορτίζονται. Η διακριτική ικανότητα του φίλτρου είναι μάλλον περιορισμένη (συνήθως 1 amu) αλλά είναι κατάλληλη για συστήματα υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών LC/MS.

9. Πειραματικό Μέρος

9.1 Αντιδραστήρια

Τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση είναι τα παρακάτω :

- Υπερφθοροοκτανοσουλφονικό οξύ (PFOS) του οίκου Sigma Aldrich
- Potassium perfluorooctanesulfonate (PFOS-K+) του οίκου I-Chem.
- Perfluorooctanoic acid (PFOA), του οίκου Sigma Aldrich.
- Μεθανόλη με βαθμό καθαρότητας του οίκου Riedel-de-Häen για Υγρή Χρωματογραφία (LC/MS grade)
- Οξικό Αμμώνιο (Ammonium Acetate) του Fluka

Χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος (EASYPure® RF) το οποίο προμηθεύτηκε από την Barnstead/Thermolyne Corporation (Dubuque, IO, USA). Πρότυπο διάλυμα (stock solution) που παρασκευάστηκε μέσα σε μεθανόλη και περιείχε 10 mg/l PFOS φυλάχτηκε σε θερμοκρασία 4 °C σε σκοτεινές συνθήκες ενώ τα πρότυπα εργασίας κατασκευάζονταν καθημερινά στα επιθυμητά επίπεδα συγκεντρώσεων.

9.2 Όργανα – Συσκευές

1. Γυάλινο φιαλίδιο των 20ml με βιδωτό πώμα
2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 710 SNR model Hamilton μικροσύριγγα των 100μl (Bellefonte, BA, USA)
3. Φιαλίδιο Πολυπροπυλενίου για εισαγωγή στο LC/MS
4. Agilent 1200 high-performance liquid chromatography with a 6110 Series Quadropole MS
5. Αναδευτήρας τύπου Vortex (Reax Control, Heidolph, Germany)
6. Φυγόκεντρος Labofuge 400 Heraeus (Kendro Laboratory Products, Germany)

9.3 Χαρακτηριστικά Υδατικών Περιβαλλοντικών Δειγμάτων

Τα δείγματα από ποταμό συλλέχθηκαν από τον ποταμό Άγιο Γεώργιο των Χανίων Κρήτης (pH 7,8, Διαλυμένο Οξυγόνο (DO) = 8,0 mg/L, Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD) = 6,56 mg/L), από το πηγάδι Χαριτάκης (pH 7,2, Διαλυμένο Οξυγόνο (DO) = 4,9 mg/L, Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD) = 10,4 mg/L) ενώ τα δείγματα εκροής βιολογικού από τις εγκαταστάσεις βιολογικού καθαρισμού του Ρεθύμνου (pH 8,0, COD = 6,8 mg/L, TDS = 780 mg/L).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται περαιτέρω χαρακτηριστικά του κάθε δείγματος που εξετάστηκαν :

Πίνακας 1 : Μετρήσεις Περιβαλλοντικών Δειγμάτων

Παράμετροι	Πηγάδι	Ποτάμι
F ⁻ (mg/L)	0.5	0.2
Br ⁻ (mg/L)	<0.2	<0.2
NO ₂ ⁻ (mg/L)	<0.2	<0.2
NO ₃ ⁻ (mg/L)	103	2.9
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	<0.2	<0.2
SO ₄ ⁻² (mg/L)	89.4	16.4
Cl ⁻ (mg/L)	81.8	14.9

9.4 Πειραματική Προετοιμασία Δειγμάτων

Η προετοιμασία των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με τα ακόλουθα βήματα– στάδια:

- Τοποθετήθηκαν 20 ml υπερκάθαρου νερού το οποίο βρίσκεται σε όξινο pH ίσο με 2, σε γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο επιτεύχθηκε αφού ρίχθηκε 1ml θειικού οξέος σε 1L υπερκάθαρου νερού.
- Ύστερα προστέθηκε σε κάθε φιαλίδιο το υπερφθοροοκτανοςουλφονικό οξύ (Perfluorooctane Sulfonate-PFOS) συγκέντρωσης 500 ppt (spike) .
- Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στους υπέρηχους για 1 λεπτό ώστε να γίνει ανάμιξη της ένωσης μέσα στο νερό.
- Προστέθηκαν 50 μl οκτανόλης και το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στο όργανο ανάδευσης τύπου Vortex για 2 λεπτά σε ταχύτητα 2500 rpm.
- Στη συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρείται για το διαχωρισμό των δύο φάσεων και την επανάκτηση/ επανασχηματισμό της οργανικής σταγόνας (οκτανόλης) μετά τη γρήγορη ανάδευση του μείγματος υδατικής και οργανικής φάσης. Αναλυτικά το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στη φυγόκεντρο (εικόνα 4) για 2 λεπτά σε ταχύτητα 3500rpm.



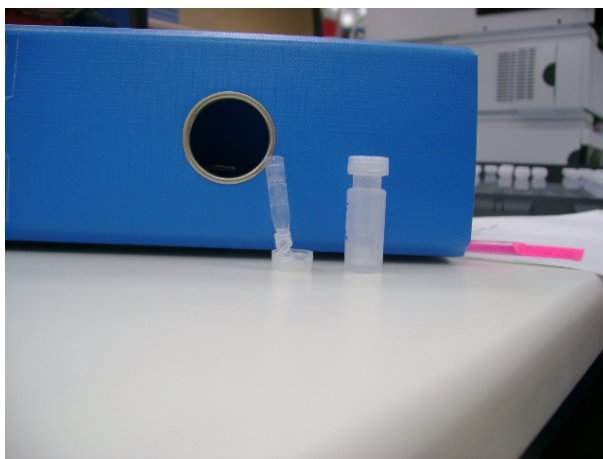
Εικόνα 4: Μηχάνημα Φυγόκεντρο με το οποίο επιτυγχάνεται η εξισορρόπηση της ουσίας στο νερό.

- Τέλος σχηματίζεται στο φιαλίδιο μία σταγόνα η οποία και απομακρύνεται από το υδατικό διάλυμα με τη βοήθεια μικροσύριγγας HPLC κάνοντας χρήση της μεθόδου υγρής μικρό-εκχύλισης.

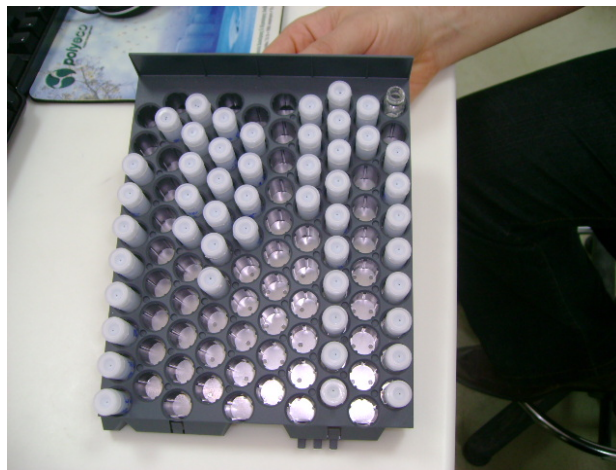


Εικόνα 5 :Μικροσύριγγα με την οποία πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία της υγρής μικρό-εκχύλισης στο εργαστήριο.

- Ύστερα από την απομάκρυνση της η σταγόνα τοποθετείται σε ειδικό φιαλίδιο πολυπροπυλενίου το οποίο και εισάγεται στο σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας LC/MS .



Εικόνα 6: Ειδικά φιαλίδια στα οποία τοποθετείται η σταγόνα ύστερα από τη διαδικασία της μικρό-εκχύλισης και εισάγεται στο LC/MS .



Εικόνα 7 : Θήκη των ειδικών φιαλιδίων μέσα στο LC/MS.

9.5 Οργανολογία

Τα τελευταία 20 χρόνια η ανάπτυξη τεχνικών για απευθείας σύζευξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC) με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry) έχει αποδειχθεί ότι είναι μια εξελισσόμενη συνεργασία επιστήμης και τεχνολογίας [23].

Η Υγρή Χρωματογραφία/Φασματομετρία μάζας (LC/MS) είναι πλέον μια κοινά χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική με ευρεία εφαρμοσιμότητα σε μεγάλο εύρος επιστημών, από βιοιατρική έως και περιβαλλοντικές επιστήμες. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με όργανο Agilent Technologies 1200 Υψηλής Απόδοσης Υγρής Χρωματογραφίας με 6110 Series Quadrupole MS.



Εικόνα 8: Agilent Technologies 6110 Series Single Quadropole LC/MS.

10. Αποτελέσματα – Συζήτηση

10.1 Βελτιστοποίηση LC/MS (Δυναμικού)

Η πιο διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση ουσιών PFCs σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι η υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography) σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας - mass spectrometry (σπεκτρόμετρο μάζας) . Παρέχει άλλωστε ξεκάθαρα πλεονεκτήματα όσον αφορά την επίτευξη υψηλής ευαισθησίας για την εύρεση και ανάλυση μεγαλύτερου εύρους ενώσεων PFC [6].

Έτσι η ανάλυση για PFOS πραγματοποιήθηκε με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία με όργανο Agilent Technologies 1200 με 6110 Series Single Quadrupole LC/MS. 10 μ L από την εκχύλιση ορίστηκαν ως ο όγκος έγχυσης και εισάγονται σε αναλυτική στήλη Betasil C18 (Μήκους 100mm, Μέγεθος σωματιδίων 5 μ m , i.d. = 2.1 mm) που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό και είναι ρυθμισμένη θερμοστατικά στους 40°C.

Οι μεταβλητές αναλυτικές συνθήκες αποτελούνται από 1mM υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου και μεθανόλης. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης είναι 0.200 mL/min. Ο διαλύτης έκλουσης ξεκινά με 40% μεθανόλη και 60% οξικό αμμώνιο για 2 λεπτά και ύστερα συνεχίζει με 40% οξικό αμμώνιο και ύστερα για διάρκεια ακόμη 10 λεπτών μειώνεται στο 10% οξικού αμμωνίου και τελικά μένει σταθερός για 2 λεπτά για να καταλήξει και πάλι σε ποσοστό 60 % οξικού αμμωνίου (αρχικές συνθήκες) αφήνοντας 4 λεπτά ως χρόνο σταθεροποίησης.

Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με αρνητικό ηλεκτροψεκασμό (negative electrospray multimode source). Οι βέλτιστες συνθήκες είχαν ως εξής : πίεση αέριου ψεκαστήρα 30 psi, ταχύτητα ροής ξηρού αέρα (drying gas temperature) και θερμοκρασία 12.0 L/min και 350 °C αντίστοιχα, τριχοειδές δυναμικό στα 3500V και δυναμικό μοριακού θραύσματος τέθηκε στα 140V.

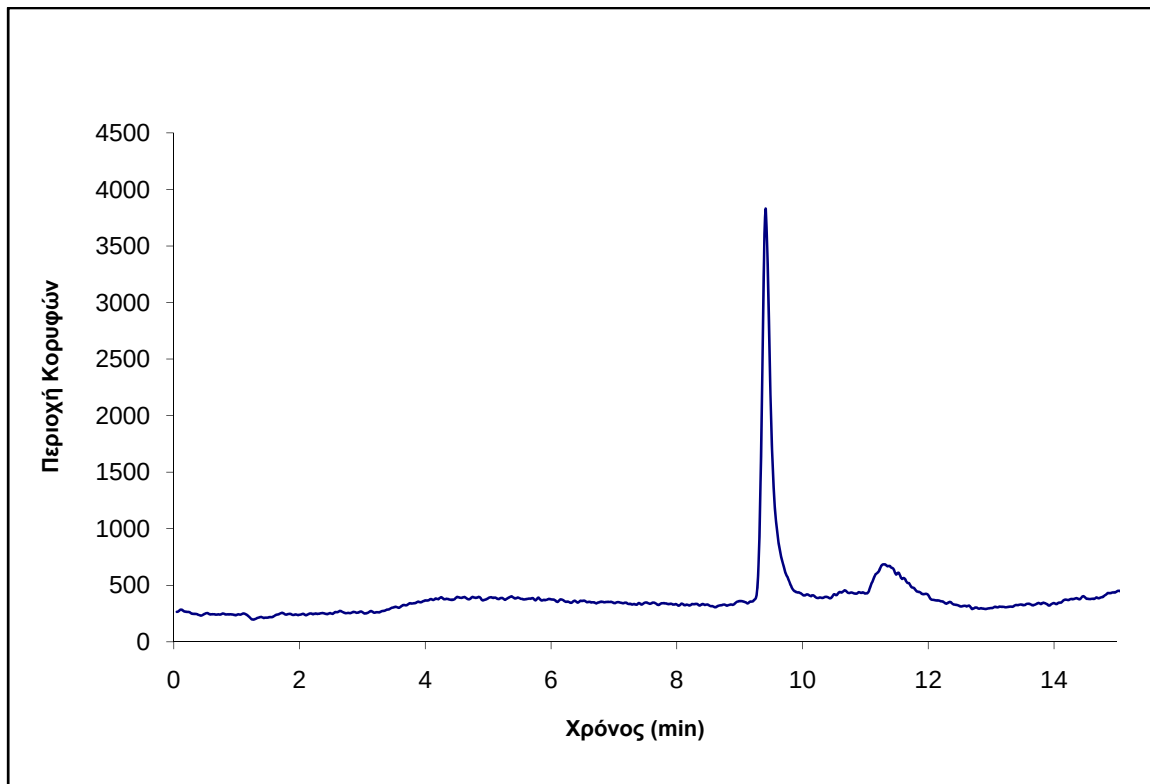
Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι διαλύτες και τα ποσοστά έκλυσης:

Πίνακας 4 : Βαθμιαία Μεταβολή της Σύνστασης Μίγματος Διαλυτών

Χρόνος	% 1 mM NH ₄ OAc in Nanopure water	% MeOH
0	60	40
2	40	60
12	10	90
14	10	90
16	60	40

Στο διάγραμμα 1 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του διαχωρισμού των ενώσεων PFOS οι οποίες εκλύονται σε χρόνο 9.6 λεπτών. Το χρωματογράφημα αντιπροσωπεύει τη χρήση των βέλτιστων συνθηκών : 50μl οκτανόλης εισάχθηκαν σε 20ml υδατικού διαλύματος και προστέθηκαν 500ppt ένωσης PFOS. Μετά την ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια οργάνου ανάδευσης τύπου Vortex για 2 λεπτά στα 2500rpm ακολούθησε φυγοκέντριση για 2 λεπτά στα 3500 rpm ώστε να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων.

Το χρωματογράφημα σε συγκέντρωση PFOS ίση με 1 ppt ύστερα από την αναλυτική διαδικασία είναι της μορφής :



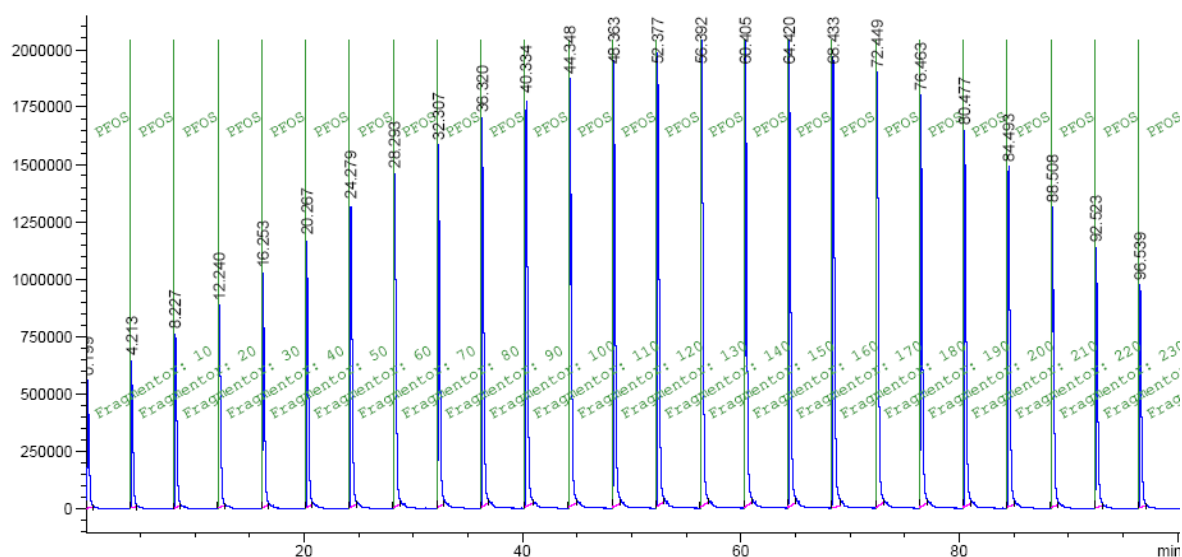
Διάγραμμα 1 : Χρωματογράφημα στο LC/MS της ένωσης PFOS συγκέντρωσης 1 ppb με χρόνο έκλουσης 9.5min.

10.2 Βελτιστοποίηση Διασύνδεσης και Παραμέτρων Ανίχνευσης MS:

Δυναμικό Μοριακού Θραύσματος: Είναι το δυναμικό που εφαρμόζεται μεταξύ του τέλους μεταφοράς στον τριχοειδή σωλήνα και της διάταξης που διαχωρίζει αυτή την ενδιάμεση περιοχή πίεσης από την περιοχή κενού του τετράπολου (quadrupole) αναλυτή μάζας και είναι η παράμετρος με τη μεγαλύτερη επιρροή τόσο στη συνολική ευαισθησία του οργάνου όσο και στην εμφάνιση του φάσματος. Οι αναλυόμενες ουσίες επιταχύνονται από το δυναμικό μοριακού θραύσματος στην ενδιάμεση περιοχή κενού όπου συγκρούονται με τα υπόλοιπα μόρια αζώτου του αέρα (dry gas) ενισχύοντας τη θραύση(fragmentation). Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως (in-source) collision-induce dissociation (CID).

Η βελτιστοποίηση του δυναμικού μοριακού θραύσματος πραγματοποιήθηκε εισάγοντας 20μl από τα πρότυπα διαλύματα ξεχωριστά κάθε 2 λεπτά στη λειτουργία ροής(flow injection mode), διαπερνώντας τη χρωματογραφική στήλη.

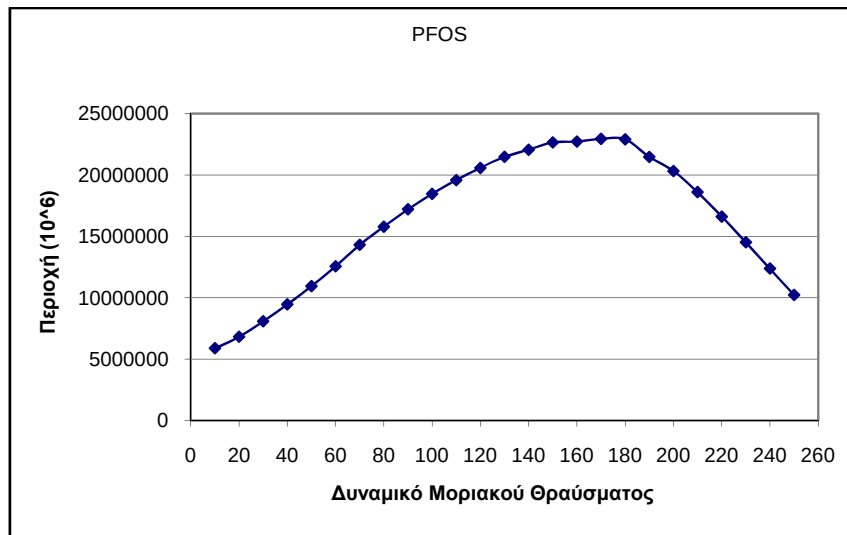
FIA (Flow Injection Analysis): Αποτελεί την έγχυση δείγματος σε ροή αντιδραστηρίου και έχει την ακόλουθη μορφή:



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα FIA για ενώσεις PFOS (FIAGram of PFOS) (επαναλαμβανόμενες εγχύσεις στη λειτουργία FIA που διαπερνούν την αναλυτική στήλη για τη μεταβολή του δυναμικού μοριακού θραύσματος σε εύρος 10-250V, με αναλογία $m/z = 499$).

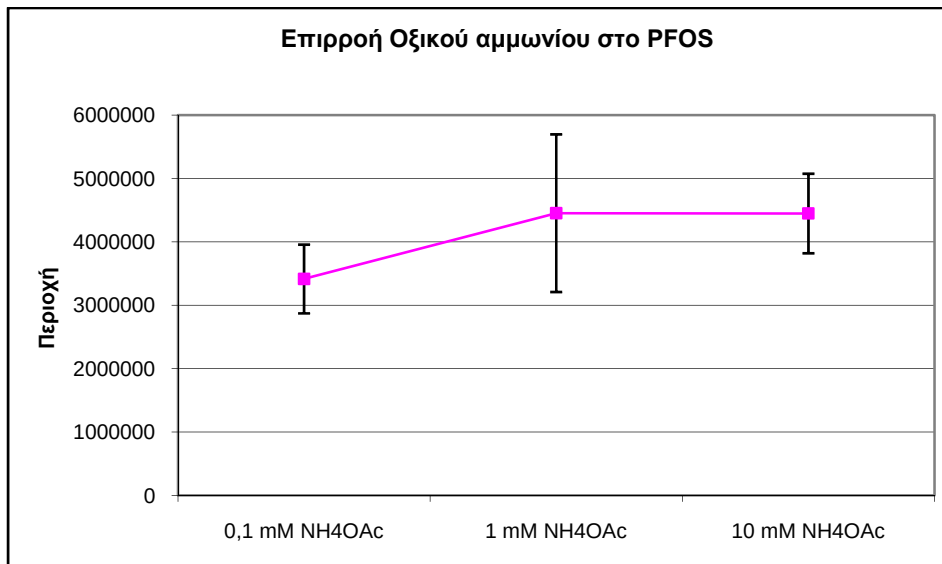
Η επιρροή του δυναμικού μοριακού θραύσματος στα σήματα των ενώσεων PFOS φαίνεται στα διαγράμματα που ακολουθούν.

Το βέλτιστο δυναμικό μοριακού θραύσματος τέθηκε στα 140V για την PFOS ένωση.

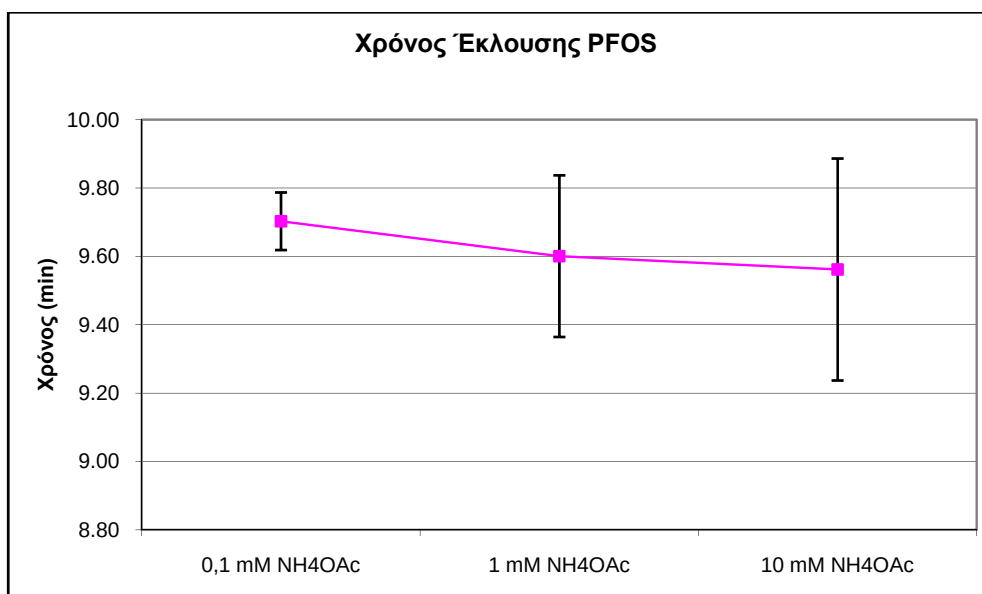


Διάγραμμα 3. Επιρροή του δυναμικού μοριακού θραύσματος στην μέγιστη απόκριση του PFOS ($m/z = 499$). Αναλυτικές Συνθήκες: Electrospray-MS; θερμοκρασία ξηρού αζώτου τέθηκε στους 350°C , ρυθμός παροχής στην περιοχή τριχοειδούς στα 12L/min , δυναμικό τριχοειδούς στα 3500V , εύρος δυναμικού μοριακού θραύσματος $10\text{-}250\text{V}$. Μεταβλητή φάση, 1 mM ammonium acetate σε νερό/μεθανόλη ($60/40, \text{v/v}$) με παροχή 0.3 mL/min .

Η επιρροή της κινητής φάσης της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου στο σήμα του PFOS ερευνάται στο Διάγραμμα 4. Παρόλο που το υψηλότερο σήμα εξασφαλίστηκε με συγκέντρωση των 10 mM οξικού αμμωνίου (ammonium acetate), εν τέλει επιλέχθηκε το 1 mM ως συμβιβασμός μεταξύ έντασης του σήματος και διαχωρισμού των κορυφών.



Διάγραμμα 4 .Επιρροή της συγκέντρωσης του οξικού αμμωνίου [(ammonium acetate) κινητής φάσης] στην απόκριση των κορυφών PFOS ($m/z = 499$). Αναλυτικές Συνθήκες: Electrospray-MS; θερμοκρασία ξηρού αζώτου τέθηκε στους 350°C, ρυθμός παροχής στην περιοχή τριχοειδούς στα 12L/min, δυναμικό τριχοειδούς στα 3500V, C. Μεταβλητή φάση, 1 mM ammonium acetate σε νερό/μεθανόλη (60/40, v/v) με παροχή 0.3 mL/min.



Διάγραμμα 5: Επιρροή της συγκέντρωσης οξικού αμμωνίου [(ammonium acetate) κινητής φάσης] στην απόκριση των κορυφών PFOS ($m/z = 499$). Αναλυτικές Συνθήκες: Electrospray-MS; θερμοκρασία ξηρού αζώτου τέθηκε στους 350°C, ρυθμός παροχής στην περιοχή τριχοειδούς στα 12L/min, δυναμικό τριχοειδούς στα 3500V, εύρος δυναμικού μοριακού θραύσματος 10-250V. Μεταβλητή φάση, 1 mM ammonium acetate σε νερό/μεθανόλη (60/40, v/v) με παροχή 0.3 mL/min.

10.3 Βελτιστοποίηση Μεθόδου: Παράμετροι που επηρεάζουν τη μέθοδο υγρής μικρό-εκχύλισης

Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου ορισμένες πειραματικές παράμετροι εξετάστηκαν και ακολούθως επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για τη διεξαγωγή της μεθόδου.

10.3.1 Επιλογή οργανικού διαλύτη

Ένα σημαντικό βήμα για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου είναι η επιλογή του καταλληλότερου οργανικού διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή της μικρό-εκχύλισης, καθώς ο διαλύτης εκχύλισης πρέπει να έχει άριστη συμπεριφορά κατά τη χρωματογραφική ανάλυση. Εξετάστηκαν διάφοροι διαλύτες (τολουένιο, εξάνιο, δεκάνιο, οκτάνιο, οκτανόλη) οι οποίοι διέφεραν ως προς την πολικότητα και τη διαλυτότητα τους στο νερό.

Η τελική επιλογή θα πρέπει να πραγματοποιείται μετά από σύγκριση της εκλεκτικότητας, της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, την πιθανότητα διάσπασης της σταγόνας, του ποσοστού διάλυσης της σταγόνας και του επιπέδου τοξικότητας.

Σε 20 ml δείγματος υπερκάθαρου νερού με προσθήκη 500 ppt της ουσίας PFOS, (σε pH ίσο με 2) προσθέτουμε και 50 μl από κάθε διαλύτη.

Ύστερα τοποθετήθηκε το φιαλίδιο για 2 λεπτά στο όργανο ανάδευσης τύπου Vortex στα 2500rpm και για 2 λεπτά στη φυγόκεντρο στα 3500 rpm.

Παρατηρήθηκε ότι ο μόνος διαλύτης με τον οποίο ήταν δυνατός ο σχηματισμός της σταγόνας στην επιφάνεια του υδατικού διαλύματος, έγινε εφικτή η διαδικασία της μικρό – εκχύλισης και η ανάκτηση της σταγόνας ήταν η οκτανόλη, οπότε και αυτή επιλέχθηκε ως ο βέλτιστος διαλύτης στην προκειμένη μέθοδο ανάλυσης PFOS.

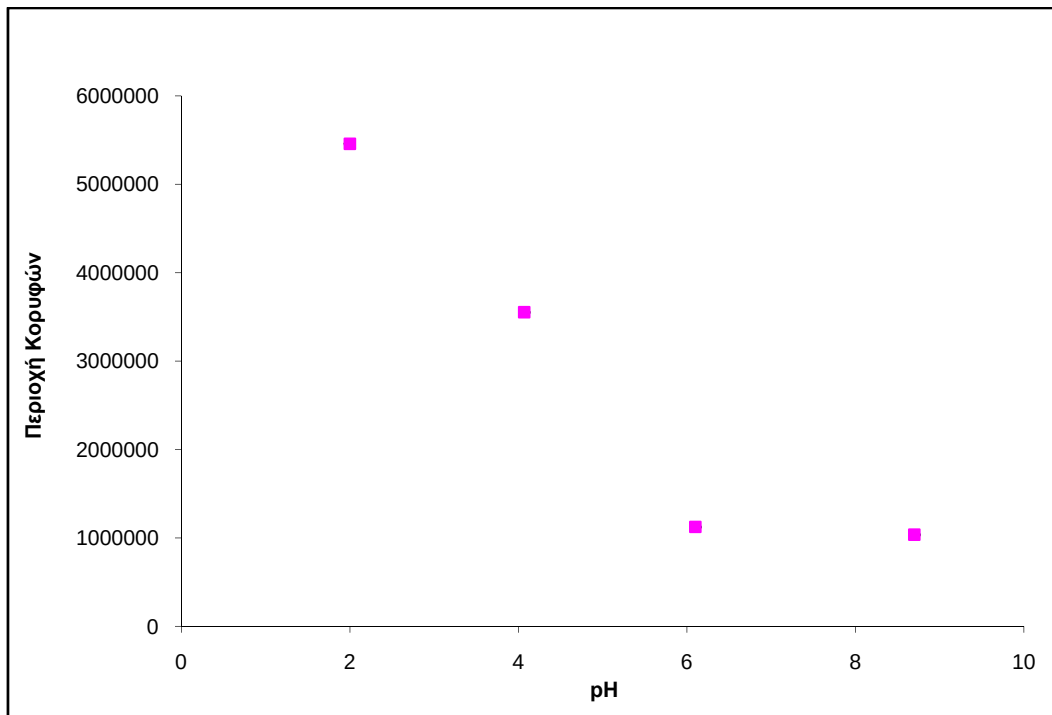
10.3.2 Επίδραση του pH

Είναι ευρέως γνωστό ότι το pH επηρεάζει σημαντικά τον καταμερισμό υδροφοβικών χημικών ενώσεων στην οκτανόλη και τη διαλυτότητα όξινων ή βασικών ενώσεων και μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης δηλαδή αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές παραμέτρους για τη βελτιστοποίηση της μικροεκχύλισης. Έτσι δοκιμάστηκαν αρκετές τιμές pH ώστε να καθιερωθεί η βέλτιστη τιμή. Σε 20 ml δείγματος υπερκάθαρου νερού στο οποίο έχει γίνει προσθήκη 500 ppt ένωσης PFOS, ρυθμίστηκε το pH στις τιμές 2,0 , 4,1 , 6,1 και 8,7 . Ακολούθησε έκθεση στους υπέρηχους για 1 λεπτό και ύστερα προστέθηκαν 50μl οκτανόλης, ακολούθησαν 2 λεπτά στο όργανο ανάδευσης τύπου Vortex στα 2500 rpm και 2 λεπτά στη φυγόκεντρο στα 3500 rpm.

Παρατηρήθηκε ύστερα από τη χρωματογραφική ανάλυση ότι η προσαρμογή του pH σε όξινες τιμές ευνοεί την αύξηση της απόκρισης του μηχανήματος. Επειδή το pKa της ένωσης PFOS είναι 2.80, σε χαμηλές τιμές του pH ($\text{pH} < 2.80$) η ένωση PFOS θα είναι πλήρως πρωτονιωμένη και έχει την τάση να κατανέμεται περισσότερο στην οργανική φάση της οκτανόλης. [28].

Υπάρχει σημαντική επίδραση του pH στην κατανομή της ένωσης PFOS στην οκτανόλη και παρατηρήθηκε μειωμένη απόδοση της εκχύλισης σε τιμές του pH μεγαλύτερες του 2. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να γίνεται αλλαγή στο pH των υδατικών δειγμάτων.

Η βέλτιστη τιμή του pH για τη συγκεκριμένη ουσία επιλέχθηκε να είναι η τιμή 2 όπως φαίνεται και από το ακόλουθο διάγραμμα :



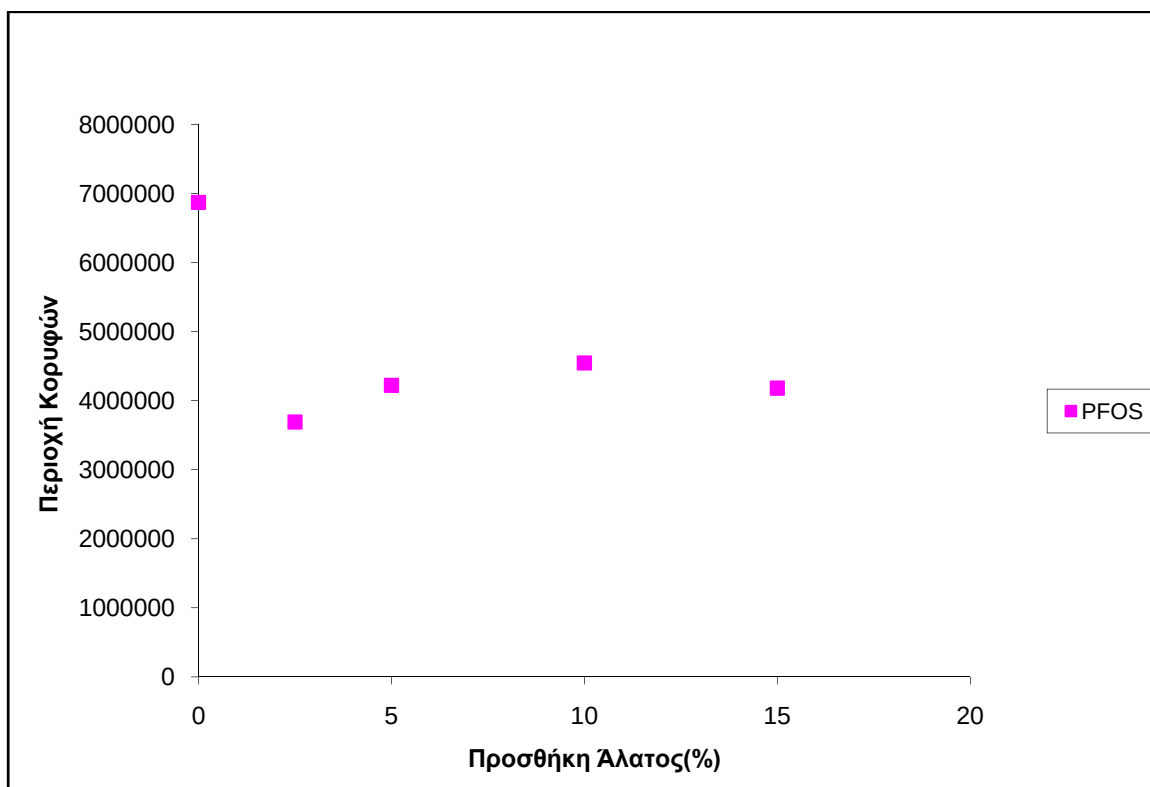
Διάγραμμα 6 :Επίδραση του pH στην αποδοτικότητα της μικρό –εκχύλισης

10.3.3 Προσθήκη Άλατος

Ανάλογα με τη φύση των ενώσεων, η προσθήκη αλάτων στο διάλυμα μπορεί περιορίσει ή να αυξήσει την εκχύλιση. Μια σειρά από δείγματα 20 ml υπερκάθαρου νερού (pH ίσο με 2) στα οποία έχει γίνει προσθήκη PFOS συγκέντρωσης 500 ppt, τοποθετήθηκαν διαφορετικές ποσότητες αλατιού σε εύρος από 0 έως 15% w/v .Ακολούθησε έκθεση στους υπέρηχους για 1 λεπτό. Προστέθηκαν 50μl οκτανόλης, και ύστερα από 2 λεπτά στο όργανο ανάδευσης (τύπου Vortex) στα 2500 rpm και 2 λεπτά στη φυγόκεντρο στα 3500 rpm.

Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος των δειγμάτων οδήγησε στη μείωση PFOS στην οργανική φάση της οκτανόλης, δηλαδή η προσθήκη άλατος ευνοεί τη διαλυτότητα της ένωσης στο νερό (salting-in effect). Συνεπώς η απόδοση της εκχύλισης δεν ενισχύεται με την προσθήκη άλατος και για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να μην προστίθεται αλάτι στο υδατικό διάλυμα .

Στην ανάλυση δηλαδή φάνηκε ότι με την προσθήκη ακόμη και μικρής ποσότητας άλατος μειώνεται η απόδοση της μεθόδου κατά πολύ.



Διάγραμμα 7: Επίδραση της Προσθήκης Αλατος (%) στην αποδοτικότητα της μικρό εκχύλισης

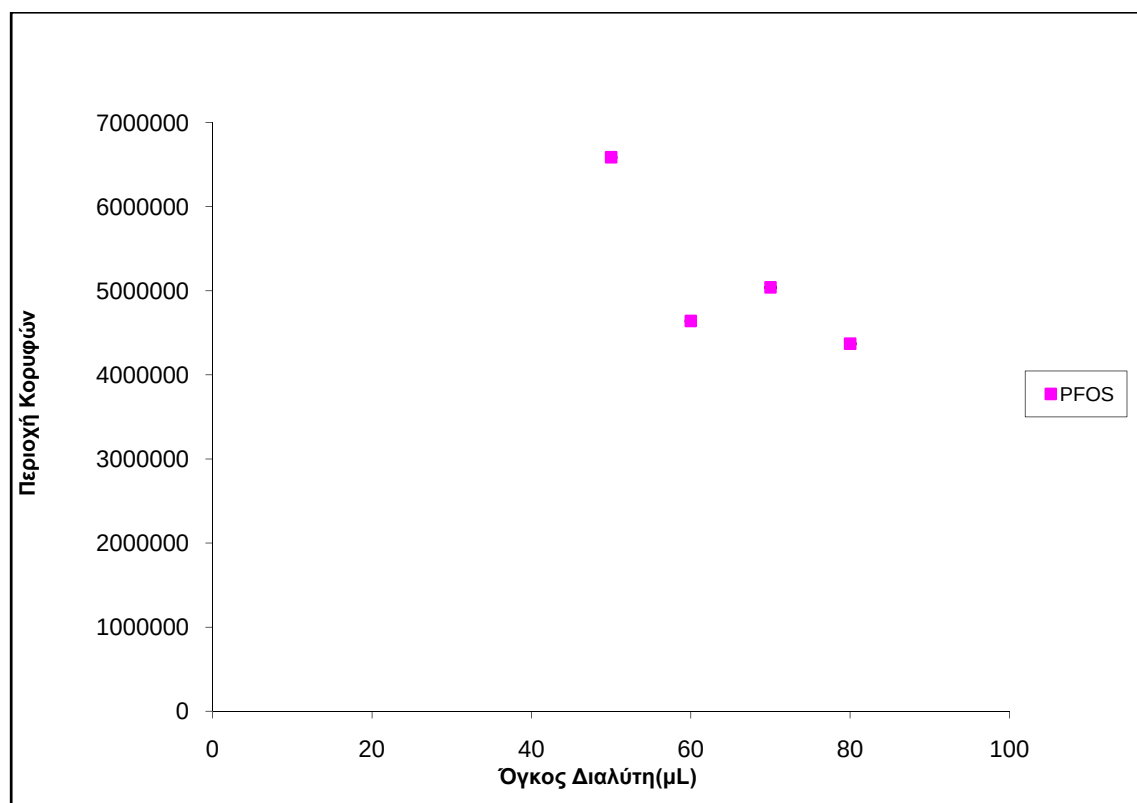
10.3.4 Επιλογή Όγκου Διαλύτη

Ο όγκος του διαλύτη που χρησιμοποιείται έχει σημασία καθώς επηρεάζει τη χρωματογραφική ανάλυση και τη συγκέντρωση της ουσίας.

Σε σειρά διαλυμάτων υπερκάθαρου νερού ποσότητας 20 ml (pH ίσο με 2) πραγματοποιήθηκε προσθήκη ουσίας PFOS συγκέντρωσης 500 ppt. Ακολούθησε έκθεση του δείγματος στους υπέρηχους για 1 λεπτό και ύστερα προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων του διαλύτη. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 50 , 60 , 70 , 80 μ L οκτανόλης αντίστοιχα και τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 2 λεπτά στο όργανο ανάδευσης τύπου Vortex στα 2500 rpm και στη φυγόκεντρο για 2 λεπτά στα 3500 rpm.

Αποφεύχθηκε η προσθήκη ποσότητας οκτανόλης μικρότερης των 50 μ l καθώς η ανάκτηση τουλάχιστον 30 μ l δεν ήταν πάντα δυνατή εξαιτίας της διάλυσης της οκτανόλης στην υδατική φάση. Όπως όμως ήταν αναμενόμενο τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση της ποσότητας του διαλύτη πάνω από τα

50μl μειώνει την απόκριση του μηχανήματος εξαιτίας της μειωμένης τελικής συγκέντρωσης της κύριας ένωσης (PFOS) στην οργανική φάση της οκτανόλης Έτσι επιλέχθηκε ως βέλτιστη τιμή του όγκου διαλύτη αυτή των 50 μl.



Διάγραμμα 8: Επίδραση της ποσότητας διαλύτη στην αποδοτικότητα της Μεθόδου

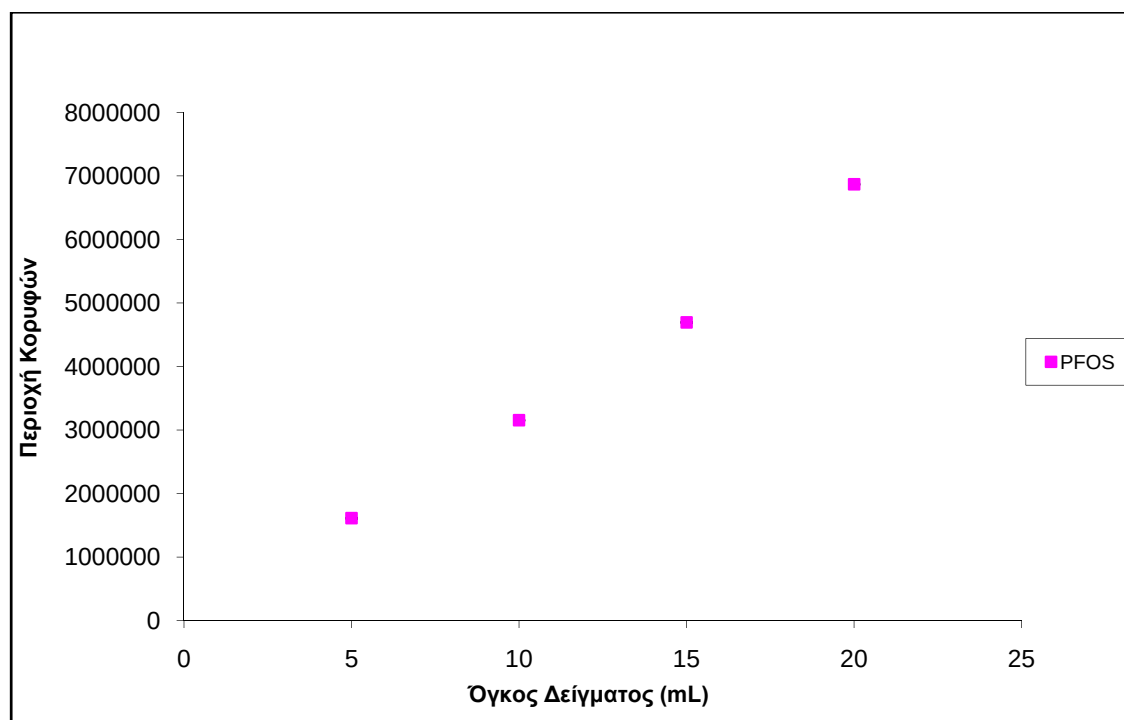
10.3.5 Επιλογή Όγκου Υδατικού Διαλύματος

Χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη παράμετρο φιαλίδια των 20 ml τα οποία περιείχαν διαφορετικές ποσότητες υπερκάθαρου νερού : 5 , 10 , 15 και 20 ml αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη 500 ppt ουσίας PFOS και τοποθετήθηκαν τα δείγματα στους υπέρηχους για 1 λεπτό.

Προστέθηκαν 50μL οκτανόλης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο όργανο ανάδευσης τύπου Vortex για 2 λεπτά στα 2500 rpm και αργότερα στη φυγόκεντρο για 2 λεπτά στα 3500 rpm.

Παρατηρήθηκε ότι αυξάνοντας τον όγκο του υδατικού διαλύματος αυξάνεται εμφανώς και η συνολική μάζα της κύριας ουσίας (PFOS) που μπορεί να εκχυλιστεί αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο και την απόδοση της

μικρόεκχύλισης . Έτσι επιλέχθηκαν τα 20 ml ως όγκος υδατικού διαλύματος για όλα τα πειράματα.



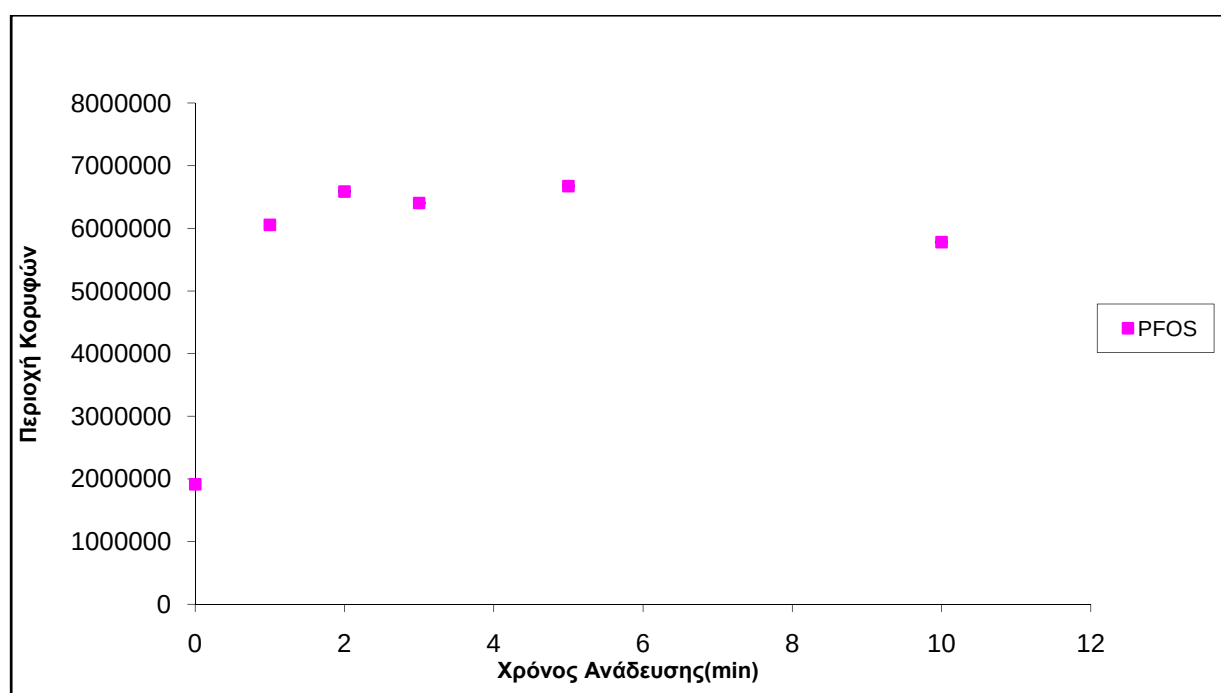
Διάγραμμα 9: Επίδραση του όγκου υδατικού διαλύματος στην αποδοτικότητα της μεθόδου

10.3.6 Επιλογή Χρόνου Ανάδευσης τύπου Vortex

Η ανάδευση του δείγματος αυξάνει γενικά την εκχύλιση και μειώνει το χρόνο που απαιτείται για να φτάσει το σύστημα σε κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας. Παρατηρήθηκε ότι η χρήση του οργάνου ανάδευσης τύπου Vortex αύξησε δραματικά την αναλυτική απόκριση του οργάνου LC/MS για όλες τις περιπτώσεις. Σε δείγμα 20ml υπερκάθαρου νερού πραγματοποιήθηκε προσθήκη ουσίας PFOS συγκέντρωσης 500 ppt και μετά από παραμονή στους υπέρηχους για 1 λεπτό , προστέθηκαν 50μl οκτανόλης. Προκειμένου να βρεθεί ο βέλτιστος χρόνος ανάδευσης για την επίτευξη ισορροπίας στο δείγμα εξετάστηκε η επίδραση των παρακάτω χρόνων ανάδευσης : 0 , 2 , 3 , 4 , 5 και 10 λεπτά στα 2500 rpm ενώ μετά τοποθετήθηκαν τα δείγματα στη φυγόκεντρο για 2 λεπτά στα 3500 rpm.

Η ανάδευση χρησιμοποιείται για την επιτάχυνση της εκχύλισης της ένωσης από την υδατική στην οργανική φάση για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση της. Με την ανάδευση αυξάνει η επιφάνεια επαφής των μορίων της κύριας ουσίας και των μορίων της οργανικής φάσης. Με την αύξηση του χρόνου ανάδευσης τύπου Vortex επιτυγχάνεται μεγαλύτερη μεταφορά μάζας της ένωσης υπό ανάλυση μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία.

Έτσι ο βέλτιστος χρόνος όπως φαίνεται και στο γράφημα 10 κρίθηκε αυτός των 2 λεπτών .



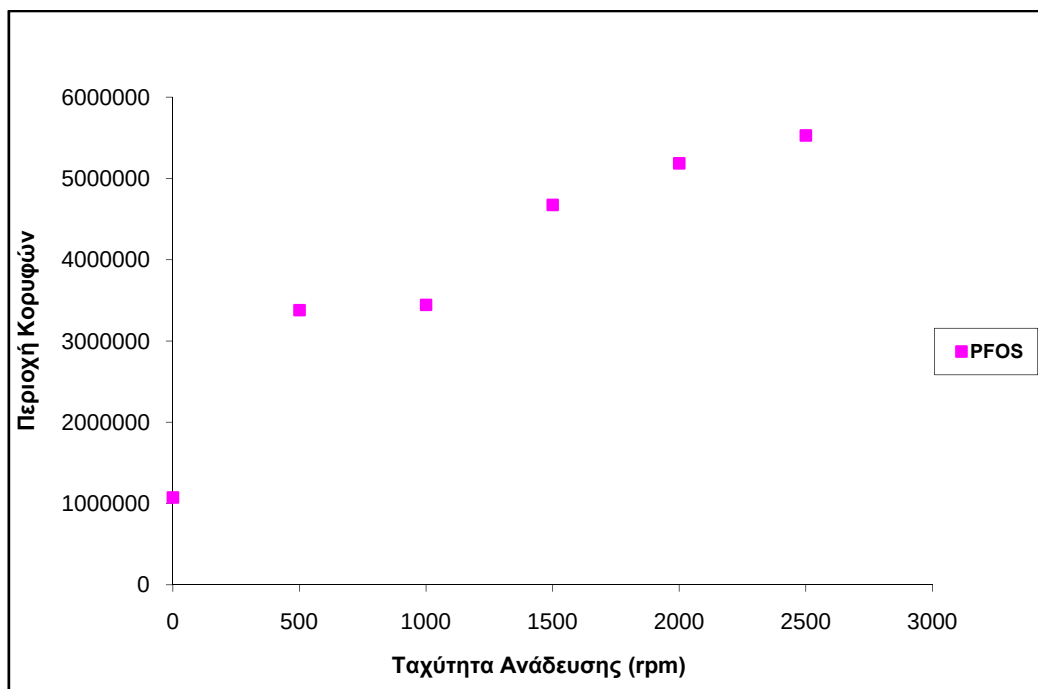
Διάγραμμα 10: Επίδραση Χρόνου Ανάδευσης στην αποδοτικότητα της Μεθόδου

10.3.7 Επιλογή Ταχύτητας Ανάδευσης τύπου Vortex

Για τη μελέτη της επίδρασης του ρυθμού ανάδευσης στην ανάλυση της ένωσης PFOS, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με την ταχύτητα του οργάνου ανάδευσης (Vortex) ώστε να βρεθεί η βέλτιστη. Δείγματα 20ml υπερκάθαρου νερού με προσθήκη ουσίας PFOS συγκέντρωσης 500ppb, παρέμειναν στους υπέρηχους για 1 λεπτό, τους προστέθηκαν 50μl οκτανόλης και τοποθετήθηκαν στο όργανο ανάδευσης τύπου Vortex για 2 λεπτά στις ακόλουθες ταχύτητες : 0 , 500 , 1000 , 1500 , 2000, 2500 rpm .

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης η απόδοση της εκχύλισης αυξανόταν με την αύξηση του ρυθμού ανάδευσης. Με την αύξηση της ταχύτητας δημιουργούνται μικρότερα σταγονίδια στην οργανική φάση της οκτανόλης και έτσι αυξάνεται η συνολική διεπιφάνεια νερού – οκτανόλης άρα επιτυγχάνεται μεγαλύτερη μεταφορά μάζας. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 11 αυξάνοντας την ταχύτητα από 0 έως 1500 rpm παρουσιάστηκε αξιοσημείωτη αύξηση στην απόκριση του μηχανήματος όμως η μέγιστη εμφανίζεται να είναι στα 2500 rpm

Έτσι επιλέχθηκε ως βέλτιστη ταχύτητα αυτή των 2500 rpm.



Διάγραμμα 11: Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης στην αποδοτικότητα της μεθόδου.

11. Απόδοση της Μεθόδου (Method Performance)

11.1 Γραμμικότητα (Linearity)

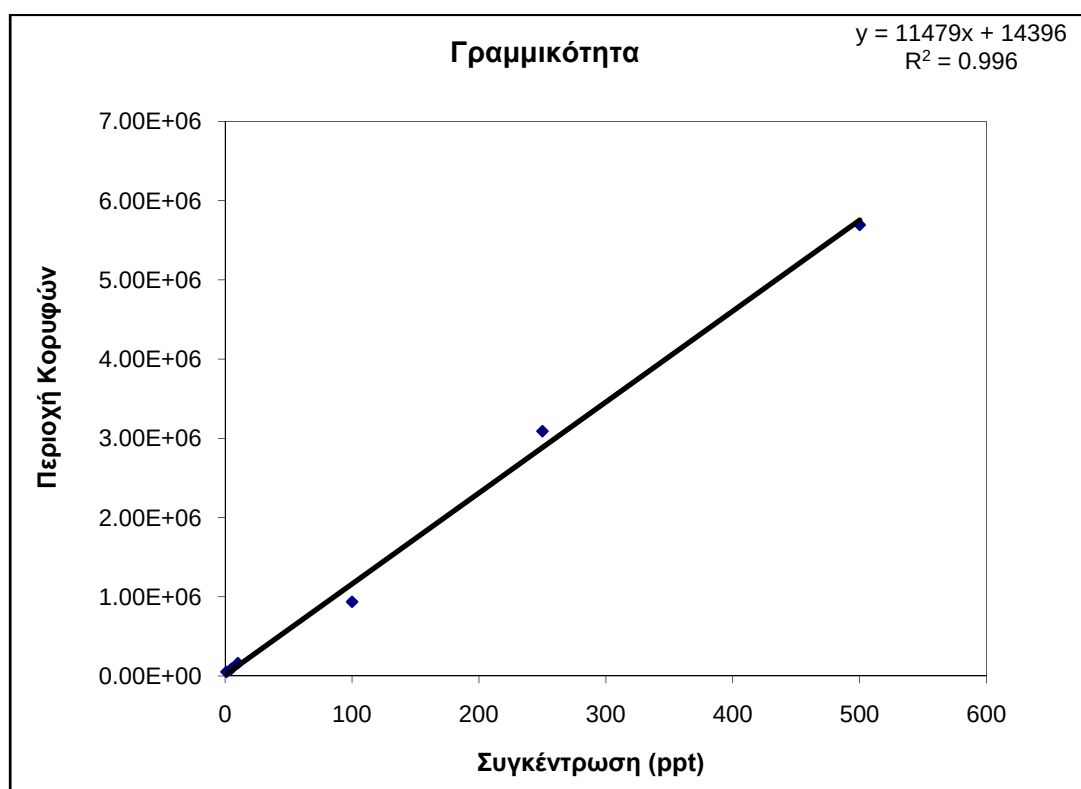
Για τη διερεύνηση της γραμμικότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις των ενώσεων PFOS: 1, 5, 10, 100, 250, 500ppt.

Η τυπική απόκλιση (Standard Deviation – stdev) προκύπτει από το λόγο της τιμής (Area κάθε Δείγματος)/(Μέση Τιμή Δειγμάτων) ενώ η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation – RSD) ορίζεται για μια σειρά μετρήσεων ίση με το λόγο της (τυπικής απόκλισης)/(μέση τιμή) και εκφράζεται επί τοις εκατό (RSD %).

Πίνακας 5 : Διερεύνηση Γραμμικότητας

Συγκέντρωση (ppt)	Σχετική Τυπική Απόκλιση (%) (Relative Standard Deviation)
0	15,9
1	7,01
5	23,2
10	0,3
100	13,2
250	10,1
500	7,6

Η γραμμικότητα της μεθόδου κρίνεται άριστη για τις ενώσεις PFOS με συντελεστές συσχέτισης $r^2 = 0.9962$.



Διάγραμμα 12 : Παρουσίαση Γραμμικότητας της Μεθόδου

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) των ενώσεων PFOS υπολογίστηκαν κάνοντας χρήση των καμπυλών βαθμονόμησης (γραμμικότητα) και κυμάνθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων, της τάξης του 1 ppt (ng/L). Εκφράζονται ως το γινόμενο της τυπικής απόκλισης πολλαπλασιασμένο επί 3 και βρέθηκαν στην τιμή του 0,01 ppt (ng/L) .

Αντίστοιχα τα όρια ποσοτικοποίησης των ενώσεων PFOS υπολογίστηκαν ως το γινόμενο της τυπικής απόκλισης επί 10 και βρέθηκε στα 0,02 ppt (ng/L).

11.2 Επαναληψιμότητα Μεθόδου (Repeatability)

Η επαναληψιμότητα ελέγχθηκε με βάση τις βέλτιστες συνθήκες σε πέντε (5) ξεχωριστά δείγματα. Αναλυτικότερα: δείγματα 20 ml υπερκάθαρου νερού, με pH ίσο με 2, με προσθήκη 500 ppt ουσίας PFOS, έχουν τοποθετηθεί στον υπέρηχο για 1 λεπτό, τους έχουν προστεθεί 50μl οκτανόλης και έχουν τοποθετηθεί στο όργανο ανάδευσης (τύπου Vortex) για 2 λεπτά στα 2500rpm αλλά και στη φυγόκεντρο για 2 λεπτά στα 3500rpm. Η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation – RSD) για τη συγκέντρωση αυτή υπολογίστηκε όπως αναφέρεται ανωτέρω και βρέθηκε ίση με $RSD = 6.47\%$.

Επίσης πραγματοποιήθηκε ακόμη μια σειρά μετρήσεων προς επαλήθευση της επαναληψιμότητας και πάλι σε σειρά πέντε δειγμάτων ($n=5$). Αυτή τη φορά σε δείγματα 20ml υπερκάθαρου νερού με pH ίσο με 2, στα οποία έχει γίνει προσθήκη 10 ppt ουσίας PFOS, τοποθετήθηκαν στον υπέρηχο για 1 λεπτό, τους προστέθηκαν 50μl οκτανόλης και τοποθετήθηκαν στο όργανο ανάδευσης (τύπου Vortex) για 2 λεπτά στα 2500rpm αλλά και στη φυγόκεντρο για 2 λεπτά στα 3500rpm. Αντίστοιχα η τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης υπολογίστηκε και είναι ίση με $RSD = 7.43\%$.

Στον πίνακα 6 φαίνονται τα παραπάνω αποτελέσματα :

Πίνακας 6 : Επαναληψιμότητα

Συγκέντρωση (ppt)	Σχετική Τυπική Απόκλιση RSD (%)
500	6,47
10	7,43

12. Εφαρμογή Βέλτιστων Συνθηκών σε Περιβαλλοντικά Δείγματα

Η αποτελεσματικότητα και εφαρμοσιμότητα της μεθόδου μικρό-εκχύλισης επηρεάζεται από τη σύνθεση της μήτρας του δείγματος. Έτσι σε δείγματα από : ποτάμι, πηγάδι, νερό βρύσης αλλά και εκροή βιολογικού καθαρισμού προστέθηκαν 100 ppt ένωσης PFOS και αναλύθηκαν κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες. Ο μέσος όρος των μετρήσεων ($n=2$) για την ένωση PFOS σε κάθε ρυπασμένο δείγμα συγκρίθηκε ως προς το μέσο όρο των τιμών ($n=2$) δείγματος υπερκάθολου νερού έτσι ώστε να υπολογιστεί η ανάκτηση για κάθε μήτρα.

Μετρήθηκε η διαφορά του ρυπασμένου δείγματος υπερκάθολου νερού με το μη-ρυπασμένο δείγμα και αντίστοιχα η διαφορά του ρυπασμένο με το μη-ρυπασμένο δείγμα της κάθε μήτρας. Η ανάκτηση της κάθε μήτρας προέκυψε από το λόγο της (διαφοράς συγκέντρωσης των δειγμάτων της κάθε μήτρας) / (τη διαφορά συγκέντρωσης δειγμάτων του υπερκάθολου νερού).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7 η αποτελεσματικότητα της προτεινόμενης μεθόδου για τα δείγματα κρίθηκε πάνω από ικανοποιητική όπως φαίνεται και από τα ποσοστά της ανάκτησης.

Πίνακας 7 : Ανάκτηση PFOS από περιβαλλοντικά δείγματα και δείγματα βιολογικού καθαρισμού.

Δείγματα	Νερό βρύσης	Νερό Ποταμού	Νερό Πηγαδιού	Εκροή Βιολογικού
Ανάκτηση (%)	90,8	95,5	105,1	87,6

13. Συμπεράσματα

Η προτεινόμενη μέθοδος μικροεκχύλισης καθιστά δυνατή την ανάπτυξη μεθόδων άμεσης προετοιμασίας των δειγμάτων ενώ είναι απλή και οικονομική χωρίς να επιβαρύνει την ευαισθησία και ακρίβεια της τεχνικής. Συγκρινόμενη με άλλες μεθόδους διαθέτει επίσης το έμφυτο πλεονέκτημα της επίτευξης των συνθηκών ισορροπίας μέσα σε μόλις λίγα λεπτά ελαχιστοποιώντας το ποσοστό σφαλμάτων. Αποτελεί δηλαδή μια πολλά υποσχόμενη και γρήγορη μέθοδο προετοιμασίας των δειγμάτων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση οργανικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού.

14. Μελλοντικές Κατευθύνσεις

Στην αγορά κυκλοφορούν εκατοντάδες υπερφθοριωμένες ενώσεις. Η χρήση τους οφείλεται στις ειδικές τους ιδιότητες με τις οποίες βρίσκουν πολλές εφαρμογές στο βιομηχανικό και εμπορικό τομέα.

Οι στόχοι στον τομέα του περιβάλλοντος πρέπει να αποσκοπούν ιδίως στη διατήρηση, την προστασία και τη βελτίωση της ποιότητας του περιβάλλοντος, την προστασία της υγείας του ανθρώπου και τη συνετή και ορθολογική χρησιμοποίηση των φυσικών πόρων. Η πολιτική αυτή στηρίζεται στην αρχή της προφύλαξης και στις αρχές της προληπτικής δράσης, της επανόρθωσης των καταστροφών του περιβάλλοντος, κατά προτεραιότητα στην πηγή, καθώς και στην αρχή «ο ρυπαίνων πληρώνει».

Έχοντας υπόψη τη σημαντική μείωση της παραγωγής PFOS μετά το 2000, οι πρώην χρήσεις - που εξακολουθούν ωστόσο να υπάρχουν στην πραγματικότητα - μπορεί να αντιπροσωπεύουν τη μεγαλύτερη πηγή εκπομπών.

Για να προστατευθούν τόσο οι άνθρωποι όσο και το συνολικό οικοσύστημα από αυτές τις επικίνδυνες ιδιότητες και τις συνέπειες των ενώσεων αυτών πρέπει η χρήση τους να περιοριστεί ή να απαγορευτεί έτσι ώστε να ενισχυθεί η παγκόσμια προσπάθεια για τη μείωση των ενώσεων αυτών και τον αφανισμό τους από προϊόντα ως το 2015, σαν πρώτο βήμα.

Το τμήμα Περιβαλλοντικής Προστασίας της πολιτείας του New Jersey συνιστά ότι οι συγκεντρώσεις των ενώσεων PFOS και γενικά PFCs δε θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 40 ppt (ng/L) σε πόσιμα ύδατα έτσι ώστε να αποφευχθούν οι καρκινογενείς -και μη- συνέπειες [13].

Για να αποφευχθεί η απελευθέρωση PFOS από τα προϊόντα αυτά στο περιβάλλον, πρέπει να απογραφούν τα είδη που περιέχουν ή έχουν κατασκευαστεί από τις ενώσεις PFOS. Είναι αναγκαία η λήψη μέτρων περιορισμού του κινδύνου για την αποφυγή της επανεμφάνισης παλαιότερων χρήσεων αλλά και για να αποφευχθεί η περαιτέρω ελευθέρωση PFOS στο περιβάλλον από αυτά που υποβλήθηκαν σε απογραφή [12]. Στην απογραφή πρέπει να περιληφθούν και προϊόντα βασισμένα στο PFOA. Τα μέτρα αυτά πρέπει να αποσκοπούν στην παύση ή στη σταδιακή εξάλειψη απορρίψεων,

εκπομπών και διαρροών των ενώσεων αυτών αλλά και όλων των πρόδρομων ενώσεων(PFOA).

Εξαιρέσεις για ουσιαστικές χρήσεις ως ενδιάμεσου πρέπει να χορηγούνται μόνον για χρήση σε κλειστά ελεγχόμενα συστήματα ενώ όπου είναι αδύνατον να αποφευχθεί η παραγωγή αποβλήτων, τα απόβλητα θα πρέπει να επαναχρησιμοποιούνται ή να ανακτώνται για τα υλικά ή το ενεργειακό τους περιεχόμενο. Παρέκκλιση πρέπει να χορηγείται για ουσιαστικές χρήσεις για περιορισμένο χρονικό διάστημα που θα ορισθεί κατά περίπτωση, εάν οι παρασκευαστές μπορούν να αποδείξουν ότι έχουν καταβάλει κάθε προσπάθεια για να αναπτύξουν ασφαλέστερες εναλλακτικές λύσεις ή εναλλακτικές διεργασίες και ότι αυτές οι εναλλακτικές λύσεις ή διεργασίες εξακολουθούν να μην είναι διαθέσιμες. Δεδομένου ότι οι ιδιότητες των PFOS είναι πολύ επικίνδυνες είναι απαράδεκτο να επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται τα εναπομείναντα αποθέματα εις βάρος του περιβάλλοντος και της υγείας όταν διατίθενται ασφαλέστερες εναλλακτικές δυνατότητες.

Για να εξασφαλισθεί ότι ο περιορισμός ώστε να επιτευχθεί η εξάλειψη έχει αποτέλεσμα, το κατώτατο όριο για τις ενώσεις PFOS στα διάφορα είδη πρέπει να μειωθεί σε 0,001%.

Όσον αφορά ηλεκτρονικά απόβλητα μέχρις ότου σημειωθεί επιστημονική και τεχνολογική πρόοδος και αναπτυχθούν περαιτέρω οι αναλύσεις του κύκλου ζωής, η επαναχρησιμοποίηση και η ανάκτηση υλικών θα πρέπει να προτιμώνται, όπου και στο βαθμό που είναι οι περιβαλλοντικώς άριστες επιλογές. Οι βέλτιστες διαθέσιμες τεχνικές επεξεργασίας, αξιοποίησης και ανακύκλωσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υπό τον όρο ότι εξασφαλίζουν την προστασία της ανθρώπινης υγείας καθώς και μια υψηλού επιπέδου προστασία του περιβάλλοντος [26].

Βιβλιογραφία

- [1] M.Villagrasa, M. Lopez de Alda, D. Barcelo, Anal. Bioanal. Chem. (2006) 386: 953-972 REVIEW.
- [2] C. Gonzalez-Barreiro, E.Martinez-Carballo, A. Sitka, S. Scharf, O.Gans, Anal. Bioanal. Chem. (2006) 386: 2123-2132.
- [3] M.K. So, Y. Miyake, W.Y. Yeung, Y.M. Ho, S. Taniyasu, P. Rostkowski, N. Yamashita, B.S. Zhou, X.J. Shi, J.X. Wang, J.P. Giesy, H. Yu, P.K.S. Lam, Chemosphere 68 (2007) 2085-2095.
- [4] D. Skutlarek, M.Exner, H.Faerber, Environ. Sci. Pollut. Res. 13 (5) 299-307 (2006) Research Articles.
- [5] Chiao-Li Tseng, Li-Lian Liu, Chien-Min Chen , Wang-Hsien Ding , J. Chromatography A , 1105 (2006) 119-126.
- [6] M. Petrovic, D. Barcelo, Trends in Analytical Chemistry, Vol.23, No. 10-11, 2004.
- [7] K.Inoue, F.Okada, R. Ito, M.Kawaguchi, N.Okanouchi, H. Nakazawa, J. Chromatography B, 810 (2004) 49-56.
- [8] R.Alzaga, J. Maria Bayona, J. Chromatography A, 1042 (2004) 155-162.
- [9] K.Van de Vijver, L. Holsbeek, K.Das, R. Blust, C. Joiris, W. de Coen, Environ. Sci. Technol. 2007, 41, 315-320.
- [10] N.Rontu, V.Vaida, II Phys. Chem. C. 2007, 111 ,9975-9980
- [11] C.M. Butt, S.A.Mabury, D.C.G. Muir, B. M. Braune, Environ.Sci. Technol. 2007,41, 3521-3528.
- [12] ΣΧΕΔΙΟ ΕΚΘΕΣΗΣ σχετικά με την πρόταση οδηγίας του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου που αφορά περιορισμούς κυκλοφορίας στην αγορά και χρήσης σουλφονικών υπερφθοροοκτανίων (τροποποίηση της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου) (COM(2005)0618 – C6-0418/2005 – 2005/0244(COD)), Επιτροπή

Περιβάλλοντος, Δημόσιας Υγείας και Ασφάλειας των Τροφίμων.

- [13] S.Nakayama, M.J. Strynar , L.Helfant, P. Egeghy, X. Ye, A.B. Lindstrom, Environ.Sci.Technol. 2007 , 41 , 5271-5276.
- [14]Εκθεση- άρθρο του WWF
http://www.wwf.gr/index.php?option=com_content&task=view&id=169&Itemid=103
- [15] S. Richardson, Anal. Chem. 2006, 78, 4021, National Exposure Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Athens, Georgia
- [16]W.Voelkel, O.G.Boroviczeny , H. Demmelmair, C. Gebauer, B.Koletzko, D.Twardella, U. Raab, H. Fromme , Int.J.Hyg.Environ.-Health, Science Direct.
- [17]M.F.Simcik, K.J. Dorweiler, Environ.Sci.Technol.2005,39, 8678-8683
- [18]K.Prevedouros, I.T.Cousins, R.C. Buck, S.H. Korzeniowski, Critical Review, Department of Applied Environmental Science(ITM), Stockholm University,Sweden.
- [19] http://www.netrino.gr/reloaded/blog-post.php?bp_id=120
- [20] http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_PFOA.htm
- [21]N.Yamashita, S.Taniyasu, G. Petrick, S. Wei, T. Gamo, P.K.S. Lam, K. Kannan, Chemosphere 70 (2008) 1247-1255
- [22]Equilibrium solvent microextraction of alkylphenols and bisphenol-A from water and wastewater samples, ABC-00507-2008, Yiantzi E.,Kalogerakis N.,Tyrovola K.,Psillakis Elefteria.
- [23]Development of a New Orthogonal Geometry Atmospheric Pressure Ionization Interface for LC/MS, Liquid Chromatography/Mass Spectrometry.
- [24] Introduction to mass spectrometry.
- [25] “Pollutant – Solid Phase Interactions”, T. A. T. Aboul-Kassim, B. R. T. Simoneit, SPRINGER, 2001

- [26] ΟΔΗΓΙΑ 2002/96/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 27ης Ιανουαρίου 2003 σχετικά με τα απόβλητα ειδών ηλεκτρικού και ηλεκτρονικού εξοπλισμού (ΑΗΗΕ).
- [27] Developments in single-drop microextraction, E. Psillakis, N. Kalogerakis, Trends in analytical chemistry, vol 21, no.1, 2002.
- [28] Προσδιορισμός δισφαινόλης Α, οκτυλφαινόλης και νονυλφαινόλης σε υδατικά διαλύματα με χρήση της τεχνικής μικρό-εκχύλισης με ελεύθερη σταγόνα.
- [29] (www.epa.gov/oppt/pfoa/pfoarisk.htm)
- [30] Effect of cationic and anionic surfactants on the sorption and desorption of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on natural sediments, Gang Pan, Chengxia Jia, Dongye Zhao, Chun You, Hao Chen and Guibin Jiang.