



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**Προσδιορισμός Geosmin και 2-Methylisoborneol με χρήση
καινοτόμου τεχνικής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπό συνθήκες
κενού**

ΜΑΡΙΑ-ΛΗΤΩ ΓΛΥΚΙΩΤΗ

Εξεταστική Επιτροπή:

Αναπλ. Καθηγ. Ψυλλάκη Ελευθερία (επιβλέπουσα)

Καθηγ. Καλογεράκης Νικόλαος

Δρ. Τυροβολά Κωνσταντίνα

Χανιά, 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
1 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	8
ΓΕΩΣΜΙΝΗ ΚΑΙ 2-ΜΕΘΥΛΟΪΣΟΒΟΡΝΕΟΛΗ.....	8
1.1 Ημιπτητικές Ενώσεις.....	8
1.2 Προέλευση γεωσμίνης και 2-μεθυλοϊσοβορνεόλης (2-MIB) στο περιβάλλον	8
1.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες	10
1.4 Επιπτώσεις στην υγεία.....	11
2 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	12
ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID PHASE MICROEXTRACTION- SPME)	12
2.1 Εισαγωγικά	12
2.2 Βασικές αρχές της SPME	13
2.3 Τρόποι εφαρμογής της SPME.....	14
2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την SPME.....	16
3 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	17
ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗ ΦΑΣΗ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΕΝΟΥ (VACUUM-ASSISTED HEADSPACE SOLID PHASE MICRO- EXTRACTION- Vac-HSSPME).....	17
3.1 Θεωρία.....	17
3.2 Ενώσεις στόχοι κατά την εφαρμογή της Vac-HSSPME.....	19
3.3 Vac-HSSPME: Σύστημα Τριών Φάσεων	20
3.4 Θερμοδυναμική θεωρία της HSSPME	20
3.5 Θεωρία για την επίδραση της πίεσης στη μέθοδο Vac-HSSPME.....	22
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	26
4 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	26
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	26
4.1 Αντιδραστήρια	26
4.2 Όργανα- Συσκευές.....	26

4.3 Πειραματική Διαδικασία	27
5 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	30
ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (GC/MS)	30
5.1 Γενικές αρχές λειτουργίας αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC/MS)...	30
5.2 Οργανολογία αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μαζών (GC/MS)	31
5.3 Συνθήκες αέριου χρωματογράφου	33
5.4 Γραμμικότητα μεθόδου στο GC/MS	34
6 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
6.1 Επιλογή Ίνας	35
6.2 Επίδραση αλατότητας.....	36
6.3 Επίδραση θερμοκρασίας.....	38
6.4 Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης	40
6.5 Επίδραση όγκου υδατικού δείγματος	40
6.6 Επίδραση χρόνου εκχύλισης	42
6.7 Γραμμικότητα	44
6.8 Εφαρμογή βέλτιστων συνθηκών σε πραγματικά δείγματα (matrix effects)	45
7 ^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ	47
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία ξεκίνησε και τελείωσε μέσα στο ακαδημαϊκό έτος 2014-2015 στο Εργαστήριο Υδατικής Χημείας της σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ελευθερία Ψυλλάκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν με δέχτηκε στο εργαστήριο της ως προπτυχιακή φοιτήτρια για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα, ακόμα, να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Ελίνα Γιαντζή για τη διάθεσή της να με βοηθήσει και να μου λύσει οποιαδήποτε απορία οποιαδήποτε στιγμή το χρειαζόμουν καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας μου. Επίσης, 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 άψογη συνεργασία, την βοήθειά και υποστήριξή τους.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στους φίλους μου, και κυρίως στην Εβίτα Παπαγεωργίου, την Ευσταθία Ζιάτα και την Όλγα Μητροπούλου, οι οποίες μου συμπαραστάθηκαν και με βοήθησαν όλο αυτό τον καιρό. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την ηθική και οικονομική υποστήριξη όχι μόνο κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έγινε με σκοπό την απόδειξη ότι η μειωμένη πίεση κατά τη δειγματοληψία υπερκείμενης του δείγματος αέριας φάσης με χρήση μικροεκχύλισης στερεής φάσης προτού επέλθει ισορροπία μεταξύ της ίνας και της υπερκείμενης φάσης (non-equilibrium VAC-HSSPME) ενισχύει την κινητική διαδικασία σε σύγκριση με την εκτέλεση της δειγματοληψίας 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 χαμηλή και ενδιάμεσή τιμή συντελεστή Henry (K_H), ενισχύεται σε συνθήκες ελαττωμένης 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. Οι παράμετροι οι οποίες μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν είναι το υλικό της επικάλυψης της ίνας, η επίδραση της ιοντικής ισχύς (NaCl), η θερμοκρασία, η ταχύτητα ανάδευσης, ο όγκος του δείγματος και ο χρόνος εκχύλισης στην απόδοση της VAC-HSSPME. Αποδείχτηκε ότι η VAC-HSSPME είναι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για την εκχύλιση ημιπτητικών ενώσεων από υδατικό περιβάλλον κάτω από ήπιες συνθήκες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η ανίχνευση, ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των ημιπτητικών ουσιών γεωσμίνη (geosmin) και 2-μεθυλοϊσοβορνεόλη (2-MIB) με την μέθοδο μικροεκχύλισης στερεής φάσης από την υπερκείμενη επιφάνεια υπό συνθήκες κενού (Vac-HSSPME) καθώς και η μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την μέθοδο αυτή.

Η γεωσμίνη και η 2-MIB παράγονται από ορισμένα είδη ακτινομυκήτων, μύκητες και κυανοπράσινα άλγη και είναι γνωστές για την γήινη οσμή τους. Οι δύο αυτές ουσίες έχουν ανιχνευτεί σε περιβαλλοντικά ύδατα, στο πόσιμο νερό, στον αέρα εσωτερικών χώρων, στους ιστούς των ψαριών και στα φαγητά. Έχει επισημανθεί ότι υπάρχει πιθανότητα η γεωσμίνη και η 2-MIB να προκαλούν μεταλλαξιγένεση και ηπατοτοξικότητα αλλά δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί οι κίνδυνοι που μπορεί να προκαλέσουν στην υγεία. Η οσμή από την γεωσμίνη και το 2-MIB μπορεί να ανιχνευθεί από την ανθρώπινη όσφρηση και το όριο συγκέντρωσης της οσμής γι' αυτές τις ενώσεις στο νερό έχει καταγραφεί στα 9 µg/mL για το 2-MIB και 4 pg/mL για τη γεωσμίνη.[1,2]

Η αναλυτική διαδικασία είναι μία πολύπλοκη διαδικασία η οποία περιλαμβάνει πολλά βήματα μέχρι την διεξαγωγή των τελικών αποτελεσμάτων. Η διαδικασία αυτή αρχίζει με την δειγματοληψία και συνεχίζει με την προετοιμασία του δείγματος. Η ανάλυση τελειώνει με τον διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των ενώσεων-στόχων με το κατάλληλο αναλυτικό όργανο. Όλα τα στάδια είναι σημαντικά για την παραλαβή σωστών αποτελεσμάτων. Τα στάδια για την ανάλυση ενός δείγματος είναι άμεσα συνδεδεμένα μεταξύ τους και ένα ελάχιστο λάθος κατά την διάρκεια ενός σταδίου επηρεάζει αρνητικά όλη την διαδικασία. Επίσης, το πιο αργό βήμα καθορίζει τον ολικό χρόνο ανάλυσης ενός δείγματος, εισάγοντας παράλληλα τα περισσότερα σφάλματα στη διαδικασία.[3]

Σήμερα, υπερσύγχρονα αναλυτικά όργανα είναι εμπορικά διαθέσιμα τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησης αναρίθμητων ενώσεων από περίπλοκες μήτρες. Τα πιο γνωστά και εύχρηστα αναλυτικά όργανα είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC ή LC) και η αέρια χρωματογραφία (GC).[3]

Ο προσδιορισμός της γεωσμίνης και της 2-MIB γίνεται με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC/MS). Οι τεχνικές εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών είναι η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid phase microextraction-SPME), η εκχύλιση με προσροφητικό αναδευτήρα (stir bar sorptive extraction-SBSE) και η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid phase microextraction-LPME).[2]

Οι κλασικές τεχνικές προετοιμασίας δείγματος είναι χρονοβόρες, κουραστικές, απαιτούν μεγάλες ποσότητες τοξικών διαλυτών και περιλαμβάνουν πολλά βήματα.

Συμπερασματικά, οι τεχνικές αυτές δεν είναι φιλικές προς το περιβάλλον και το κόστος πραγματοποίησής τους είναι υψηλό. Το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι η απώλεια μεγάλου μέρους της ποσότητας των αναλυτών κατά την διαδικασία. Επομένως, η πολυπλοκότητα του σταδίου της προ-επεξεργασίας της μήτρας αυξάνει το χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωσή της και οδηγεί στη μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου.

Όλα τα παραπάνω προβλήματα, που φέρουν οι κλασικές τεχνικές προετοιμασίας δείγματος, δημιούργησαν την ανάγκη ανάπτυξης νέων τεχνικών προετοιμασίας δείγματος. Αυτές οι νέες μέθοδοι συγκεντρώνουν πλήθος από τις επιθυμητές ιδιότητες όπως υψηλή ταχύτητα, χαμηλό κόστος, μικρή απαίτηση σε διαλύτες και ολοκλήρωση μέσα σε λίγα βήματα. Γενικά ο στόχος είναι η δημιουργία απλών τεχνικών που εκτυλίσσονται σε λίγα στάδια και διαθέτουν την ικανότητα αυτοματοποίησης.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΓΕΩΣΜΙΝΗ ΚΑΙ 2-ΜΕΘΥΛΟΪΣΟΒΟΡΝΕΟΛΗ

1.1 Ημιπτητικές Ενώσεις

Ημιπτητικές οργανικές ενώσεις είναι οι ενώσεις που χαρακτηρίζονται από μικρή σταθερά Henry (K_H) με αποτέλεσμα να προτιμούν την υδατική φάση.[3] Περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα ρυπαντών, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (OCPs) και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) και βρίσκονται στον αέρα, το νερό, το έδαφος, σε ζωντανούς οργανισμούς ακόμα και σε απομακρυσμένες παρθένες περιοχές όπως η Αρκτική. Πολλές ημιπτητικές οργανικές ενώσεις είναι καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές ακόμα και σε θηλαστικά στη κορυφή της τροφικής αλυσίδας. Οι ενώσεις αυτές εισάγονται στο περιβάλλον μέσω της ατμόσφαιρας, για παράδειγμα, από τις εκπομπές της ελλιπούς καύσης του άνθρακα των καυσίμων (π.χ PAHs), από τους ρύπους που περιέχονται ήδη σε μετασχηματιστές και πυκνωτές (π.χ PCBs) και από τον ψεκασμό πάνω σε εδάφη και βλαστήσεις (π.χ OCPs).[4]

Στην παρούσα εργασία θα παρουσιαστεί μια τεχνική για τον προσδιορισμό των ουσιών γεωσμίνη και 2-μεθυλοϊσοβορνεόλη στο νερό.

1.2 Προέλευση γεωσμίνης και 2-μεθυλοϊσοβορνεόλης (2-MIB) στο περιβάλλον

Μια σειρά από πτητικές και ημι-πτητικές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν οσμές και δυσάρεστη γεύση στα ύδατα. Από πρακτική άποψη, οι πιο σημαντικές ουσίες είναι εκείνες με το κατώτερο όριο συγκέντρωσης οσμής. Μερικές είναι ενοχλητικές προς τις ανθρώπινες αισθήσεις, ακόμα και αν παρουσιάζονται σε επίπεδα χαμηλών ng/L. Μερικοί μικροβιακοί μεταβολίτες, όπως η γεωσμίνη και η 2-MIB ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Οι δύο αυτές ενώσεις έχουν ανιχνευτεί σε ύδατα του περιβάλλοντος, ποσιμο νερό, στον αέρα εσωτερικών χώρων, στους ιστούς ψαριών και σε τρόφιμα. Έχει επισημανθεί ότι υπάρχουν πιθανότητες να προκαλέσουν μεταλλαξιγένεση και

ηπατοτοξικότητα, αλλά δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί οι κίνδυνοι που μπορεί να προκαλέσουν στην υγεία.[2,5]

Η γεωσμίνη προσδιορίστηκε πρώτα σε ακτινομύκητες και αργότερα σε κυανοβακτήρια και άλγη, ως το κύριο συστατικό που προσδίδει μια γήινη μυρωδιά στο έδαφος και το νερό. Το 2-MIB είναι ένα άλλο μικροβιακό υποπροϊόν με γήινη μυρωδιά, το οποίο αναφέρεται σε περιστατικά γεύσης και οσμής. Τόσο η γεωσμίνη όσο και το 2-MIB είναι τριτοταγείς αλκοόλες των οποίων η δομή τις καθιστά ανθεκτικές στην οξειδωση, μια διαδικασία ρουτίνας που εφαρμόζεται για τον καθαρισμό του νερού. Αυτό, σε συνδυασμό με τα κατώτατα όρια τιμών οσμής, τις καθιστά ως τις κύριες ουσίες για τα προβλήματα γεύσης και οσμής των υδάτων.[5,6,7]

Η παραγωγή γεωσμίνης και 2-MIB από αυτούς τους μικροοργανισμούς δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή αλλά σίγουρα ενισχύεται από διάφορα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά, όπως η παρουσία θρεπτικών συστατικών, η δυνατότητα διείσδυσης του φωτός στο νερό, οι θερμοκρασίες που επικρατούν, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διάφορων μικροοργανισμών, η παρουσία φυτοπλαγκτόν. Επίσης οι μύκητες του εδάφους μπορούν να παράγουν τις δύο αυτές ουσίες.[8,9]

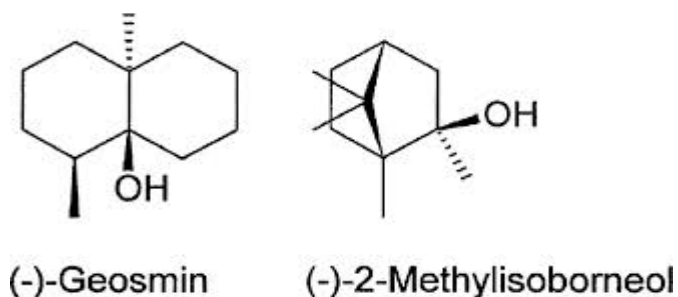
Πιο συγκεκριμένα, η **γεωσμίνη**, χημικώς γνωστή ως 1,2,7,7-τετραμεθυλ-2-νορβορνεόλη, είναι μια οργανική ένωση με χαρακτηριστική οσμή χρώματος (π.χ. γίνεται αντιληπτή στον αέρα μετά από έντονη φθινοπωρινή βροχή, που «μυρίζει» το χώμα) και παράγεται από ορισμένα μικρόβια. Το όνομα, γεωσμίνη, μεταφράζεται σε “γήινη μυρωδιά” από την προέλευση του εδώ και 100 χρόνια τώρα. Η **2-MIB**, ή 2-μεθυλοϊσοβορνεόλη, είναι και αυτή μια οργανική ένωση με έντονη οσμή, με πολύ χαμηλό κατώτατο όριο οσμής. Έχει οσμή και γεύση μούχλας, παράγεται από ορισμένα άλγη και είναι από τις βασικές ενώσεις που υποβαθμίζουν την ποιότητα του νερού και μπορούν να το καταστήσουν μη αποδεκτό στους καταναλωτές.[9,10]

Τόσο η γεωσμίνη όσο και η 2-MIB είναι χαμηλού μοριακού βάρους πτητικές τριτοταγείς αλκοόλες. Σε πηγές νερού, οι ενώσεις αυτές παράγονται από ορισμένα είδη κυανοβακτηρίων (κυανοπράσινα άλγη) και ακτινοβακτήρια (από μια ομάδα Gram θετικών βακτηρίων). Η παρουσία αυτών των βακτηρίων απαιτείται για τον σχηματισμό των ενώσεων, ωστόσο, η παραγωγή των ενώσεων δεν είναι πάντοτε εμφανής όταν αυτά τα βακτήρια είναι παρόντα. Η 2-MIB παράγεται κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής αυτών των βακτηρίων ενώ η γεωσμίνη είναι συνήθως παγιδευμένη στα κυτταρικά τοιχώματα και απελευθερώνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, όταν τα βακτήρια αυτά πεθαίνουν. Ως αποτέλεσμα, η γεύση και η οσμή συσχετίζεται άμεσα το καλοκαίρι με τον πληθυσμό των φυκών σε συστήματα με λίγο νερό. Υπάρχουν κι άλλες γνωστές πηγές αυτών των ενώσεων, οι οποίες συνδέονται με την αποσύνθεση του ξύλου, των φύλλων και άλλης οργανικής ύλης που υπάρχει στη φύση και βρίσκεται συνήθως στα επιφανειακά ύδατα.[9]

Η βιοχημική έρευνα για την παραγωγή 2-MIB και γεωσμίνης από ακτινομύκητες έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι ουσίες αυτές συντίθενται με μεθυλίωση L-μεθειονίνης και φολικού οξέος. Οι συνθήκες που ήταν σχετικές με την παραγωγή γήινων μiasμάτων από ακτινομύκητες στο νερό ήταν το υψηλό επίπεδο θρεπτικών συστατικών, η παρουσία φυτικών υπολειμμάτων, η δομή των τραπεζών δεξαμενής, η επιτρεπόμενη συσσώρευση ιζημάτων και οι αερόβιες συνθήκες στα ιζήματα. Η επίδραση του φωτός, του αζώτου και του φωσφόρου στην παραγωγή γεωσμίνης και 2-MIB δεν έχουν άμεση επίδραση στον ρυθμό βιοσύνθεσης των ενώσεων αυτών. Η αύξηση της συγκέντρωσής τους σε ευτροφικά νερά είναι αποτέλεσμα της βιομάζας των φυκών παρά της αυξημένης τους παραγωγής.[9,11]

1.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η παρουσία 2-MIB μπορεί να παρατηρηθεί και τους χειμερινούς μήνες, ενώ αυτο δεν συμβαίνει για τη γεωσμίνη. Το γεγονός αυτό δείνει ότι ο μηχανισμός σχηματισμού των δύο αυτών ενώσεων είναι διαφορετικός.[12]



Εικόνα 1.1 Χημική δομή γεωσμίνης και 2-MIB

Στον παρακάτω πίνακα 1.1 συνοψίζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων στόχων (οι σχετικές μοριακές μάζες (M_r), οι τάσεις ατμών, οι σταθερές του συντελεστή Henry (K_H), οι συντελετές κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}) και οι διαλυτότητες στο νερό).[13]

Πίνακας 1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων στόχων

Ενώσεις	Μοριακό Βάρος ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Τάση Ατμών στους 25°C (mm Hg)	Σταθερά Henry, K_H ($\text{atm}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$)	$\log K_{ow}$	Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
2-MIB	168	0.032	2.322E-005	3.31	305.1
Γεωσμίνη	182	0.00057	1.18E-005	3.57	156.7

1.4 Επιπτώσεις στην υγεία

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία των ενώσεων οι οποίες δίνουν γεύση και οσμή στο νερό, είναι κυρίως μια “αισθητική” ανησυχία και δεν συνδέεται με επιπτώσεις στην υγεία. Επίσης, η γεωσμίνη και η 2-MIB δεν έχουν συσχετιστεί με την παρουσία τοξινών από κυανοβακτήρια, τοξίνες εξαιρετικά τοξικές ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην υπάρχει μέγιστο επίπεδο μόλυνσης ή μέγιστος στόχος επιπέδου προσμίξεων είτε για την γεωσμίνη είτε για την 2-MIB. Μελέτες έχουν ανιχνεύσει γεωσμίνη και 2-MIB σε διάφορα είδη ψαριών, αλλά έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι δεν οδηγούν σε καμία τοξικότητα ούτε στο ψάρι ούτε στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης ψαριών. [9]

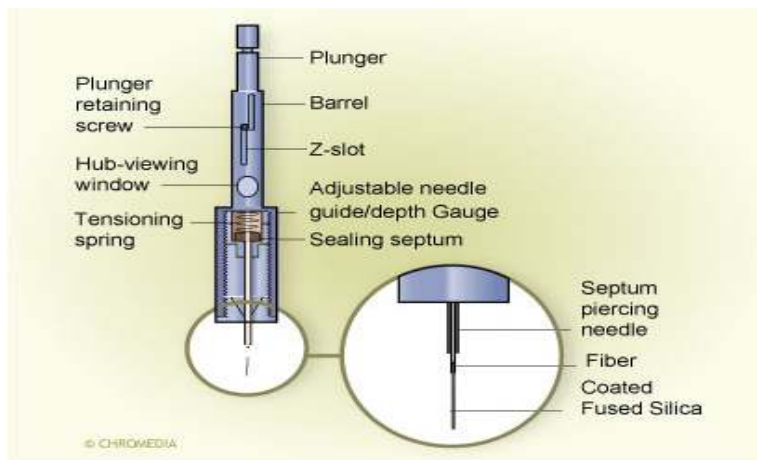
2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ (SOLID PHASE MICROEXTRACTION- SPME)

2.1 Εισαγωγικά

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) είναι μια σχετικά νέα και πολύ επιτυχημένη τεχνική προετοιμασίας δείγματος. Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε από τον J. Pawliszyn και την επιστημονική του ομάδα στο πανεπιστήμιο του Waterloo (Ontario, Canada) το 1989. Η μέθοδος της SPME ενσωματώνει τη δειγματοληψία, την εκχύλιση, την συγκέντρωση και την εισαγωγή του δείγματος σε ένα μόνο βήμα και χρησιμοποιείται για υγρά, αέρια και στερεά δείγματα καθώς επίσης απομονώνει πτητικά και ημιπτητικά συστατικά. Τέλος η μέθοδος αυτή εξοικονομεί χρόνο και κόστος προετοιμασίας και μπορεί να βελτιώσει τα όρια ανίχνευσης. [3,14,15]

Η συσκευή που χρησιμοποιείται, είναι μια ειδική συσκευή δειγματοληψίας (SPME holder), η οποία κατασκευάστηκε για πρώτη φορά το 1993 από τη Supelco και εμπορεύεται στις μέρες μας από την Sigma Aldrich. Η εμπορική αυτή συσκευή αποτελείται από μία τριχοειδή ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica) και επικαλύπτεται από υμένιο υγρού πολυμερικού υλικού το οποίο είναι είτε πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) είτε πολυακρυλικό (PA). Η ίνα είναι συνδεδεμένη με ένα ατσάλινο έμβολο και μια συσκευή συγκράτησης που μοιάζει με μικροσύριγγα. Στην εικόνα 2.1 φαίνεται η συσκευή δειγματοληψίας. [3,15,16]



Εικόνα 2.1 Συσκευή δειγματοληψίας (SPME-holder)

Η SPME αναπτύχθηκε για την επίτευξη γρήγορης προετοιμασίας δειγμάτων τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα όσο και σε *in situ* εφαρμογές. Η τεχνική αυτή προσθέτει ορισμένες μοναδικές δυνατότητες στην χρωματογραφική ανάλυση αραιών διαλυμάτων σε δύσκολες μήτρες και εφαρμόζεται κυρίως σε εκχύλιση αέριας και υγρής φάσης. Σε γενικές γραμμές, η SPME χρησιμοποιείται για αέρια ή υδατικά διαλύματα και δεν εφαρμόζεται για την ανάλυση των οργανικών μητρών. [3,14,17,18]

Τα κύρια πλεονεκτήματα της SPME είναι η δυνατότητά της να αποσυνδέσει τη δειγματοληψία από τις επιπτώσεις της μήτρας, οι οποίες μπορούν να στρεβλώσουν την εμφανή σύνθεση του δείγματος ή να δυσχαιράνουν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, η απλότητα και η ευκολία στην χρήση καθώς επίσης και η μειωμένη ή ανύπαρκτη κατανάλωση διαλυτών. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνδυάζονται για να κάνουν την SPME μια ελκυστική μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων. Επιπλέον, έχει τα πρόσθετα οφέλη του χαμηλού κόστους και της απλότητας και δεν απαιτεί πολύπλοκο και ακριβό εξοπλισμό για περιστασιακή χρήση. Η SPME απαιτεί προσεκτική βελτιστοποίηση και συνεπείς συνθήκες λειτουργίας για να έχει επιτυχία. [3,14,17,18,19,20]

2.2 Βασικές αρχές της SPME

Η εκχύλιση με την τεχνική SPME βασίζεται στη κατανομή του αναλύτη μεταξύ της υδατικής φάσης και της στατικής φάσης του πολυμερούς. Η μεταφορά των αναλυτών από τη μήτρα του δείγματος στην ίνα ξεκινάει από τη στιγμή που η επικαλυμμένη ίνα έρθει σε επαφή με το δείγμα. Τυπικά, η εκχύλιση με την τεχνική SPME θεωρείται ότι ολοκληρώνεται όταν επέλθει ισορροπία στη συγκέντρωση του αναλύτη μεταξύ της μήτρας και της επικαλυμμένης ίνας. Μόλις επέλθει ισορροπία, το ποσό του αναλύτη που εκχυλίζεται παραμένει σταθερό, εντός φυσικά των ορίων του πειραματικού σφάλματος, και ανεξάρτητο του επιπλέον χρόνου εκχύλισης. [3,15,18]

Στην κατάσταση ισορροπίας η μάζα του αναλύτη στο υλικό επικάλυψης της ίνας δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$n = \frac{k_{fs} \cdot V_f \cdot V_s \cdot C_o}{k_{fs} \cdot V_f + V_s} \quad (2.2.1)$$

(κατανομή μεταξύ φάση μήτρας και φάση ίνας, χωρίς υπερκείμενη φάση)

Όπου:

n : αριθμός των γραμμομορίων που εκχυλίζονται από την επικάλυψη της ίνας

K_{fs} : η σταθερά κατανομής της επικάλυψης της ίνας προς το δείγμα

V_f : ο όγκος της επικάλυψης της ίνας

V_s : ο όγκος του δείγματος

C_0 : η αρχική συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας στο δείγμα

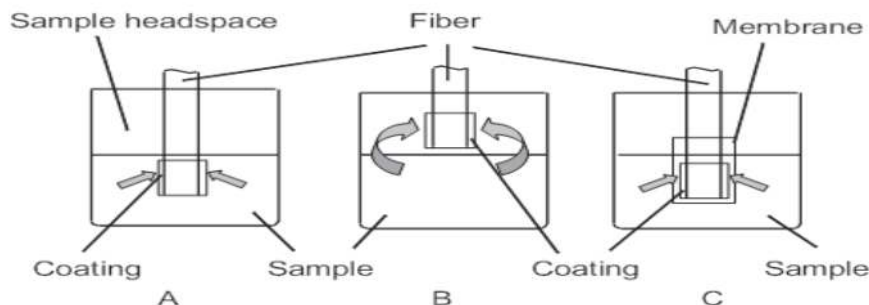
Η εξίσωση (1) δείχνει ότι υπάρχει μια ευθέως ανάλογη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη και της ποσότητας που έχει εκχυλιστεί. Αυτά είναι τα βασικά στοιχεία για την ποσοτικοποίηση της αναλυόμενης ουσίας. Επιπλέον δείχνει ότι η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται είναι ανεξάρτητη από την τοποθεσία της ίνας στο σύστημα. Έτσι, η ίνα μπορεί να τοποθετηθεί μέσα στο υδατικό δείγμα ή στην υπερκείμενη επιφάνεια, αρκεί να παραμένει σταθερός ο όγκος της επικάλυψης της ίνας, ο όγκος της υπερκείμενης επιφάνειας και του δείγματος. [3,21,22]

2.3 Τρόποι εφαρμογής της SPME

Η τεχνική της SPME μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τρεις βασικούς τρόπους:

- i. την απευθείας εμφύσηση της ίνας στο δείγμα (direct SPME- DI-SPME)
- ii. την έκθεση της ίνας στην υπερκείμενη αέρια φάση (headspace SPME- HS-SPME)
- iii. την απευθείας έκθεση της ίνας χρησιμοποιώντας μεμβράνη για την προστασία της (membrane protection SPME- MP-SPME) [3,15,18]

Η εικόνα 2.2 απεικονίζει τους τρεις αυτούς τρόπους.



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση τρόπων δειγματοληψίας της SPME. (a) Απευθείας εκχύλιση, (b) Υπερκείμενη εκχύλιση, (c) Εκχύλιση με μεμβράνη προστασίας [20]

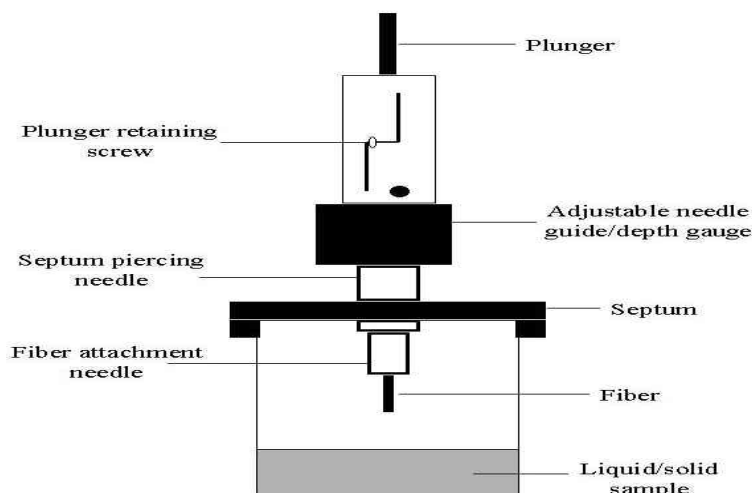
Στην απευθείας εμφύσηση της ίνας (direct SPME- DI-SPME) η επικαλυμμένη ίνα εισάγεται εντός του δείγματος και οι αναλύτες μεταφέρονται απευθείας από τη μήτρα

του δείγματος στο υλικό επικάλυψης. Για να διευκολυνθεί η γρήγορη εκχύλιση απαιτείται κάποια ανακίνηση για τη μεταφορά των αναλυτών από τον όγκο του δείγματος στην ίνα. Ο τρόπος αυτός εφαρμόζεται στην περίπτωση ανίχνευσης μη πτητικών ουσιών. [14,19,20]

Στην περίπτωση της έκθεσης της ίνας στην υπερκείμενη αέρια φάση (headspace SPME- HS-SPME) οι αναλύτες εκχυλίζονται από την αέρια φάση που έχει έρθει σε ισορροπία με το δείγμα. Η HS-SPME έχει το προτέρημα ότι προστατεύει την ίνα από οποιαδήποτε ζημιά η οποία μπορεί να προέλθει από κάποια εχθρική μήτρα, όπως για παράδειγμα μήτρα με πολύ χαμηλό ή υψηλό pH, ή αυτές που περιέχουν πολύ μεγάλα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και τα χουμικά οξέα, που έχουν την τάση να καλύπτουν την επιφάνεια της επικάλυψης. Η HS-SPME επιτρέπει επίσης τροποποιήσεις στη φύση της μήτρας, όπως αλλαγή του pH, χωρίς να επηρεαστεί ή να καταστραφεί η ίνα. Επιπλέον η χρήση της SPME με αυτό τον τρόπο επιτρέπει τη δειγματοληψία και σε στερεά δείγματα. Σε ένα σύστημα που αποτελείται από υγρό δείγμα και την υπερκείμενη επιφάνεια, η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται από την επικάλυψη της ίνας δεν εξαρτάται από την θέση της ίνας είτε στην υγρή είτε στην αέρια φάση. Ως εκ τούτου η ευαισθησία στην δειγματοληψία με HS-SPME είναι η ίδια με την ευαισθησία στην δειγματοληψία με DI-SPME, όσο οι όγκοι των δύο φάσεων είναι ίδιοι και στους δύο τρόπους δειγματοληψίας.

Η επιλογή του τρόπου δειγματοληψίας έχει πολύ σημαντικές επιπτώσεις στην κινητική της εκχύλισης. Αν η τιμή του K_H μιας ένωσης είναι μεγάλη, τότε η συγκέντρωση των αναλυτών στην υπερκείμενη φάση είναι μεγάλη με αποτέλεσμα να υπάρχει ταχεία εκχύλιση γιατί οι εκχυλιζόμενες ουσίες προέρχονται κυρίως από την αέρια υπερκείμενη φάση. Από την άλλη αν η τιμή του K_H είναι χαμηλή, τότε η εκχύλιση είναι μεγάλης διάρκειας γιατί οι αναλύτες πρέπει να διαχέονται από την συμπυκνωμένη φάση πριν φτάσουν στην ίνα. Έτσι, στην περίπτωση της εκχύλισης υδατικών διαλυμάτων, πτητικές και μη πολικές ουσίες εκχυλίζονται γρηγορότερα από ημιπτητικές και πολικές πτητικές ουσίες. Η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση στην κινητική της διεργασίας γιατί καθορίζει την τάση ατμών των αναλυτών πάνω από τη συμπυκνωμένη φάση.

Σε γενικές γραμμές, οι χρόνοι ισορροπίας για τις πτητικές ενώσεις είναι μικρότεροι στην HS-SPME παρά στην DI-SPME κάτω από τις ίδιες συνθήκες ανάδευσης γιατί (α) ένα σημαντικό μέρος των αναλυτών βρίσκεται στον υπερκείμενο χώρο πριν ξεκινήσει η διαδικασία της εκχύλισης, (β) υπάρχει συνήθως μια μεγάλη διεπιφάνεια μεταξύ της μήτρας του δείγματος και της υπερκείμενης φάσης και (γ) οι συντελεστές διάχυσης στην αέρια φάση είναι τυπικά υψηλότεροι κατά τέσσερις τάξεις μεγέθους απ' ό τι στα υγρά. [14,19,20,21]



Εικόνα 2.4 Σχηματική απεικόνιση της HS-SPME

Τέλος, στην περίπτωση της χρήσης μεμβρανών (membrane protection SPME- MP-SPME), η ίνα διαχωρίζεται από το δείγμα με μια επιλεκτική μεμβράνη. Ο κύριος σκοπός της χρήσης μεμβρανών είναι η προστασία της ίνας από τις δυσμενείς επιπτώσεις που προκαλούν ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους που προέρχονται από την ανάλυση πολύ ρυπασμένων δειγμάτων. Παρόλο που η HS-SPME εξυπηρετεί τον ίδιο σκοπό, η προστασία με μεμβράνη επιτρέπει την ανάλυση λιγότερο πτητικών ενώσεων. Η διαδικασία της εκχύλισης με μεμβράνη είναι ουσιαστικά πιο αργή από την DI-SPME γιατί οι αναλύτες πρέπει να διαχυθούν μέσω της μεμβράνης πριν φτάσουν στην επικάλυψη. Η χρήση λεπτών μεμβρανών και η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης μπορούν να οδηγήσουν σε μικρότερους χρόνους εκχύλισης.[14,19,20]

2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την SPME

Η τεχνική της SPME επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες οι περισσότεροι από τους οποίους ελέγχονται κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου, με στόχο την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου.[20] Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση και την ακρίβεια της μεθόδου SPME είναι:

- ο τύπος του υλικού επικάλυψης της ίνας
- η τοποθεσία της ίνας
- ο χρόνος δειγματοληψίας και εκρόφησης
- η θερμοκρασία δειγματοληψίας και εκρόφησης
- η ανάδευση του δείγματος
- η ιοντική ισχύ του διαλύματος (αναλόγως της προσδιοριζόμενης ουσίας)
- το pH του δείγματος
- το είδος των αναλυτών (πτητικότητα, πολικότητα ενώσεων-στόχων)
- ο ολικός όγκος του συστήματος (όγκος δείγματος και υπερκείμενη φάσης)
- η αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα
- η σταθερά κατανομής k_{fs} και ο συντελεστής διάχυσης D_f του εκάστοτε αναλύτη που μεταφέρεται από το δείγμα στο υλικό επικάλυψης της ίνας.

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΗΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΗ ΦΑΣΗ ΥΠΟ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΕΝΟΥ (VACUUM-ASSISTED HEADSPACE SOLID PHASE MICRO-EXTRACTION- Vac-HSSPME)

3.1 Θεωρία

Οι δύο πιο κοινοί τρόποι δειγματοληψίας στην SPME με τη χρήση της πολυμερούς ίνας είναι η άμεση και υπερκείμενης φάσης προσεγγίσεις, ανάλογα με το αν η SPME ίνα εκτίθεται απευθείας στη μήτρα του δείγματος ή στον υπερκείμενο χώρο που βρίσκεται πάνω από το δείγμα. Ειδικότερα, HSSPME προστατεύει την επικάλυψη της ίνας από ζημιές που μπορεί να προκαλέσουν εχθρικές ή ρυπανσμένες μήτρες, επιτρέποντας έτσι την ανάλυση σύνθετων μητρών.[27]

Η τεχνική δειγματοληψίας στην υπερκείμενη φάση είναι αναπτύχθηκε για την ανάλυση σύνθετων δειγμάτων. Η δειγματοληψία SPME από τον υπερκείμενο χώρο του δείγματος σε κλειστό σύστημα τριών φάσεων περιορισμένου όγκου είναι μια πολλαπλών σταδίων διαδικασία με τους αναλύτες να διαχωρίζονται μεταξύ του δείγματος, της υπερκείμενης φάσης και της ίνας. Με την μεταφορά των αναλύτων από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο, οι πτητικές ουσίες εκχυλίζονται γρηγορότερα από τις ημιπτητικές. Έτσι, για να επέλθει ισορροπία σε μικρότερο χρονικό διάστημα για τις λιγότερο πτητικές ενώσεις πραγματοποιείται ανάδευση, η λύση όμως αυτή δεν είναι πάντα αποτελεσματική. Η αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος έχει σημαντική επίδραση στην κινητική της εκχύλισης των λιγότερο πτητικών ενώσεων. Ωστόσο, σε ορισμένες ακραίες περιπτώσεις η αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος οδηγεί στην αποσύνθεση μερικών ενώσεων ή/και τη δημιουργία άλλων συστατικών. Πιο συχνά όμως, η αυξημένη θερμοκρασία κατά τη δειγματοληψία μειώνει τη σταθερά κατανομής μεταξύ της μήτρας του δείγματος και της επικαλυμμένης ίνας και ως εκ τούτου η ευαισθησία της μεθόδου και η ανάκτηση του αναλύτη κατά την ισορροπία μειώνονται.[3,20,24,27,28,29]

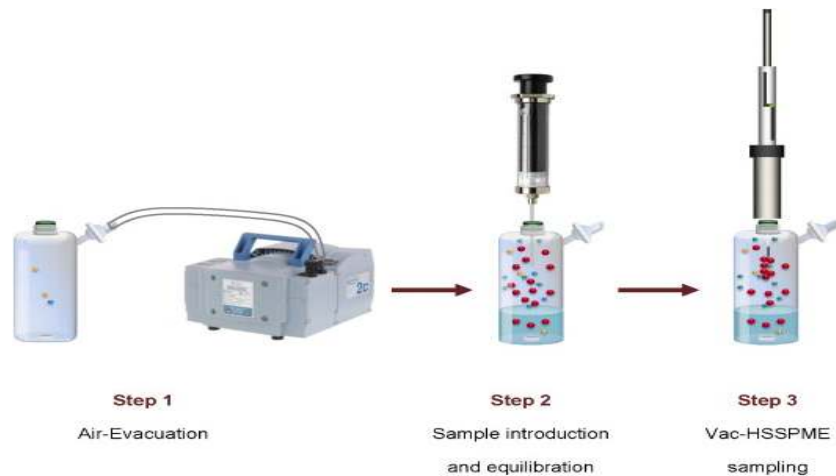
Γενικά, η δειγματοληψία γίνεται με την εισαγωγή της ίνας στην υπερκείμενη αέρια φάση για ορισμένο χρονικό διάστημα, όπου μόρια των ουσιών έχουν μεταβεί στον αέριο χώρο μεταξύ του πώματος και της επιφάνειας του υγρού μίγματος (headspace)

και προσκολλούνται στην επιφάνεια της ίνας. Με το τέλος του χρόνου δειγματοληψίας η ίνα πάνω στην οποία έχουν προσκολληθεί οι ουσίες είναι έτοιμη προς ανάλυση. [14,17,19,20]

Σύμφωνα με τις συνθήκες που έθεσε ο Pawliszyn (1997), η μέθοδος αυτή οδηγεί στη μείωση της μάζας των ενώσεων προς ανάλυση που προσκολλούνται στο πολυμερικό στρώμα της ίνας. Η μάζα των ενώσεων που εκχυλίζεται εξαρτάται κυρίως από τον όγκο της υπερκείμενης αέριας φάσης και από τους λόγους κατανομής μεταξύ της φάσης των ατμών και του υγρού δείγματος καθώς επίσης και από τη φάση του στρώματος του πολυμερούς της ίνας. Αυτές οι σχέσεις είναι αρκετά σύνθετες και παράγουν τις εξαρτήσεις της μάζας της διαλυμένης ουσίας που εκχυλίζεται σε σχέση με τους σχετικούς όγκους υγρού και υπερκείμενης αέριας φάσης. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να διατηρηθούν σταθεροί οι όγκοι δειγμάτων και υπερκείμενης αέριας φάσης σε όλα τα δείγματα. [3,20]

Μετά από μια χρονική περίοδο επέρχεται ισορροπία μεταξύ της υγρής φάσης του δείγματος, της υπερκείμενης αέριας φάσης και του προσροφητικού υλικού της ίνας. Οι ενώσεις- στόχοι χαρακτηρίζονται από διάφορες τιμές συντελεστών διάχυσης και σταθερών κατανομής. Οι τιμές αυτές είναι υπεύθυνες για τις διαφορές που εμφανίζονται στους χρόνους ισορροπίας των ενώσεων-στόχων καθώς επίσης περιγράφουν και την πορεία τους μεταξύ μήτρας και εκχυλιστικής φάσης κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Επομένως, οι μεγάλες κορυφές (large peak area) που εμφανίζονται στα χρωματογραφήματα αντιστοιχούν σε αναλύτες με μεγάλες σταθερές κατανομής ενώ οι μικρές κορυφές (small peak area) σε αναλύτες με μικρές σταθερές κατανομής. Τέλος για τους συντελεστές διάχυσης, ενώσεις με παρόμοια μοριακά βάρη εμφανίζουν στα χρωματογραφήματα παρομοίου μεγέθους κορυφές. [3,14,15]

Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου HSSPME, το συγκεκριμένο πείραμα έγινε υπό συνθήκες κενού μέσα στην υπερκείμενη αέρια φάση της δειγματοληπτικής φιάλης (Vac-HSSPME). Με τη μείωση της πίεσης στην υπερκείμενη επιφάνεια επιτυγχάνεται περιορισμός στη μεταφορά μάζας από την υγρή στην αέρια φάση. [15]



Εικόνα 3.1 Δημιουργία κενού, εμπλουτισμός φιάλης δειγματοληψίας με το μείγμα και δειγματοληψία

3.2 Ενώσεις στόχοι κατά την εφαρμογή της Vac-HSSPME

Κατά τη δειγματοληψία της μεθόδου Vac-HSSPME προσκολλούνται στην ίνα κυρίως πτητικές αλλά και ορισμένες ημιπτητικές ουσίες. Αυτό συμβαίνει γιατί οι πτητικές ενώσεις εμφανίζουν μικρή σταθερά κατανομής μεταξύ υπερκείμενης αέριας φάσης και του πολυμερικού στρώματος της ίνας (k_{fs}) και μεγάλη σταθερά κατανομής μεταξύ του υγρού δείγματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης (k_{hs}), ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από μεγάλη τιμή K_H με αποτέλεσμα να προτιμούν την αέρια φάση. Επιπλέον, οι πτητικές ενώσεις διαχέονται εύκολα και γρήγορα από την υδατική στην αέρια φάση αλλά λόγω του μικρού συντελεστή διάχυσης κατανέμονται δύσκολα στο εσωτερικό του πολυμερούς που επικαλύπτει την ίνα. [3,15,21,25,26]

Οι ημιπτητικές ενώσεις, από την άλλη, προτιμούν την υδατική φάση και αυτό συμβαίνει διότι χαρακτηρίζονται από μεγάλη σταθερά κατανομής μεταξύ υπερκείμενης αέριας φάσης και του πολυμερικού στρώματος της ίνας (k_{fs}), μικρή σταθερά κατανομής μεταξύ του υγρού δείγματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης (k_{hs}) και σχετικά μικρή τιμή K_H . Οι ημιπτητικές ενώσεις λόγω του μεγάλου συντελεστή διάχυσης κατανέμονται ευκολότερα στο εσωτερικό του πολυμερούς που επικαλύπτει την ίνα με αποτέλεσμα η ανάλυσή τους να απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο αλλά ταυτόχρονα να έχει μεγαλύτερη ακρίβεια. [3,15,21,22]

Συμπερασματικά, η τεχνική της Vac-HSSPME είναι αποτελεσματικότερη για πτητικές ενώσεις καθώς έχουν μεγαλύτερες τιμές K_H και η δειγματοληψία πραγματοποιείται στην υπερκείμενη αέρια φάση, με έκθεση της ίνας, όπου είναι το ιδανικότερο περιβάλλον γι' αυτές. Όσο μειώνεται η πτητικότητα των ενώσεων τόσο οι K_H αποκτούν μικρότερες τιμές με αποτέλεσμα να χρειάζεται περισσότερος χρόνος για να επέλθει ισορροπία μεταξύ των τριών φάσεων (δείγματος- υπερκείμενης φάσης-

πολυμερικό στρώμα της ίνας). Επιπλέον, ενώσεις με χαμηλές τιμές K_H αλλά υψηλούς συντελεστές οκτανόλης/νερού (k_{ow}), έχουν υψηλή ευαισθησία στην μέθοδο αλλά χρειάζονται μεγάλο χρονικό διάστημα για να επέλθει ισορροπία μεταξύ των τριών φάσεων. [3,14,15,31]

3.3 Vac-HSSPME: Σύστημα Τριών Φάσεων

Η μικροεκχύλιση από την υπερκείμενη φάση με ένα πολυμερούς βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ τριών φάσεων: της υδατικής φάσης, του υπερκείμενου χώρου και της φάσης εκχύλισης. Συνεπώς, υπάρχουν δύο διεπιφάνειες, αυτή της μήτρας με την υπερκείμενη φάση κι αυτή της υπερκείμενης φάσης με τη φάση εκχύλισης. Οι συντελεστές διάχυσης στην αέρια φάση είναι 10^4 - 10^5 φορές μεγαλύτεροι από αυτούς στην υγρή φάση, γι' αυτό και η μεταφορά μάζας στον υπερκείμενο χώρο γίνεται γρηγορότερα. Τα στάδια που καθυστερούν χρονικά τη HSSPME είναι ο αργός ρυθμός μεταφοράς της μάζας από τη μήτρα στη φάση ατμών καθώς και ο ρυθμός διάχυσης των αναλυτών στο στρώμα πολυμερούς της ίνας. [3,15,18,22]

Όπως έχει αναφερθεί, όταν οι ενώσεις είναι ημιπτητικές ο χρόνος που απαιτείται για να επέλθει ισορροπία μεταξύ των φάσεων είναι μεγαλύτερος και η εκχυλιζόμενη ποσότητα μειώνεται. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές όπως η χρήση ανάδευσης, η αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος και η προσθήκη άλατος στην υγρή μήτρα. [3]

Στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται η εφαρμογή συνθηκών κενού στην υπερκείμενη αέρια φάση σε συνδιασμό με την χρήση των παραπάνω τεχνικών και φαίνεται να επιδρά θετικά στην μέθοδο. Με τις συνθήκες χαμηλής πίεσης στη δειγματοληπτική φιάλη αποδεικνύεται η ύπαρξη τριών φάσεων στο σύστημα καθώς και ο περιορισμός μεταφοράς μάζας από την υγρή στην αέρια φάση. Η εφαρμογή συνθηκών κενού κατά την εκχύλιση ημιπτητικών ενώσεων ενισχύει την μεταφορά μάζας από την υδατική φάση προς τον υπερκείμενο χώρο και μειώνει τον χρόνο αποκατάστασης της ισορροπίας με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η διαδικασία της εκχύλισης. [15,22]

3.4 Θερμοδυναμική θεωρία και HSSPME

Η μέθοδος της HSSPME είναι μια τεχνική εκχύλισης που βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ των φάσεων. Η διεργασία της εκχύλισης ολοκληρώνεται όταν επέλθει ισορροπία κατανομής των ουσιών μεταξύ της μήτρας του δείγματος, της υπερκείμενης φάσης και του υλικού επικάλυψης της ίνας. Η θεωρία που βρίσκεται πίσω από τη μέθοδο μικροεκχύλισης στερεής φάσης έχει ερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό

από τον J.Pawliszyn και την ερευνητική του ομάδα. Σύμφωνα λοιπόν με τον J.Pawliszyn η αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αναλυτών που εκχυλίζονται από την φάση εκχύλισης, εφόσον οι όγκοι του δείγματος, εκχυλιζόμενης ποσότητας και υλικού επικάλυψης είναι σταθερή. [19,20,30]

Παρακάτω θα αναλυθεί η εξίσωση κατανομής των φάσεων της μήτρας, της υπερκείμενης φάσης και της φάσης εκχύλισης. [3,15,18]

Αρχικά θα αναλυθεί η σχέση της αρχικής συγκέντρωσης του αναλυτή στο δείγμα προς τη συγκέντρωση του αναλυτή που εκχυλίζεται σε συνθήκες ισορροπίας:

$$C_0 \cdot V_s = C_f^\infty \cdot V_f + C_h^\infty \cdot V_h + C_s^\infty \cdot V_s \quad (3.4.1)$$

Όπου:

C_0 : η αρχική συγκέντρωση του αναλυτή στο δείγμα

$C_f^\infty, C_h^\infty, C_s^\infty$: οι συγκεντρώσεις του αναλυτή στην πολυμερική επικάλυψη της ίνας, στην υπερκείμενη φάση, στο δείγμα όταν έχει φτάσει σε ισορροπία

$V_f^\infty, V_h^\infty, V_s^\infty$: οι όγκοι της πολυμερικής επικάλυψης της ίνας, της υπερκείμενης φάσης, και του δείγματος

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

$$K_{fs} = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot V_s \cdot C_0}{K_{fs} \cdot V_f + V_s} \quad (3.4.2)$$

(3.4.3) $K_{fs} = K_{fh} \cdot K_{hs}$: σταθερά κατανομής μεταξύ πολυμερικής επικάλυψης της ίνας και της φάσης της μήτρας

(3.4.4) $K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_h^\infty}$: σταθερά κατανομής μεταξύ της πολυμερικής επικάλυψης της ίνας μεταξύ της υπερκείμενης φάσης

(3.4.5) $K_{hs} = \frac{C_h^\infty}{C_s^\infty}$: σταθερά κατανομής υπερκείμενης φάσης προς φάση μήτρας

Με συνδυασμό των εξισώσεων (3.4.2), (3.4.3), (3.4.4), (3.4.5) καταλήγουμε στην εξίσωση (3.4.6) που περιγράφει την κατανομή μεταξύ της φάσης της μήτρας, της υπερκείμενης φάσης και της φάσης της ίνας:

$$K_{fs} = \frac{K_{fh} \cdot k_{hs} \cdot V_f \cdot C_0 \cdot V_s}{K_{fh} \cdot k_{hs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s} \quad (3.4.6)$$

3.5 Θεωρία για την επίδραση της πίεσης στη μέθοδο Vac-HSSPME

Η βασική θεωρία της Vac-HSSPME βασίζεται στην ισορροπία του αναλύτη μεταξύ των τριών φάσεων (υδατική φάση, υπερκείμενη φάση, φάση εκχύλισης). Η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται από την υγρή ίνα σε συνθήκες ισορροπίας, δίνεται από τη σχέση:[27]

$$C_f^\infty \cdot V_f = \frac{K_f \cdot K_g \cdot V_s \cdot V_f}{K_f \cdot K_g \cdot V_f + K_g \cdot V_g + V_s} \cdot C_s^\infty \quad (3.5.1)$$

Όπου:

C_s^∞ : η συγκέντρωση του αναλύτη στη συμπυκνωμένη φάση πριν την έκθεση της ίνας

V_s, V_g, V_f : οι όγκοι του δείγματος, της υπερκείμενης φάσης και της πολυμερικής επικάλυψης της ίνας

K_g : ο συντελεστής κατανομής υπερκείμενης φάσης- δείγματος και ορίζεται ως:

$$K_g = \frac{C_g^\infty}{C_s^\infty}$$

K_f : ο συντελεστής κατανομής επικάλυψης της ίνας- υπερκείμενης φάσης και ορίζεται

ως: $K_f = \frac{C_f^\infty}{C_g^\infty}$ με C_s^∞, C_f^∞ και C_g^∞ να εκφράζουν τις συγκεντρώσεις του αναλύτη, σε συνθήκες ισορροπίας, στο δείγμα, στην ίνα και στην υπερκείμενη φάση, αντίστοιχα.

Σύμφωνα με την θερμοδυναμική θεωρία, οι μερικές πιέσεις και οι συγκεντρώσεις ισορροπίας είναι ανεξάρτητες από τη συνολική πίεση καθώς οι συντελεστές κατανομής και η K_H επηρεάζονται μόνο σε υψηλές πιέσεις ($P > 500 \text{ kPa}$). Επομένως, σε συνθήκες ισορροπίας, οι ποσότητες των αναλυτών που εκχυλίζεται από την ίνα αναμένεται να είναι η ίδια, είτε κάτω από συνθήκες μειωμένης πίεσης είτε κάτω από κανονικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, ανάλογα με την ένωση-στόχο, η πίεση κατά τη δειγματοληψία ίσως επηρεάζει τον ρυθμό της εκχύλισης και συνεπώς και την απόκριση της μεθόδου.[27]

Σε ένα κλειστό σύστημα τριών φάσεων περιορισμένου όγκου, η Vac-HSSPME θεωρείται μια διαδικασία με πολλά στάδια που περιλαμβάνει τη μεταφορά μάζας και στις τρεις φάσεις (υδατική φάση, υπερκείμενη φάση, φάση εκχύλισης) και στις δύο διεπιφάνειες (δείγμα- υπερκείμενη φάση, υπερκείμενη φάση- ίνα). Πριν την εισαγωγή της ίνας-SPME, πρέπει να έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ του δείγματος και της υπερκείμενης φάσης. Μόλις γίνει έκθεση της ίνας στον υπερκείμενο χώρο, αυτή αρχίζει να απορροφά γρήγορα τα μόρια των αναλυτών από τον υπερκείμενο χώρο. Συνεπώς, η συγκέντρωση των αναλυτών στον υπερκείμενο χώρο μειώνεται γρήγορα αλλά αναπληρώνεται με τη μεταφορά αναλύτη από το δείγμα στην υπερκείμενη φάση. Τυπικά, θεωρείται πως η μεταφορά μάζας στον υπερκείμενο χώρο είναι μια πολύ γρήγορη διαδικασία. Για ημιπτητικές ενώσεις, η εξάτμιση του αναλύτη από το

δείγμα στον υπερκείμενο χώρο είναι το στάδιο καθορισμού για την Vac-HSSPME ενώ η μεταφορά μάζας από τον υπερκείμενο χώρο στην πολυμερική επιφάνεια της ίνας θεωρείται σχετικά μια πολύ γρήγορη διαδικασία. [27]

Γενικά, η εξάτμιση των οργανικών διαλυτών από το νερό θεωρείται ως μια αντίδραση πρώτης τάξης και η μεταβολή της συγκέντρωσης στην υδατική φάση (C_s) σε σχέση με τον χρόνο (t), δίνεται από την εξίσωση: [27]

$$C_s = C_s^o \cdot e^{-kt} \quad (3.5.2)$$

όπου k είναι η σταθερά ρυθμού εξάτμισης. Λαμβάνοντας υπόψη την ισορροπία της χημικής μάζας γύρω από το σώμα νερού, δίδεται η ακόλουθη εξίσωση:

$$V_s \frac{dC_s}{dt} = -K_L \cdot A \cdot (C_s - C_i) \quad (3.5.3)$$

Όπου:

C_i : η συγκέντρωση του αναλυτή στην διεπιφάνεια νερού-αέρα

A : η διεπιφάνεια μεταξύ υδατικής και αέριας φάσης

K_L : ο συντελεστής της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και υδατικής φάσης μέσα στη ζώνη της διεπιφάνειας

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις (3.5.2) και (3.5.3) προκύπτει μια νέα εξίσωση στην οποία συσχετίζεται η σταθερά του ρυθμού εξάτμισης (k):

$$k = \frac{K_L}{L} \quad (3.5.4)$$

Όπου L : το βάθος του διαλύματος μέσα σε δοχείο με ομοιόμορφη διατομή

Οι Liss και Slater και αργότερα οι Mackay και Leinonen ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν τον συντελεστή της συνολικής μεταφοράς μάζας μεταξύ της αέριας και της υδατικής φάσης μέσα στη ζώνη της διεπιφάνειας (K_L). Ο αναφερόμενος συντελεστής περιγράφεται από την εξίσωση (3.5.5), η οποία βασίζεται στην θεωρία των δύο φάσεων (two-film theory), στο μοντέλο πλήρης ανάδευσης του συστήματος (flux-matching boundary condition) και στην υπόθεση ότι η συνολική αντίσταση στην μεταφορά μάζας προέρχεται από το λεπτό στρώμα της αέριας φάσης είτε της υγρής ή/και από τα δύο στρώματα που είναι παρακείμενα στην ζώνη της διεπιφάνειας δείγματος/υπερκείμενης φάσης. [3,27]

$$K_L = \left[\frac{1}{k_L} + \frac{1}{K_H k_g} \right]^{-1} \quad (3.5.5)$$

Όπου:

k_L : ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην υδατική φάση

K_H : η σταθερά του Henry

k_g : ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση

T: η απόλυτη θερμοκρασία

R: η παγκόσμια σταθερά των αερίων

Γενικά, θεωρείται ότι οι πτητικές ουσίες μεταφέρονται γρήγορα και εύκολα στην αέρια φάση γιατί χαρακτηρίζονται από υψηλή τάση ατμών, υψηλές τιμές K_H και σχετικά μικρά μοριακά βάρη. Παρόλα αυτά στην αέρια φάση μπορούν να μεταφερθούν και ημιπτητικές ενώσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από χαμηλή τάση ατμών, χαμηλές τιμές K_H και σχετικά μεγάλα μοριακά βάρη. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει όταν οι ημιπτητικές ενώσεις είναι υδρόφοβες δηλαδή διαθέτουν υψηλές τιμές K_{ow} και έχουν χαμηλές διαλυτότητες στο νερό. Επομένως, η αναλογία της συγκέντρωσης του ημιπτητικού αναλύτη στην ατμόσφαιρα προς τη συγκέντρωσή του στο νερό (C_g/C_w) είναι μεγάλη παρά τη μεγάλη τάση ατμών που χαρακτηρίζει τον αναλύτη. Αυτή η αναλογία αναφέρεται και ως «αδιάστατη» σταθερά Henry (K'_H) η οποία στην ουσία δείχνει ποια φάση θα είναι το φράγμα στη μεταφορά της μάζας. [3,27]

Η μεταφορά των χημικών ενώσεων από το νερό στην ατμόσφαιρα καθορίζεται από το ρυθμό εξάτμισής τους ο οποίος εξαρτάται από την αντίσταση της μεταφοράς μάζας:

- μέσα στην υδάτινη φάση
- μέσα στην αέρια φάση
- συνδυασμός των ανωτέρων

Η φάση στην οποία οφείλεται η παρεμπόδιση της μεταφοράς μάζας εξαρτάται από την τιμή του K'_H που χαρακτηρίζει τον εκάστοτε αναλύτη. Όταν η ένωση έχει υψηλό K'_H ($>5 \cdot 10^{-3} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) [27] τότε η αντίσταση στη μεταφορά μάζας προέρχεται από την υδάτινη φάση. Όταν η ένωση έχει χαμηλό K'_H ($\leq 1.2 \cdot 10^{-5} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ή $1.6 \cdot 10^{-6} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$) [27] τότε η αντίσταση προέρχεται κυρίως από την αέρια φάση. Τέλος όταν η ένωση έχει ενδιάμεση τιμή K'_H τότε η αντίσταση προέρχεται από τον συνδυασμό της αντίστασης της αέριας και της υγρής φάσης. [3,27]

Ο μοριακός συντελεστής διάχυσης στην αέρια φάση (D_g) του αναλύτη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω πολλών και διαφορετικών υπολογιστικών μεθόδων οι οποίες δείχνουν ανεξάρτητα της πολικότητας των αναλυτών είναι αντιστρόφως ανάλογος της ολικής πίεσης (P). Η μέθοδος υπολογισμού του D_g των Fuller-Schettler-Giddings είναι η πιο ακριβής. [3,27]

$$D_g = \frac{0.001 \times T^{1.75} \sqrt{\frac{1}{M_{air}} + \frac{1}{M_C}}}{P \left[(\sum V_{air})^{1/3} + (\sum V_C)^{1/3} \right]^2} \quad (3.5.6)$$

Όπου:

T: η απόλυτη θερμοκρασία

M_{air} , M_c : είναι τα μοριακά βάρη για τον αέρα και για τον οργανικό αναλύτη αντίστοιχα

P: η ολική πίεση

V_{air} , V_c : είναι οι γραμμομοριακοί όγκοι του αέρα και του αναλύτη αντίστοιχα

Ο συντελεστής μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση (k_g) είναι ανάλογος με τον μοριακό συντελεστή διάχυσης στην αέρια φάση (D_g) υψωμένος σε μία δύναμη m:

$$k_g \propto D_g^m \quad (3.5.7)$$

Η αφαίρεση του μεγαλύτερου ποσοστού του αέρα από την δειγματοληπτική φιάλη πριν την εισαγωγή του δείγματος οδηγεί σε μείωση της ολικής πίεσης στο κλειστό αυτό σύστημα. [3,27]

Εάν στο κλειστό σύστημα επικρατούν συνθήκες κενού, η θερμοκρασία είναι σταθερή και η επίδραση της εναπομένουσας ποσότητας αέρα είναι πολύ μικρή στην διαμόρφωση του D_g , για αναλύτες με χαμηλά K'_H η μείωση της ολικής πίεσης του συστήματος οδηγεί σε αύξηση του D_g . Σύμφωνα με την εξίσωση (3.5.7) η αύξηση του μοριακού συντελεστή διάχυσης στην αέρια φάση D_g συντελεί σε αύξηση του συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση k_g και εν συνεχεία αύξηση στο συνολικό συντελεστή μεταφοράς μάζας K_L σύμφωνα με την εξίσωση $K_L \approx K'_H k_g$. [3,27]

Στη περίπτωση, λοιπόν, ημιπηκτικών αναλυτών η διαδικασία της εξάτμισης από την υδάτινη μήτρα στην υπερκείμενη αέρια φάση εξαρτάται από το συντελεστή μεταφοράς μάζας στην αέρια φάση (k_g) και ο ρυθμός της εξάτμισης αυξάνεται με τη βμείωση της πίεσης στην υπερκείμενη φάση.

Η δειγματοληψία με τη μέθοδο Vac-HSSPME πριν φτάσει σε ισορροπία το σύστημα οδηγεί σε ταχύτερη εξάτμιση των αναλυτών καθώς η μείωση της συγκέντρωσής τους στην υπερκείμενη αέρια φάση κατά την δειγματοληψία (λόγω της ρόφησης τους πάνω στην ίνα) αναπληρώνεται αμέσως.

Αυτό αποδεικνύει ότι το καθοριστικό στάδιο για όλη την διεργασία της Vac-HSSPME είναι η μεταφορά της μάζας από το υδάτινο δείγμα στην υπερκείμενη αέρια φάση και γι αυτό στην HSSPME μέθοδο η ισορροπία επέρχεται ταχύτερα υπό συνθήκες κενού σε σύγκριση με αυτή υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. [3,27]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

4.1 Αντιδραστήρια

- (+/-)-Geosmin και 2-Methylisoborneol 100 ug/mL σε MeOH, 47525-U, SUPELCO, Bellefonte, PA, USA
- Μεθανόλη (methanol) με βαθμό καθαρότητας 'super gradient' του οίκου Lab-Scan Analytical Sciences
- Υπερκάθαρο (δix απιονισμένο) νερό από σύστημα καθαρισμού ύδατος EASYpureRF, από την Barnstead/ThermoLyne
- Χλωριούχο Νάτριο (Sodium Chloride) με βαθμό καθαρότητας ACS reagent $\geq 99\%$

Το πρότυπο διάλυμα εργασίας παρασκευαζόταν καθημερινά σε υπερκάθαρο νερό στη συγκέντρωση και ποσότητα που απαιτούνταν για κάθε πείραμα.

4.2 Όργανα- Συσσκευές

1. Γυάλινη δειγματοληπτική φιάλη των 100 mL για την παρασκευή του πρότυπου διαλύματος.
2. Μικροσύριγγα των 50 μ L
3. Γυάλινα δειγματοληπτικά φιαλίδια των 22 mL (Supelco 22 mL διαφανές φιαλίδιο, βιδωτό καπάκι, υλικό: διαφανές γυαλί, Εξωτ.διάμετρος×Υψος×Εσωτ.διάμετρος=23mm×85mm×18mm, σπείρωμα: 20-400)

4. Μαγνητικός αναδευτήρας (Sigma-Aldrich) επικαλυμμένος με Teflon (10 mm × 5 mm)
5. Ειδικά κατασκευασμένο καπάκι για επίτευξη κενού εφοδιασμένο με PTFE/Silicone πώμα
6. Septum τα οποία προμηθεύονται από την Shimadzu και είναι τύπου Thermo-green LB-1 για το καπάκι και Thermo-green LB-2 στον εισαγωγέα του GC/MS
7. o-ring διαμέτρου 10 mm × πάχος 4 mm
8. Αντλία κενού (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Model MZ 2c NT, Wertheim, Germany)
9. Σύριγγα κενού 10 mL (gas tight SGE, Australia)
10. SPME holder (Supelco, Bellefonte, PA)
11. 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 1 cm (Supelco, Bellefonte, PA)
12. Συσκευή ανάδευσης (Heidolph, MR 3001 K, Germany)
13. He (>99.999% pure) ως φέρον αέριο για το GC με ρυθμό 1.2 mL/min
14. Αέριος χρωματογράφος τύπου GC-17A συζευγμένο με φασματογράφο μάζας QP-5050A MS από την Shimadzu (Tokyo, Japan), εφοδιασμένο με στήλη 30 m × 0.25 mm I.D. DB-5 επικαλυμμένη με 5% διφαινυλ-πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (0.25 μm)

4.3 Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά, από το διάλυμα stock της ουσίας Geosmin και 2-Methylisoborneol έγινε αραιώση σε φιαλίδιο που περιείχε 1 mL μεθανόλης (MeOH) μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση των 10 ppm.

- **Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης Υπερκείμενου υπό Συνθήκες Κενού (Headspace Solid Phase Microextraction under Vacuum conditions, vac-HSSPME)**

1^ο βήμα: Παρασκευάζεται καθημερινά το πρότυπο διάλυμα εργασίας. Με τη βοήθεια της μικροσύριγγας των 50 μL τραβάμε 10 μL από το διάλυμα των 10 ppm και τα τοποθετούμε σε φιάλη των 100 mL μαζί με υπερκάθαρο νερό, ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος να είναι 1 ppb.

2^ο βήμα: 7 gr χλωριούχο νάτριο (NaCl) τοποθετούνται σε φιαλίδιο (vial) των 22 mL και στη συνέχεια τοποθετούνται ο μαγνητικός αναδευτήρας και το καπάκι.

3^ο βήμα: Με τη βοήθεια της αντλίας κενού δημιουργούνται συνθήκες κενού στο φιαλίδιο.

4^ο βήμα: Με τη σύριγγα κενού εισάγονται 7 mL πρότυπου διαλύματος στο φιαλίδιο. Μόλις η σύριγγα κενού διαπερνά το septum LB-1 που βρίσκεται στο καπάκι, το διάλυμα αυτόματα αρχίζει να ρέει στο φιαλίδιο. Το έμβολο της σύριγγας κατεβαίνει χωρίς τη βοήθεια του χειριστή λόγω της υποπίεσης στο εσωτερικό της σύριγγας. Μόλις εισαχθεί όλη η ποσότητα στο φιαλίδιο, η σύριγγα αφαιρείται.

5^ο βήμα: Το φιαλίδιο με το δείγμα τοποθετείται πάνω σε μαγνητική πλάκα και μέσα σε υδατόλουτρο (water bath) που είναι ρυθμισμένο στους 25 °C ώστε η θερμοκρασία περιβάλλοντος να παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 5 min ώστε να επέλθει ισορροπία μεταξύ υγρής μήτρας και υπερκείμενης φάσης.

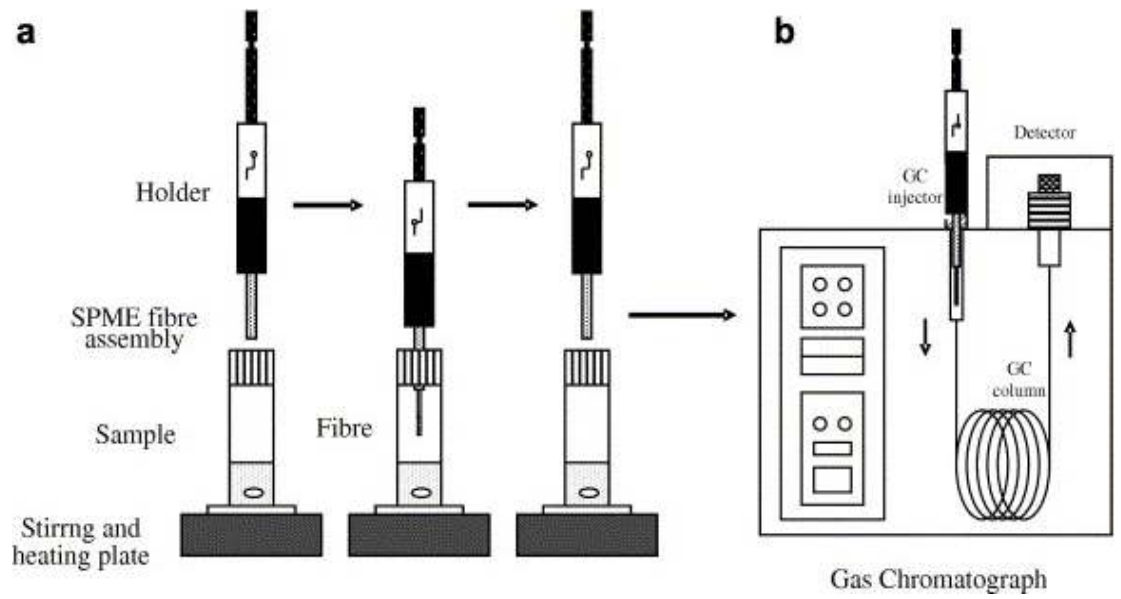
6^ο βήμα: Η ένεση της SPME διαπερνά το προτρυπημένο septum LB-1 που βρίσκεται στο καπάκι και το έμβολο πιέζεται προς τα κάτω ώστε η ίνα από πολυμερές να εμφανιστεί και να ξεκινήσει η διαδικασία της εκχύλισης. Η ίνα που χρησιμοποιείται για την δειγματοληψία των ενώσεων ήταν 50/30 μm grey DVB/CAR/PDMS με μήκος ίνας 1 cm. Η διάρκεια της δειγματοληψίας ήταν 30 min.

Κάθε μέρα πριν από την πρώτη χρήση πραγματοποιείται λευκή ανάλυση (blank fiber) για να διαπιστωθεί η απουσία ακαθαρσιών και υπολειμμάτων Geosmin και 2-Methylisoborneol στην ίνα.

7^ο βήμα: Μόλις ολοκληρωθεί η εκχύλιση η ίνα πολυμερούς αποσύρεται και η σύριγγα SPME αφαιρείται και μεταφέρεται στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος του GC/MS για εκρόφιση όπου παραμένει για 10 min για παρασυρθούν από το φέρον αέριο οι ενώσεις στόχοι. Με τη βοήθεια του GC/MS πραγματοποιείται ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ενώσεων στόχων.

➤ **Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου υπό Ατμοσφαιρική Πίεση (Headspace solid phase microextraction under atmospheric pressure, HSSPME)**

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την vac-HSSPME μόνο που παραλείπεται το 3ο βήμα και στο 4ο βήμα το διάλυμα δεν ρέει αυτόματα λόγω της ύπαρξης μορίων αέρα στο εσωτερικό του φιαλιδίου. Επομένως, ο χειριστής πρέπει να πιέσει το έμβολο της σύριγγας ώστε να μεταφερθεί το διάλυμα από την σύριγγα στη φιάλη.



Εικόνα 4.1 Στάδια δειγματοληψίας HS-SPME και εκρόφιση

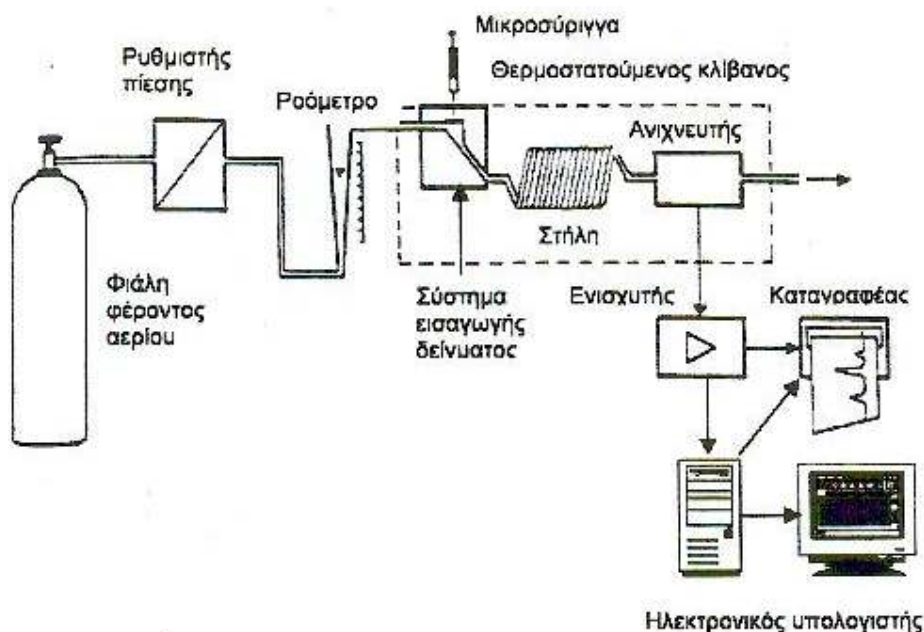
5^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ- ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ (GC/MS)

5.1 Γενικές αρχές λειτουργίας αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC/MS)

Η αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου, κλπ.

Αέρια χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας (GC/MS) είναι μια σύζευξη δύο ισχυρών αναλυτικών τεχνικών. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης, το διαχωρισμό τους με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z) και την καταγραφή τους. Με τον τρόπο αυτό παρέχονται πληροφορίες για τον ποιοτικό προσδιορισμό αγνώστων ενώσεων (δομή, στοιχειώδης σύνθεση και μοριακό βάρος) καθώς επίσης και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. [30,32]



Εικόνα 5.1 Αέριος χρωματογράφος-φασματογράφος μάζας GC/MS

5.2 Οργανολογία αέριας χρωματογραφίας- φασματομετρίας μαζών (GC/MS)

Η βασική αρχή ενός αέριου χρωματογράφου περιλαμβάνει την πτητικότητα του δείγματος σε ένα θερμαινόμενο στόμιο εισαγωγής (injector), τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος σε μια ειδική στήλη με βάση το χρόνο και την ανίχνευση κάθε συστατικού από έναν ανιχνευτή. Στην αέρια χρωματογραφία (GC) το φέρον αέριο, το οποίο είναι συνήθως υδρογόνο (H_2) ή ήλιο (He), από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό. Σε ορισμένες περιπτώσεις στη συνέχεια υπάρχει μια διάταξη όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου.[32]

Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο γιατί οξειδώνει την στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα αν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίσχυη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, για αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται.[32]

Το κύριο μέρος του χρωματογράφου είναι η στήλη. Υπάρχουν δύο είδη στηλών: οι πληρωμένες και οι τριχοειδείς στήλες. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει όσο το δυνατόν μικρότερο χώρο, από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, άργιλο, ύαλο ή πλαστικό, μήκους 1-2 m για τις πληρωμένες στήλες, μέχρι αρκετών εκατοντάδων μέτρων για τις τριχοειδείς, εσωτερικής διαμέτρου της τάξεως των mm στις αναλυτικές στήλες, πολλών δεκάδων cm στις παρασκευαστικές στήλες.[32]

Το δείγμα, συνήθως όγκου 1 μL , εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή διαφράγματος (septum). Η ταχύτητα και η ικανότητα του διαχωρισμού εξαρτώνται από την θερμοκρασία. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά.

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει

τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα. [32]

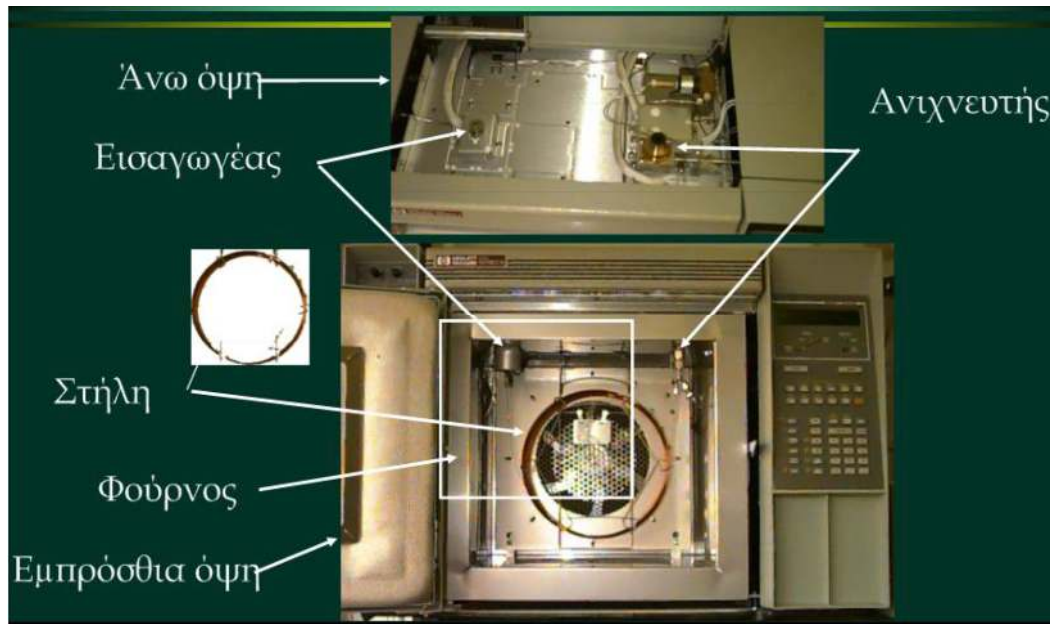
Τα **φασματόμετρα μαζών (MS)** αποτελούνται από:

- Το θάλαμο ιοντισμού όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα ενός ηλεκτρονίου
- Τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z)
- Τον ανιχνευτή

Ο χώρος όπου δημιουργούνται και επιταχύνονται τα ιόντα διατηρείται σε κατάσταση υψηλού κενού. Με το υψηλό κενό δημιουργούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες θέρμανσης ατμοί της προς προσδιορισμό ουσίας χωρίς τη διάσπαση της, που οδηγούνται στο θάλαμο ιοντισμού. Επίσης απομακρύνονται τα μόρια της και τα ουδέτερα προϊόντα της διάσπασης από το χώρο της ανάλυσης μετά από κάθε μέτρηση. [30]

Ο αναλυτής αποτελείται από ένα σωλήνα σε σχήμα τόξου, που βρίσκεται μέσα σε ομογενές μαγνητικό πεδίο (3000-4000 gauss) και σε διεύθυνση κάθετη προς τις δυναμικές γραμμές του μαγνητικού πεδίου. Με δύο κυκλικές οπές- διαφράγματα μεταβλητής ακτίνας στην αρχή και στο τέλος του σωλήνα ένα μέρος από τα ιόντα που δεν εστιάζονται στο κέντρο των διαφραγμάτων απορρίπτεται. [30]

Ο συνηθέστερος τρόπος ιοντισμού είναι με βομβαρδισμό των αέριων μορίων της ένωσης με δέσμη ηλεκτρονίων. Κατά τον ιοντισμό της ένωσης με ηλεκτρόνια, ο οποίος επιτυγχάνεται με βομβαρδισμό μορίων αυτής με δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας (συνήθως 70 eV), δημιουργείται με απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μέρος της ένωσης μια κατιοντική ρίζα που αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν. Οι κατιοντικές αυτές ρίζες επιταχύνονται αρχικά με ηλεκτρικό πεδίο και στη συνέχεια κινούνται μέσα στο μαγνητικό πεδίο, οπότε εκτρέπονται και διαχωρίζονται με βάση το m/z . [32]



Εικόνα 5.2 Οργανολογία GC/MS

5.3 Συνθήκες αέριου χρωματογράφου

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε αέριο χρωματογράφο τύπου GC-17A συζευγμένο με φασματογράφο μάζας QP-5050 MS από την Shimadzu (Tokyo, Japan) εφοδιασμένο με στήλη 30m×0.25mm I.D.DB-5 επικαλυμμένη με 5% διφαινυλπολυδιμεθυλοσιζάνιο (0.25 μm). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν ρυθμισμένη στους 270 °C και η βαλβίδα διαχωρισμού ανοίγει μετά από 1 min. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) καθαρότητας >99.999%, με ταχύτητα ροής 1.2 mL·min⁻¹. Η θερμοκρασία της στήλης βρισκόταν αρχικά στους 40 °C για 3 min και στη συνέχεια αυξήθηκε στους 280 °C με ρυθμό 10 °C·min⁻¹ όπου και παρέμεινε για 3 min. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν διάρκειας 30 min. Η θερμοκρασία της διεπιφάνειας (interface) ήταν ρυθμισμένη στους 280 °C και ο τύπος ιονισμού ήταν electron impact (70eV). Η αναλογία split/splitless ήταν 20:1. Για όλες τις αναλύσεις ο φασματογράφος μάζας λειτουργούσε σε SIM (Single Ion Monitoring) mode και τα ιόντα ποσοτικοποίησης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 5.1 με το χρόνο ανίχνευσης του κάθε αναλυτή από το GC.

Πίνακας 5.1 Ιόντα SIM των ενώσεων στόχων και χρόνοι ανίχνευσης

Ενώσεις-Στόχοι	t_r (min)	Μητρικό Ιόν (m/z)	Ιόν Ποσοτικοποίησης (m/z)
2-MIB	13.097	95	108.107
Γεωσμίνη	16.673	112	111.126

5.4 Γραμμικότητα μεθόδου στο GC/MS

Πριν την έναρξη των πειραμάτων είναι απαραίτητη η εύρεση των χρόνων κατακράτησης των ουσιών στον αέριο χρωματογράφο και ο έλεγχος της γραμμικότητας της μεθόδου. Για το λόγο αυτό έγιναν απευθείας εκχύσεις (direct injections) 1μL στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου με πρότυπα εργασίας που περιείχαν μίγμα των δύο ουσιών. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων. Οι χρόνοι κατακράτησης των ουσιών βρέθηκαν 13.097 και 16.673 min για το 2-MIB και τη γεωσμίνη αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν 1, 10, 50 και 100 ppm.

Η ανάλυση έδειξε ότι η μέθοδος αυτή είναι γραμμική αφού τα διαγράμματα και για τις δύο ουσίες έδωσαν συντελεστή συσχέτισης (R^2) που τείνει να είναι πολύ κοντά στο ένα.

6^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προκειμένου να αναπτυχθεί μια ολοκληρωμένη μέθοδος Vac-HSSPME για τον προσδιορισμό της 2-MIB και της γεωσμίνης είναι απαραίτητο να βελτιστοποιηθούν ορισμένοι παράμετροι.

Στον Πίνακα 6.1 δίνονται οι παράμετροι που θα εξεταστούν. Με την βελτιστοποίηση κάθε παραμέτρου, το επόμενο πείραμα πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους που έχουν ήδη βελτιστοποιηθεί.

Πίνακας 6.1 Παράμετροι που θα εξεταστούν

Συνθήκες Πειραματικής Διαδικασίας	
Επιλογή ίνας	PDMS, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS
Ποσότητα NaCl (% w/v)	0, 5, 10, 15, 20
Θερμοκρασία (°C)	25, 40, 60, 80
Στροφές ανάδευσης (rpm)	0, 500, 750, 1000, 1400
Όγκος δείγματος (mL)	5, 7, 9, 11
Χρόνος εκχύλισης (min)	10, 20, 30, 45, 60, 90, 120

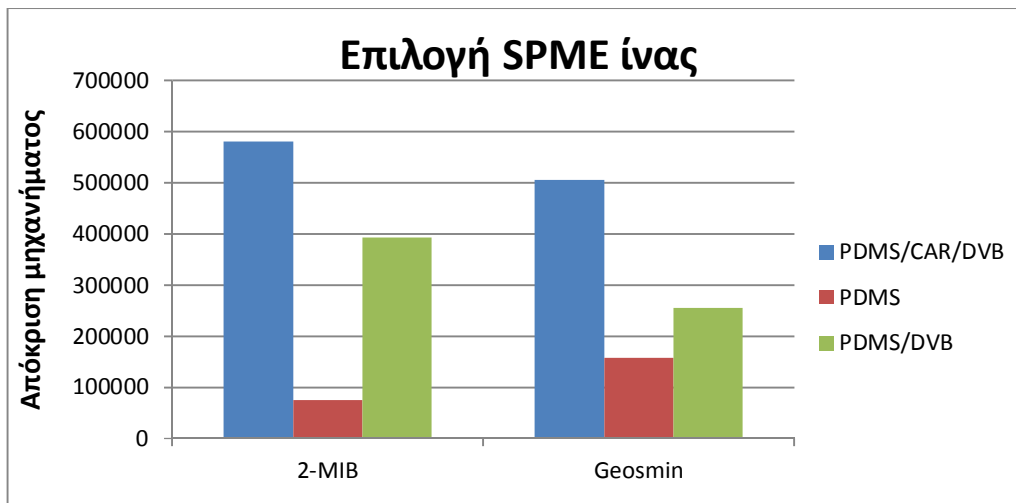
Οι έλεγχοι θερμοκρασίας και χρόνου εκχύλισης έγιναν υπό συνθήκες κενού αλλά και από συνθήκες κανονικής πίεσης μέσα στη δειγματοληπτική φιάλη.

6.1 Επιλογή Ίνας

Αρχικά πρέπει να γίνει επιλογή της ίνας με την οποία θα πραγματοποιηθούν τα πειράματα. Για την επιλογή της καταλληλότερης SPME ίνας για την εκχύλιση της 2-MIB και γεωσμίνης χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες σταθερές συνθήκες και αξιολογήθηκαν τρεις τύποι ιών SPME (PDMS, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS). Συγκεκριμένα, η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 25 °C, η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 1 ppb και ο όγκος του ήταν 7 mL. Ο χρόνος

ισορροπίας ήταν 5 min στα 1000 rpm και ο χρόνος εκχύλισης 30 min στα 1000 rpm. Η ποσότητα NaCl που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20% w/v.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στην εικόνα 6.1



Εικόνα 6.1 Έλεγχος για την επιλογή SPME ίνας

Η ίνα που δίνει τα βέλτιστα αποτελέσματα είναι η ίνα DVB/CAR/PDMS. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται από το διάγραμμα η ίνα PDMS δίνει τη χαμηλότερη απόκριση και αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η ίνα αυτή απευθύνεται κυρίως στην εκχύλιση μη πολικών ενώσεων, είναι εξαιρετικά υδρόφοβη και συγκρατεί ικανοποιητικά τα χαμηλής και μέσης πολικότητας συστατικά. Στη συνέχεια, δεύτερη σε απόκριση έρχεται η ίνα PDMS/DVB η οποία είναι γνωστό ότι χρησιμοποιείται για τη συγκράτηση των μεγαλύτερων και λιγότερο πτητικών μορίων λόγω των μεγαλύτερων πόρων καθώς. Τέλος, η ίνα DVB/CAR/PDMS έχει τη μεγαλύτερη απόκριση στο μηχανήμα. Η ίνα αυτή καθιστά δυνατή τη συγκράτηση όλων των μορίων ανεξαρτήτως μεγέθους. Αποτελείται από στρώμα PDMS/Carboxen και καλύπτεται από στρώμα PDMS/DVB. Τα μικρά μόρια που έχουν μεγαλύτερο συντελεστή διάχυσης προσεγγίζουν το εσωτερικό στρώμα ταχύτερα με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η συγκράτηση των μεγαλύτερων στο εξωτερικό στρώμα. [1,3]

Έτσι, για όλα τα πειράματα επιλέχθηκε η ίνα **50/30 μm DVB/CAR/PDMS 1 cm**.

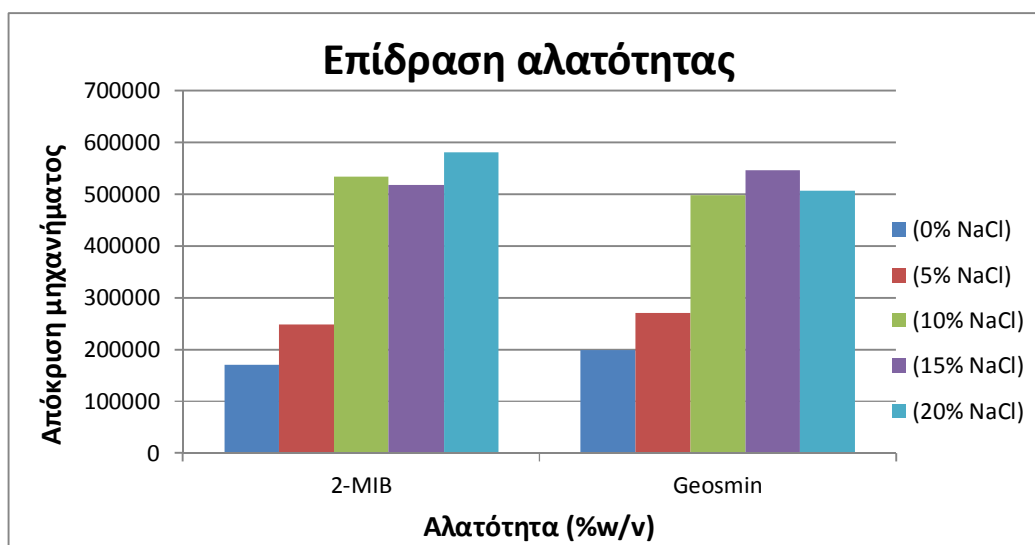
6.2 Επίδραση αλατότητας

Για την επίδραση της αλατότητας στη μέθοδο Vac-HSSPME, χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες σταθερές συνθήκες και ελέγχθηκαν ποσοστά αλατότητας 0, 5, 10, 15, 20% w/v NaCl. Πιο αναλυτικά, τοποθετήθηκαν στη δειγματοληπτική φιάλη 7 mL

πρότυπου εργασίας 1 ppb. Τα πρότυπα εργασίας παρασκευάστηκαν εμβολιάζοντας 10 μL από διάλυμα συγκέντρωσης 100 ppb που περιέχει τις ενώσεις διαλυμένες σε μεθανόλη, σε υδατικό διάλυμα με συνολικό όγκο 100 mL. Η δειγματοληπτική φιάλη αφέθηκε να αναδεύεται για 5 min ώστε να επέλθει ισορροπία και στη συνέχεια εμβαπτίστηκε στη φιάλη η ίνα DVB/CAR/PDM για 30 min. Η ανάδευση τόσο κατά την ισορρόπηση όσο και κατά τη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στα 1000 rpm και σε θερμοκρασία 25 °C.

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 25 °C, η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 1 ppb και ο όγκος του ήταν 7 mL, ο χρόνος ισορροπίας ήταν 5 min στα 1000 rpm και ο χρόνος εκχύλισης 30 min στα 1000 rpm.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στην εικόνα 6.2



Εικόνα 6.2 Επίδραση αλατότητας στην Vac-HSSPME

Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα μέχρι την ποσότητα 10% w/v NaCl όσο αυξάνεται η αλατότητα τόσο αυξάνεται και η απόκριση του μηχανήματος και για τις δύο ουσίες. Για την 2-MIB σε ποσότητα 15% w/v NaCl παρατηρείται μια μικρή πτώση ενώ η γεωσμίνη στην ίδια ποσότητα εξακολουθεί να αυξάνεται. Για ποσότητα 20% w/v NaCl η απόκριση του μηχανήματος για την 2-MIB αυξάνεται και ξεπερνάει και την κορυφή στο 10% w/v, ενώ για τη γεωσμίνη μειώνεται ελάχιστα σε σχέση με το 15% w/v. Από αυτό συμπεραίνεται ότι γενικά η αλατότητα επηρεάζει και τις δύο ουσίες λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης (salting out effect) καθώς απελευθερώνονται περισσότεροι αναλύτες στην υπερκείμενη επιφάνεια ενισχύοντας το φαινόμενο της προσρόφησης στην ίνα. Με απλούστερα λόγια, η προσθήκη άλατος στη μήτρα οδηγεί σε μείωση της υδατοδιαλυτότητας των προς ανάλυση ενώσεων οι οποίες δεν είναι ηλεκτρολύτες και σε αύξηση της σταθεράς Henry, αυξάνοντας την συγκέντρωσή τους στην υπερκείμενη φάση.

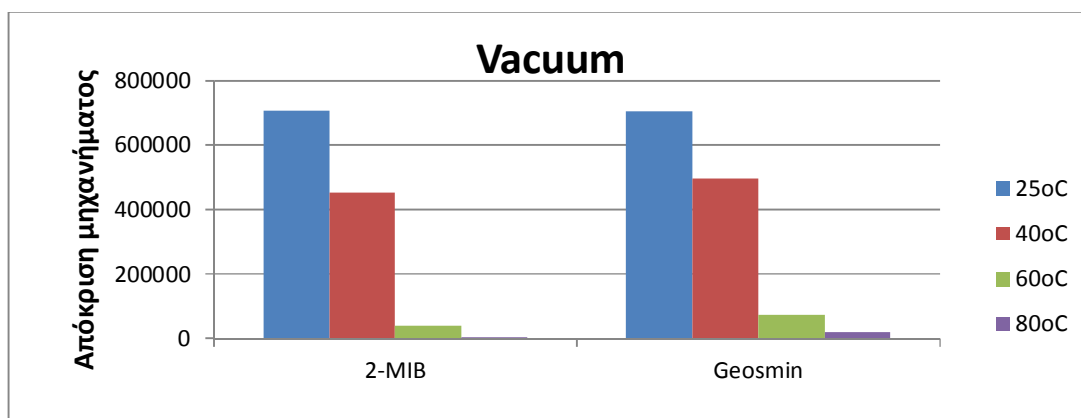
Έχει παρατηρηθεί ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος τα ανιόντα σχηματίζουν μια στοιβάδα στην επιφάνεια της ίνας, εμποδίζοντας τη μεταφορά των οργανικών ενώσεων προς την υπερκείμενη αέρια φάση. Επομένως, η προσθήκη άλατος ενισχύει το φαινόμενο της εξαλάτωσης μέχρι ένα σημείο.

Τελικά, επιλέχθηκε για όλα τα πειράματα ποσοστό αλατότητας **20% w/v NaCl**.

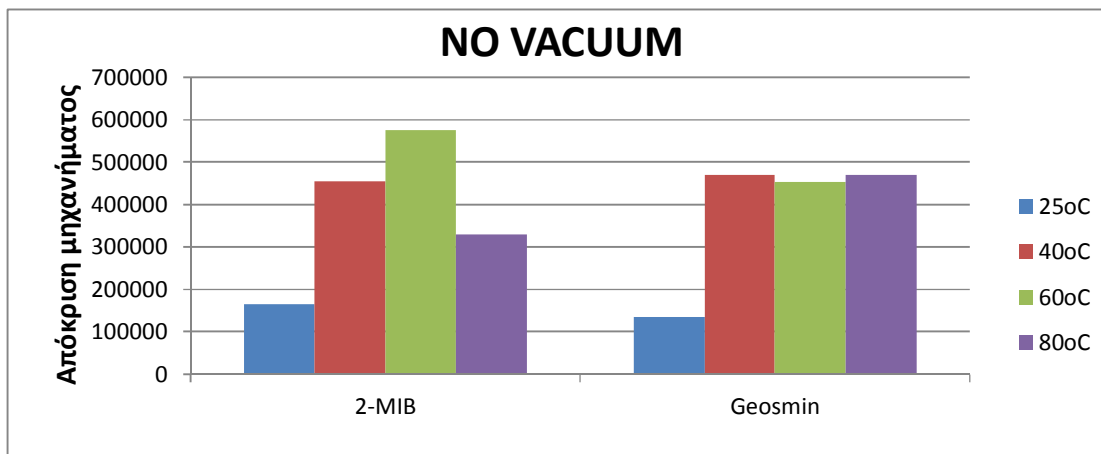
6.3 Επίδραση θερμοκρασίας

Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος της επίδρασης της θερμοκρασίας. Για να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στη διαδικασία της εκχύλισης έγιναν πειράματα στις ίδιες συνθήκες αλλά σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες: 25, 40, 60, 80 °C. Η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 1 ppb και ο όγκος του 7 mL. Το δείγμα αναδευόταν για 5 min στα 1000 rpm μέχρι να επέλθει ισορροπία, ενώ η εκχύλιση διήρκησε 30 min στα 1000 rpm. Η ποσότητα NaCl ήταν 20% w/v και η ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση ήταν η 50/30 μm DVB/CAR/PDMS . Για όλες τις θερμοκρασίες χρησιμοποιήθηκε υδατόλουτρο.

Τα πειράματα αυτά έγιναν από τέσσερις φορές το καθένα, δύο υπό συνθήκες κενού και δύο υπό συνθήκες κανονικής πίεσης. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στις εικόνες 6.3 και 6.4



Εικόνα 6.3 Επίδραση θερμοκρασίας στην Vac-HSSPME



Εικόνα 6.4 Επίδραση θερμοκρασίας στην HSSPME

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει την απόδοση της μεθόδου Vac-HSSPME ενώ αυξάνει την απόδοση της HSSPME. Παρατηρείται ότι η απόκριση του μηχανήματος στους 25 °C στην μέθοδο Vac-HSSPME είναι μεγαλύτερη από την βέλτιστη απόκριση στους 60 °C στην HSSPME υπό συνθήκες κανονικής πίεσης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι θετικό γιατί συμπεραίνεται ότι η Vac-HSSPME έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την HSSPME και μπορεί επιπλέον να χρησιμοποιηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

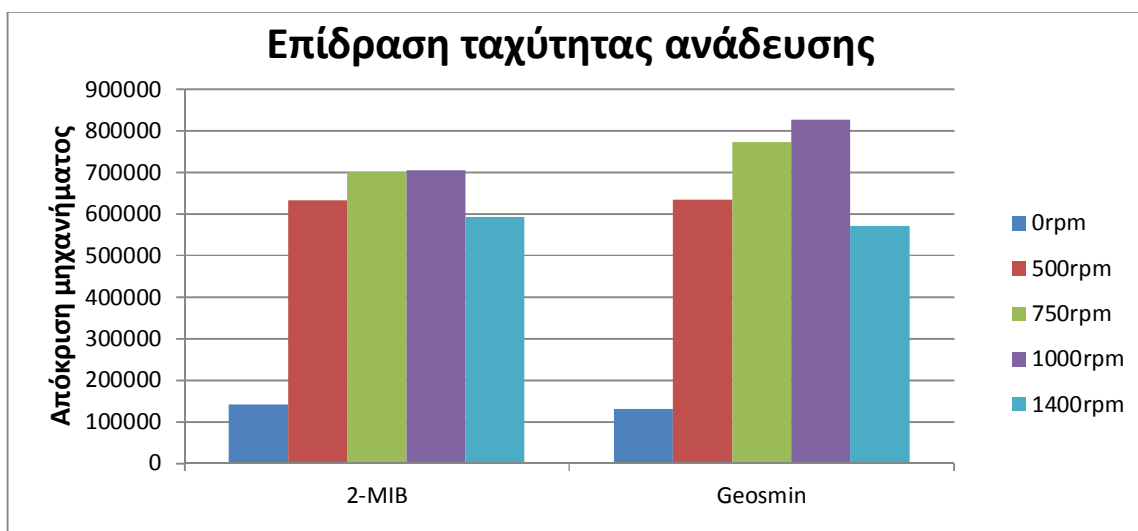
Όσο αφορά την Vac-HSSPME αυτό μάλλον οφείλεται στην υψηλή πίεση των ατμών με αποτέλεσμα η μέγιστη εκχύλιση να πραγματοποιείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον μόρια νερού αλλάζουν τις ιδιότητες της ίνας και μειώνουν την ποσότητα αναλύτων που εκχυλίζονται.

Γενικά η θέρμανση του δείγματος οδηγεί σε ταχύτερη HSSPME υπό κανονικές ατμοσφαιρικές συνθήκες. Ωστόσο, αυξημένες θερμοκρασίες στο δείγμα μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την ανάκτηση μετατοπίζοντας την ισορροπία μεταξύ ίνας και υπερκείμενου χώρου προς τον δεύτερο. Επιπλέον, η αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση μειώνει τη σταθερά κατανομής του εκάστοτε αναλύτη. Μειώνεται, επίσης, η συνολική ποσότητα που εκχυλίζεται από την ίνα λόγω της μείωσης της σταθεράς κατανομής των αναλυτών μειώνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Αυτό οφείλεται στο ότι η διαδικασία της ρόφησης είναι εξώθερμο φαινόμενο ($q > 0$).

Τελικά, επιλέχθηκε για όλα τα πειράματα η θερμοκρασία **25 °C**.

6.4 Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης

Επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης στην εκχύλιση των ουσιών. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 25 °C, η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 1 ppb και ο όγκος του ήταν 7 mL. Ο χρόνος ισορροπίας ήταν 5 min στα 1000 rpm και ο χρόνος εκχύλισης 30 min σε πέντε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης: 0, 500, 750, 1000, 1400 rpm. Η ποσότητα NaCl που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20% w/v. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στην εικόνα 6.5



Εικόνα 6.5 Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης στην Vac-HSSPME

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της κίνησης των μορίων και της απόδοσης της εκχύλισης. Από 0-1000 rpm υπάρχει μια σταδιακή αύξηση στην απόδοση της εκχύλισης ενώ στα 1400 rpm η απόδοση ελαττώνεται αισθητά και για τις δύο ουσίες.

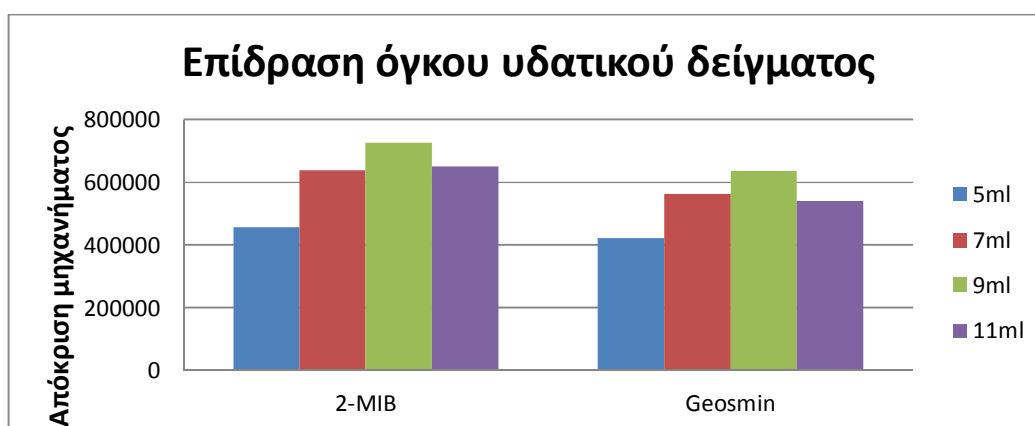
Η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης του δείγματος κατά την εκχύλιση του είναι καταλυτική αφού διευκολύνει τη μεταφορά της μάζας από το διάλυμα στην ίνα. Στην περίπτωση της Vac-HSSPME η ανάδευση δεν αναμιγνύει μόνο την υδατική φάση (μήτρα) αλλά βοηθάει ταυτόχρονα και την ανάδευση της υπερκείμενης αέριας φάσης.

Έτσι επιλέχθηκε για όλα τα πειράματα η ταχύτητα **1000 rpm**.

6.5 Επίδραση όγκου υδατικού δείγματος

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του όγκου του υδατικού δείγματος αφού ο όγκος της υπερκείμενης επιφάνειας επηρεάζει τόσο τη συγκέντρωση των ουσιών στην υπερκείμενη επιφάνεια αλλά και τους χρόνους ισορροπίας. [18]

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 25 °C, η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 1 ppb, ο χρόνος ισορροπίας ήταν 5 min στα 1000 rpm, ο χρόνος εκχύλισης 30 min στα 1000rpm, η ποσότητα NaCl ήταν 20% w/v και η ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση ήταν η 50/30 μm DVB/CAR/PDMS. Για τις συνθήκες αυτές εισήχθησαν σε φιαλίδιο 5, 7, 9, 11 mL υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 1 ppb εμβολιασμένα με γεωσμίνη και 2-MIB. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στην εικόνα 6.6



Εικόνα 6.6 Επίδραση όγκου υδατικού δείγματος στην Vac-HSSPME

Συνήθως αύξηση του όγκου του υδατικού δείγματος σημαίνει μείωση του λόγου αέρια- υγρή φάση, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη συγκέντρωση των ουσιών στη υπερκείμενη επιφάνεια, το οποίο ευνοεί φυσικά τη διαδικασία της εκχύλισης. [18] Στην Vac-HSSPME η έλλειψη αέρα στον υπερκείμενο χώρο επιταχύνει την κινητική της εκχύλισης και το διάγραμμα σχεδόν σταθεροποιείται και για τις δύο ουσίες.

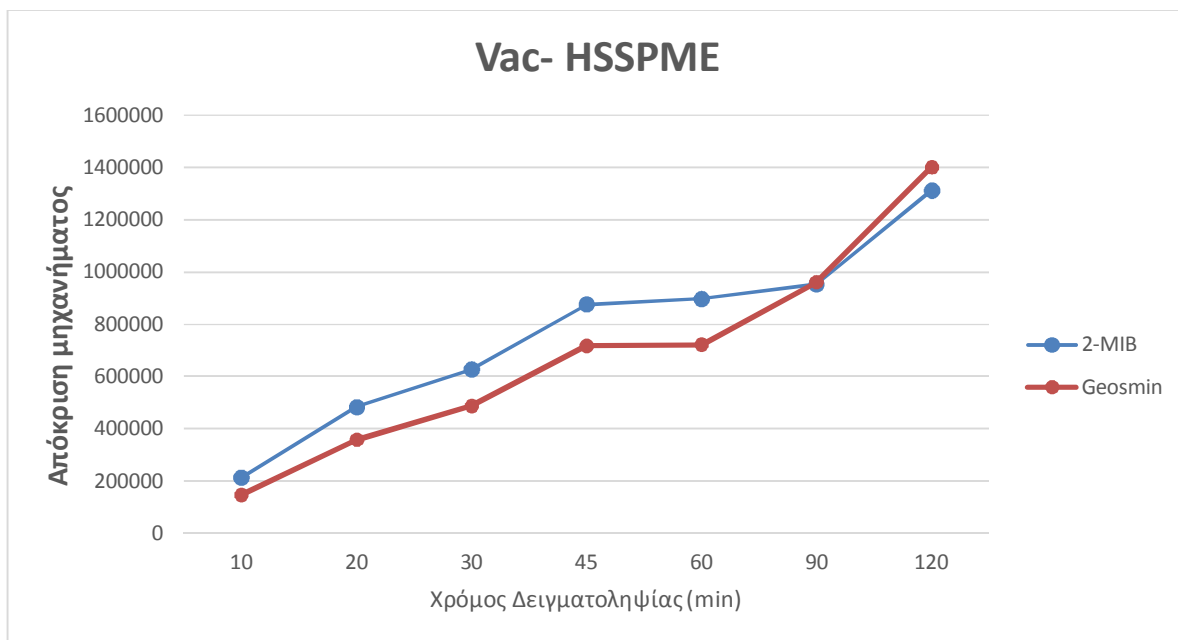
Κατά την HSSPME, για ημιπτητικούς αναλύτες μεγαλύτερη ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να επιτευχθεί με την αύξηση του όγκου του διαλύματος, γιατί γι' αυτούς τους αναλύτες μειώνοντας τον όγκο του υπερκείμενου χώρου αυξάνεται η συγκέντρωση της κλίσης στον υπερκείμενο χώρο και χρειάζονται λιγότερο χρόνο για να διαχέονται στην υπερκείμενη φάση. [28]

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα λοιπόν, έως και τα 9 mL αύξηση του όγκου συνεπάγεται και αύξηση της απόκρισης του μηχανήματος αφού αυξάνεται και ο αριθμός των μορίων στο υδατικό δείγμα που μπορούν να μεταφερθούν στην υπερκείμενη αέρια φάση και τελικά να εκχυλιστούν. Για τα 11 mL η απόκριση του μηχανήματος μειώνεται και για τις δύο ουσίες.

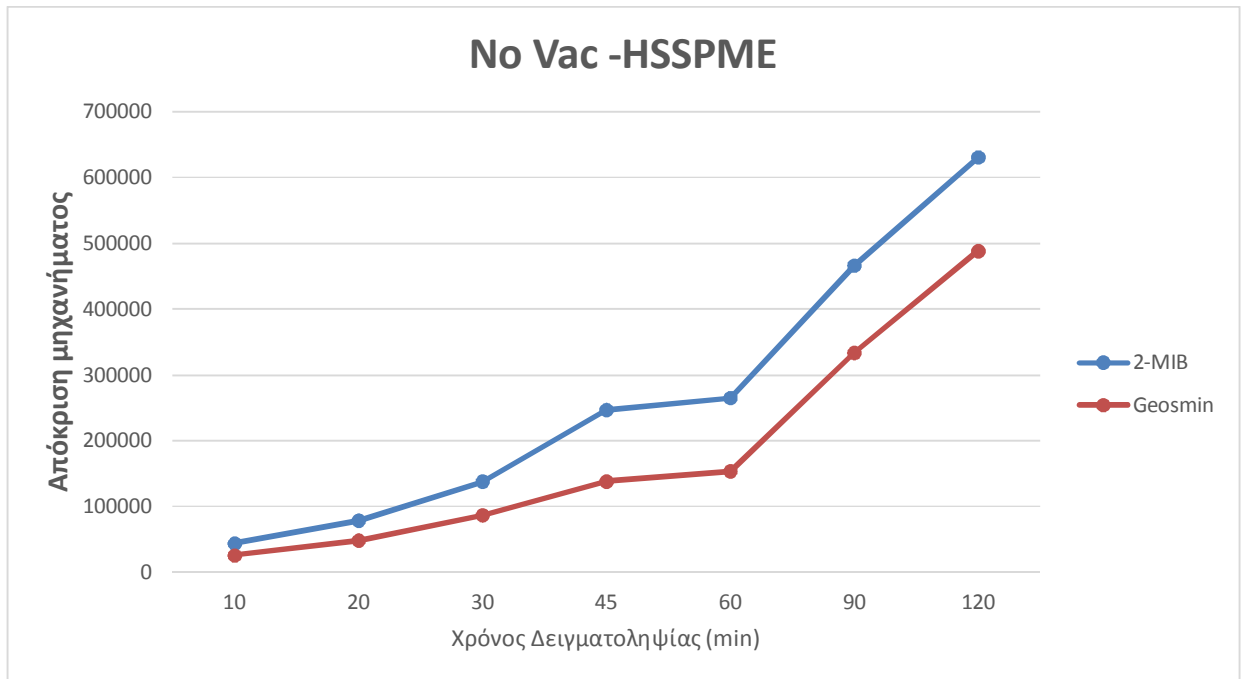
Έτσι επιλέχθηκε για όλα τα πειράματα ως όγκος υδατικού διαλύματος τα **9 mL**.

6.6 Επίδραση χρόνου εκχύλισης

Τέλος μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου εκχύλισης. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ήταν 25 °C, η συγκέντρωση του δείγματος ήταν 1 g/g και ο όγκος του 9 mL. Η ανάδευση και η δειγματοληψία έγιναν στις 1000 rpm και η ανάδευση διήρκησε 5 min. Η ποσότητα NaCl ήταν 20% w/v και η ίνα που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση ήταν η 50/30 μm DVB/CAR/PDMS. Οι χρόνοι που ελέγχθηκαν ήταν 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 min. Τα πειράματα αυτά έγιναν από τέσσερις φορές το καθένα, δύο υπό συνθήκες κενού (Vacuum) και δύο κάτω από συνθήκες κανονικής πίεσης (No-Vacuum). Τα αποτελέσματα από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στις εικόνες 6.7 και 6.8



Εικόνα 6.7 Επίδραση χρόνου εκχύλισης στην Vac-HSSPME



Εικόνα 6.8 Επίδραση χρόνου εκχύλισης στην HSSPME

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε ότι η μέθοδος HSSPME είναι πολύ πιο γρήγορη και αποτελεσματική υπό συνθήκες κενού σε αντίθεση με τις συνθήκες κανονικής πίεσης. Φαίνεται ότι οι αποκρίσεις και των δύο ενώσεων αυξάνονται με την αύξηση του χρόνου εκχύλισης και υπό συνθήκες κενού και υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης πράγμα που σημαίνει ότι δεν έχει επέλθει ακόμα ισορροπία για το χρονικό διάστημα που μελετήθηκε. Η Vac-HSSPME βασίζεται όπως και η κλασική HSSPME στη μεταφορά μάζας από την υδατική φάση στην υπερκείμενη φάση και ύστερα από την υπερκείμενη φάση στη στερεή φάση (ίνα). Καθώς το σύστημα πλησιάζει σε συνθήκες ισορροπίας ο ρυθμός μεταφοράς μάζας ελαττώνεται. Παρόλα αυτά πλήρης ισορροπία επιτυγχάνεται μετά από πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η ανάπτυξη κενού μειώνει την πίεση στον υπερκείμενο χώρο με αποτέλεσμα την αύξηση των συντελεστών διάχυσης των ουσιών προς την αέρια φάση και κατ' επέκταση 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.

Η μείωση της πίεσης ενισχύει τον εντοπισμό των ημιπτητικών ενώσεων, 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 φάση με αποτέλεσμα να επέρχεται ισορροπία γρηγορότερα και ο εντοπισμός με μεγαλύτερη ευκολία τις ημιπτητικές ουσίες.

Τελικά επιλέχθηκε χρόνος εκχύλισης για όλα τα πειράματα **30 min**.

6.7 Γραμμικότητα

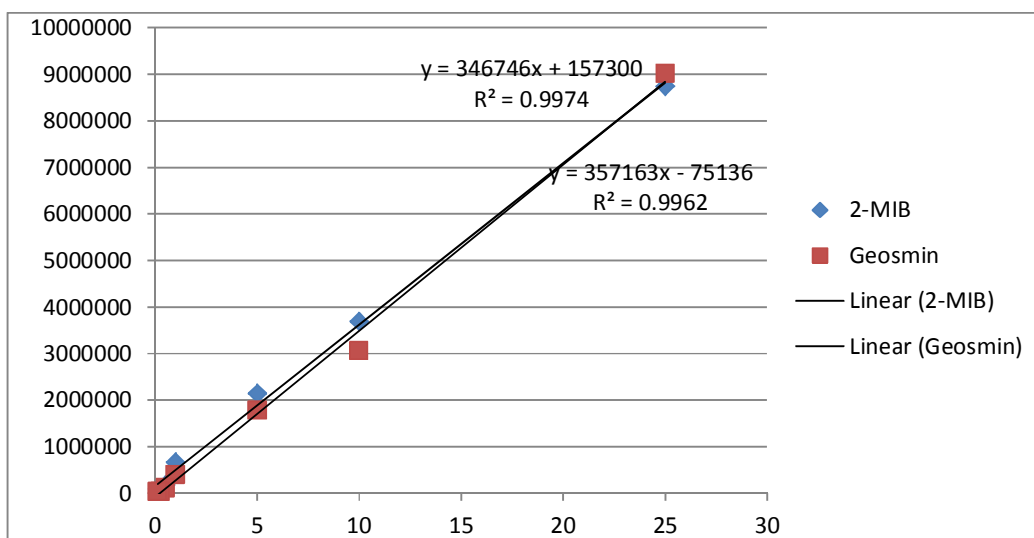
Σύμφωνα με τη βελτιστοποίηση της μεθόδου Vac-HSSPME όπως περιγράφηκε παραπάνω οι βέλτιστες συνθήκες που επιλέχθηκαν φαίνονται στον πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2 Βέλτιστες συνθήκες μεθόδου Vac-HSSPME

Βέλτιστες Συνθήκες Μεθόδου Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης στην Υπερκείμενη Φάση υπό Συνθήκες Κενού	
Επιλογή fiber	DVB/CAR/PDMS
Ποσότητα NaCl (% w/v)	20
Θερμοκρασία (°C)	25
Στροφές ανάδευσης (rpm)	1000
Όγκος δείγματος (mL)	9
Χρόνος εκχύλισης (min)	30

Μελετήθηκε επιπλέον, η γραμμικότητα της μεθόδου σε επίπεδα συγκεντρώσεων 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 και 25 ppb για τη 2-MIB και τη γεωσμίνη. Οι συντελεστές συσχέτισης είναι 0,997 και 0,996 αντίστοιχα (Πίνακας 6.3) οπότε η μέθοδος μπορεί να θεωρηθεί γραμμική.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε και η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πέντε αναλύσεις στις βέλτιστες συνθήκες με διαλύματα συγκέντρωσης 1 και 10 ppb εμβολιασμένα και με τις δύο ενώσεις. Η επαναληψιμότητα εκφράστηκε ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD).



Εικόνα 6.9 Διάγραμμα γραμμικότητας βελτιστοποιημένης μεθόδου

Πίνακας 6.3 Γραμμικότητα και επαναληψιμότητα της μεθόδου Vac-HSSPME

	Εύρος Συγκεντρώσεων (ppb)	Linearity (R^2)	RSD (%)
2-MIB	0.1 - 25	0.997	4.9 για 1 ppb 3.3 για 10 ppb
Γεωσμίνη	0.1 - 25	0.996	5.2 για 1 ppb 8 για 10 ppb

6.8 Εφαρμογή βέλτιστων συνθηκών σε πραγματικά δείγματα (matrix effects)

Μετά τη βελτιστοποίηση της μεθόδου πρέπει να γίνει εφαρμογή της σε πραγματικά δείγματα, αφού η αποτελεσματικότητά της επηρεάζεται από τη σύνθεση της μήτρας που εξετάζεται. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε νερό βρύσης από τον εργαστηριακό χώρο και δείγμα από την εκροή της Δευτεροβάθμιας Επεξεργασίας του Βιολογικού Καθαρισμού των Χανίων που βρίσκεται στην περιοχή Κουμπελή.

Αρχικά έγινε ανάλυση των δύο αυτών μητρών όπου δεν ανιχνεύθηκαν οι ενώσεις-στόχοι. Και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον υπολογισμό της ανάκτησης. Για τα δείγματα αυτά υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (RSD)

και η ανάκτηση (Recovery) των ουσιών. Η ανάκτηση υπολογίστηκε από το πηλίκο της ποσότητας 2-MIB και γεωσμίνης που αναλύθηκαν στο GC/MS στα πραγματικά δείγματα προς την ποσότητα των αυτών των ουσιών που αναλύθηκαν στο GC/MS σε απιονισμένο νερό, πολλαπλασιασμένο με εκατό (100). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 6.4

Πίνακας 6.4 Ποσοστά ανάκτησης ουσιών από νερό βρύσης και εκκροή βιολογικού καθαρισμού Χανίων

Ουσίες	Νερό βρύσης		Εκκροή Βιολογικού	
	RSD (%)	Σχετική Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Σχετική Ανάκτηση (%)
2-MIB	5.6	101.3	18.4	90.7
Γεωσμίνη	4.4	124.6	25.1	93.4

Τα δείγματα επιμολύνθηκαν με μίγμα των δύο ενώσεων (γεωσμίνη και 2-MIB) και το τελικό διάλυμα είχε συγκέντρωση 10 ppb. Η εκχύλιση έγινε με ίνα 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 1 cm και διήρκησε 30 min. Η ανάδευση πραγματοποιήθηκε στις 1000 στροφές και η θερμοκρασία ήταν 25 °C. Το δείγμα που εκχυλίστηκε είχε όγκο 9 mL και είχε προστεθεί 20% w/v αλάτι (NaCl). Η ανάκτηση κρίνεται ικανοποιητική, επομένως η μήτρες δεν επιδρούν στην απόδοση της Vac-HSSPME

7^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ρυθμός της μεθόδου HSSPME αυξάνεται όταν η δειγματοληψία γίνεται υπό συνθήκες κενού λόγω της ενίσχυσης των ποσοστών εξάτμισης των ενώσεων-στόχων. Η μέθοδος Vac-HSSPME αποδείχθηκε πως είναι απλή και με μεγάλη ευαισθησία για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της γεωσμίνης και της 2-MIB. Με τη δημιουργία κενού στο εσωτερικό της φιάλης δειγματοληψίας επιτυγχάνεται μείωση της υδατοδιαλυτότητας των ουσιών που έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια των ουσιών προς ανάλυση να έχουν τάση διαφυγής προς την επιφάνεια της ίνας. Έγινε μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την Vac-HSSPME όπως η περιεκτικότητα σε NaCl, η θερμοκρασία εκχύλισης, η ταχύτητα ανάδευσης, ο όγκος του υδατικού δείγματος και ο χρόνος εκχύλισης. Επιπλέον, έγινε σύγκριση των παραμέτρων αυτών σε συνθήκες κανονικής πίεσης και τα αποτελέσματα ήταν πολύ πιο ικανοποιητικά για τις συνθήκες κενού. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα καπάκι το οποίο εφαρμόζεται σε εμπορικά διαθέσιμα φιαλίδια. Η προτεινόμενη διαδικασία επιτρέπει τη δειγματοληψία όλων των ενώσεων που εφαρμόζεται η HSSPME, ανεξάρτητα από την πτητικότητά τους. Η Vac-HSSPME είναι μια πολύ εύκολη, γρήγορη και πολλά υποσχόμενη μέθοδος προετοιμασίας δείγματος ανίχνευσης ρυπαντών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις στο υδάτινο περιβάλλον και η δειγματοληπτική της διάταξη επιτρέπει την αυτοματοποίηση της μεθόδου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sadao Nakamura, Shigeki Daishima. Simultaneous determination of 22 volatile organic compounds, methyl-tert-butyl ether, 1,4-dioxane, 2-methylisoborneol and geosmin in water by headspace solid phase microextraction- gas chromatography- mass spectrometry. Takakura-cho, Hachioji-shi, Tokyo, Japan 2005.
2. Keita Saito, Kota Okamura, Hiroyuki Kataoka. Determination of musty odorants, 2-methylisoborneol and geosmin, in environmental water by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography- mass spectrometry. Shujitsu university, Nisigawara, Okayama, Japan 2008.
3. Αντωνία Μουσουράκη, Χανιά (2012). Διερεύνηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού “ Vac-HSSPME “, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανια.
4. Jun He, Rajasekhar Balasubramanian. Semi-volatile organic compounds (SVOCs) in ambient air and rainwater in a tropical environment: Concentrations and temporal and seasonal trends. National University of Singapore, Republic of Singapore 2009.
5. Rangesh Srinivasan, George A. Sorial. Treatment of taste and odor causing compounds 2-methyl isoborneol and geosmin in drinking water: A critical review. University of Cincinnati, Cincinnati 2010.
6. Julien Parinet, Manuel J. Rodriguez, Jean Serodes. Influence of water quality on the presence of off- flavour compounds (geosmin and 2-methylisoborneol).
7. Henryk H. Jeleń, Małgorzata Majcher, Renata Zawirska-Wojtasiak, Małgorzata Wiewiórowska and □□□□□ □□sowicz. Determination of Geosmin, 2-Methylisoborneol, and a Musty-Earthy Odor in Wheat Grain by SPME-GC-MS, Profiling Volatiles, and Sensory Analysis. Agricultural University of Poznań, Poland 2003.
8. Ting Zhang, Lin Li, Yanxia Zuo, Quan Zhou and Lirong Song. Biological origins and annual variations of earthy-musty off-flavours in the Xionghe Reservoir in China, 2010.
9. AU Wnorowski. Tastes and odours in the aquatic environment: A review. Division of Water Technology, CSIR, Pretoria, South Africa 1992.
10. George Izaguirre, Cordelia J.Hwang, Stuart W. Kranser and Michael J. McGuire. Geosmin and 2-Methylisoborneol from Cyanobacteria in Three Water Supply Systems.
11. Steven W Lloyd, Jeanne M Lea, Paul V Zimba, Casey C Grimm. Rapid analysis of geosmin and 2-methylisoborneol in water using solid phase micro extraction procedures. 1998.
12. Μαρία Σπαντιδάκη. Έλεγχος ποιότητας νερού φράγματος ποταμών Αμαρίου. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά 2012.
13. ChemSpider. Search and share chemistry (<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.27642.html>)
14. Pawliszyn J. 1997. Solid Phase Microextraction, Theory and Practice. Wiley-VHC.

15. Χαράλαμπος Λαγουδάκης, Χανιά 2014. Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού, οργανοχλωριωμένων ενώσεων που βρίσκονται σε δείγματα νερού, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
16. Χημικό εργαστήριο. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (solid phase microextraction-SPME). (<http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2009/11/solid-phase-microextraction-spme.html>)
17. Pawliszyn J., Pawliszyn B. Pawliszyn M., 1997. The chemical Educator, vol. 2, No 4.
18. Sadao Nakamura, Shigeki Daishima. Simultaneous determination of 22 volatile organic compounds, methyl-tert-butyl ether, 1,4-dioxane, 2-methylisoborneol and geosmin in water by headspace solid phase microextraction- gas chromatography- mass spectrometry. Takakura-cho, Hachioji-shi, Tokyo, Japan 2005.
19. Pawliszyn J.. Applications of Solid Phase Microextraction. Royal Society of Chemistry 1999.
20. Pawliszyn J.. Theory of Solid-Phase Microextraction. Department of Chemistry, University of Waterloo, ON, N2L 3G1, Canada.
21. Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice.
22. J. K. Lokhnauth, (2005), 'Solid Phase Microextraction and Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to Ion Mobility Spectrometry', Dissertation.
23. John V. Hinshaw, Serveron Corp., Hillsboro, Oregon, USA. Solid-Phase Microextraction
24. Gyorgy Vas and Karol Vekey. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric. 2004.
25. Αρτεμης Παλαιογιάννη-Μπέλλου. Ανίχνευση οργανοφωσφορικών ενώσεων σε δείγματα ελαιολάδου με χρήση της τεχνικής SPME, GC-ECD. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά 2008.
26. Σταμάτιος-Δαυίδ Στραφιώτης. Διερεύνηση της σύστασης του πτητικού κλάσματος της βρώσιμης ελιάς Καλαμών μετά από SPME δειγματοληψία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2009.
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 2012.
28. Eleftheria Psillakis, Evangelia Yiantzi, Nicolas Kalogerakis. Downsizing vacuum-assisted headspace solid phase microextraction. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά 2013.
29. EleftheriaPsillakis, Antonia Mousouraki, EvangeliaYiantzi, Nicolas Kalogerakis. Effect of Henry's law constant and operating parameters on vacuum-assisted headspace solid phase micro-extraction. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2012.
30. Καψημάλη Δήμητρα. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου μορφοειδικού προσδιορισμού μονομεθυλο- και ανόργανου υδράργυρου σε βιολογικά υγρά με μικροεκχύλιση στερεής φάσης από υπερκείμενη αέρια φάση (HS-SPME) και

αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματοφωτόμετρο μάζας (GC-MS).
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη 2008.

31. Pawliszyn J. Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory.
32. Μπίτη Μαρία, Μυστηρίδου Εμμανουέλα. Πειράματα Ποσοτικοποίησης Παραγώγων των Ενώσεων α -Dicarbonyl του Κρασιού. Πανεπιστήμιο Πατρών 2010.