



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

“Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, οργανοχλωριωμένων ενώσεων που βρίσκονται σε δείγματα νερού”

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΛΑΓΟΥΔΑΚΗΣ

Εξεταστική Επιτροπή:

Ψυλλάκη Ελευθερία (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Καλογεράκης Νικόλαος

Τυροβολά Κωνσταντίνα

Χανιά, 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ (OCP's).....	7
1.1.1 Δομή OCPs.....	8
1.1.2 Φυσικοχημικές Ιδιότητες.....	9
1.1.3 Τρόπος δράσης ουσιών.....	11
1.1.4 Τύχη των ουσιών στόχων στο περιβάλλον.....	11
1.1.5 Επίδραση Lindane και 4,4`-DDE στους ανθρώπους.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	14
ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	14
2.1 Εκχύλιση ενώσεων από δείγματα.....	14
2.1.1 Υγρή – Υγρή Εκχύλιση (Liquid – Liquid Extraction, LLE).....	14
2.1.2 Εκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).....	15
2.2 Μικροεκχύλιση.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	17
ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ.....	17
(SOLID PHASE MICRO-EXTRACTION, SPME).....	17
3.1 Εισαγωγικά.....	17
3.2 Θεωρητικά στοιχεία της μεθόδου SPME.....	18
3.2.1 Στάδια της SPME.....	18
3.2.2 Βασικές Αρχές SPME.....	19
3.2.3 Εφαρμογές της μεθόδου SPME.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	22
ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΗ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗ ΦΑΣΗ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΕΝΟΥ.....	22
(VACUUM-ASSISTED HEADSPACE SOLID PHASE MICRO-EXTRACTION, Vac – HSSPME).....	22
4.1 Θεωρία.....	22
4.2 Ουσίες όπου εφαρμόζεται η Vac-HSSPME.....	23
4.3 Vac-HSSPME: Σύστημα τριών φάσεων.....	24
4.4 Θερμοδυναμική Θεωρία της μεθόδου HSSPME.....	25

4.5 Θεωρία για την επίδραση της πίεσης στην μέθοδο Vac-HSSPME	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	28
5.1 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΙΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ Vac-HSSPME	28
5.1.1 Επίδραση της σταθεράς του Henry	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
5.1.2 Επίδραση της θερμοκρασίας	28
5.1.3 Επίδραση του pH	29
5.1.4 Επίδραση της αλατότητας	29
5.1.5 Επίδραση χρόνου εκχύλισης.....	29
5.1.6 Επίδραση του τύπου της ίνας.....	29
5.1.7 Επίδραση ανάδευσης δείγματος.....	30
5.1.8 Επίδραση όγκου οργανικής φάσης.....	30
5.1.9 Επίδραση χρόνου εκρόφησης.....	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	31
ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ GC	31
6.1 Περιγραφή διαδικασίας.....	31
6.2 Συνθήκες Αέριου Χρωματογράφου	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	34
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	34
7.1 Αντιδραστήρια και Όργανα.....	34
7.2 Όργανα και Συσκευές	34
7.3 Πειραματική Διαδικασία.....	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
8.1 Επίδραση Ιοντικής Ισχύος (NaCl)	37
8.2 Επίδραση του pH	38
8.3 Επίδραση Χρόνου Εκχύλισης	39
8.4 Επίδραση θερμοκρασίας	41
9 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....	44
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	44
Βιβλιογραφία	45

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία ξεκίνησε και τελείωσε μέσα στο ακαδημαϊκό έτος 2012-2013 στο Εργαστήριο Υδατικής Χημείας του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Κατά την διάρκεια εκτέλεσης των πειραμάτων αλλά και της συγγραφής της εργασίας αυτής είχα την συμπαράσταση και την βοήθεια πολλών ατόμων. Γι αυτό τον λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ελευθερία Ψυλλάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν με δέχτηκε ως προπτυχιακό φοιτητή για την εκπόνηση της προπτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την Δρ. Ευαγγελία Γιαντζή και την Δρ. Κωνσταντίνα Τυροβολά για όλη την βοήθεια και συμπαράσταση που μου έδωσαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Επιπλέον, δεν θα μπορούσα να παραλείψω το υπόλοιπο επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου και τους συμφοιτητές μου που εκπονούσαν κι αυτοί την διπλωματική τους εργασία για την άνοξη συνεργασία και την βοήθειά τους.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου και ιδιαίτερα στην Ελένη Προβατά, τον Γιάννη Χατά, τον Χάρη Τσαγδή, τον Βαγγέλη Ντάνο, Δημήτρη Ξυλά και όλους τους υπόλοιπους που με βοήθησαν κατά την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην LadrierePrescillia για την ψυχολογική υποστήριξη και που με βοήθησε να τελειώσω την πτυχιακή εργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ θερμά τον πατέρα μου, την μητέρα μου και τον αδερφό μου για την ηθική και οικονομική υποστήριξη όχι μόνο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας είναι η ανίχνευση, ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση οργανοχλωριωμένων ουσιών με τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεής φάσης από την υπερκείμενη επιφάνεια υπό συνθήκες κενού (Vac – HSSPME), καθώς και η μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τη μέθοδο αυτή. Η μείωση της πίεσης στην μέθοδο μικροεκχύλισης στερεής φάσης από την υπερκείμενη φάση προτού επέλθει ισορροπία μεταξύ της ίνας και της υπερκείμενης φάσης (VAC-HSSPME) ενισχύει την κινητική διαδικασία σε σύγκριση με την εκτέλεση της μικροεκχύλισης υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Σύμφωνα με τα πειράματα που έλαβαν χώρα στην πτυχιακή εργασία παρατηρούμε ότι η εκχύλιση των πτητικών και ημιπτητικών ενώσεων, δηλαδή αυτές με χαμηλό και ενδιάμεσο K_H , ενισχύεται σε συνθήκες μειωμένης πίεσης. Με τον τρόπο αυτό αντιμετωπίζεται το εμπόδιο της αντίστασης της μεταφοράς μάζας από την υγρή στην αέρια φάση η οποία ελέγχει τον ρυθμό εξάτμισης των ημιπτητικών ενώσεων. Έτσι μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης. Με σειρά πειραμάτων μελετήθηκαν η επίδραση της ιοντικής ισχύος (NaCl), το pH, ο χρόνος εκχύλισης και η θερμοκρασία στην VAC-HSSPME, αλλά και στην μικροεκχύλιση χωρίς κενό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέθοδος VAC-HSSPME είναι καταλληλότερη έναντι της no-VAC-HSSPME, λόγω της καλύτερης ευαισθησίας που παρέχει. Έτσι, με την εφαρμογή του κενού στην μέθοδο γίνεται εντοπισμός των προς εξέταση ουσιών σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις απ' ότι στην HSSPME χωρίς κενό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανίχνευση των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων είναι απαραίτητη καθώς αποτελούν κίνδυνο τόσο στην υγεία των ανθρώπων όσο και στην πανίδα μιας περιοχής. Η μέθοδος Vac-HSSPME είναι μια καινοτόμος τεχνική προσδιορισμού ουσιών η οποία είναι εύκολη και σχετικά γρήγορη κατά την χρήση της.

Από τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο και μετά αναπτύχθηκε ραγδαία η φυτοφαρμακολογία, λόγω της αναγκαίας αύξησης της παραγωγικότητας των καλλιεργούμενων αγρών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση φυτοφαρμάκων σε εδάφη και νερά, δημιουργώντας έτσι σοβαρά προβλήματα στην μικροπανίδα και την μικροχλωρίδα.

Για την κατάλληλη επιλογή μεθόδων καθαρισμού των νερών και εδαφών είναι απαραίτητη η αξιολόγηση της ποιότητας αυτών με ανάλυση δειγμάτων που έχουν παρθεί από την υπό εξέταση περιοχή (δειγματοληψία). Πριν την ανάλυση γίνεται συνήθως προεπεξεργασία των δειγμάτων (απομόνωση ή προεμπλουτισμός αναλυτών, απομάκρυνση αιωρούμενης ύλης, κ.α.). Το ενδιάμεσο αυτό βήμα γίνεται για την βελτίωση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης, για την διασφάλιση των κατάλληλων φυσικοχημικών παραμέτρων αλλά και για την συντήρηση του δείγματος. Τελικό βήμα της ανάλυσης είναι ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των υπο εξέταση ενώσεων με την βοήθεια κατάλληλων οργάνων.

Οι παραδοσιακές τεχνικές παρασκευής και προετοιμασίας δειγμάτων είναι αρκετά χρονοβόρες και χρησιμοποιούν κυρίως τοξικούς και οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι δεν είναι καθόλου φιλικό προς το περιβάλλον και έχουν αρκετό κόστος.

Τα αναλυτικά όργανα που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (PCBs) και Οργανοχλωριωμένων Παρασιτοκτόνων (OCPs) είναι τα εξής: η Αέρια Χρωματογραφία (GC) συζευγμένη με τον Ανιχνευτή Σύλληψης Ηλεκτρονίων (ECD), την Φασματομετρία Μάζας (MS) καθώς και την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

Νέες αναλυτικές τεχνικές όπως η δισδιάστατη GC (2D-GC) και το “fast-GC”, χρησιμοποιώντας GC-ECD μπορεί να χρησιμοποιηθούν στο εγγύς μέλλον για ανάλυση υψηλού διαχωρισμού των PCB/OCPs με μικρότερο κόστος. Διαδικασίες με χαμηλές περιβαλλοντικές επιπτώσεις όπως η SPME, η χαμηλή χρήση διαλυτών κ.α. χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο.

1.1 ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ (OCP's)

Τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται κυρίως ως εντομοκτόνα. Είναι ενώσεις οι οποίες βιοαποικοδομούνται με πάραπολύ αργούς ρυθμούς έωςκαθόλου. Λόγω αυτού θεωρούνταισημαντικοί ρύποι για το περιβάλλον. Έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό, συσσωρεύονται στους λιπαρούς ιστούς των οργανισμών και έχουν την ικανότητα να προσροφούνται στα αιωρούμενα σωματίδια καθώς και σε ιζήματα.



Εικόνα 1.1 Ψεκασμός με Φυτοφάρμακα

Η μεγαλύτερη παρέμβαση που έχει κάνει ο άνθρωπος στην φύση είναι τα φυτοφάρμακα λόγω της τοξικότητας, της βιοσυσσώρευσης και γενικά των αρνητικών επιδράσεων στο έδαφος, στο νερό και κατ' επέκταση στους οργανισμούς που ζουν σε αυτά. Γι' αυτόν τον λόγο είναι σημαντική η ανάπτυξη διάφορων μεθόδων για την ανίχνευσή τους.

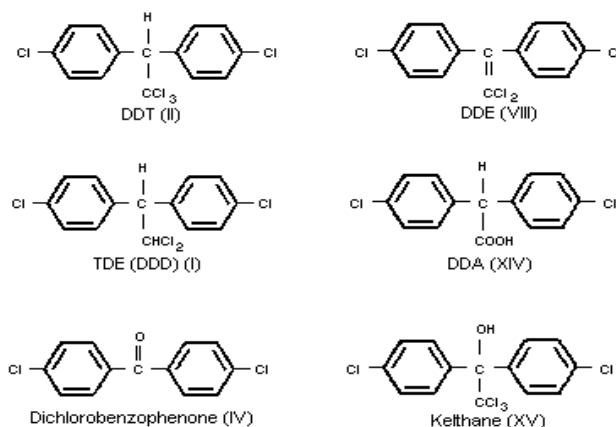
Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ή αλλιώς φυτοφάρμακα, είναι προϊόντα που χρησιμοποιούνται για να προστατεύσουν τις γεωργικές καλλιέργειες, να διατηρούν την υγεία των φυτών και να εξασφαλίζουν ένα υψηλό επίπεδο ποσότητας και ποιότητας τροφίμων. Αυτά επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες ορισμένων φυτών και την καταστροφή άλλων ανεπιθύμητων φυτών καταστρέφοντας, επιβραδύνοντας ή εμποδίζοντας τελείως την ανάπτυξη τους. [1]

Η Ε.Ε. έχει θέσει ορισμένα όρια ποσότητας φυτοφαρμάκων για τα προϊόντα ανθρώπινης και ζωικής διατροφής. Ο Ευρωπαϊκός Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου καθορίζει την μέγιστη περιεκτικότητα για τα κατάλοιπα των φυτοφαρμάκων επί και εντός των οπωροκηπευτικών, μέσα και πάνω από τα σιτηρά καθώς και για τρόφιμα ζωικής προέλευσης.

Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστεί μια τεχνική για τον προσδιορισμό των ουσιών Lindane και 4,4'-DDE στο νερό, οι οποίες εντάσσονται στα φυτοφάρμακα. Στη συνέχεια θα δοθούν η δομή, οι φυσικοχημικές ιδιότητες, οι πηγές αλλά και η τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον.

1.1.1 Δομή OCPs

Τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα διαχωρίζονται σε 5 κύριες ομάδες. Αυτές είναι: η ομάδα του DDT με περίπου 10 ενώσεις (όπως dicofol, chlorfenethol), το εξαχλωροκυκλοεξάνιο HCH και 8 ισομερή (Lindane), η ομάδα των χλωριωμένων κυκλοδιενίων (όπως Aldrin, Dieldrin, Endrin και Endosulfan), τα Toxaphene και τέλος τα φυτοφάρμακα με δομή κλωβού (cagedstructure) όπως το Mirex και το Chlordecone.[2 , 3]



Εικόνα 1.1: DDT και άλλα OCP's που προέρχονται από αυτό

Το πρώτο οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο που τέθηκε σε χρήση είναι το 4,4'-DDT. Χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα κατά τον Β Παγκόσμιο Πόλεμο για την καταπολέμηση των εντόμων-φορέων ασθενειών όπως η ελονοσία. Κατά την δεκαετία του 1960 είχαμε την μέγιστη παραγωγή αυτού. Επίσης, το DDT ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την εξάλειψη της ελονοσίας σε Ευρώπη και ΗΠΑ. Μετά από οικοτοξικολογικές έρευνες απαγορεύτηκε η χρήση του DDT το 1972 στις ΗΠΑ και το 1977 σε πολλές χώρες της Ευρώπης. Παρόλα αυτά, το DDT εξακολουθεί να είναι από τα πιο αποτελεσματικά εντομοκτόνα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.)

αποφάσισε το 2006 να το χρησιμοποιήσει για ράντισμα σπιτιών, ιδιαίτερα στην Αφρική για την καταπολέμηση επιδημιών ελονοσίας και τύφου.[3]



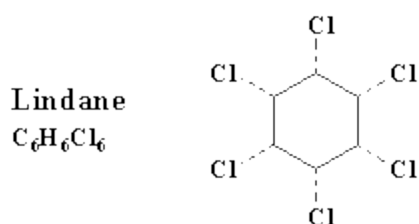
Εικόνα 1.2: Ψέκασμα κατά διάφορων ασθενειών κατά τον ΄Β Παγκόσμιο Πόλεμο

Κοινό γνώρισμα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων είναι ότι, στην δομή τους άτομα χλωρίου συνδέονται χημικά με υδρογονάνθρακες, είναι σταθερές ουσίες, τοξικές και βιοσυσσωρεύονται στους ζωντανούς οργανισμούς. Αυτές οι τρεις ιδιότητες είναι που τις καθιστούν πολύ επιβλαβείς ενώσεις.[3 , 4]

1.1.2 Φυσικοχημικές Ιδιότητες

Οι ενώσεις στόχοι της παρούσας διπλωματικής είναι το Lindane και το 4,4'-DDE. Πιο αναλυτικά για τις δύο αυτές ουσίες:

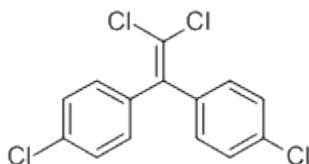
Το Lindane με χημικό τύπο $C_6H_6Cl_6$ είναι μια απαρχαιωμένη οργανοχλωριωμένη τοξική ένωση που χρησιμοποιούταν ως εντομοκτόνο ή φυτοφάρμακο εκτενώς σε ολόκληρο τον κόσμο. Σε μερικές χώρες χρησιμοποιείται ακόμα ως φαρμακευτική ουσία, σε πολύ μικρό ποσοστό (1 %) σε σαμπουάν ή λοσιόν για θεραπεία από ψείρες ή ψώρα. Παρασκευάστηκε για εμπορική χρήση πρώτη φορά στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1950. Τότε χρησιμοποιούταν ως δόλωμα για παράσιτα αλλά και σαν σπρέι για το φύλλωμα φυτών. Το Lindane έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών, μία από αυτές είναι η χρήση του ως εντομοκτόνο, ενώ χρησιμοποιείται και για την εξολόθρευση σκουληκιών που ζουν στα φυλλώματα των φυτών, εντόμων του εδάφους αλλά και ανθρωπίνων ζωικών παρασίτων όπως τσιμπούρια και ψείρες. Είχε χαρακτηριστεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος, το 1985, ως φυτοφάρμακο περιορισμένης χρήσης.[5, 6]



Εικόνα 1.3: Χημικός τύπος και δομή της ουσίας Lindane

Το **4,4'-DDE** με χημικό τύπο C₁₄H₈Cl₄ είναι και αυτό μια οργανοχλωριωμένη ένωση η οποία χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο ή φυτοφάρμακο. Αυτή η ουσία προέρχεται από αφυδραλογόνωση της ουσίας 4,4'-DDT. Το DDE είναι άχρωμο, έχει κρυσταλλική μορφή και εμφανίζει παρόμοιες ιδιότητες με το DDT, αν και είναι λιγότερο τοξικό από αυτό. Στην Ελλάδα απαγορεύθηκε η χρήση του από το 1977 και μετά. [7, 8]

Το DDE ως πολυχλωριωμένη ένωση δεν είναι υδατοδιαλυτή και δεν μπορεί να διασπαστεί στο περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, με την εκτεταμένη χρήση αυτού, την συσσώρευση του στους λιπαρούς ιστούς των άγριων αρπακτικών πουλιών μέσω της τροφικής αλυσίδας. Επίσης, με έρευνες που έγιναν στην Αγγλία και στις ΗΠΑ έδειξαν ότι η μείωση του αριθμού των αρπακτικών ήταν δραματική την δεκαετία του 1960 και ότι ήταν αποτέλεσμα της εκλέπτυνσης του κελύφους των αυγών, της πρόωρης θραύσης και της θανάτωσης των νεοσσών. Αυτό συνέβαινε διότι το DDT και οι μεταβολίτες του επηρεάζουν την ενζυματική παραγωγή ανθρακικού ασβεστίου (CaCO₃) που χρειάζεται για την παραγωγή του κελύφους των αυγών. [7, 8]



Εικόνα 1.4: Χημική δομή της ουσίας 4,4'-DDE

Η ένωση αυτή είναι γνωστή και με τα ονόματα:

- p,p'-DDE, 1,1'-(Dichloroethenylidene)bis(4-chlorobenzene),
- 1,1'-(dichloroethenylidene)bis(4-chlorobenzene),
- 1,1'-(dichloroethenylidene)bis(4-chloro-Benzene),
- 1,1'-(dichloroethenylidene)bis(4-chlorobenzene),
- 1,1'-(dichloroethylidene)bis(4-chlorobenzene),
- 1,1'-dichloroethenylidene)bis(4-chlorobenzene),
- 1,1-Bis(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethylene. [8]

Το DDE έχει πυκνότητα $0,89\text{gr/cm}^3$, στην φυσική του κατάσταση είναι στερεό με μορφή κρυσταλλικής σκόνης. Το σημείο τήξης του είναι $88 - 90^\circ\text{C}$, το σημείο βρασμού βρίσκεται στους 336°C και το Μοριακό του Βάρος είναι $318,02\text{ g/mol}$. [7,8]

Πίνακας 1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό εξέταση ουσιών, [5, 6, 9]

Ουσία	Cas-Number	Χημικός Τύπος	Μοριακό Βάρος (g/mol)	Διαλυτότητα στο Νερό (mg/L)	Τάση ατμών (mmHg)	Σταθερά Henry ($\text{m}^3\text{atm/mol}$)	Log(K_{ow})
Lindane	58-89-9	$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cl}_6$	290,83	7	$9,4 \cdot 10^{-6}$	$2,43 \cdot 10^{-7}$	3,61
4,4'-DDE	72-55-9	$\text{C}_{14}\text{H}_8\text{Cl}_4$	318,02	0,12	$6,2 \cdot 10^{-6}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	6,51

1.1.3 Τρόπος δράσης ουσιών

Τα φυτοφάρμακα-εντομοκτόνα είναι κατασκευασμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να δηλητηριάζουν ένα μεγάλο αριθμό εντόμων αλλά και τερμίτες, κατά την επαφή τους με την ουσία. Αυτό συμβαίνει διότι οι ουσίες αυτές δεσμεύουν ή παρεμποδίζουν την δράση ενζύμων ζωτικής σημασίας για το νευρικό σύστημα.

Πιο συγκεκριμένα το Lindane, δρα στον παρεμποδιστικό μηχανισμό του νευρικού συστήματος που είναι γνωστός ως δέκτης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA) που αυξάνει την περατότητα των μεμβρανών των νευρώνων σε ιόντα χλωρίου. Εμποδίζουν δηλαδή την είσοδο των ιόντων χλωρίου στους νευρώνες και έτσι ανταγωνίζονται την ηρεμιστική του GABA. [6,10]

Το 4,4'-DDE είναι μια ουσία γνωστή για την επίδραση που έχει στην απομείωση των νεύρων αγωγής των ώσεων σε έντομα και θηλαστικά. Επίσης, επεμβαίνει στην δίοδο νατρίου, μειώνοντας τον αριθμό ιόντων νατρίου, προκαλώντας μεγάλη νευρική διέγερση, σπασμούς, συχνές ώσεις ακόμα και τον θάνατο. [9]

1.1.4 Τύχη των ουσιών στόχων στο περιβάλλον

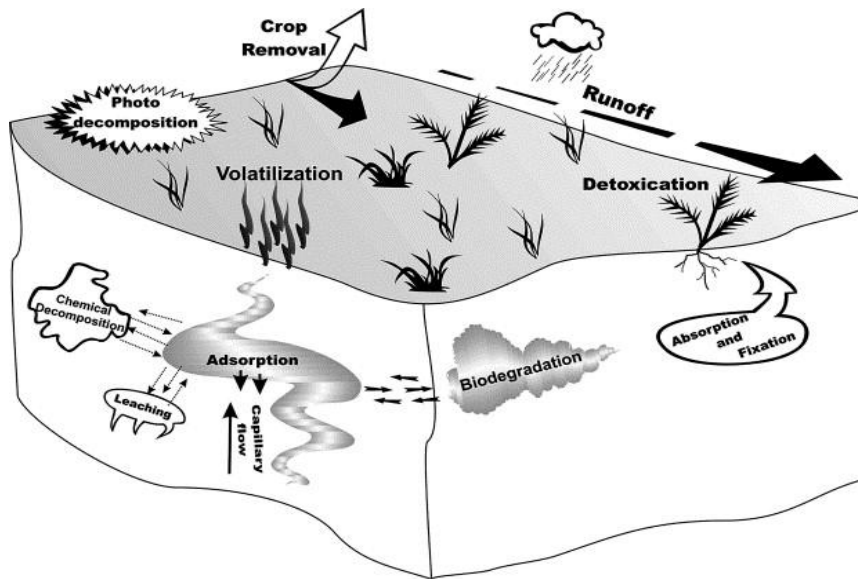
Η απελευθέρωση φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον οδηγεί είτε σε θετικά αποτελέσματα (π.χ. η έκπλυση ορισμένων ζιζανιοκτόνων στο ριζικό σύστημα μπορεί να δώσει καλύτερο έλεγχο των ζιζανίων), αλλά και σε αρνητικά αποτελέσματα (π.χ. συσσώρευση της ουσίας δια μέσου της τροφικής αλυσίδας, μέχρι και τον άνθρωπο, και να προκαλέσει βλάβες στην υγεία των οργανισμών). [10,11]

Όταν γίνει χρήση φυτοφαρμάκων σε μια περιοχή, αυτό ακολουθεί τρεις πιθανές διαδρομές, την αέρια οδό, τα επιφανειακά και υπόγεια νερά καθώς και το έδαφος. Αυτά, όταν χρησιμοποιηθούν, υφίστανται μια σειρά από χημικές, βιολογικές και φυσικές διεργασίες, με αποτέλεσμα να διαταράζουν τα οικοσυστήματα. [10,11]

Στον αέρα καταλήγει από ψέκασμα δέντρων. Οι εκπομπές μπορεί να προέρχονται κατά την παραγωγή, μεταφορά ή διάθεση των φυτοφαρμάκων. Αυτοί οι αέριοι ρύποι μεταφέρονται από τον άνεμο και μπορούν να φτάσουν σε πολύ μεγάλη απόσταση από την περιοχή που χρησιμοποιούνται. Έπειτα, είτε εισπνέονται από οργανισμούς και από τον άνθρωπο, είτε από τις κατακρημνίσεις καταλήγουν στο έδαφος.[10, 11]

Τα νερά διαχωρίζονται σε υπόγεια και σε επιφανειακά. Στα υπόγεια νερά τα φυτοφάρμακα καταλήγουν από τις κατακρημνίσεις, οι οποίες παρασύρουν τα φυτοφάρμακα που βρίσκονται στον αέρα ή που έχουν κατακαθίσει στα φυτά από τα ψεκάσματα, και εισέρχονται από το έδαφος μέχρι τον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα. Τα επιφανειακά νερά ρυπαίνονται είτε από τις κατακρημνίσεις, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είτε από την απευθείας διάθεση των φυτοφαρμάκων στην επιφάνεια των λιμνών και των παράκτιων περιοχών για την καταστροφή διαφόρων φυτών και για την αντιμετώπιση επιβλαβών εντόμων. Επίσης, τα νερά αποστράγγισης είναι μία από τις κυριότερες πηγές ρύπανσης των θαλασσών, των λιμνών, των ποταμών, κλπ.[10,11]

Μεγάλες ποσότητες των φυτοφαρμάκων απορροφούνται από το έδαφος. Ειδικά, αυτά με K_{oc} $1,5 \cdot 10^5$ (4,4'-DDE) απορροφούνται πολύ ισχυρά από το χώμα. Κατάληξη φυτοφαρμάκων στο χώμα γίνεται ξανά είτε από τις κατακρημνίσεις είτε από την απευθείας εφαρμογή τους. Από το έδαφος, αυτά εξατμίζονται, προσροφούνται, διασπώνται χημικώς, παθαίνουν έκπλυση ή αποσυντίθενται. [10,11]



Εικόνα 1.5: Τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον

Όταν τα φυτοφάρμακα βρεθούν στο έδαφος, τρεις είναι οι κύριες κατηγορίες διάσπασης τους. Η μικροβιακή, η χημική και η φωτοχημική διάσπαση. Τα προϊόντα της διάσπασης είναι συνήθως λιγότερο επικίνδυνα ή μη τοξικά. Υπάρχουν όμως αρκετά φυτοφάρμακα τα οποία αποδομούνται πολύ δύσκολα, τα οποία προκαλούν σοβαρά προβλήματα ρύπανσης του περιβάλλοντος και συσσωρεύονται μέσω της τροφικής αλυσίδας στα έμβια όντα. [9]

Τέλος, τα φυτοφάρμακα-παρασιτοκτόνα έχουν τρεις κύριες ιδιότητες οι οποίες καθορίζουν την τύχη τους στο περιβάλλον. Αυτές είναι ο συντελεστής προσρόφησής τους στο έδαφος, ο οποίος εκφράζεται με τον συντελεστή προσρόφησης (adsorptioncoefficient, K_{oc}) και τον συντελεστή κατανομής (adsorptionpartitioncoefficient, K_d), οι οποίοι καθορίζουν το ποσοστό της ουσίας που θα προσροφηθεί από τα κλάσματα του αργίλου του εδάφους, η διαλυτότητα, δηλαδή η τάση μιας ουσίας να διαλύεται στο νερό και η πτητικότητα, δηλαδή η τάση μιας ουσίας να αεριοποιείται. Η τελευταία εκφράζεται με την σταθερά του Henry (K_H). Αυτή η σταθερά καθορίζει την τύχη των φυτοφαρμάκων στην ατμόσφαιρα, καθώς μας δείχνει την τάση που έχουν να αεροποιούνται. [10,11]

1.1.5 Επίδραση Lindane και 4,4'-DDE στους ανθρώπους

Από μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπους ύστερα από χρόνια έκθεση, η ουσία επιδρά στην ρινική και στην στοματική κοιλότητα. Έχουν δημοσιευτεί μελέτες που δείχνουν τις επιδράσεις του Lindane στο αίμα, όπως η υποχρωμική αναιμία, η απλαστική αναιμία κλπ. Ανθρώπινοι θάνατοι, κυρίως παιδιών, ήταν αποτέλεσμα έκθεσης ανθρώπων σε Lindane το οποίο προήλθε από ψεκασμούς. Το Lindane κατατάσσεται στις επικίνδυνες ουσίες επειδή χαρακτηρίζεται ως τοξική/νευροτοξική, καρκινογόνος και τελικά θανατηφόρα ουσία. [5,6]

Έχει παρατηρηθεί ότι άτομα, τα οποία ύστερα από κατάποση μεγάλης ποσότητας DDE έγιναν πιο νευρικοί, είχαν συστηματικό τρέμουλο χεριών, επιληπτικές κρίσεις και παραισθησία της γλώσσας, των χειλών και του προσώπου. Αντιμετώπιζαν εφίδρωση, πονοκέφαλο, ναυτία, εμετό, ζάλη και υπερευαισθησία σε εξωτερικά ερεθίσματα. Όταν όμως σταμάτησε η έκθεση των ατόμων αυτών στο DDE, σταμάτησαν και τα προβλήματα στο νευρικό τους σύστημα.[9]

Τα παιδιά εκτίθενται στο DDE είτε τρώγοντας μολυσμένο φαγητό είτε από μητρικό γάλα που περιέχει ποσότητα της ουσίας αυτής. Αν και το DDT και τα παράγωγά του έχουν καταργηθεί εδώ και 30 περίπου χρόνια εντοπίζονται ακόμα μικρές ποσότητες στο χόμα οι οποίες μπορεί να καταλήξουν σε κηπευτικά προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση.[9]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΡΟΠΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Πριν την ανάλυση ενός δείγματος ακολουθούνται συγκεκριμένα βήματα, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα. Αρχικά έχουμε την δειγματοληψία, όπου δίνεται προσοχή ώστε το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικής μήτρας απ' όπου λαμβάνεται. Την συντήρηση του δείγματος η οποία μας βεβαιώνει ότι το δείγμα θα διατηρεί τα φυσικά και χημικά του χαρακτηριστικά ώστε η ανάλυση να αντιπροσωπεύει τη μήτρα που υπόκειται σε μελέτη ακόμα και μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα από την δειγματοληψία. Την προετοιμασία του δείγματος διότι τα περισσότερα δείγματα δεν είναι έτοιμα για την άμεση εισαγωγή τους στα αναλυτικά όργανα. Τέλος, με την ολοκλήρωση της προετοιμασίας δείγματος, λαμβάνει χώρα η ανάλυση των δειγμάτων, με την επιλογή αρχικά της καταλληλότερης μεθόδου ανάλυσης.[10,11,12]

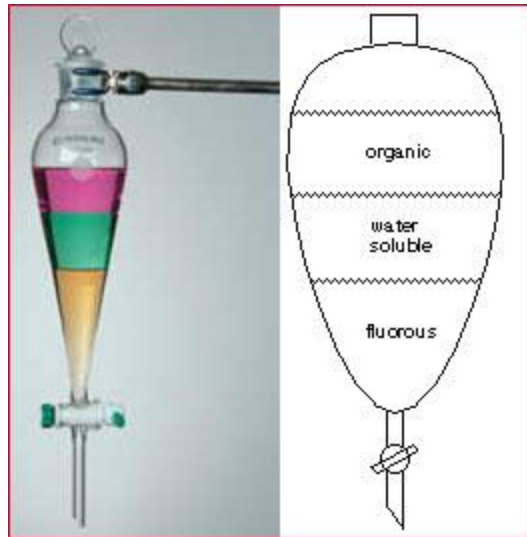
2.1 Εκχύλιση ενώσεων από δείγματα

Η εκχύλιση είναι μία από τις κλασσικές τεχνικές διαχωρισμού και βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, που αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Ανάλογα με την φυσική κατάσταση του εκχυλιστικού μέσου και της φάσης δότη μεθόδος αυτή έχει διαφορετικό τρόπο εφαρμογής. Στις τεχνικές εκχυλίσεως συμπεριλαμβάνεται η εκχύλιση στερεών με υγρό, η εκχύλιση στερεής φάσης (SolidPhaseExtraction, SPE) και η υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-LiquidExtraction, LLE). [11]

2.1.1 Υγρή – Υγρή Εκχύλιση (Liquid – Liquid Extraction, LLE)

Με αυτή την τεχνική διαχωρισμού η ουσία στόχος κατανέμεται μεταξύ δύο μη μίγνυμένων υγρών, δημιουργώντας έτσι δύο φάσεις. Επειδή τα υγρά δεν αναμειγνύονται μεταξύ τους, σχηματίζουν δύο στιβάδες. Το υγρό με την μεγαλύτερη πυκνότητα βρίσκεται στην κάτω στιβάδα. Η ουσία στόχος, ενώ αρχικά βρίσκεται στην μία φάση, μετά την εκχύλιση βρίσκεται και στις δύο φάσεις. Η κατανομή της ουσίας στις δύο φάσεις εξαρτάται από τον συντελεστή ή σταθερά κατανομής (K_d). [13,14]

Η υγρή – υγρή εκχύλιση απαιτεί μεγάλη ποσότητα οργανικού διαλύτη υψηλής καθαρότητας, οι περισσότεροι εκ' των οποίων είναι τοξικοί. Είναι αρκετά χρονοβόρα διαδικασία και δίνει μικρές αναλογίες όγκου δείγματος/διαλύτη. Γι' αυτό τον λόγο δίνεται έμφαση στην βελτίωση της κλασσικής υγρής – υγρής εκχύλισης. [10,11,14]



Εικόνα 2.1:Υγρή – ΥγρήΕκχύλιση

2.1.2ΕκχύλισηΣτερεήςΦάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια σύγχρονη τεχνική προετοιμασίας του προς μέτρηση δείγματος. Χρησιμοποιεί ένα προσροφητικό υλικό το οποίο εκχυλίζει οργανικές ενώσεις από υδατικά δείγματα. Τα κύρια χαρακτηριστικά που έκαναν την SPE τόσο δημοφιλή είναι ότι μείωσε αισθητά τον χρόνο της εκχύλισης και τους μεγάλους όγκους διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην Υγρή – Υγρή εκχύλιση. Επίσης, έχει μεγαλύτερη ακρίβεια καθώς διαγράφει το στάδιο της ανθρώπινης διαμεσολάβησης μεταξύ του σταδίου προσυγκέντωσης και του σταδίου της ανάλυσης.[10,11,14]



Εικόνα 2.2: Συσκευή πραγματοποίησης της μεθόδου SPE

Όμως με την SPE υπάρχει περιορισμός στην εκχύλιση ουσιών. Περιορίζεται δηλαδή σε ημιπτητικές και μη-πτητικές ενώσεις. Τόσο η Εκχύλιση Στερεάς Φάσης όσο και η Υγρή – Υγρή Εκχύλιση χρησιμοποιούν τοξικούς οργανικούς διαλύτες, χρειάζονται αρκετή προετοιμασία και πολλά βήματα πριν την εκτέλεση και εμφανίζουν αρκετές φορές προβλήματα κατά την διάρκεια της εκχύλισης. [10,11,14]

2.2 Μικροεκχύλιση

Μικροεκχύλιση ονομάζεται η μέθοδος η οποία περιλαμβάνει δύο διαφορετικές τεχνικές, την μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SolidPhaseMicro-Extraction , SPME) και την μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LiquidPhaseMicro-Extraction, LPME). Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας του δείγματος καθώς και της ποσότητας της εκχυλιστικής φάσης, μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος και κάνοντας την πιο φιλική προς το περιβάλλον. Το πλεονέκτημα της μεθόδου μικροεκχύλισης είναι ότι επιταχύνει την μεταφορά της μάζας κατά την διαδικασία της ρόφησης και της εκρόφησης στο αναλυτικό όργανο ενώ ταυτόχρονα εμποδίζει την έμφραξη του αναλυτικού οργάνου από προσμίξεις. [11,15]

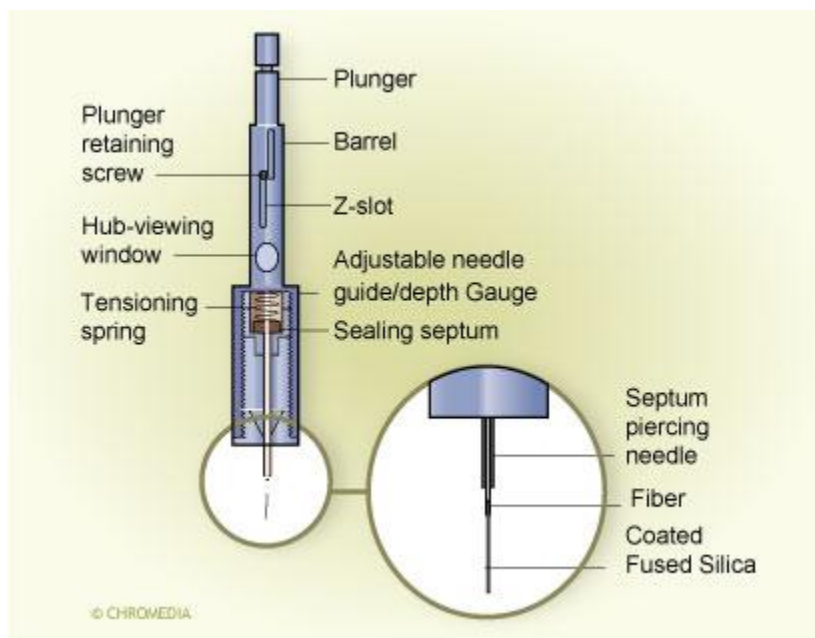
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣΤΕΡΕΗΣΦΑΣΗΣ (SOLIDPHASEMICRO-EXTRACTION, SPME)

3.1 Εισαγωγικά

Η μέθοδος μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) αποτελεί μια σχετικά καινούρια μέθοδο ανίχνευσης ουσιών και ανάλυσης δειγμάτων η οποία εφευρέθηκε το 1989 από τους J. Pawliszyn και την ομάδα επιστημόνων του στο πανεπιστήμιο του Waterloo στον Καναδά. Η νέα αυτή τεχνική προετοιμασίας δείγματος, στην οποία δεν χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, βασίζεται στην ρόφηση των αναλυτών από την στερεή φάση εκχύλισης το οποίο κάνει αυτή την μέθοδο να ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες συμβατικές τεχνικές προετοιμασίας δείγματος.[10,11,16]

Η μέθοδος SPME, χρησιμοποιεί μια ειδική συσκευή δειγματοληψίας (SPME holder), η οποία εφευρέθηκε από τον Janusz Pawliszyn και εμπορευματοποιήθηκε από την Supelco το 1993 και εμπορεύεται στις μέρες μας από την Sigma Aldich. Η εμπορική αυτή συσκευή αποτελείται από μια επαναχρησιμοποιούμενη μικροσύριγγα η οποία συνδέεται με μία ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fusedsilica) και επικαλύπτεται από υμένιο υγρό πολυμερικού υλικού το οποίο μπορεί να είναι είτε πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) είτε πολυακρυλικό (PA). Κάθε ίνα είναι συγχωνευμένη σε μία στατική φάση πάνω στην επιφάνεια των οποίων βρίσκεται το ροφητικό υλικό (στατική φάση). [10,11,16,17,18]



Εικόνα 3.1: Συσκευή δειγματοληψίας SPME

Οι αναλυόμενες ουσίες μεταφέρονται στην ίνα την στιγμή που αυτή έρχεται σε επαφή με το δείγμα. Η εκχύλιση ουσιαστικά σταματάει την στιγμή που επέρχεται ισορροπία στην κατανομή των ενώσεων-στόχων μεταξύ του δείγματος και της εκχυλιζόμενης φάσης. Όταν δηλαδή επέλθει ισορροπία, η εκχυλισμένη ποσότητα παραμένει σταθερή, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και δεν επηρεάζεται από περαιτέρω αύξηση του χρόνου εκχύλισης. Αν η εκχύλιση διακοπεί πριν την επίτευξη της ισορροπίας του δείγματος και της εκχυλιζόμενης φάσης, τότε το ποσό της προς ανάλυσης ουσίας είναι ανάλογο του χρόνου εκχύλισης.[10,11, 16, 17, 18]

Κατά την ανάλυση των ρύπων, η ίνα έρχεται σε επαφή με το δείγμα ή τοποθετείται στην υπερκείμενη επιφάνεια. Από εκεί ασκείται πίεση στο ειδικό έμβολο της συσκευής έτσι ώστε να εκτεθεί η ίνα στο δείγμα. Όταν τελειώσει ο στόχος του πειράματος, η ίνα επαναφέρεται τραβώντας το έμβολο προς τα πάνω και μεταφέρεται στο αναλυτικό όργανο όπου, στον εισαγωγέα του αναπτύσσονται πολύ υψηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να γίνεται εκρόφηση των αναλυτών. Η ίνα μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκ νέου αμέσως μετά την εκρόφηση της.[10, 11, 16, 17, 18]

Συγκρίνοντας την SPME με την LLE ή την SPE παρατηρούμε ότι αυτή η μέθοδος ελαχιστοποιεί την χρήση τοξικών οργανικών διαλυτών, κάνοντας την φιλική ως προς το περιβάλλον, είναι πιο απλή κι εύκολη ως πειραματική διαδικασία και είναι αποδοτική με εξαιρετική αναπαραγωγιμότητα. Επίσης, αυτή η αναλυτική μέθοδος εφαρμόζεται για την ανίχνευση μεγάλης ποικιλίας αναλυτών από πολλές και διαφορετικές μήτρες, σε πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης αλλά παράλληλα με αρκετά υψηλή ακρίβεια.[10, 11, 19]

3.2 Θεωρητικά στοιχεία της μεθόδου SPME

3.2.1 Στάδια της SPME

Κατά την διεξαγωγή της τεχνικής μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME) παρατηρούνται δύο στάδια:

- Το στάδιο της δειματοληψίας-εκχύλισης και
- Το στάδιο της εκρόφησης-μέτρησης

Στο στάδιο της δειματοληψίας-εκχύλισης αρχικά εισάγουμε την ίνα, η οποία βρίσκεται μέσα στην σύριγγα μικροεκχύλισης στερεής φάσης (SPME fiberholder) για προστασία από κίνδυνο θραύσης, μέσα από το septum, το οποίο είναι ένα ελαστικό διάφραγμα από σιλικόνη, που χρησιμοποιείται ως πώμα του φιαλιδίου όπου περιέχεται το δείγμα προς ανάλυση. Όταν η μικροσύριγγα βρεθεί στο κατάλληλο σημείο, μετά την εισαγωγή της από το septum, η ίνα εξάγεται από την σύριγγα, με κίνηση του ειδικού εμβόλου προς τα κάτω, έτσι ώστε είτε να βυθιστεί μέσα στο δείγμα για δειματοληψία μη-πτητικών ουσιών είτε να παραμείνει στην υπερκείμενη φάση (headspace) για δειματοληψία πτητικών ουσιών, για το ανάλογο χρονικό διάστημα που απαιτεί το κάθε πείραμα. Όταν περάσει το χρονικό διάστημα αυτό (χρόνος

δειγματοληψίας) η ίνα εισέρχεται ξανά μέσα στην σύριγγα μικροεκχύλισης με κίνηση του εμβόλου προς τα πάνω και στην συνέχεια εξέρχεται από την φιάλη δειγματοληψίας. Από εκεί είτε αποθηκεύεται για μικρό χρονικό διάστημα είτε διεξάγεται απ' ευθείας το στάδιο της εκρόφησης. [11,20]

Στο στάδιο της εκρόφησης η συσκευή SPME διαπερνά το septum, που βρίσκεται στον εισαγωγέα δείγματος της αέριας ή υγρής χρωματογραφίας, και μόλις βρεθεί στο κατάλληλο σημείο η ίνα εξάγεται στο εσωτερικό του εισαγωγέα, με κίνηση του εμβόλου προς τα κάτω, όπου πραγματοποιείται εκρόφηση των αναλυτών, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών του εισαγωγέα, για ορισμένο χρονικό διάστημα. Όταν περάσει ο χρόνος αυτός (χρόνος εκρόφησης) η ίνα εισέρχεται ξανά μέσα στην μικροσύριγγα και από εκεί εξάγεται από τον εισαγωγέα την αέριας ή υγρής χρωματογραφίας. Κατά το χρονικό διάστημα της εκρόφησης οι αναλύτες παρασύρονται από την κινητή φάση προς την χρωματογραφική στήλη για χρωματογραφικό διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Μετά την εξαγωγή της μικροσύριγγας από το αναλυτικό όργανο, η ίνα είναι καθαρή και έτοιμη για επόμενη δειγματοληψία.[11,20]

3.2.2 Βασικές Αρχές SPME

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) αναπτύχθηκε με σκοπό την μείωση του χρόνου προετοιμασίας του δείγματος στο εργαστήριο και στον χώρο δειγματοληψίας. Αυτή έχει ως βασική αρχή την κατανομή του αναλύτη μεταξύ της υδατικής φάσης και της στατικής φάσης του πολυμερούς. Η εκχύλιση λαμβάνει τέλος όταν επέλθει ισορροπία μεταξύ της μήτρας του δείγματος και της ίνας. Όταν γίνει αυτό, η ποσότητα που εκχυλίζεται παραμένει σταθερή και ανεξάρτητη του χρόνου εκχύλισης, πάντα όμως εντός των ορίων του πειραματικού σφάλματος. [10,11,21]

Για να γίνει περιγραφή της κατάστασης ισορροπίας και να υπολογιστεί η εκχυλισμένη ποσότητα, χρησιμοποιείται η παρακάτω σχέση:

Όπου:

n : γραμμομόρια που εκχυλίζονται από την ίνα

K_{fs} : σταθερά κατανομής μεταξύ της επικάλυψης της ίνας και του δείγματος

V_f : όγκος επικάλυψης της ίνας

V_s : όγκος του δείγματος

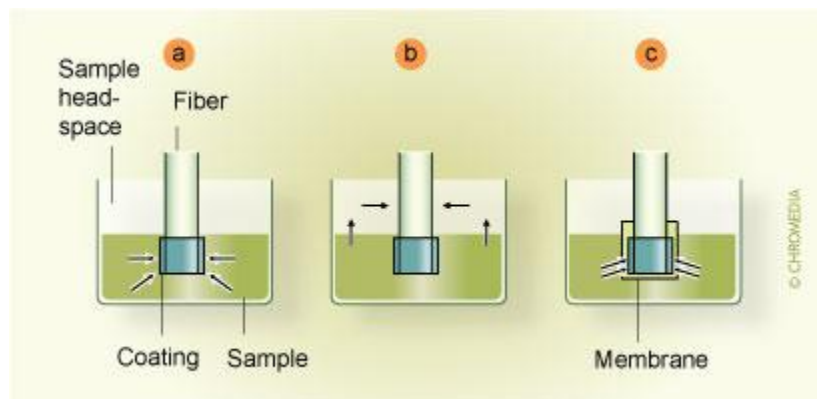
C_0 : αρχική συγκέντρωση της προς ανάλυσης ουσίας στο δείγμα

Για να χρησιμοποιηθεί αυτή η εξίσωση πρέπει το διάλυμα να είναι ομοιογενές και να μην υπάρχει διαφυγή των αναλυτών από την αέρια φάση. Αν ισχύουν τα παραπάνω, τότε από την εξίσωση μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται είναι ανεξάρτητη από την τοποθεσία της ίνας μέσα στο δοχείο. Επίσης, αν ο όγκος του δείγματος, ο όγκος της υπερκείμενης φάσης και ο όγκος της επικάλυψης της ίνας παραμείνουν σταθεροί, τότε η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται θα είναι σταθερή είτε τοποθετήσουμε την ίνα μέσα στο δείγμα είτε στην υπερκείμενη επιφάνειά του. [10,11,22]

3.2.3 Εφαρμογές της μεθόδου SPME

Η μέθοδος SPME έχει τρεις τρόπους εφαρμογής κατά το στάδιο της δειγματοληψίας. Αυτές είναι η απευθείας εμβάπτιση της ίνας στο δείγμα (Direct Immersion SPME), την τοποθέτησή της στην υπερκείμενη φάση (Headspace SPME) και την απευθείας έκθεση της ίνας στο μίγμα χρησιμοποιώντας ειδική μεμβράνη για την προστασία της (Membrane Protection SPME). [10,11,21]

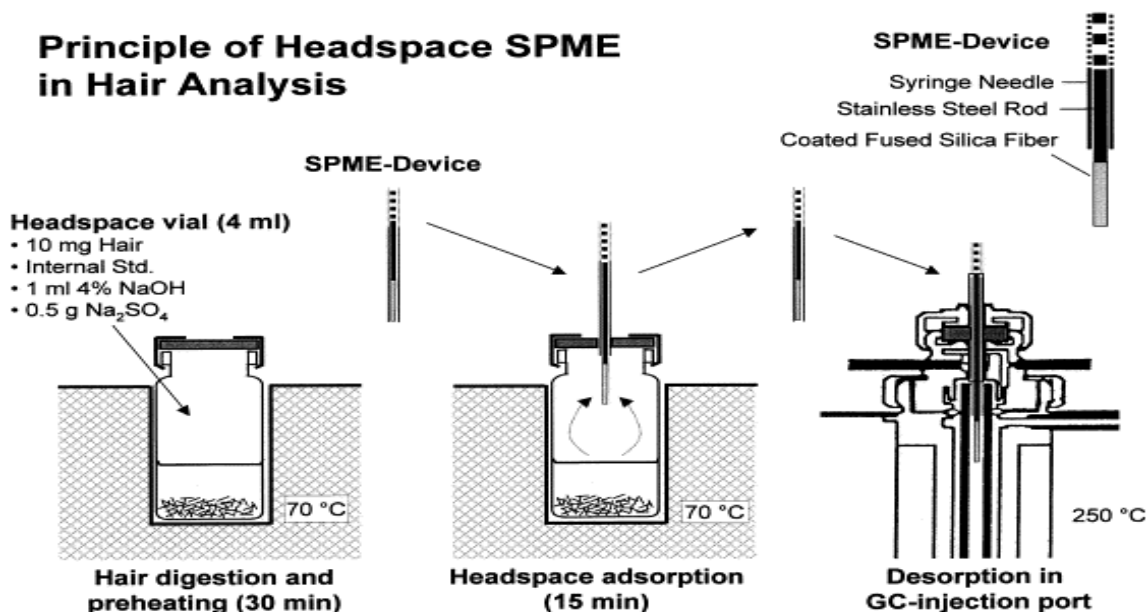
Στην Direct Immersion SPME αρχικά βυθίζουμε την ίνα στο δείγμα, με αποτέλεσμα οι αναλύτες να μεταφέρονται απευθείας από την μήτρα του δείγματος στο υλικό επικάλυψης της ίνας. Με την ανάδευση του δείγματος επιτυγχάνεται αισθητή μείωση του χρόνου που χρειάζεται για την αποκατάσταση της ισορροπίας. [10,11,21,23]



Εικόνα 3.2: Direct Immersion SPME

Στην Headspace SPME, η ίνα εκτίθεται στο σημείο που βρίσκεται ανάμεσα στο πώμα και την επιφάνεια του υγρού (Υπερκείμενος χώρος) έτσι ώστε οι ουσίες που περιέχονται στο δείγμα να μεταφέρονται στον υπερκείμενο χώρο και από εκεί στην επιφάνεια της ίνας. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για πτητικές και ημιπτητικές ουσίες. Σε αυτή την περίπτωση, αύξηση της θερμοκρασίας και ανάδευση θα οδηγήσουν σε μείωση του χρόνου ισορροπίας. [10,11,21,24]

Principle of Headspace SPME in Hair Analysis



Εικόνα 3.3: Στάδια δειγματοληψίας και μέτρησης ουσιών με την μέθοδο HS-SPME

Στην Membrane Protection SPME η εκχύλιση γίνεται όπως και στην Direct Immersion SPME. Η διαφορά είναι στην προστατευτική μεμβράνη από πολυμερές υλικό που χρησιμοποιείται ως επικάλυψη της ίνας για να την προστατεύει και να αυξάνει την επιλεκτικότητά της. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε βρώμικα ή πολύπλοκα μείγματα και προτιμάται όταν οι ουσίες που αναλύονται έχουν υψηλό σημείο ζέσεως. [10,11,21,25]

Η μέθοδος της Headspace SPME έχει μεγαλύτερο προτέρημα από τις άλλες δύο μεθόδους διότι σε αυτήν η ίνα προστατεύεται πολύ περισσότερο καθώς δεν επιτρέπει την προσρόφηση μη-πηκτικών στοιχείων με υψηλό μοριακό βάρος και έτσι αυξάνεται η διάρκεια ζωής της. Επίσης, η μέθοδος αυτή δίνει την δυνατότητα στον αναλυτή να αλλάξει διάφορα στοιχεία στο προς ανάλυση δείγμα ανάλογα με τα πειράματα που θα εκτελεστούν. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να γίνουν στο pH, στην αλατότητα κ.α. Τέλος, ακόμα ένα πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι γίνεται εφικτή η δειγματοληψία από στερεά δείγματα. [10,11,18,21]

Η μέθοδος HS-SPME έχει και μειονεκτήματα. Μερικά από αυτά είναι ότι υπάρχει περιορισμός στις ενώσεις που μπορούν να αναλυθούν, καθώς μόνο οι πτητικές και μερικές ημιπτητικές ουσίες εμφανίζονται στην υπερκείμενη φάση κατά την φάση της δειγματοληψίας έτσι ώστε να προσροφηθούν στην ίνα. Ο συντελεστής διάχυσης των αναλυτών είναι αυτός που καθορίζει την μεταφορά των ουσιών στην υπερκείμενη φάση. Άλλο μειονέκτημα είναι η δυσκολία αυτοματοποίησης της μεθόδου διότι το κλάσμα των συστατικών που ροφούνται σε κάθε ίνα επηρεάζεται από το είδος του ροφητικού υλικού και τον συντελεστή κατανομής των συστατικών στο κάθε δείγμα. [11]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣΣΤΗ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗ ΦΑΣΗ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΕΝΟΥ

(VACUUM-ASSISTED HEADSPACE SOLID PHASE MICRO-EXTRACTION, Vac – HSSPME)

4.1 Θεωρία

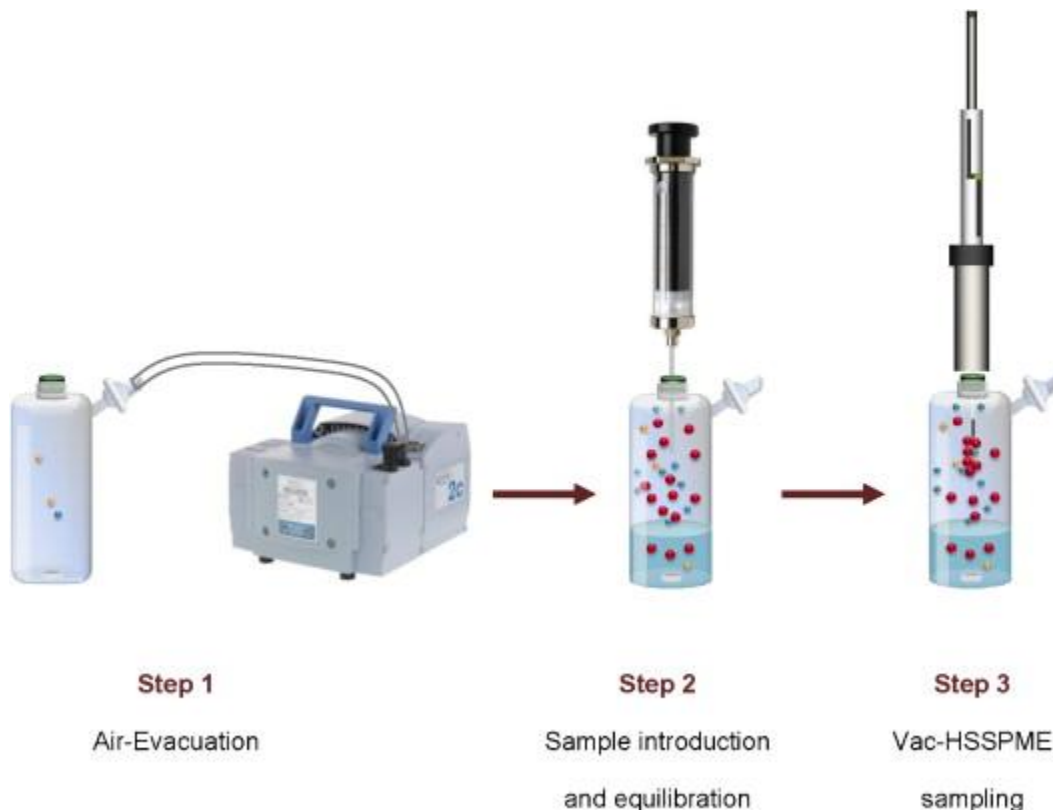
Η τεχνολογία δειγματοληψίας στην Υπερκείμενη Φάση είναι μια τεχνική η οποία αναπτύχθηκε για την ανάλυση σύνθετων δειγμάτων εύκολα και φιλικά προς το περιβάλλον. Με την παρουσία υπερκείμενης αέριας φάσης πάνω από ένα υγρό μίγμα μέσα σε ένα κλειστό δοχείο παρατηρείται μεταφορά των πτητικών ουσιών του μίγματος προς την υπερκείμενη αέρια φάση. Εάν συνδυαστεί με την μέθοδο SPME τότε έχουμε μια μέθοδο εύκολης και γρήγορης ανάλυσης ακόμα και πολύ ρυπασμένων μειγμάτων. Η δειγματοληψία γίνεται με την εισαγωγή της ίνας στην υπερκείμενη αέρια φάση για ορισμένο χρονικό διάστημα (χρόνος δειγματοληψίας), όπου μόρια των πτητικών ουσιών έχουν μεταβεί στον αέριο χώρο μεταξύ του πώματος και της επιφάνειας του υγρού μίγματος (headspace) προσκολλούνται στην επιφάνεια της ίνας. Με το τέλος του χρόνου δειγματοληψίας η ίνα μαζί με τις προσκολλημένες πτητικές ουσίες είναι έτοιμες προς ανάλυση. [26,27]

Αυτή η μέθοδος, σύμφωνα με τις συνθήκες που έθεσε ο Pawliszyn το 1997 στο βιβλίο Solid Phase Micro-extraction: Theory and Practice, οδηγεί στην μείωση της μάζας των ενώσεων προς ανάλυση στο πολυμερικό στρώμα της ίνας. Αυτή η μάζα των ενώσεων προς εκχύλιση εξαρτάται από τον όγκο της υπερκείμενης αέριας φάσης, τον λόγον κατανομής μεταξύ της αέριας φάσης και του υγρού δείγματος αλλά και από την φάση του στρώματος του πολυμερούς της ίνας. Αυτές οι σχέσεις είναι αρκετά σύνθετες και αποτελούν την εξάρτηση της μάζας της διαλυμένης ουσίας που εκχυλίζεται σε σχέση με τους σχετικούς όγκους υγρού-υγρού και της υπερκείμενης αέριας φάσης. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να διατηρηθούν σταθεροί όγκοι δειγμάτων αλλά και υπερκείμενης αέριας φάσης σε όλα τα δείγματα. [11,28,29]

Η δειγματοληψία λαμβάνει τέλος όταν έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ της υγρής φάσης του δείγματος, της υπερκείμενης αέριας φάσης και του προσροφητικού υλικού της ίνας (χρόνος ισορροπίας). Περεταίρω αύξηση του χρόνου δειγματοληψίας δεν επηρεάζει την εκχύλιση διότι η εκχυλισμένη ποσότητα παραμένει σταθερή. Οι τιμές των συντελεστών διάχυσης και της σταθεράς κατανομής των ενώσεων/στόχων είναι υπεύθυνες για αλλαγές στους χρόνους ισορροπίας των παραπάνω φάσεων, καθώς αυτές κανονίζουν την πορεία των ενώσεων αυτών μεταξύ της μήτρας και της εκχυλιστικής φάσης κατά την εκχύλιση. Σε ένα χρωματογράφημα, όταν συναντήσουμε μεγάλες κορυφές (largepeakarea) σημαίνει ότι οι ουσίες που αναλύονται έχουν μεγάλους συντελεστές κατανομής. Το αντίθετο σημαίνει όταν συναντήσουμε μικρές

κορυφές (smallpeakarea). Για τους συντελεστές διάχυσης, ενώσεις με παρόμοια μοριακά βάρη εμφανίζουν κορυφές παρόμοιου μεγέθους στα χρωματογραφήματα. [11,26,28,31]

Για μεγαλύτερη βελτίωση της μεθόδου HSSPME, το συγκεκριμένο πείραμα έγινε υπό συνθήκες κενού μέσα στην υπερκείμενη αέρια φάση της δειγματοληπτικής φιάλης (Vac-HSSPME). Με την μεγάλη μείωση της πίεσης στην υπερκείμενη επιφάνεια της δειγματοληπτικής φιάλης πετυχαίνεται περιορισμός στην μεταφορά μάζας από την υγρή στην αέρια φάση αλλά και την ύπαρξη τριών φάσεων στο σύστημα. [10,11,28,29]



Εικόνα 4.1: Δημιουργία κενού, εμπλουτισμός φιάλης δειγματοληψίας με το μείγμα και δειγματοληψία

4.2 Ουσίες όπου εφαρμόζεται η Vac-HSSPME

Κατά την δειγματοληψία της μεθόδου Vac-HSSPME στην ίνα προσκολλούνται κατά κύριο λόγο πτητικές και ορισμένες ημιπτητικές ουσίες. Αυτό συμβαίνει διότι οι πτητικές ουσίες έχουν σχετικά μικρή σταθερά κατανομής μεταξύ της υπερκείμενης αέριας φάσης και του στρώματος επικάλυψης της ίνας (k_{fn}), εμφανίζουν μεγάλη σταθερά κατανομής μεταξύ του υγρού δείγματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης (k_{hs}) και έχουν σχετικά μεγάλη σταθερά Henry (K_H). Λόγω των τριών αυτών ιδιοτήτων, οι πτητικές ουσίες προτιμούν την αέρια φάση από την υγρή. Παρόλη την ευκινησία και την ευκολία με την οποία οι πτητικές ουσίες διαχέονται από την

υδατική στην αέρια φάση, κατανέμονται δύσκολα στο εσωτερικό της επικάλυψης της ίνας λόγω του μικρού συντελεστή διάχυσης. [11,30,31]

Οι ημιπτητικές ενώσεις με την σειρά τους εμφανίζουν μεγάλη σταθερά κατανομής μεταξύ της υπερκείμενης φάσης και της επικάλυψης της ίνας (k_{fb}), μικρή σταθερά κατανομής μεταξύ του υγρού δείγματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης (k_{hs}) και μικρή σχετικά σταθερά του Henry (K_H). Αυτές οι ουσίες προτιμούν την υγρή φάση αλλά κατανέμονται με μεγαλύτερη ευκολία στο εσωτερικό της επικάλυψης της ίνας λόγω του μεγάλου συντελεστή διάχυσης με αποτέλεσμα, κατά την ανάλυση ημιπτητικών ουσιών, να απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος ανάλυσης έτσι ώστε να έχει μεγαλύτερη ακρίβεια το πείραμα. [10,11,31]

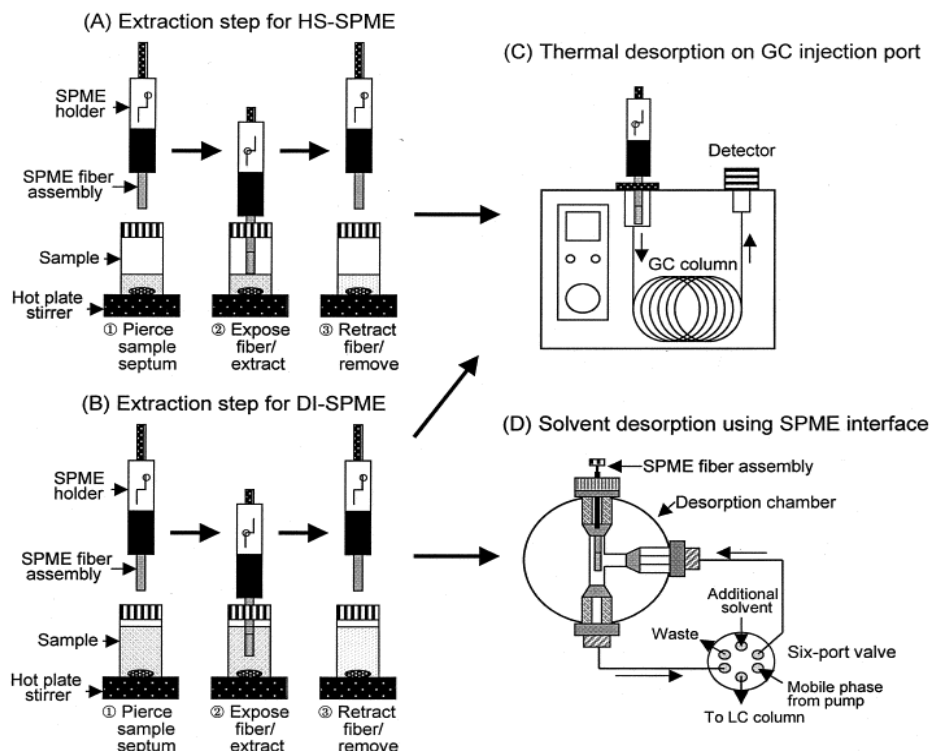
Από τα παραπάνω, παρατηρείται ότι οι πτητικές ουσίες ευνοούνται κατά το στάδιο της δειγματοληψίας με την μέθοδο Vac-HSSPME, καθώς η δειγματοληψία γίνεται στην υπερκείμενη αέρια φάση, με έκθεση της ίνας, όπου είναι το ιδανικότερο περιβάλλον για τις πτητικές ουσίες. Όσο μειώνεται η σταθερά του Henry για διάφορες ουσίες τόσο αυξάνεται ο χρόνος που χρειάζεται για να επέλθει ισορροπία μεταξύ των τριών φάσεων (δείγματος-υπερκείμενης φάσης-στρώμα ίνας). Αντίθετα, όσες ουσίες έχουν υψηλό συντελεστή οκτανόλης-νερού (k_{ow}) και χαμηλή σταθερά Henry, δίνουν υψηλή ευαισθησία στην μέθοδο με μεγάλο όμως χρονικό διάστημα ως προς την ισορροπία των τριών φάσεων. [10,11,28,29,31]

4.3 Vac-HSSPME: Σύστημα τριών φάσεων

Ολόκληρη η μεθοδολογία της μεθόδου Vac-HSSPME βασίζεται στην ισορροπία των τριών φάσεων (υδατικής-υπερκείμενης-εκχυλιστικής), στις οποίες υπάρχουν δύο διεπιφάνειες, αυτή της μήτρας με την υπερκείμενη φάση και αυτή της υπερκείμενης φάσης με την φάση εκχύλισης. Ο συντελεστής διάχυσης στην αέρια φάση είναι κατά πέντε τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος από αυτόν στην υγρή φάση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μεταφορά μάζας στην αέρια φάση να γίνεται πολύ γρήγορα. [10,11,29]

Τα στάδια που καθυστερούν χρονικά την μέθοδο μικροεκχύλισης στερεής φάσης υπό συνθήκες κενού είναι:

- Η αργή μεταφορά της μάζας από την μήτρα στη φάση ατμών και
- Ο ρυθμός διάχυσης των αναλυτών στο στρώμα πολυμερούς της ίνας.



Εικόνα 4.2. Στάδια Εκχύλισης της HS-SPME μεθόδου καθώς και το στάδιο εκρόφησης των αναλυτών.

4.4 Θερμοδυναμική Θεωρία της μεθόδου HSSPME

Την θεωρία πίσω από την μέθοδο μικροεκχύλισης στερεής φάσης έχει αναλύσει σε μεγάλο βαθμό ο J. Pawliszyn μαζί με την ερευνητική του ομάδα. Σύμφωνα με αυτόν, η αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αναλυτών που εκχυλίζονται, εφόσον όμως οι όγκοι του δείγματος, της εκχυλιζόμενης φάσης και του υλικού επικάλυψης παραμένουν σταθερά. [29,31]

Παρακάτω θα αναλυθεί η εξίσωση κατανομής των φάσεων της μήτρας, υπερκείμενης φάσης και φάσης της ίνας:

Αρχικά έχουμε την σχέση της αρχικής συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα προς την συγκέντρωση του αναλύτη που εκχυλίζεται σε συνθήκες ισορροπίας:

Όπου:

= η αρχική συγκέντρωση μέσα στο δείγμα

, , = οι συγκεντρώσεις της ουσίας προς ανάλυση στην επικάλυψη της ίνας, στην υπερκείμενη φάση και στο δείγμα

, , = οι όγκοι του δείγματος, της επικάλυψης της ίνας και της υπερκείμενης φάσης

Στην συνέχεια έχουμε την εξίσωση κατανομής μεταξύ της φάσης της μήτρας και της φάσης της ίνας:

Όπου μαζί με τις εξισώσεις:

➤ Σταθεράς κατανομής ανάμεσα στην επικάλυψη της ίνας και στην φάση της μήτρας:

➤ Σταθεράς κατανομής της επικάλυψης της ίνας μεταξύ της υπερκείμενης φάσης:

➤ Σταθεράς κατανομής της υπερκείμενης φάσης προς την φάση της μήτρας:

Με συνδυασμό όλων των παραπάνω εξισώσεων καταλήγουμε στην εξίσωση που περιγράφει την κατανομή μεταξύ της φάσης της μήτρας, της υπερκείμενης φάσης και της φάσης της ίνας, η οποία έχει την μορφή:

4.5 Θεωρία για την επίδραση της πίεσης στην μέθοδο Vac-HSSPME

Σύμφωνα με εργαστηριακά πειράματα πάνω στην μέθοδο Vac-HSSPME έχει παρατηρηθεί ότι η αλλαγή της πίεσης κατά την δειγματοληψία, ανάλογα με την φύση των αναλυτών, επηρεάζει την ταχύτητα της εκχύλισης με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η συνολική αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Η φυσική διαδικασία εξάτμισης οργανικών ενώσεων από υδατικό περιβάλλον περιγράφεται από την παρακάτω αντίδραση πρώτης τάξεως:

Όπου:

= η μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη στην υδατική φάση σε σχέση με τον χρόνο (t)

k = μια σταθερά της ταχύτητας της εξάτμισης

Με ολοκλήρωση της παραπάνω εξίσωσης ως προς το χρόνο προκύπτει μια νέα εξίσωση η οποία περιγράφει τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη στην διεπιφάνεια μεταξύ του δείγματος και της υπερκείμενης φάσης:

—

Όπου:

= ο όγκος του δείγματος

= η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται στην διεπιφάνεια μεταξύ του νερού και του αέρα

= η επιφάνεια μεταξύ της υδατικής και της αέριας φάσης

= ο συντελεστής της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και της υδατικής φάσης μέσα στη ζώνη της διεπιφάνειας.

Με περαιτέρω ολοκλήρωση της παραπάνω εξίσωσης καταλήγουμε στην εξίσωση:

—

Όπου:

L = το βάθος του δείγματος μέσα σε δοχείο με ομοιόμορφη διατομή.

Αυτή η εξίσωση περιγράφει και συσχετίζει τη σταθερά ταχύτητας της εξάτμισης (k) με τον συντελεστή της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και της υδατικής φάσης μέσα στη περιοχή της διεπιφάνειας (K_L).

Έχει παρατηρηθεί ότι εάν γίνει δειγματοληψία με την μέθοδο Vac-HSSPME πριν επέλθει ισορροπία στο σύστημα, τότε γίνεται ταχύτερο το φαινόμενο της εξάτμισης των αναλυτών, καθώς η μείωση της συγκέντρωσής τους στην υπερκείμενη αέρια φάση αναπληρώνεται αμέσως. Από την παραπάνω πρόταση συμπεραίνεται ότι η μεταφορά μάζας από το υδατικό δείγμα στην υπερκείμενη φάση παίζει καθοριστικό ρόλο στην διεργασία της HSSPME. Επομένως, γι' αυτό το λόγο επέρχεται ισορροπία ταχύτερα υπό συνθήκες κενού (Vacuum) στην υπερκείμενη φάση απ' ότι σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. [11,27,28,30]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΠΙΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ Vac-HSSPME

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης υπό συνθήκες κενού επηρεάζεται από διάφορα στοιχεία τα οποία έχουν να κάνουν είτε με την χημική σύσταση της ουσίας που εξετάζεται, είτε με τις συνθήκες κάτω από τις οποίες εκτελείτε το πείραμα. Παρακάτω θα αναλυθούν ορισμένες παράμετροι.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την ευαισθησία της μεθόδου SPME είναι: [11, 32, 33,34]

- Η θερμοκρασία δειγματοληψίας και εκρόφησης
- Το pH του δείγματος
- Η ιοντική ισχύς του διαλύματος (ανάλογα της προσδιορισμένης ουσίας)
- Χρόνος εκχύλισης
- Ο τύπος της ίνας
- Η ανάδευση του δείγματος
- Ο όγκος της οργανικής φάσης

5.1.1 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η συγκέντρωση των ημιπτητικών ενώσεων στην αέρια φάση είναι μικρή, και η ποσότητα εκχύλισης με την μέθοδο HSSPME είναι αρκετά μικρότερες. Μια αύξηση στην θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα στην αύξηση της σταθεράς του Henry των αναλυτών, αύξηση του συντελεστή διάχυσης και μείωση του ποσοστού που εκχυλίζεται σε ισορροπία. [36,37]

Η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης μπορεί να έχει δραματική βελτίωση στην ταχύτητα της εκχύλισης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας δειγματοληψίας, ο συντελεστής κατανομής του δείγματος K_g αυξάνεται, με αποτέλεσμα να έχουμε ταχύτερους χρόνους ισορροπίας.

Το μειονέκτημα της θερμοκρασίας είναι ότι η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας δειγματοληψίας και εκχύλισης είναι ο περιορισμός του συντελεστή της ίνας-υπερκειμένης φάσης K_f , και ως εκ τούτου την ικανότητα επικάλυψης ($K_g K_f V_f$). Το σύστημα μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτερους χρόνους ισορροπίας θυσιάζοντας όμως την ευαισθησία. [36,37,38]

Για τον λόγο αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η θερμοκρασία εκχύλισης έτσι ώστε να βελτιστοποιείται η εκχύλιση των ημιπτητικών ουσιών στην υπερκειμένη φάση. Ένας τρόπος για να ελαχιστοποιηθεί το μειονέκτημα των υψηλών θερμοκρασιών είναι η βελτιστοποίηση όλων των παραμέτρων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης.

5.1.2 Επίδραση του pH

Η ρύθμιση του pH του δείγματος μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία της μεθόδου για τις βασικές και όξινες ουσίες προς ανάλυση. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός ότι η μέθοδος SPME μπορεί να εξάγει μόνο ουδέτερα μη-ιοντικά στοιχεία από το νερό, εκτός αν χρησιμοποιείται επικάλυψη ιοντικής ανταλλαγής. Ρυθμίζοντας το pH κατάλληλα, τα ασθενή οξέα και βάσεις μπορεί να εκχυλιστούν στην ίνα SPME. Για να βεβαιωθούμε ότι το 99% της όξινης ένωσης είναι σε ουδέτερη μορφή, το pH πρέπει να είναι τουλάχιστον 2 μονάδες χαμηλότερο από το pKa του αναλυτή. Για τις βασικές ενώσεις, το pH πρέπει να είναι μεγαλύτερο από το pKa κατά 2 μονάδες. [34,37]

5.1.3 Επίδραση της αλατότητας

Για να βελτιωθεί η εκχύλιση οργανικών ουσιών από υδατικά διαλύματα, μια μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά είναι η προσθήκη άλατος. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η σταθερά κατανομής ίνας-μήτρας των ουδέτερων οργανικών μορίων. Γενικότερα, η επίδραση του άλατος αυξάνει τον βαθμό εκχύλισης με αύξηση της πολικότητας της ουσίας, μειώνει τα όρια ανίχνευσης, ενώ οι τυχαίες συγκεντρώσεις άλατος των φυσικών υποστρωμάτων μπορούν να κανονικοποιηθούν.[34]

5.1.4 Επίδραση χρόνου εκχύλισης

Για την διεξαγωγή πειραμάτων με την μέθοδο SPME, είναι σημαντικό σύστημα να επέλθει σε κατάσταση ισορροπίας, να είναι δηλαδή σταθερό. Έτσι, μια μεταβολή στη μεταφορά μάζας δεν επηρεάζει τα τελικά αποτελέσματα. Ο χρόνος μετά τον οποίο η ποσότητα των εκχυλιζόμενων ουσιών παραμένει σταθερή και ανταποκρίνεται στη ν ποσότητα που εκχυλίζεται σε άπειρο χρόνο, είναι ο χρόνος ισορροπίας. Ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζεται από το πάχος της επικάλυψης της ίνας και είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται η λεπτότερη επικάλυψη η οποία δίνει αποδεκτή ευαισθησία. [34]

5.1.5 Επίδραση του τύπου της ίνας

Η επιλογή του τύπου της ίνας καθορίζεται από τη χημική φύση της προς ανάλυση ουσίας, το μοριακό βάρος και το μέγεθος των προς ανάλυση ουσιών, το σημείο βρασμού και την τάση ατμών των προς ανάλυση ουσιών, την πολικότητα της ίνας και της ουσίας, τις χαρακτηριστικές ομάδες της ένωσης και της ίνας, το εύρος των συγκεντρώσεων και τον τύπο του ανιχνευτή. Γενικά ισχύει ένας απλός ενικός κανόνας για την επιλογή ίνας «τα όμοια προσελκύουν όμοια». Οι εμπορικά διαθέσιμες επικαλύψεις ίνας είναι:

- το Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB),
- το Carbowax/Divinylbenzene CW/DVB),

- το Divinylbenzene/Carboxen/ Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS),
- το Carboxen/Polydimethylsiloxane(Carboxen/PDMS),
- το Polyacrylate,
- το PolyethyleneGlycol (PEG) και
- το Polycrate (PA). [34]

5.1.6 Επίδραση ανάδευσης δείγματος

Οι συνθήκες ανάδευσης καθορίζουν τον ρυθμό εκχύλισης και τον χρόνο που θα επέλθει ισορροπία για εκχύλιση από υδατικά δείγματα. Η μαγνητική ανάδευση είναι η πιο κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται στην SPME, καθώς υπάρχει στην πλειοψηφία των αναλυτικών εργαστηρίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με τους τρεις τρόπους της SPME. [34]

5.1.7 Επίδραση όγκου οργανικής φάσης

Η παρουσία ενός οργανικού διαλύτη στο νερό μπορεί να αλλάξει το K σύμφωνα με την εξίσωση:

$$K_{fss} = 2.303 \cdot K_{fw} \exp(P_1 - P_2) / 2$$

Όπου:

K_{fw} : σταθερά κατανομής του καθαρού νερού

P_1 : $P_1 = 10.2$ είναι η παράμετρος πολικότητας του νερού

P_2 : $P_2 = cP_S + (1+c)P_1$ είναι η παράμετρος πολικότητας νερού/διαλύτη για ένα διαλύτη συγκέντρωσης c και πολικότητας P_S .

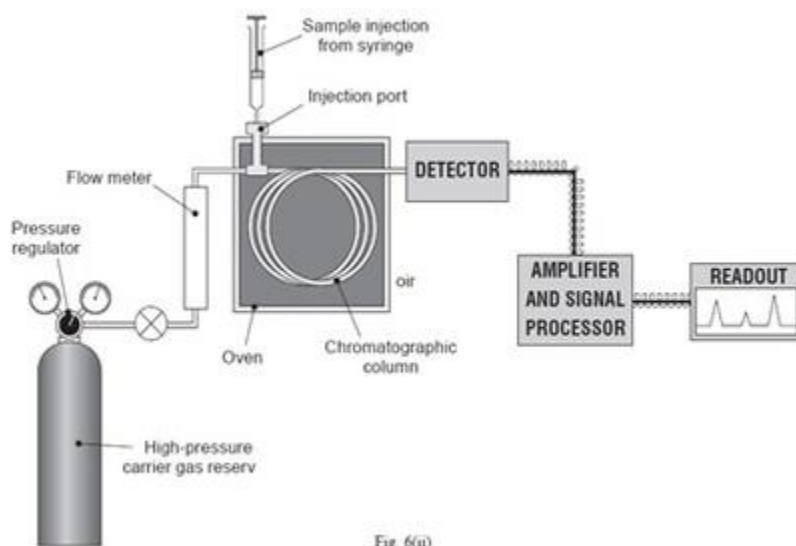
Αυτή η εξίσωση δείχνει ότι η συγκέντρωση του διαλύτη πρέπει να είναι πάνω από 1% για να αλλάξει τις ιδιότητες του νερού και την σταθερά κατανομής. [34]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΕΚΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ GC

6.1 Περιγραφή διαδικασίας

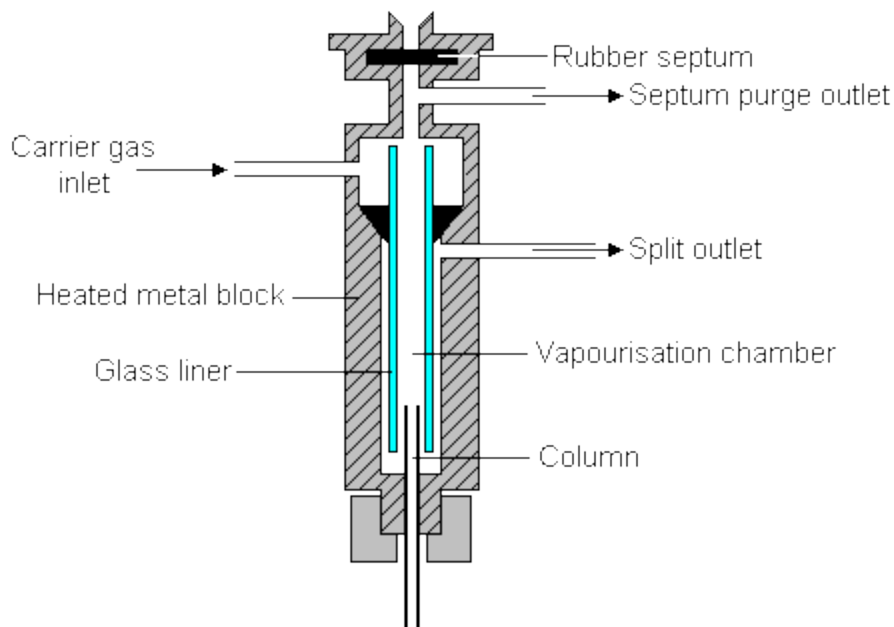
Αέριος χρωματογράφος είναι μια συσκευή η οποία χρησιμοποιείται για την ανάλυση, τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό διαφόρων χημικών ουσιών μέσα σε ένα δείγμα. Η κινητή φάση σε έναν αέριο χρωματογράφο είναι το φέρον αέριο το οποίο συνήθως είναι ένα αδρανές αέριο όπως το ήλιο ή το άζωτο. Η στάσιμη φάση αποτελείται από ένα μικροσκοπικό στρώμα πολυμερούς σε ένα αδρανές στερεό υπόστρωμα, μέσα σε ένα κομμάτι γυάλινου σωλήνα που ονομάζεται στήλη. Οι ενώσεις που αναλύονται αλληλεπιδρούν με τα τοιχώματα της στήλης. Αυτό αναγκάζει κάθε ένωση να εκλουστεί σε διαφορετικό χρόνο. [39,40]



Εικόνα6.1: Αέριος Χρωματογράφος

Η διαδικασία της εκρόφησης είναι ακριβώς η αντίθετη από αυτήν της ρόφησης. Με την εισαγωγή της μικροσύριγγας και έκθεση της ίνας στον εισαγωγέα ξεκινάει η διαδικασία της εκρόφησης. Αυτή πραγματοποιείται λόγω υψηλών γραμμικών ταχυτήτων ροής και υψηλής θερμοκρασίας στον εισαγωγέα του GC. [10,11,28,29]

The split / splitless injector



Εικόνα 6.2: Εισαγωγέας GC

Με αυτό τον τρόπο οι εκροφόμενες ουσίες απομακρύνονται άμεσα από την ίνα χωρίς να αλληλεπιδρούν με το υλικό επικάλυψης και να επιβραδύνουν την διεργασία αυτή. Οι αναλύτες αρχικά μεταφέρονται από το εξωτερικό στρώμα της επικάλυψης της ίνας και όσο περνάει ο χρόνος εκρόφησης μεταφέρονται στα εσωτερικά στρώματα επικάλυψης μέχρι την ολοκλήρωσης της διαδικασίας. Η απόδοση της εκρόφησης εξαρτάται από την ταχύτητα μεταφοράς των αναλυτών από το υλικό επικάλυψης της ίνας στον εισαγωγέα και από εκεί στη στήλη του GC. [10,11,28,29]

6.2 Συνθήκες Αέριου Χρωματογράφου

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος GC-17A του οίκου Shimadzu. Ο εισαγωγέας τέθηκε σε λειτουργία Splitless και ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο με πίεση 600 KPa και συνολική ροή 28 mL/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα είναι 270 °C. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης είναι 32 min και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου φαίνεται στον πίνακα 6.1. Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής χρωματογραφική στήλη και τα χαρακτηριστικά της παρουσιάζονται στον πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.1: Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα

Step	Rate (°C/min)	Temp(°C)	Wait(min)
Initial		100	2
1	20	200	0
2	2	250	0

Πίνακας 6.2. Χαρακτηριστικά τριχοειδούς στήλης

Χαρακτηριστικά	Μέγεθος
Τύπος (Type)	HPSMS
Μήκος (Length)	30 m
ID	0,25 m
Φιλμ (Film)	0,25 m

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1 Αντιδραστήρια και Όργανα

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

- i. Lindane και 4,4'-DDE του οίκου R.D.H.
- ii. Ακετόνη (acetone) μεβαθμόκαθαρότητας 'analytical grade' της Fisher Scientific
- iii. Εξάνιο (Hexane) της Merckγια τον αέριο χρωματογράφο και
- iv. Χλωριούχο Νάτριο (Sodium Chloride) της R.D.H.

Αρχικά, κατασκευάστηκαν τα λεγόμενα πυκνά πρότυπα διαλύματα (stock individuals) τοποθετώντας 31,60 mg Lindane σε μορφή σκόνης καθώς και 31,65 mg 4,4'-DDE σε ξεχωριστά φιαλίδια με 5 mL acetone το καθένα. Αυτά είχαν συγκέντρωση $C_{\text{Lindane}}=6721,4$ ppm και $C_{\text{DDE}}=6766,7$ ppm. Καθημερινά προπαρασκευάζονταν τα πρότυπα διαλύματα εργασίας (working standards) σε συγκεντρώσεις και ποσότητες που απαιτούνταν για κάθε πείραμα. Για την κατασκευή των υδατικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο (ultrapure) νερό από το σύστημα καθαρισμού ύδατος EASYpureRF από την Barnstead/ThermoLyne και οι εμβολιασμοί (spike) των δειγμάτων γίνονταν με μικροσύριγγες.

7.2 Όργανα και Συσκευές

Χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος μοντέλου GC-17A gas chromatography της Shimadzu, ενώ ο ανιχνευτής είναι του τύπου ECD-17 Ver2 (Electron Capture Detector). Για την εξασφάλιση κατάλληλων συνθηκών θερμοκρασίας το πείραμα λάμβανε μέρος σε ένα Incubator ρυθμισμένο στους 25 °C της Elven, Athens, Greece. Χρησιμοποιήθηκε ένα SPME-PDMS των 100 μm και SPME holder το οποίο προμηθεύεται από την Supelco, Bellefonte, PA. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων υπό συνθήκες κενού χρησιμοποιήθηκε ειδική γυάλινη στρογγυλή δειγματοληπτική φιάλη (round Gas Sampling Bulb, RGSB) καθώς και μια σύριγγα κενού (gas tight syringe SGE, Australia) των 10 mL.

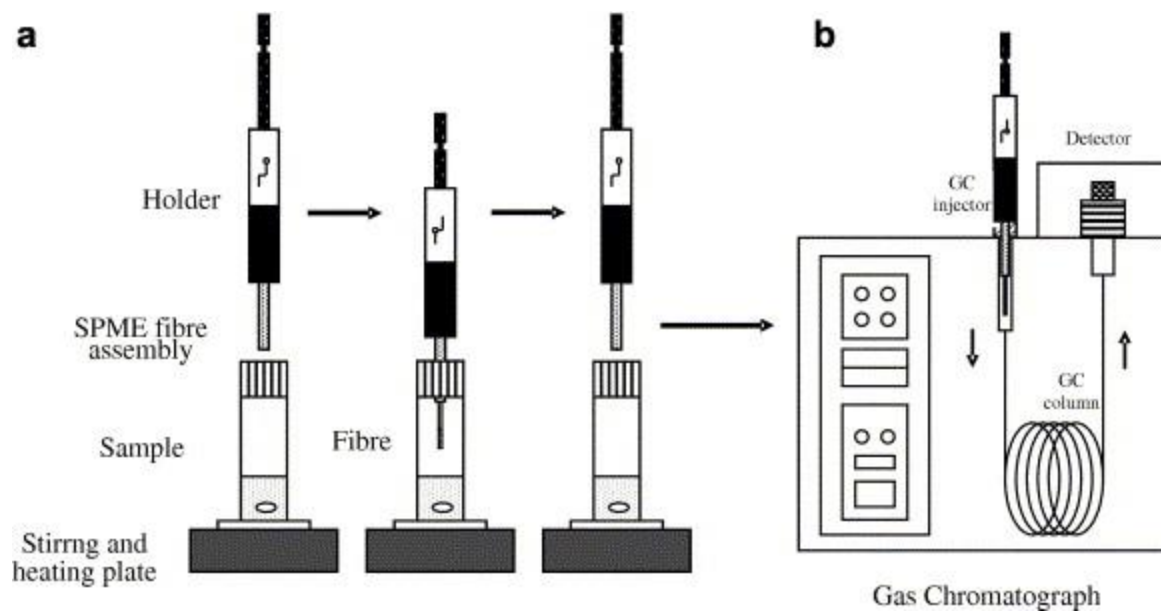
Για την ανάδευση του δείγματος μέσα στην δειγματοληπτική φιάλη χρησιμοποιήθηκε μαγνητικός αναδευτήρας (Sigma-Aldrich) επικαλυπτόμενος με Teflon (10mmx 5mm). Τα Septum που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύονται από την Shimadzu και είναι τύπου Thermo-green LB-2 για τον αέριο χρωματογράφο και τύπου Thermo-green LB-1 για την δειγματοληπτική φιάλη. Τέλος, για την πραγματοποίηση κενού στην δειγματοληπτική φιάλη χρησιμοποιήθηκε μια αντλία κενού Vacuum-brand GmbH & Co.KG μοντέλου MZ 2CNT (Wertheim, Germany) αλλά και ένα όργανο μέτρησης pH.

7.3 Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά, από τα διαλύματα stock των ουσιών Lindane και 4,4'-DDE έγινε αραιώση σε ξεχωριστά φιαλίδια που περιείχαν 5 mL ακετόνης μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση των 100 ppm. Από τα διαλύματα των 100 ppm κάθε τρεις με τέσσερις μέρες κατασκευάζοταν διάλυμα (ενδιάμεσο διάλυμα) που περιείχε και τις δύο ουσίες μαζί (Mix₁) σε 5 mL ακετόνη με τελική συγκέντρωση 1 ppm. Τέλος, καθημερινά από το ενδιάμεσο διάλυμα τραβούσαμε 50 μL με μικροσύριγγα και τα τοποθετούσαμε σε φιάλη των 100 mL μαζί με υπερκάρθαρο νερό (Mix₂) για τελική συγκέντρωση 0,5 μg/L. Αυτή η διαδικασία γινόταν έτσι ώστε τα διαλύματα να μπορούν να ανιχνευτούν στον αέριο χρωματογράφο και να μην βρίσκονται εκτός των ορίων του.

Στην συνέχεια, ύστερα από καλό καθάρισμα της RGSB φιάλης γινόταν τοποθέτηση ενός μαγνήτη στο εσωτερικό της για την πραγματοποίηση της ανάδευσης. Από εκεί, γινόταν σύνδεση του ειδικού στομίου της φιάλης με την αντλία κενού. Ύστερα από 2 λεπτά περίπου λειτουργίας της αντλίας έκλεινε η βάννα της δειγματοληπτικής συσκευής για την διατήρηση της χαμηλής πίεσης στο εσωτερικό της. Έπειτα, ανάλογα με το πείραμα γινόταν εισαγωγή ορισμένων mL από το Mix₂ με την βοήθεια σύριγγας κενού από το ειδικό στόμιο της φιάλης μέσω του septum που βρίσκεται στο πάνω μέρος της.

Σε αυτό το σημείο η φιάλη τοποθετείται στον incubator για την διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας πάνω στην συσκευή ανάδευσης για δέκα λεπτά, εκτός αν το πείραμα απαιτεί διαφορετικό χρόνο, μέχρι να επέλθει ισορροπία. Με το πέρας των δέκα λεπτών γίνεται εισαγωγή της SPME holder από το septum της φιάλης και έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο αέριο χώρο πάνω από το μείγμα που εξετάζεται. Όταν περάσει ο χρόνος δειγματοληψίας γίνεται εισαγωγή της ίνας μέσα στο SPME holder, απομακρύνεται από την φιάλη και τοποθετείται στον εισαγωγέα του GC. Εκεί παραμένει για έξι λεπτά μετά από τα οποία η συσκευή SPME απομακρύνεται από τον εισαγωγέα και είναι έτοιμη να χρησιμοποιηθεί ξανά. Όλα τα πειράματα έγιναν εις διπλούν.



Εικόνα 7.1: Στάδια δειγματοληψίας και εκρόφησης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία θα εξεταστούν ορισμένοι παράμετροι προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος Vac-HSSPME. Αυτές οι παράμετροι δίνονται στον παρακάτω πίνακα. Με τον έλεγχο κάθε παραμέτρου, το επόμενο πείραμα θα πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους που έχουν ήδη βελτιστοποιηθεί.

Πίνακας 8.1: Εξεταζόμενες παράμετροι

Έλεγχοι κατά την Πειραματική Διαδικασία	
Ποσότητα NaCl (% w/v)	0, 5, 10, 15, 20
pH	2.3, 4.27, 6.03, 7.87, 9.90
Χρόνος Εκχύλισης (min)	5, 10, 15, 30, 45, 60, 90
Θερμοκρασία (°C)	20, 45

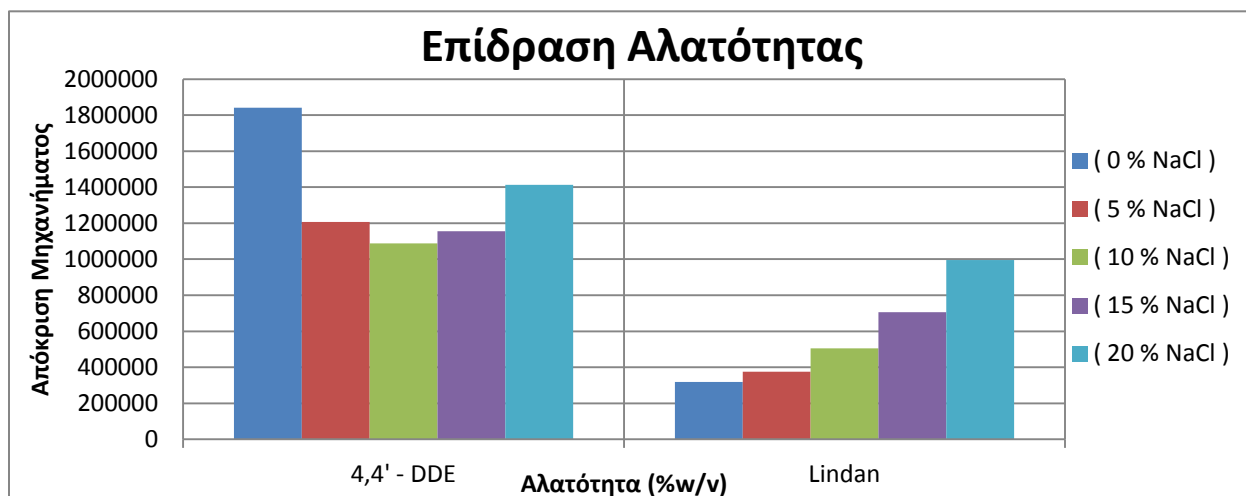
Οι έλεγχοι χρόνου εκχύλισης και θερμοκρασίας έγιναν υπό συνθήκες κανονικής πίεσης αλλά και υπό συνθήκες κενού μέσα στην δειγματοληπτική φιάλη. Για τα συγκεκριμένα δείγματα επιλέχθηκε η ίνα PDMS των 100 μm , η οποία δίνει καλύτερη απόδοση στα πειράματα.

8.1 Επίδραση Ιοντικής Ισχύος (NaCl)

Ο έλεγχος αυτός γίνεται διότι σύμφωνα με παλιότερες (Magdicetal. 1996, Zamboninetal. 2006) η προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο υδατικό δείγμα μπορεί να αυξήσει την ικανότητα εκχύλισης για πολλές ουσίες.

Για τον έλεγχο της επίδρασης της αλατότητας κατασκευάστηκαν πέντε υδατικά δείγματα σε φιάλες των 100 mL με ποσοστό αλατότητας 0, 5, 10, 15 και 20 %w/v. Στην συνέχεια, κατασκευάστηκε το ενδιάμεσο μείγμα (Mix₁) που έχει αναφερθεί παραπάνω και από αυτό τοποθετήθηκαν 50 μL στις πέντε φιάλες με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις σε NaCl. Έτσι, το Lindane και το 4,4'-DDE είχαν τελική συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g/L}$.

Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ήταν 25 °C οι οποίοι διατηρούνταν σταθεροί μέσα στον incubator, ο όγκος δείγματος που επιλέχθηκε ήταν 10 mL, ο χρόνος ισορροπίας ήταν 10 min με ανάδευση στα 1000rpm και ο χρόνος εκχύλισης στα 30 min με την ίδια ανάδευση. Τα αποτελέσματα που έδωσε ο αέριος χρωματογράφος για το συγκεκριμένο πείραμα φαίνονται στην εικόνα 8.1.



Εικόνα 8.1. Επίδραση αλατότητας στην Vac-HSSPME

Από το διάγραμμα παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl τόσο αυξάνεται και η απόκριση του μηχανήματος για το Lindane. Από αυτό συμπεραίνεται ότι η αλατότητα επηρεάζει το Lindane λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης (salting out effect) καθώς απελευθερώνονται περισσότεροι αναλύτες στην υπερκείμενη επιφάνεια ενισχύοντας το φαινόμενο της προσρόφησης στην ίνα.

Για το DDE όμως δεν συμβαίνει το ίδιο, καθώς σε συγκέντρωση αλατότητας 0%, παρατηρείται μέγιστη απόκριση μηχανήματος. Επομένως, σύμφωνα με τη δεύτερη περίπτωση, η ύπαρξη αλατιού μειώνει την απόκριση και άρα επηρεάζει αρνητικά τον προσδιορισμό της ουσίας.

Έχει παρατηρηθεί ότι, κατά την αύξηση της συγκέντρωσης των αλάτων πάνω από ένα σημείο, δημιουργείται μια στοιβάδα στην επιφάνεια του διαλύματος η οποία εμποδίζει την μεταφορά των αναλυτών στην υπερκείμενη φάση. Επομένως, η προσθήκη άλατος ενισχύει το φαινόμενο της εξαλάτωσης μέχρι ένα σημείο.

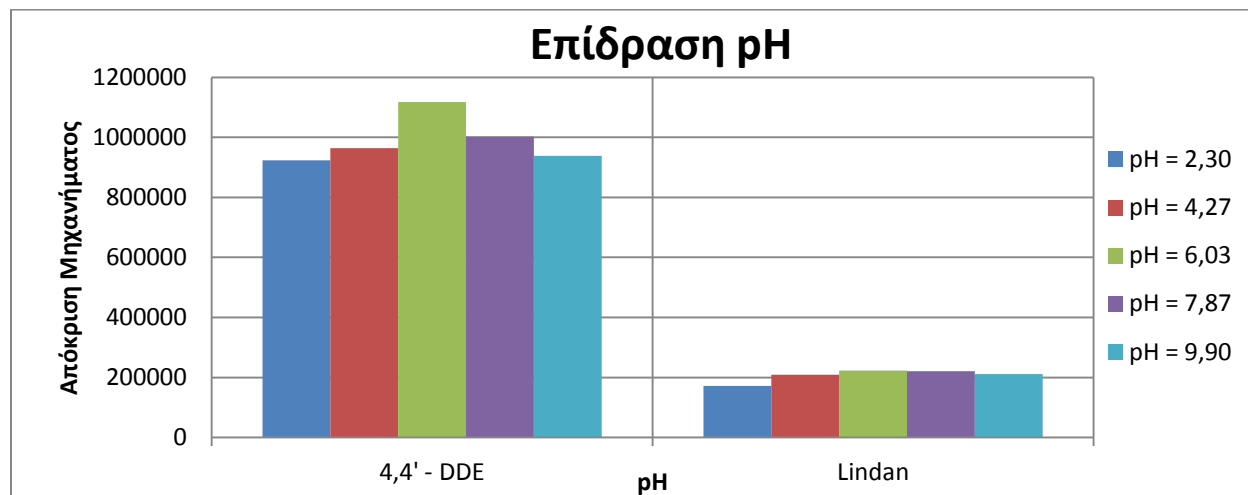
Τελικά, επιλέχθηκε ποσοστό αλατότητας 0%.

8.2 Επίδραση του pH

Για τον έλεγχο της επίδρασης του pH κατασκευάστηκε εκ' νέου το ενδιάμεσο μίγμα (Mix₁). Σε πέντε ξεχωριστές φιάλες των 100 mL τοποθετήθηκε υπερκάθαρο νερό με pH γύρω στο 6. Σε δύο από αυτές τοποθετήθηκαν ορισμένες σταγόνες από βασικό υδατικό διάλυμα με pH=2 και με την βοήθεια ενός πεχάμετρου καταλήξαμε σε τα pH 2,3 και 4,3. Σε δύο άλλες φιάλες τοποθετήθηκαν ορισμένες σταγόνες από υδατικό διάλυμα με pH περίπου 10 μέχρι τις τιμές 7,9 και 9,9 αντίστοιχα. Η τρίτη φιάλη παρέμεινε στο pH του Υρ-H₂O, δηλαδή στο 6,03. Στην

συνέχεια, από το Μίχ₁ τοποθετήθηκαν 50 μL στις πέντε φιάλες με τα διαφορετικά pH για τελική συγκέντρωση Lindane και DDE 0,5 μg/L.

Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ήταν 25°C οι οποίοι διατηρούταν σταθεροί μέσα στον incubator, ο όγκος δείγματος που επιλέχθηκε ήταν 10 mL, ο χρόνος ισορροπίας ήταν 10 min με ανάδευση στα 1000rpm και ο χρόνος εκχύλισης στα 30 min με την ίδια ανάδευση. Τα αποτελέσματα που έδωσε ο αέριος χρωματογράφος για το συγκεκριμένο πείραμα φαίνονται στην εικόνα 8.2.



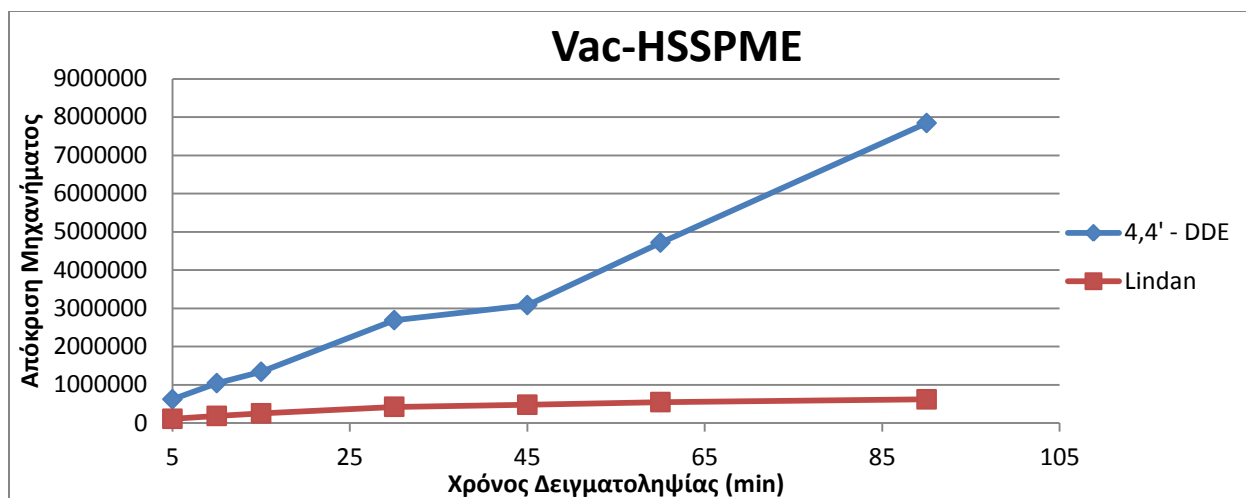
Εικόνα 8.2. Επίδραση pH στην Vac-HSSPME

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η αλλαγή του pH δεν επηρεάζει την εκχύλιση, καθώς η διαφορά της απόκρισης του αέριου χρωματογράφου για τα διαφορετικά pH και των δύο ουσιών δεν είναι αξιόλογη. Από αυτό συμπεραίνεται ότι το pH του δείγματος δεν επηρεάζει την ανάλυση των ουσιών Lindane και DDE. Τελικά επιλέχθηκε pH ίσο με του υπερκάθαρου.

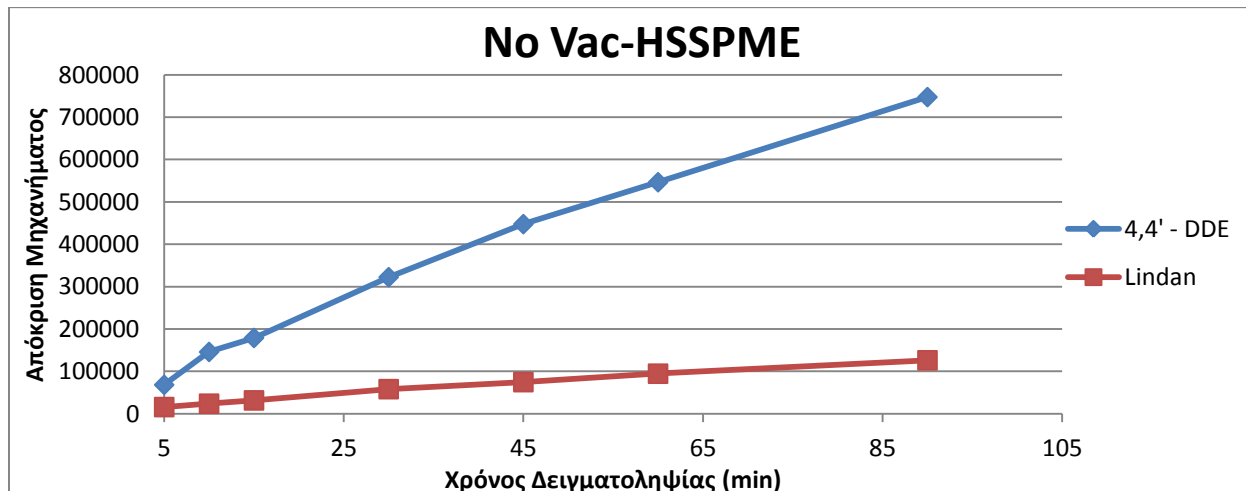
8.3 Επίδραση Χρόνου Εκχύλισης

Για τον έλεγχο του χρόνου εκχύλισης κατασκευάστηκε αρχικά ξανά το ενδιάμεσο διάλυμα (Μίχ₁). Από αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα με συγκέντρωση Lindane και DDE 0,5 μg/L.

Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ήταν 25 °C οι οποίοι διατηρούταν σταθεροί μέσα στον incubator, ο όγκος δείγματος που επιλέχθηκε ήταν 10 mL και ο χρόνος ισορροπίας ήταν 10 min με ανάδευση στα 1000rpm. Τα πειράματα αυτά έγιναν από τέσσερις φορές το καθένα, δύο υπό συνθήκες κανονικής πίεσης (No-Vacuum) και δύο υπό συνθήκες κενού (Vacuum). Τα αποτελέσματα που έδωσε ο αέριος χρωματογράφος για το συγκεκριμένο πείραμα φαίνονται στις εικόνες 8.3 και 8.4



Εικόνα 8.3: Επίδραση χρόνου εκχύλισης στην Vac-HSSPME



Εικόνα 8.4: Επίδραση χρόνου εκχύλισης στην HSSPME

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι η μέθοδος HSSPME είναι πολύ πιο αποτελεσματική και γρήγορη υπό συνθήκες κενού απ' ότι υπό συνθήκες κανονικής πίεσης. Επίσης, όσο περνάει ο χρόνος εκχύλισης τόσο μεγαλύτερη είναι η απόκριση του αέριου χρωματογράφου για το DDE και στις δύο περιπτώσεις πράγμα που σημαίνει ότι δεν έχει επέλθει ισορροπία ακόμα. Για το Lindane στην HSSPME υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης φαίνεται ότι το σύστημα δεν έχει φτάσει σε ισορροπία ακόμα καθώς η απόκριση του μηχανήματος αυξάνεται όσο περνάει ο χρόνος εκχύλισης. Αντίθετα, στην Vac-HSSPME έχει επιτευχθεί διότι από τα 30 min και μετά δεν παρατηρείται αύξηση στην απόκριση του μηχανήματος. Όσο το σύστημα πλησιάζει σε συνθήκες ισορροπίας ο ρυθμός μεταφοράς μάζας ελαττώνεται, παρ' όλα αυτά η πλήρης ισορροπία επέρχεται μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα.

Μείωση του χρόνου εκχύλισης μπορεί να επιτευχθεί με μείωση της πίεσης στην υπερκείμενη επιφάνεια μέχρι και σε συνθήκες κενού, πράγμα που έγινε κατά την διάρκεια των πειραμάτων αυτής της πτυχιακής εργασίας. Η μειωμένη πίεση στο εσωτερικό της φιάλης δειγματοληψίας οδηγεί στην ενίσχυση της διάχυσης των αναλυτών από το δείγμα στην ίνα αλλά και την μεταφορά των ημιπτητικών ουσιών σε μεγαλύτερο βαθμό στην ίνα, πράγμα το οποίο ενισχύει το φαινόμενο της HSSPME. Η Vac-HSSPME όμως αυξάνει αποτελεσματικά την μέθοδο μόνο όταν οι συνθήκες μειωμένης πίεσης παραμείνουν σταθερές μέσα στην φιάλη δειγματοληψίας. Όταν δεν συμβαίνει αυτό, έχουμε αστοχία στις μετρήσεις. [10,11]

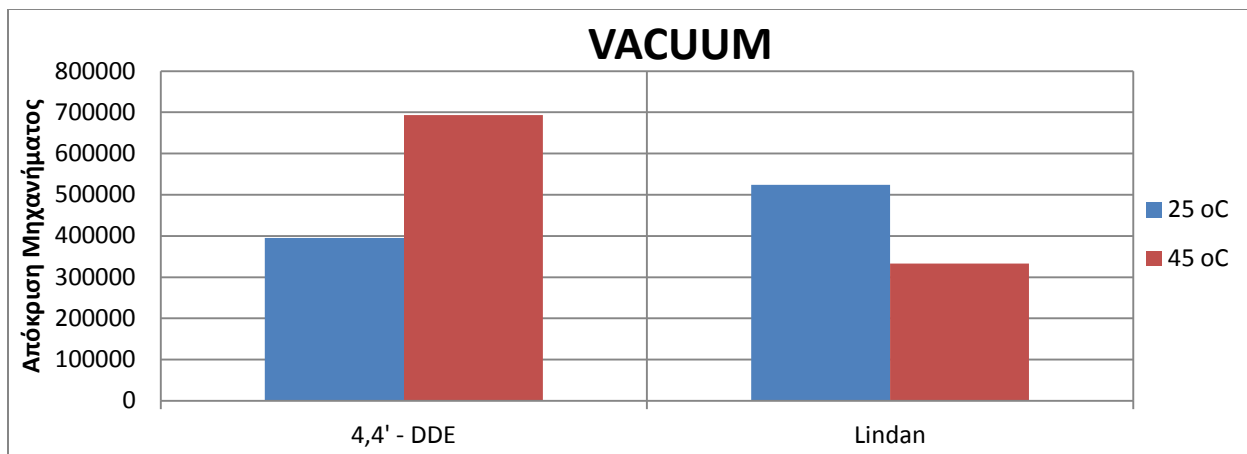
Η μείωση της πίεσης βοηθάει τον αναλυτή να εντοπίσει κυρίως ημιπτητικές ενώσεις, ουσίες δηλαδή που χαρακτηρίζονται από χαμηλό K_H και χαμηλές σταθερές κατανομής μεταξύ της υπερκείμενης αέριας φάσης και της ίνας, αντί πτητικών ενώσεων. Αυτό συμβαίνει διότι οι πτητικές ουσίες έχουν ήδη πολύ μικρό χρόνο εκχύλισης και δεν παρατηρείται ιδιαίτερη επίδραση κατά την διαδικασία εκχύλισης των ουσιών αυτών. Αντίθετα, παρατηρείται αύξηση του ρυθμού εξάτμισης των ημιπτητικών ουσιών προς την υπερκείμενη αέρια επιφάνεια με αποτέλεσμα να επέρχεται ισορροπία γρηγορότερα και ο αναλυτής να εντοπίσει με μεγαλύτερη ευκολία τις ημιπτητικές ουσίες. [10,11]

Τελικά επιλέχθηκε χρόνος εκχύλισης 30 λεπτά.

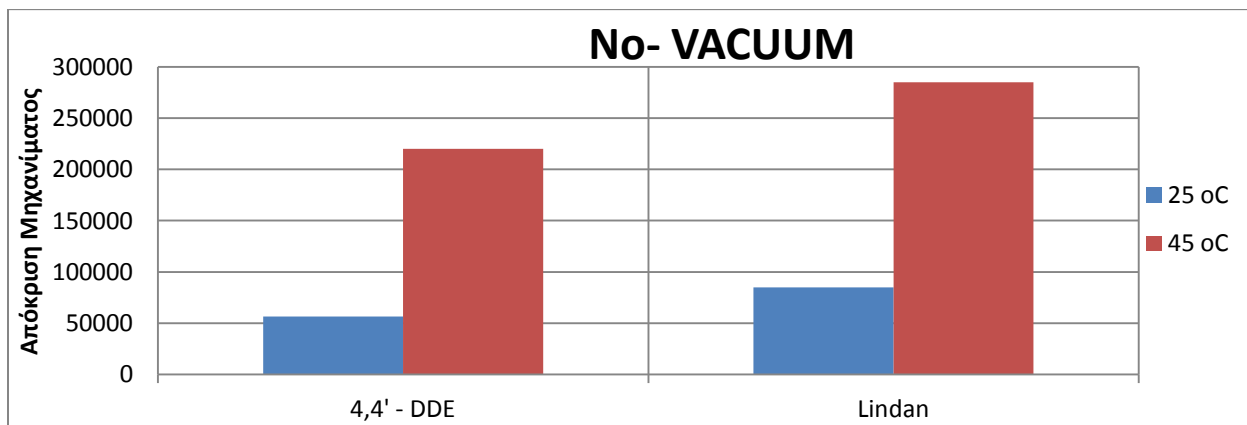
8.4 Επίδραση θερμοκρασίας

Τέλος, έγινε έλεγχος στην επίδραση της θερμοκρασίας. Αυτό έγινε σε θερμοκρασίες 25 και 45°C. Κατασκευάστηκε ξανά το ενδιάμεσο διάλυμα (Mix₁). Από αυτό τοποθετήθηκαν 50 μL σε φιάλη των 100 mL μαζί με Ultra pure-H₂O. Έτσι το τελικό δείγμα έχει συγκέντρωση Lindane και DDE 0,5 μg/L.

Ο όγκος δείγματος που επιλέχθηκε ήταν 10 mL, ο χρόνος ισορροπίας ήταν 10 min με ανάδευση στα 1000rpm και ο χρόνος εκχύλισης ήταν 30 min με την ίδια ανάδευση. Για τους 25°C η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή μέσα στον incubator ενώ για τους 45°C χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο. Τα πειράματα αυτά έγιναν από τέσσερις φορές το καθένα, δύο υπό συνθήκες κανονικής πίεσης και δύο υπό συνθήκες κενού. Τα αποτελέσματα που έδωσε ο αέριος χρωματογράφος για το συγκεκριμένο πείραμα φαίνονται στις εικόνες 8.5 και 8.6.



Εικόνα 8.5: Επίδραση θερμοκρασίας στην Vac-HSSPME



Εικόνα 8.6: Επίδραση θερμοκρασίας στην HSSPME

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι ένα σημείο αυξάνει την απόδοση της μεθόδου HSSPME και Vac-HSSPME. Εξάιρεση αποτελεί η απόκριση του μηχανήματος για το Lindane στους 45°C η οποία έχει μικρότερη απόκριση από αυτήν των 25°C. Αυτό μάλλον οφείλεται στην υψηλή πίεση ατμών με αποτέλεσμα η μέγιστη εκχύλιση να πραγματοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται ότι αυξάνεται και η πίεση της εξάτμισης των ατμών του αναλύτη. Έτσι η συγκέντρωση του αναλύτη αυξάνεται στην υπερκείμενη αέρια φάση, απ' όπου γίνεται η δειγματοληψία. Επίσης, επέρχεται γρηγορότερα ισορροπία απ' ότι σε μικρότερες θερμοκρασίες. Ένα μειονέκτημα της αύξησης της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση είναι ότι μειώνεται η σταθερά κατανομής του εκάστοτε αναλύτη. Με λίγα λόγια, με την αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση παρατηρείται αύξηση του ρυθμού εκχύλισης. [41]

Το μειονέκτημα που αναφέρθηκε παραπάνω, αντιμετωπίζεται με τη χρήση μιας ειδικής ίνας η οποία ψύχεται εσωτερικά όταν το υπόλοιπο σύστημα θερμαίνεται με αποτέλεσμα η σταθερά κατανομής του αναλύτη να παραμένει σταθερή σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Η ειδική αυτή συσκευή ονομάζεται `` ColdFiber `` την οποία ανακάλυψε ο J.Pawliszyn μαζί με την επιστημονική του ομάδα. Όμως, η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας, ακόμα και με την βοήθεια της συσκευής ColdFiber, οδηγεί στην μείωση της σταθεράς κατανομής αλλά και στην αλλοίωση των συστατικών της μήτρας προκαλώντας αστάθεια στα μόρια των αναλυτών και αστοχία του πειράματος. Γι αυτό το λόγο, η αύξηση της θερμοκρασίας πρέπει να γίνεται μέσα σε επιτρεπτά όρια. [11,28,29,41]

9^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος μικροεκχύλισης στερεής φάσης στην υπερκείμενη φάση υπό συνθήκες κενού (Vac-HSSPME) αποδείχθηκε μια εύκολη και απλή μέθοδος προσδιορισμού, ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργανοχλωριωμένων ενώσεων όπως το Lindane και το 4,4'-DDE σε υδατικά δείγματα. Με την δημιουργία κενού στο εσωτερικό της φιάλης δειγματοληψίας επιτυγχάνεται μείωση της διαλυτότητας των ουσιών που έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια των ουσιών προς ανάλυση να έχουν τάση διαφυγής προς την υπερκείμενη επιφάνεια αυξάνοντας έτσι την συγκέντρωσή τους εκεί και κατ' επέκταση και στην επιφάνεια της ίνας. Έγινε μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την Vac-HSSPME όπως η περιεκτικότητα σε NaCl, το pH, ο χρόνος εκχύλισης και η θερμοκρασία εκχύλισης. Επίσης έγινε σύγκριση των παραμέτρων αυτών και σε συνθήκες κανονικής πίεσης στην δειγματοληπτική φιάλη όπου τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά υπό συνθήκες κενού. Η Vac-HSSPME είναι μια πολύ εύκολη, γρήγορη και πολλά υποσχόμενη μέθοδος προετοιμασίας δείγματος ανίχνευσης ρυπαντών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο υδατικό περιβάλλον. Με τη δημιουργία κενού, αυξάνεται η τάση διαφυγής των ουσιών προς την υπερκείμενη επιφάνεια και κατ' επέκταση στην επιφάνεια της ίνας (μείωση χρόνου εκχύλισης). Γενικά η αύξηση της αλατότητας πάνω από ένα σημείο εμποδίζει την μεταφορά στην υπερκείμενη φάση. Για το 4,4'-DDE αποδείχθηκε αυτό, ενώ για το Lindane τα αποτελέσματα έδειξαν πως ενισχύεται η απόκριση του μηχανήματος. Όσον αφορά το pH, σύμφωνα με τα αποτελέσματα συμπεραίνεται πως δεν επηρεάζει την εκχύλιση. Η αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι ένα σημείο αυξάνει την απόδοση της HSSPME και της Vac - HSSPME

Βιβλιογραφία

- [1] Ελευθέριος Βελλής, 2013. Οικονομικές επιπτώσεις της ευρωπαϊκής νομοθεσίας στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Πανεπιστήμιο Μακεδονίας.
- [2] Διατριβή Γεωπονικής Σχολής Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου 2007, {<http://invenio.lib.auth.gr/record/101288/files/PAPADAKIS.pdf?version=1>}
- [3] Λειτουργίες του Ποταμού – Η Σχέση με τον Άνθρωπο, {<http://www.bio.auth.gr/river/river/theory/unit4/chapter5.htm#5.5>}
- [4] Wikipedia {<http://en.wikipedia.org/wiki/Aldrin>}
- [5] Public Health Goal for LINDANE In Drinking WaterOffice of Environmental Health Hazard AssessmentCalifornia Environmental Protection Agency. 1999
- [6] Addendum to the 2002 Lindane reregistration eligibility decision (RED). EPA, July 2006
- [7] Ανώνυμος. Sheffield Hallam University. Gas Chromatography
- [8] Wikipedia. 4,4'-DDE. { <http://en.wikipedia.org/wiki/Dichlorodiphenyldichloroethylene> }
- [9] Chapter 5: DDE. EPA report 815-R-08-012. June 2008
- [10] Τσιγαρίδα Αναστασία, 2011. Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση οργανοχλωριωμένων ενώσεων με χρήση μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
- [11] Αντωνία Μουσουράκη, Χανιά (2012). Διερεύνηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού “Vac-HSSPME”, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
- [12] Λιούρτα Νικολέτα, Χανιά (2008). Συγκριτική Αξιολόγηση Πειραματικών Μεθόδων προσδιορισμού Πετρελαϊκών Ρύπων σε Περιβαλλοντικά Δείγματα {<http://poseidon.library.tuc.gr/artemis/MT2008-0111/MT2008-0111.pdf>}
- [13] Χημικό Εργαστήριο, Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία (ΜΣ) {chimikoergastirio.blogspot.gr/2009/11/s.html}
- [14] Ευάγγελου Μπακέα – Κων/νου Ευσταθίου, Αθήνα 2008 Εισαγωγή στους Αναλυτικούς Διαχωρισμούς {www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/DIAXORISMOI_10.pdf}
- [15] Agnieszka Zgoła-Grzeskowiak, Tomasz Grzeskowiak, October 2011 TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 30 {<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993611001671>}
- [16] Παπαδοπούλου Αικατερίνη, Χανιά (2010). Μικροεκχύλιση με χρήση ηλεκτρομεμβράνης για την ανάλυση παραβενίων σε υδατικά δείγματα και απόβλητα. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
- [17] John V.Hinshaw, Serveron Corp. Hillsboro, Oregon, USA (Solid-Phase Microextraction) {<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc europe/462003/75775/article.pdf>}
- [18] Xianhao Cheng, Jennifer Forsythe, Earl Peterkin: Some factors affecting SPME analysis and PAHs in Philadelphia’s urban waterways. Philadelphia Water Department, Organics Laboratory, Bureau of Laboratory Services, 1500 E. Hunting Park Avenue, Philadelphia, PA 19124, USA

- [19] Λιούρτα Νικολέτα. Συγκριτική Αξιολόγηση Πειραματικών Μεθόδων Προσδιορισμού Πετρελαϊκών Ρύπων σε Περιβαλλοντικά Δείγματα. Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Χανιά 2008 { <http://poseidon.library.tuc.gr/artemis/MT2008-0111/MT2008-0111.pdf> }
- [20] Janusz Pawliszyn. Theory of Solid-Phase Microextraction. Department of Chemistry, University of Waterloo, ON, N2L 3G1, Canada. { <http://chromsci.oxfordjournals.org/content/38/7/270.full.pdf> }
- [21] Janusz Pawliszyn: Applications of Solid Phase Microextraction. Royal Society of Chemistry 1999 { http://books.google.gr/books?id=M5TTT_8WfW0C&pg=PA169&lpg=PA169&dq=spme+basics&source=bl&ots=qb-spq0BFh&sig=85U--B3u22eSFx6QOxvtDUoAJtk&hl=el&sa=X&ei=L1zEUYjVJ4rVtQah_YGQBA&ved=0CG4Q6AEwBw#v=onepage&q=spme%20basics&f=true }
- [22] Dr. Frank Michael, Klaus Buckendahl: Basics in Solid Phase Micro Extraction (PSME) and applications in food and environmental analysis. Euroanalysis 2001
- [23] López-Darias J, Pino V, Anderson JL, Graham CM, Afonso AM. Determination of water pollutants by direct-immersion solid-phase microextraction using polymeric ionic liquid coatings. 19 February 2010
- [24] Haiou Zhu, Zhigang Lu, Jianjun Li and Lirong Gao. Development of a headspace–SPME–GC/MS method to determine volatile organic compounds released from textiles. China 2009
- [25] Sjaak de Koning, Hans-Gerd Janssen. Modern Methods of Sample Preparation for GC Analysis. February 2008 Germany
- [26] Library 4 Science. Head Space Analysis { <http://www.chromatography-online.org/topics/head/space/analysis.html> }
- [27] Eleftheria Psillakis, Evangelia Yiantzi, Lucia Sanchez-Prado, Nicolas Kalogerakis. Vacuum-assisted headspace solid phase micro-extraction: Improved extraction of semi volatiles by non-equilibrium headspace sampling under reduced pressure conditions. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά 2011.
- [28] Eleftheria Psillakis, Antonia Mousouraki¹, Evangelia Yiantzi¹, Nicolas Kalogerakis. Effect of Henry's law constant and operating parameters on vacuum-assisted headspace solid phase micro-extraction. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2012.
- [29] Pawliszyn J. 1997. Solid Phase Microextraction, Theory and Practice. Wiley-VHC
- [30] Pawliszyn J., Pawliszyn B. Pawliszyn M., 1997. The chemical Educator, vol. 2, No 4.
- [31] Haiou Zhu, Zhigang Lu, Jianjun Li and Lirong Gao. Development of a headspace–SPME–GC/MS method to determine volatile organic compounds released from textiles. China 2009
- [32] Ευάγγελου Μπακέα, Κων/νου Ευσταθίου. Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας. Εισαγωγή στους Αναλυτικούς Διαχωρισμούς. Αθήνα 2008, { http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/DIAXORISMOI_10.pdf }
- [33] Μικροεκχύλιση Στερεής Φάσης (Solid Phase Micro-extraction - SPME) { <http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2009/11/solid-phase-microextraction-spme.html> }
- [34] Μπούκη Χρυσούλα, 2008. ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ ΕΝΕΪΛΟΔΑΙΝΟΛΗΣ ΣΕ ΒΙΟΜΑΖΑ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ.

- [35] Alaee, M., Whittal, R. M., Strachan, W. M. J., 1996. The Effect of Water Temperature and Composition on Henry's Law Constant for Various PAHs. *Chemosphere*, Vol32, 6, 1153-1164.
- [36] Ai, J., 1997. Headspace Solid Phase Microextraction. Dynamics and Quantitative Analysis before Reaching a Partition Equilibrium. *Anal. Chem.*, 69, 3260-3266
- [37] Pawliszyn, J., 2000. Theory of Solid-Phase Microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 38, 270-278
- [38] Górecki, T., Khaled, A., Pawliszyn, J., 1998. The Effect of Sample Volume on Quantitative Analysis by Solid-Phase Microextraction. Part 2. Experimental Verification. *Analyst*, 123, 2819-2824
- [39] Wikipedia. Gas Chromatography
- [40] Ανώνυμος. Sheffield Hallam University. Gas Chromatography
- [41] S. J. Shahtaheri, H. R. Heidari, F. Golbabaeei, M. Alimohammadi, A. Rahimi Froshani. Department of Occupational Health, Center for Environmental Research, School of Public Health, Medical Sciences/University of Tehran, Tehran, Iran. Department of Environmental Health Engineering and Center for Environmental Research, School of Public Health, Medical Sciences/University of Tehran, Tehran, Iran. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Medical Sciences/University of Tehran, Tehran, Iran. SOLID PHASE MICROEXTRACTION FOR TRACE ANALYSIS OF URINARY BENZENE IN ENVIRONMENTAL MONITORING. June, 2006.