



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΤΟΜΟΑΠΩΘΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ
ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗΣ
ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΑΕΡΙΑ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ – ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ»**

ΞΥΝΟΓΑΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΨΥΛΛΑΚΗ Ε. (ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)
ΠΑΡΑΝΥΧΙΑΝΑΚΗΣ Ν. (ΔΕΚΤΟΡΑΣ)
ΤΥΡΟΒΟΛΑ Κ. (ΔΙΔΑΚΤΩΡ)

ΧΑΝΙΑ, 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπλ. Καθηγήτρια κα. Ψυλλάκη Ε. και την Δρ. Τυροβολά Κ. για τις συμβουλές και την υποστήριξη τους που ήταν καθοριστικές για την ολοκλήρωσή της.

Τον Καθηγητή κ. Διαμαντόπουλο Ε. για την ευγενή παραχώρηση χώρου του εργαστηρίου Τεχνολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος καθώς επίσης και την Υπεύθυνη εργαστηρίου κα. Κουκουράκη Ε. για τις συμβουλές της στον τρόπο λειτουργίας του GC-MS και για την βοήθειά της στην αντιμετώπιση επίλυση διαφόρων προβλημάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω των Λέκτορα κ. Παρανυχιανάκη Ν. για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την αξιολόγηση της διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση μιας μεθόδου ανίχνευσης τριών ενώσεων που χρησιμοποιούνται σε εντομοαπωθητικά, τα οποία είναι τα N,N – διαθυλο – μετα – τολουαμίδη (DEET), Βουτυλ-3,4-διυδρο-2,2-διμεθυλο-4-οξο-πυράν-6-καρβοξύλο (Butopyronoxyl) και διπρόδυλο πιριδίνη-2,5-δικαρβόξύλο (R-326). Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνονται με την τεχνική της Μικροεκχύλισης στερεής Φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME) σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία και φασματομετρία μαζών (Gas Chromatography – Mass Spectroscopy, GC-MS).

Σκοπός της εργασίας είναι η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την ανίχνευση και ανάλυση των τριών μελετώμενων εντομοαπωθητικών ενώσεων. Η συγκεκριμένη μέθοδο εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα. Τα δείγματα που μελετήθηκαν συλλέχτηκαν από την είσοδο και την έξοδο του βιολογικού καθαρισμού των Χανίων, από επιφανειακό νερό ποταμού καθώς επίσης και από νερό βρύσης. Σκοπός της εφαρμογής αυτής ήταν η δημιουργία μητρώων και η πιστοποίηση της εγκυρότητας της μεθόδου. Η μέθοδος παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και είναι γραμμική. Μπορεί να εφαρμοστεί γρήγορα και αποδοτικά στην ανίχνευση των ενώσεων σε δείγματα βιολογικού καθαρισμού και πόσιμου νερού.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	5
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Χημικές και φυσικές ιδιότητες.....	8
1.2. Χρήσεις και εφαρμογές των εντομοαπωθητικών.....	11
1.3. Τοξικότητα	15
1.3.1. DEET	15
1.3.2. Butopyronoxyl.....	16
1.3.3. R-326	16
1.4. Περιβαλλοντική τύχη των εντομοαπωθητικών	21
1.5. Επίπεδα συγκέντρωσης των ουσιών στο περιβάλλον	21
1.6. Υπάρχουσες εξελιγμένες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων	21
1.7. Μικροεκχύλιση στερεή φάσης, SPME (Solid-phase micro extraction).....	23
1.8. Αέρια Χρωματογραφία	29
1.8.1. Διάταξη αέριου χρωματογράφου.....	30
1.8.2. Φασματομετρία Μάζας.....	32
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	37
2.1. Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια.....	37

2.2. Δείγματα.....	37
2.3. Διαδικασία SPME	38
2.4 Μέθοδος Αέριου Χρωματογράφου GC-MS	39
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
3.1. Προκαταρκτικά πειράματα: επιλογή τρόπου εκχύλισης και ίνας-SPME ...	41
3.2. Βελτιστοποίηση μεθόδου	43
3.2.1. Επιλογή όγκου διαλύματος.....	43
3.1.5. Επίδραση αλατότητας.....	45
3.1.5. Επιλογή ταχύτητας ανάδευσης	46
3.1.6. Επιλογή χρόνου εκχύλισης	47
3.2. Επίδοση μεθόδου.....	48
4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (MATRIX EFFECTS).....	51
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	52
6.ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	52
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1:Μελετώμενες ουσίες, δομή και άλλα χαρακτηριστικά	10
Πίνακας 2:Κατασκευαστές, Προμηθευτές και Μάρκες εντομοαπωθητικών	14
Πίνακας 3:Προφίλ οξείας τοξικότητας του εντομοαπωθητικού R - 326.....	17
Πίνακας 4:Αριθμός εφαρμογών του R-326 ανά μέρα λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα ανησυχίας για τη μη εμφάνιση καρκίνου	20
Πίνακας 5:Δεδομένα που εισήχθησαν στο GC-MS στη μέθοδο SCAN.....	40
Πίνακας 6: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα αέριου χρωματογράφου	40
Πίνακας 7:Μάζες που καταμετρήθηκαν κατά τη μέθοδο SIM.....	41
Πίνακας 8:Επαναληψιμότητα	49
Πίνακας 9: Σύγκριση μεθόδου SBSE με SPME	50
Πίνακας 10:Ποσοστά ανάκτησης ενώσεων από πραγματικά δείγματα.....	51
Πίνακας 11:Ονομασίες ενώσεων, δομές και άλλα σχετικά δεδομένα.....	57

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Απόκριση μηχανήματος με χρήση διαφόρων ινών-SPME	43
Σχήμα 2: Επιλογή όγκου	44
Σχήμα 3: Επίδραση αλατότητας	45
Σχήμα 4: Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης	46
Σχήμα 5: Χρόνος ανάδευσης	48

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1:Σχηματική αναπαράσταση της ροφητικής ράβδου εκχύλισης	22
Εικόνα 2:Μέρη από τα οποία αποτελείται η ίνα SPME	24
Εικόνα 3:Είδη εκχύλισης SPME, (α) άμεση εκχύλιση, (b) εκχύλιση στην αέρια φάση, (c) εκχύλιση με μεμβράνη	25
Εικόνα 4:Εφαρμογή SPME δειγματοληψίας με δύο τρόπους: παραλαβή πτυτικών συστατικών από το εσωτερικό διάκενο του φιαλιδίου (αριστερά), παραλαβή των πτυτικών συστατικών από το υγρό διάλυμα (δεξιά).....	27
Εικόνα 5:Διάταξη Αέριου Χρωματογράφου.....	32
Εικόνα 6:Διάταξη Τετραπολικού Φίλτρου Μάζας	34
Εικόνα 7:Αρχή λειτουργίας τετραπολικού φίλτρου μάζας.....	35

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα εντομοαπωθητικά είναι ουσίες οι οποίες τοποθετούνται στο δέρμα, στα ρούχα και σε άλλες επιφάνειες προκειμένου να αποτρέψουν έντομα και ιδιαίτερα αραχνοειδή να τις προσεγγίσουν και κατά συνέπεια να τις αλλοιώσουν. Είναι ουσιαστικά εναλλακτικά σκευάσματα των εντομοκτόνων, τα οποία δεν έχουν σχεδιαστεί για να σκοτώνουν τα έντομα αλλά για να τα απομακρύνουν [25].

Τα εντομοαπωθητικά έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να έρχονται σε επαφή με το δέρμα ή με ρούχα. Έχουν σκοπό να απομακρύνουν και να προλαμβάνουν από διάφορα τσιμπήματα εντόμων, όπως κουνουπιών, μυγών ή από τσιμπήματα τσιμπουριών, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν τοπικούς ερεθισμούς, αλλεργικές αντιδράσεις ακόμα και αρρώστιες όπως ελονοσία, την αρρώστια του λύκου (Lyme disease), καθώς και διάφορες εγκεφαλοπάθειες. Χρησιμοποιούνται παγκοσμίως για την πρόληψη τέτοιου είδους ασθενειών και η ανάπτυξή τους έχει αυξηθεί ραγδαία [25].

Τα εντομοαπωθητικά δημιουργούν ένα αέριο στρώμα το οποίο έχει δυσάρεστη οσμή ή γεύση στα έντομα. Τέτοιου είδους εντομοαπωθητικά είναι το N,N – διάθυλο – μετά – τολουαμίδη ή εν συντομία DEET , το Βουτυλ-3,4-διυδρο-2,2-διμεθυλο-4-οξο-πυράν-6-καρβοξύλο ή αλλιώς Butopyronoxyl και το διπρόπυλο πιριδίνη-2,5-δικαρβόξύλο ή R-326 τα οποία θα μελετηθούν στην παρούσα εργασία. Το Butopyronoxyl αποτελεί ένα από τα πρώτα εντομοαπωθητικά που δημιουργήθηκαν πριν από το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο το 1937. Το DEET και το R-326 εμφανίστηκαν αργότερα, με αρκετά εκτεταμένη τη χρήση του DEET, σε αντίθεση με τη χρήση του R-326, το οποίο εμφανίζεται στα διάφορα σκευάσματα πάντα σε συνδυασμό με το πρώτο [20].

Ο στρατός έπαιξε πολύ σημαντικό ρόλο στην έρευνα για την ανάπτυξη των εντομοαπωθητικών. Τα πρώτα εντομοαπωθητικά, όπως η σιτρονέλλα, είχαν ως βάση διάφορα συστατικά φυτών και είχαν περιορισμένη χρονική διάρκεια δράσης [20]. Γι' αυτό το λόγο κατά τη διάρκεια του δεύτερου παγκόσμιου πολέμου άρχισε καινούργια έρευνα για την εύρεση εντομοαπωθητικών μεγάλης διάρκειας. Το 1937 ένα από τα πρώτα χημικά εντομοαπωθητικά ήταν το Butopyronoxyl. Το 1942, σε εργαστηριακή έρευνα που διεξήχθη από τους Madden, Linguist και Knipling έδειξε ότι το Butopyronoxyl αποτελεί σημαντική προστασία για τα αραχνοειδή (chiggers) [20].

Μία ριζοσπαστική ανακάλυψη έγινε το 1953 με την δημιουργία του DEET. Αυτό είναι ίσως και το πιο σημαντικό γεγονός στην ιστορία των εντομοαπωθητικών, καθώς το DEET παραμένει το βασικό συστατικό σε διάφορα σκευάσματα όπως επίσης και το πιο αποτελεσματικό απωθητικό για πάνω από 50 χρόνια μετά από την ανακάλυψή του. Το DEET βρίσκεται εφαρμογή σε μεγάλο φάσμα περιπτώσεων εναντίον όλων σχεδόν των ειδών κουνουπιών, μυγών και τσιμπουριών. Γι αυτό και παραμένει το βασικό μέτρο σύγκρισης ως προς την απόδοση και τη δράση για οποιαδήποτε νέα μελετώμενη ουσία [20].

Υπολογίζεται ότι 15 εκατομμύρια άνθρωποι στην Μεγάλη Βρετανία, 78 εκατομμύρια στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και 200 εκατομμύρια παγκοσμίως χρησιμοποιούν το DEET κάθε χρόνο. Οι παρενέργειες που εμφανίζει η χρήση του είναι λίγες, καθώς πολλά από τα περιστατικά είχαν ιστορικό από εκτενή χρήση και εφαρμογή του [20].

Μετά την ανακάλυψη του DEET άρχισαν να δημιουργούνται φόρμουλες τέτοιες ώστε να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα του ενεργού συστατικού των εντομοαπωθητικών σκευασμάτων, το οποίο συνήθως ήταν το DEET. Τέτοια φόρμουλα είναι το διπρότυλο R-326 το οποίο κατασκευάστηκε αποκλειστικά γι αυτό το σκοπό. Εργαστηριακές έρευνες που έχουν διεξαχθεί, έχουν αποδείξει ότι το R-326 είναι αποτελεσματικό παρά μόνο όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα απωθητικά και όχι μόνο του [20] .

1.1. Χημικές και φυσικές ιδιότητες

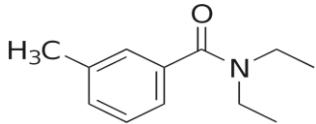
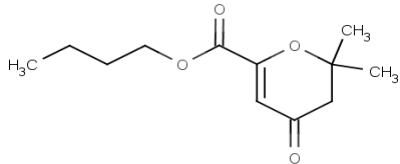
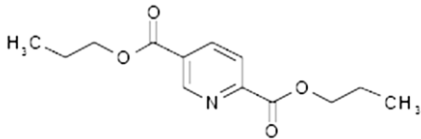
Η N,N – διαθυλο – μετα – τολουαμίδη (N,N, -DIET-3-ME BENZAMIDE) ή DEET είναι μία υγρή ένωση με μοριακό τύπο $C_{12}H_{17}NO$ και Cas number: 000134-62-3, έχει μοριακό βάρος 191,28 με σημείο τήξης στους $-45^{\circ}C$ και σημείο βρασμού στους $290^{\circ}C$. Είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, δηλαδή 912 mg/L στους $25^{\circ}C$ [7]. Άλλες ουσίες στις οποίες μπορεί να διαλυθεί είναι η αιθανόλη, ο αιθέρας, η ισοπροπανόλη, το χλωροφόρμιο, η αλκοόλη, το βενζόλιο και η κετόνη, μερικώς διαλυτό είναι σε πετρελαϊκό αιθέρα και σε γλυκερίνη. Το DEET έχει ελαφριά οσμή και ανοιχτό κίτρινο χρώμα. Η πίεση εξάτμισή του κυμαίνεται στα 0,002 mm Hg στους $25^{\circ}C$ [1] και η πυκνότητά του ισούται με 0,996 στους $20^{\circ}C$ [20].

Το Βουτυλ-3,4-δωδρο-2,2-διμεθυλο-4-οξο-πυράν-6-καρβοξυλο (Butyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-4-oxo-2H-pyran-6-carboxylate) ή αλλιώς Butopyronoxyl ή Ινδαλόνη (Indalone) είναι μία υγρή ένωση με μοριακό τύπο $C_{12}H_{18}O_4$ και Cas number: 532-34-3, έχει μοριακό βάρος 226,27 με θερμοκρασία τήξης κάτω από $25^{\circ}C$ και θερμοκρασία βρασμού στους $264^{\circ}C$. Πρακτικά δεν είναι διαλυτό στο νερό, δηλαδή 275 mg/l στους $25^{\circ}C$ [7], είναι μερικώς διαλυτό σε αλκοόλη, σε αιθέρα και σε χλωροφόρμιο. Διαλυτό είναι σε βενζόλιο. Το Butopyronoxyl είναι πτητική ένωση με πίεση εξάτμισης 2.5×10^{-4} mm Hg στους $25^{\circ}C$ [1]. Έχει οσμή και το χρώμα του ποικίλη από κίτρινο σε ανοιχτό κόκκινο-καφέ. Η πυκνότητά του κυμαίνεται από 1,052-1,06 στους $25^{\circ}C$ [28].

Το διπρόπυλο πριδίνη-2,5-δικαρβοξύλο (di-n-propyl isocinchomeronate ή dipropyl pyridine-2,5-dicarboxylate) ή R-326 ή MGK-326 είναι μία υγρή ένωση με μοριακό τύπο $C_{13}H_{17}NO_4$ και Cas number 136-45-8, έχει μοριακό βάρος 251,28. παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα στο νερό, δηλαδή 20,8 mg/l στους $25^{\circ}C$ [7], δηλαδή είναι πρακτικά αδιάλυτο. Το R-326 είναι διαλυτό σε πετρελαϊκά αποστάγματα, όπως στην κηροζίνη (kerosene), στο τολουόλιο (toluene), στο ξυλόλιο (xylene), στη μεθανόλη (methanol), στην αιθανόλη (ethanol) και στην ισοπροπανόλη (isopropanol) [10]. Είναι πτητική ένωση με πίεση εξάτμισης 5.48×10^{-4} mm Hg στους $25^{\circ}C$ [4].

Στον πίνακα 1 που παρατίθεται στη συνέχεια αναρτώνται συνοπτικά οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και άλλα συγκεντρωτικά χαρακτηριστικά αυτών.

Πίνακας 1: Μελετώμενες ουσίες, δομή και άλλα χαρακτηριστικά¹

Συντομογραφία	Ονομασία	Cas. no.	Εμπειρικός Τύπος	Δομή	LogK _{ow}
DEET	N,N-διαθυλο-μετα-τολουαμίδη	134-62-3	C ₁₂ H ₁₇ NO		2.18
Butopyronoxyl	Βουτυλ-3,4-διυδρο-2,2-διμεθυλο-4-οξο-πυράν-6- καρβοξυλο	532-34-3	C ₁₂ H ₁₈ O ₄		2.42
R-326/ MGK-326	Διπρότυλο πιριδίνη-2,5-δικαρβόξυλο	136-45-8	C ₁₃ H ₁₇ NO ₄		3.57

¹ Πηγή [25]

1.2. Χρήσεις και εφαρμογές των εντομοαπωθητικών

Τα τσιμπήματα από έντομα, πιο συνηθισμένα από κουνούπια, μύγες και ψύλλους, μπορούν να προκαλέσουν ερεθισμό του δέρματος και αλλεργικές αντιδράσεις που με τη σειρά τους πιθανόν να οδηγήσουν σε μολύνσεις δευτέρου βαθμού ή ακόμα και σε μεταφορά νόσων, όπως είναι ο πυρετός Δυτικού Νείλου, η ελονοσία, μέχρι και εγκεφαλίτιδα που μεταδίδεται από τσιμπούρι [25].

Η προέλευση των εντομοαπωθητικών μπορεί να είναι είτε από φυσική πηγή είτε από συνθετική παραγωγή δραστικών ουσιών. Τα κουνούπια και άλλα έντομα που τρέφονται με αίμα έλκονται κυρίως από το γαλακτικό οξύ (lactic acid) και από το βουτανοϊκό οξύ (butanoic acid) που απελευθερώνονται κατά τη διαπνοή, τα εντομοαπωθητικά λοιπόν καλύπτουν την ανθρώπινη μυρωδιά κι έτσι αποπροσανατολίζουν τα έντομα. Το 1930, μόνο τέσσερα απωθητικά ήταν γνωστά: το λάδι σιτρονέλλας (citronella) , φθαλικός διμεθυλεστέρας (dimethyl phthalate, DMP), το Βουτυλ-3,4-διυδρο-2,2-διμεθυλο-4-οξο-πυράν-6-καρβοξύλο (Butopyronoxyl ή indianol) και 2-ethyl-1,3-hexanediol (ονομάζεται και ethohxadiol ή Rutgers 612). Όσον αφορά το Butopyronoxyl, το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, είναι αποτελεσματικό κυρίως κατά του τσιμπήματος από μύγα (stable fly: *Stomoxys calcitrans*) [25]. Οι ιδιότητες του DEET ανακαλύπτονται στα μέσα του 1953. Η δομή του DEET είναι παρεμφερή με τη δομή μιας ουσίας που βρίσκεται στη ντομάτα και η οποία λειτουργεί ως φυσικό εντομοαπωθητικό. Καταγράφεται επισήμως ως εντομοαπωθητικό το 1965. Το DEET είναι το πιο αποτελεσματικό παγκοσμίως χρησιμοποιούμενο εντομοαπωθητικό κατά των κουνουπιών και των ψύλλων. Αποτελεσματικές φόρμουλες εμπεριέχουν 10-100% DEET και το 1990 υπολογίστηκε κατανάλωσή του γύρω στο 1.8×10^6 kg. Άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται ως εντομοαπωθητικά είναι το R-326 και η περμεθρίνη (permethrin). Το R-326 είναι το πιο αποτελεσματικό απωθητικό κατά διαφόρων μυγών, της σκνίπας και άλλων παρόμοιων εντόμων [25].

Στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν όπως έχει προαναφερθεί τρεις χημικές ενώσεις που εμπεριέχονται σε εντομοαπωθητικά: το DEET, το Butopyronoxyl και το R-326 οι χρήσεις των οποίων θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια.

Όσον αφορά το DEET υπάρχουν πάνω από 225 προϊόντα στην αγορά που το εμπεριέχουν και παρασκευάζονται από 7 εταιρίες [8,10]. Υπολογίζεται ότι γύρω στο 21-30 % των νοικοκυριών χρησιμοποιούν DEET κάθε χρόνο. Εμπεριέχεται σε διάφορα προϊόντα για να απωθεί μύγες, τσιμπούρια, κουνούπια, σκνίπες και άλλα μικρά πετούμενα έντομα. Επίσης το DEET εμπεριέχεται και σε προϊόντα που είναι καταχωρημένα για κατ' οίκον χρήση με άμεση εφαρμογή στο δέρμα, σε ρούχα, καθώς και σε κατοικίδια ζώα (γάτες, σκύλους και άλογα). Εφαρμόζεται με τη μορφή κρέμας, αεροζόλ και μη αεροζόλ σπρέι, καθώς και σε προϊόντα που είναι εμποτισμένα με αυτό, παραδείγματος χάριν περιλαίμια ζώων. Οι συγκεντρώσεις της χημικής ένωσης DEET κυμαίνονται από 4-100 % σε διάφορα προϊόντα. Η χρήση του σε τρόφιμα απαγορεύεται ρητά [10].

Το Butopyronoxyl ή Indalone έχει αποδειχθεί πιο αποτελεσματικό για την πρόληψη από τσίμπημα ψύλλων σε αντίθεση με άλλο πρόωρο συνθετικό απωθητικό, συμπεριλαμβανομένου και του DEET. Αρχικά, εφαρμόστηκε σε στρατιωτικές στολές, καθώς παρείχε πάνω από 70 % προστασία από ενήλικους και προνύμφες *A. americanum* (τσιμπούρι) με χρονική διάρκεια δύο εβδομάδων μετά την εφαρμογή του. Ομοίως, εφαρμόστηκε και σε κάλτσες για την απώθηση του *I. scapularis* (τσιμπούρι) με χρονική διάρκεια δράσης του τριών εβδομάδων. Στην κλωστοϋφαντουργία εφαρμοζόταν με τη μορφή ακετονικού διαλύματος Butopyronoxyl και παρείχε προστασία πάνω από 90 % με χρονική διάρκεια δράσης μεγαλύτερη των πέντε ημερών, για την αντιμετώπιση του τσιμπουριού *A. americanum*. Σε στρατιωτικές στολές εφαρμόστηκε το ίδιο διάλυμα παρέχοντας προστασία άνω του 90 % για διάστημα 30 ημερών. Σε στολές εργασίας παρείχε προστασία μόνο 49 % εν αντιθέσει με άλλα αντίστοιχα απωθητικά που παρείχαν 76% προστασία για διάστημα τεσσάρων ημερών. Μελέτες έδειξαν ότι η δράση του Butopyronoxyl μειώθηκε στο 39 % στις περιπτώσεις που τα υφάσματα πλύθηκαν δύο φορές σε διάστημα μιας εβδομάδας. Τέλος, το Butopyronoxyl με τη μορφή γαλακτώματος παρέχει προστασία 83 % χρονικής διάρκειας έξι εβδομάδων μετά την εφαρμογή του, ενώ σε μορφή αεροζόλ η προστασία του ανέρχεται μόλις στο 22 % για χρονική διάρκεια τεσσάρων εβδομάδων [26].

Η χημική ένωση MGK-326 ή R-326 χρησιμοποιείται ως εντομοαπωθητικό με εφαρμογή σε κατοικίδια ζώα, όπως γάτες (ανήλικες/ενήλικες), σκύλους (ανήλικους/ενήλικους) και άλογα (όχι στην τροφή) και στους χώρους διαμονής αυτών, καθώς και στους ανθρώπους στο δέρμα και στο ρουχισμό. Το R-326 χρησιμοποιείται για να επεκτείνει τη δράση του DEET στα διάφορα τσιμπήματα. Γενικά οι στόχοι του R-326 είναι η πρόληψη από τσιμπήματα μύγας, ψύλλου, τσιμπουριού, σκνίπας και κουνουπιού, στους ανθρώπους και στα ζώα. Τεχνικά, ο βαθμός δραστηριότητας του στα διάφορα σκευάσματα είναι 97 % αλλά για χρήση του στη βιομηχανία κυμαίνεται από 7,70-50 %. Όσον αφορά την εφαρμογή του στους ανθρώπους πάντα χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη χημική ένωση DEET και με το εντομοαπωθητικό MGK-264. Εμφανίζεται σε προϊόντα με τη μορφή αεροζόλ με δραστηριότητα που κυμαίνεται από 1-2,5 % ενώ στα προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση εμφανίζεται σε μορφή λοσιόν και σπρέι με δραστηριότητα που κυμαίνεται από 1,76-4 %. Στην εφαρμογή του σε ζώα το ποσοστό δράσης του R-326 κυμαίνεται στο 4 % ενώ για εξωτερική χρήση, παράδειγμα ψεκασμό αχυρώνων ή γενικότερα χώρων διαμονής ζώων το ποσοστό δραστηριότητας φθάνει στο 5 %. Τέλος υπάρχουν και προϊόντα που χρησιμοποιούνται σε είδη υγιεινής και εμπεριέχουν R-326. Το ποσοστό δραστηριότητας του σε τέτοια προϊόντα ανέρχεται στο 0,2-1 %. Τέτοιου είδους προϊόντα εφαρμόζονται συνήθως σε άλογα [17].

Στον πίνακα 2 παραθέτονται προϊόντα και οι κατασκευαστές αυτών που χρησιμοποιούν DEET, Butopyronoxyl και R-326. Όσον αφορά τα προϊόντα που εμπεριέχουν το Butopyronoxyl δεν κυκλοφορούν πλέον στην αγορά [31].

Πίνακας 2:Κατασκευαστές, Προμηθευτές και Μάρκες εντομοαπωθητικών²

Ενεργό Συστατικό	Μάρκες	Κατασκευαστές και Προμηθευτές
DEET (5-100%)	Υπάρχουν πολλές μάρκες, φόρμουλες και διαφορετικές συγκεντρώσεις από πολλούς κατασκευαστές και προμηθευτές (~230 προϊόντα) οι πιο γνωστές από αυτές είναι: Off, Cutter, Repel, Muskol, Ben's, Sawuer, BugX.	Off, S.C.Johnson & Sons, Inc. Cutter, Spectrum Brands, Inc. Repel, Inc. Ben's, Natrapel Inc. Sawyer Products
DEET ελεγχόμενης αποδέσμευσης σκευάσματα (controlled release formulations)	3M Ultrathon™ (polymer-based) Sawyer Controlled Release (microencapsulated)	3M Company, Sawyer Pruducts
Butopyronoxyl (ή indalone)	Aldrich butopyronoxyl, Cutter insect repellent, Cutter insect repellent foam, Cutter insect repellent spray, Eureka bug-a-boo personal insect repellent, Insect repell, Nosect repellent by dro, Sportsmate premium insect repellent spray	Haihang Industry Co.Ltd. Jinan Haohua Industry Co. Ltd. Chemos GmbH, Aldrich chemical company, Spectrum Inc. Morton Inc., Contact Industries, Specialty products of America inc., malter international co., Reckitt benckiser inc. ^[1]
MGK -326 (ή R-326)	Εντομοαπωθητικό χρησιμοποιούμενο με DEET συνθέτουν εντομοαπωθητικές φόρμουλες (επίσης περιλαμβάνεται και το MGK-264) Παράδειγμα: Cutter Tick Defense™	Sawyer Products, Inc. Spectrum Brands, Inc.

² Πηγή [31]

1.3. Τοξικότητα

1.3.1. DEET

Ανεπιθύμητες παρενέργειες έχουν αναφερθεί και καταγραφεί από τη χρήση DEET σε παιδιά και ενήλικους. Τέτοιες είναι ο δηλητηριασμός και σε κάποιες περιπτώσεις παρενέργειες νευρολογικής φύσεως, όπως είναι οι πονοκέφαλοι [2,3,11]. Παρόλα αυτά, τα περιστατικά πονοκεφάλων είναι λίγα και ως το 1960 υπολογίστηκε ότι εμφανίζονταν σε ποσοστό ένα στους 100 εκατομμύρια χρήστες, λαμβάνοντας υπόψη τις διαθέσιμες μελέτες και την πιθανότητα μη αναφοράς ή την υπερβολή στην δήλωση πιθανών παρενεργειών μετά από χρήση του DEET [5,6]. Περιστατικά εγκεφαλοπάθειας, τρέμουλο, προβλήματα στο λόγο, διαφορές στη συμπεριφορά, κώμα ακόμα και θάνατος έχουν αναφερθεί ως πιθανή αιτία χρήσης του DEET σε παιδιά. Εντούτοις η U.S. EPA θεώρησε ότι τα στοιχεία δεν ήταν επαρκή για να καθοριστεί η έκθεση σε DEET ως η αιτία αυτών των περιστατικών [17]. Τέτοιου είδους αναφορές αφορούν συνήθως συνεχείς δερματικές εφαρμογές ή πιο συνηθισμένα κατάποση του DEET [3,11,26]. Μία μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι άτομα με μη κανονικό μεταβολισμό αμμωνίας μπορεί να έχουν αυξημένη ευαισθησία σε δυσμενείς επιπτώσεις από την έκθεση σε DEET [24]. Όσον αφορά την καρκινογένεση μετά από επαφή με DEET δεν υπάρχουν στοιχεία από μελέτες που να υποδηλώνουν τη συσχέτισή του με κάποια μετάλλαξη, ύστερα από εφαρμογές που έχουν γίνει σε ενήλικους αρουραίους και ποντικούς, με λήψη από το στόμα της συγκεκριμένης ουσίας. Ο Παγκόσμιος οργανισμός Υγείας για έρευνα πάνω στον καρκίνο (World Health Organization International Agency for Research on Cancer, IARC) δεν έχει αξιολογήσει ακόμα την καρκινογένεση από DEET [24].

Θάνατος των κυττάρων έχει παρατηρηθεί σε αρσενικούς ενήλικους ποντικούς μέσω δερματικής έκθεσης τους σε συνδυασμό των χημικών ενώσεων DEET, περμεθρίνη (permethrin) και pyridostigmine bromide. Αυτός ο συνδυασμός χημικών μελετήθηκε ως πιθανή αιτία προβλημάτων του ουροποιογεννητικού συστήματος σε βετεράνους στρατιώτες στον πόλεμο του κόλπου, καθώς είχαν εκτεθεί σε αυτό τον συνδυασμό χημικών κατά την παραμονή τους [20,24]. Σε μελέτες που έγιναν σε κυοφορούντα κουνέλια φαίνεται να διαπερνά το DEET τον πλακούντα μετά από δερματική επαφή ή με ένεση. Γενικά πολλές μελέτες τοξικότητας σε ποντίκια και

κουνέλια έχουν γίνει πάνω στην αναπαραγωγή, εμβρυική και αναπτυξιακή τους ζωή, από τις οποίες λίγες είναι αυτές που δεν παρουσιάζουν τοξικότητα σε επαναληπτικές δόσεις λιγότερο των 250 mg/kg/day. Παρόλα αυτά χρειάζεται περεταίρω μελέτη για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων [24].

1.3.2. Butopyronoxyl

Το butopyronoxyl έχει ταξινομηθεί ως ένα αρωματικό εντομοαπωθητικό επαφής καθώς είναι ελαφρώς ασταθές και το έντομο πρέπει να έρθει σε επαφή με την επιφάνεια εφαρμογής του για να απωθηθεί. Σε μελέτες για την απώθηση τσιμπουριών ήταν ένα αποτελεσματικό απωθητικό και φάνηκε να είναι ασφαλές για χρήση σε ρούχα και άμεση εφαρμογή στο δέρμα [8]. Η τοξικότητα κατάποσης του Butopyronoxyl είναι χαμηλή για ποντίκια το LD₅₀ (χαμηλότερη δόση με θάνατο του 50 % του μελετώμενου πληθυσμού) ισούται με 13,700 mg/kg, παρόλα αυτά, προβλήματα στα νεφρά και στο συκώτι παρατηρήθηκαν σε τρωκτικά μετά από έκθεση για παρατεταμένο χρονικό διάστημα [3].

1.3.3. R-326

Το R-326 παρουσιάζει χαμηλή οξεία τοξικότητα μέσω της κατάποσης (κατηγορία τοξικότητας III), μέσω επαφής με το δέρμα (κατηγορία τοξικότητας III) και μέσω της εισπνοής (κατηγορία τοξικότητας IV). Επειδή το R-326 δεν προκαλεί ερεθισμό στα μάτια και στο δέρμα, έχει καταταχθεί στην κατηγορία τοξικότητας III και IV, αντίστοιχα [17].

Το προφίλ του R-326 για οξεία τοξικότητα συνοψίζεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Προφίλ οξείας τοξικότητας του εντομοαπωθητικού R - 326³

Είδος Μελέτης	Αποτελέσματα	Κατηγορία Τοξικότητας
Μέσω Κατάποσης	LD ₅₀ = 5850 mg/kg , αρσενικός πληθυσμός LD ₅₀ = 4270 mg/kg, θηλυκός πληθυσμός LD ₅₀ = 5120 mg/kg, αρσενικός και θηλυκός πληθυσμός	III Βάση την τοξικότητα σε θηλυκούς πληθυσμούς
Μέσω Δερματικής Επαφής	LD ₅₀ => 2000 mg/kg	III
Μέσω εισπνοής	LC ₅₀ => 6.09 mg/L	IV
Ερεθισμός Ματιών	Μη ερεθισμός	III
Δερματικός Ερεθισμός	Μη ερεθισμός	IV

³ Πηγή [10]

Για τον προσδιορισμό των ορίων χρόνιας τοξικότητας μιας χημικής ένωσης, εντοπίζεται το επίπεδο μη παρατηρούμενης επιβλαβούς επίδρασης της ουσίας (no observed adverse effect level, NOAEL). Ο συντελεστής NOAEL αναφέρεται στο επίπεδο έκθεσης σε μία ουσία, το οποίο δεν μπορεί να προκαλέσει καμία αρνητική επίδραση στον εκτιθέμενο οργανισμό, επιλέγεται από μελέτες που προσεγγίζουν καλύτερα τη διάρκεια και τον τρόπο έκθεσης στο συγκεκριμένο χημικό. Επειδή είναι ιδιαίτερα δύσκολο να προσδιοριστεί συνήθως αντικαθίσταται από την παράμετρο «επίπεδο μη παρατηρούμενης επίδρασης» (no observed effect level, NOEL), η οποία εκφράζει τη μέγιστη δυνατή δόση έκθεσης που δεν προκαλεί αρνητική επίδραση στον εκτιθέμενο οργανισμό, αναφερόμενη μόνο σε τοξικολογικές επιδράσεις [22].

Έκθεση από οικιακά προϊόντα είναι το μόνο σενάριο έκθεσης για το R-326 βασιζόμενο στα τωρινά δεδομένα. Τοξικολογικές δόσεις και όρια τοξικότητας για εκθέσεις μέσω της τροφής δεν έχουν θεσπιστεί. Από την άλλη πλευρά, τελικά σημεία για περιστασιακή έκθεση έχουν θεσπιστεί για μικρό χρονικό διάστημα (1-30 ημέρες) και για χρήση (1-6 μήνες) [17].

Τόσο για στοματική όσο και για δερματική έκθεση από R-326 επιλέχθηκε NOAEL ίσο με 65 mg/kg/day από μελέτη αναπαραγωγής σε δύο γενιές αρουραίων, κατά την οποία μειώθηκε το σωματικό βάρος των νεογνών κατά τις μέρες της γαλουχίας στο διάστημα της 14-21 ημέρας και η παράμετρος του χαμηλότερου επιπέδου παρατηρούμενης επιβλαβούς επίδρασης (lowest observed adverse effect level, LOAEL) ήταν τα 250 mg/kg/day. Χάρη στη χαμηλή τοξικότητα που παρατηρήθηκε σε μελέτη με αρουραίους με τη μέγιστη δυνατή δόση και για διάρκεια 90 ημερών μέσω εισπνοής, έχει προσδιοριστεί το NOAEL ίσο με 60 mg/kg/day, που αποτελεί την υψηλότερη δοκιμασμένη δόση έκθεσης μέσω της αναπνευστικής οδού [17].

Το οριακό σημείο για την εμφάνιση καρκίνου έχει προσδιοριστεί μετά από συνδυασμό χρόνιων τοξικών και καρκινικών μελετών σε αρουραίους και ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα, για τον προσδιορισμό καρκινογένεσης από εντομοαπωθητικά αρχικά αξιολογούνται στοιχεία τα οποία αποδεικνύουν ότι το μελετώμενο απωθητικό είναι καρκινογόνο. Αν υπάρχουν στοιχεία, όπως κάποια μορφή όγκου και έχει καταταχθεί μία ένωση ως καρκινογόνα, τότε διεξάγεται μία ποσοτικοποίηση υπολογίζοντας την πιθανότητα καρκινογένεσης της ένωσης (non-threshold, Q₁) αυτής ή το περιθώριο έκθεσης (margin of exposure, MOE) σε αυτή [17].

Από το 1993, το R-326 έχει κατοχυρωθεί ως πιθανή καρκινογόνα ουσία, ύστερα από μελέτες για την εμφάνιση καρκίνου που έγιναν σε αρουραίους και ποντικούς, με την καθοδήγηση του Οργανισμού Υγείας. Υπό το φώς αυτών των πορισμάτων ο Οργανισμός Υγείας ποσοτικοποίησε το ρίσκο καρκίνου προσεγγίζοντας το κατώτατου ορίου έκθεσης (Q_1). Η τιμή του Q_1 για το R-326 ισούται με $1.6 \times 10^{-3} \text{ (mg/kg/day)}^{-1}$, βασιζόμενη στην εμφάνιση καρκίνου στο συκώτι ποντικών [17].

Όλα τα προϊόντα που περιέχουν R-326 και προορίζονται για ανθρώπινη χρήση, εμπεριέχουν και DEET ως πρωταρχικό ενεργό συστατικό [6,20].

Στον πίνακα 4 παραθέτεται ο ημερήσιος αριθμός εφαρμογών R-326 στο δέρμα ανάλογα με την υποομάδα πληθυσμού με σκοπό την μη εμφάνιση καρκίνου [17].

Πίνακας 4:Αριθμός εφαρμογών του R-326 ανά μέρα λαμβάνοντας υπόψη τα επίπεδα ανησυχίας για τη μη εμφάνιση καρκίνου⁴

Υπόβαθρο πληθυσμού	Εφαρμοζόμενη Δόση (mg/kg/day)	Βάρος σώματος	Ημερήσια Δόση	Αριθμός εφαρμογών ανά ημέρα
Παιδιά < 12 χρονών	325	25	0.65	3
Παιδιά από 13-17 χρονών	735	56		6
Ενήλικες γυναίκες	806	62		8
Ενήλικες άνδρες	1001	77		8

⁴ Πηγή [24]

⁴ Στόχος είναι το MOE=10

1.4. Περιβαλλοντική τύχη των εντομοαπωθητικών

Υπάρχουν περιορισμένα δεδομένα για την περιβαλλοντική τύχη του DEET. Έχει ανιχνευθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο 75 % των ροών που έχουν μελετηθεί στις Η.Π.Α. Το DEET διασπάται αργά στο έδαφος και είναι φωτοδιασπώμενο [24].

Το Butorygonoxyl δεν αποτελεί ένωση που υδρολύεται εύκολα. Από μελέτες έχει υπολογιστεί ο χρόνος ημιζωής στα 132 χρόνια σε pH ίσο με 7 και στα 13 χρόνια σε pH ίσο με 8. Το Butorygonoxyl είναι φωτοευαίσθητο [30],

Όσον αφορά το R-326 λόγω της περιορισμένης χρήσης του ως ενεργό συστατικό σε προϊόντα η μόνη μελέτη πάνω στην περιβαλλοντική τύχη του ήταν η υδρόλυση. Το R-326 παραμένει σταθερό σε όξινες συνθήκες (pH ίσο με 5) και δεν παρατηρήθηκε μείωση του κατά τη διάρκεια των 30 ημερών που διεξήχθη η έρευνα. Από την άλλη πλευρά, το R-326 άρχισε να υδρολύεται σε ουδέτερο pH (pH ίσο με 7) και μειώθηκε στο μισό η ποσότητά του μέσα σε 17 μέρες. Σε αλκαλικό περιβάλλον (pH ίσο με 9) παρατηρήθηκε μείωση της ποσότητάς του στο μισό μέσα σε 14 ώρες [17].

1.5. Επίπεδα συγκέντρωσης των ουσιών στο περιβάλλον

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αναφορές για τα επίπεδα συγκέντρωσης του DEET, Butorygonoxyl και του R-326 στο περιβάλλον καθώς οι μελέτες που έχουν γίνει είναι περιορισμένες. Αυτό ίσως οφείλεται και στη δυσκολία μελέτης τους στο φυσικό περιβάλλον λόγω της φωτοευαισθησίας που εμφανίζουν.

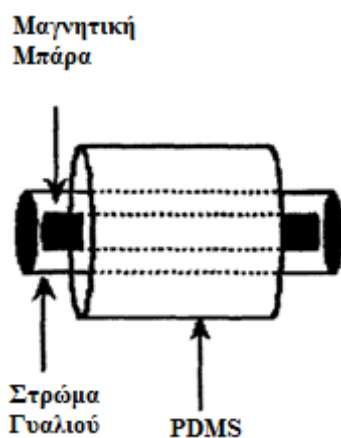
1.6. Υπάρχουσες εξελιγμένες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων

Η μέθοδος εκχύλισης με χρήση ράβδου ρόφησης (Stir bar sorptive extraction, SBSE) αποτελεί μία εναλλακτική τεχνική μικροεκχύλισης. Σε αυτή την τεχνική η ράβδος επικαλύπτεται με ένα πολυμερικό υλικό συνήθως πολυδιμεθύλο σιλοξάνιο (polydimethyl siloxane, PDMS) και στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα αναδευόμενο υδατικό διάλυμα. Η ελεύθερη κίνηση της ράβδου εκχύλισης μέσα στο διάλυμα του δείγματος διευκολύνει την εκχύλιση [9,16].

Η μέθοδος εκχύλισης με ρόφηση είναι από τη φύση της μία τεχνική εύρεσης ισορροπίας μεταξύ των μορίων στην υδατική φάση και εκείνων που προσροφώνται από το υλικό της ράβδου. Σε υδατικά διαλύματα το ποσό της μελετώμενης ουσίας που θα εκχυλιστεί είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με το υλικό ρόφησης της ράβδου [9,16].

Η ράβδος ανάδευσης αποτελείται από τρία μεμονωμένα υλικά. Το εσωτερικό της ράβδου αποτελείται από μία μαγνητική μπάρα, με σκοπό την ανάδευση των υδατικών διαλυμάτων. Γι' αυτό το λόγο το διάλυμα προετοιμάζεται πάνω σε μία μαγνητική πλάκα ανάδευσης. Στη συνέχεια η μαγνητική μπάρα καλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα γυαλιού, με σκοπό την προστασία του μαγνήτη. Αυτό το στρώμα γυαλιού δρα ως τείχος μεταξύ του μαγνήτη και του πολυμερικού υλικού, προστατεύοντας το περίβλημα από την πιθανή οξείδωση του μετάλλου με το χρόνο [16].

Στην εικόνα 1 [16] παρουσιάζεται η σχηματική αναπαράσταση της ράβδου καθώς και τα υλικά που αποτελείται.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της ροφητικής ράβδου εκχύλισης

Αρχικά τοποθετείται το δείγμα μέσα σε ένα φιαλίδιο, όπου εκεί θα πραγματοποιηθεί η εκχύλιση, μαζί με τη μαγνητική ράβδο ανάδευσης και αναδεύεται το δείγμα για μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Ο χρόνος ανάδευσης εξαρτάται από τον όγκο του δείγματος, από την ταχύτητα ανάδευσης και από την ποσότητα προσροφητικού υλικού. Όταν το δείγμα φτάσει σε σημείο ισορροπίας η μπάρα

ανάδευσης αφαιρείται από το δείγμα και σκουπίζεται ελαφρά για την απομάκρυνση σταγονιδίων δείγματος. Τέλος, η μπάρα τοποθετείται σε έναν σωλήνα θερμικής εκρόφησης και η προσροφημένη ποσότητα ουσίας απομακρύνεται από την μπάρα θερμικά μέσω του αέριου χρωματογράφου [9,16]. Επίσης, μία εναλλακτική μέθοδος απομάκρυνσης της προσροφημένης ουσίας από τη ράβδο είναι με τη χρησιμοποίηση διαλύτη, όμως στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί υγρή χρωματογραφία (high performance liquid chromatography, HPLC) [16].

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε από τους Rodil.R και Moerder M. για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση οκτώ εντομοαπωθητικών ενώσεων, πιο συγκεκριμένα των DMP, DEET, Butopyronoxyl, Icaridin, R-326, MGK-326, Piperonyl butoxide και Permethrin. Η μέθοδος εφαρμόστηκε και σε πραγματικά υδατικά διαλύματα και αποδείχθηκε εφαρμόσιμη [25].

1.7. Μικροεκχύλιση στερεή φάσης, SPME (Solid-phase micro extraction)

Η τεχνική μικροεκχύλιση στερεής φάσης ή αλλιώς SPME, που αναπτύχθηκε από τον Pawliszyn (1990), είναι μια εξαιρετικά απλή, γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται επιλεκτική προσυγκέντρωση πτητικών συστατικών από υγρά και στερεά δείγματα χωρίς χρήση τοξικών διαλυτών [9,18]. Αποτελεί μια εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών αναλυτικών τεχνικών παραλαβής πτητικών και ημιπτητικών οργανικών συστατικών. Σήμερα η τεχνική SPME βρίσκει εφαρμογή στην εξέταση περιβαλλοντικών δειγμάτων και δειγμάτων τροφίμων και αποτελεί αντικείμενο έρευνας πολλών ερευνητικών ομάδων σε όλο τον κόσμο [9,18]. Όλα τα στάδια της κλασικής εκχύλισης υγρού-υγρού έχουν ενσωματωθεί σε ένα στάδιο με τη χρήση μιας συσκευής, που έχει ως αποτέλεσμα να απλοποιείται η όλη διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος. Χρησιμοποιείται μια ίνα κατασκευασμένη από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου, η οποία έχει καλυφθεί με ένα ειδικό πολυμερικό υλικό (στατική φάση). Η στατική φάση την οποία φέρει η ίνα μπορεί να είναι είτε ένα πολυμερικό υγρό υψηλής μοριακής μάζας παρόμοιας φύσης με τη στατική φάση που φέρει μια στήλη αέριου χρωματογράφου (π.χ. πολυδιμεθυλο σιλοξάνιο ή PDMS), είτε ένα στερεό υλικό με υψηλό πορώδες (αυξάνει την επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για προσρόφηση) [18].

Η όλη συσκευή είναι κατά τέτοιο τρόπο κατασκευασμένη ώστε να επιτρέπεται η χρησιμοποίησή της πολλές φορές σε διαφορετικά δείγματα, καθώς η

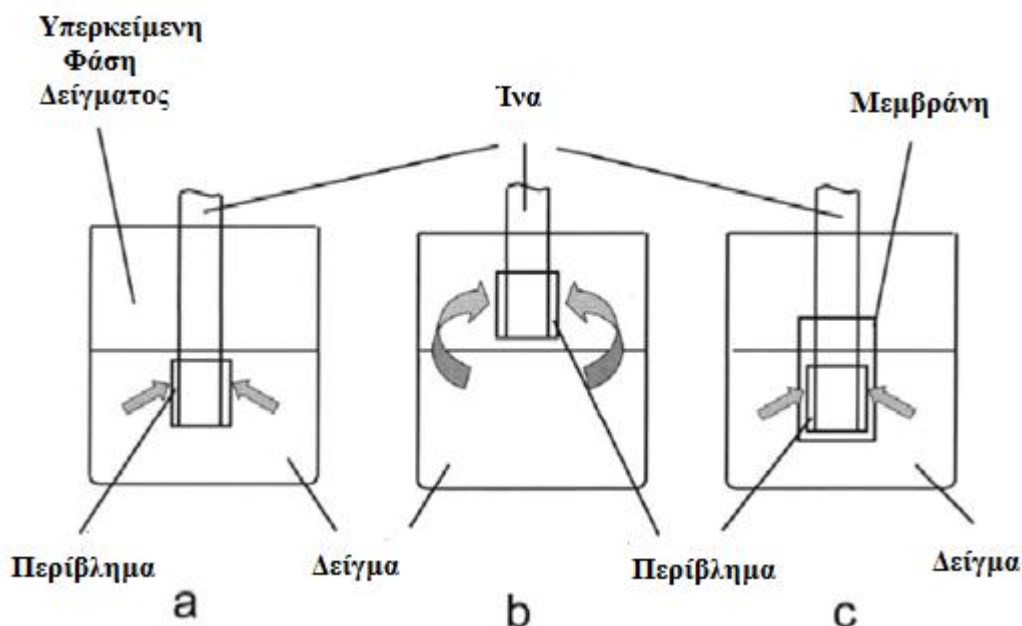
αποσυναρμολόγησή της για την τοποθέτηση ίδιου ή διαφορετικού τύπου ίνας είναι πολύ εύκολη [9,18].



Εικόνα 2:Μέρη από τα οποία αποτελείται η ίνα SPME

Η τεχνική SPME εφαρμόζεται με δύο διαφορετικούς τρόπους οι οποίοι διαφέρουν μόνο ως προς τη θέση στην οποία τοποθετείται η ίνα (μέσα στο δείγμα ή στην υπερκείμενη αυτού αέρια φάση). Στην πρώτη περίπτωση, η ίνα εμβαπτίζεται στο δείγμα, για παράδειγμα σε ένα υδατικό διάλυμα, με συνέπεια τα πτητικά συστατικά του να συγκρατούνται στο πολυμερικό υλικό. Συνήθως απαιτείται μια επαρκής ανάδευση του δείγματος που αποσκοπεί στην ταχύτερη αλληλεπίδραση των πτητικών συστατικών με το πολυμερικό υλικό, επειδή χαρακτηριστικό αυτών των συστατικών είναι ο χαμηλός συντελεστής διάχυσης. Στη δεύτερη περίπτωση πρέπει να έχει προηγηθεί η διάχυση των πτητικών συστατικών από το δείγμα στο εσωτερικό διάκενο (headspace) του φιαλιδίου, εντός του οποίου έχει μεταφερθεί το προς εξέταση δείγμα. Θεωρητικά και οι δύο τρόποι δίνουν τα ίδια αποτελέσματα όταν τελικώς επιτυγχάνεται θερμοδυναμική ισορροπία [9,18]. Υπάρχει και μία τρίτη περίπτωση που είναι σαν τη πρώτη με τη διαφορά ότι η ίνα επικαλύπτεται με μία μεμβράνη με σκοπό την μη καταστροφή της από το μελετώμενο δείγμα [12].

Στην εικόνα 3 παραθέτονται σχηματικά οι τρεις περιπτώσεις της SPME [12].



Εικόνα 3:Είδη εκχύλισης SPME, (α) άμεση εκχύλιση, (β) εκχύλιση στην αέρια φάση, (c) εκχύλιση με μεμβράνη

Η διαδικασία δειγματοληψίας λαμβάνει χώρα σε δύο φάσεις:

- Φάση προσρόφησης των πτητικών συστατικών στην SPME-ίνα [12,18]
- Φάση εκρόφησης των πτητικών συστατικών από την SPME-ίνα [12,18].

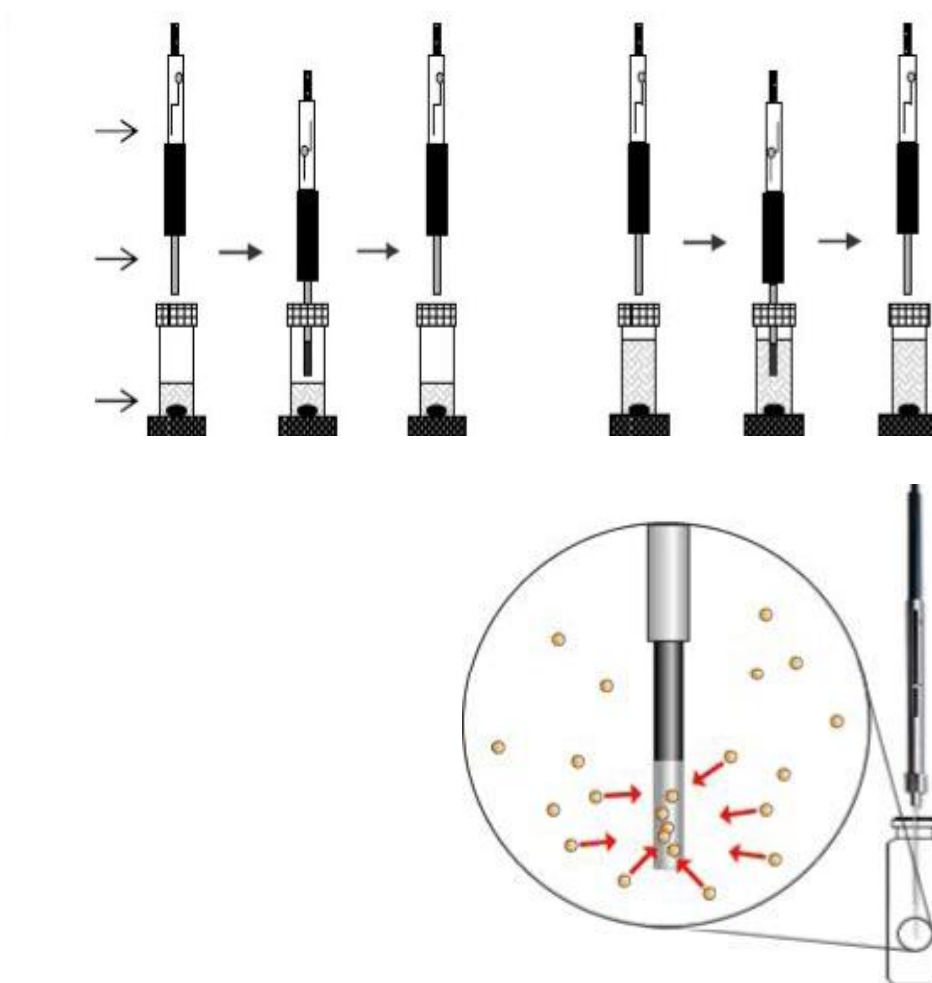
Η SPME-ίνα είναι τοποθετημένη στη βελόνη μιας ειδικού τύπου σύριγγας. Με τη βοήθεια του εμβόλου της σύριγγας είναι δυνατό η ίνα να εξέλθει από τη βελόνη, αφού η τελευταία διεισδύσει μέσω ενός septum στο φιαλίδιο με το δείγμα, και να έρθει σε επαφή με την υπερκείμενη αέρια φάση του δείγματος (ή με το αραιωμένο ή αναμεμιγμένο με νερό δείγμα) για ορισμένο χρόνο. Το φιαλίδιο που περιέχει το δείγμα θερμαίνεται [18].

Η διαδικασία SPME αναπτύχθηκε για να αντιμετωπίσει την ανάγκη για ταχεία δειγματοληψία και προετοιμασία του δείγματος στο εργαστήριο. Είναι μία τεχνική προετοιμασίας δείγματος χωρίς διαλύτη και συνδυάζει δειγματοληψία, απομόνωση και εμπλουτισμό του δείγματος σε ένα βήμα. Στην προσέγγιση αυτή, μικροποσότητες προσροφητικών στερεών ή υγρών πολυμερών εκτίθενται στο δείγμα [18].

Μία ίνα SPME μπορεί να αναλυθεί άμεσα από έναν αέριο χρωματογράφο (gas chromatography, GC) ή από έναν υγρό χρωματογράφο (liquid chromatography, LC), με αποτέλεσμα να μειώνει το σφάλμα της ανάλυσης από οποιαδήποτε απώλεια στην

πειραματική διαδικασία, χάρη στη μεγάλη προετοιμασία του δείγματος. Παρόλο που άρχισε να εφαρμόζεται μόλις από το 1990, η SPME έχει επιτυχώς εφαρμοστεί σε δειγματοληψίες και σε αναλύσεις περιβαλλοντικών, τροφικών και σε φαρμακευτικών δειγμάτων [18].

Με την SPME τοποθετούνται ίνες επικαλυμμένες με μία επίστρωση υγρού πολυμερούς μέσα σε ένα δείγμα ή στην υπερκείμενη φάση του (αέρια φάση) έως ότου πραγματοποιηθεί ισορροπία μεταξύ των μετρούμενων ουσιών του δείγματος που προσροφόνται από την ίνα και των διαλυμένων μετρούμενων ουσιών στο δείγμα. Το ποσό του δείγματος που εκχυλίζεται μέσα στην ίνα είναι γραμμικά ανάλογο με την συγκέντρωση που βρίσκεται στο δείγμα. Η μέθοδος της ισορροπίας στην εκχύλιση είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος της SPME για επιτόπιο δείγματα. Οι συσκευές για την μέτρηση SPME δειγμάτων βασίζονται σε αυτή την ισορροπία και απαιτούν έναν χρόνο προετοιμασίας δείγματος που είναι αρκετός για να επιτευχθεί η ισορροπία αυτή. Για να μειωθεί αισθητά ο χρόνος προετοιμασίας του δείγματος έχουν αναπτυχθεί ενεργές συσκευές. Για αέρια δείγματα μπορεί να πραγματοποιηθεί εύκολα με τη χρήση αντλίας αέρα, ενώ για υγρά δείγματα η ανάδευση μπορεί να μειώσει το χρόνο προετοιμασίας αισθητά [18,20].



Εικόνα 4:Εφαρμογή SPME δειγματοληψίας με δύο τρόπους: παραλαβή πτητικών συστατικών από το εσωτερικό διάκενο του φιαλιδίου (αριστερά), παραλαβή των πτητικών συστατικών από το υγρό διάλυμα (δεξιά)

Η SPME ίνα μετά από την προσρόφηση των πτητικών συστατικών επανέρχεται με τη βοήθεια του εμβόλου της σύριγγας στη βελόνη, που απομακρύνεται από το φιαλίδιο για να οδηγηθεί αμέσως στη διάταξη εισαγωγής τύπου split/splitless του αέριου χρωματογράφου. Στο liner της τελευταίας, η ίνα εξέρχεται εκ νέου από τη βελόνη ώστε τα προσροφημένα στη στατική φάση πτητικά συστατικά να ελευθερωθούν (με θερμική εκρόφηση) προκειμένου να οδηγηθούν με τη βοήθεια του φέροντος αερίου στην τριχοειδή στήλη του αέριου χρωματογράφου όπου θα διαχωριστούν [18].

Για την εκρόφιση όλων των πτητικών συστατικών από την ίνα απαιτείται ένας ορισμένος χρόνος. Γι' αυτό συχνά είναι αναγκαία η συμπύκνωση τους στην είσοδο της στήλης ή η μερική έγχυση τους στη στήλη (split injection). Πριν χρησιμοποιηθεί η ίνα απαιτείται εξισορρόπηση της σύμφωνα με τις οδηγίες που δίνει ο κατασκευαστής, ενώ κάθε χρησιμοποιημένη ίνα πρέπει να καθαρίζεται ώστε να απομακρυνθούν επιβαρύνσεις που είναι συχνά σε θέση να επηρεάσουν δυσμενώς τη μορφή του χρωματογραφήματος. Ο καθαρισμός της γίνεται με παραμονή της για επαρκή χρόνο σε υψηλή θερμοκρασία παρουσία αδρανούς αερίου εντός της διάταξης έγχυσης του αερίου χρωματογράφου [18].

Όταν η ίνα έρχεται σε επαφή με την υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση στο φιαλίδιο, τα πολύ πτητικά συστατικά προσροφώνται ταχύτερα από τα λιγότερο πτητικά συστατικά. Η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στην κινητική της προσρόφησης (καθορίζει την τάση των ατμών των συστατικών που προσροφώνται) [18].

Ο χρόνος που είναι αναγκαίος για να αποκατασταθεί η ισορροπία στην ίνα είναι βραχύτερος όταν εφαρμόζεται η τεχνική της SPME στην υπερκείμενη φάση του δείγματος (headspace SPME) απ' ό,τι όταν εφαρμόζεται η τεχνική της άμεσης SPME επειδή:

- i. σημαντικό κλάσμα των προς παραλαβή συστατικών απαντά στην αέρια φάση (headspace) πριν ξεκινήσει η προσρόφιση και
- ii. οι συντελεστές διάχυσης στην αέρια φάση είναι σε γενικές γραμμές υψηλότεροι κατά τέσσερις τάξεις μεγέθους απ' ό,τι σε μια υγρή φάση [12,18].

Τα επίπεδα των λιγότερο πτητικών συστατικών στην υπερκείμενη του δείγματος αέρια φάση είναι πολύ χαμηλά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για την αύξηση του ρυθμού προσρόφησης στην ίνα απαιτείται είτε η αύξηση της θερμοκρασίας είτε η εφαρμογή μιας αποτελεσματικότερης τεχνικής ανακίνησης του δείγματος [12,18].

Κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής SPME αποτελεί ο πολύ μικρός χρόνος που απαιτείται για να παραληφθούν τα πτητικά συστατικά. Άλλα πλεονεκτήματά της είναι:

- η χρησιμοποίηση πολύ μικρής ποσότητας δείγματος,
- το σχετικά χαμηλό κόστος της,
- η μη χρησιμοποίηση διαλύτη,
- η αποφυγή προετοιμασίας του δείγματος,

- η υψηλή ευαισθησία της
- η ταυτόχρονη παραλαβή και προσυγκέντρωση των πτητικών συστατικών από το δείγμα.

Κύρια μειονεκτήματα της τεχνικής SPME είναι:

- η ανάγκη επιλογής του προσροφητικού υλικού (στατική φάση), ιδίως όταν το κλάσμα των πτητικών συστατικών περιέχει πολλές ενώσεις που διαφοροποιούνται έντονα ως προς την πτητικότητα και τη χημική συμπεριφορά.
- η αδυναμία εργασίας με μεγάλη ποσότητα δείγματος, που είναι απαραίτητη, όταν επιδιώκεται η ταυτοποίηση ή ο προσδιορισμός ενός ή περισσότερων πτητικών συστατικών τα οποία περιέχονται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις στο δείγμα
- η δυσκολία για αυτοματοποίηση και η μειωμένη αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων, επειδή το κλάσμα των συστατικών που προσροφώνται στην κάθε ίνα επηρεάζεται από το είδος του προσροφητικού υλικού και από το συντελεστή κατανομής των συστατικών στο δείγμα ή στην υπερκείμενή του αέρια φάση και στο προσροφητικό υλικό [3,9,18].

1.8. Αέρια Χρωματογραφία

Η χρωματογραφική μέθοδος περιλαμβάνει μία σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών στα συστατικά τους. Ο διαχωρισμός αυτός πραγματοποιείται με διαδοχικές εκλεκτικές δεσμεύσεις και αποδεσμεύσεις των μορίων αυτών από επιφάνεια στερεής ή στατικής υγρής φάσης, με τη βοήθεια ρευστού κινούμενου κατά μία διεύθυνση (κινητή φάση). Η κινητή φάση καθώς διέρχεται από τη στατική προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος [14].

Στην αέρια χρωματογραφία η κινητική φάση είναι αέρια και διακρίνεται στην αέρια - στερεή και στην αέρια - υγρή χρωματογραφία. Η αέρια - στερεή χρωματογραφία χρησιμοποιείται σε αναλύσεις αέριων δειγμάτων σε στήλες προσρόφησης όπου υγρά και πτητικά στερεά διαχωρίζονται σε στήλες κατανομής [14].

Στην αέρια – υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση, με διαφορετικές ταχύτητες, των συστατικών μέσα στη στήλη. Οι διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις αυτών με την υγρή στατική φάση. Η παραπάνω τεχνική αναφέρεται ως χρωματογραφία έκλουσης [14].

Αρκετοί κατασκευαστές οργάνων προσφέρουν αέριους χρωματογράφους, που μπορούν να συζευχθούν άμεσα με φασματόμετρα μαζών (MS) ταχείας σάρωσης [17].

1.8.1. Διάταξη αέριου χρωματογράφου

Το φέρον αέριο (συνήθως άζωτο, ήλιο, υδρογόνο, αργό) οδηγείται από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, 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 [14,18].

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 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, 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. [14,18].

Το κύριο μέρος του αέριου χρωματογράφου είναι η στήλη. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία είναι συνήθως γυάλινες ή χαλύβδινες, γεμισμένες με διάφορα υλικά, ανάλογα με τα συστατικά που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Υπάρχουν δύο είδη στηλών οι πληρωμένες στήλες και οι τριχοειδείς. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος

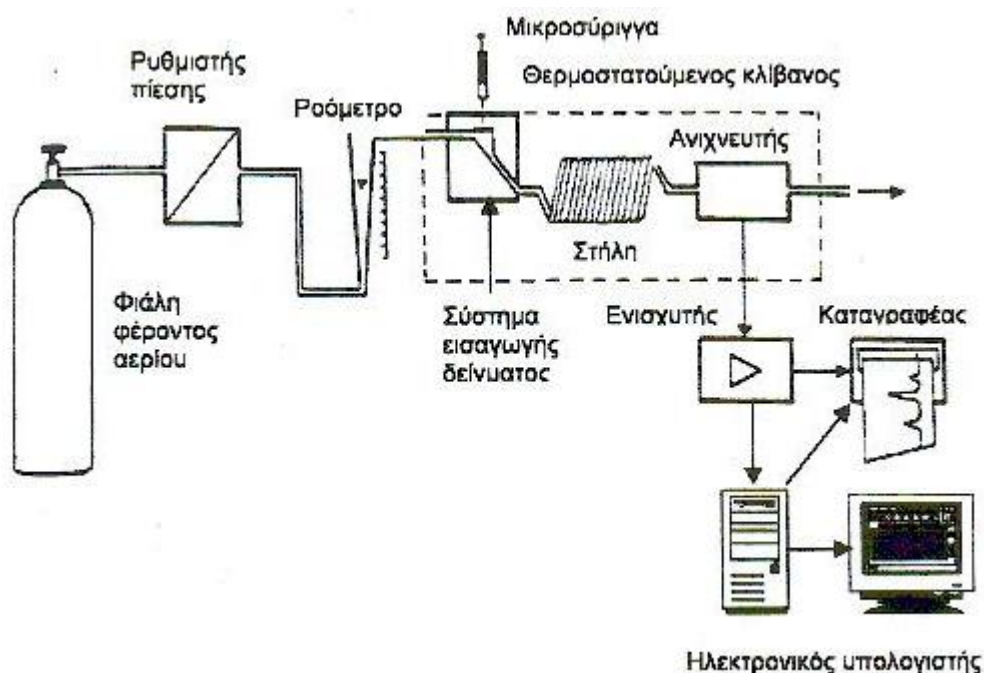
ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο χώρο, από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό, μήκους 1-2 m για της πληρωμένες στήλες, μέχρις αρκετών εκατοντάδων μέτρων για τις τριχοειδείς, εσωτερικής διαμέτρου της τάξεως των mm στις αναλυτικές στήλες, πολλών δεκάδων cm στις παρασκευαστικές στήλες [18].

Το δείγμα, συνήθως όγκου 1μL 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 τη θερμοκρασία στη στήλη. Για αυτό το λόγο η στήλη βρίσκεται σε φούρνο, του οποίου η θερμοκρασία ελέγχεται αυστηρά [14,18].

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 [18].

Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα [18].

Στην εικόνα 5 παρουσιάζεται μία τυπική διάταξη αέριου χρωματογράφου.



Εικόνα 5: Διάταξη Αέριου Χρωματογράφου

1.8.2. Φασματομετρία Μάζας

Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μαζών στηρίζεται στη δημιουργία ιόντων (κυρίως θετικών) μιας ένωσης [27], μετά από αλληλεπίδραση της ένωσης αυτής με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία [18]. Καθένα από τα ιόντα που σχηματίζονται χαρακτηρίζεται από το λόγο της μάζας προς φορτίο (m/z) [18,27] και από την σχετική αφθονία τους [18]. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατό να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος (MB) της ένωσης και ο τρόπος σύνδεσης των διαφόρων ομάδων μεταξύ τους [27].

Βασίζεται σε χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην αέρια φάση κατά τις οποίες σχηματίζονται ιοντικά, και ουδέτερα θραύσματα, εξαιτίας της διάσπασης των μορίων ενός συστατικού λόγω ιονισμού του. Τα ιόντα που προκύπτουν διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο (m/z) και καταγράφονται με τη μορφή ενός φάσματος μαζών. Αν οι εντάσεις του φορτίου κάθε ιόντος εκφρασθούν ως ποσοστό της έντασης του ιόντος το οποίο αποτελεί τη βασική κορυφή, οι τιμές m/z συναρτήσει της εκατοστιαίας σχετικής έντασης (% RI) αποτελούν το γραμμικό φάσμα μαζών. Η φασματομετρία μαζών είναι τεχνική που μπορεί να δώσει

σημαντικές πληροφορίες για τη δομή μιας χημικής ένωσης και υπό προϋποθέσεις να επιτρέψει τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης αυτής. Στην περίπτωση μιγμάτων χημικών ενώσεων, παρέχει ελάχιστες χρήσιμες πληροφορίες ακόμη και όταν χρησιμοποιηθούν φασματόμετρα μαζών μεγάλης διακριτικής ικανότητας. Ο συνδυασμός της φασματομετρίας μαζών με την αέρια χρωματογραφία επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των επιμέρους συστατικών πολύπλοκων μιγμάτων ακόμη και όταν αυτά περιέχονται σε εξαιρετικώς χαμηλές συγκεντρώσεις. Η συνήθης ανάλυση με αέρια χρωματογραφία έχει όμως ένα βασικό μειονέκτημα καθώς η αναγνώριση της ταυτότητας των διαχωριζόμενων συστατικών βασίζεται στη σύγκριση των χρόνων συγκράτησής τους με αυτούς προτύπων. Με αυτό τον τρόπο δεν είναι ασφαλής η ταυτοποίηση όλων των επιμέρους συστατικών επειδή τα χρωματογραφικά δεδομένα δεν παρέχουν πάντα αξιόπιστες πληροφορίες, όταν δεν χρησιμοποιούνται πρότυπα [18].

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από:

1. Το θάλαμο ιοντισμού, όπου μετατρέπεται η ένωση σε ιόντα, συνήθως κατιόντα με απόσπαση ενός ηλεκτρονίου,
2. Τον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται διαχωρισμός των ιόντων με βάση το λόγο m/z ,
3. Τον ανιχνευτή [27].

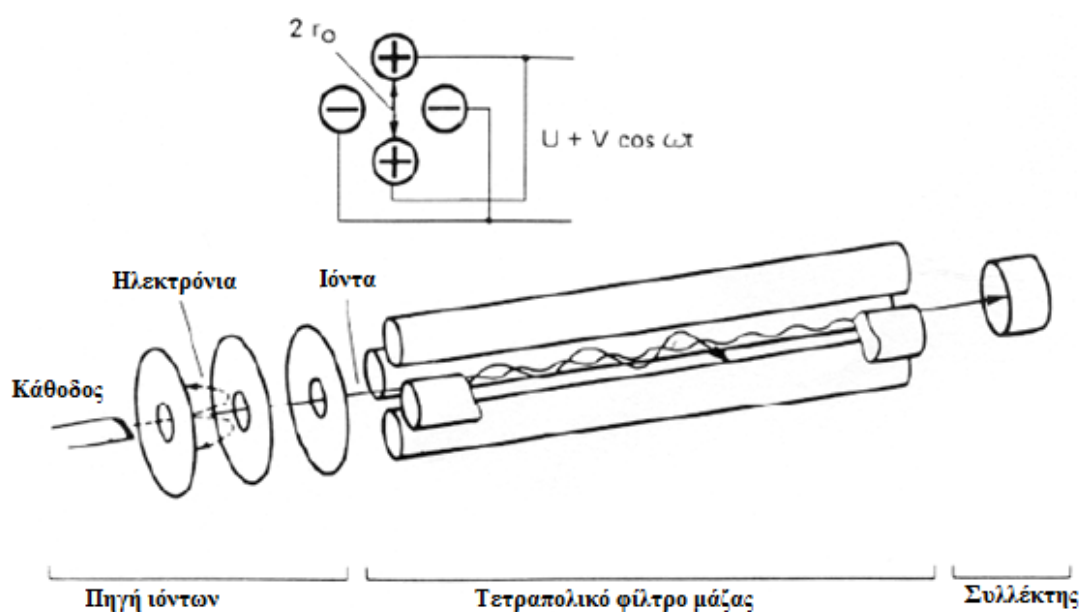
Ο ιονισμός στα φασματόμετρα μαζών επιτυγχάνεται με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, ανιόντων ή κατιόντων και έκθεση στην επίδραση ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου [18].

Ο διαχωρισμός των ιόντων επιτυγχάνεται:

- Σε μαγνητικό ή ηλεκτρικό αναλυτή μάζας
- Σε αναλυτή μάζας στον οποίο μετράται ο «χρόνος πτήσης»
- Σε αναλυτή μάζας τύπου τετραπολικού φίλτρου ή
- Σε αναλυτή μάζας τύπου τετραπολικής παγίδας ιόντων [18].

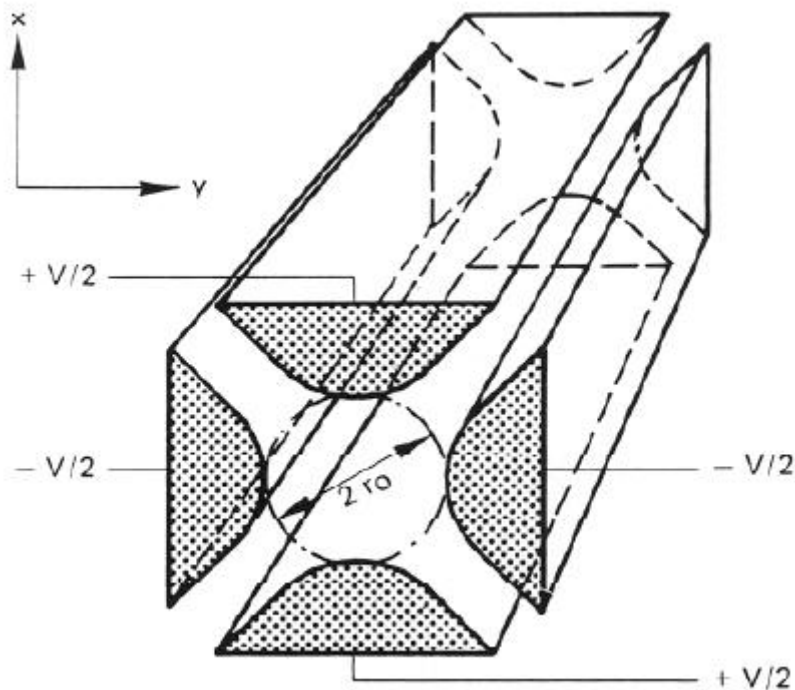
Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας ο αέριος χρωματογράφος εμπεριείχε αναλυτή μάζας τύπου τετραπολικού φίλτρου.

Ο διαχωρισμός των διαφορετικών ιόντων σε σχέση με το χώρο ή σύμφωνα με το λόγο μάζας/φορτίου επηρεάζεται από μαγνητικά και /ή από ηλεκτρικά πεδία. Ο τετραπολικός φασματογράφος μάζας υψηλής συχνότητας χρησιμοποιείται παγκοσμίως λόγω του γεγονότος ότι ο μικρός του όγκος επιτρέπει την άμεση εισαγωγή του μέσα στο σύστημα κενού. Ο βασικός του σχεδιασμός φαίνεται στην εικόνα 6. Σε ένα υψηλής συχνότητας τετραπολικό ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο στην ιδανική περίπτωση αποτελείται από τέσσερις ράβδους ηλεκτροδία με υπερβολική διατομή και απόσταση $2r_0$ μεταξύ τους, είναι δυνατόν ο διαχωρισμός ιόντων σύμφωνα με το λόγο μάζας/φορτίο. Οι υπερβολικές επιφάνειες προσεγγίζονται με μεγάλη ακρίβεια από κυλινδρικούς ράβδους [23].



Εικόνα 6: Διάταξη Τετραπολικού Φίλτρου Μάζας

Το δυναμικό μεταξύ των ηλεκτροδίων αποτελείται από μία υψηλής συχνότητας τάση $V \cos \omega t$ και από μία συσκευή τάσης U [23].



Εικόνα 7: Αρχή λειτουργίας τετραπολικού φίλτρου μάζας

Όταν τα ιόντα εισέλθουν στο σύστημα διαχωρισμού κατά τη διεύθυνση του πεδίου, η ύπαρξη του εναλλασσόμενου ηλεκτρικού πεδίου τα αναγκάζει σε ταλαντωτική κίνηση. Οι εξισώσεις κίνησης των ιόντων ονομάζονται εξισώσεις Mathieu. Οι λύσεις τους κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία, τα πλάτη των ταλαντώσεων παραμένουν σταθερά με το χρόνο. Αυτές οι λύσεις αναφέρονται ως σταθερές. Οι υπόλοιπες λύσεις, οι ασταθείς, χαρακτηρίζονται από τη συνεχή αύξηση του πλάτους. Η φυσική σημασία των παραπάνω είναι ότι κάποια ιόντα θα καταφέρουν να περάσουν μέσα από τον αναλυτή, ενώ τα υπόλοιπα θα κτυπήσουν τις ράβδους, με αποτέλεσμα να χάσουν το φορτίο τους και να αντληθούν από το θάλαμο [23].

Η ανίχνευση των ιόντων μετά το διαχωρισμό τους γίνεται ηλεκτρικά. Οι μέθοδοι ανίχνευσης διαφοροποιούνται ανάλογα με τις απαιτήσεις σε ευαισθησία και ταχύτητα ανίχνευσης. Παρόλο αυτά, για κάθε μία υπάρχουν κάποια θεμελιώδη όρια που δεν μπορούν να ξεπεραστούν [23].

Στην πιο απλή περίπτωση τα ιόντα προσκρούουν σε ένα συλλέκτη όπου και αποφορτίζονται [18,23]. Τέτοιους είδους συλλέκτες ονομάζονται Faraday Cup. Το

ρεύμα που προκύπτει μετασχηματίζεται σε έναν ευαίσθητο μετατροπέα, ώστε να δώσει σήμα ανάλογο του ιοντικού ρεύματος [23].

Συνήθως τα ιοντικά ρεύματα είναι πολύ μικρής εντάσεως και είναι αναγκαία η ενίσχυση του σήματος. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται πολλαπλασιαστές δευτερογενών ηλεκτρονίων (secondary electron multiplier , S.E.M.). Τα προς ανίχνευση ιόντα επιταχύνονται περαιτέρω σε μερικά keV και μετά προσκρούονται πάνω σε δύνοδους. Εκεί απελευθερώνουν κάποιον αριθμό καταστάσεων. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατόν να επιτευχθεί υψηλή ενίσχυση του ρεύματος [23].

Το φάσμα μαζών μιας ένωσης παριστάνεται συνήθως ως γράφημα, με τη μάζα (τιμές m/z) στον άξονα x και την ένταση (αριθμός ιόντων που δεδομένης τιμής m/z φθάνουν στον ανιχνευτή) στον άξονα y [27].

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.1. Πρότυπα διαλύματα και αντιδραστήρια

Τα πρότυπα διαλύματα DEET (>97%), 250 mg, και R-326 (>99%), 100 mg, προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma – Aldrich (Steinheim, Germany), ενώ το Butopyronoxyl, 25 g, προμηθεύτηκαν από την εταιρία TCI. Η Μεθανόλη (HPLC MeOH) είναι της εταιρίας Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) είναι της εταιρίας Aldrich. Υπερκάθαρο νερό προμηθεύτηκε από το εργαστήριο.

Παρασκευάστηκαν πυκνά πρώτα διαλύματα (mg/mL) για κάθε συστατικό σε μεθανόλη. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε δείγμα μείγματος των μελετώμενων ενώσεων συγκέντρωσης 1000mg/L σε μεθανόλη, το οποίο τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο όγκου 5 ml. Από το παραπάνω διάλυμα πραγματοποιούνται όλες οι απαιτούμενες αραιώσεις για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικά αναδευτήρια, για την ομογενοποίηση των δειγμάτων, κατά την προετοιμασία τους. Για την πραγματοποίηση της μικροεκχύλισης (microextraction) χρησιμοποιήθηκαν διάφορα είδη ινών-SPME τα χαρακτηριστικά των οποίων δίνονται στη συνέχεια: 65μm PDMS/DVB, 100μm PDMS, 85μm PA, 50/30μm PVB/CAR/PDMS, 75μm CAR/PDMS και 65μm CW/DVB, προμηθεύτηκαν από την εταιρία SUPELCO. Κάθε ίνα προσαρμόστηκε σε μία βελόνη μιας ιδιού τύπου σύριγγας (SPME-fiber holder) της εταιρίας SUPELCO. Η βελόνη προστατεύει την ίνα και ελέγχει την έκθεση αυτής, κατά τη διαδικασία της προσρόφησης και της εκρόφησης των δειγμάτων.

2.2. Δείγματα

Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σκούρου χρώματος φιαλίδια (amber glass vials), καθώς παρουσίαζαν φωτοευαισθησία, τον οποίων η έκπλυση έγινε με ακετόνη και μεθανόλη. Συλλέχθηκαν δείγματα από την εισροή (wastewater in) και την εκροή (wastewater out) της μονάδας του Βιολογικού καθαρισμού Χανίων, Κρήτης. Η συλλογή του δείγματος στην έξοδο του βιολογικού έγινε στην ένωση των δεξαμενών εξόδου, πριν τη χλωρίωση. Η εγκατάσταση προβλέπει την επεξεργασία αστικών λυμάτων που αντιστοιχούν σε 105.500 κατοίκους, την επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων που αντιστοιχούν σε 5.000 ισοδύναμους κατοίκους και σε βοθρολύματα

που αντιστοιχούν σε 7.000 ισοδύναμους κατοίκους, δηλαδή συνολικά εξυπηρετεί 117.500 ισοδύναμους κατοίκους με ημερήσια παροχή $26.000\text{m}^3/\text{d}$ [32]. Δείγμα από επιφανειακό νερό (surface water) συλλέχθηκε από τον ποταμό Κλαδισσό. Όλα τα δείγματα συλλέχθηκαν 2 Μαρτίου 2010. Τέλος χρησιμοποιήθηκε και νερό βρύσης (tap water). Όσον αφορά τα δείγματα από την εισροή του βιολογικού, την εκροή του βιολογικού και του επιφανειακού νερού από τον ποταμό, λόγω αυξημένων στερεών, υπέστησαν διήθηση. Για τη διαδικασία της διήθησης χρησιμοποιήθηκε διηθητικό χαρτί whatman με διάμετρο πόρων 47mm.

2.3. Διαδικασία SPME

Για την πραγματοποίηση της μικροεκχύλισης, αρχικά πραγματοποιούμε την απαιτούμενη αραίωση του διαλύματος με τη μίξη των ενώσεων συγκέντρωσης 1000 ppm με υπερκάθαρο νερό (nanopure water). Το καινούργιο διάλυμα τοποθετείτε σε ογκομετρική φιάλη, η οποία τυλίγεται με αλουμινόχαρτο καθώς το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο. Στη συνέχεια τοποθετείται συγκεκριμένη ποσότητα διαλύματος σε συγκεκριμένης χωρητικότητας σκούρου φιαλιδίου. Μέσα στο φιαλίδιο τοποθετείται και ένας μαγνητικός αναδευτήρας, για να πραγματοποιηθεί η ανάδευση. Το πώμα του φιαλιδίου έχει προ τρυπηθεί έτσι ώστε η τοποθέτηση της ίνας να είναι ευκολότερη. Το φιαλίδιο και η βελόνη ιδικού τύπου σύριγγας τοποθετούνται στην ειδική βάση διάταξης SPME πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα τύπου Heidolph MR3001K. Η απόσταση της βελόνης από του φιαλιδίου εκλέγεται τέτοια ώστε η ίνα να εισέρχεται ίσα μέσα στο υδατικό διάλυμα, καθώς και στο κέντρο αυτού. Στην περίπτωση της εκχύλισης στην υπερκείμενη φάση του δείγματος χρησιμοποιήθηκε ένα ποτήρι ζέσεως το οποίο εμπεριείχε απιονισμένο νερό, το ποτήρι τοποθετήθηκε πάνω στη θερμαινόμενη πλάκα και μέσα σε αυτό τοποθετήθηκε το φιαλίδιο. Με τη βοήθεια ενός ηλεκτρονικού θερμόμετρου ελεγχόταν η θερμοκρασία του νερού, προσέχοντας τη στάθμη του νερού να είναι ίδια με τη στάθμη του διαλύματος και συμπληρώνοντας με νερό όποτε είναι αναγκαίο. Μετά το τέλος του εκλεγμένου χρόνου για την πραγματοποίηση της εκχύλισης, αφαιρείται η βελόνη από την όλη διάταξη και τοποθετείται στον αέριο χρωματογράφο (GC-MS) στην ειδική προεξοχή για 5min, με σκοπό να πραγματοποιηθεί η μέτρηση των ουσιών που συγκρατήθηκαν από την ίνα. Τέλος τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή γραφικών παραστάσεων σε υπολογιστή.

Τα φιαλίδια, οι ογκομετρικές φιάλες, τα σιφώνια, ο μαγνητικός αναδευτήρας και οι σύριγγες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αραιώσης υπέστησαν πλύσεις με ακετόνη και μεθανόλη πριν και μετά από κάθε χρήση.

2.4 Μέθοδος Αέριου Χρωματογράφου GC-MS

Για τη μέτρηση των ουσιών χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι στο GC-MS η μέθοδος SCAN και η μέθοδος SIM (Single Ion Monitoring). Η μέθοδος SIM μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία στον ποσοτικό προσδιορισμό μίας ή περισσότερων ενώσεων ενώ η μέθοδος SCAN μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ενώσεων.

Η SCAN μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την επιλογή των συνθηκών ανίχνευσης των ενώσεων DEET, Butopyronoxyl και R-326. Ποιο συγκεκριμένα:

1. για την εύρεση της γραμμικής απόκρισης των ενώσεων. κάνοντας κατευθείαν ένεση (direct injection) των ουσιών στο GC-MS,
2. στην επιλογή του τρόπου εκχύλισης των ουσιών, δηλαδή αν θα γίνει στην υπερκείμενη αέρια ή στην υγρή φάση των δειγμάτων,
3. στην επιλογή της βέλτιστης ίνας-SPME,
4. στην επιλογή όγκου μελετώμενου δείγματος,
5. στην επίδραση του χλωριούχου νατρίου (NaCl) στο δείγμα,
6. στην επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης του δείγματος και
7. στην επιλογή του χρόνου εκχύλισης.

Η μέθοδος SIM χρησιμοποιήθηκε ένα πιο ευαίσθητο όργανο για την μελέτη της απόδοσης της μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε για την εύρεση: (α) της επαναληψιμότητας των μετρήσεων, (β) της γραμμικότητας της μεθόδου και (γ) του τρόπου επίδρασης εξωτερικών παραγόντων (matrix effects).

Οι παράμετροι που εισήχθησαν στο χρωματογράφο για τις δύο μεθόδους παρουσιάζονται στους πίνακες 5 και 6.

Πίνακας 5: Δεδομένα που εισήχθησαν στο GC-MS στη μέθοδο SCAN

	Τιμή	Μονάδες
<u>GC</u>		
Sampling time	5	Min
Injection temperature	260	°C
Interface temperature	290	°C
Control mode	Splitless	
Column inlet pressure	52.8	kPa
Column flow	0.9	ml/min
Linear velocity	34.9	cm/sec
Split ratio	44	-
Total flow	42.3	ml/min
Carrier flow	42.3	ml/min
Program	Oven temperature	
<u>MS</u>		
Acquisition mode	Scan	
Micro scan width	0	U
Interface temperature	290	°C
Solvent cut time	6	Min
Detector voltage	Absolute	
Threshold	1000	-
Interval	0.5	Sec
GC program time	21.50	min

Πίνακας 6: Θερμοκρασιακό πρόγραμμα αέριου χρωματογράφου

	Rate	Temperature (⁰ C)	Hold Time
1	-	70	2
2	20	180	0
3	5	220	0
4	10	280	0

Οι μάζες που καταμετρήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της μεθόδου SIM παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Μάζες που καταμετρήθηκαν κατά τη μέθοδο SIM

	Start Time (min)	End Time (min)	Ch1- m/z	Ch2- m/z	Ch3- m/z	Ch4 -m/z	Ch5 -m/z	Ch6- m/z
1	6	13	91	119	190	115	125	126
2	13.10	21.50	165	179	192	0	0	0

Στη συνέχεια για να ελέγξουμε τη γραμμικότητα της μεθόδου στο GC-MS, πραγματοποιούμε απευθείας εκχύσεις διαφορετικών συγκεντρώσεων με ποσότητα 1μL. Οι εκχύσεις αυτές προέρχονται από διάλυμα μίγματος των τριών ουσιών σε ακετονιτρίλιο (ACN). Τα διαλύματα τα οποία προετοιμάστηκαν είχαν συγκέντρωση 1, 2,5, 5, 10 και 20mg/L. Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν δύο εκχύσεις στον χρωματογράφο.

Η μέθοδος αποδείχθηκε ότι είναι γραμμική και για τις τρεις ουσίες, καθώς η τιμή του συντελεστή συσχέτισης (R^2) και στις τρεις γραφικές παραστάσεις τείνει στην τιμή 1. Άρα μπορούμε να προχωρήσουμε στη βελτιστοποίηση των συνθηκών για την ανίχνευσή των ενώσεων με τη συγκεκριμένη μέθοδο του αέριου χρωματογράφου.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Προκαταρκτικά πειράματα: επιλογή τρόπου εκχύλισης και ίνας-SPME

Αρχικά μελετήθηκε η μέθοδος δειγματοληψίας με χρήση της μεθόδου SPME. Οι τρόποι δειγματοληψίας με χρήση SPME που δοκιμάστηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι δύο:

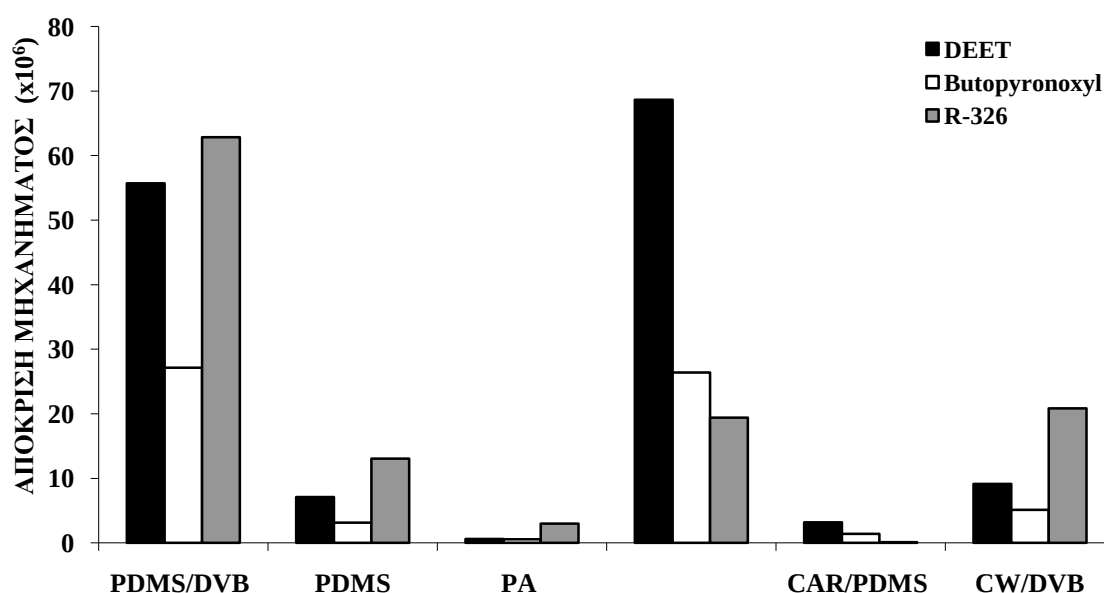
- δειγματοληψία της υπερκείμενης του δείγματος αέριας φάσης (headspace extraction) και
- δειγματοληψία με απευθείας βύθιση της SPME ίνας στο δείγμα (immersion SPME).

Για την διεξαγωγή των προκαταρκτικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα τύπου 65 μm PDMS/DVB. Για την εκχύλιση των υδατικών διαλυμάτων συγκέντρωσης 10 mg/L τοποθετημένα σε σκούρα φιαλίδια των 7 και 22 mL. Χρησιμοποιήθηκαν όγκοι διαλυμάτων 7 και 10 mL, στην περίπτωση της εκχύλιση με απευθείας βύθιση και στην περίπτωση της εκχύλιση στην υπερκείμενη φάση των δειγμάτων αντίστοιχα. Ο χρόνος δειγματοληψίας σε κάθε περίπτωση ήταν 30 min και η ταχύτητα ανάδευσης των δειγμάτων ορίστηκε στα 1000 rpm. Στην περίπτωση της εκχύλισης στην υπερκείμενη αέρια φάση πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε θερμοκρασία 60 $^{\circ}\text{C}$ και 100 $^{\circ}\text{C}$.

Παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση της απευθείας δειγματοληψίας στο δείγμα η προσροφημένη ποσότητα των ενώσεων ήταν πολύ μεγαλύτερη από εκείνη της δειγματοληψίας της υπερκείμενης του δείγματος αέριας φάσης. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση DEET είχε διπλασιαστεί, το Butopyronoxyl είχε δεκαπλασιαστεί και το R-326 είχε τριακονταπλασιαστεί. Προφανώς οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό ανάλυση ενώσεων δεν επιτρέπουν την αποτελεσματική τους μεταφορά στην υπερκείμενη φάση. Έτσι επιλέχθηκε η μέθοδος SPME με απευθείας δειγματοληψία στο υδατικό διάλυμα.

Στη συνέχεια μελετήθηκε, για υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g/L}$, για κάθε ένωση η απόδοση διαφόρων SPME-ινών προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι ίνες με χαρακτηριστικά 65 μm PDMS/DVB, 100 μm PDMS, 85 μm PA, 50/30 μm DVB/CAR/PDMS, 75 μm CAR/PDMS και 65 μm CW/DVB. Οι υπόλοιποι παράμετροι που εφαρμόστηκαν κατά την πειραματική διαδικασία ήταν όγκος υδατικού διαλύματος 7 mL, ο χρόνος δειγματοληψίας ήταν 30 min και η ταχύτητα ανάδευσης ορίστηκε στα 1000 rpm.

Τα αποτελέσματα δίνονται στο σχήμα 1 όπου φαίνεται ότι οι δύο ίνες που παρουσιάζουν μεγαλύτερες τιμές απορρόφησης των ουσιών είναι η 65 μm PDMS/DVB και η 50/30 μm DVB/CAR/PDMS. Η ποσότητα του Butopyronoxyl που απορροφήθηκε και στις δύο ίνες, είναι σχεδόν η ίδια. Διαφορές παρουσιάζονται στην ένωση DEET όπου η προσρόφηση είναι μεγαλύτερη στην ίνα DVB/CAR/PDMS απ' ό τι στην PDMS/DVB ενώ η ένωση R-326 ανιχνεύεται πολύ καλύτερα από το PDMS/DVB. Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκε η 65 μm PDMS/DVB ως καλύτερη ίνα για την ανίχνευσή τους.



Σχήμα 1: Απόκριση μηχανήματος με χρήση διαφόρων ινών-SPME

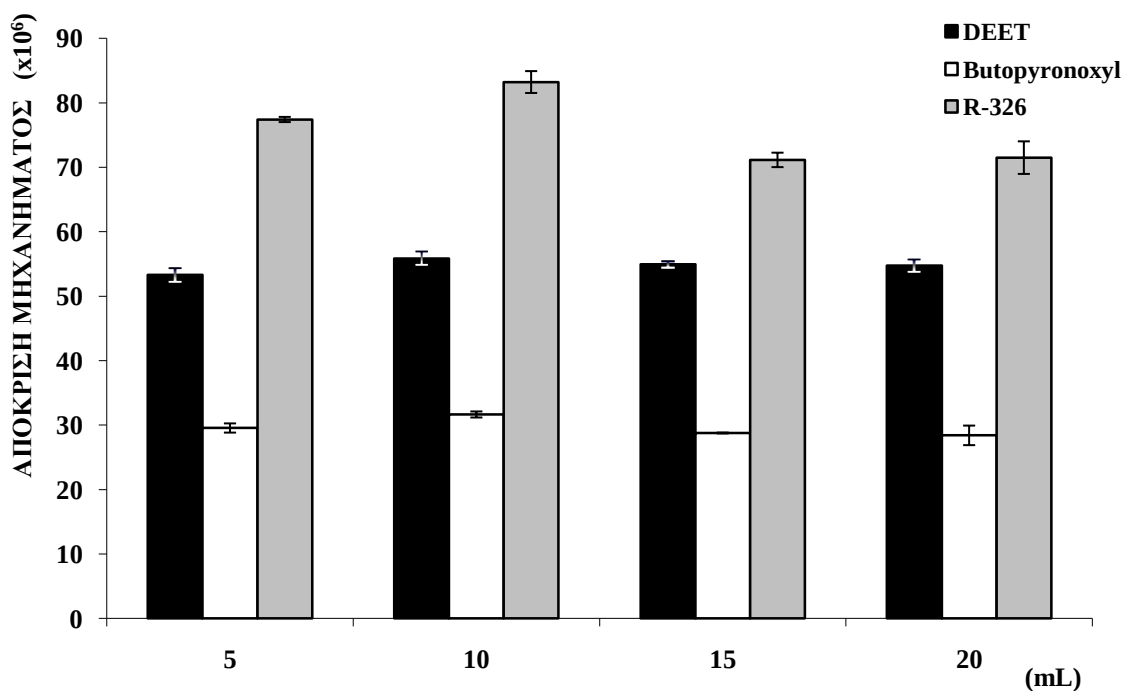
3.2. Βελτιστοποίηση μεθόδου

3.2.1. Επιλογή όγκου διαλύματος

Έχει παρατηρηθεί ότι η ποσότητα των προσροφημένων ενώσεων είναι ανάλογη με τον όγκο του υδατικού διαλύματος, λόγω του ότι όσο αυξάνεται ο όγκος αυξάνεται και η ποσότητα των ενώσεων που είναι διαθέσιμη για έκχυση.

Μέσα στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας ελέγχθησαν όγκοι των 5, 10, 15 και 20 mL . Τα υδατικά διαλύματα τοποθετήθηκαν σε σκούρα φιαλίδια όγκου 7, 15 και 22 ml αντίστοιχα. Οι υπόλοιποι πειραματικοί παράμετροι συγκέντρωσης δείγματος 100 µg/L ήταν η ταχύτητα ανάδευσης 1000 rpm και ο χρόνος εκχύλισης 30 min.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 2.



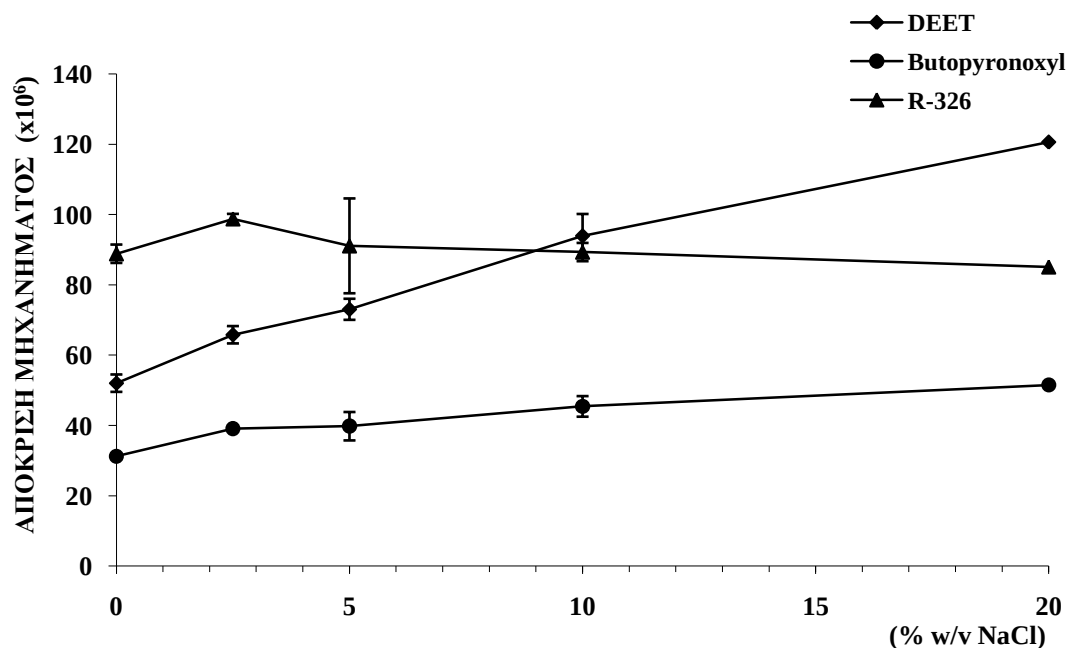
Σχήμα 2: Επιλογή όγκου

Παρότι θα αναμενόταν αύξηση των προσροφημένων ουσιών με αύξηση του όγκου του υδατικού διαλύματος, τα αποτελέσματα (σχήμα 2) έδειξαν ότι η ποσότητα των ενώσεων που εκχυλίστηκε ήταν περίπου η ίδια για όλους τους όγκους που μελετήθηκαν. Το γεγονός ότι η ανάδευση γίνεται λίγο αποδοτική με αποτέλεσμα να αντισταθμίζεται όσο αυξάνεται ο όγκος του υδατικού διαλύματος. Δεδομένου των αποτελεσμάτων αποφασίστηκε να επιλεγεί ως ιδανικός όγκος υδατικού διαλύματος ο ελάχιστος δυνατός, δηλαδή τα 5 mL. Αυτό έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν και οφείλεται στη μείωση της ταχύτητας ανάδευσης όταν αυξάνεται ο όγκος των φιαλιδίων [15].

3.1.5. Επίδραση αλατότητας

Γενικά για ημιπολικές και πολικές ενώσεις έχει παρατηρηθεί ότι η ιοντική ισχύ αυξάνει την ποσότητα των προσροφημένων ενώσεων στην SPME-ίνα λόγω του φαινομένου της εξαλάτωσης. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο μελετήθηκε η προσθήκη χλωριούχου νατρίου (NaCl) στο υδατικό διάλυμα σε ποσότητες των 0, 2.5, 5, 10 και 20% w/v NaCl. Οι υπόλοιποι πειραματικοί παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η συγκέντρωση δείγματος 100 µg/L και όγκου 5 mL με ταχύτητα ανάδευσης 1000 rpm και με χρόνο εκχύλισης 30 min.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 3.



Σχήμα 3: Επίδραση αλατότητας

Σύμφωνα με το σχήμα 3 παρατηρείται ότι με την προσθήκη άλατος έχουμε μία ενίσχυση της εκχύλισης από την ίνα-SPME. Όσον αφορά τις ενώσεις DEET και Butopyronoxyl όσο μεγαλύτερη είναι η προσθήκη άλατος τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα των ουσιών που προσροφούνται από την ίνα στην περίπτωση του R-326 η προσροφητική ικανότητα της αυξάνεται με προσθήκη άλατος έως 2,5 % w/v και στη συνέχεια παρατηρείται μία σχετικά μικρή μείωση αυτής. Συνοψίζοντας τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι με την προσθήκη 20 % w/v NaCl παρατηρείται βέλτιστη εκχύλιση

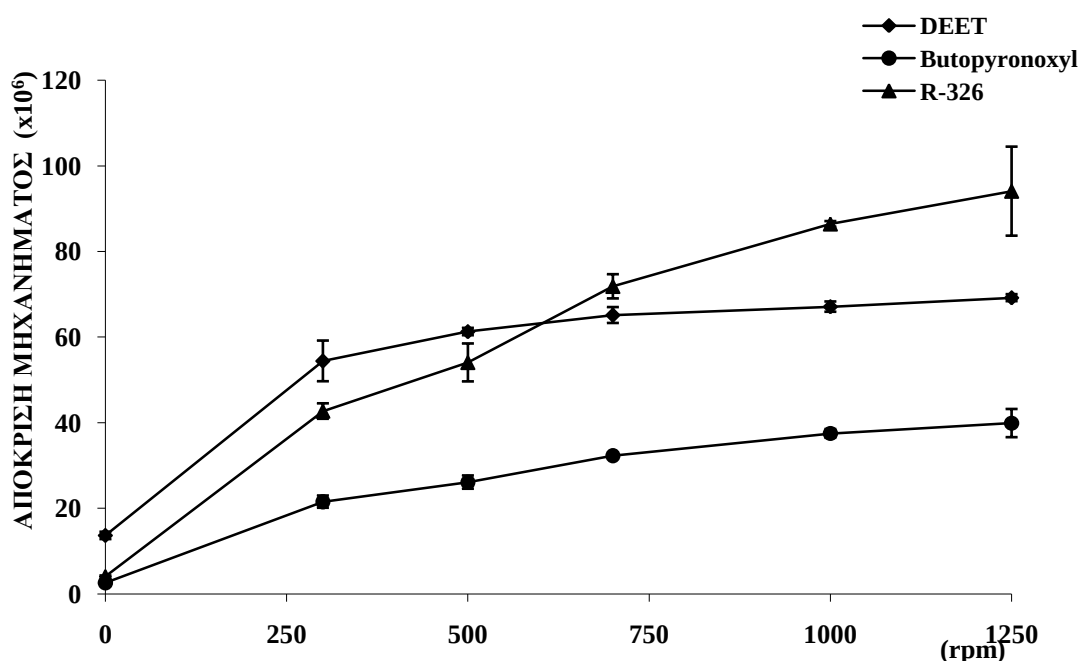
για το DEET ενώ συγχρόνως το Butopyronoxyl και το R-326 επηρεάζονται ελάχιστα. Επειδή όμως ενδέχεται να καταστραφεί η ίνα μετά από κάποιες εκχύσεις σε τόσες μεγάλες συγκεντρώσεις NaCl επιλέγεται η ποσότητα των 2,5 % w/v NaCl, όπου παρατηρείται το φαινόμενο ενίσχυσης της μικροεκχύλισης λόγω προσθήκη άλατος ενώ ταυτόχρονα οι μικρές ποσότητες NaCl δεν θα καταστρέψουν την ίνα SPME.

3.1.5. Επιλογή ταχύτητας ανάδευσης

Η ταχύτητα ανάδευσης του υδατικού διαλύματος αποτελεί έναν από τους παράγοντες που ενισχύουν την εκχύλιση των ενώσεων μιας και αυξάνοντας την ταχύτητα αυξάνεται και η εκχυλιζόμενη ουσία.

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας ελέγχθηκαν οι ταχύτητες 0, 300, 500, 700, 1000 και 1250 rpm. Οι υπόλοιποι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η συγκέντρωση του δείγματος 100 µg/L με όγκο 5 mL, τοποθέτηση NaCl ποσότητας 2,5 % w/v και χρόνου εκχύλισης 30 min.

Τα αποτελέσματα τα οποία διεξήχθησαν παρουσιάζονται στο σχήμα 4:



Σχήμα 4: Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης

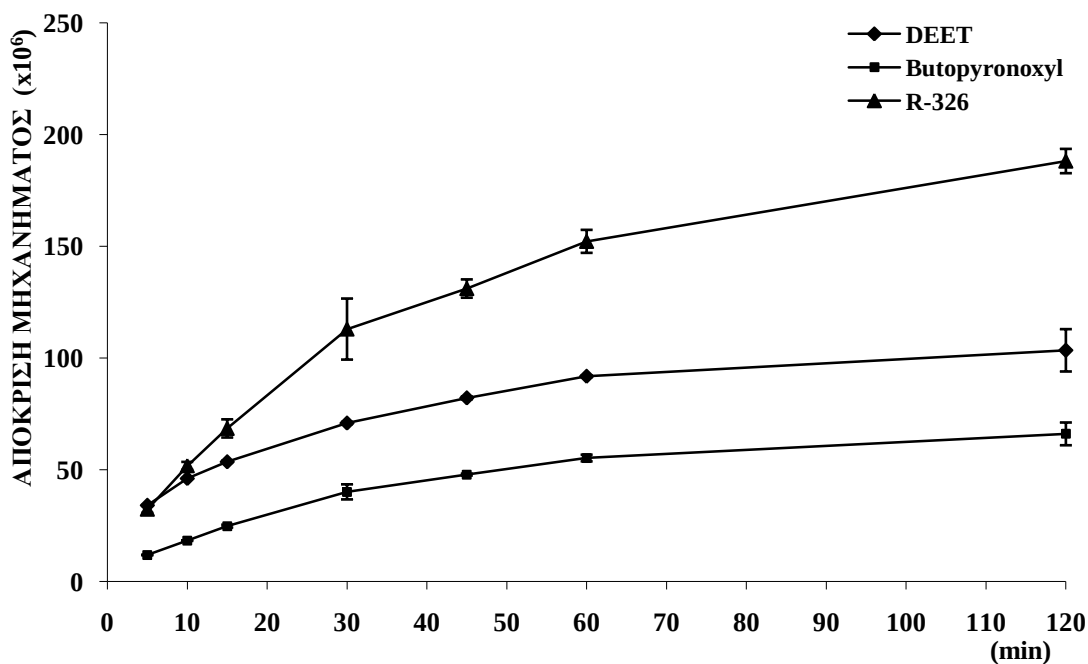
Παρατηρώντας το σχήμα 4 της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης, συμπεραίνεται ότι η εκχύλιση των ουσιών από την ίνα είναι ανάλογη με την ταχύτητα, δηλαδή αυξάνοντας την ταχύτητα έχουμε και αύξηση της απορρόφησης. Έτσι προκειμένου να έχουμε τη μέγιστη δυνατή απόδοση της ίνας για της ανίχνευση των ενώσεων, επιλέχθηκε ως ιδανική ταχύτητα αυτή των 1250 rpm.

3.1.6. Επιλογή χρόνου εκχύλισης

Η τελευταία παράμετρος SPME που μελετήθηκε είναι ο χρόνος εκχύλισης του δείγματος. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνοντας το χρόνο εκχύλισης αυξάνεται και η ποσότητα που εκχυλίζεται μέχρις ότου το σύστημα να εισέλθει σε ισορροπία.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία η χρόνοι που μελετήθηκαν ήταν τα 5min, 10, 15, 30, 45, 60 και 120 min. Οι υπόλοιποι πειραματικοί παράμετροι είναι η ταχύτητα ανάδευσης 1250 rpm και το δείγμα όγκου 5 mL με συγκέντρωση ουσιών 100 µg/L και με προσθήκη 2,5 % w/v NaCl.

Βάση των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν (σχήμα 5) κατά την πειραματική διαδικασία, παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση του χρόνου προετοιμασίας του δείγματος αυξήθηκε και η ποσότητα των προσροφημένων ενώσεων στην ίνα. Η μέγιστη ποσότητα προσροφημένων ενώσεων παρατηρείται μετά από δειγματοληψία 120 min, παρόλα αυτά, παρατηρείται ότι δεν έχει επέλθει ισορροπία. Με βάση τα παραπάνω επιλέχθηκε ως κατάλληλος χρόνος ανάδευσης τα 60 min, καθώς σε αυτό το χρονικό διάστημα οι ποσότητες των ουσιών που προσροφώνται από την ίνα και στη συνέχεια ανιχνεύονται από το GC-MS, έχει ενισχυθεί σημαντικά σε σχέση με τα 30 min ενώ δεν διαφέρει δραματικά από τα αποτελέσματα για δειγματοληψία 120 min.



Σχήμα 5: Χρόνος ανάδευσης

3.2. Επίδοση μεθόδου

Στο κεφάλαιο 3.1. παρουσιάστηκε η διαδικασία και τα αποτελέσματα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών με σκοπό την ανίχνευση των ενώσεων DEET, Butopyronoxyl και R-326. Περιληπτικά, τα αποτελέσματα ήταν ότι ο καλύτερος τρόπος ανίχνευσης των ουσιών είναι με δειγματοληψία με απευθείας βύθιση της SPME-ίνας στο υδατικό διάλυμα, η επιλεγθείσα ίνα είναι η 65 μm PDMS/DVB. Στη συνέχεια ο βέλτιστος όγκος του υδατικού διαλύματος είναι τα 5 mL με προσθήκη NaCl ποσότητας 2,5 % w/v, η ταχύτητα ανάδευσης επιλέχθηκε στις 1250 rpm και ο χρόνος της εκχύλισης τα 60 min.

Για την εύρεση της απόδοσης της μεθόδου η ανίχνευση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο SIM του GC-MS.

Η γραμμικότητα της μεθόδου μελετήθηκε για διαλύματα συγκέντρωσης 2, 10, 50, 100, 250, 1000 και 5000 ng/L. Ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) κυμαίνεται από 0,993

έως 0,999 όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 8. Με αποτέλεσμα να θεωρηθεί η μέθοδος γραμμική και για τις τρεις ενώσεις.

Πίνακας 8:Επαναληψιμότητα

	Linearity (R ²)	RSD,% (n=5, 50ng/L)	RSD,% (n=5, 1000ng/L)	LOD (ng/L)
DEET	0,999	9,4	3,6	1
Butopyronoxyl	0,999	10,8	4,6	4
R-326	0,993	12,7	9,8	1

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επαναληψιμότητα της μεθόδου για δύο συγκεντρώσεις αυτή των 50 ng/L και των 1000 ng/L. Στον πίνακα 8 παρουσιάζονται οι τρεις ενώσεις ξεχωριστά με τον συντελεστή σχετικής απόκλισης %RSD (relative standard deviation) που υπολογίστηκε για την κάθε μία. Συγκρίνοντας τις τρεις ενώσεις συμπεραίνεται ότι η R-326 παρουσιάζει μεγαλύτερο συντελεστή σχετικής απόκλισης και σε χαμηλές αλλά και σε υψηλές συγκεντρώσεις 12,7% και 9,8% αντίστοιχα. Αυτό υποδηλώνει τη μεγαλύτερη ευαισθησία της ένωσης. Επίσης το σφάλμα στις μετρήσεις στη συγκέντρωση των 50 ng/L έχει μεγαλύτερες τιμές από εκείνο των 1000 ng/L, αυτό οφείλεται στο ότι οι ενώσεις είναι καλύτερα ανιχνεύσιμες από το GC-MS όσο αυξάνεται η συγκέντρωσή τους στα μελετώμενα διαλύματα παρόλα αυτά τα σφάλματα είναι εντός των αποδεκτών ορίων, δηλαδή κάτω του 15% με αποτέλεσμα να θεωρείται η διαδικασία επιλέγσιμη.

Ως όριο ανίχνευσης (LOD, limit of detection) μιας ουσίας ονομάζεται το σημείο το οποίο η ανάλυση είναι μόνο εφικτή, δηλαδή δεν μπορεί να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα, και ορίζεται από το λόγο: $\frac{S}{N} = 3$ όπου ως N ορίζεται ο θόρυβος του οργάνου (N, Noise) και ως S το σήμα της μετρούμενης ουσίας (S, Signal). Τα LODs των ενώσεων υπολογίστηκαν από τη χαμηλότερη συγκέντρωση που μελετήθηκε για τη γραμμικοποίηση των ενώσεων, η οποία είναι τα 2 ng/L. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Τέλος παρατηρείται ότι η μέθοδος αυτή είναι πιο ευαίσθητη με εκείνη των Rodil R. και Moeder M. [25] καθώς, στη συγκεκριμένη περίπτωση μειώθηκαν κατά πολύ οι τιμές των διαφόρων παραμέτρων και τα αποτελέσματα είναι παρεμφερή με τα δικά τους. Στον πίνακα 9 συγκρίνονται τα αποτελέσματα των μεθόδων εκχύλιση με χρήση ράβδου ρόφησης (SBSE) και μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME). Με τη μέθοδο SPME μειώθηκε κατά πολύ ο όγκος του μελετώμενου δείγματος, η ποσότητα του NaCl, καθώς και ο απαιτούμενος χρόνος εκχύλισης.

Πίνακας 9: Σύγκριση μεθόδου SBSE⁵ με SPME

	Μέθοδος SBME	Μέθοδος SPME
Όγκος δείγματος	20 mL	5 mL
Ποσότητα NaCl	20 %	2,5 %
Ταχύτητα ανάδευσης	1000 rpm	1250 rpm
Χρόνος εκχύλισης	180 min	60 min

⁵ Πηγή [25]

4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ (MATRIX EFFECTS)

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων η διαδικασία ελέγχθηκε σε πραγματικά υδατικά διαλύματα σε δείγματα από την είσοδο και την έξοδο του βιολογικού καθαρισμού αστικών λυμάτων των Χανίων, σε επιφανειακό νερό από ποτάμι και σε νερό βρύσης. Η αποδοτικότητα της εκχύλισης μπορεί να επηρεαστεί από τη σύσταση των δειγμάτων. Ως εκ τούτου, πιθανές επιδράσεις που μπορούν να έχουν σε πραγματικά δείγματα οι μελετώμενες ενώσεις ερευνήθηκαν με σύγκριση των περιεχόμενων συστατικών των δειγμάτων με εκείνων που αποτελούνταν από υπερκάθαρο νερό.

Αρχικά έγινε ανάλυση των δειγμάτων με χρήση SPME στο GC-MS δίχως επιμόλυνση και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα δείγματα αυτά δεν υπήρχαν ίχνη των ενώσεων. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν διαλύματα από τα πραγματικά δείγματα με συγκέντρωση των ουσιών 250 ng/L και προετοιμάστηκαν με την προαναφερθείσα διαδικασία από το κεφάλαιο 3.

Οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν από το μέσο όρο της ποσότητας των ανιχνεύσιμων ενώσεων από το GC-MS σε πραγματικά δείγματα προς το μέσο όρο της ποσότητας των ανιχνεύσιμο ενώσεων από το GC-MS στα δείγματα σε υπερκάθαρο νερό, ίδιας αρχικής συγκέντρωσης των ενώσεων και στις δύο περιπτώσεις, επί της εκατό.

Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάκτηση των ουσιών.

Πίνακας 10: Ποσοστά ανάκτησης ενώσεων από πραγματικά δείγματα

	Είσοδος βιολογικού (%)	Έξοδος βιολογικού (%)	Επιφανειακό νερό (%)	Νερό βρύσης (%)
DEET	94.1 ($\pm$ 1,3)	104.9 ($\pm$ 2,5)	80.2 ($\pm$ 6,1)	88.2 ($\pm$ 5)
Butopyronoxyl	71.8 ($\pm$ 2,9)	80.1 ($\pm$ 3,3)	32,9 ($\pm$ 43,7)	60.1 ($\pm$ 10,8)
R-326	122.2 ($\pm$ 2,7)	120 ($\pm$ 10,1)	29,3 ($\pm$ 2,6)	74.7 ($\pm$ 4,9)

Παρατηρώντας τον πίνακα 10 συμπεραίνεται ότι εμφανίζονται αυξομειώσεις στην ανάκτηση των ουσιών με την μεγαλύτερη να εμφανίζεται στην περίπτωση του επιφανειακού νερού με το Butopyronoxyl και το R-326 κυμαίνονται στα 32,9 και 29,3 % αντίστοιχα.. Γενικά το DEET κυμαίνεται από 80,2 έως 104,9 % με αποτέλεσμα να συμπεραίνεται ότι η εκχύλισή του δεν επηρεάζεται από τη σύσταση του υποστρώματος. Το Butopyronoxyl κυμαίνεται από 32,9 έως 71,8 % όπου στο επιφανειακό νερό παρουσιάζει την ελάχιστη ανάκτηση, λόγω σημαντικής επίδρασης του υποστρώματος. Τέλος, το R-326 επηρεάζεται εξίσου από τη σύσταση του υποστρώματος του επιφανειακού νερού. Αυτό οφείλεται στο ότι ίσως αντιδρούν ή προσκολλώνται οι ουσίες σε σωματίδια του υποστρώματος με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμα για εκχύλιση.

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας εφαρμόστηκε για πρώτη φορά η μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεής φάσης για την ανίχνευσης των ενώσεων DEET, Butopyronoxyl και R-326, με χρήση αέριας χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας. Προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ανίχνευσής τους και ελέγχθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της σε πραγματικά δείγματα. Η μέθοδος παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και γραμμικότητα. Μπορεί να αποτελέσει ένα γρήγορο και αποδοτικό εργαλείο ανίχνευσης των ενώσεων αυτών σε δείγματα βιολογικού καθαρισμού καθώς και πόσιμου νερού. Τέλος, η μέθοδος παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με προγενέστερη έρευνα από τους Rodil R. και Moeder M, στην οποία πραγματοποιήθηκε μικροεκχύλιση με ράβδο ρόφησης [25].

6.ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Μελλοντικά απαιτείται ο προσδιορισμός της σύστασης των πραγματικών δειγμάτων, καθώς και μία πιο διεξοδική μελέτη του υποστρώματος του επιφανειακού νερού και του νερού βρύσης, καθώς η πιθανή ύπαρξη χουμικού οξέος και χλωριωμένων αντίστοιχα, θα συνέβαλλε στη μειωμένη ανάκτηση των ενώσεων. Τέλος, η μέθοδος αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της τύχης των ενώσεων αυτών στο περιβάλλον.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Blaine, Rl., 1976, "Using Thermal Analysis as a Process Development and Quality Control Tool in Circuit Manufacturing" *Insulation/Circuits* 1, 37-42
2. Zadikoff C. M., 1979, "Toxic encephalopathy associated with use of insect repellent," *Journal of Pediatrics* 95, 140.
3. Heick, H.M., 1980. "Reye-like syndrome associated with use of insect repellent in a presumed heterozygote for ornithine carbamoyl transferase deficiency." *Journal of Pediatrics* 97, 471.
4. Neely, W. B. and Blau, G. E., 1985, "Introduction to environmental exposure from chemicals. In: Neely, W. B. and Blau, G. E. (Eds) *Environmental Exposure from Chemicals*" CRC Press 1-11
5. Oransky, S., 1989, "Seizures Temporarily Associated with Use of DEET Insect Repellent-New York and Connecticut." *Morbidity and Mortality Weekly Report* 38, 678-680.
6. Lipscomb, J.W.,1992. "Seizure following brief exposure to the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide." *Annals of Emergency Medicine* 21, 315
7. Meylan, W.M., Howard P.H. and Boethling R.S. 1996 "Improve Methode for estimating water solubility from octanol/water partition coefficient" *Environmental Toxicology of Chemistry* 15, 100
8. Brown M., MD and Adelaide A. Hebert, MD Houston, Texas, , 1997, "insect repellent: clinical review", *Journal of the American academy of dermatology* 36, 244
9. Eisert, R. and Pawliszyn, J., 1997, "New trends in solid-phase microextraction. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*", 103-135.
10. U.S. Environmental Protection Agency, 1998. "Reregistration Eligibility Decision-DEET", 5-6

11. Bell, J.W., 2002, "Human Exposures to N,N-diethyl-m-toluamide insect repellents reported to the American Association of Poison Control Centers 1993-1997." *International Journal of Toxicology* 21,341.
12. Heather L., Pawliszyn J., 2002, "Evolution of solid- phase microextraction technology" , *Journal of chromatography A* 885, 154
13. Frank D., Bart T. and Pat S., 2003, "Stir bar sorptive extraction of trace organic compounds in aqueous matrices", *LC-GC Europe*, 1-7
14. Μεκίνη Δ.,2004, "Ανάπτυξη νέας μεθόδου ανάλυσης νιτροπολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε υδατικά δείγματα με χρήση μικροεκχύλισης υγρής και στερεής φάσης (LPM,SPME) – GC/MS και αποδόμηση αυτών με χρήση υπερήχων", μεταπτυχιακή διατριβή του TUC
15. Canosa P., Rodriguez I., Rubi E., Cela R., 2005, "Optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of triclosan and possible related compounds in water samples", *Journal of chromatography A* 1072, 107
16. Lokhnauth J. K., 2005, "Solid phase microextraction and Stir bar Sorptive extraction coupled to ion mobility spectrometry", Ph.D, department of chemistry and biochemistry
17. U.S. Environmental Protection Agency, 2005, "Reregistration Eligibility Decision (RED) Di-n-propyl-isocinchromeronate (MGK repellent 326)", 3-16
18. Παπαδομανωλάκη Θ., 2005 " Σύγχρονες Τεχνικές μικροεκχύλισης υγρής φάσης για την ανάλυση οργανικών μικρορυπαντών", μεταπτυχιακή διατριβή
19. Coodner K. L., and Jinhe B., 2006, "The use of stir-bar sorptive extraction (SBSE) for analytical food analysis" *Florida State Horticultural Society* 199, 379-382
20. Debboun M., Frances S. P. and Strickman D., 2006, "Insect repellent Principles, methods and Uses", CSC Press

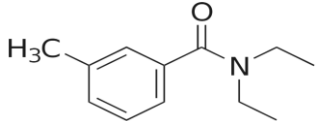
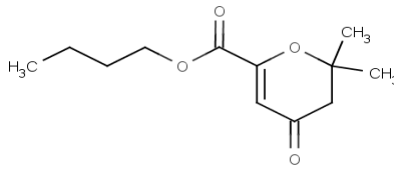
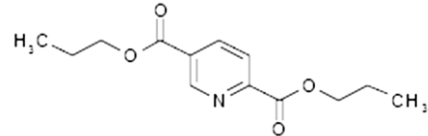
21. Ouyang G. and Pawliszyn J., 2006, "Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring", Trends in Analytical Chemistry 25, 692
22. Γιδαράκος Ε., 2006, "Επικίνδυνα απόβλητα διαχείριση – επεξεργασία - διαχείριση", Ζήτη, 72-73, 84-85
23. Τριανταφυλλόπουλος Ν., 2006, "Μελέτη των ροφημένων ειδών άνθρακα κατά την ισορροπία της διασπαστικής ρόφησης του CH₄ σε κεραμοδιμεταλλικούς ηλεκτρολύτες βασισμένους στο νικέλιο" διδακτορική διατριβή TUC, 68-73
24. Environmental Protection Agency, 2007, "Diethyltoluamide (DEET) chemical summary, toxicity and exposure assessment for children's health", 1-5
25. Rodil R., Moeder M., 2007, "Stir bar sorptive extraction coupled to thermodesorption – gas chromatography – mass spectrometry for the determination of insect repellent substances in water sample", Journal of Chromatography A 1178, 9
26. Brooke W. Bissinger, R. Michael R., 2009, "Tick repellents: Past, Present and Future", Pesticide Biochemistry and Physiology 96, 66-67
27. Mecmurry J., 2009, "Οργανική Χημεία Τόμος Ι", Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης U.S, 524-525

Ηλεκτρονικοί Ιστότοποι

28. http://www.chemicaldictionary.org/dic/B/Butopyronoxyl_830.html
29. <http://zenbackpacking.net/InsectRepellent.htm#DEET>
30. http://hazmap.nlm.nih.gov/cgi-bin/hazmap_generic?tbl=TblAgents&id=1780
31. <http://www.pesticideinfo.org>
32. <http://www.deyax.org.gr>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 11: Ονομασίες ενώσεων, δομές και άλλα σχετικά δεδομένα⁶

Συντομογραφία	Ονομασία	Cas. no.	Εμπειρικός Τύπος	Δομή	Επιλεγμένα ιόντα (m/z)
DEET	N,N-Diethyl-m-toluamide	134-62-3	C ₁₂ H ₁₇ NO		91, 119 , 190
Butopyronoxyl	Butyl-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-4-oxo-2H-pyran-6-carboxylate	532-34-3	C ₁₂ H ₁₈ O ₄		115, 125 , 126
R-326/ MGK-326	Di-n-propyl isocinchomeronate	136-45-8	C ₁₃ H ₁₇ NO ₄		165 , 179, 192

⁶ Πηγή [25]

