



Πολυτεχνείο Κρήτης
Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος
Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών:
«Έλεγχος ποιότητας και διαχείριση περιβάλλοντος»

Μεταπτυχιακή διατριβή

Τίτλος:

Προσδιορισμός πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε υδατικά δείγματα με χρήση της τεχνικής LPME-GC/MS: εφαρμογή σε δείγματα εκροής από μονάδες βιολογικού καθαρισμού.

Χαραλαμπάκη Μάγδα

Εξεταστική Επιτροπή:

Ψυλλάκη Ελευθερία (επιβλέπουσα)

Καλογεράκης Νικόλαος

Μαντζαβίνος Διονύσιος

Χανιά 2004

A. Περίληψη

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση μεθόδου προσυγκέντρωσης υδατικού δείγματος που περιέχει Πολυκυκλικούς Αρωματικούς Υδρογονάνθρακες (Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, PAH). Η μέθοδος αυτή ονομάζεται Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME) και αναπτύχθηκε αρχικά από τους Rasmussen και Pederson-Bjergaard.

Οι Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες είναι οργανικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους που αποτελούνται από συγχωνευμένους δακτυλίους. Εισάγονται στο περιβάλλον μέσω των φυσικών και ανθρωπογενών διαδικασιών καύσης, εξαιτίας της ατελούς καύσης. Θεωρούνται ρύποι προτεραιότητας λόγω της διαπιστωμένης τοξικότητας, δράσης ως μεταλλαξιογόνων και καρκινογεννητικότητας πολλών ενώσεων της κατηγορίας αυτής.

Ο προσδιορισμός των ενώσεων PAH που χρησιμοποιήθηκαν (ναφθαλένιο, ακεναφθένιο, φαιναθρένιο, φλορανθένιο, πυρένιο, με εσωτερικό πρότυπο το φλουορένιο) στα πρότυπα διαλύματα, έγινε με αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας (GC/MS).

Τέλος, έγινε ανάλυση πραγματικών δειγμάτων για τη διαπίστευση της ικανότητας προσυγκέντρωσης της LPME, με τη βοήθεια της ήδη ανεπτυγμένης τεχνικής Μικροεκχύλισης Στερεής Φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME), σε δείγματα νερού εκροής από τις μονάδες βιολογικού καθαρισμού των νομών Χανίων και Ηρακλείου.

Οι ενώσεις PAH εισέρχονται στα αστικά απόβλητα μέσω των αστικών απορροών, των βιομηχανικών εκροών και από διαρροές ή κηλίδες πετρελαίου. Αποτελούν υδρόφοβη ομάδα οργανικών ενώσεων και το μεγαλύτερο ποσοστό τους συσσωρεύεται στη λάσπη. Παρόλ' αυτά, ικανό ποσοστό διαφεύγει στο νερό εκροής και στη συνέχεια στους φυσικούς αποδέκτες, όπως διαπιστώθηκε και στην εργασία αυτή.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	i
Περιεχόμενα	ii
Λίστα σχημάτων	iv
Λίστα πινάκων	v
1. Εισαγωγή	1
1.1. Επεξεργασία αστικών λυμάτων	1
1.2. Βιολογικός καθαρισμός αστικών λυμάτων	1
1.3. Ποιότητα του νερού εκροής και της λάσπης από βιολογικούς καθαρισμούς	2
1.4. Συσσώρευση των ενώσεων αυτών στη λάσπη	2
1.5. Τοξικότητα των υγρών και στερεών αποβλήτων	3
1.6. Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (PAHs)	3
1.6.1. Πηγές και σημεία εντοπισμού των PAHs, επιφανειακά και υπόγεια νερά-πόσιμο νερό	5
2. Τεχνικές προετοιμασίας δείγματος	6
2.1. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME)	7
2.2. Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (SDME)	8
2.3. Μικροεκχύλιση μεμβράνης	8
2.3.1. Μικροεκχύλιση υγρής φάσης- LPME	9
2.3.1.1. Διατάξεις της ίνας για τις LPME δύο και τριών φάσεων	11
2.3.1.2. Διάταξη LPME ενεργού μεταφοράς	13
2.3.1.3. Διάταξη δυναμικής LPME	13
2.3.2. Βελτιστοποίηση μεθόδου. Παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της LPME	14
2.3.2.1. Επιλογή της ίνας (hollow fiber)	14
2.3.2.2. Επιλογή του διαλύτη	14
2.3.2.3. Ανάδευση του δείγματος.	14
2.3.2.4. Προσθήκη άλατος	15
2.3.2.5. Επίδραση της σχέσης των όγκων του διαλύματος δότη και δέκτη.	15
2.3.2.6. Ρύθμιση του pH.	15
2.3.2.7. Διάρκεια της εκχύλισης.	16
2.3.3. Εφαρμογές της LPME. Βιοϊατρική και ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων και τροφίμων.	16
3. Χρωματογραφική ανάλυση	19
3.1. Εισαγωγή	19
3.2. Βασικοί ορισμοί χρωματογραφήματος	20

3.3.	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας	21
3.4.	Διάταξη αέριου χρωματογράφου	21
3.5.	Εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας	23
3.6.	Φασματοσκοπία Μάζας. Φασματογράφος Μάζας	23
3.7.	Σύζευξη Φασματογράφου Μάζας με Αέρια Χρωματογραφία	24
	4. Πειραματικό μέρος	25
4.1.	Αντιδραστήρια και οργανολογία	25
4.2.	Περιγραφή της μεθόδου	25
4.3.	Εφαρμογή της τεχνικής μικροεκχύλισης LPME	26
4.4.	Εφαρμογή της τεχνικής μικροεκχύλισης SPME	26
4.5.	Χρωματογραφική ανάλυση με αεριοχρωματογράφο-φασματογράφο μάζας (GC-MS)	26
	5. Συζήτηση αποτελεσμάτων	28
5.1.	Συνθήκες εκχύλισης με την τεχνική μικροεκχύλισης υγρής φάσης	28
5.1.1.	Πειραματικός έλεγχος για τον καθορισμό του κατάλληλου διαλύτη	28
5.1.2.	Μελέτη της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης	28
5.1.3.	Μελέτη της επίδρασης της ιονικής ισχύος του υδατικού διαλύματος	29
5.1.4.	Μελέτη του χρόνου εκχύλισης	30
5.2.	Εκτίμηση μεθόδου	31
5.3.	Έλεγχος της ικανότητας εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου σε φυσικά δείγματα	32
5.4.	Ανάλυση δειγμάτων που προέρχονται από την εκροή μονάδας βιολογικού καθαρισμού αστικών αποβλήτων	33
	6. Μελλοντικές προοπτικές στη χρήση της LPME	35
	Βιβλιογραφία	36

Λίστα Σχημάτων

Σχήμα	Τίτλος	σελίδα
1.1.	Χημική δομή των 16 πιο σημαντικών PAH που περιέχονται στις λίστες προτεραιότητας ρυπαντών της EPA	4
2.1.	Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευή SPME	7
2.2.	Σχηματική αναπαράσταση συστήματος μικροεκχύλισης σταγόνας χωρίς επανεκχύλιση	8
2.3.	Συσκευή για μικροεκχύλιση με κοίλη μεμβράνη	9
2.4	Τομή του εσωτερικού της κοίλης ίνας στο υδατικό διάλυμα στη (i) δύο φάσεων και (ii) τριών φάσεων LPME	11
2.5	Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης της ίνας, όταν δύο σύριγγες συνδέονται σε κάθε άκρο της κοίλης ίνας	12
2.6.	Διάταξη με μικροσύριγγα για την στήριξη της ίνας, εισαγωγή και συλλογή του διαλύτη-δέκτη και την εισαγωγή δείγματος σε αναλυτικά όργανα	12
2.7.	Βασικές αρχές της ενεργής μεταφοράς στην LPME	13
3.1.	Γενική μορφή χρωματογραφήματος, με τις παραμέτρους που περιγράφουν τις κορυφές του	20
3.2.	Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων ενός αέριου χρωματογράφου	21
3.3.	Το τμήμα διαχωρισμού και το τμήμα ανάλυσης του αέριου χρωματογράφου.	22
5.1.	Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην απόδοση της εκχύλισης	29
5.2.	Επίδραση της προσθήκης άλατος στην απόδοση της εκχύλισης	30
5.3.	Επίδραση της διάρκειας της εκχύλισης στην απόδοσή της.	31

Λίστα Πινάκων

Πίνακας	Τίτλος	σελίδα
2.1	Κύριες βιοϊατρικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές της τεχνικής LPME	18
3.1	Αρχές χρωματογραφικής ανάλυσης	19
5.1	Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης	31
5.2	Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου	32
5.3	Σχετική ανάκτηση των PAH από νερό βρύσης και γεώτρησης μαζί με τις σχετικές τυπικές αποκλίσεις	33
5.4	Αποτελέσματα της ανάλυσης δειγμάτων που προέρχονται από την εκροή μονάδας βιολογικού καθαρισμού αστικών αποβλήτων	34

1. Εισαγωγή

1.1. Επεξεργασία αστικών λυμάτων

Κάθε ανθρώπινη κοινότητα παράγει τόσο υγρά όσο και στερεά απόβλητα. Τα υγρά απόβλητα προέρχονται από τη χρήση του νερού από τον άνθρωπο με διάφορους τρόπους. Έτσι ως υγρά απόβλητα μπορούμε να χαρακτηρίσουμε το σύνολο των υγρών που συλλέγονται από τις κατοικίες, τις βιομηχανίες και από άλλα κτίρια που αφορούν ανθρώπινες δραστηριότητες καθώς και από τις υπόγειες και επιφανειακές απορροές νερού των πόλεων αλλά και νερό βροχής.¹

Σε περίπτωση που ανεπεξέργαστα απόβλητα συσσωρευτούν, η αποσύνθεση των οργανικών υλών θα έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δύσσομων αερίων. Ακόμα, τα μη κατεργασμένα συνήθως περιέχουν μεγάλες ποσότητες παθογόνων μικροοργανισμών που προέρχονται είτε από τον άνθρωπο ή από ορισμένα βιομηχανικά απόβλητα (κυρίως τροφίμων). Τα απόβλητα ακόμα περιέχουν θρεπτικά υλικά που ενισχύουν την ανάπτυξη των φυτών της θάλασσας (ευτροφισμός) και σε κάποιο βαθμό τοξικά συστατικά.¹

Γι' αυτούς τους λόγους η άμεση και χωρίς ενόχληση απομάκρυνση των αποβλήτων από την πηγή σχηματισμού τους ακολουθούμενη από την επεξεργασία και διάθεσή τους είναι όχι μόνο επιθυμητή αλλά και απαραίτητη σε μια βιομηχανοποιημένη κοινωνία.¹

Αν και η συλλογή του νερού της βροχής και των αποχετεύσεων εφαρμόζεται ήδη από τα αρχαία χρόνια, η συλλογή των υγρών αποβλήτων ξεκινά πολύ αργότερα στις αρχές του 19^{ου} αιώνα. Πιο μετά, όταν αναπτύχθηκε η επιστήμη της βακτηριολογίας, οι αρχές της βρήκαν εφαρμογή και στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων.¹

1.2. Βιολογικός καθαρισμός αστικών λυμάτων

Ένα ολοκληρωμένο σύστημα καθαρισμού πρέπει να είναι σχεδιασμένο για την αφαίρεση περισσότερων της μιας κατηγορίας ρύπων γι' αυτό και αποτελεί συνδυασμό πολλών υποσυστημάτων. Τα υποσυστήματα αυτά μπορούν να χωριστούν σε πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια ανάλογα με τη ζητούμενη ποιότητα καθαρισμού και τη θέση του υποσυστήματος μέσα στο ολοκληρωμένο σύστημα.²

Ο βιολογικός καθαρισμός κατατάσσεται συνήθως στα δευτεροβάθμια συστήματα. Εκεί ουσιαστικά, επιταχύνονται οι φυσιολογικές διαδικασίες οξειδωσης και αποικοδόμησης των βιολογικών ρύπων, διεργασίες που στη φύση επιτελούνται πολύ αργά και με κατανάλωση ή καταστροφή φυσικών πόρων και οικοσυστημάτων.²

Ο βιολογικός καθαρισμός των αποβλήτων στηρίζεται στη χρησιμοποίηση μικροοργανισμών σε ελεγχόμενες συνθήκες, για την βιοδιάσπαση των οργανικών ρύπων σε απλούστερες και κατά τεκμήριο αβλαβέστερες για το περιβάλλον ενώσεις.²

1.3. Ποιότητα του νερού εκροής και της λάσπης από βιολογικούς καθαρισμούς

Ο αριθμός των οργανικών ενώσεων που έχουν συντεθεί από την αρχή του προηγούμενου αιώνα ξεπερνά το μισό εκατομμύριο και περίπου 10000 νέες ενώσεις προσθέτονται κάθε χρόνο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πολλές από αυτές τις ενώσεις να καταλήγουν στα υγρά αστικά απόβλητα.¹

Πολλοί είναι οι οργανικοί ρυπαντές που έχουν ανιχνευτεί στις αστικές αποχετεύσεις, όπως οι φθαλικοί εστέρες, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και αζωτούχες ενώσεις. Οι πηγές τους είναι πολλές και διαφορετικές. Οι περισσότεροι από τους ρυπαντές προέρχονται από καθημερινά προϊόντα που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος και διαρρέουν κατά τη χρήση τους ή μετά από την απόρριψή τους. Οι ρυπαντές που προέρχονται από βιομηχανικά απόβλητα μπορούν να εκτιμηθούν πολύ εύκολα από τις χημικές ενώσεις στις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται.³

Οι εκπλύσεις των δρόμων των πόλεων συνεισφέρουν επίσης με μεγάλο εύρος ρυπαντών στο σύστημα αποχέτευσης μιας πόλης. Έχουν βρεθεί σημαντικές ποσότητες PAHs στην εκροή όμβριων υδάτων από περιοχή κατοικιών μετά από έρευνα των Ξανθόπουλου και Hahn (1990).³

Μεγάλη ανησυχία προκαλεί τα τελευταία χρόνια η ύπαρξη πτητικών οργανικών ενώσεων (VOC) και πτητικών τοξικών οργανικών ενώσεων (VTOC). Στην Καλιφόρνια για παράδειγμα, η ολική εκπομπή VTOCs από μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων έχει υπολογιστεί στους 800 tons/yr.¹

Το Γραφείο Προστασίας του Περιβάλλοντος της Αμερικής (US Environmental Protection Agency) έχει ορίσει στη νομοθεσία (EPA, 1984) για τα αστικά και βιομηχανικά απόβλητα, ρύπους προτεραιότητας, κρίνοντας από την τοξικότητα που εμφανίζουν τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο υδατικό περιβάλλον. Αυτά διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες: βαρέα μέταλλα και κυανιούχες ενώσεις, πτητικές οργανικές ενώσεις, ημιπτητικές οργανικές ενώσεις και παρασιτοκτόνα και πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs). Ακόμα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η μετατροπή μη τοξικών ενώσεων στα υγρά απόβλητα σε τοξικές χλωριωμένες οργανικές ενώσεις, όπως τα τριαλομεθάνια, κατά τη χρήση χλωρίου για την απολύμανση των αποβλήτων πριν από τη διάθεσή τους.⁴

1.4. Συσσώρευση των ενώσεων αυτών στη λάσπη

Η ιλύς είναι το τελικό προϊόν της επεξεργασίας των αστικών λυμάτων και περιέχει πολλούς από τους ρυπαντές που απομακρύνονται από τα υγρά απόβλητα. Είναι ένα πυκνό αιώρημα στερεών, που αποτελείται κυρίως από οργανική ύλη και οργανικά στερεά θρεπτικής βάσης. Ανάλογα με την επεξεργασία που ακολουθείται μπορεί να έχει τη μορφή λάσπης ή ξηρού στερεού.⁴

Πολλοί από τους οργανικούς ρυπαντές, όπως οι φθαλικοί εστέρες και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) είναι υδροφοβικά μόρια, έτσι προσροφούνται άμεσα στα στερεά με αποτέλεσμα ένα μεγάλο ποσοστό τους να καταβυθίζεται. Η απομάκρυνσή τους από τα απόβλητα εξαρτάται από το μέγεθος

των σωματιδίων στα οποία έχουν ροφηθεί, αφού επηρεάζεται ο ρυθμός καθίζησης, η μεταφορά μάζας, η προσρόφηση, η διάχυση και οι βιοχημικές αντιδράσεις.³

1.5. Τοξικότητα των υγρών και στερεών αποβλήτων

Η διάθεση του νερού εκροής σε επιφανειακά νερά, ποτάμια, λίμνες, εκβολές ποταμών ή στη θάλασσα είναι η συνήθης τακτική που ακολουθείται. Σε μερικές περιπτώσεις είναι δυνατή και η επαναχρησιμοποίηση του νερού για αρδευτικούς κυρίως σκοπούς. Για τη διάθεση της λάσπης οι πιο κοινές λύσεις είναι η αποτέφρωση, η απόθεση μέσα στη γη και η χρήση της ως λίπασμα στις καλλιέργειες. Στα τέλη της δεκαετίας του '80 απαγορεύτηκε η απόθεση της λάσπης στη θάλασσα.¹

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις είναι σημαντικό να υπάρχουν πληροφορίες για την παρουσία των τοξικών οργανικών ρυπαντών, αφού επηρεάζεται άμεσα το φυσικό περιβάλλον και η υγεία του ανθρώπου.¹

Για τον έλεγχο των τοξικών συστατικών της εκροής μπορούν να χρησιμοποιηθούν κριτήρια ειδικά για κάθε τοξική ένωση ξεχωριστά ή συνολικά κριτήρια τοξικότητας. Τα κριτήρια αυτά ορίζονται μετά από εργαστηριακά πειράματα και σκοπό έχουν να προστατεύσουν το υδατικό περιβάλλον από έντονες και χρόνιες τοξικές επιδράσεις, καθώς και τον άνθρωπο από την έκθεση σε αυτές τις ενώσεις. Οι τοξικές επιδράσεις είναι συνάρτηση των συγκεντρώσεων έκθεσης αλλά και της διάρκειας της έκθεσης. Για παράδειγμα, τα επίπεδα ισχυρής τοξικότητας για το υδατικό περιβάλλον δεν πρέπει να υπερβαίνονται ακόμα και σύντομο χρονικό διάστημα π.χ. μία ώρα, αντίθετα, για τα επίπεδα χρόνιας τοξικότητας υπάρχει ανοχή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα που φτάνει υπέρβαση μέσης συγκέντρωσης μέχρι και τεσσάρων ημερών. Γενικά, μελετούνται οι επιδράσεις στον ρυθμό ανάπτυξης, αναπαραγωγής και θανάτου των οργανισμών.¹

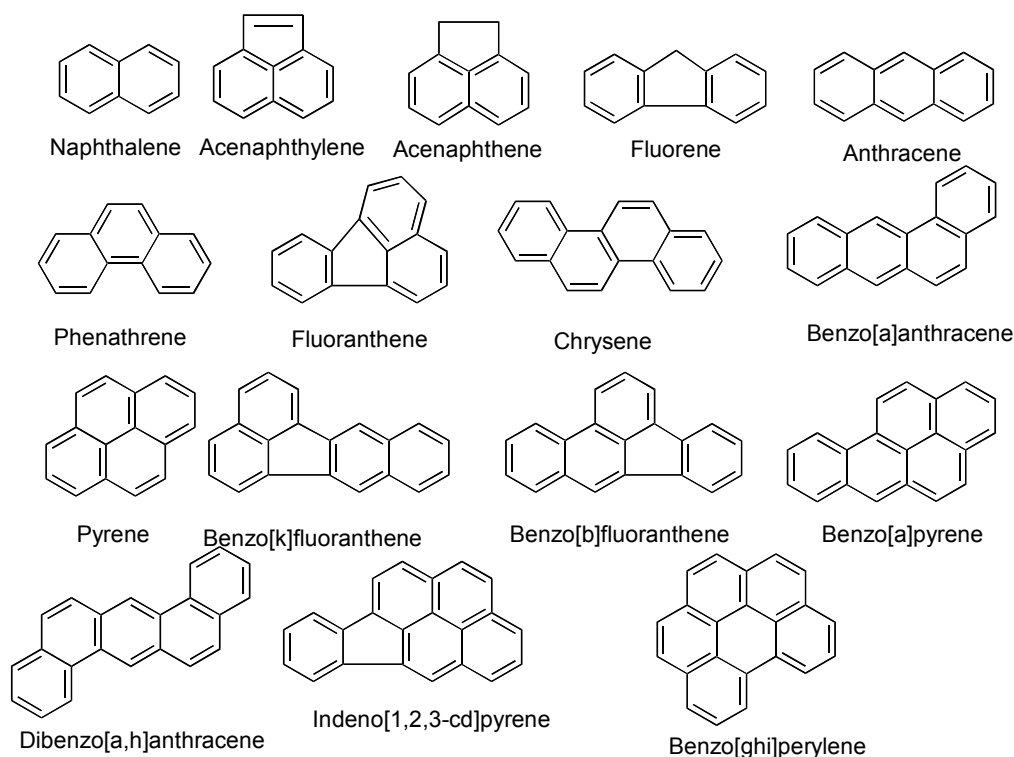
1.6. Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (PAHs)

Μία κατηγορία ενώσεων που εμφανίζεται πολύ συχνά στη λάσπη και στο νερό εκροής από μονάδες βιολογικών καθαρισμών, είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs), στους οποίους έχει δοθεί πολύ μεγάλη σημασία, εξαιτίας της διαπιστωμένης τοξικότητας, δράσης ως μεταλλαξιογόνων και καρκινογεννητικότητας πολλών ενώσεων που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία, ύστερα από πειράματα σε διάφορα είδη ζώων.⁵

Τα PAHs είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από συγχωνευμένους βενζολικούς δακτυλίους. Όταν ένα ζευγάρι ατόμων άνθρακα είναι κοινό, τότε οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που διανέμονται από κοινού θεωρούμε ότι είναι συγχωνευμένοι. Η τελική δομή είναι ένα μόριο, όπου όλα τα άτομα άνθρακα και υδρογόνου βρίσκονται σε ένα επίπεδο. Έτσι προκύπτει μια ποικιλία ενώσεων μεταξύ του ναφθαλενίου (C₁₀H₈) και του κορονετίου (C₂₄H₁₂). Μεταξύ αυτών των ενώσεων υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός PAHs, που διαφέρουν ως προς τον

αριθμό και την θέση των αρωματικών δακτυλίων. Οι διαφοροποιήσεις ως προς τον αριθμό, την θέση και ενδεχομένως την χημεία των ατόμων που αντικαθιστούν άλλα άτομα, βασίζονται στο βασικό σύστημα δακτυλίων. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των PAHs ποικίλλουν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Λόγω του τεράστιου ενδιαφέροντος που υπάρχει για τα PAHs, σχετικά με τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον, έχουν συμπεριληφθεί στις λίστες προτεραιότητας ρυπαντών που έχει συντάξει η EPA (Environmental Protection Agency) των ΗΠΑ αλλά και η Ευρωπαϊκή Ένωση. Η EPA έχει τοποθετήσει στην λίστα προτεραιότητας ρυπαντών 16 PAHs χωρίς υποκατάστατες, ως πολύ επικίνδυνων ενώσεων.⁵

Τα PAHs εισάγονται στο περιβάλλον μέσω των φυσικών και ανθρωπογενών διαδικασιών καύσης. Επομένως οι ποσότητες τους που βρίσκονται σε υδατικά και εδαφικά συστήματα έχουν ένα συστατικό ατμοσφαιρικής προέλευσης. Οι κυριότερες φυσικές πηγές, μέσω των οποίων εισάγονται τα PAHs στην ατμόσφαιρα, είναι οι εκρήξεις ηφαιστειών και οι πυρκαγιές στα δάση και σε μεγάλες πεδιάδες. Σημαντικές ανθρωπογενείς πηγές είναι η καύση φυσικών καυσίμων, η αποτέφρωση απορριμμάτων, η παραγωγή ασφάλτου και άνθρακα, η διύλιση του πετρελαίου, η παραγωγή αλουμινίου, ο εξευγενισμός του λαδιού και άλλες βιομηχανικές δραστηριότητες εξαιτίας ατελούς καύσης.⁵



Σχήμα 1.1. Χημική δομή των 16 πιο σημαντικών PAH που περιέχονται στις λίστες προτεραιότητας ρυπαντών της EPA.⁵

Παρά την ύπαρξη πολλών ανθρωπογενών πηγών στις αστικές και βιομηχανικές περιοχές, τα PAHs απαντώνται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σε αγροτικές και απομακρυσμένες περιοχές, λόγω της ικανότητάς τους να μεταφέρονται σε πολύ μεγάλες αποστάσεις ως αέρια και αεροζόλ και λόγω

της φαινόμενης αντοχή τους στην αποικοδόμηση τους στην ατμόσφαιρα. Γ' αυτόν τον λόγο οι εκπομπές των PAHs σε αστικές και βιομηχανικές περιοχές μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα των παράκτιων νερών καθώς και τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών.⁵

Ύστερα από την είσοδο των PAHs στο υδατικό περιβάλλον, η συμπεριφορά, και η τύχη που θα έχουν εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους. Οι κύριες διεργασίες μέσα στο νερό στις οποίες συμμετέχουν τα PAHs είναι η διάλυση, εξάτμιση, προσρόφηση σε αιωρούμενα στερεά, ιζηματοποίηση, βιοτική και αβιοτική αποδόμηση, πρόσληψη από υδρόβιους οργανισμούς και συσσώρευση.⁵

1.6.1. Πηγές και σημεία εντοπισμού των PAHs, επιφανειακά και υπόγεια νερά-πόσιμο νερό

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες εισάγονται στα επιφανειακά νερά μέσω των ατμοσφαιρικών κατακρημνισμάτων, των αστικών απορροών, από βιομηχανικές εκροές και από διαρροές ή κηλίδες πετρελαίου. Τα ατμοσφαιρικά κατακρημνίσματα περιλαμβάνουν την υγρή και ξηρή απόθεση σωματιδίων και ατμών. Τα PAHs, ως ημιπτητικές οργανικές ενώσεις, συναντώνται τόσο σε αέρια όσο και σε σωματιδιακή μορφή στον αέρα και υπόκεινται σε έκπλυση με τους ατμούς αλλά και με τα σωματίδια κατά τη διάρκεια της κατακρήμνισης.⁵

Η ύπαρξη των PAHs στα υπόγεια νερά προέρχεται από μολυσμένα επιφανειακά νερά, από τις εκροές των γεωργικών αρδεύσεων, από την διήθηση σωματιδίων που προέρχονται από περιοχές διάθεσης στερεών αποβλήτων ή από μολυσμένα εδάφη. Η κίνηση και η μεταφορά των PAHs στα εδαφικά συστήματα καθώς και οι μηχανισμοί διεύθυνσης τους στα υπόγεια νερά παραμένουν ασαφείς.⁵

Η σύσταση του υπόγειου νερού μεταβάλλεται καθώς ρέει μέσω των διαφόρων εδαφικών σωματιδίων και τα PAHs προσροφούνται στα οργανικά στερεά του χώματος. Έχει αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις των PAHs στα υπόγεια νερά που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια είναι δυνατόν να αυξηθούν ύστερα από περιόδους βροχόπτωσης, γεγονός που σημαίνει ότι πραγματοποιείται μια γρήγορη μεταφορά από το νερό της βροχής στο υπόγειο νερό.⁵

Η παρουσία των PAHs στο πόσιμο νερό μπορεί να οφείλεται στην χρήση επιφανειακών ή υπόγειων νερών για κατανάλωση ή στην χρήση σωλήνων, που είναι κατασκευασμένοι από άνθρακα (επίστρωση πίσσας) στα δημόσια δίκτυα ύδρευσης, μιας και αυτό επιτρέπεται σε ορισμένες χώρες. Επίσης από έρευνες έχει προκύψει ότι υψηλότερα επίπεδα PAHs αναμένονται στο πόσιμο νερό που προέρχεται από πηγές, όπως εγκαταστάσεις επεξεργασίας νερού και συστήματα συλλογής του βρόχινου νερού. Η χλωρίωση του πόσιμου νερού, ως τεχνική απολύμανσης, μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό οξυγονωμένων και χλωριωμένων PAHs, ενώσεις που είναι πολύ πιο τοξικές από τα PAHs.⁵

Ανάμεσα στις πολυάριθμες οργανικές ενώσεις που έχουν βρεθεί σε δείγματα πόσιμου νερού, έχει αναφερθεί και η παρουσία PAHs από πολλούς ερευνητές.⁵

2. Τεχνικές προετοιμασίας δείγματος-Τεχνικές μικροεκχύλισης

Σημαντικό ζήτημα είναι τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης μεγάλης ταχύτητας, ακρίβειας, πιστότητας και ευαισθησίας. Παρά τη μεγάλη τεχνολογική πρόοδο, τα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση, δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν την μήτρα των δειγμάτων απευθείας και έτσι ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της προετοιμασίας του δείγματος, είναι απαραίτητο. Για την ανάλυση ιχνοποσοτήτων οργανικών ουσιών, το επιπλέον αυτό στάδιο κυρίως αφορά εκχυλίσεις με σκοπό την απομόνωση των συστατικών που ενδιαφέρουν από τη μήτρα του δείγματος. Τελικά, η συγκέντρωση των ουσιών-στόχων ενδυναμώνεται (εμπλουτισμός) και η παρουσία των συστατικών της μήτρας μειώνεται (καθαρισμός δείγματος).⁶

Η εκχύλιση υγρής φάσης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) είναι μια τεχνική προετοιμασίας δείγματος με πολλές παραλλαγές, στην οποία αναφέρονται πολλές από τις πρότυπες αναλυτικές μεθόδους. Παρά την ευρύτατη χρήση της, θεωρείται χρονοβόρα διαδικασία, με επιτηδευμένη και με πολλά στάδια λειτουργία. Επίσης, προβλήματα σχηματισμού γαλακτωμάτων εμποδίζουν την αυτοματοποίησή της. Περισσότερο σημαντικό είναι βέβαια ότι γίνεται χρήση μεγάλων ποσοτήτων τοξικών οργανικών διαλυτών. Οι μεγάλες αυτές ποσότητες, όχι μόνο επηρεάζουν την ανάλυση όταν πρόκειται για μικροποσότητες αλλά θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του εργαστηριακού προσωπικού. Ακόμα, η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων εργαστηριακών αποβλήτων προσθέτει λειτουργικά έξοδα για την επεξεργασία τους.⁶

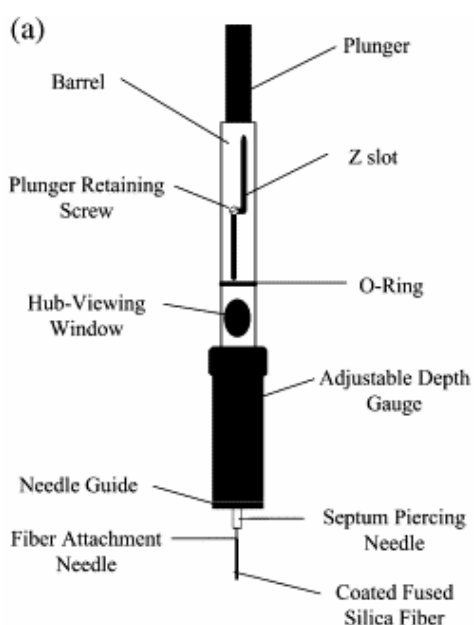
Από τους Arthur και Pawliszyn προτάθηκε η SPME (Solid Phase Microextraction) κατά την οποία μικρή ποσότητα από τον διαλύτη για την εκχύλιση, στηριζόμενη σε στερεή φάση (ίνα), εκτίθεται στο δείγμα. Στη συνέχεια και μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα, γίνεται η ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο (GC) ή σε υγρό χρωματογράφο υψηλής πίεσης (HPLC).⁶

Οι έρευνες των τελευταίων ετών επομένως, οδηγούν στην μινιατουροποίηση της παραδοσιακής τεχνικής LLE, μειώνοντας δραστικά την αναλογία μεταξύ της φάσης του δέκτη και του δότη. Δύο κύριες τεχνικές που προέκυψαν από την εξέλιξη της SPME είναι η SDME (Single Drop Microextraction) και η LPME (Liquid Phase Microextraction). Η SDME χρησιμοποιεί ως φάση δέκτη μια μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη μη αναμίξιμου με το νερό η οποία αιωρείται στο υδατικό διάλυμα του δότη. Πολλά υποσχόμενη τεχνική σε αυτό το πεδίο είναι η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LPME), στην οποία μια κοίλη ίνα που εμβαπτίζεται σε οργανικό διαλύτη χρησιμοποιείται για να προσαρμόσει ή να προστατεύσει τον όγκο της τάξης των μl του διαλύτη-δέκτη.⁶

Συνολικά, οι τεχνικές μικροεκχύλισης αποδεικνύεται ότι είναι γρήγορες αποτελεσματικές και με χαμηλό κόστος τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων εκμηδενίζοντας τη χρήση τοξικών διαλυτών.⁶

2.1. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME)

Μία από τις νέες τεχνικές που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια και έχουν ως αρχή τους τη χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυτών και διαλυμάτων είναι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME). Η τεχνική αυτή μοιάζει με την εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Διαφέρει με την SPE στο ότι το προσροφητικό υλικό βρίσκεται στην επιφάνεια ίνας και όχι πακεταρισμένο σε στήλη ή τοποθετημένο πάνω σε επίπεδο δίσκο. Επίσης, ενώ η SPE είναι μέθοδος εξαντλητικής εκχύλισης και χρησιμοποιείται σε υγρά δείγματα, η SPME βασίζεται στην επίτευξη ισορροπίας, δηλαδή δεν είναι εξαντλητική και ακόμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για αέρια και στερεά δείγματα.⁷



Η νέα τεχνική αυτή εκχύλισης, όπως αναφέρεται και παραπάνω, βασίζεται στο διαχωρισμό του συστατικού στόχου, σε ακινητοποιημένη φάση εκχύλισης. Μετά την επίτευξη ισορροπίας ή με την πάροδο καλά καθορισμένου χρονικού διαστήματος οι ενώσεις που έχουν απορροφηθεί, εκκροφούνται θερμικά με την έκθεση της ίνας στην περιοχή που γίνεται η ένεση του δείγματος σε αέριο χρωματογράφο (GC) ή Υγρό Χρωματογράφο Υψηλής Απόδοσης ώστε να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν.^{8,9}

Σχήμα 2.1. Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευή SPME.⁷

Η μετακίνηση των ενώσεων από το δείγμα στην ίνα ξεκινά μόλις αυτά έρχονται σε επαφή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η εκχύλιση θεωρείται ότι τελειώνει με την επίτευξη συγκέντρωσης ισορροπίας για την υπό ανάλυση ουσία μεταξύ του δείγματος και της επικάλυψης της ίνας. Αυτό σημαίνει ότι όταν το σύστημα φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας η εκχυλιζόμενη ποσότητα είναι σταθερή, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και δεν αλλάζει πλέον με την πάροδο του χρόνου.⁸

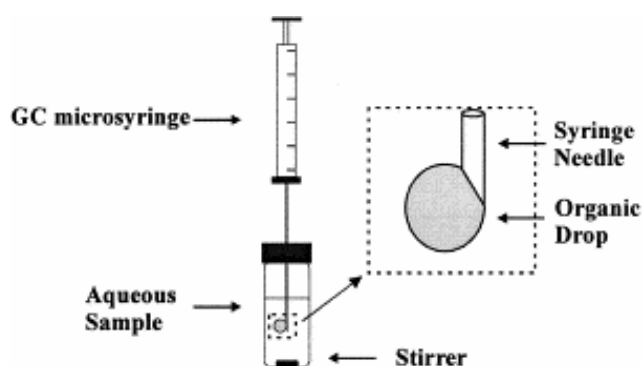
Η SPME αριθμεί ως σήμερα μεγάλη ποσότητα αναφορών σε ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως περιβάλλον, ανάλυση τροφίμων, κλινικές έρευνες και εγκληματολογικές αναλύσεις.⁶

Παρόλα τα θετικά αποτελέσματα που έδωσε η τεχνική αυτή κατά τη δεκαετία εφαρμογής της, σημαντικά είναι και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει και θέτουν περιορισμούς στη χρήση της. τα πιο σπουδαία από αυτά είναι, η

περιορισμένη διάρκεια ζωής των ινών που χρησιμοποιεί, η σχετικά εύθραυστη φύση των ινών αυτών και η πιθανότητα σφαλμάτων εκ μεταφοράς μεταξύ των αναλύσεων.⁶

2.2. Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (SDME)

Μια σημαντική μέθοδος που αναπτύχθηκε από την μικροεκχύλιση με διαλύτη είναι η μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (SDME), όπου το ρόλο του δέκτη έχει μια μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη, μη αναμίξιμου με το νερό, η οποία κρέμεται πάνω από υδατικό διάλυμα (δότης). Αυτό είναι το σύστημα δύο φάσεων. Όταν η μικροσταγόνα έρθει σε επαφή με το υδατικό δείγμα, οι οργανικές ενώσεις μεταφέρονται στην φάση του οργανικού και έτσι επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των ουσιών προς ανάλυση. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, το οποίο έχει καθοριστεί κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, η μικρο-σταγόνα αποσύρεται μέσα στην μικροσύριγγα και μεταφέρεται στον θάλαμο εισαγωγής δειγμάτων ενός GC ή HPLC για ανάλυση. Η SDME, αν και είναι μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος εκχύλισης, παρουσιάζει και κάποια σημαντικά μειονεκτήματα όπως τα ακόλουθα : η εφαρμογή εκτεταμένων χρόνων δειγματοληψίας και μεγάλων ταχυτήτων ανάδευσης έχουν ως αποτέλεσμα πιθανή μετατόπιση και απώλεια της μικροσταγόνας.⁶



Σχήμα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση συστήματος μικροεκχύλισης σταγόνας χωρίς επανεκχύλιση.¹⁰

2.3. Μικροεκχύλιση μεμβράνης

Μια άλλη εκδοχή της μικρο-LLE είναι η μικροεκχύλιση με μεμβράνη. Οι τεχνικές που αναπτύχθηκαν από αυτή την εκδοχή μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες:

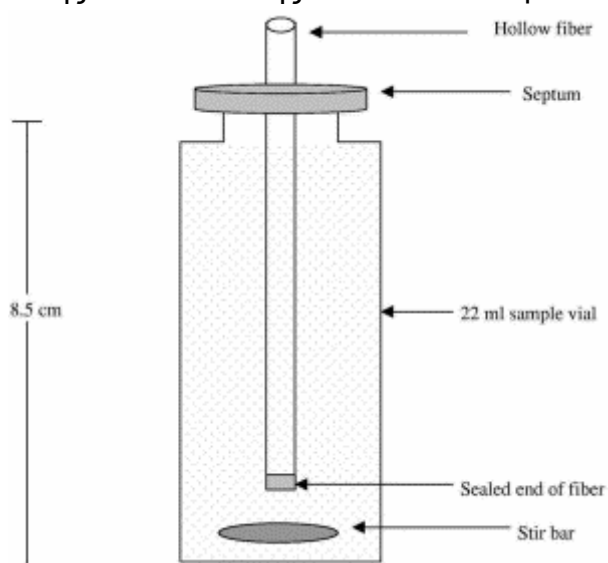
- Τεχνικές πορώδους μεμβράνης, που τα δύο διαλύματα (δότης και δέκτης) βρίσκονται και στις δύο πλευρές της μεμβράνης και είναι σε επαφή μέσω των πόρων της μεμβράνης και
- Τεχνικές μη πορώδους μεμβράνης, όπου η μεμβράνη σχηματίζει μια ξεχωριστή φάση (πολυμερική ή υγρή) ανάμεσα στα διαλύματα δότη και δέκτη.⁶

Μία από τις τεχνικές μη πορώδους μεμβράνης που προέκυψαν, καλείται, τεχνική υποστηριζόμενης υγρής μεμβράνης (supported liquid membrane, SLM) και στηρίζεται στην χρήση των πόρων πολυμερικής μεμβράνης ως στήριγμα στον οργανικό διαλύτη, όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.3. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σύστημα τριών φάσεων και το στρώμα του οργανικού διαλύτη βρίσκεται ανάμεσα στα διαλύματα δότη και δέκτη.⁶

Στην περίπτωση που μια από τις φάσεις (συνήθως ο δέκτης) είναι επίσης οργανικός διαλύτης, θεωρούμε ότι έχουμε σύστημα δύο φάσεων και η τεχνική είναι γνωστή ως υγρή-υγρή εκχύλιση με μεμβράνη μικροπόρων (microporous membrane liquid-liquid extraction, MMLLE).⁶ Η MMLLE μπορεί να συνδεθεί και on-line με αναλυτικά όργανα.¹¹

Η χρήση μεμβρανών παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή εκλεκτικότητα, σχηματισμό καθαρού εκχυλίσματος και υψηλό βαθμό εμπλουτισμού.⁶

Η ανάλυση ιχνοποσοτήτων διευκολύνεται περαιτέρω από την μείωση της κατανάλωσης διαλυτών. Οι μονάδες της πολυμερικής μεμβράνης μπορεί



να είναι επίπεδες ή να έχουν την μορφή κοίλης ίνας και στις περισσότερες τεχνικές γίνεται άμεση σύνδεση των μεμβρανών εκχύλισης με όργανα ανάλυσης. Αν και είναι πολλά τα πλεονεκτήματα του αυτοματισμού, επειδή έχουν αναφερθεί προβλήματα μνήμης λόγω της απευθείας σύνδεσης με όργανα ανάλυσης, τελευταία έχουν αναπτυχθεί μερικές τεχνικές χωρίς να βρίσκονται σε on-line διάταξη. Μία από αυτές είναι η LPME, που αναπτύχθηκε από τους Rasmussen και Pedersen-Bjergaard.⁶

Σχήμα 2.3. Συσκευή για μικροεκχύλιση με κοίλη μεμβράνη.¹¹

2.3.1. Μικροεκχύλιση υγρής φάσης- LPME δύο φάσεων- LPME τριών φάσεων

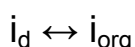
Ο όρος μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid phase microextraction, LPME) εισήχθη αρχικά για να περιγράψει το διφασικό σύστημα στην μικροεκχύλιση διαλυτών. Στη συνέχεια επικράτησε να χρησιμοποιείται στις διατάξεις που ανέπτυξαν οι Rasmussen και Pedersen-Bjergaard.⁶

Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης χρησιμοποιεί πορώδεις υδροφοβικές ίνες (hollow fibers) οι οποίες είναι εμποτισμένες με οργανική φάση για την δημιουργία των συστημάτων SLM και MMLLE. Η μέθοδος αυτή που προέκυψε θεωρήθηκε η εξέλιξη των μεθόδων μικροεκχύλισης με διαλύτη, καθώς προσθέτει ένα φιλμ προστασίας σε συστήματα μικροσταγόνας και ενισχύει την δημιουργία υγρών

φιλμ που δεν αναμιγνύονται με το νερό. Αυτή η νέα μέθοδος μικροεκχύλισης αποδείχθηκε πολύ καλή εναλλακτική επιλογή, αφού εκτός του ότι είναι απλή, φθηνή, γρήγορη και χρησιμοποιεί μικρές ποσότητες διαλυτών, εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία και επειδή η κοίλη ίνα απορρίπτεται μετά από κάθε χρήση περιορίσει στο ελάχιστο την πιθανότητα σφαλμάτων εκ μεταφοράς μεταξύ των αναλύσεων. Υπάρχουν δύο διατάξεις με τις οποίες εφαρμόζεται η LPME, η διάταξη δύο φάσεων και αυτή των τριών φάσεων, όπως περιγράφονται παρακάτω.⁶

Στην δύο φάσεων LPME, ο αναλύτης (συστατικό-στόχος) *i*, εκχυλίζεται από υδατικό διάλυμα (δότης), μέσω διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το νερό και ο οποίος είναι σταθεροποιημένος στους πόρους της κοίλης ίνας, σε ίδιο διαλύτη με τον σταθεροποιημένο που βρίσκεται στο εσωτερικό της κοίλης ίνας (δέκτης).⁶

Η διαδικασία της εκχύλισης φαίνεται παρακάτω:



αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζεται από την σταθερά (ή θερμοδυναμικό συντελεστή) κατανομής $K_{org/d}$ που ορίζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων του αναλύτη *i* στους δύο διαλύτες μετά από την αποκατάσταση της ισορροπίας και είναι σταθερός για καθορισμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας.⁶

Επομένως, εμφανές είναι ότι για να είναι πετυχημένη η εφαρμογή της LPME δύο φάσεων, απαιτούνται μεγάλες τιμές σταθερών $K_{org/d}$. Τέτοιες τιμές αντιστοιχούν σε μέτρια ή πολύ υδροφοβικές ενώσεις που έχουν όξινες ή βασικές ομάδες ή σε ουδέτερες ενώσεις με ισοδύναμη υδροφοβικότητα.⁶

Κάτι που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι η LPME δύο φάσεων δίνει εκχύλισμα σε οργανική φάση, συμβατό με αναλυτικές τεχνικές όπως η GC και η HPLC.⁶

Στην LPME τριών φάσεων, ο αναλύτης *i*, εκχυλίζεται από την υδατική φάση (διάλυμα δότης) μέσω οργανικού διαλύματος που είναι σταθεροποιημένο μέσα στους πόρους κοίλης ίνας (οργανική φάση), σε άλλη υδατική φάση (διάλυμα δέκτης), στο εσωτερικό της ίνας. Στην περίπτωση αυτή, η οργανική φάση αποτελεί ένα φράγμα μεταξύ των δύο φάσεων, δότη και δέκτη, έτσι ώστε να μην υπάρχει ανάμιξή τους. Αφού το τελικό διάλυμα είναι υδατικό, η τριών φάσεων LPME, συνδυάζεται συνήθως με HPLC ή με σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (capillary electrophoresis, CE).⁶

Η LPME τριών φάσεων, για έναν αναλύτη *i*, μπορεί να παρασταθεί ως εξής:

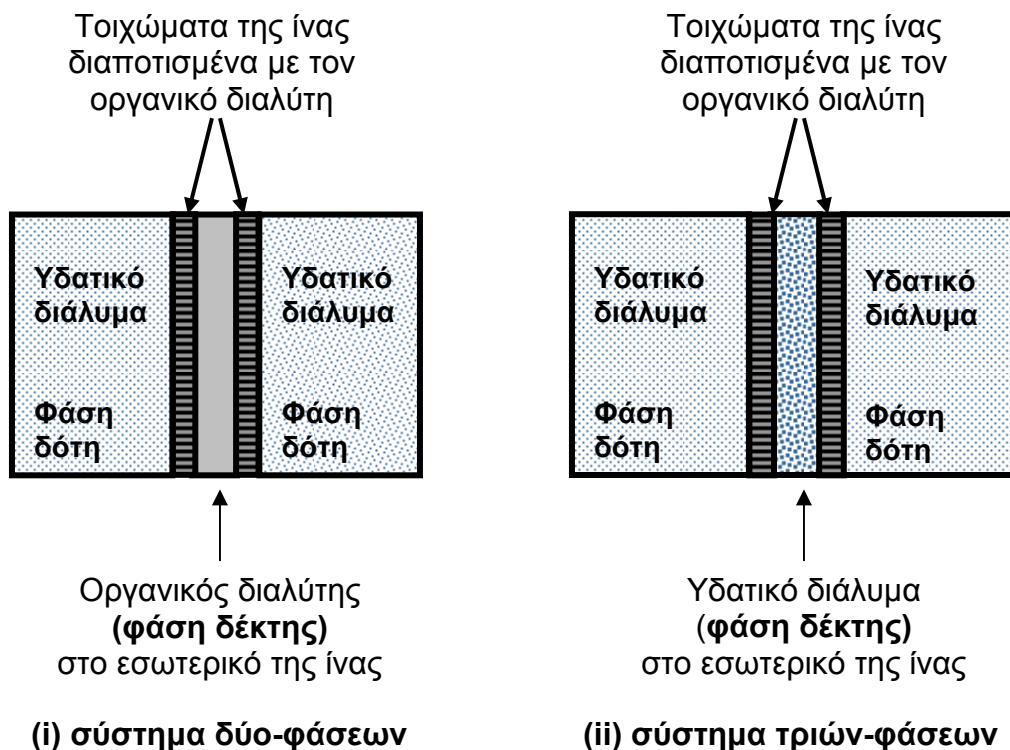


στην περίπτωση αυτή εμφανίζονται δύο σταθερές κατανομής, η $K_{org/d}$ και η $K_{a/org}$, που είναι αντίστοιχα οι σταθερές μεταξύ της οργανικής φάσης και του δότη και μεταξύ του δέκτη και της οργανικής φάσης. Η συνολική σταθερά κατανομής βρίσκεται από το γινόμενο των επιμέρους σταθερών, δηλαδή:

$$K_{a/d} = K_{org/d} \cdot K_{a/org}$$

Η κατάλληλη ρύθμιση της σύνθεσης της των φάσεων δέκτη και δότη, είναι πολύ σημαντική για να πετύχει η LPME τριών φάσεων. Μεγάλες τιμές $K_{a/d}$ (>>1), μπορούν να επιτευχθούν όταν οι αναλύτες στη φάση του δέκτη εμπλέκονται σε

αντιδράσεις, όπως η πρωτονίωση και η συμπλοκοποίηση δίνοντας ενώσεις που έχουν μικρή συγγένεια με την οργανική φάση.⁶



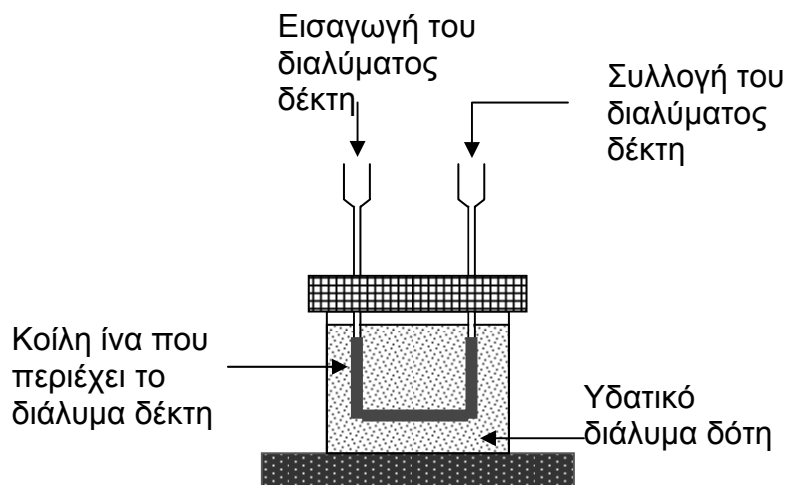
Σχήμα 2.4. Τομή του εσωτερικού της κοίλης ίνας στο υδατικό διάλυμα στη (i) δύο φάσεων και (ii) τριών φάσεων LPME.⁶

2.3.1.1. Διατάξεις της ίνας για τις LPME δύο και τριών φάσεων

Υπάρχουν δύο διαφορετικές διατάξεις της ίνας για την πραγματοποίηση της LPME δύο και τριών φάσεων όπως φαίνεται και στο σχήμα.⁶

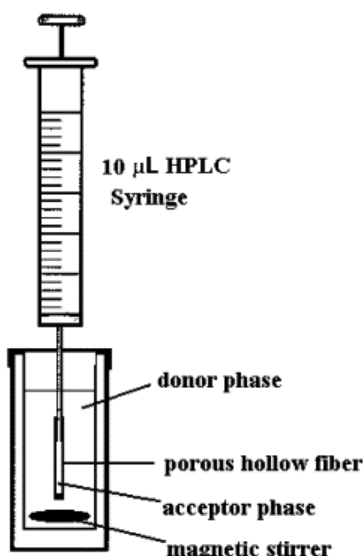
Στην πρώτη διάταξη, δύο κοινές ιατρικές βελόνες σύριγγας περνούν μέσα από ένα ελαστικό διάφραγμα (septum) και τα δύο άκρα συνδέονται με ένα κομμάτι κοίλης ίνας. Το μήκος της ίνας ποικίλει από 4cm ως 8cm, για μεγαλύτερου μήκους ίνες (από 8cm μέχρι 27cm) χρησιμοποιείται στήριγμα γύρω από το οποίο τυλίγεται η ίνα.⁶

Τόσο στην δύο φάσεων, όσο και στην τριών φάσεων LPME, η ίνα πρέπει να εμβαπτιστεί αρχικά για μερικά δευτερόλεπτα στον οργανικό διαλύτη, ώστε να σταθεροποιηθεί αυτός στους πόρους της ίνας. Στη συνέχεια η ίνα τοποθετείται μέσα στο διάλυμα δότη και ο διαλύτης δέκτης ωθείται στο εσωτερικό της ίνας με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας. Όταν ολοκληρωθεί η εκχύλιση το διάλυμα δέκτης συλλέγεται σε μικροφιαλίδια ή αποτραβιέται με τη σύριγγα και οδηγείται για ανάλυση στην αναλυτική συσκευή.⁶



Σχήμα 2.5. Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης της ίνας, όταν δύο σύριγγες συνδέονται σε κάθε άκρο της κοίλης ίνας.⁶

Στην δεύτερη διάταξη, μόνο η μία άκρη της ίνας χρησιμοποιείται για την ένεση και την συλλογή του διαλύτη δέκτη, ενώ η άλλη βρίσκεται ελεύθερη μέσα στο διάλυμα δότη. Η μικροσύριγγα σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται για την στήριξη της ίνας αλλά και για την εισαγωγή του διαλύματος δότη καθώς και την απομάκρυνσή του στη συνέχεια. Ένας άλλος τρόπος για την πραγματοποίηση της διάταξης αυτής είναι με τη χρήση δοχείου με ελαστικό πώμα ως υποστηρικτικό της ίνας. Σε αυτή την περίπτωση μεταλλικό σωληνοειδές εξάρτημα προσαρμόζεται στο κέντρο του ελαστικού διαφράγματος ώστε να βοηθήσει την εισαγωγή της ίνας σε αυτό.⁶



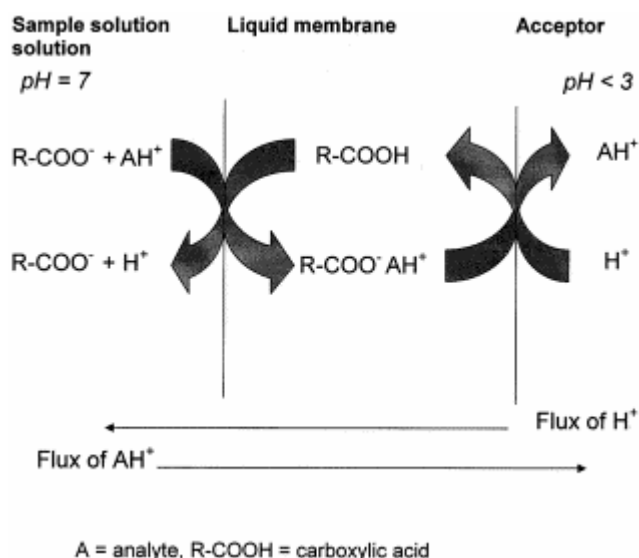
Σχήμα 2.6. Διάταξη με μικροσύριγγα για την στήριξη της ίνας, εισαγωγή και συλλογή του διαλύτη-δέκτη και την εισαγωγή δείγματος σε αναλυτικά όργανα.⁶

Γενικά όταν χρησιμοποιείται η δεύτερη διάταξη, το ελεύθερο άκρο της ίνας μπορεί να σφραγιστεί με εφαρμογή φλόγας και πάντα πριν την είσοδό της στο διάλυμα δότη πρέπει να εμποτίζεται από το διάλυμα δέκτη.⁶

2.3.1.2. Διάταξη LPME ενεργού μεταφοράς

Τόσο η δύο, όσο και η τριών φάσεων LPME στηρίζονται στη διάχυση των ενώσεων από το ένα διάλυμα στο άλλο, ανάλογα με τους συντελεστές κατανομής. Πάντως, πολλές ενώσεις έχουν τέτοια χημική φύση που δεν επιτρέπει μεγάλες τιμές στους συντελεστές κατανομής. Η εκχύλιση τους λοιπόν με αυτόν τον τρόπο είναι ελλιπή.¹²

Σε αυτές τις περιπτώσεις εκχύλιση LPME με τη χρήση κοίλης ίνας, μπορεί να επιτευχθεί με διάταξη ενεργού μεταφοράς, στην οποία ένας μεταφορέας προστίθεται στο δείγμα. Ο μεταφορέας αυτός είναι μια σχετικά υδροφοβική ένωση,



ιοντικού ζεύγους όμως, για να έχει ικανοποιητική διαλυτότητα στο νερό. Στο διάλυμα του δείγματος αυτές οι ενώσεις σχηματίζουν ιονικά ζεύγη με τις υπό εκχύλιση ενώσεις και ακολουθεί η εκχύλιση τους με αυτή τη μορφή, στην οργανική φάση στους πόρους της ίνας. Εκεί οι αναλύτες απελευθερώνονται προς το διάλυμα δέκτη. Τα αντισταθμιστικά ιόντα από το διάλυμα δέκτη στη συνέχεια, σχηματίζουν νέα ιονικά ζεύγη με τον μεταφορέα ο οποίος επανεκχυλίζεται στο δείγμα.¹²

Σχήμα 2.7. Βασικές αρχές της ενεργής μεταφοράς στην LPME¹²

2.3.1.3. Διάταξη δυναμικής LPME

Τα τρία παραπάνω συστήματα που περιγράφονται, αποτελούν στατικά συστήματα μικροεκχύλισης. Η LPME μπορεί να πραγματοποιηθεί και με δυναμικό σύστημα. Η διάταξη είναι ίδια όπως στο σχήμα 2.7 και μπορεί να είναι δύο ή τριών φάσεων. Η διαφορά τους είναι ότι στην περίπτωση αυτή γίνεται επαναλαμβανόμενη εισαγωγή και εξαγωγή μικρών όγκων από το δείγμα στο εσωτερικό της κοίλης ίνας. Κατά την είσοδο του υδατικού δείγματος, σχηματίζεται λεπτό υμένιο οργανικού διαλύματος στην επιφάνεια του εσωτερικού της κοίλης ίνας, το οποίο εκχυλίζει έντονα τις ενώσεις από το δείγμα. Στη συνέχεια, η επαναφορά του οργανικού διαλύματος μέσα στην ίνα, έχει σαν αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του υμενίου και των εκχυλισμένων ενώσεων στον κύριο όγκο του οργανικού διαλύματος.¹²

Με τον ίδιο τρόπο η δυναμική LPME εφαρμόζεται και για την τριών φάσεων διάταξη. Στη μικροσύριγγα πρώτα εισάγεται ποσότητα υδατικού διαλύματος

(acceptor solution) και στη συνέχεια με την οργανική φάση. Με πολλές επαναλήψεις της διαδικασίας αυτής, η εκχύλιση έχει γίνει τελικά πιο γρήγορα.¹²

2.3.2. Βελτιστοποίηση μεθόδου. Παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της LPME

2.3.2.1. Επιλογή της ίνας (hollow fiber)

Οι ίνες που χρησιμοποιούνται στην LPME πρέπει να είναι αρκετά υδρόφοβες όσο και συμβατές με τον οργανικό διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί. Σε όλες τις αναφορές που έχουν δημοσιευθεί αναφέρεται η χρήση τριχοειδών μεμβρανών από πολυπροπυλένιο (PP). Ο πιο συνηθισμένος τύπος αυτών των ινών έχει εσωτερική διάμετρο της τάξης των 600μm που είναι συμβατή με τα μl του όγκου του δέκτη που απαιτείται για την μικροεκχύλιση. Το πάχος των τοιχωμάτων (200μm) παρέχει μηχανική σταθερότητα και απλοποιεί την προετοιμασία για εκχύλιση. Τέλος το ονομαστικό και το μέγιστο μέγεθος των πόρων (0.2μm και 0.64μm αντίστοιχα) των τριχοειδών μεμβρανών εξασφαλίζει αποτελεσματικό μικροφιλτράρισμα, μια και επιτρέπει την διείσδυση μέσω των πόρων της ίνας μόνο των μικρών μορίων (συστατικών-στόχων).⁶

2.3.2.2. Επιλογή του διαλύτη

Πολύ σημαντικό βήμα στην βελτιστοποίηση της μεθόδου και για τις δύο εκδοχές της LPME (δύο ή τριών φάσεων), είναι η επιλογή του καταλληλότερου διαλύτη. Πρέπει να δοκιμάζονται διάφοροι μη-υδατοδιαλυτοί διαλύτες που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την πολικότητα και την διαλυτότητα τους στο νερό. Επίσης είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών.⁶

Η τελική επιλογή του οργανικού διαλύτη πρέπει να ικανοποιεί διάφορες απαιτήσεις. Θα πρέπει να έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ώστε να αποφεύγεται η διάλυση στην υδατική φάση και χαμηλή πτητικότητα, έτσι ώστε να περιορίζεται η εξάτμιση του κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Επιπλέον στην LPME δύο φάσεων, θα πρέπει να παρέχει υψηλή διαλυτότητα για τις προσδιοριζόμενες ουσίες, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη εκχύλιση. Στις περιπτώσεις που η LPME δύο φάσεων συνδέεται με αέριο χρωματογράφο (GC), ο οργανικός διαλύτης πρέπει να έχει εξαιρετική χρωματογραφική συμπεριφορά. Στην LPME τριών φάσεων ο διαλύτης που θα επιλέξουμε θα πρέπει να εξασφαλίζει υψηλές τιμές για τον συντελεστή $K_{org/d}$ και κυρίως για τον $K_{a/org}$. Τέλος, ο διαλύτης θα πρέπει να έχει τέτοια πολικότητα που να ταιριάζει με αυτήν της ίνας από πολυπροπυλένιο, ώστε να μπορεί εύκολα να ακινητοποιηθεί στους πόρους της. Μεγάλη σημασία έχει ο εμποτισμός της ίνας με διαλύτη, καθώς η εκχύλιση πραγματοποιείται στην επιφάνεια του ακινητοποιημένου διαλύτη.⁶

2.3.2.3. Ανάδευση του δείγματος.

Η ανάδευση του δείγματος είναι απαραίτητη για την επιτάχυνση της κινητικής της εκχύλισης. Με αύξηση του ρυθμού ανάδευσης στο διάλυμα δότη η εκχύλιση

ενισχύεται καθώς η διάχυση των συστατικών μέσα στη διεπιφάνεια της κοίλης ίνας υποβοηθάται και ακόμα, βελτιώνεται η επαναληψιμότητα της εκχύλισης.⁶

Στην LPME το διάλυμα του δέκτη προστατεύεται μέσα στην κοίλη ίνα και μπορούμε να εφαρμόσουμε πολύ υψηλές ταχύτητες ανάδευσης. Τόσο στην LPME δύο φάσεων όσο και στην LPME τριών φάσεων, η χρήση μαγνητικού αναδευτήρα ή δόνησης αυξάνει σημαντικά την εκχύλιση. Η ανάδευση με δόνηση έχει το πλεονέκτημα να εξουδετερώνει την πιθανότητα της μόλυνσης του δείγματος που παρατηρείται όταν χρησιμοποιούνται μαγνητικοί αναδευτήρες καλυμμένοι από Teflon. Όταν χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του δείγματος, η χρήση της μέγιστης ταχύτητας ανάδευσης προκαλεί το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα, οι οποίες έχουν την τάση να προσκολλώνται στην επιφάνεια της κοίλης ίνας. Αυτές οι φυσαλίδες αέρα επιταχύνουν την εξάτμιση του διαλύτη και συμβάλλουν στην εξαγωγή ανακριβών μετρήσεων.⁶

2.3.2.4. Προσθήκη άλατος

Ανάλογα με τη φύση των ουσιών-στόχων, η προσθήκη άλατος στο δείγμα προς εκχύλιση, μπορεί να μειώσει την διαλυτότητά τους και επομένως να ενισχύσει την εκχύλιση εξαιτίας του φαινομένου της εξαλάτωσης (salting-out effect). Στις τεχνικές LPME, οι επιδράσεις της προσθήκης άλατος στο διάλυμα του δότη, πριν από την εκχύλιση, έχουν μελετηθεί. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανάλογα με το είδος των ουσιών-στόχων, η αύξηση της ιοντικής ισχύς του υδατικού διαλύματος μπορεί να έχει διάφορες συνέπειες στη εκχύλιση : μπορεί να την αυξήσει, να μη την επηρεάσει ή ακόμα και να την περιορίσει.⁶

2.3.2.5. Επίδραση της σχέσης των όγκων του διαλύματος δότη και δέκτη.

Οι όγκοι των διαλυμάτων δότη και δέκτη που θα επιλεγθούν είναι πολύ μεγάλης σημασίας. Γενικά η ευαισθησία της μεθόδου τόσο στη δύο όσο και στην τριών φάσεων LPME μπορεί να αυξηθεί μειώνοντας τον λόγο των όγκων δέκτη-δότη διαλύματος. Πάντως ο όγκος του διαλύματος δέκτη μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με την αναλυτική τεχνική που ακολουθεί. Για παράδειγμα, όταν ακολουθεί HPLC μπορούν να γίνουν ενέσεις των 10-25 μl και έτσι όλη η ποσότητα της φάσης του δέκτη μπορεί να αναλυθεί εξασφαλίζοντας χαμηλότερα όρια ανίχνευσης.⁶

2.3.2.6. Ρύθμιση του pH.

Η ρύθμιση του pH μπορεί να αυξήσει την εκχύλιση καθώς η μετατόπιση της ισορροπίας σχετίζεται με την διαλυτότητα των όξινων/βασικών συστατικών-στόχων. Στην LPME δύο φάσεων αλλά και στην τριών φάσεων έχει αποδειχτεί ότι η αλλαγή του pH στο υδατικό διάλυμα του δότη προκαλεί μεγαλύτερη προσυγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας.⁶

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, στην LPME τριών φάσεων, ο καθορισμός της σύστασης των φάσεων του δότη και του δέκτη έχει πολύ μεγάλη σημασία, μιας και οδηγεί σε αυξημένους λόγους κατανομής και διασφαλίζει υψηλούς συντελεστές εμπλουτισμού και ανάκτησης για τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Αυτό συνήθως γίνεται με την ρύθμιση του pH στο υδατικό διάλυμα και στο διάλυμα του δότη. Για παράδειγμα όταν μελετούμε όξινες ενώσεις, το pH του υδατικού διαλύματος του δότη ρυθμίζεται στην όξινη περιοχή τιμών, ώστε να αποφορτιστούν οι κύριες ενώσεις, να μειωθεί έτσι η διαλυτότητα τους μέσα στο δείγμα και να εξασφαλιστεί αποτελεσματική μεταφορά στην οργανική φάση. Στην συνέχεια, για να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός των προσδιοριζόμενων ουσιών στην οργανική φάση και να διασφαλιστεί η επιτυχία της εκχύλισης, το pH του διαλύματος του δέκτη ρυθμίζεται στην βασική περιοχή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον ιονισμό των ουσιών-στόχων και εξασφαλίζει μεγάλη διαλυτότητα των ενώσεων στην φάση του δέκτη από ότι στην οργανική φάση.⁶

2.3.2.7. Διάρκεια της εκχύλισης.

Η μεταφορά της μάζας είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από τον χρόνο και ο ρυθμός της μειώνεται όσο το σύστημα πλησιάζει τις συνθήκες ισορροπίας. Ανεξάρτητα αν η εκχύλιση είναι πλήρης ή χρησιμοποιείται ως τεχνική προσυγκέντρωσης, η ισορροπία επιτυγχάνεται ύστερα από έκθεση του διαλύματος του δέκτη στο δείγμα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου είναι επομένως σημαντική η εύρεση των χρόνων εκχύλισης των ενώσεων-στόχων, έτσι ώστε να βρούμε τον χρόνο στον οποίο επιτυγχάνεται πρακτικά η ισορροπία. Αν και αυξημένοι χρόνοι έκθεσης του διαλύματος του δέκτη συμβάλλουν στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, δεν είναι πάντοτε πρακτική η εφαρμογή μεγάλων χρόνων εκχύλισης. Συνήθως επιλέγουμε χρόνους μικρότερους από τον χρόνο χρωματογραφίας, για να εξασφαλίσουμε υψηλό ρυθμό αναλύσεων. Πάντως πρέπει να αναφερθεί ότι όταν εργαζόμαστε στο τμήμα ανόδου όπως δείχνουν τα γραφήματα των χρόνων εκχύλισης, είναι απαραίτητη η σταθερή και ακριβής τήρηση των χρόνων για να έχουμε καλής ακρίβειας αποτελέσματα. Σε μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένοι χρόνοι εκχύλισης, ταυτόχρονη εκχύλιση μεγάλου αριθμού δειγμάτων βοήθησε στο να υπάρχει μεγάλος αριθμός αναλύσεων δειγμάτων ανά ώρα.⁶

2.3.3. Εφαρμογές της LPME. Βιοϊατρική και ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων και τροφίμων

Μεγάλος αριθμός εφαρμογών της LPME αφορά τον προσδιορισμό διάφορων ουσιών σε βιολογικά υγρά όπως στο αίμα, στο πλάσμα του αίματος, την ουρία και το σάλιο. Η μέθοδος της μικροεκχύλισης σε σύζευξη με αναλυτικά όργανα όπως GC, CE και HPLC, δίνει όρια ανίχνευσης της τάξης των $\mu\text{l/l}$, ακόμα και όταν γίνεται εκχύλιση μικρών όγκων βιολογικών δειγμάτων εξαιτίας του επαρκούς εμπλουτισμού στους αναλύτες. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην τεχνική της LPME βρέθηκε ότι παρέχουν άριστη εκχύλιση των ουσιών στόχων, χωρίς να επιτρέπουν

την είσοδο στη φάση του δέκτη μακρομορίων και άλλων συστατικών που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανάλυση.⁶

Η διάταξη Α στην LPME δύο φάσεων αλλά και η διάταξη Β έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε αυτές τις εφαρμογές αλλά η πλειοψηφία των βιοϊατρικών εφαρμογών χρησιμοποιεί την τριών φάσεων LPME καθώς τα περισσότερα φάρμακα έχουν χαμηλή τιμή σταθεράς $K_{org/d}$. Στον Πίνακα 2.1. φαίνονται οι βιοϊατρικές εφαρμογές και οι κύριες πειραματικές συνθήκες τους. Τελευταία, η τεχνική εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό ζιζανιοκτόνων με φαίνοξυ ομάδα στον μοριακό τους τύπο στο βοδινό γάλα.⁶

Η εφαρμογή της LPME στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, στον προσδιορισμό ρύπων σε διάφορα δείγματα έχει ως αποτέλεσμα, υψηλό εμπλουτισμό των προσδιοριζόμενων ουσιών που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως και μεγάλη εκλεκτικότητα λόγω της ικανότητας της ίνας να μην επιτρέπει την εκχύλιση μεγάλων μορίων και αιωρούμενης ύλης. Σε όλες τις δημοσιεύσεις στον τομέα του περιβάλλοντος γίνεται χρήση της διάταξης Β για την κοίλη ίνα. Η επιλογή ανάμεσα στη δύο ή τριών φάσεων LPME εξαρτάται από τη χημική φύση των ουσιών-στόχων. Σε όλες τις αναφορές, τα ανεπτυγμένα πρότυπα έδειξαν ότι είναι γρήγορα, ακριβή, ευαίσθητα και χαμηλού κόστους τεχνικές προετοιμασίας δείγματος που δίνουν μεγάλους συντελεστές εμπλουτισμού και επαρκή καθαρισμό δείγματος ακόμα και σε σύνθετες μήτρες δειγμάτων. Όλες οι περιβαλλοντικές εφαρμογές που έχουν δημοσιευθεί φαίνονται στον Πίνακα 2.1. και είναι συνεχώς αυξανόμενες.⁶

Οι εφαρμογές τις LPME αυξήθηκαν ραγδαία και προς την κατεύθυνση της ανάλυσης τροφίμων και ειδικά στην ανίχνευση ζιζανιοκτόνων στο βοδινό γάλα, όπως φαίνεται στον πίνακα 2.1.⁶

Πίνακας 2.1. Κύριες βιοϊατρικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές της τεχνικής LPME.¹¹

Type of analyte	Matrix	LPME system
Drug analysis		
Anti-arrhythmics	Plasma	Active transport
Anti-hypertensives	Water	Three-phase static
Beta-blocking agents	Water	Three-phase static
Anti-inflammatory agents	Urine	Three-phase static
Analgesics	Plasma, urine	Three-phase static, two-phase static, active transport
Psycholeptics	Water	Three-phase static
Anxiolytics	Plasma, Urine	Two-phase static
Psychoanaleptics	Plasma, whole blood, breast milk	Three-phase static
Opium alkaloids	Water	Three-phase static
Antihistamines	Plasma, Urine	Three-phase static, two-phase static
Drugs of abuse	Plasma, Urine, whole blood, saliva	Three-phase static, two-phase static
Drug metabolites	Plasma, Urine	Three-phase static
Environmental analysis		
Anilines	Water	
Aromatic amines	Tapwater, surface water	Three-phase dynamic
Nitrophenols	Seawater	Three-phase static
Organochlorine pesticides	Seawater, pond water, soil	Two-phase static
Phenols	Water	Two-phase dynamic
		Three-phase static, two-phase dynamic
Phenoxy herbicides	Bovine milk	Three-phase static
Polyaromatic hydrocarbons	Water, soil	Three-phase static, two-phase static, three-phase dynamic
Triazine herbicides	Soil	Two-phase static
miscellaneous	Surface water	Two-phase static

3. Χρωματογραφική ανάλυση

3.1. Εισαγωγή

Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών στα συστατικά τους, με διαδοχικές εκλεκτικές δεσμεύσεις και αποδεσμεύσεις αυτών από επιφάνεια στερεής ή στατικής υγρής φάσης με τη βοήθεια ρευστού κινούμενου κατά μία διεύθυνση (κινητή φάση). Η κινητή φάση καθώς διέρχεται από την στατική προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος.^{13,14}

Οι διάφορες μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρό ή αέριο) ή της στατικής φάσης (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα), ως προς τον μηχανισμό διαχωρισμού (προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή) και ως προς την μορφή της στατικής φάσης (στήλη, λεπτή στιβάδα πάνω σε πλάκα ύαλου ή χάρτου).¹³

Πίνακας 3.1. Αρχές χρωματογραφικού διαχωρισμού.¹³

<i>Αρχή διαχωρισμού</i>	<i>Διάταξη</i>	<i>Χρωματογραφική τεχνική</i>
Προσρόφηση	Στήλη	Υγρή Χρωματογραφία (LC)
		Αέρια Χρωματογραφία (GC)
		Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)
Κατανομή	Στήλη	Υπερκρίσιμη Ρευστή Χρωματογραφία Χρωματογραφία αερίου-υγρού
	Επίπεδη	Χρωματογραφία Χάρτου Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας
Ιοντοανταλλαγή	Στήλη	Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής
Μηχανικός Διαχωρισμός	Στήλη	Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού
Βιοσυγγένεια	Στήλη	Χρωματογραφία Συγγένειας

Στην αέρια χρωματογραφία η κινούμενη φάση είναι αέρια και ανάλογα τη στατική φάση, διακρίνεται στην αέρια-στερεή (G.S.C.) και στην αέρια-υγρή (G.L.C.).¹³

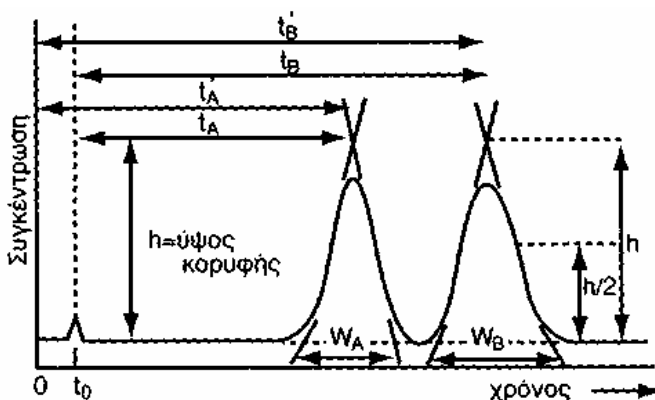
Από τους δύο αυτούς τύπους χρωματογραφίας η G.S.C. χρησιμοποιείται σε αναλύσεις αέριων δειγμάτων σε στήλες προσρόφησης, ενώ υγρά και πτητικά στερεά διαχωρίζονται με την G.L.C. σε στήλες κατανομής.¹⁴

Στην αέρια-υγρή χρωματογραφία (ή απλά αέρια χρωματογραφία), ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από την στήλη με διαφορετικές ταχύτητες που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και

από τις αλληλεπιδράσεις τους με την υγρή στατική φάση.¹³ Η παραπάνω τεχνική αναφέρεται ως χρωματογραφία έκλουσης.^{15,16}

3.2. Βασικοί ορισμοί χρωματογραφήματος

Χρωματογράφημα είναι η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου ή του όγκου του φέροντος αερίου. Στο σχήμα 3.1 φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα:



Σχήμα 3.1. Γενική μορφή χρωματογραφήματος, με τις παραμέτρους που περιγράφουν τις κορυφές του.¹³

Ο χρόνος ανάσχεσης (retention time, t_R), βασική μεταβλητή, είναι ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ της ένεσης του δείγματος στη στήλη και της εμφάνισης της ουσίας (εμφάνιση του μεγίστου της κορυφής), υπό καθορισμένες συνθήκες. Ο νεκρός χρόνος (dead time, t_M), είναι ο απαιτούμενος χρόνος για την διέλευση αδρανούς αερίου από την στήλη, χωρίς να συγκρατείται από αυτή. Ακόμα χρησιμοποιείται και ο όγκος ανάσχεσης (retention volume) που είναι ο απαιτούμενος όγκος φέροντος αερίου για την έκλυση μιας ουσίας και δίνεται από την σχέση: $V_R = t_R \times F_C$.¹³

Για πρακτικούς σκοπούς χρησιμοποιείται ο ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης (adjusted retention time, t_R') $t_R' = t_R - t_M$. Επίσης ανάλογα χρησιμοποιείται και ο ανηγμένος όγκος ανάσχεσης (adjusted retention volume) $V_R' = V_R - V_M$, χαρακτηριστική παράμετρος για μια ουσία και για δεδομένη στήλη με το πλεονέκτημα ότι είναι ανεξάρτητη της παροχής της κινητής φάσης. Το V_M είναι ο νεκρός όγκος (hold-up volume) της στήλης, ίσος προς το γινόμενο του t_M επί την ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου: $V_M = t_M \times F_C$.¹³

Πολλές φορές χρησιμοποιείται ο διορθωμένος όγκος ανάσχεσης V_R^0 (corrected retention volume), $V_R^0 = j \times V_R$, όπου j συντελεστής διόρθωσης της πίεσης, λόγω της μεταβολής της πίεσης κατά την είσοδο του φέροντος αερίου στη στήλη.¹³

Άλλες σημαντικές παράμετροι που φαίνονται στο σχήμα είναι το ύψος κορυφής h και το εύρος κορυφής w .¹³

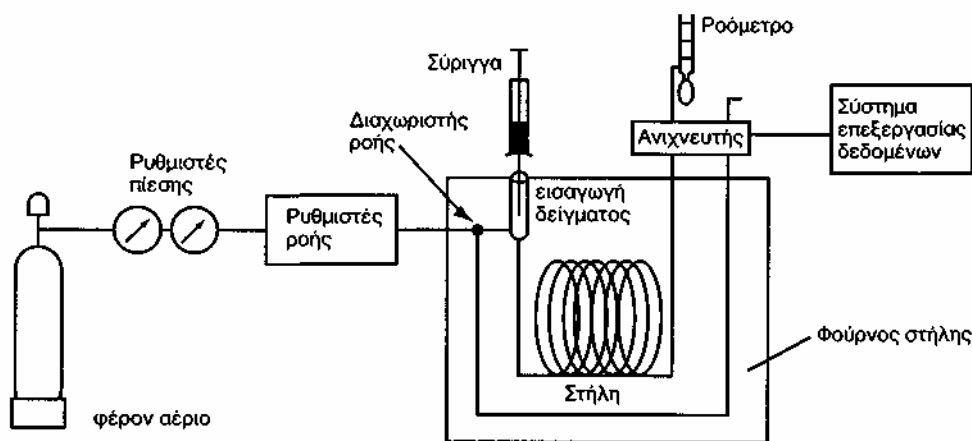
3.3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας

Στα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνεται η ταχύτητα και η απλότητα καθώς και η μεγάλη ευαισθησία που φτάνει σε συγκεντρώσεις ppm και ppb. Ακόμα, ενώ είναι αποτελεσματική σε δύσκολους διαχωρισμούς είναι και μη καταστρεπτική μέθοδος, επιτρέποντας έτσι σύζευξη με άλλες διατάξεις π.χ. MS. Δίνει αναλύσεις υψηλής ακρίβειας, με τυπικά RSDs 1-5% με μικρές ποσότητες δείγματος, μl και με χαμηλό κόστος.^{13,16}

Κύρια μειονεκτήματα είναι ότι περιορίζεται στα πτητικά δείγματα, ενώ δεν είναι κατάλληλη για θερμικά ασταθή δείγματα. Η αναγνώριση των κορυφών, επίσης, γίνεται με φασματοσκοπία, συνήθως μάζας.¹³

3.4. Διάταξη αέριου χρωματογράφου

Το φέρον αέριο (συνήθως άζωτο, αργό, υδρογόνο) 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.¹⁷



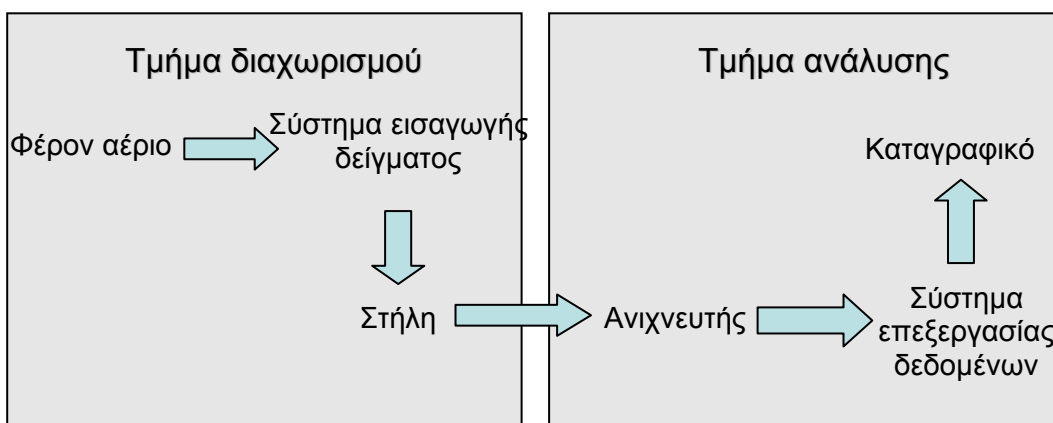
Σχήμα 3.2. Σχηματική αναπαράσταση των βασικών τμημάτων ενός αέριου χρωματογράφου.¹⁶

Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή και τα σήματα της ανίχνευσης καταγράφονται από το καταγραφικό ή οδηγούνται σε μικροϋπολογιστή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μία διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και τέλος ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου.¹⁷

Ο αέριος χρωματογράφος αποτελείται από δύο τμήματα: (1) το φέρον αέριο και το κύριο μέρος του χρωματογράφου, όπου γίνεται ο διαχωρισμός και (2) το σύστημα ανίχνευσης, καταγραφής και αποτίμησης του σήματος (σχήμα 3.2).¹⁷

Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί στον ανιχνευτή από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Έτσι, ως φέροντα αέρια μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε: ήλιο, αργό, άζωτο και υδρογόνο.¹⁷

Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να υπάρχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, γι' αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι τελείως απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιούμε. Η παροχή του ρυθμίζεται με ειδικές βαλβίδες και ροόμετρα.¹⁷



Σχήμα 3.3. Το τμήμα διαχωρισμού και το τμήμα ανάλυσης του αερίου χρωματογράφου.¹⁷

Το κύριο μέρος του χρωματογράφου, η καρδιά του χρωματογράφου, είναι η στήλη. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία είναι συνήθως γυάλινες ή χαλύβδινες στήλες γεμισμένες με διάφορα υλικά ανάλογα με τα συστατικά που θέλουμε να διαχωρίσουμε (στήλες υλικού πλήρωσης, packed columns). Το σχήμα τους έχει τη μορφή έλικας και η διάμετρος τους είναι πάρα πολύ μικρή. Σήμερα χρησιμοποιούνται τριχοειδείς γυάλινες στήλες μήκους μέχρι 25 m, οι οποίες εσωτερικά είναι καλυμμένες με διάφορα υλικά (coated capillary glass columns).¹⁷

Το δείγμα όγκου της τάξης μl, εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή ενός διαφράγματος ή μιας βαλβίδας. Η ταχύτητα και η ικανότητα διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για το λόγο αυτό η στήλη βρίσκεται μέσα σε ένα φούρνο ακριβείας ο οποίος δίνει αυστηρά επαναλήψιμες συνθήκες.¹⁷

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης

της στήλης ή το υλικό κάλυψης του εσωτερικού της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου.¹⁷

Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης, ανιχνεύει τα διάφορα συστατικά και δίνει ηλεκτρικά σήματα. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μικροϋπολογιστή.¹⁷

3.5. Εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια μέθοδος ενόργανης ανάλυσης ικανή να δίνει πληροφορίες τόσο για την ποιοτική όσο και για την ποσοτική σύνθεση δειγμάτων.¹⁷ Χρησιμοποιείται ευρέως κυρίως για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό οργανικών ουσιών σε πολύπλοκα δείγματα, μέχρι και τον προσδιορισμό διάφορων φυσικοχημικών μεγεθών.¹³

Η ποιοτική ανάλυση γίνεται σε δείγματα γνωστών και/ή αγνώστων συστατικών με σύγκριση του χρόνου ανάσχεσης και απόκρισης από το χρωματογράφημα μετά από τον διαχωρισμό τους.¹⁷ Πιο συχνά γίνεται σύζευξη με φασματογράφο μάζας (mass spectrometer), για την ποιοτική ανάλυση.¹⁶

Η συνολική ποσότητα ενός εκλούμενου συστατικού συνήθως υπολογίζεται από την επιφάνεια της κορυφής, με ολοκλήρωση με την βοήθεια ηλεκτρονικών ολοκληρωτών. Για την ποσοτική ανάλυση το σχήμα της κορυφής δεν έχει καμία επίδραση στην ακρίβεια της ανάλυσης, με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη κορυφών.¹⁸ Η ποσοτική ανάλυση μπορεί να γίνει και με σύγκριση του ύψους κορυφής. Αν οι κορυφές είναι στενές και οξείες, το ύψος της κορυφής είναι ανάλογο της ποσότητας της ουσίας.¹⁵ Πρακτικά, στις αναλυτικές τεχνικές στο εργαστήριο, η εκτίμηση του ύψους της κορυφής δεν εφαρμόζεται αφού εξαρτάται από τους συντελεστές ανάσχεσης και χάνει την αναλογία του με την συγκέντρωση ή την μάζα του συστατικού που εκλύεται, ενώ το εμβαδόν της κορυφής είναι ανεξάρτητο από τους συντελεστές ανάσχεσης.¹⁸

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται σήμερα για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε:

- τρόφιμα (λιπίδια, πρωτεΐνες, συντηρητικά, αρωματικές ύλες κ.α.),
- φάρμακα,
- προϊόντα πετρελαίου,
- βιομηχανίες αρωματοποιίας,
- περιβαλλοντικά δείγματα (PCB's, DDT, καρβαμιδικές ενώσεις, οργανοχλωριωμένες ενώσεις, παρασιτοκτόνα, PAH's),
- τοξικολογία, δικονομική ανάλυση (π.χ. αιθανόλη στο αίμα οδηγών, ναρκωτικά σε βιολογικά υγρά, αίμα, ούρα, υγρά στομάχου).¹⁷

3.6. Φασματοσκοπία Μάζας. Φασματογράφος Μάζας

Ο φασματογράφος μάζας είναι ένα αναλυτικό όργανο που χρησιμοποιείται στην εξακρίβωση του μοριακού βάρους και της δομής των οργανικών ενώσεων, καθώς και στην ταυτοποίηση και προσδιορισμό συστατικών ανόργανων ουσιών.

Το δείγμα αεριοποιείται μέσα στον φασματογράφο μάζας και τα ιόντα που προκύπτουν, στην αέρια φάση πια, διαχωρίζονται σύμφωνα με τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z) και ανιχνεύονται συνήθως ηλεκτρικά. Το ρεύμα που παράγεται από τα ιόντα που αντιστοιχούν στα διαφορετικά συστατικά του δείγματος, ενισχύεται και εμφανίζονται τα δεδομένα στη συνέχεια, σε έναν παλμογράφο ή σε καταγραφέα ή αποθηκεύεται σε έναν υπολογιστή.¹⁹

Οι κορυφές στο φάσμα μάζας σχεδιάζονται σε άξονες, με αυθαίρετες μονάδες ή κανονικοποιούνται ως προς το την πιο σημαντική κορυφή στην οποία δίνεται η τιμή 100.¹⁹

Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από τις παρακάτω βασικές μονάδες:

- μία πηγή ιόντων, όπου τα ιόντα σχηματίζονται από το δείγμα,
- από ένα αναλυτή που διαχωρίζει τα ιόντα ανάλογα με τις τιμές του λόγου m/z ,
- έναν ανιχνευτή για την ένταση του ρεύματος από κάθε ιόν,
- ηλεκτρονικά συστήματα για την παροχή ρεύματος και για τον έλεγχο των τριών παραπάνω μονάδων,
- συστήματα αντλιών.¹⁹

3.7. Σύζευξη Φασματογράφου Μάζας με Αέρια Χρωματογραφία

Το κύριο πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί κατά τη σύζευξη του φασματογράφου μάζας με αέρια χρωματογραφία είναι η αυξημένη πίεση στην πηγή ιονισμού από το φέρον αέριο του χρωματογράφου.¹⁹

Όταν χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες είναι δυνατή η απευθείας είσοδος στην πηγή παραγωγής ιόντων αλλά στις πακεταρισμένες απαιτούνται διαχωριστήρες, δημιουργώντας μια πιο πολύπλοκη διασύνδεση.¹⁹

Ο μοριακός διαχωριστήρας με εκτόξευση αερίου, χρησιμοποιείται συνήθως με τις πακεταρισμένες στήλες. Στηρίζεται στο ότι το ιξώδες των αέριων μορίων είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους, σύμφωνα με το νόμο διάχυσης του Graham. Έτσι τα χαμηλού μοριακού βάρους συστατικά όπως το φέρον αέριο ή εκλούόμενα συστατικά απομακρύνονται εκλεκτικά κατά την εφαρμογή άντλησης στην διαδρομή τους προς την πηγή ιονισμού. Το αέριο ρεύμα που φτάνει τελικά στην πηγή αερισμού, είναι εμπλουτισμένο με το υψηλότερου μοριακού βάρους συστατικό που υπάρχει. Οι διαχωριστές μπορεί να είναι ενός ή περισσότερων σταδίων. Δεύτερος τύπος διασύνδεσης βασίζεται στη σχετική διαπερατότητα μεμβράνης για διαφορετικά μόρια.¹⁹

Στην απευθείας σύζευξη, το άκρο της τριχοειδούς στήλης της χρωματογραφίας, περνά μέσα στην πηγή ιονισμού μέσω υάλινης οδού που θερμαίνεται στην απαιτούμενη θερμοκρασία με κατάλληλη θερμική αντίσταση.¹⁹

4. Πειραματικό μέρος

4.1. Αντιδραστήρια και οργανολογία

- Ακετονιτρίλιο (SupraSolv grade), Merck (Darmstadt, Germany).
- Τολουόλιο (SupraSolv grade), Merck (Darmstadt, Germany).
- NaCl (>99.5%), Merk.
- Απιονισμένο νερό, από σύστημα EASYpure RF της Barnstead/Thermolyne (Dubuque, USA).
- PAH: ναφθαλένιο, ακεναφθένιο, φαιναθρένιο, φλουορένιο, φλορανθένιο και πυρένιο, >98% Sigma-Aldich (Steinheim, Germany).
- Di-n-butylphthalate και bis-2-ethylhexyl phthalate (Sigma-Aldrich Chemie).
- Κοίλη μεμβράνη πολυπροπυλενίου (Accurel Q 3/2), πάχος τοιχωμάτων 200μm, εσωτερική διάμετρος 600μm, (Membrana, Wuppertal, Germany).
- Σύριγγα 10μl Hamilton Gastight (Hamilton Bonaduz, Switzerland), Model 1701RNR, με αμβλεία βελόνα (5.1 cm length; 0.071 cm O.D.; 0.015 cm I.D.).
- SPME συσκευή με ίνα πολυδιμεθυλοσιλοξάνιου (PDMS) (Supelco, Sigma-Aldrich Chemie).
- Σύστημα GC-MS (Shimadzu GC-17A version 3, QP-5050A). Τριχοειδής στήλη 30m × 0.25 mm HP-5MS (Agilent Technologies).
- Ελαστικό πώμα για το GC, Thermogreen LB-2 (Supelco).
- He (>99.999% pure) ως φέρον αέριο στο GC με ρυθμό 1.2ml/min.
- Γυάλινα φιαλίδια των 7 ml (Supelco, Bellefonte, USA).
- Μαγνητικός αναδευτήρας με γυάλινη επικάλυψη (8mm× 3mm).
- Συσκευή ανάδευσης Heidolph MR3001K, 800W.

4.2. Περιγραφή της μεθόδου

Διάλυμα συγκέντρωσης 500μg/ml από τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες σε ακετονιτρίλιο χρησιμοποιήθηκε καθημερινά για την προετοιμασία υδατικών διαλυμάτων επιμολυσμένων με τα PAH στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Για την εκχύλιση 5 ml από τα υδατικά αυτά δείγματα, που περιέχουν 2.5% NaCl w/v, τοποθετούνται κάθε φορά σε καθαρό γυάλινο φιαλίδιο των 7 ml. Σε αυτά εφαρμόζεται ανάδευση με τη χρήση μικρού μαγνητικού αναδευτήρα επικαλυμμένου με γυαλί στις 1000 στροφές ανά λεπτό (rpm). Διάλυμα 10μg/ml φλουορενίου σε τολουόλιο χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο. Τα διαλύματα φυλάσσονταν σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία 4 °C. Η περιεκτικότητα σε άλας αλλά και η ταχύτητα ανάδευσης είναι διαφορετικές όταν διερευνούνται και κάθε φορά η τιμή τους αναφέρεται.

4.3. Εφαρμογή της τεχνικής μικροεκχύλισης LPME

Η μεμβράνη πρώτα καθαρίζεται με ακετόνη σε υπέρηχους για μερικά λεπτά. Αφού στεγνώσουν κόβονται σε τμήματα με μήκος 1.3 cm, τα οποία έχουν χωρητικότητα περίπου 3 μl. Το μήκος άρα και η χωρητικότητα των κοίλων ινών έχουν προσαρμοστεί στο μέγεθος των φιαλιδίων που χρησιμοποιούνται στη μελέτη αυτή. Οι ίνες έχουν χαμηλό κόστος και γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί νέα ίνα σε κάθε ανάλυση.

Η διαδικασία περιλαμβάνει την εισαγωγή 3μl από το τολουόλιο στη σύριγγα, στη συνέχεια ακολουθούν 3.4μl νερού. Μετά από την εφαρμογή της κοίλης ίνας στη βελόνα της σύριγγας, η ίνα εμβαπτίζεται σε φιαλίδιο με οργανικό διαλύτη ώστε να εμποτιστεί με αυτόν. Αφού γίνει αυτό, απομακρύνεται η περίσσεια του οργανικού διαλύτη στο εσωτερικό, πιέζοντας το έμβολο μέχρι να φύγει όλος ο όγκος του νερού μέσα από τη σύριγγα. Στα πειράματα ποσοτικοποίησης, τα 3 ml είναι διάλυμα του εσωτερικού προτύπου σε τολουόλιο. Γρήγορα μετά η ίνα πρέπει να απομακρυνθεί από εκείνο το φιαλίδιο και να εισαχθεί στο φιαλίδιο με τα 5 ml του προς ανάλυση υδατικού διαλύματος. Ο οργανικός διαλύτης, με πίεση του εμβόλου οδηγείται στο εσωτερικό της κοίλης ίνας τότε και η εκχύλιση ξεκινά.

Αφού η εκχύλιση εξελιχθεί για ορισμένο χρονικό διάστημα που προκύπτει μετά από τη βελτιστοποίηση της μεθόδου, 1.4μl από τον οργανικό διαλύτη αποτραβιούνται στο εσωτερικό της σύριγγας και απελευθερώνονται στο σύστημα εισαγωγής δείγματος του GC-MS για ανάλυση.

4.4. Εφαρμογή της τεχνικής μικροεκχύλισης SPME

Η τεχνική SPME χρησιμοποιήθηκε συμπληρωματικά για την επιβεβαίωση της ύπαρξης των PAHs στα δείγματα των εκροών από μονάδα επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων. Αυτή η μέθοδος έχει αναπτυχθεί προηγουμένως από το ίδιο εργαστήριο. Στα δείγματα των εκροών προστίθεται NaCl σε συγκέντρωση 4.7% w/v και 5 ml αυτών εκχυλίζονται σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση της συσκευής SPME εφοδιασμένης με την ίνα από πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο. Εφαρμόζεται ανάδευση ρυθμού 1000rpm με μαγνητικό αναδευτήρα επικαλυμμένου με γυαλί, για 60 λεπτά. Στη συνέχεια και η συσκευή αυτή μεταφέρεται στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος του GC-MS που χρησιμοποιείται για την ανάλυση. Για την ποσοτικοποίηση, διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης των ενώσεων στόχων αναλύονται κατά τον ίδιο τρόπο.

4.5. Χρωματογραφική ανάλυση με αεριοχρωματογράφο-φασματογράφο μάζας (GC-MS)

Χρησιμοποιείται το μηχάνημα GC-MS όπως αναφέρεται παραπάνω, σε όλες τις αναλύσεις. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος λειτουργεί στους 260 °C χωρίς διαμερισμό δείγματος (splitless), με τη δίοδο διαχωρισμού κλειστή για 5 λεπτά. Καθημερινά καινούριο ελαστικό πώμα τοποθετούνταν στον εισαγωγέα του δείγματος αφού πρώτα είχε διατρηθεί, για να αποφευχθούν διαρροές του φέροντος

αερίου εξαιτίας της χρήσης βελόνας μεγάλης διαμέτρου. Το φέρον αέριο, He διοχετευόταν με ρυθμό 1.2ml/min. Ο φούρνος αρχικά βρισκόταν στους 60°C για 1 min και προγραμματιζόταν να φτάνει τους 150°C με ρυθμό 10°C/min και τελικά στους 270°C με τον ίδιο ρυθμό όπου και παρέμενε για 1min. Η θερμοκρασία της διεπιφάνειας ήταν ρυθμισμένη στους 300°C και η τάση του ανιχνευτή στα 1.40 kV. Ο ιονισμός του δείγματος γίνεται με σύγκρουση με ηλεκτρόνια (electron impact, EI, 70 eV). Ακόμα ρυθμίζεται έλεγχος επιλεγμένων ιόντων (single ion monitoring, SIM) ως εργαλείο ποσοτικής ανάλυσης. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στον σχηματισμό των παρακάτω ιοντικών θραυσμάτων (m/z), για το ναφθαλένιο :128, ακεναφθένιο: 153, φαιναθρένιο: 178, φλορανθένιο: 202 και πυρένιο: 202. και (εσωτερικό πρότυπο) φλουορένιο: 166. Πριν γίνει η ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο SIM, πλήρες φάσμα (m/z 50-465) χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση όλων των συστατικών στόχων, ανάλογα με το φάσμα μάζας που δίνουν και τους χρόνους ανάλυσης από το GC.

5. Συζήτηση αποτελεσμάτων

5.1. Συνθήκες εκχύλισης με την τεχνική μικροεκχύλισης υγρής φάσης

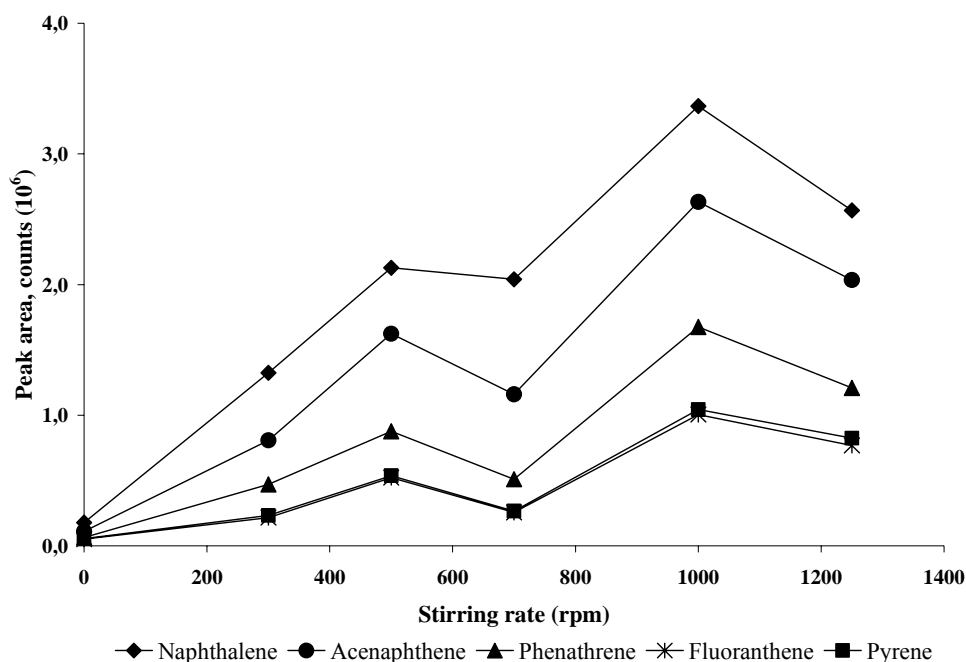
5.1.1. Πειραματικός έλεγχος για τον καθορισμό του κατάλληλου διαλύτη

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως η επιλογή των συνθηκών για την πραγματοποίηση της εκχύλισης είναι μεγάλης σημασίας αφού θα καθορίσουν την εκλεκτικότητα και την επάρκεια της εκχύλισης ως προς τις ενώσεις στόχους.

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη πρέπει να υπακούει στις απαιτήσεις που αναφέρονται στο κεφάλαιο 2.1.3.5. Εξετάστηκαν το τολουόλιο, το διχλωρομεθάνιο και το εξάνιο. Η εκλεκτικότητα των διαλυτών εκτιμήθηκε σε δεκαπεντάλεπτες εκχυλίσεις 5ml υδατικών δειγμάτων τα οποία είχαν επιμολυνθεί με 50μg/l με κάθε ένωση στόχο με εφαρμογή ταχύτητας ανάδευσης στις 1000rpm. Από τους διαλύτες που μελετήθηκαν, το τολουόλιο μπορούσε εύκολα να ακινητοποιηθεί στους πόρους της ίνας, σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν εμφανίστηκαν σημαντικές απώλειες του διαλύτη κατά την εκχύλιση και το κυριότερο, έδειξε μεγάλη εκλεκτικότητα και έδωσε καλή απόδοση εκχύλισης για όλες τις ενώσεις στόχους. Στο ίδιο συμπέρασμα για τον διαλύτη έχει καταλήξει και άλλη έρευνα, που έχει γίνει για την ανάλυση μικρορυπαντών στο νερό της βροχής.²⁰

5.1.2. Μελέτη της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης

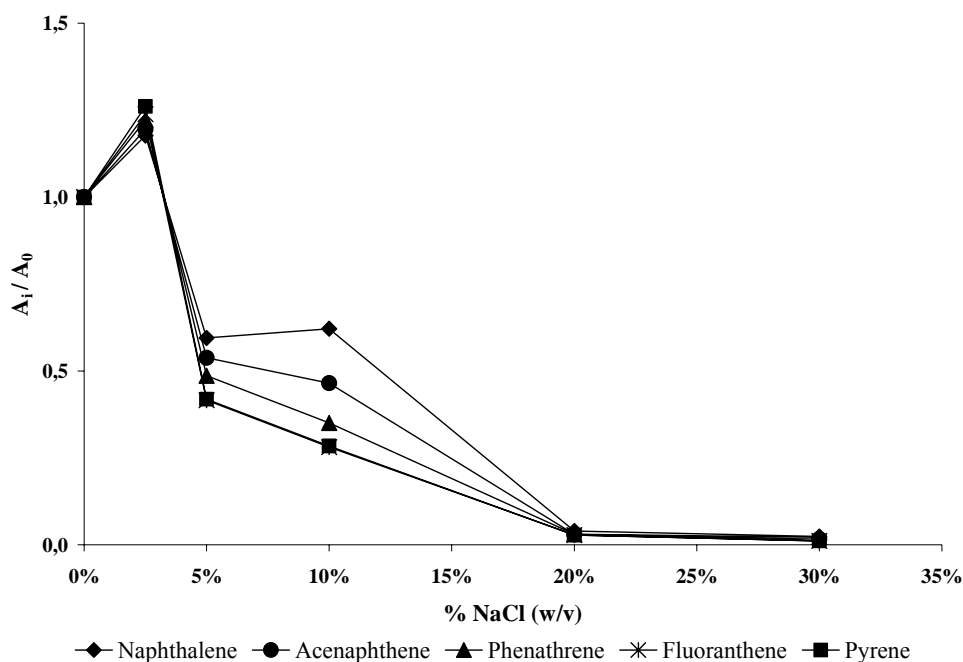
Σε ξεχωριστή ομάδα πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης του δείγματος κατά την εκχύλισή του. Μια σειρά από υδατικά διαλύματα των 5 ml επιμολυσμένων με 25μg/l από κάθε ένωση στόχο, εκχυλίζεται για 15 min με τολουόλιο και με ταχύτητες ανάδευσης από 0-1250 rpm. Όπως ήταν αναμενόμενο, η εφαρμογή μαγνητικής ανάδευσης ενδυναμώνει την εκχύλιση, φτάνοντας ένα μέγιστο στις 1000rpm. Στην μεγαλύτερη ταχύτητα ανάδευσης, 1250 rpm, η απόκριση του οργάνου φαίνεται να ελαττώνεται (σχήμα 5.1). Αυτό παρατηρείται κυρίως γιατί γίνεται διάλυση του διαλύτη στην υδατική φάση εξαιτίας της έντονης ανάδευσης. Έτσι στα υπόλοιπα πειράματα επιλέχθηκε ο ρυθμός ανάδευσης 1000rpm.



Σχήμα 5.1. Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην απόδοση της εκχύλισης.

5.1.3. Μελέτη της επίδρασης της ιονικής ισχύος του υδατικού διαλύματος

Η επίδραση της ιονικής ισχύος του υδατικού διαλύματος, μπορεί να έχει διαφορετικές επιδράσεις στην εκχύλιση. Συνήθως, ανάλογα με τη διαλυτότητα των ενώσεων που μελετάμε, η προσθήκη άλατος στο διάλυμα, ενισχύει την εκχύλιση των πολικών ενώσεων εξαιτίας του φαινομένου της εξαλάτωσης. Μία πρόσφατη μελέτη για την εκχύλιση των PAHs από υδατικά διαλύματα, ανέλυσε την επίδραση της προσθήκης άλατος κατά την εφαρμογή της τεχνικής LPME σε συγκεντρώσεις άλατος 10-30% w/v. Τα αποτελέσματα έδειξαν ελαφριά αύξηση της ικανότητας εκχύλισης κατά την αύξηση της ιονικής ισχύος του μέσου. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν συγκεντρώσεις άλατος 2.5-30% w/v. Υδατικά δείγματα που περιείχαν 25μg/l για κάθε συστατικό στόχο και την απαιτούμενη ποσότητα NaCl, με ανάδευση στις 1000rpm εκχυλίζονταν για 15min με την τεχνική της LPME. Στο σχήμα 5.2 φαίνεται η επίδραση του NaCl στην επίδοση της μεθόδου. Ο λόγος των εμβαδών των κορυφών σε διάφορες συγκεντρώσεις άλατος, προς τα εμβαδά των κορυφών χωρίς την προσθήκη άλατος (A_i/A_0) δίνεται ως συνάρτηση της ιονικής ισχύος του υδατικού διαλύματος. Για τις περιεκτικότητες του άλατος που χρησιμοποιήθηκαν, μέγιστη απόδοση έδωσε η συγκέντρωση 2.5% στο NaCl. Έτσι, αυτή η συγκέντρωση χρησιμοποιήθηκε για τα υπόλοιπα πειράματα.

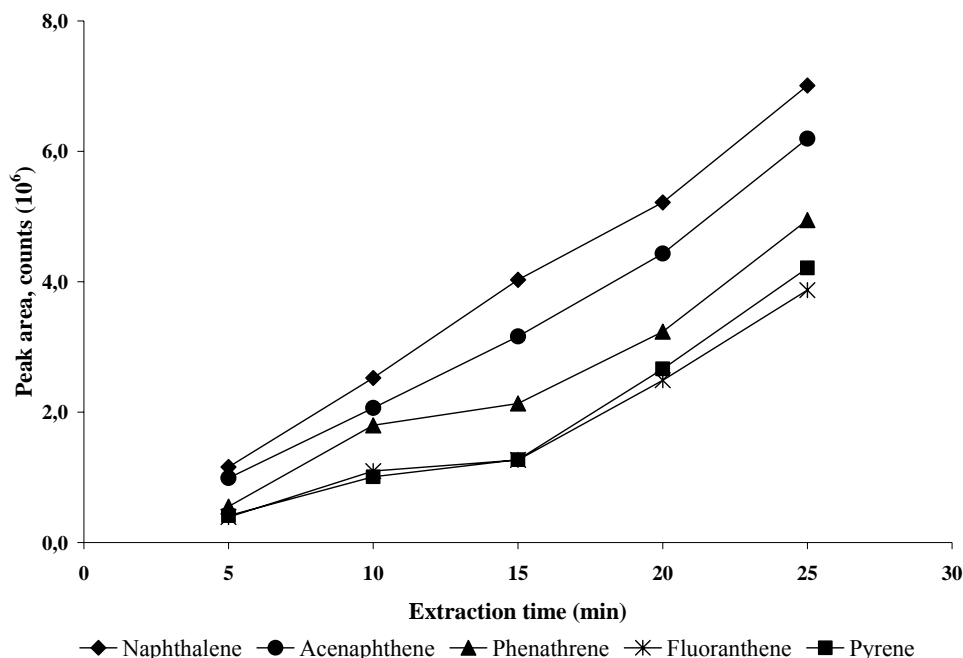


Σχήμα 5.2. Επίδραση της προσθήκης άλατος στην απόδοση της εκχύλισης.

5.1.4. Μελέτη του χρόνου εκχύλισης

Άλλη ομάδα πειραμάτων οργανώθηκε για την καθιέρωση του βέλτιστου χρόνου εκχύλισης. Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης LPME βασίζεται στην μεταφορά μάζας των συστατικών από την υδατική φάση στην οργανική και η διαδικασία αυτή εξαρτάται από τον χρόνο. Όσο το σύστημα πλησιάζει σε συνθήκες ισορροπίας, ο ρυθμός μεταφοράς μάζας ελαττώνεται. Οι συνθήκες ισορροπίας επιτυγχάνονται όταν έχει περάσει μεγάλο χρονικό διάστημα, θεωρητικά σε άπειρο χρόνο. Στο σχήμα 5.3 φαίνεται η επίδραση του χρόνου εκχύλισης για κάθε ένωση-στόχος ξεχωριστά, όταν η ταχύτητα ανάδευσης είναι 1000rpm, η συγκέντρωση κάθε PAH είναι 25μg/l και του NaCl είναι 2.5%w/v.

Όπως είναι εμφανές (σχήμα 5.3), όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος της εκχύλισης, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποσότητα των συστατικών που εισέρχονται στην οργανική φάση. Ακόμα και με πραγματοποίηση της εκχύλισης για 25 min δεν φάνηκε το σύστημα να φτάνει σε συνθήκες ισορροπίας. Για ποσοτικές αναλύσεις δεν είναι όμως απαραίτητο το σύστημα να φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας, εφόσον εφαρμόζεται αυστηρά ο ίδιος χρόνος σε όλες τις αναλύσεις. Στην παρούσα μελέτη ο χρόνος εκχύλισης ορίστηκε στα 15 min με σκοπό να υπάρχει ικανοποιητικός ρυθμός ανάλυσης δειγμάτων, σε συνδυασμό με τον χρόνο της χρωματογραφικής ανάλυσης.



Σχήμα 5.3. Επίδραση της διάρκειας της εκχύλισης στην απόδοσή της.

Συνοψίζοντας, οι βέλτιστες συνθήκες που καθορίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στις υπόλοιπες αναλύσεις είναι: 5ml από τα υδατικά δείγματα περιεκτικότητας 2.5% w/v σε NaCl με ανάδευση 1000rpm, εκχυλίζονται σε διάλυμα τολουολίου με το εσωτερικό πρότυπο, για 15 min.

5.2. Εκτίμηση μεθόδου

Πραγματοποιήθηκε τριήμερη μελέτη βαθμονόμησης με σκοπό την εξακρίβωση της αναπαραγωγιμότητας μεταξύ ημερών της εκχύλισης LPME. Κάθε μέρα η προτεινόμενη μέθοδος εξετάστηκε κατά την εκχύλιση υδατικών διαλυμάτων περιεκτικότητας 2.5% w/v σε NaCl επιμολυσμένων με τις ενώσεις στόχους σε συγκεντρώσεις από 0.50 ως 50μg/l. Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.1, οι καμπύλες βαθμονόμησης που προκύπτουν, έχουν πολύ καλή γραμμικότητα για όλες τις ενώσεις με συντελεστή συσχέτισης (r^2) από 0.9977 ως 0.9999.

Πίνακας 5.1. Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης.

Analyte	1 ^η Μέρα	2 ^η Μέρα	3 ^η Μέρα
Naphthalene	0.9999	0.9980	0.9999
Acenaphthene	0.9997	0.9990	0.9997
Phenathrene	0.9983	0.9995	0.9984
Fluoranthene	0.9977	0.9999	0.9977
Pyrene	0.9977	0.9998	0.9977

Το όριο ανίχνευσης (LOD), προσδιορίστηκε ορίζοντας λόγο σήματος προς θόρυβο ίσο με τρία ($S/N=3$). Τα LOD όλων των αναλυτών στόχων βρέθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, $\mu\text{g/l}$ μεταξύ των τιμών 0.005 και 0.011, τιμές που είναι συγκρίσιμες με τις τιμές που δίνουν άλλες μέθοδοι μικροεκχύλισης. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκφράζεται με την σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) και εκτιμήθηκε με την ανάλυση έξι διαδοχικών υδατικών διαλυμάτων συγκέντρωση $10\mu\text{g/l}$ σε κάθε ένα από τα πέντε PAH και βρέθηκε μεταξύ 2.7 και 11.3% με μέση τιμή 6%, όπως φαίνεται και στον πίνακα.

Ακόμα, η αναπαραγωγικότητα της προτεινόμενης μεθόδου που αντιπροσωπεύει την μεταξύ ημερών επαναληψιμότητα (within day precision) εξετάστηκε με την εκχύλιση τριών πανομοιότυπων δειγμάτων επιμολυσμένων με $10\mu\text{g/l}$ σε διάστημα τριών εργάσιμων ημερών (πίνακας 5.2). Οι τιμές RSD αυτών των μετρήσεων βρέθηκαν μεταξύ 7.9 και 14.4% με μέση τιμή 10.0%.

Πίνακας 5.2. Επαναληψιμότητα και αναπαραγωγικότητα της μεθόδου.

Analyte	LOD ^a ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Precision (RSD; %)	
		Repeatability ^b	Reproducibility ^c
Naphthalene	0.005	11.3	14.4
Acenaphthene	0.010	2.7	10.8
Phenathrene	0.008	2.9	7.9
Fluoranthene	0.011	4.9	8.2
Pyrene	0.006	9.4	8.5

^aLOD υπολογίστηκε για λόγο σήματος/θόρυβο 3, ($S/N = 3$).

^bRepeatability, η επαναληψιμότητα βρέθηκε εκχυλίζοντας διαδοχικά, έξι δείγματα, επιμολυσμένα με $10\mu\text{g/l}$ (2.5 % NaCl w/v).

^cReproducibility, η αναπαραγωγικότητα υπολογίστηκε εκχυλίζοντας τρία όμοια δείγματα επιμολυσμένα με $10\mu\text{g/l}$ (2.5 % NaCl) για περίοδο τριών εργάσιμων ημερών.

5.3. Έλεγχος της ικανότητας εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου σε φυσικά δείγματα

Σε επόμενη σειρά πειραμάτων εξετάστηκε η ικανότητα εφαρμογής της μεθόδου για τον προσδιορισμό της μόλυνσης με PAHs σε φυσικά δείγματα νερού. Έτσι νερό της βρύσης και νερό από γεώτρηση με επιμόλυνση σε PAHs $10\mu\text{g/l}$, εκχυλίστηκε με τη μέθοδο αυτή, σύμφωνα με τις συνθήκες που επιλέχθηκαν μετά από τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν με τη λήψη πλήρους φάσματος αλλά και με τον έλεγχο επιλεγμένων μοριακών θραυσμάτων στον φασματογράφο μάζας (full-scan και SIM MS). Δεν βρέθηκαν θετικά σε PAHs. Στις ίδιες συνθήκες, έξι πανομοιότυπα δείγματα από το νερό βρύσης αλλά και από το νερό της γεώτρησης αναλύθηκαν και η περιεκτικότητα επί τοις εκατό των ενώσεων στόχων εκτιμήθηκε λαμβάνοντας υπόψη την σχετική ανάκτηση. Η σχετική ανάκτηση (relative recovery), προσδιορίζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων των αναλυτών που βρίσκεται στα φυσικά δείγματα και σε αυτά που προκύπτουν με χρήση του απιονισμένου νερού, με την ίδια επιμόλυνση. Στον πίνακα 5.3 φαίνεται ότι λήφθηκαν αποδεκτές σχετικές ανακτήσεις, με τιμές από 98-111% για τα δείγματα με νερό βρύσης με μέση τιμή 104% και για τα δείγματα με νερό από τη γεώτρηση οι τιμές βρίσκονται από 63-86% με μέση τιμή 78%. Είναι

πολύ πιθανό ότι τα αιωρούμενα στερεά στο νερό της γεώτρησης, που είναι περισσότερα από ότι στο νερό της βρύσης, συνέβαλαν στις αυξημένες τιμές RSD αλλά και στα χαμηλά επίπεδα της σχετικής ανάκτησης σε σχέση με τα δείγματα από το νερό της βρύσης.

Πίνακας 5.3. Σχετική ανάκτηση των PAH από νερό βρύσης και γεώτρησης μαζί με τις σχετικές τυπικές αποκλίσεις.

Analyte	Relative recoveries (%) and RSD values (%) ^{a,b}	
	Tap water	Well water
Naphthalene	99 (3.2)	82 (17.9)
Acenaphthene	102 (1.7)	63 (17.7)
Phenanthrene	106 (4.2)	86 (10.0)
Fluoranthene	111 (6.9)	84 (4.4)
Pyrene	110 (7.8)	76 (4.2)

^a επίπεδο επιμόλυνσης : 10 µg/l.

^b μέσος όρος των έξι πειραμάτων.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα και υπό αυτές τις πειραματικές συνθήκες, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μήτρα των δειγμάτων είχε μικρή επίδραση στην ανάλυση τους.

5.4. Ανάλυση δειγμάτων που προέρχονται από την εκροή μονάδας βιολογικού καθαρισμού αστικών αποβλήτων

Η προτεινόμενη τεχνική μικροεκχύλισης τελικά χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων PAHs σε δείγματα εκροής μονάδας επεξεργασίας αστικών αποβλήτων. Οι δύο μεγαλύτερες μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων στην Κρήτη, Χανίων και Ηρακλείου, είναι συμβατικά συστήματα ιλύος με δευτεροβάθμια επεξεργασία, περιλαμβάνοντας επεξεργασία ενεργού ιλύος με μέσο χρόνο αερισμού 36 ώρες. Οι μονάδες επεξεργάζονται ετησίως 16000 και 31000 m³ αστικών αποβλήτων αντίστοιχα, καλύπτοντας τις ανάγκες 110000 και 300000 κατοίκων κατά μέσο όρο αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα βρίσκονται στον πίνακα 5.4. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν θετικά στην παρουσία των PAHs. Οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις δείχνουν καθαρά ότι οργανικοί ρύποι προτεραιότητας, όπως αυτοί, απομακρύνονται με πολύ αργούς ρυθμούς κατά την επεξεργασία των αστικών λυμάτων.

Πίνακας 5.4. Αποτελέσματα της ανάλυσης δειγμάτων που προέρχονται από την εκροή μονάδας βιολογικού καθαρισμού αστικών αποβλήτων.

Analyte	Χανιά 1		Χανιά 2		Χανιά 3		Χανιά 4	
	Hollow fibre		Hollow fibre		Hollow fibre		Hollow fibre	
	LPME	SPME	LPME	SPME	LPME	SPME	LPME	SPME
Naphthalene	0.057	0.065	0.098	0.023	0.149	0.086	0.108	0.074
Acenaphthene	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	0.075	0.127	- ^a	- ^a
Phenathrene	<i>nq</i> ^b	0.112	<i>nq</i> ^b	0.084	0.236	0.243	<i>nq</i> ^b	0.087
Fluoranthene	<i>nq</i> ^b	0.017	<i>nq</i> ^b	0.023	<i>nq</i> ^b	0.054	<i>nq</i> ^b	0.013
Pyrene	0.030	0.019	0.021	0.025	0.043	0.101	0.026	0.015

Analyte	Ηράκλειο 1		Ηράκλειο 2		Ηράκλειο 3		Ηράκλειο 4	
	Hollow fibre		Hollow fibre		Hollow fibre		Hollow fibre	
	LPME	SPME	LPME	SPME	LPME	SPME	LPME	SPME
Naphthalene	0.082	0.016	0.027	0.007	0.030	0.012	<i>nq</i> ^b	<i>nq</i> ^b
Acenaphthene	- ^a	0.017	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
Phenathrene	0.091	0.032	0.057	0.032	0.149	0.041	0.235	0.162
Fluoranthene	<i>nq</i> ^b	0.072	0.062	0.033	0.075	0.026	0.332	0.261
Pyrene	0.031	0.121	- ^a	0.039	0.084	0.029	0.366	0.265

^a Δεν ανιχνεύτηκε

^b *nq*: not quantified; συγκέντρωση κάτω από τα όρια της ποσοτικοποίησης που ορίζονται για λόγο S/N = 10.

Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που αναφέρουν ότι η επεξεργασία ενεργού ιλύος των αποβλήτων, δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην απομάκρυνση των υπό εξέταση ρυπαντών που είναι γνωστοί για την μακρόχρονη παραμονή τους στο περιβάλλον.²⁰ Ακόμα, η επίδοση της LPME βρέθηκε συγκρίσιμη με αυτήν της SPME

Επιπροσθέτως, η ικανότητα των δύο τεχνικών στην προσυγκέντρωση πολλών οργανικών ενώσεων, πιστοποιήθηκε με τον προσδιορισμό φθαλικών ενώσεων που προσδιορίστηκαν εξίσου από την LPME και την SPME στα υπό εξέταση δείγματα των εκροών. Η αναγνώριση των φθαλικών έγινε κατά την ανάλυση σε πλήρες φάσμα (full scan MS) των δειγμάτων. Το φάσμα μάζας αυτών των ενώσεων αντιστοιχεί στον κανονικό διβουτυλικό φθαλικό εστέρα και στον δις2-αιθυλεξυλοφθαλικό εστέρα. (με συντελεστή ταύτισης >90). Η ταυτοποίησή τους ακόμα επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των χρόνων ανάλυσης αυτών με εκείνων που δίνονται από πρότυπα διαλύματά τους στις ίδιες συνθήκες χρωματογραφικής του ανάλυσης. Τα φθαλικά αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη ομάδα ευρέως διαδεδομένων ρυπαντών που εισέρχονται στο οικοσύστημα κυρίως από τα πλαστικά απόβλητα. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες που δείχνουν ότι τα φθαλικά βρίσκονται τόσο σε ανεπεξέργαστα δείγματα των αστικών αποχετεύσεων, όσο και μετά από πρωτοβάθμιο και δευτεροβάθμιο καθαρισμό τους αλλά και μετά από την εκροή και διάθεση στο περιβάλλον.

6. Μελλοντικές προοπτικές στη χρήση της LPME

Η τεχνική μικροεκχύλισης LPME αποδεικνύεται ότι είναι αποτελεσματική, με πλήθος εφαρμογών. Είναι απλοϊκή στην εφαρμογή της και ακόμα, σύμφωνη με τις αρχές της Πράσινης Χημείας, που θέλει κάθε χημική δραστηριότητα να είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να μειώνεται ή να εξαλείφεται η χρήση ή η δημιουργία επικίνδυνων ουσιών.

Οι δυνατότητες της LPME στην προσυγκέντρωση των αναλυτών από υδατικά διαλύματα μένει να διερευνηθεί περαιτέρω με την εξέταση και άλλων παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοσή της. Σημαντική είναι η μελέτη του λόγου των όγκων της οργανικής και της υδατικής φάσης που πρέπει να χρησιμοποιηθεί, καθώς και αν η προσθήκη μικρής ποσότητας του οργανικού διαλύτη στο υδατικό διάλυμα μπορεί να ενισχύσει την εκχύλιση των ενώσεων προς την οργανική φάση. Μελέτη των παραγόντων αυτών έχει γίνει σε ορισμένο βαθμό με χρήση PAH και τα αποτελέσματά της αποτελούν ξεχωριστή έρευνα, η οποία πραγματοποιήθηκε στο ίδιο εργαστήριο και από το ίδιο άτομο με την παρούσα εργασία.

Η τεχνική αυτή ακόμα, αναμένεται να δοκιμαστεί και στον προσδιορισμό νιτροπαραγώγων των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Nitro-PAH) αλλά και στον προσδιορισμό των προϊόντων αποδόμησής τους με χρήση υπερήχων.

Βιβλιογραφία

1. Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse/ Metcalf&Eddy, Inc.- 3rd ed/ revised by George Tchobanoglous, Frank Burton.
2. Περιβαλλοντική Χημεία ΙΙ. Π. Σίσκος, Μ. Σκούλλος. Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Αθηνών 1990.
3. Marttinen S, Kettunen R, Rintala J. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. The Science of the Total Environment. 2003;**301**:1-12.
4. www.epa.gov
5. Manoli E, Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. Trends in analytical chemistry. 1999;**18no6**:417-428.
6. Psillakis E, Kalogerakis N. Developments in liquid-phase microextraction. Trends in Analytical Chemistry.
7. Mester Z, Sturgeon R, Pawliszyn J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. Spectrochimica Acta Part B. 2001;**56**:233-260.
8. Penalver A, Pocurull E, Borull F, Marce R.M. Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. Trends in Analytical Chemistry 1999;**18**:557-568.
9. Eisert R, Pawliszyn J. New trends in solid-phase microextraction. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 1997;**27(2)**:103-135.
10. Jeannot MA, Cantwell FF. Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at a tip of a syringe needle. Analytical chemistry 1997;**69**:235-239.
11. King S, Meyer J, Andrews A. screening method for polycyclic aromatic hydrocarbons in soil using hollow fiber membrane solvent microextraction. J Chrom A 2002;**982**:201-208.
12. Rasmussen K,E, Pedersen-Bjergaard S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. Trends in Analytical Chemistry. 2004;**23**:1-10.
13. Εργαστηριακές Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας. Χατζηγιάννου Θ. Π. Πανεπιστήμιο Αθηνών 1996.
14. Εισαγωγή στην Εξέταση των Τροφίμων. Γαλανού Δ., Βουδούρη Ε. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών.
15. Αναλυτικές Μέθοδοι Διαχωρισμού. Σίσκος Π., Νικολέλης Δ. Αθήνα 1991.

-
16. Basic Gas Chromatography, Techniques in Analytical Chemistry. McNair H., Miller J. John Wiley & Sons Publication 1998.
 17. Ενόργανη Χημική Ανάλυση. Παπαδογιάννης Ν. Ιωάννης, Σαμανίδου Φ. Βικτωρία Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2001.
 18. Gas Chromatography. A Practical Course. Schomburg G. VCH Publishers, Inc., New York 1990.
 19. Mass Spectrometry. Analytical Chemistry by Open Learning 2nd edition, James Baker. John Willey & Sons Ltd ©1999.
 20. Basheer, C., Balasubramanian, R., Lee, H.K., 2003. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fibre membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1016, 11-20.
 21. Charalabaki M, Psillakis E, Mantzavinos D, Kalogerakis N. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fibre liquid-phase microextraction
 22. Marttinen, S.K., Kettunen, R.H., Rintala, J.A., 2003. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. *Sci. Tot. Environ.* 301, 1-12.