



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΗΓΜΕΝΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΠΟΛΥΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ ΔΙΦΑΙΝΥΛΙΩΝ, ΑΛΟΓΟΝΟΜΕΝΩΝ
ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ, ΠΟΛΥΚΥΚΛΙΚΩΝ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ
ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΩΝ ΚΑΙ ΚΥΑΝΟΤΟΞΙΝΩΝ

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΤΣΙΜΕΛΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ευχαριστώ θερμά τη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου που προκήρυξε τη θέση του Υποψήφιου Διδάκτορα και εισηγήθηκε την εκπόνηση της Διδακτορικής αυτής Διατριβής στον Τομέα ΙΙΙ Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών.

Εκφράζω ιδιαίτερες ευχαριστίες στο Ινστιτούτο Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος και στο Εργαστήριο Καταλυτικών-Φωτοκαταλυτικών Διεργασιών, Ηλιακή Ενέργεια -Περιβάλλον, όπου εκπονήθηκε η παρούσα Διατριβή. Επίσης ευχαριστώ θερμά το ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος για την παροχή υποτροφίας (2005-2009).

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με στήριξαν κατά την διάρκεια της θητείας μου ως Υποψήφια Διδάκτορα στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου στον Τομέα ΙΙΙ Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών:

- Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Δήμητρα Δημοτικάλη, Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, και Επιβλέπουσα της Διατριβής για την θαυμάσια συνεργασία κατά το διάστημα αυτό, για την πολύτιμη βοήθειά της καθώς και για τις παρατηρήσεις της για την τελική διαμόρφωση του κειμένου.

- Ευχαριστώ επίσης, τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής κ. Ι. Σιμιτζή, Καθηγητή Ε.Μ.Π., κ. Ο. Μαρκοπούλου, Καθηγήτρια Ε.Μ.Π., κ. Σ. Λιοδάκη, Καθηγητή Ε.Μ.Π., κ. Α. Καλοκαιρινό, Καθηγητή Ε.Κ.Π.Α., κ. Ε. Δασενάκη, Αναπλ. Καθηγητή Ε.Κ.Π.Α. και κ. Σ. Πολυμένη, Επικ. Καθηγητή Ε.Μ.Π., για τις υποδείξεις τους στη διαμόρφωση του κειμένου.

- Το μεγαλύτερο, όμως, ευχαριστώ το οφείλω, χωρίς αμφιβολία, στην Δρ. Αναστασία Χισκιά, Ερευνήτρια Α΄ του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος και μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής μου, για την καθοδήγησή της, το ενδιαφέρον της και την καθοριστική επιστημονική της στήριξη. Την ευχαριστώ για τις ευκαιρίες που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Ήταν πάντα εκεί για περιεκτικές συζητήσεις και ουσιαστικές παρατηρήσεις (επιστημονικές και μη). Τέλος την ευχαριστώ για την πολύτιμη συμβολή της στη συγγραφή και την παρουσίαση της παρούσας διατριβής.

- Θερμότατα ευχαριστώ επίσης, τον Δρ. Ηλία Παπακωνσταντίνου για το ενδιαφέρον του και την πολύτιμη βοήθεια του σε επιστημονικά θέματα, όποτε και αν τη χρειάστηκα. Τον ευχαριστώ επίσης θερμά για τη φιλική του διάθεση όλα αυτά τα χρόνια.

- Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στο Δρ. Θεόδωρο Τριάντη, φίλο και συνεργάτη, για την πολύτιμη βοήθειά του από την πρώτη μέρα της εκπόνησης αυτής της ερευνητικής εργασίας μέχρι την τελευταία.

- Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Δρ. Τριαντάφυλλο Καλούδη, για την πολύτιμη βοήθειά του και την επιστημονική του υποστήριξη.

- Αν και υποτίθεται ότι η Διδακτορική Διατριβή είναι μια εργασία προσωπική, εγώ δεν αισθάνθηκα ποτέ μόνη αλλά μέρος μιας ομάδας και γι' αυτό ευχαριστώ ιδιαίτερα την Ελένη, τη Σταματία, την Ειρήνη, την Εύα, την Γεωργία, το Γιώργο, την Σοφία και τον Γιάννη, για τη βοήθεια και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς θα μετρούσα 8 λιγότερους φίλους και πολλά μοναχικά βράδια στο εργαστήριο. (Παιδιά έχει κέρασμα μετά την παρουσίαση!)
- Οφείλω πολλά όμως και στους «άλλους» φίλους μου, που ακόμα και αν δεν εμπλέκονται άμεσα με την Διατριβή, βοήθησαν καθόλη την διάρκεια της εκπόνησής της να κρατήσω τις ισορροπίες!... (Βάσω και για σένα ήταν αυτό ☺).
- Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου, για την στήριξη που μου παρείχαν, προκειμένου να ολοκληρώσω αυτήν την Διατριβή. Σ' αυτούς οφείλω τα πάντα.
- Για το τέλος άφησα να ευχαριστήσω τον άντρα μου, γιατί με την αισιοδοξία του με εμπνέει να συνεχίζω.....

Στην κόρη μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκαν προηγμένες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό οργανικών ρύπων σε διαφορετικά υποστρώματα (επιφανειακά και πόσιμα ύδατα, μέλι). Οι οργανικοί ρύποι που επιλέχθηκαν περιλαμβάνουν τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια, αλογονομένους υδρογονάνθρακες, κυανοτοξίνες καθώς και τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Οι ρύποι αυτοί παρουσιάζουν αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον στην Ελλάδα αλλά και διεθνώς, λόγω της υψηλής τοξικότητάς τους, της εκτεταμένης εμφάνισής τους καθώς και της μεγάλης δυσκολίας στον προσδιορισμό τους.

Ειδικότερα, αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού επτά πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (Polychlorinated Biphenyls, PCBs) σε δείγματα πόσιμων και επιφανειακών υδάτων με χρήση της τεχνικής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Head Space Solid Phase Microextraction, HS-SPME). Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν συγκεκριμένα ισομερή πολυχλωριωμένων διφαινυλίων, τα οποία αποτελούν δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης (“PCB markers”). Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των πιο σημαντικών πειραματικών παραμέτρων όπως, επιλογή ίνας, χρόνου και θερμοκρασίας εκρόφησης των αναλυτών, επίδραση του χρόνου ανάδευσης και εκχύλισης, η επίδραση μίγματος PCBs στην εκχύλιση κάθε αναλύτη ξεχωριστά. Ακολούθησε επικύρωση της μεθόδου σύμφωνα με τους ισχύοντες κανόνες επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων όπως αυτοί περιγράφονται με διεθνή πρότυπα. Η εφαρμοσιμότητα της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα υδάτων εκτιμήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων πόσιμου νερού από το δίκτυο ύδρευσης της ΕΥΔΑΠ στην Αθήνα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν ανιχνεύθηκαν μετρήσιμες συγκεντρώσεις PCBs ή οι συγκεντρώσεις ήταν μικρότερες του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου. Παράλληλα, διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για μία εξαιρετικά απλή, γρήγορη, εφαρμόσιμη και ευαίσθητη μέθοδο.

Αλογονομένοι υδρογονάνθρακες όπως το παραδιχλωροβενζόλιο (p-dichlorobenzene, p-DCB), το 1,2 διβρωμοαιθάνιο (1,2-Dibromoethane, 1,2-DBE) και το ναφθαλένιο (Naphthalene, Naphth) προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα σε δείγματα μελιού. Οι ενώσεις αυτές είναι βλαβερές ή έντονα τοξικές για τον άνθρωπο, εμφανίζονται στο μέλι λόγω της χρήσης τους ως χημικά για την αντιμετώπιση του σκώρου των κερύθρων και επομένως η ανίχνευσή τους σε ίχνη παρουσιάζει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον. Για το σκοπό αυτό αναπτύχθηκε και παρουσιάστηκε στην διεθνή βιβλιογραφία για πρώτη φορά, σύγχρονη αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των παραπάνω ρύπων σε δείγματα μελιού. Η μέθοδος βασίζεται στο συνδυασμό των τεχνικών HS-SPME και αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών (GC-MS). Η βελτιστοποίηση της μεθόδου έγινε για το σύνολο των πειραματικών μεγεθών που επηρεάζουν την ανάκτηση των τριών αναλυτών με την τεχνική

HS-SPME και ακολούθησε η επικύρωσή της με έλεγχο της γραμμικότητας, επαναληψιμότητας, αναπαραγωγιμότητας, των ορίων ανίχνευσης καθώς και της ανάκτησης των τριών αναλυτών σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης. Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία σε πραγματικά δείγματα μελιού, εμφανίζοντας απλότητα και ταχύτητα στην εφαρμογή της, καθώς και υψηλή ευαισθησία στην ανίχνευση των συγκεκριμένων αναλυτών. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν την μέθοδο εφαρμόσιμη σε αναλύσεις ρουτίνας και κατάλληλη για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

Οι κυανοτοξίνες αποτελούν οργανικούς ρύπους βιολογικής προέλευσης με υψηλή τοξικότητα και εμφανίζονται τελευταία με αυξημένη συχνότητα σε συστήματα επιφανειακών και παράκτιων υδάτων σε όλο τον κόσμο. Στα πλαίσια της διατριβής, αναπτύχθηκε μια αξιόπιστη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου με ηλεκτροψεκασμό (Electron Spray Ionization, Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, ESI-LC-MS/MS) για τον προσδιορισμό πέντε κυανοτοξινών (μικροκυστίνη- LR, RR, YR, LA και Nonτουλαρίνη) σε πόσιμα και επιφανειακά ύδατα. Παράλληλα, διεξήχθη έρευνα για την παρουσία κυανοτοξινών στα επιφανειακά ύδατα και στο πόσιμο νερό της Αθήνας. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των πέντε κυανοτοξινών, με βάση το σύστημα MS/MS, επιτεύχθηκε μετά από τη βελτιστοποίηση μιας σειράς παραμέτρων που είχαν ως στόχο την μεγιστοποίηση του καταγραφόμενου σήματος. Η ταυτοποίηση όλων των κυανοτοξινών που αναλύθηκαν πραγματοποιήθηκε με την παρακολούθηση δύο θυγατρικών ιόντων για κάθε μοριακή μάζα, ενώ προτάθηκαν και οι μηχανισμοί δημιουργίας των θυγατρικών ιόντων. Η εκχύλιση και προσυγκέντρωση των κυανοτοξινών σε εμβολιασμένα δείγματα νερών πραγματοποιήθηκαν με χρήση της τεχνικής της εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Τα ποσοστά ανάκτησης αξιολογήθηκαν σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης, ενώ παράλληλα προσδιορίστηκαν εξαιρετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον συστηματικό έλεγχο δειγμάτων επιφανειακού νερού από τη λίμνη του Μαραθώνα και δειγμάτων πόσιμου νερού από το δίκτυο της ΕΥΔΑΠ στην Αθήνα. Καμία κυανοτοξίνη δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα πόσιμου νερού που εξετάστηκαν, ανιχνεύθηκαν, όμως, μικροκυστίνες (μικροκυστίνη LR και μικροκυστίνη RR) σε δείγματα επιφανειακού νερού από την λίμνη του Μαραθώνα. Οι συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν ήταν πολύ χαμηλότερες του ορίου που έχει προταθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) (1 $\mu\text{g/L}$ για την μικροκυστίνη LR). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποτελούν την πρώτη αναφορά για την ύπαρξη μικροκυστινών στο νερό της λίμνης του Μαραθώνα.

Η τελευταία κατηγορία ρύπων που μελετήθηκε στα πλαίσια της διατριβής είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς) (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs). Οι ενώσεις αυτές προέρχονται τόσο από φυσικές πηγές όσο και από ανθρωπογενείς

δραστηριότητες, χαρακτηρίζονται από μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες και σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή και Εθνική νομοθεσία αποτελούν ουσίες προτεραιότητας και η παρουσία τους στα νερά θα πρέπει να ελέγχεται. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος προσδιορισμού οκτώ πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου σε συνδυασμό με φωτοϊοντισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (LC-APPI-MS/MS). Η εκχύλιση και προσυγκέντρωση των ΠΑΥς σε εμβολιασμένα δείγματα νερών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης. Για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών χρησιμοποιήθηκαν δευτεριωμένα πρότυπα ΠΑΥς. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών φωτοϊοντισμού επιτεύχθηκε με τη χρήση ενώσεων που ενίσχυναν τον ιοντισμό των ΠΑΥς (dopants). Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, επικυρώθηκε σύμφωνα με διεθνή πρότυπα μετά από διερεύνηση της γραμμικότητας, της ακρίβειας, της εκλεκτικότητας και της επαναληψιμότητας. Τα όρια ανίχνευσης των ΠΑΥς που επιτεύχθηκαν ήταν εξαιρετικά χαμηλά και η μέθοδος ικανοποιεί απόλυτα τις απαιτήσεις πρόσφατης Ευρωπαϊκής Οδηγίας (2008/105/EK) ως προς τα νέα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των ΠΑΥς σε επιφανειακά νερά. Η εφαρμοσιμότητα της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε πραγματικά δείγματα υδάτων (πόσιμα και επιφανειακά).

Abstract

The present thesis focuses on the development of advanced analytical methods for the determination of organic pollutants in various matrices (surface-drinking water, honey). Target pollutants, i.e., polychlorinated biphenyls (PCBs), halogenated hydrocarbons, cyanotoxins and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), were chosen due to their high toxicity, their widespread occurrence and the difficulty in their determination.

In this frame, a new method for the determination of polychlorinated biphenyls in water samples has been developed. Analysis was carried out using gas chromatography with electron capture detector (GC/ECD) after extraction and preconcentration of target analytes by solid phase microextraction (SPME) with a 100µm film thickness polydimethylsiloxane fiber. The target compounds studied, known as “PCB markers”, included one trichloro, one tetrachloro, two pentachloro, two hexachloro and one heptachloro biphenyls, named according to IUPAC PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB118, PCB 138, PCB 153 and PCB 180, respectively. Several parameters affecting the extension of the adsorption process (i.e., immersion versus head space SPME extraction efficiency, addition of salt, adsorption time, extraction temperature, stability of the fiber used) were studied. The response of each analyte was determined in the presence and absence of other congeners at different levels. Head space

-solid phase microextraction (HS-SPME) showed better sensitivity compared to immersion in the aqueous phase, without carryover between the samples. The above method also showed good linearity over a wide concentration range from $0,001\mu\text{g l}^{-1}$ to $10\mu\text{g l}^{-1}$ level for the majority of the target analytes, while correlation coefficients (r^2) ranged among 0,9735 and 0,9942. The detection limits were in the order of nanogram per liter level (1 to 5 ng l^{-1}) with relative standard deviation (RSD) values below 13% within the above mentioned concentration range. The method was applied for the determination of potable water samples of the area of Athens. Target analytes were not detected or gave values below the limit of quantification of the proposed method. The proposed method proved to be simple, fast sensitive and applicable for the analysis of PCBs in water samples.

A new method for the simultaneous determination of halogenated hydrocarbons (1,4-dichlorobenzene (p-DCB), naphthalene and 1,2-dibromoethane (1,2-DBE)) residues in honey has also been developed. Analysis was carried out using gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) in selected ion monitoring mode (SIM), after extraction and preconcentration of target analytes by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), with a $100\mu\text{m}$ film thickness polydimethylsiloxane (PDMS) fiber. Several parameters affecting the extension of the adsorption process (i.e., addition of salt, extraction time, extraction temperature) were studied. The optimal conditions for the determination of these analytes were established. The proposed HS-SPME method showed good sensitivity, without carryover between the samples. Linearity was studied from 5 to $2500\mu\text{g kg}^{-1}$ for p-DCB, $0,5$ to $500\mu\text{g kg}^{-1}$ for naphthalene and 5 to $500\mu\text{g kg}^{-1}$ honey for 1,2-DBE with correlation coefficients (r^2) ranging from 0.9901 to 0.9999. Precision was assessed and both intra and inter-day R.S.D.s (%) were below 6.3%. The detection limits were found to be 1 , $0,1$ and $2\mu\text{g kg}^{-1}$ honey for p-DCB, naphthalene and 1,2-DBE, respectively. The percentage recoveries that were evaluated with the proposed HS-SPME method and the standard addition calibration technique gave values among 72.8 and 104.3% for measurements in samples spiked with one target analyte or mixtures of the three. This method has been applied for the analysis of unknown honey samples. The results showed an excellent applicability of the proposed method for the determination of the target compounds in honey samples.

Blooms of cyanobacteria (blue-green algae) occur world-wide in fresh and brackish waters. These blooms pose an environmental hazard because of the release, by some of these species, of water soluble toxic compounds, called cyanotoxins. A part of this thesis has been the development of a new method for the determination of 5 cyanotoxins (MC-RR, -LR, -YR, -LA and nodularin) in surface and drinking water, using liquid chromatography hyphenated with electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). The extraction and preconcentration of cyanotoxins from spiked samples was carried out with solid phase extraction using Oasis HLB cartridges. The mean recoveries that were evaluated at two

concentration levels (0.1 and 1 $\mu\text{g l}^{-1}$) gave values among 69 and 113 % for all target analytes, while the detection limits ranged among 0.002 and 0.017 $\mu\text{g l}^{-1}$. The detection, confirmation and quantitative determination were achieved with mass spectrometry-triple stage quadrupole detector in ESI mode, after optimising several parameters. All target compounds were confirmed in SRM mode (one parent ion and two daughter ions for each compound). Fragmentation patterns of the target compounds were explained by proposed mechanisms. The application of the proposed method was carried out in monitoring surface (Marathonas Lake, a reservoir of Athens drinking water) and drinking water of Athens. Cyanotoxins were not detected in drinking water samples but microcystins LR and RR were detected in surface water samples of Marathonas lake at concentrations lower than the limit set in drinking water by WHO (1 $\mu\text{g l}^{-1}$ for MC-LR). The results of this study constitute the first report on the presence of microcystins in Marathonas Lake.

A novel method for the determination of EU 8 priority pollutants polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), in lake and drinking water, has been developed and validated using liquid chromatography/dopant assisted atmospheric-pressure photoionization/tandem mass spectrometry (LC-APPI-MS/MS). Clean up procedure for lake and drinking water was performed with (SPE) on C_{18} cartridges. All measurements were carried out in a LC-MS/MS system and the target compounds were quantified by use of 3 deuterated PAHs. Various dopants and dopant mixtures were tested for their effectiveness and the most suitable one for the majority of target compounds was anisole. The proposed LC-APPI-MS/MS method was comprehensively validated taking into account, specificity, linearity, accuracy and precision. The linearity of the method was studied from 1 to 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ for Anthracene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(k)fluoranthene, Benzo(a)pyrene, Benzo(g,h,i)perylene and Indeno(1,2,3,c,d)pyrene and from 10 to 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ for Naphthalene and Fluoranthene, with correlation coefficients (r^2) ranging from 0.991 to 0.9990. Precision was assessed and both intra and inter-day R.S.D.s (%) were below 19.5 % for all target analytes in surface and drinking water. The mean recoveries, that were evaluated at two concentration levels (0.01 and 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ /PAH with the exception of Naphthalene and Fluoranthene which were evaluated at the concentration levels 0.1 and 1 $\mu\text{g l}^{-1}$), were among 78 and 119 % for all target analytes. The proposed analytical method achieves very low limits of detection, in surface waters ($\leq 0.005 \mu\text{g l}^{-1}$) and drinking waters ($\leq 0.0005 \mu\text{g l}^{-1}$). To the best of our knowledge this is the first report on PAHs determination in water samples with LC-APPI-MS/MS. Moreover the proposed method is the only LC-MS/MS method which is in compliance with the recent directive 2008/105/EC, providing higher sensitivity and specificity than did earlier published methods. The method was successfully applied in lake and drinking water samples of the area of Athens.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	
Εισαγωγή-Σκοπός της Διατριβής.....	1
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	5
Κεφάλαιο 1: Οργανικοί ρύποι.....	5
1.1. Πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs).....	5
1.1.1. Ονοματολογία και δομή των PCBs.....	6
1.1.2. Φυσικές ιδιότητες των PCBs.....	7
1.1.3. Φυσικές Σταθερές των PCBs.....	8
1.1.4. Μίγματα Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (Aroclor).....	9
1.1.5. Τα PCBs ως παραπροϊόντα.....	9
1.1.6. Τα PCBs στο περιβάλλον.....	10
1.1.7. Κύρια περιστατικά ρύπανσης από PCBs.....	13
1.1.8. Ρυθμιστικές κινήσεις.....	14
1.2. Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς).....	16
1.2.1. Ονοματολογία και δομή των ΠΑΥς.....	18
1.2.2. Φυσικές Ιδιότητες των ΠΑΥς.....	20
1.2.3. ΠΑΥς στο περιβάλλον.....	21
1.2.4. ΠΑΥς στα νερά.....	23
1.2.5. Τοξικότητα και καρκινογόνος δράση των ΠΑΥς.....	24
1.3. Αλογονομένοι Υδρογονάνθρακες.....	26
1.3.1. 1,4-διχλωροβενζόλιο (p-DCB).....	27
1.3.2. 1,2-Διβρωμοαιθάνιο (1,2-DBE).....	28
1.4. Κυανοτοξίνες.....	30
1.4.1. Ευτροφισμός και επεισόδια έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης (blooms).....	31
1.4.2. Κυανοβακτήρια στο περιβάλλον.....	34
1.4.3. Κυανοβακτηριακές Τοξίνες.....	35
1.4.4. Τοξικότητα των μικροκυστινών και της νοντουλαρίνης.....	42
1.4.5. Επίδραση των κυανοτοξινών στην ανθρώπινη υγεία. Δηλητηριάσεις ανθρώπων.....	43
Κεφάλαιο 2: Σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές.....	46
2.1. Γενικές αρχές αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC).....	46
2.1.1. Ανιχνευτές αέριας χρωματογραφίας.....	49
2.1.1.1. Ανιχνευτής δέσμμευσης ηλεκτρονίων (ECD).....	49
2.1.1.2. Ανιχνευτής Φασματομετρίας μάζας (MS).....	50
2.2. Γενικές αρχές υγρής χρωματογραφίας (LC).....	54
2.2.1. Τεχνικές ιοντισμού στο σύστημα LC-MS/MS.....	56
2.2.1.1. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI).....	58
2.2.1.2. Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI).....	62
2.2.1.3. Φωτοϊοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (APPI).....	63

2.2.2 Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών σε σειρά (Tandem MS)	65
Κεφάλαιο 3. Σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης οργανικών ρύπων	68
3.1. Η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)	68
3.2. Τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME).....	75
3.2.1. Εισαγωγή.....	75
3.2.2 Αρχή της μεθόδου.....	76
Κεφάλαιο 4: Ανάπτυξη Προηγμένων Αναλυτικών Μεθόδων για τον προσδιορισμό Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων, Αλογονομένων Υδρογονανθράκων, Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων και Κυανοτοξινών	82
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	86
Κεφάλαιο 5: Πειραματικές μέθοδοι προσδιορισμού αναλυτών.....	86
5.1. Ανάλυση Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (PCBs) στο νερό	87
5.1.1. Αντιδραστήρια-Συσκευές-Υλικά-Όργανα για την ανάλυση των Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (PCBs) στο νερό. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων.....	87
5.1.2. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης για την ανάλυση Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (PCBs) στο νερό.....	88
5.2. Ανάλυση Αλογονομένων Υδρογονανθράκων (p-DCB, 1,2-DBE) και Ναφθαλενίου στο μέλι.....	89
5.2.1. Αντιδραστήρια-Συσκευές-Υλικά-Όργανα για την ανάλυση των Αλογονομένων Υδρογονανθράκων (p-DCB, 1,2-DBE) και του Ναφθαλενίου στο μέλι. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων	89
5.2.2. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης για την ανάλυση 1,2- Διβρωμοαιθανίου, 1,4-Διχλωροβενζολίου και Ναφθαλενίου στο μέλι	91
5.3. Ανάλυση Κυανοτοξινών στο νερό.	91
5.3.1. Αντιδραστήρια-Συσκευές-Υλικά-Όργανα για την ανάλυση Κυανοτοξινών. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων	91
5.3.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης για την ανάλυση κυανοτοξινών στο νερό. Δειγματοληψία Κυανοτοξινών	96
5.3.3 Δειγματοληψία επιφανειακού ύδατος από τη λίμνη του Μαραθώνα καθώς και πόσιμου νερού της Αθήνας. Διαρκής έλεγχος για την παρουσία κυανοτοξινών.....	98
5.4. Ανάλυση Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων (ΠΑΥς) στο νερό..	100
5.4.1. Αντιδραστήρια-Συσκευές-Όργανα για την ανάλυση Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων(ΠΑΥς). Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων.....	100
5.4.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης για την ανάλυση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων	105

5.5	Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων	107
5.5.1.	Υπολογισμός ορίων ανίχνευσης	109
5.5.2.	Μελέτη ανθεκτικότητας αναλυτικών μεθόδων	111

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....113

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs)113

6.1	Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού PCBs με την τεχνική HS-SPME	113
6.1.1.	Επιλογή ίνας και θερμοκρασίας-χρόνου εκρόφησης αναλυτών.....	113
6.1.2.	Αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης του δείγματος.....	114
6.1.3.	Επίδραση του χρόνου ανάδευσης και εκχύλισης των PCBs στην HS-SPME μέθοδο	115
6.1.4.	Σύγκριση HS-SPME και SPME μεθόδων για την ανάλυση των PCBs...	116
6.1.5.	Συντελεστές κατανομής των PCBs στην τεχνική HS-SPME.....	119
6.1.6.	Γραμμικότητα της προτεινόμενης μεθόδου	120
6.1.7.	Ανάκτηση και ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου	121
6.1.8.	Επίδραση της συνολικής συγκέντρωσης των PCBs στην ανάκτηση του κάθε αναλύτη με την προτεινόμενη HS-SPME μεθοδο.....	123
6.1.9.	Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της προτεινόμενης μεθόδου. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα.....	124

Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού 1,2-Διβρωμοαιθανίου, 1,4-Διχλωροβενζολίου και Ναφθαλενίου στο μέλι, με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (HS-SPME) και αέρια χρωματογραφία-ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS).....127

7.1.	Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού 1,2- Διβρωμοαιθανίου (1,2-DBE), 1,4- Διχλωροβενζολίου (p-DCB) και Ναφθαλενίου στο μέλι με την τεχνική HS-SPME-Εισαγωγή	127
7.1.1.	Επιλογή ίνας και θερμοκρασίας-χρόνου εκρόφησης αναλυτών.....	127
7.1.2.	Συντελεστές κατανομής των 1,2-DBE, p-DCB και Ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο	128
7.1.3.	Αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης του δείγματος.....	129
7.1.4.	Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης των 1,2-DBE, p-DCB, Ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο.....	130
7.1.5.	Επίδραση του χρόνου εκχύλισης των 1,2-DBE, p-DCB, και Ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο.....	131
7.1.6.	Ανάλυση των 1,2-DBE, p-DCB και Ναφθαλενίου στο φασματογράφο μάζας	132
7.1.7.	Γραμμικότητα της προτεινόμενης μεθόδου	135
7.1.8.	Ανάκτηση και ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου	135
7.1.9.	Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της προτεινόμενης μεθόδου. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα.....	136

Κεφάλαιο 8: Αποτελέσματα ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS)138

8.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών	138
8.1.1. Απομόνωση και προσυγκέντρωση κυανοτοξινών	138
8.1.2. Επιλογή στήλης και εκλούστιακού συστήματος για το σύστημα υγρής χρωματογραφίας (HPLC).....	139
8.1.3. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών στο φασματογράφο μάζας	140
8.1.3.1. Προσδιορισμός της Μικροκυστίνης RR.....	142
8.1.3.2. Προσδιορισμός της Νοντουλαρίνης	144
8.1.3.3. Προσδιορισμός της Μικροκυστίνης YR.....	145
8.1.3.4. Προσδιορισμός της Μικροκυστίνης LR.....	147
8.1.3.5. Προσδιορισμός της Μικροκυστίνης LA.....	149
8.1.4. Επιλογή παραμέτρων στο σύστημα φασματομετρίας μάζας LC-MS/MS	150
8.1.5. Επάρκεια χρωματογραφικού διαχωρισμού	153
8.1.6. Ταυτοποίηση κυανοτοξινών	153
8.1.7. Εκλεκτικότητα. Παρεμποδιστές	154
8.1.8. Γραμμικότητα-Εύρος μεθόδου	154
8.1.9. Πιστότητα της προτεινόμενης μεθόδου	155
8.1.10. Ορθότητα της προτεινόμενης μεθόδου	157
8.1.11. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.....	159
8.1.12. Ανθεκτικότητα της προτεινόμενης μεθόδου	160
8.1.13. Εφαρμοσιμότητα της μεθόδου. Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων	161

**Κεφάλαιο 9: Αποτελέσματα ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού πολυκυκλικών
αρωματικών υδρογοναθράκων (ΠΑΥς) με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης
(SPE) και υγρή χρωματογραφία- φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού
τετραπόλου (LC-MS/MS).....**

9.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ΠΑΥς.....	172
9.1.1. Απομόνωση και προσυγκέντρωση των ΠΑΥς	172
9.1.2. Επιλογή στήλης και συστήματος έκλουσης για τον υγρό χρωματογράφο (HPLC)	173
9.1.3. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ΠΑΥς στο σύστημα LC-MS/MS....	173
9.1.3.1. Βελτιστοποίηση παραμέτρων που αφορούν την θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων	174
9.1.3.1.1. Προσδιορισμός Ναφθαλενίου	174
9.1.3.1.2. Προσδιορισμός Ανθρακενίου.....	176
9.1.3.1.3 Προσδιορισμός Φλορανθενίου	178
9.1.3.1.4. Προσδιορισμός Βενζο(β)φλορανθενίου, Βενζο(κ)φλορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου	179
9.1.3.1.5. Προσδιορισμός Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Βενζο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου	181
9.1.3.1.6. Προσδιορισμός δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων Ναφθαλενίου- D8, Ανθρακενίου-D10, Βενζο(α) πυρενίου-D12	183
9.1.3.2. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν στον ιοντισμό των μοριακών ιόντων.....	187
9.1.4 Επάρκεια χρωματογραφικού διαχωρισμού	192
9.1.5. Ταυτοποίηση των ΠΑΥς.....	193
9.1.6. Εκλεκτικότητα. Παρεμποδιστές	193
9.1.7. Γραμμικότητα και Εύρος της μεθόδου	194

9.1.8. Πιστότητα της προτεινόμενης μεθόδου	195
9.1.9. Ορθότητα της προτεινόμενης μεθόδου	197
9.1.10. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.....	199
9.1.11. Ανθεκτικότητα της προτεινόμενης μεθόδου	200
9.1.12. Εφαρμοσιμότητα της μεθόδου-Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.....	201
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	203
Κεφάλαιο 10: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού Πολυχλωριωμένων	
Διφαινυλίων	203
10.1. Εισαγωγή.....	203
10.2. Ανάπτυξη της HS-SPME μεθόδου	205
10.2.1. Επιλογή ίνας, χρόνου και θερμοκρασίας εκρόφησης των αναλυτών	205
10.2.2. Αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης του δείγματος	207
10.2.3. Επίδραση του χρόνου ανάδευσης και εκχύλισης των PCBs στην HS- SPME μέθοδο	207
10.2.4. Σύγκριση HS-SPME και SPME μεθόδων για την ανάλυση των PCBs.	208
10.3. Επικύρωση της προτεινόμενης HS-SPME μεθόδου.....	209
Κεφάλαιο 11: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού 1,2- Διβρωμοαιθανίου, 1,4- Διχλωροβενζολίου και Ναφθαλενίου στο μέλι.....	212
11. 1. Εισαγωγή.....	212
11.2. Ανάπτυξη της HS-SPME μεθόδου	214
11.2.1. Επιλογή ίνας, χρόνου και θερμοκρασίας εκρόφησης αναλυτών	214
11.2.2. Αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης του δείγματος	216
11.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης του 1,2-DBE, p-DCB και ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο.....	217
11.2.4. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης του 1,2-DBE, p-DCB και ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο.....	218
11.3. Ανάλυση του 1,2-DBE, p-DCB και ναφθαλενίου στο φασματογράφο μάζας .	218
11.4. Επικύρωση της προτεινόμενης HS-SPME μεθόδου.....	219
Κεφάλαιο 12: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS)	222
12.1. Εισαγωγή.....	222
12.2. Απομόνωση και προσυγκέντρωση των κυανοτοξινών	224
12.3. Επιλογή στήλης και εκλουστικού συστήματος	227
12.4. Προσδιορισμός Κυανοτοξινών στο φασματογράφο μάζας	228
12.4.1. Προσδιορισμός της μικροκυστίνης RR.....	230

12.4.2. Προσδιορισμός της νοντουλαρίνης.....	233
12.4.3. Προσδιορισμός της μικροκυστίνης YR.....	236
12.4.4. Προσδιορισμός της μικροκυστίνης LR.....	238
12.4.5. Προσδιορισμός της μικροκυστίνης LA.....	241
12.5. Επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου.....	248
12.6. Ανάλυση δειγμάτων για την παρουσία κυανοτοξινών στα επιφανειακά ύδατα και στο πόσιμο νερό της Αθήνας.....	250
Κεφάλαιο 13: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού πολυκυκλικών αρωματικών υδρογοναθράκων (ΠΑΥς) με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS).....	255
13.1. Εισαγωγή.....	255
13.2. Απομόνωση και προσυγκέντρωση των ΠΑΥς.....	257
13.3. Επιλογή στήλης και εκλουστικού συστήματος για το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	258
13.4. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ΠΑΥς στο σύστημα LC-MS/MS.....	259
13.4.1. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν την θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων.....	259
13.4.1.1. Προσδιορισμός του Ναφθαλενίου.....	259
13.4.1.2. Προσδιορισμός του Ανθρακενίου.....	260
13.4.1.3. Προσδιορισμός του Φλουορανθενίου.....	260
13.4.1.4. Προσδιορισμός του Βενζο(β)φλουορανθενίου, Βενζο(κ)Φλουορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου.....	261
13.4.1.5. Προσδιορισμός του Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Βενζο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου.....	261
13.4.1.6. Προσδιορισμός των δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων του Ναφθαλενίου-D8, Ανθρακενίου-D10 και Benzo(α)πυρενίου-D12 ...	262
13.4.2. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν στον ιοντισμό των μοριακών ιόντων.....	262
13.5. Επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου.....	266
13.6. Εφαρμοσιμότητα της μεθόδου. Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.....	269
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	271
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	275

Εισαγωγή-Σκοπός της Διατριβής

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει «κοινή συνείδηση» τόσο στους ειδικούς επιστήμονες, όσο και στους απλούς ανθρώπους, το γεγονός ότι η ποιότητα του περιβάλλοντος συνεχώς χειροτερεύει με συνέπειες που δεν μπορούν ακόμα να εκτιμηθούν.

Η συνειδητοποίηση του μεγέθους του παραπάνω προβλήματος οδήγησε στη δημιουργία των πρώτων προβληματισμών και σχεδιασμών για τη λήψη μέτρων, προκειμένου να διασφαλιστεί η ποιότητα του περιβάλλοντος. Στα πλαίσια των προσπαθειών που καταβάλλονται σε παγκόσμια κλίμακα για την προστασία του περιβάλλοντος, σημαντική θέση κατέχει η διατήρηση της καθαρότητας της ατμόσφαιρας, των νερών και του εδάφους.

Ωστόσο, μία από τις αναγκαίες προϋποθέσεις για την σωστή αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών προβλημάτων είναι η γνώση του είδους και της ποσότητας των χημικών ενώσεων που ρυπαίνουν το περιβάλλον. Για αυτούς τους λόγους η ανάπτυξη σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού οργανικών ρύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα αλλά και τρόφιμα, είναι περισσότερο επιβεβλημένη από ποτέ. Η Ευρωπαϊκή Ένωση αλλά και άλλοι διεθνείς οργανισμοί έχουν εκδώσει και συνεχίζουν να εκδίδουν ένα μεγάλο αριθμό οδηγιών που σχετίζονται με τον συστηματικό έλεγχο αυτών των ρύπων σε περιβαλλοντικά δείγματα καθώς και με την θέσπιση χαμηλών επιτρεπόμενων ορίων των ρύπων αυτών.

Η ανάπτυξη προηγμένων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού οργανικών ρύπων που παρουσιάζουν αυξημένο ενδιαφέρον στην Ελλάδα αλλά και διεθνώς αποτέλεσε και το σκοπό της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα αναπτύχθηκαν αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό:

- Πολυχλωριωμένων διφαινυλίων σε επιφανειακά και πόσιμα νερά, με την τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME) και αέρια χρωματογραφία-ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (Gas Chromatography-Electron Capture Detector, GC-ECD).
- 1,2- Διβρωμοαιθανίου, 1,4-Διχλωροβενζολίου και Ναφθαλενίου στο μέλι, με την τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) και αέρια χρωματογραφία-ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-ECD).
- Κυανοτοξινών σε επιφανειακά και πόσιμα νερά με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extracxtion, SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) .
- Πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε επιφανειακά και πόσιμα νερά με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) σε συνδυασμό με την τεχνική

φωτοϊοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI) .

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinated Biphenyls, PCBs) συγκαταλέγονται ανάμεσα στους ρύπους που θεωρούνται παγκόσμιοι και επίμονοι ρυπαντές, ενώ παράλληλα μπορεί να ανιχνεύονται σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού επτά PCBs (τρίχλωρο έως επτάχλωρο διφαινύλια) σε υδατικά δείγματα (επιφανειακά και πόσιμα) με την τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SMPE). Τα συγκεκριμένα επτά ισομερή επιλέχθηκαν γιατί αποτελούν δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης από πολυχλωριωμένα διφαινύλια (“PCB markers”). Αυτή η ερευνητική προσπάθεια έχει πλέον ιδιαίτερη σημασία αφού μόλις το 2008 η Ευρωπαϊκή Ένωση, με την οδηγία 2008/105/EK σχετικά με πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, κατατάσσει τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια στις ουσίες υποκείμενες σε επανεξέταση για πιθανό χαρακτηρισμό ως «ουσίες προτεραιότητας» ή ως επικίνδυνες ουσίες προτεραιότητας»

Τα τελευταία χρόνια η τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SMPE) κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος στην ανάλυση οργανικών ρύπων από υδατικά δείγματα καθώς και από πολύπλοκα υποστρώματα, όπως είναι και το μέλι. Το μέλι είναι ένα εξαγωγίμο προϊόν της Ελλάδας, με μεγάλη οικονομική σημασία. Σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το μέλι ως φυσικό προϊόν πρέπει να είναι απαλλαγμένο από οργανικά και ανόργανα κατάλοιπα, ξένα προς τη σύστασή του. Ωστόσο, η εκτεταμένη χρήση εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και ακαριοκτόνων μέσα στις κυψέλες μελισσών μπορεί να προκαλέσει την ρύπανση του μελιού και γενικότερα των μελισσοκομικών προϊόντων. Σε αυτήν την μελέτη, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των υπολειμάτων p-DCB, Ναφθαλενίου και 1,2-DBE στο μέλι, με τον συνδυασμό της τεχνικής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος (Head Space Solid Phase Microextraction, HS-SPME και της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS) αποτέλεσε επίσης στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, δεδομένου ότι παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Η βελτιστοποίηση και επικύρωση της προτεινόμενης επιβεβαιωτικής μεθόδου, θεωρήθηκε εξ’ αρχής επιβεβλημένη προκειμένου η μέθοδος αυτή να μπορεί να εφαρμοστεί για αναλύσεις πραγματικών δειγμάτων μελιού.

Το πρόβλημα της παρουσίας κυανοτοξινών σε πόσιμα και επιφανειακά ύδατα ανά τον κόσμο, καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων αναλυτικών τεχνικών και μεθόδων για τον έλεγχο αυτών των τοξινών. Η ανάγκη αυτή προκύπτει και από την υποχρέωση των Εταιρειών Ύδρευσης για συμμόρφωση με τις Οδηγίες 98/83 ΕΚ και 2000/60, καθώς και με τα όρια που έχουν τεθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) για την ποιότητα του πόσιμου νερού και των επιφανειακών υδάτων. Στόχο της

παρούσας διατριβής αποτέλεσε και η ανάπτυξη μιας νέας και ευαίσθητης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS), για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των μικροκυστινών LR, RR, YR, LA και της νοντουλαρίνης σε δείγματα πόσιμου και επιφανειακού νερού. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά, στην οποία να επιτυγχάνονται χαμηλά όρια ανίχνευσης (της τάξης των ng/L) με ταυτόχρονο προσδιορισμό των 5 προαναφερθέντων κυανοτοξινών σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, η νέα μέθοδος αναμένεται να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των υπό εξέταση κυανοτοξινών. Η ανίχνευση κυανοβακτηρίων σε νερά λιμνών, σε διαφορετικά σημεία του Ελλαδικού χώρου κατά το παρελθόν, καθιστά ακόμα πιο επιτακτική την ανάγκη ανάπτυξης σύγχρονων και αξιόπιστων μεθόδων για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίησή των κυανοτοξινών. Στο πλαίσιο αυτό, ένας ακόμα στόχος της διατριβής αυτής ήταν και η διεξαγωγή της πρώτης συστηματικής έρευνας για την παρουσία κυανοτοξινών στο πόσιμο νερό της Αθήνας καθώς και στα επιφανειακά ύδατα των ταμιευτήρων της ΕΥΔΑΠ (λίμνες Μαραθώνα και Υλίκη). Η έρευνα αυτή αποτελεί την πρώτη αξιόπιστη προσπάθεια διερεύνησης της ύπαρξης κυανοτοξινών στο νερό της Αθήνας (πόσιμο και επιφανειακό), από το οποίο υδρεύεται ο μισός πληθυσμός της χώρας.

Η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS), ανήκει στις προηγμένες μεθόδους ανάλυσης στις οποίες συνδυάζονται τα πλεονεκτήματα της υγρής χρωματογραφίας με την επιβεβαίωση που επιτυγχάνεται μέσω της φασματομετρίας μάζας. Επιπλέον, η αξιοπιστία των αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού οργανικών ρύπων έχει στις μέρες μας ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι πολλοί προσδιορισμοί ρύπων διέπονται από πλήθος νομοθεσιών σε εθνικό αλλά και διεθνές επίπεδο.

Μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες περιβαλλοντικών ρύπων είναι και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς) (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs). Κάποιες από αυτές τις ενώσεις χαρακτηρίζονται από μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες ενώ παράλληλα ανιχνεύονται σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα. Στη βιβλιογραφία υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παρουσία διαφόρων ΠΑΥς στο πόσιμο και επιφανειακό νερό, δεδομένου ότι μπορεί να απειληθεί η υδρόβια ζωή και η υγεία των ανθρώπων. Ωστόσο, δεν υπάρχει δημοσιευμένη εργασία στην οποία να προτείνεται μέθοδος προσδιορισμού ΠΑΥς σε νερά (πόσιμα ή επιφανειακά) με την συνδυασμένη τεχνολογία LC-MS/MS. Επιπλέον, το 2008 τέθηκαν «αυστηρά» πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος στον τομέα της πολιτικής των επιφανειακών υδάτων (συμπεριλαμβάνονται ποτάμια, λίμνες και λοιπές επιφανειακές υδάτινες δεξαμενές), με ακόμα νεότερη οδηγία (2008/105/EK). Σε καμία δημοσιευμένη εργασία δεν επιτυγχάνεται επιβεβαίωση των οκτώ ΠΑΥς, σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, στα όρια που υπαγορεύονται από την πρόσφατη

οδηγία 2008/105/EK. Στα πλαίσια της διατριβής αυτής επιδιώχθηκε η ανάπτυξη μίας ευαίσθητης και αξιόπιστης LC-MS/MS μεθόδου για τον προσδιορισμό των οκτώ ΠΑΥς σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της οδηγίας 2008/105/EK. Σημαντική προτεραιότητα αποτέλεσε επίσης και η διευκρίνιση του μηχανισμού θραυσματοποίησης των μοριακών ιόντων των αναλυτών με την τεχνική MS/MS. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή είναι η πρώτη εργασία στην οποία προτείνεται μέθοδος προσδιορισμού των ΠΑΥς σε πόσιμα και επιφανειακά νερά με LC- MS/MS.

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1 : Οργανικοί ρύποι

1.1. Πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs)

Τα Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια (Polychlorinated Biphenyls, PCBs) είναι μία κατηγορία ενώσεων με 209 μέλη, στα οποία ένα ως δέκα άτομα χλωρίου είναι συνδεδεμένα με ένα μόριο διφαινυλίου.

Τα προϊόντα αυτά εχρησιμοποιούντο ευρέως, ως διηλεκτρικά υγρά σε πυκνωτές και μετασηματιστές ή ακόμα ως πρόσθετα σε εντομοκτόνα, σε χρώματα και σε αντιγραφικό χαρτί, σε στεγανοποιητικά και σε πλαστικά¹. Ο κύριος παραγωγός ήταν η εταιρία Monsanto Corporation (St. Louis, MO) ή οποία προωθούσε το προϊόν της με την ονομασία Aroclor, από το 1930 έως και το 1977. Η φυσική και η χημική τους σταθερότητα, καθώς και οι εξαιρετικές ηλεκτρικές τους ιδιότητες οδήγησαν στην εμπορική επιτυχία και χρησιμότητα των PCBs.

Εμπορικά, τα PCBs παρασκευάστηκαν και πουλήθηκαν ως σύνθετα μίγματα τα οποία περιείχαν πολλά ισομερή διαφόρων βαθμών χλωρίωσης. Τα περισσότερα ισομερή PCBs είναι άχρωμα, άοσμα κρυσταλλικά στερεά, ενώ τα εμπορικά μίγματα είναι διαυγή ρευστά μεγάλου ιξώδους. Αν και οι φυσικές και οι χημικές ιδιότητες ποικίλουν στα διάφορα ισομερή, τα PCBs έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και χαμηλή τάση ατμών². Είναι διαλυτά στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, στα έλαια και στις λιπαρές ουσίες. Είναι πολύ σταθερές ενώσεις και δεν διασπώνται εύκολα. Εντούτοις, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μπορούν να καταστραφούν μέσω χημικών, θερμικών και βιοχημικών διεργασιών. Η εργαστηριακή αποικοδόμηση των PCBs, απαιτεί θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες ή χρήση καταλυτών. Η αποικοδόμηση τους όμως στο περιβάλλον πραγματοποιείται σχετικά αργά, σε σχέση με άλλους οργανικούς ρύπους².

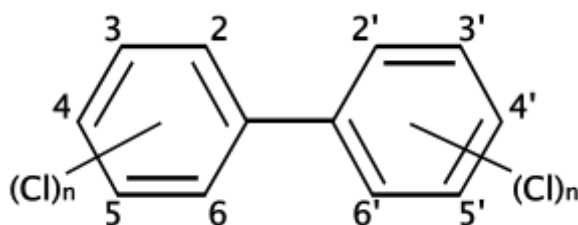
Τα PCBs εισήλθαν στο περιβάλλον κατά το παρελθόν, τόσο από παράνομες όσο και από νόμιμες χρήσεις και απορρίψεις. Είναι λιπόφιλα μόρια, αποικοδομούνται δύσκολα στο περιβάλλον και εμφανίζουν τάση βιοσυσσώρευσης. Η εκτεταμένη χρήση τους, έχει επιβαρύνει το περιβάλλον λόγω διαρροών και εσφαλμένης διαχείρισης ή εσφαλμένης απόθεσης. Οι περισσότερες από αυτές τις απορρίψεις τείνουν να εντοπίζονται κοντά στον τόπο χρήσης, σε επιχωματώσεις σκουπιδιών ή σε χώρους υγειονομικής ταφής και συχνά προκαλούν σχετικά υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις. Ωστόσο, η βαθμιαία μετακίνηση των PCBs από τις περιοχές της αρχικής ρύπανσης έχει συμβάλλει στην ευρεία ρύπανση του περιβάλλοντος. Η περιβαλλοντική μεταφορά (κυρίως ατμοσφαιρική μεταφορά) των PCBs είναι πολύπλοκη και παγκόσμια και κατά κανόνα οι αστικές περιοχές έχουν υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων από τις αγροτικές περιοχές². Τα PCBs μπορούν να θεωρηθούν ως ένας

«πανταχού παρόν ρύπος», αφού έχουν βρεθεί σε δείγματα θαλάσσιων φυτών, ζώων, ψαριών και φυσικά και στον άνθρωπο ².

Το δημόσιο ενδιαφέρον για τα PCBs, νομικό και επιστημονικό, πηγάζει από την διαπίστωση ότι είναι τοξικά μόρια και για αυτό το λόγο είναι μη αποδεκτά ως εμπορικά προϊόντα. Κατά καιρούς κυβερνήσεις κρατών έχουν πραγματοποιήσει διάφορες δράσεις, όπως στις ΗΠΑ η «Toxic Substances Control Act (TSCA)». Η τοξικότητά τους έχει μελετηθεί εκτενώς με έρευνες και με εργαστηριακές μελέτες σε είδη οργανισμών και με μελέτες σε ανθρώπους που είχαν εκτεθεί σε υψηλές δόσεις PCBs, στον χώρο εργασίας ή μέσω ατυχημάτων. Εντούτοις ο βαθμός της τοξικότητας των διαφόρων μελών PCBs και η φύση των επιδράσεων στον άνθρωπο και στους άλλους οργανισμούς είναι αμφισβητήσιμες. Γενικότερα, η θέση της EPA (Environmental Protection Agency) για τη τοξικότητα των PCBs δεν είναι αρκετά ξεκάθαρη αφού περιορίζεται στην φράση: «τα PCBs είναι πιθανά καρκινογενείς ουσίες για τον άνθρωπο».

1.1.1. Ονοματολογία και δομή των PCBs

Τα PCBs είναι μία τάξη 209 διακεκριμένων ενώσεων, οι οποίες έχουν το τύπο : $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, όπου το n λαμβάνει τιμές 1 έως 10 (για τις ενώσεις μονοχλωροδιφαινύλιο (n=1), έως δεκαχλωροδιφαινύλιο (n=10)). Ο γενικός συντακτικός τύπος των ενώσεων αυτών είναι:



Σχήμα 1.1. Γενικός συντακτικός τύπος των PCBs:

Ο όρος PCBs αναφέρεται σε όλη την τάξη, ή σε ένα ή περισσότερα μέλη: Τα PCBs αναφέρονται στα Chemical Abstracts με την περιγραφή «1,1 διφαινύλιο, χλωρο-παράγωγα» με ένα γενικό κωδικό CAS registry number 1336363. Σε εμπορικά προϊόντα μιγμάτων PCBs (γνωστά και ως Aroclor), έχει δοθεί ο κωδικός 12767-79-2. Συνώνυμα τα οποία αναφέρονται στα Chemical Abstracts είναι τα : διφαινύλιο, χλωριωμένο διφαινύλιο (με αντίστοιχους αγγλόφωνους όρους biphenyl, chlorinated diphenyl και diphenyl chlorinated). Τα πλήρη ονόματά τους είναι δύσχρηστα και για το λόγο αυτό σε πολλές δημοσιεύσεις τροποποιούνται. Έτσι για παράδειγμα το 3,3',4,4',5,5'- εξαχλωροδιφαινύλιο αναφέρεται ως 3,3',4,4',5,5'-hexaCB ή 3,3',4,4',5,5'-hexa ή πιο απλά 3,3',4,4',5,5'.

Οι Ballschmiter και Zell το 1980 ταξινόμησαν τα 209 μέλη σε μία αύξουσα αριθμητική σειρά η οποία ονομάστηκε "Ballschmiter", "BZ" ή αριθμοί κατά "IUPAC" από το 1 ως το 209.³ Είναι προφανής ο λόγος εφαρμογής του συστήματος αυτού που βοηθά στην εύκολη ταξινόμηση και αποτροπή των λαθών στην ονοματολογία των PCBs.

Όλη η τάξη των PCBs, όπως αναφέρθηκε, απαριθμεί 209 μέλη τα οποία ονομάζονται ομογενή μέλη (congeners). Όταν τα PCBs υποδιαιρούνται σύμφωνα με το βαθμό χλωρίωσης τότε χρησιμοποιείται ο όρος ομόλογη σειρά (homolog). Τα PCBs μίας ομόλογης σειράς, τα οποία έχουν τα άτομα χλωρίου σε διαφορετικές θέσεις καλούνται ισομερή (isomers), αντιστοιχούν δε σε ενώσεις με ίδιο μοριακό αλλά διαφορετικό συντακτικό τύπο. Στον παρακάτω Πίνακα 1.1 παρατίθενται οι κατηγορίες ονοματολογίας των χλωριωμένων διφαινυλίων.

Πίνακας 1.1. Κατηγορίες Ονοματολογίας των PCBs

Κατηγορία	Αριθμός διακεκριμένων ενώσεων
Ομογενή μέλη	209
Ομόλογες Σειρές	10
Ισομερή	1-46

1.1.2. Φυσικές ιδιότητες των PCBs

Οι φυσικές ιδιότητες των PCBs είναι ιδιαίτερα σημαντικές για την κατανόηση των αναλυτικών ιδιοτήτων τους και την τύχη τους στο περιβάλλον. Τα περισσότερα PCBs είναι άχρωμες και άοσμες κρυσταλλικές ουσίες. Τα εμπορικά μίγματα είναι διαφανή υγρά υψηλού ιξώδους (τα πιο υψηλής χλωρίωσης μίγματα είναι πιο παχύρρευστα, για παράδειγμα το Aroclor 1260 είναι μία συγκολλητική ρητίνη). Αν και οι φυσικές και χημικές τους ιδιότητες ποικίλουν, τα PCBs έχουν πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό καθώς και πολύ μικρή τάση ατμών. Γενικότερα οι φυσικές ιδιοτήτες τους είναι υπεύθυνες για την τάση βιοσυσσώρευσής τους⁴, την περιβαλλοντική τους μεταφορά, την διαλυτότητά τους σε ύδατα⁵ και την αποικοδόμησή τους στο περιβάλλον^{2,6}. Στον Πίνακα 1.2 παρατίθενται τα μοριακά βάρη και το ποσοστό χλωρίωσης των ομόλογων PCBs.

Πίνακας 1.2. Σύσταση χλωριωμένων διφαινυλίων βάσει ομόλογης σειράς².

Μοριακός Τύπος	Βασικό Μοριακό Βάρος (g/mol) ¹	Μέσο Μοριακό Μοριακό Βάρος (g/mol) ²	Ποσοστό χλωρίωσης (%)	Αριθμός Ισομερών
C ₁₂ H ₁₀	154.1	154.2	0	1
C ₁₂ H ₉ Cl	188.0	188.7	19	3
C ₁₂ H ₈ Cl ₂	222.0	223.1	32	12
C ₁₂ H ₇ Cl ₃	256.0	257.6	41	24
C ₁₂ H ₆ Cl ₄	289.9	292.0	49	42

C ₁₂ H ₅ Cl ₅	323.9	326.4	54	46
C ₁₂ H ₄ Cl ₆	357.8	360.9	59	42
C ₁₂ H ₃ Cl ₇	391.8	395.3	63	24
C ₁₂ H ₂ Cl ₈	425.8	429.8	66	12
C ₁₂ HCl ₉	459.7	464.2	69	3
C ₁₂ Cl ₁₀	493.7	498.7	71	1

¹Υπολογισμένο σύμφωνα με τα ατομικά βάρη των ¹²C, ³⁵Cl, ¹H που είναι αντιστίχως 12.000, 34.969 και 1.0079 και αντιστοιχεί στη μικρότερη μοριακή μάζα.

²Υπολογισμένο σύμφωνα με τη φυσική ισοτοπική περιεκτικότητα του άνθρακα, του χλωρίου και του υδρογόνου και αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη μοριακή μάζα.

1.1.3. Φυσικές Σταθερές των PCBs

Στον Πίνακα 1.3 παρατίθενται διάφορες φυσικές ιδιότητες ομάδων PCBs με τον ίδιο βαθμό χλωρίωσης. Οι ιδιότητες αφορούν το σημείο τήξεως, το σημείο ζέσεως, την τάση ατμών, την διαλυτότητα των ουσιών στο νερό, τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης - νερού, K_{ow}, τον συντελεστή βιοσυσσωρεύσεως καθώς και το ρυθμό εξάτμισης. Κάποιες βιβλιογραφικές αναφορές⁷ συμπεριλαμβάνουν σε παρόμοιους πίνακες και άλλες παραμέτρους. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα σημεία ζέσεως και οι τάσεις ατμών ποικίλουν όχι μόνο με τον βαθμό της χλωρίωσης αλλά και με την θέση της υποκαταστάσεως. Παρόμοια δεδομένα ισχύουν και για τα σημεία τήξεως των ουσιών αυτών.

Πίνακας 1.3. Φυσικές ιδιότητες ισομερών PCBs.²

Ομάδα PCB	Σημείο τήξεως (°C)	Σημείο ζέσεως (°C)	Τάση ατμών (Pa) (25 °C)	Διαλυτότητα στο νερό (g/m ³) (25 °C)	Λογαριθμικός Συντελεστής οκτανόλης-νερού (Log K _{ow})	Προσεγγιστικός συντελεστής βιοσυσσωρεύσεως σε ιχθύς	Προσεγγιστικός ρυθμός εξάτμισης (g/(m ² h)) (25 °C)
Biphenyl	71	256	4.9	9.3	4.3	1000	0.92
MonoCB	25-77.9	285	1.1	4.0	4.7	2500	0.25
DiCB	24.4-149	312	0.24	1.6	5.1	6300	0.065
TriCB	28-87	337	0.054	0.65	5.5	1.6×10 ⁴	0.017
TetraCB	47-180	360	0.012	0.26	5.9	4.0×10 ⁴	4.2×10 ⁻³
PentaCB	76.5-124	381	2.6×10 ⁻³	0.099	6.3	1.0×10 ⁵	1.0×10 ⁻³
HexaCB	77-150	400	5.8×10 ⁻⁴	0.038	6.7	2.5×10 ⁵	2.5×10 ⁻⁴
HeptaCB	122.4-149	417	1.3×10 ⁻⁴	0.014	7.1	6.3×10 ⁵	6.2×10 ⁻⁵
OctaCB	159-162	432	2.8×10 ⁻⁵	5.5×10 ⁻³	7.5	1.6×10 ⁶	1.5×10 ⁻⁵
NonaCB	182.8-206	445	6.4×10 ⁻⁶	2.0×10 ⁻³	7.9	4.0×10 ⁶	3.5×10 ⁻⁶
DecaCB	305.9	456	1.4×10 ⁻⁶	7.6×10 ⁻⁴	8.3	1.60×10 ⁷	8.5×10 ⁻⁷

Οι συντελεστές κατανομής, συγκεκριμένα η τιμή log K_{ow}, και η διαλυτότητα των PCBs στο νερό είναι πολύ σημαντικά στοιχεία για τον καθορισμό της μεταφοράς και τύχης των ουσιών αυτών στο περιβάλλον⁴ αλλά και για τον σχεδιασμό της εκχύλισής τους με την

χρήση διαφόρων αναλυτικών τεχνικών. Οι Shiu και Mackay⁸ δημοσίευσαν τιμές $\log K_{ow}$ 4.3 (για DiCB) έως 8.26 (για DecaCB).

Ωστόσο, η τιμή της διαλυτότητάς τους στο υδατικό περιβάλλον εξαρτάται από την ύπαρξη και άλλων οργανικών ενώσεων. Για παράδειγμα η προσθήκη μικρού όγκου μεθανόλης ή βουτανόλης σε νερό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητάς τους στο νερό⁹. Γενικά όμως τα PCBs παρουσιάζουν μικρή διαλυτότητα στο νερό και αυτό το δεδομένο ενισχύεται από πειραματικά δεδομένα που εμφανίζουν τη διαλυτότητα να κυμαίνεται μεταξύ 5.5×10^{-6} έως 1.2×10^{-12} g/g για το δεκαχλωροδιφαινύλιο. Οι υπολογισμοί αυτοί εξάγονται με θεωρητικούς υπολογισμούς και χρήση πειραματικών δεδομένων όπως τα σημεία τήξεως².

1.1.4. Μίγματα Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (Aroclor)

Τα PCBs εμφανίστηκαν ως σύνθετα μίγματα (Aroclor) στο εμπόριο το 1929, παρόλο που η εργαστηριακή τους παρασκευή είχε επιτευχθεί από το 1881. Δεν απαντώνται φυσικά στο περιβάλλον αν και μπορούν να παραχθούν ως παραπροϊόντα χημικών διεργασιών. Η παγκόσμια παραγωγή τους περιορίστηκε ή διακόπηκε στις αρχές της δεκαετίας του '70, αν και κάποια παραγωγή μικρότερης κλίμακας συνεχίστηκε τουλάχιστον ως το 1983².

Όλα τα εμπορικά μίγματα συντέθηκαν σε μία μαζική διεργασία με απ' ευθείας χλωρίωση του διφαινυλίου με αέριο χλώριο υπό θέρμανση παρουσία χλωριούχου σιδήρου ως καταλύτη. Το μόριο του διφαινυλίου με την σειρά του παρήχθη με αντίδραση αφυδρογόνωσης του βενζολίου. Ο μέσος βαθμός χλωρίωσης ρυθμιζόταν από το χρόνο της αντίδρασης, για την επίτευξη προϊόντος με επιθυμητές ιδιότητες. Το τελικό προϊόν καθαριζόταν με διαδικασίες απόσταξης και φιλτραρίσματος².

1.1.5. Τα PCBs ως παραπροϊόντα

Τα PCBs εκτός από την άμεση βιομηχανική παραγωγή σχηματίζονται και ως παραπροϊόντα κατά τις χημικές διεργασίες οι οποίες περιλαμβάνουν πηγές χλωρίου και υδρογοναθράκων. Διεργασίες κατά τις οποίες μπορεί να σχηματίζονται PCBs, είναι στην παραγωγή χλωριωμένων βενζολίων, βυνιλοχλωριδίου, χλωριωμένων διαλυτών (π.χ. χλωροφόρμιου), χλωριωμένων αλκανίων, οργανοσιλικονούχων φαρμάκων, χρωστικών (π.χ. πράσινο της φθαλοκυανίνης) κ.α.

Μία άλλη πηγή παραγωγής PCBs η οποία έχει αναφερθεί σε εργαστηριακά πειράματα είναι η σύνθεση μόνο- και δι- υποκατεστημένων PCBs σε διεργασίες χλωρίωσης υδάτων. Ωστόσο δεν υπάρχει πληθώρα ερευνών που να επιβεβαιώνει αυτόν τον τρόπο

σχηματισμού PCBs. Από την EPA έχουν καθιερωθεί κανονισμοί για την παραγωγή PCBs ως παραπροϊόντα, από τυχαίο ή μη ηθελημένο λόγο¹⁰.

Ο σχηματισμός των PCBs μπορεί επίσης να γίνει και κατά την θερμική αποικοδόμηση άλλων χλωριωμένων οργανικών ουσιών. Έχει βρεθεί ότι κατά την πυρόλυση μίγματος χλωροαλκανίων, υπό ατμόσφαιρα ηλίου σε θερμοκρασίες 300-700 °C, παράγονται ισομερή μόνο- και τέτρα- υποκατεστημένα PCBs¹¹. Κατά τις διεργασίες αποτεφρώσεως παρατηρήθηκε η ύπαρξη PCBs, αλλά και PCDDs, PCDFs και PCBzs σε ίχνη¹². Τα πειράματα έγιναν σε εργαστηριακή κλίμακα, χρησιμοποιώντας αποτεφρωτήρα υγρής κλίνης με συνθετικό καύσιμο το οποίο περιείχε οικιακά απόβλητα, χαρτί, πλαστικό, μέταλλα και άλατα μετάλλων. Προσδιορίστηκαν τρία PCBs (No 77, 126, 169) σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 500 ng/m³, ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος. Βρέθηκε ότι ο χρόνος παραμονής των υλικών στον αποτεφρωτήρα και ειδικά στον χώρο ψύξης μετά την καύση, έπαιζε σημαντικό ρόλο στις παρατηρούμενες συγκεντρώσεις.

1.1.6. Τα PCBs στο περιβάλλον

Τα PCBs λόγω του ότι είναι λιπόφιλα, έχουν την τάση να προσροφώνται στα εδάφη και στα ιζήματα. Αναφέρεται ότι το 99 % της μάζας τους κατανέμεται στα εδάφη. Έτσι, ενώ θεωρητικά δεν αναμένεται το πρόβλημα των PCBs να έχει πολλαπλές διαστάσεις, η πτητικότητα των PCBs από τις διάφορες πηγές οδηγεί σε μετρήσιμες συγκεντρώσεις στην ατμόσφαιρα. Υπολογίζεται ότι $0,9 \times 10^9$ g ανά έτος είναι η μεταφορά των PCBs μέσω της ατμόσφαιρας στις ΗΠΑ¹³. Αυτό είναι λιγότερο από το 1 % της συνολικής μάζας των PCBs στο περιβάλλον. Ωστόσο, η ατμοσφαιρική μεταφορά αναγνωρίζεται ως ο κύριος μηχανισμός της παγκόσμιας κατανομής των PCBs. Έχει υπολογιστεί ότι οι Μεγάλες Λίμνες στις ΗΠΑ έχουν επιβαρυνθεί με PCBs κατά 60 - 90%, μέσω της ατμοσφαιρικής μεταφοράς¹⁴.

Η έκθεση των ανθρώπων στα PCBs πραγματοποιείται κυρίως μέσω των τροφίμων. Υπολογίζεται ότι η δόση των PCBs που προσλαμβάνεται με την ημερήσια διατροφή ανά Kg τροφίμου, ανά ημέρα ανέρχεται σε $1,4 \times 10^{-5}$ mg/Kg/d¹⁵. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες μελέτες που αναφέρονται στα ποσοστά βιοσυγκεντρώσεως-βιοσυσσωρεύσεως των ουσιών αυτών και στους ιχθύς και στα θαλάσσια θηλαστικά, όπου τα PCBs εισέρχονται μέσω της τροφικής αλυσίδας.

Στους παρακάτω Πίνακες 1.4 και 1.5 παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των PCBs στον άνθρωπο, τα θηλαστικά και στα νερά, από διάφορες δημοσιευμένες μελέτες παγκοσμίως. Στον άνθρωπο τα PCBs ανιχνεύονται στο αίμα, το λίπος και τους ιστούς, λόγω της μη πολικότητάς τους, της λιποφιλικότητάς τους και της αυξημένης σταθερότητας που εμφανίζουν στις διεργασίες βιοαποικοδόμησης. Έρευνες κατά την δεκαετία του 70 έδειξαν

ότι οι μέσες συγκεντρώσεις PCBs στο αίμα ανθρώπων που ζούσαν σε αστικές περιοχές ήταν της τάξης των 10 ppb. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν στο μητρικό γάλα, αφού εκείνη τη δεκαετία οι μέσες τιμές κυμαίνονταν μεταξύ 10 και 50 ppb. Σε μελέτες που διεξήχθησαν στις ΗΠΑ από τα μέσα μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 70, παρατηρήθηκε ότι σε ποσοστό 99.1% τα δείγματα του μητρικού γάλακτος που αναλύθηκαν περιείχαν μετρήσιμες συγκεντρώσεις PCBs.¹⁶

Πίνακας1.4. Συγκεντρώσεις PCBs στους ζωντανούς οργανισμούς²

Οργανισμός	Περιοχή Συγκεντρώσεων (μg/g)
Θαλάσσιοι Οργανισμοί	
Ζωοπλαγκτόν	< 0.003-1.055
Μαλάκια - Οστρακόδερμα	<0.003-7
Φώκιες	3-212
Φάλαινες- Δελφίνια	0.012-147
Ιχθύς	
Υδάτων (ΗΠΑ)	0.1-15
Ωκεανών	0.03-190
Πτηνά	
Βόρεια Αμερική	0,1 -14000
Ευρώπη	0,5-9570
Αυγά	0,1-434
Άνθρωποι	
Λίπος (γενικός πληθυσμός)	0.3-10
Πλάσμα (γενικός πληθυσμός)	0.001-0.029
Πλάσμα (έκθεση επαγγελματικού χώρου)	0.036-1.9
Λίπος (περίπτωση Yusho)	0.7-75.5
Πλάσμα (περίπτωση Yusho)	0.002-0.015
Γάλα	0.01-0.39
Γάλα - εκχυλισμένα λιπίδια	0.01-18.6

Πίνακας 1.5. Συγκεντρώσεις PCBs στα νερά²

Υπόστρωμα/ Τοποθεσία	Συγκέντρωση (ng/l)
Νερό	
Διάφοροι ωκεανοί και θάλασσες	0.004-0.06
Ανταρκτική, θαλάσσιο νερό	0.03-0.07
Ανταρκτική, χιόνι	0.3-1
Βόρειος Ειρηνικός Ωκεανός	0.2-1.1
Δυτικός Ειρηνικός Ωκεανός	0.04-0.25
Ατλαντικός	0.3-8
Ακτές Μεσογείου	13
Σουηδία, ποτάμια	0.5
Σουηδία, πόσιμο νερό	0.33
ΗΠΑ/Καναδάς, Μεγάλες Λίμνες	0.8-31
Λίμνη Βαϊκάλη, Σιβηρία	0.018-59
Ιαπωνία, πόσιμο νερό	1-100
ΗΠΑ, λίμνη Michigan	100-450
Μετρίως επιμολυσμένα ποτάμια	<50
Βαρέως επιμολυσμένα ποτάμια	<500
Νερό βροχής	
Στο θαλάσσιο περιβάλλον	0.5-10
Στην ύπαιθρο	1-50
Στις Μεγάλες Λίμνες	10-150
Στις αστικές περιοχές	10-250

Σε ότι αφορά την περιοχή της Μεσογείου, έχει γίνει προσπάθεια για σύγκριση των κύριων αποθεμάτων σε PCBs διαφόρων χωρών, παρά την έλλειψη ομοιογενών στοιχείων (Πίνακας 1.6). Αυτά τα στοιχεία δεν είναι απόλυτα ακριβή με την αυστηρή έννοια του όρου, και γι' αυτό προσφέρονται για την εξαγωγή γενικών και όχι ειδικών συμπερασμάτων.

Πίνακας 1.6. Σχετική συνεισφορά των Μεσογειακών χωρών σε PCBs στη δεκαετία του '90¹⁷:

Χώρα	Αποθέματα σε PCBs (τόννοι)	% Ποσοστό αποθεμάτων PCBs στην περιοχή
Ισπανία	5972	24%
Γαλλία	5846	23%
Ιταλία	3872	12%
Αλγερία	3055	12%
Κροατία	2082	11%

Ελλάδα	1768	7%
Τυνησία	2000	8%
Πορτογαλλία	657	3%
Πρώην Γιουγκοσλαβία	197	1%

1.1.7. Κύρια περιστατικά ρύπανσης από PCBs

Τέσσερα κύρια περιστατικά ρύπανσης από PCBs είναι παγκοσμίως γνωστά και προκάλεσαν το διεθνές ερευνητικό ενδιαφέρον: Η περίπτωση Yusho στην Ιαπωνία, ο ποταμός Hudson στην Νέα Υόρκη, το λιμάνι New Bedford στη Μασαχουσέτη και η περίπτωση των Μεγάλων Λιμνών (Great Lakes) στην Βόρεια Αμερική.

Η περίπτωση Yusho, είναι γνωστή λόγω της μαζικής κατανάλωσης λαδιού που ήταν επιμολυσμένο με υψηλές συγκεντρώσεις από PCBs, PCDFs και PCQs. Το περιστατικό έλαβε χώρα στην δυτική Ιαπωνία το 1968 και αφορούσε περισσότερα από 1600 άτομα. Τα κλινικά συμπτώματα των ασθενών της περίπτωσης Yusho ήταν κόπωση, πονοκέφαλοι, πρηξίματα και πόνοι καθώς και φλεγμονές, επιβράδυνση της ανάπτυξης στα παιδιά, αναιμίες, μειωμένη νευρική αντίδραση, χρωματισμός του δέρματος και πρήξιμο των ματιών. Τα επίπεδα των PCBs στο αίμα των ασθενών ήταν διπλάσια ως τριπλάσια του μέσου όρου των μη εκτεθειμένων ατόμων².

Η περίπτωση^{2,18} του ποταμού Hudson είχε να κάνει με απορρίψεις PCBs στον ποταμό, από την εταιρεία General Electric, κατασκευάστρια πυκνωτών. Η εταιρία είχε δύο εργοστάσια παραγωγής σε απόσταση μόλις 5 km από τον ποταμό. Οι απορρίψεις των PCBs από τα δύο εργοστάσια υπολογίζονται συνολικά στα 6×10^8 g. Τα PCBs κατανεμήθηκαν στο νερό, στα ιζήματα και στα ψάρια. Τα μέσα επίπεδα των PCBs στα ιζήματα κυμαινόταν στα 150 mg/g και με περιοδικά δείγματα να έχουν τιμές της τάξης των 1000 mg/g. Η εκτεταμένη ρύπανση από τα PCBs έδωσε τιμές στα ιζήματα μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από άλλες ρυπασμένες περιοχές. Η εταιρία General Electric αγόραζε το 15 % της εγχώριας παραγωγής PCBs της εταιρία Monsanto, του μεγαλύτερου παραγωγού PCBs παγκοσμίως. Η περιοχή τέθηκε υπό αυστηρό περιβαλλοντικό έλεγχο και έγιναν πολλές μελέτες φυσικής αποκατάστασης των ρυπασμένων ιζημάτων.

Η περίπτωση του λιμανιού New Bedford οφειλόταν σε εργοστάσια κατασκευής πυκνωτών με PCBs. Δύο εργοστάσια ρύπαιναν το οικοσύστημα της περιοχής από την εποχή του 1940 ως τα τέλη του 1970. Η διασπορά της ρύπανσης ήταν μεγάλη και οδήγησε σε συγκεντρώσεις σε ιχθείς της τάξης των 5 ppm. Οι συγκεντρώσεις αυτές ήταν πολύ μεγαλύτερες από το ανώτατο επιτρεπτό όριο που είχε τεθεί από τον FDA (Food and Drug Administration), οπότε και επιβλήθηκε απαγόρευση του ψαρέματος στην περιοχή το 1979¹⁹.

Στην περίπτωση των Μεγάλων Λιμνών (Great Lakes) η ρύπανση από τα PCBs δεν προερχόταν από σημειακές πηγές αλλά από διάσπαρτες πηγές, στις οποίες ήταν παρόντες και άλλοι ρύποι υψηλής τοξικότητας όπως μόλυβδος, αρσενικό, υδράργυρος και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογοναθράκες. Η συγκέντρωση των PCBs ωστόσο υπερέβαινε το 1 ng/L²⁰.

Από έρευνες στην Lake Superior προέκυψε ότι οι συνολικές συγκεντρώσεις των PCBs μειώθηκαν από 2,4 σε 0,18 ng/L σε μία περίοδο 12 ετών (1980 - 1992) και αυτό υποδεικνύει μία απώλεια 26.500 Kg PCBs από τη λίμνη. Η απώλεια αυτή στο νερό της λίμνης αποδίδεται κυρίως στην πτητικότητα των PCBs και την μεταφορά τους σε άλλα περιβαλλοντικά συστήματα²¹.

1.1.8. Ρυθμιστικές κινήσεις

Η πανταχού εμφάνιση των PCBs στο περιβάλλον, αύξησε το γενικότερο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον. Οι ενδείξεις ότι η έκθεση σε PCBs προκαλεί καρκινογένεση υποκίνησε το κοινό ενδιαφέρον το οποίο ήταν πολύ έντονο στις ΗΠΑ και το 1976 δημοσιεύτηκε ρυθμιστικός κανονισμός για τα PCBs με την ονομασία : Toxic Substances Control Act (TSCA), PL 94-469 (U.S. Congress, 1976). Εν συντομία ο TSCA προσφέρει ειδικές ρυθμίσεις και κανονισμούς κατά την παρασκευή, επεξεργασία και κατανομή στο εμπόριο ή χρήση των PCBs. Η EPA (U.S. Environmental Protection Agency) ήταν επιφορτισμένη με την εφαρμογή και επιτήρηση των κανονισμών. Στις ΗΠΑ εμφανίζονται και πλήθος άλλων δράσεων όπως η δράση για την υγεία και ασφάλεια στον εργασιακό χώρο (OSHA) με ανάπτυξη σταθερών για το εργατικό προσωπικό, η δράση για καθαρά νερά (Clean Water Act - CWA), η δράση Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act - Cercla, η δράση Resource Conservation and Recovery Act, η δράση Hazardous Material Transportation Act - HMTA, η δράση Food, Drug, and Cosmetic Act - FD&C, η δράση Safe Drinking Water Act και η δράση Clean Air Act. Παρόμοιες κινήσεις υπάρχουν και σε άλλα σημεία του κόσμου και μάλιστα στην ΕΕ με διάφορες οδηγίες.

Η κάθε χώρα είναι εκείνη που θα μετατρέψει τις οδηγίες σε νομοθεσία. Έτσι υπάρχουν φαινομενικές αποκλίσεις στα όρια ασφαλείας που θεσπίζει η κάθε χώρα. Οι διαφορές αυτές και τα όρια παρουσιάζονται παρακάτω.

Οι βασικές οδηγίες της ΕΕ, τότε επονομαζόμενης ΕΟΚ διαμορφώνονται κατά τα έτη 1976 και 1978, με κωδικούς 78/319/ΕΟΚ και 76/403/ΕΟΚ των Συμβουλίων της 20-3-1978 και 6-4-1976 αντίστοιχα: Βάσει αυτών των οδηγιών στην Ελλάδα θεσπίζεται από το κοινοβούλιο το νομοσχέδιο υπ αριθμόν ΚΥΑ 72751/3054/85 (ΦΕΚ 665 Β/1-11-85) περί των τοξικών και επικίνδυνων αποβλήτων και της εξάλειψης των πολυχλωροδифαινυλίων και πολυχλωροτριφαινυλίων σε συμμόρφωση με τις ανωτέρω οδηγίες. Στα 20 άρθρα που

απαρτίζουν τα ανωτέρω νομοσχέδια ρυθμίζονται όλες οι παράμετροι που αφορούν τα PCBs, όπως η διαχείρισή τους, η συλλογή τους, η διάθεση και η εξάλειψή τους. Ρυθμίζονται επίσης και οι υποχρεώσεις των κατόχων PCBs καθώς και οι κυρώσεις που επιβάλλονται από το νόμο στους παραβάτες των διατάξεων αυτών.

Ως επακόλουθο αυτών των νομοσχεδίων, τα Ελληνικά Πανεπιστήμια και Ερευνητικά Κέντρα άρχισαν να ασχολούνται με το θέμα που καλείται ρύπανση από PCBs στον Ελλαδικό χώρο.^{22,23}

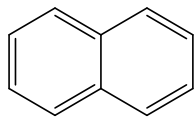
1.2. Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς)

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς) (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) είναι χημικές ενώσεις που αποτελούνται από συμπυκνωμένους αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι δεν περιέχουν ετεροάτομα ή δεν φέρουν υποκαταστάτες²⁴.

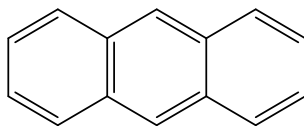
Οι ΠΑΥς υπάρχουν στο πετρέλαιο, τον άνθρακα και την πίσσα, ενώ παράγονται και ως παραπροϊόντα καύσης διαφόρων καυσίμων όπως το ξύλο, ο λιθάνθρακας και το diesel²⁵. Τα ΠΑΥς μπορεί να βρίσκονται ακόμη και στα τρόφιμα όπως τα δημητριακά, τα έλαια, τα λίπη και τα μαγειρεμένα κρέατα^{26,27}. Εξαιτίας της τοξικότητας που παρουσιάζουν αρκετοί απ' αυτούς, αλλά και της ευρείας διάδοσής τους στο περιβάλλον, συγκέντρωσαν και εξακολουθούν να συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον των ερευνητών και αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης^{28,29}.

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες έχουν πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό καθώς και πολύ μικρή τάση ατμών. Είναι κυρίως λιπόφιλα μόρια (ιδιαίτερα οι ενώσεις με μεγαλύτερα μοριακά βάρη) και γι αυτό το λόγο στο περιβάλλον βρίσκονται πρωτίστως στο χώμα, τα ιζήματα και τις λιπώδεις ουσίες και δευτερευόντως στο νερό ή τον αέρα³⁰. Εντούτοις, η παρουσία τους στον αέρα και στα νερά έχει καταγραφεί σε διάφορες δημοσιευμένες μελέτες και γι αυτό το λόγο η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (US-EPA-United States Environmental Protection Agency) και η Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν εκδώσει διάφορες οδηγίες που αφορούν την παρουσία των ΠΑΥς σε αυτά τα περιβαλλοντικά υποστρώματα.^{26,31-33}

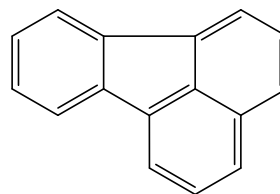
Δεκαέξι ΠΑΥς έχουν χαρακτηριστεί ως ρύποι άμεσης προτεραιότητας από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ. Ο χαρακτηρισμός αυτός αφορά συνολικά 129 ενώσεις για τις οποίες τέθηκαν διάφοροι περιορισμοί σχετικά με τις ποσότητές τους στις διάφορες εκροές. Οι ενώσεις αυτές ταξινομήθηκαν με βάση την τοξικότητά τους και τη συχνότητα εμφάνισής τους στο περιβάλλον^{34,35}. Σε ότι αφορά τα νερά, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ορίσει 5 πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες ως ρύπους προτεραιότητας σε πόσιμα νερά και 8 ρύπους σε επιφανειακά νερά^{31,32}. Οι υδρογονάνθρακες αυτοί παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.2



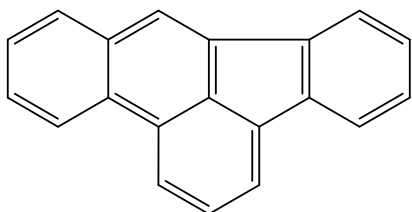
Ναφθαλένιο



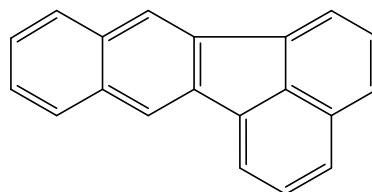
Ανθρακένιο



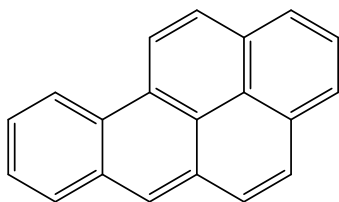
Φθορανθένιο



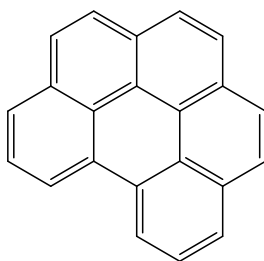
Βενζο(β)φθορανθένιο



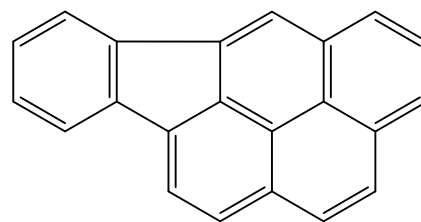
Βενζο(κ)φθορανθένιο



Βενζο(α)πυρένιο



Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο



Ινδενο(1,2,3,-γ,δ)πυρένιο

Σχήμα 1.2. Οχτώ πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς) που είναι ρύποι προτεραιότητας στα επιφανειακά νερά σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση.

1.2.1. Ονοματολογία και δομή των ΠΑΥς

Αρκετοί ΠΑΥς είναι γνωστοί με την εμπειρική τους ονομασία, η οποία δηλώνει είτε την προέλευση τους (π.χ. πυρένιο), είτε το χρώμα τους (π.χ. χρυσένιο), είτε το σχήμα τους (π.χ. κορωνένιο). Τα ονόματα αυτά επικράτησαν και αποδείχθηκε πρακτικά αδύνατο να αλλαχθούν, όταν εισήχθηκε η συστηματική ονοματολογία. Πάντως, σύμφωνα με την IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) η ονοματολογία των ΠΑΥς πρέπει να βασίζεται στους παρακάτω κανόνες.³⁶

A. i) Τα ονόματα των ΠΑΥς με μέγιστο δυνατό αριθμό μη συσσωρευμένων διπλών δεσμών (non-cumulative double bonds) πρέπει να έχουν κατάληξη -ένιο. Συσσωρευμένοι (συνεχόμενοι) διπλοί δεσμοί είναι αυτοί που υπάρχουν σε μία αλυσίδα, στην οποία τρία τουλάχιστον συνεχόμενα άτομα άνθρακα συνδέονται με διπλούς δεσμούς, π.χ. $C=C=C=C$ (οι ενώσεις με τέτοιους δεσμούς ονομάζονται κουμουλένια (cumulene)). Μη συσσωρευμένοι (μη συνεχόμενοι) διπλοί δεσμοί σε μία ένωση είναι όλες οι υπόλοιπες διατάξεις, συμπεριλαμβανομένων και των συζυγών διπλών δεσμών.

ii) Τα ονόματα των ΠΑΥς, που περιέχουν πέντε ή περισσότερους βενζολικούς δακτυλίους σε ευθεία γραμμική διάταξη, σχηματίζονται από το αντίστοιχο αριθμητικό πρόθεμα που δηλώνει τον αριθμό των δακτυλίων και την κατήληξη -ακένιο.

iii) “Ορθο-συμπυκνωμένοι” ή “Ορθο και πέρι-συμπυκνωμένοι” υδρογονάνθρακες με μέγιστο δυνατό αριθμό μη συσσωρευμένων διπλών δεσμών, που περιέχουν τουλάχιστον δύο δακτυλίους, πέντε ή περισσότερων μελών και που δεν έχουν κάποιο από τα αποδεκτά εμπειρικά ονόματα, ονομάζονται με πρόθεμα το όνομα του βασικού τους δακτυλίου ή του βασικού συστήματος δακτυλίων. Το βασικό σύστημα δακτυλίων πρέπει να είναι ο υδρογονάνθρακας με τους περισσότερους δακτυλίους, για τον οποίο υπάρχει κάποιο εμπειρικό όνομα. Τα συνδεδεμένα συστατικά πρέπει να είναι όσο το δυνατό πιο απλά.

iv) Τα προθέματα των συνδεδεμένων συστατικών σχηματίζονται αλλάζοντας την κατάληξη -ένιο του ονόματος του βασικού υδρογονάνθρακα σε -ενο, π.χ. "πυρενο"- από πυρένιο. Όταν υπάρχουν περισσότερα από ένα προθέματα, ακολουθείται αλφαβητική σειρά. Επίσης, είναι αναγνωρισμένα τα παρακάτω προθέματα:

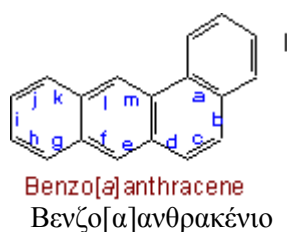
Άνθρα από Ανθρακένιο
Βένζο από Βενζόλιο
Νάφθο από Ναφθαλίνιο
Πέρυλο από Περυλένιο
Φαίναθρο από Φαιναθρένιο
Ακεναφθο από Ακεναφθυλένιο

Εκτός από το βενζο, είναι αναγνωρισμένα και τα παρακάτω προθέματα που αφορούν μονοκυκλικούς υδρογονάνθρακες (καθένα αντιπροσωπεύει τον τύπο με τον μέγιστο αριθμό

μη συσσωρευμένων διπλών δεσμών): κυκλοπεντα, κυκλοεπτα, κυκλοοκτα κλπ. Όταν το βασικό συστατικό είναι μονοκυκλικός υδρογονάνθρακας, η κατάληξη -ένιο δηλώνει το μέγιστο δυνατό αριθμό μη συσσωρευμένων διπλών δεσμών, και όχι έναν διπλό δεσμό μόνο.

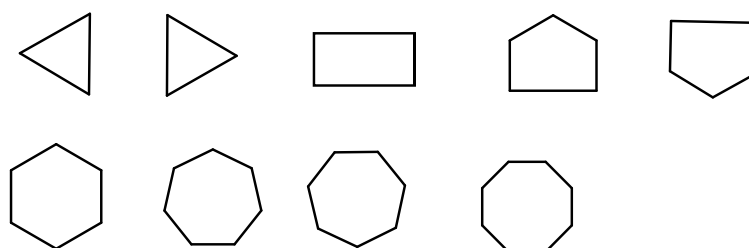
ν) Τα ισομερή διαχωρίζονται με χαρακτηρισμό των περιφερειακών πλευρών του βασικού συστατικού, σαν α, β, γ κλπ. Σαν α χαρακτηρίζεται η πλευρά "1, 2", β η πλευρά "2, 3" (ή σε ειδικές περιπτώσεις η πλευρά "2, 2α") κλπ., για όλες τις περιφερειακές πλευρές. Πριν το γράμμα, που χαρακτηρίζει την πλευρά όπου γίνεται η σύντηξη, δίνονται, όταν κρίνεται απαραίτητο, τα νούμερα των θέσεων σύνδεσης του άλλου συστατικού. Τα νούμερα και τα γράμματα περικλείονται σε αγκύλες και τοποθετούνται αμέσως μετά την ονομασία του συνδεόμενου συστατικού

Παράδειγμα:

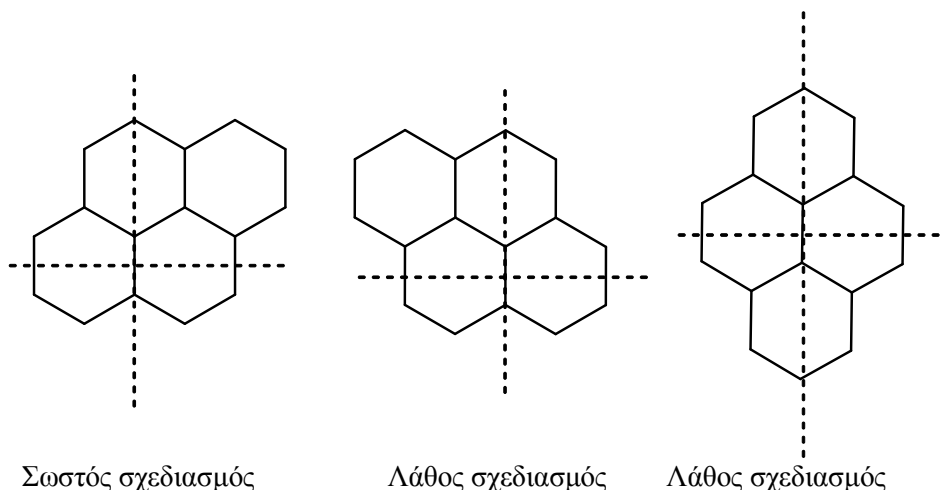


vi) Όταν ένα όνομα αντιστοιχεί σε δύο ή περισσότερα συμπυκνωμένα, ισομερή, μητρικά συστήματα δακτυλίων, με μέγιστο αριθμό μη συσσωρευμένων διπλών δεσμών, και όταν το όνομα αυτό μπορεί να γίνει πιο συγκεκριμένο με την υπόδειξη της θέσης ενός ή περισσότερων ατόμων υδρογόνου (χαρακτηριστικό υδρογόνο), τότε, πριν το όνομα, δίνεται η θέση του υδρογόνου και το γράμμα *H* γραμμένο πλάγια.

B. i) Για το σκοπό της αρίθμησης, οι δακτύλιοι των πολυκυκλικών "ορθο-συμπυκνωμένων" ή "ορθο και περι-συμπυκνωμένων υδρογονανθράκων" σχεδιάζονται ως εξής:



και τοποθετούνται έτσι ώστε (α) ο μεγαλύτερος αριθμός δακτυλίων να είναι σε οριζόντια σειρά και (β) το υπόλοιπο του μορίου να βρίσκεται πάνω και δεξιά από αυτή την οριζόντια σειρά (πάνω δεξιό τεταρτημόριο). Αν περισσότερες από μία γραφές είναι σύμφωνες με τα παραπάνω, τότε επιλέγεται εκείνη που έχει τους λιγότερους δακτυλίους στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο:



ii) Ατομα που είναι κοινά για δύο ή περισσότερους δακτυλίους, χαρακτηρίζονται με την προσθήκη των γραμμάτων α, β, γ αμέσως μετά τον αριθμό του ατόμου άνθρακα που προηγείται. Για τα εσωτερικά άτομα άνθρακα, που έπονται του τελευταίου αριθμημένου ατόμου άνθρακα, ακολουθείται η φορά του ρολογιού.

iii) Όταν υπάρχει δυνατότητα επιλογής, τα κοινά άτομα άνθρακα, δύο ή περισσότερων δακτυλίων, ακολουθούν τη μικρότερη δυνατή αρίθμηση

iv) Όταν υπάρχει δυνατότητα επιλογής, το άτομο του άνθρακα που είναι συνδεδεμένο με χαρακτηριστικό άτομο υδρογόνου, αριθμείται με τον μικρότερο δυνατό αριθμό.

Γ. i) Τα ονόματα των "ορθο-συμπυκνωμένων" και "ορθο-και περί-συμπυκνωμένων" πολυκυκλικών υδρογονανθράκων, που περιέχουν λιγότερους από το μέγιστο δυνατό αριθμό μη συσσωρευμένους διπλούς δεσμούς, σχηματίζονται από τα προθέματα "διυδρο-", "τετραϋδρο-" κλπ., ακολουθούμενα από το όνομα του αντίστοιχου υδρογονάνθρακα που δεν έχει αναχθεί. Το πρόθεμα "περυδρο-" δηλώνει πλήρη υδρογόνωση. Όταν υπάρχει δυνατότητα επιλογής, το χαρακτηριστικό άτομο υδρογόνου αριθμείται με τον μικρότερο δυνατό αριθμό.

ii) Όταν υπάρχει δυνατότητα επιλογής, τα άτομα άνθρακα στα οποία έχουν προστεθεί άτομα υδρογόνου, αριθμούνται με το μικρότερο δυνατό αριθμό.

iii) Οι υποκατεστημένοι ΠΑΥς ονομάζονται σύμφωνα με τους κανόνες με τους οποίους γίνεται και η ονομασία των υποκατεστημένων μονοκυκλικών υδρογονανθράκων.

1.2.2. Φυσικές Ιδιότητες των ΠΑΥς

Όλοι οι ΠΑΥς, εκτός από ορισμένα υδρογονωμένα παράγωγα, βρίσκονται σε στερεή κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Είναι λιγότερο πτητικοί από τους άκυκλους υδρογονάνθρακες και τα σημεία ζέσεώς τους είναι πολύ υψηλότερα από των κανονικών

αλκανίων με τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Τα μεγάλα μοριακά τους βάρη, καθώς και η έλλειψη πολικών υποκαταστατών στα μόρια τους, τους καθιστά δυσδιάλυτους στο νερό³⁷.

Στον Πίνακα 1.7 αναφέρονται οι μοριακοί τύποι, τα μοριακά βάρη τα σημεία τήξεως και ζέσεως, οι τάσεις ατμών και οι διαλυτότητες στο νερό των 8 ΠΑΥς που χαρακτηρίζονται, όπως προαναφέρθηκε, ως ρύποι προτεραιότητας για τα επιφανειακά νερά από την Ευρωπαϊκή Ένωση.

Πίνακας 1.7. Φυσικοχημικές σταθερές των ΠΑΥς³⁸

ΠΑΥς	Μοριακός Τύπος	Μοριακό Βάρος	Σημείο Τήξης (°C)	Σημείο Ζέσεως (°C)	Τάση ατμών (Torr)	Διαλυτότητα (mg/L)
Ναφθαλένιο (Naphth)	C ₁₀ H ₈	128.16	80.2	217.9	0.492	32.0
Ανθρακένιο (Anthr)	C ₁₄ H ₁₀	178.22	218	342	2×10 ⁻⁴ στους 20 °C	0.05-0.07 στους 25 °C
Φλορανθένιο (Fluor)	C ₁₆ H ₈	202.26	110	375	10 ⁻⁶ ×10 ⁻⁴ στους 20 °C	0.26 στους 25 °C
Βένζο(β)Φλορανθένιο (B(b)F)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	168	-	10 ⁻¹¹ ×10 ⁻⁶ στους 20 °C	-
Βενζο(κ)φλορανθένιο (B(k)F)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	217	480	9.6×10 ⁻¹¹ στους 20 °C	-
Βένζο(α)πυρένιο (B(a)P)	C ₂₀ H ₁₂	252.32	117	310-312	5×10 ⁻⁹	0.0038 στους 25 °C
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο (B(g,h,i)P)	C ₂₂ H ₁₂	276.34	273	-	~10 ⁻¹⁰	0.00026 στους 25 °C
Ινδενο(1,2,3-γ,δ)πυρένιο (Indeno)	C ₂₂ H ₁₂	276.34	161.5-163	-	~10 ⁻¹⁰	-

Η παύλα (-) υποδηλώνει έλλειψη στοιχείων

Σε ότι αφορά την διαλυτότητα, αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία απορρυπαντικών σε υδατικό διάλυμα μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα των ΠΑΥς μέχρι και 10⁴ φορές εξαιτίας της δημιουργίας μικηλλίων.³⁹

1.2.3. ΠΑΥς στο περιβάλλον

ΠΑΥς σχηματίζονται κάθε φορά που ουσίες με άνθρακα και υδρογόνο θερμαίνονται σε θερμοκρασίες πάνω από 700 °C, όπως συμβαίνει κατά τις διαδικασίες πυρόλυσης. Η συγκεκριμένη, κάθε φορά, θερμοκρασία επηρεάζει το μίγμα των ΠΑΥς που θα σχηματιστεί.⁴⁰ Ο μηχανισμός (ή οι μηχανισμοί) σχηματισμού των ΠΑΥς κατά την ατελή καύση οργανικών υλών δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Γενικά, πιστεύεται ότι πρόκειται για συνδυασμό δύο αντιδράσεων: πυρόλυσης και πυροσύνθεσης. Σε υψηλές θερμοκρασίες, οι οργανικές ενώσεις διασπώνται, μερικώς, σε μικρότερα ασταθή προϊόντα (πυρόλυση). Αυτά τα προϊόντα, κυρίως ρίζες, επανασυνδέονται, για να σχηματίσουν μεγαλύτερους και σχετικά σταθερότερους αρωματικούς υδρογονάνθρακες (πυροσύνθεση).

Όσον αφορά τις ανθρωπογενείς πηγές ΠΑΥς στην ατμόσφαιρα, αυτές μπορούν να χωρισθούν σε δύο κατηγορίες: τις κινητές πηγές και τις σταθερές. Στις κινητές πηγές υπάρχουν κυρίως τα μέσα μεταφοράς δηλαδή τα βενζινοκίνητα και πετρελαιοκίνητα αυτοκίνητα, τα τρένα, τα πλοία και τα αεροπλάνα, ενώ στις σταθερές πηγές υπάρχουν διάφορες βιομηχανικές δραστηριότητες όπως η καύση των απορριμμάτων, η οικιακή θέρμανση και γενικότερα όλες οι εγκαταστάσεις, όπου γίνεται καύση κάποιων καυσίμων με σκοπό την παραγωγή ενέργειας.⁴¹ Οι παράγοντες που επηρεάζουν το είδος και την ποιότητα των ΠΑΥς, που εκπέμπονται από κινητές πηγές, και ειδικότερα από τα αυτοκίνητα είναι⁴²:

- Η περιεκτικότητα των καυσίμων σε αρωματικές ενώσεις
- Η περιεκτικότητα των καυσίμων σε θείο
- Οι συνθήκες οδήγησης των αυτοκινήτων
- Τα χρησιμοποιούμενα λιπαντικά
- Ο χρόνος χρήσης των αυτοκινήτων
- Ο τύπος των αυτοκινήτων

Η καύση των στερεών απορριμμάτων, όπως κι αν γίνεται (φυσικά, τυχαία ή από επιχείρηση δημοτική, εμπορική ή αγροτική), προκαλεί σημαντικές εκπομπές ΠΑΥς στην ατμόσφαιρα. Το είδος των ενώσεων που εκπέμπονται εξαρτάται από τη φύση των απορριμμάτων που καίγονται. Στα εργοστάσια αποτέφρωσης απορριμμάτων σημαντικό ρόλο για το είδος και την ποσότητα των εκπεμπόμενων ενώσεων, παίζουν, επίσης, το είδος του αποτεφρωτήρα και οι συνθήκες καύσης. Από τις σημαντικότερες βιομηχανικές πηγές εκπομπής ΠΑΥς στην ατμόσφαιρα είναι η βιομηχανία πετρελαίου. Η βιομηχανία άνθρακα είναι επίσης, μία από τις σημαντικές πηγές ΠΑΥς στην ατμόσφαιρα. Τέλος άλλες πηγές είναι οι βιομηχανίες λιπασμάτων, ενώ υψηλές τιμές συγκεντρώσεων παρατηρούνται στο εσωτερικό των χυτηρίων ή στα γκαράζ των αυτοκινήτων⁴³.

Φυσικές πηγές εκπομπής ΠΑΥς στην ατμόσφαιρα είναι οι πυρκαγιές των δασών, η ηφαιστειακή δραστηριότητα, η διαγένεση των ιζημάτων και η βιοσύνθεση των ΠΑΥς από βακτήρια.⁴³

Το κάπνισμα είναι μία επιπλέον πηγή ΠΑΥς στην ατμόσφαιρα, ενώ αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή εκπομπής ΠΑΥς στην ατμόσφαιρα εσωτερικών χώρων. Στον καπνό του τσιγάρου έχουν βρεθεί περίπου 1000 ΠΑΥς μαζί με αζωτούχα και ετεροκυκλικά παράγωγά τους⁴³. Η ποσότητα των ΠΑΥς στον καπνό του τσιγάρου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η συχνότητα και διάρκεια των εισπνοών, το είδος του καπνού, η υγρασία του καπνού και το είδος του τσιγαρόχαρτου. Σε κάθε περίπτωση, οι ποσότητες των ΠΑΥς που εκπέμπονται στην ατμόσφαιρα από φυσικές πηγές είναι μικρότερες από αυτές που εκπέμπονται από ανθρωπογενείς πηγές.⁴⁴

1.2.4. ΠΑΥς στα νερά

Η παρουσία των ΠΑΥς στα επιφανειακά νερά και τη θάλασσα οφείλεται κυρίως σε διαρροές αργού πετρελαίου ή άλλων προϊόντων διύλισης, από πετρελαιοπηγές, διυλιστήρια και δεξαμενόπλοια, στις ατμοσφαιρικές αποθέσεις και κατακρημνίσεις, στις εκπλύσεις του εδάφους από τα νερά της βροχής, στα υγρά απόβλητα από διάφορες βιομηχανικές δραστηριότητες και στα αστικά λύματα.⁴⁵ Στις ανθρωπογενείς αυτές πηγές πρέπει να προστεθούν και οι φυσικές πηγές ΠΑΥς από τη βιολογική αποσύνθεση μικροοργανισμών και φυτών.

Το αργό πετρέλαιο περιέχει ΠΑΥς σε υψηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες ποικίλλουν ανάλογα με τον τύπο του και την προέλευσή του. Πολλές φορές, από το είδος των ΠΑΥς που περιέχονται στο αργό πετρέλαιο είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η προέλευσή του. Ανάλογες διαφορές στις συγκεντρώσεις των ΠΑΥς παρατηρούνται και στα προϊόντα διύλισης του πετρελαίου.⁴⁶ Πρέπει να σημειωθεί ότι περίπου 200.000 τόνοι πετρελαίου και προϊόντων του αποχύνονται κάθε χρόνο στους ωκεανούς από τα διυλιστήρια και τα εργοστάσια πετροχημικών, ενώ ανάλογη είναι η ρύπανση λιμνών και ποταμών, που προκαλείται από απόβλητα διυλιστηρίων⁴⁷.

Οι εκπλύσεις του εδάφους από τα νερά της βροχής σε αστικές περιοχές (αστικές απορροές) επιβαρύνουν επίσης σημαντικά τα φυσικά νερά με ΠΑΥς. Η παρουσία των ΠΑΥς στα εκπλύματα του εδάφους οφείλεται στα αιωρούμενα σωματίδια της ατμόσφαιρας, στα σωματίδια που επικάθονται στους δρόμους από τις τριβές των ελαστικών στην άσφαλτο και σε κηλίδες πετρελαιοειδών και λαδιών στο έδαφος.⁴⁸ Η σύσταση των ΠΑΥς στα εκπλύματα του εδάφους βρέθηκε να προσομοιάζει τη σύσταση τους στην ατμόσφαιρα. Η συγκέντρωσή τους στα εκπλύματα βρέθηκε να είναι μεγαλύτερη κατά την περίοδο του φθινοπώρου και του χειμώνα, γεγονός που αποδόθηκε στις αυξημένες συγκεντρώσεις ΠΑΥς στην ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια αυτών των εποχών, λόγω της λειτουργίας της κεντρικής θέρμανσης και της αυξημένης κυκλοφοριακής κίνησης.⁴⁸

Άλλη πηγή ΠΑΥς στα φυσικά νερά είναι τα υγρά απόβλητα διαφόρων βιομηχανιών. Έχει βρεθεί ότι τα υγρά απόβλητα των διυλιστηρίων πετρελαίου ευθύνονται σημαντικά για τη ρύπανση των επιφανειακών νερών με ΠΑΥς⁴⁹, ενώ σημαντική επιβάρυνση με ΠΑΥς των φυσικών νερών προκαλείται επίσης από χαμηλού μοριακού βάρους ΠΑΥς, όπως το ναφθαλένιο.⁵⁰

Τα αστικά λύματα αποτελούν μία επιπλέον πηγή ΠΑΥς στο υδάτινο περιβάλλον. Έχει βρεθεί ότι η παγκόσμια εισροή πετρελαϊκών υδρογονανθράκων στο θαλάσσιο περιβάλλον, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και οι ΠΑΥς, μέσω αστικών λυμάτων, ανέρχεται σε 0,7 εκατομμύρια τόνους το χρόνο σε σύνολο 3,3 εκατομμυρίων τόνων, που είναι οι ετήσιες εισροές από όλες τις υπάρχουσες πηγές.⁵¹

Σε ό,τι αφορά την παρουσία ΠΑΥς στο πόσιμο νερό αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στο ότι οι ΠΑΥς προϋπάρχουν στα επιφανειακά ή υπόγεια νερά, που χρησιμοποιούνται ως πηγές, και δεν απομακρύνονται κατά την επεξεργασία, είτε σε υλικά όπως η ανθρακάσφαλτος (coal tar), που σε ορισμένες χώρες χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη των σωλήνων μεταφοράς του πόσιμου νερού⁵². Έχει βρεθεί ότι πόσιμα νερά που προέρχονται από πηγές όπως, συλλεκτήρες ομβρίων υδάτων ή εγκαταστάσεις επεξεργασίας και επαναχρησιμοποίησης νερού, παρουσιάζουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ΠΑΥς, σε σχέση με πόσιμα νερά, που προέρχονται από λίμνες, ποταμούς ή τον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα⁵³. Σχετικές έρευνες έδειξαν ότι η χλωρίωση πόσιμου νερού, που περιέχει ΠΑΥς, μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό χλωριωμένων και οξειδωμένων παραγώγων των ΠΑΥς⁵², ενώσεων δηλαδή πιο τοξικών σε σχέση με τις μητρικές.⁵⁴

1.2.5. Τοξικότητα και καρκινογόνος δράση των ΠΑΥς

Οι πρώτες επιστημονικές αποδείξεις που αφορούν τη συσχέτιση της εμφάνισης καρκίνου με την έκθεση σε προϊόντα άνθρακα και πετρελαίου τοποθετούνται χρονικά στις αρχές του εικοστού αιώνα. Πρωτοπόρες μελέτες, σχετικές με τη χημική σύσταση των προϊόντων καύσης, άρχισαν να πραγματοποιούνται μόλις πριν από μερικές δεκαετίες ενώ ήδη την εποχή αυτή είχαν απομονωθεί αρκετοί ΠΑΥς και είχε προσδιοριστεί η δομή τους. Μεταγενέστερα, βιολογικές δοκιμές ενώσεων, που απομονώθηκαν ή συντέθηκαν χημικά, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι αρκετοί ΠΑΥς είναι τοξικοί. Γι' αυτό το λόγο το επιστημονικό ενδιαφέρον αυξήθηκε ραγδαία^{55,56}.

Η τοξικότητα μιας ένωσης αναφέρεται στην ικανότητά της να προκαλεί βλάβες σε ζωντανούς οργανισμούς, καθώς και να επάγει σ' αυτούς καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες δράσεις ή φαινόμενα τερατογένεσης.⁵⁷⁻⁵⁹ Ο όρος οξεία τοξικότητα (acute toxicity) αναφέρεται στις άμεσες επιδράσεις μιας ένωσης στους οργανισμούς που εκτίθενται σ' αυτήν, έστω και για μία μόνο φορά, ενώ η χρόνια τοξικότητα (chronic toxicity) χαρακτηρίζει τις επιδράσεις της ένωσης αυτής σε οργανισμούς που εκτίθενται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε μικρές δόσεις της. Τα ΠΑΥς είναι πιθανά πολύ τοξικές ουσίες για τον άνθρωπο αφού έχει βρεθεί ότι κάποιες από αυτές τις ενώσεις προκαλούν καρκίνο σε διάφορους ιστούς, καρδιαγγειακή πάθηση, απώλεια γονιμότητας, καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Η καρκινογένεση που προέρχεται από ΠΑΥς έχει μελετηθεί διεξοδικά και έχει γίνει διεθνώς αποδεκτή⁵⁶. Η καρκινογένεση συνδέεται με την πολυπλοκότητα του μορίου, δηλ., τον αριθμό των βενζολικών δαχτυλίων και με την ομοιοπολική σύνδεσή τους σε κρίσιμους στόχους μέσα στο DNA. Σχετικά πρόσφατα κάποιοι από τους δεκαέξι ΠΑΥς, που αποτελούν ρύπους προτεραιότητας για την ΕΡΑ, χαρακτηρίστηκαν φωτομεταλλαξιογόνοι (photomutagenic)⁶⁰.

Έτσι σύμφωνα με μελέτες του διεθνούς οργανισμού έρευνας για τον καρκίνο (International Agency for Research on Cancer, IARC), που αφορούσαν ύποπτες ενώσεις για την πρόκληση καρκίνου στον άνθρωπο, το βενζο[α]πυρένιο, το διβενζο[α,η]ανθρακένιο, βενζο[β]φλουορανθένιο, το βενζο[κ]φλουορανθένιο είναι με μεγάλη πιθανότητα ενώσεις καρκινογόνες για τον άνθρωπο, το ινδενο[1, 2, 3-γ,δ]πυρένιο, το φλουορανθένιο, το χρυσένιο είναι πιθανά καρκινογόνες για τον άνθρωπο ενώσεις, ενώ το ανθρακένιο και το πυρένιο δεν μπορούν να ταξινομηθούν στις καρκινογόνες για τον άνθρωπο ενώσεις.⁶¹ Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χαρακτηρισμός "με μεγάλη πιθανότητα καρκινογόνες για τον άνθρωπο ενώσεις" αναφέρεται στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία για την πρόκληση καρκίνου απ' αυτές τις ενώσεις στον άνθρωπο, ενώ υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την πρόκληση καρκίνου από τις ίδιες ενώσεις στα ζώα. Ο όρος "πιθανά καρκινογόνες για τον άνθρωπο ενώσεις" χρησιμοποιείται όταν υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία για την πρόκληση καρκίνου απ' αυτές τις ενώσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Ενώσεις, οι οποίες δεν ανήκουν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες, και επιπλέον δεν έχει αποδειχθεί ότι δεν προκαλούν καρκίνο δεν ταξινομούνται ως καρκινογόνες για τον άνθρωπο ενώσεις, χωρίς, όμως, να χαρακτηρίζονται και ως μη καρκινογόνες.

1.3. Αλογονομένοι Υδρογονάνθρακες

Αλογονομένες οργανικές ενώσεις, είναι αυτές που περιέχουν χλώριο, βρώμιο, φθόριο ή ιώδιο σε αλειφατικό ή σε αρωματικό ανθρακικό σκελετό. Οι αλογονομένοι υδρογονάνθρακες δεν είναι βιοδιασπώμενοι σε αντίθεση με τους υδρογονάνθρακες οι οποίοι αποικοδομούνται σχετικά εύκολα με οξειδωτικές διεργασίες και βακτηριακές επεμβάσεις στα υδάτινα συστήματα. Έχουν ανιχνευθεί και φυσικές αλογονομένες οργανικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους στα νερά, το έδαφος και την ατμόσφαιρα ως αποτέλεσμα της χλωρίωσης των υδάτων, καθώς επίσης και σε φύκια και φυτά.^{62,63}

Η πλειοψηφία των αλογονομένων και πολυαλογονομένων ουσιών είναι τοξικοί ρύποι, προέρχονται κυρίως από ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης και βρίσκονται σε όλα τα περιβαλλοντικά συστήματα. Η βιομηχανική παρασκευή αλογονομένων διαλυτών συνεχίζεται ακόμη και σήμερα λόγω της χρησιμότητάς τους σε βιομηχανικές, βιοτεχνικές και εργαστηριακές διεργασίες. Οι πιο σημαντικοί χλωριωμένοι διαλύτες είναι το χλωροφόρμιο (CHCl_3), το διχλωροαιθάνιο (CH_2CHCl_2) και ο τετραχλωράνθρακας (CCl_4). Για το ξηρό καθάρισμα χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες, όπως το τριχλωροαιθάνιο (CH_2CHCl_2) και το τριχλωροαιθυλένιο (C_2HCl_3), ενώ για την παρασκευή πολυμερών (πολυβινυλοχλωρίδιο, PVC) χρησιμοποιήθηκε το μονομερές βινυλοχλωρίδιο ($\text{CH}_2=\text{CHCl}$). Σημαντικές βιομηχανικές εφαρμογές είχαν οι χλωροφθοράνθρακες (Chlorofluorocarbons, CFCs), όπως τα φρεόν (CCl_3F , CCl_2F_2), ως ψυκτικά υγρά σε ψυγεία και κλιματιστικά μηχανήματα, ως προωθητικά σε σπρέι και στα αφρώδη πλαστικά, ενώ οι αντίστοιχες βρωμιούχες ενώσεις χρησιμοποιούνται σε πυροσβεστήρες.⁶⁴ Άλλες σημαντικές κατηγορίες αλογονομένων και πολυαλογονομένων υδρογονανθράκων περιλαμβάνουν ομάδες ενώσεων, όπως τοξικοί ρύποι των αποβλήτων της χημικής βιομηχανίας (π.χ. χλωριωμένες φαινόλες), φυτοφάρμακα (εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα), προϊόντα καύσης στερεών καυσίμων, απορριμμάτων και πλαστικών (διοξίνες, διβενζοφουράνια) και διηλεκτρικά υγρά θερμομόνωσης (πολυχλωριωμένα διφαινόλια).

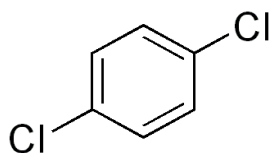
Σε ότι αφορά τους αλογονομένους υδρογονάνθρακες, που χρησιμοποιούνται ως φυτοφάρμακα-παρασιτοκτόνα, είναι κατηγορία περιβαλλοντικών ρύπων που βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα νερά πολλών ποτάμιων, λιμναίων και παράκτιων περιοχών, ως αποτέλεσμα της έκπλυσης υπολειμμάτων από τις γεωργικές εκμεταλλεύσεις⁴³. Σε αυτό συνετέλεσε ιδιαίτερα η προσπάθεια του ανθρώπου τις τελευταίες δεκαετίες να μεγιστοποιήσει την ποσότητα παραγωγής γεωργικών προϊόντων. Επιπροσθέτως, η ταχύτατη ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών ουσιών, που παρατηρήθηκε μετά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, επέτρεψε στο σύγχρονο άνθρωπο να πετύχει σε μεγάλο βαθμό το στόχο του.

Σταδιακά άρχισαν να παρουσιάζονται προβλήματα από την αλόγιστη χρήση των παραπάνω ουσιών, που οδήγησαν σε στροφή του καταναλωτή στην ποιότητα. Το κλίμα που διαμορφώθηκε στην παγκόσμια αγορά ήταν λογικό να επηρεάσει άμεσα διάφορα γεωργικά προϊόντα όπως και τα προϊόντα κυψέλης. Αναφορές σε υπολείμματα επικίνδυνων ενώσεων (αντιβιοτικών, πτητικών εντομοκτόνων κ.α.) στο μέλι και στο βασιλικό πολτό εμφανίζονται όλο και πιο συχνά στη διεθνή βιβλιογραφία αλλά και στα Μέσα Μαζικής Ενημέρωσης.

Οι μελισσοκόμοι προκειμένου να αντιμετωπίσουν το πρόβλημα του κηρόσκωρου χρησιμοποιούν χημικά μέσα, όπως το 1,4-διχλωρο-βενζόλιο (κηροσκωρίνη), ναφθαλένιο (ναφθαλίνη), 1,2-διβρωμο-αιθάνιο, μεθανικό οξύ, θειάφι και οξικό οξύ. Ειδικότερα οι τρεις πρώτες χημικές ενώσεις εφαρμόζονται αυτούσιες σε κλειστούς χώρους αποθήκευσης των πλαισίων, όπου μέσω της εξάτμισης ή εξάχνωσης των μορίων τους καταστρέφεται ο κηρόσκωρος. Αυτές όμως οι οργανικές χημικές ενώσεις απορροφούνται από το κερί και στην συνέχεια μεταφέρονται στο αποθηκευμένο μέλι.

1.3.1. 1,4-διχλωροβενζόλιο (p-DCB)

Το 1,4-διχλωροβενζόλιο ή παραδιχλωροβενζόλιο (p-Dichlorobenzene, p-DCB) έχει άχρωμη ή ελαφρώς λευκή κρυσταλλική μορφή και διακριτική αρωματική οσμή.



Σχήμα 1.3. Δομή 1,4-διχλωροβενζολίου (παραδιχλωροβενζολίου)

Είναι σχεδόν αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό στον αέρα, το χλωροφόρμιο, το βενζόλιο, το οινόπνευμα και την ακετόνη. Είναι μη διαβρωτική ουσία, πτητική και εύφλεκτη όταν εκτίθεται στη θερμότητα ή απευθείας σε γυμνή φλόγα.

Η κύρια χρήση του 1,4-διχλωροβενζολίου τα προηγούμενα 20 έτη, ήταν πρωτίστως ως συστατικό αποσμητικών χώρου και ως καπνογόνο εντομοκτόνο για τον έλεγχο σκώρων (35 εως 55% της παγκόσμιας παραγωγής). Χρησιμοποιείται επίσης ως συστατικό στην παραγωγή σουλφιδίου του πολυφαινυλενίου, ως πλαστικό που χρησιμοποιείται στις ηλεκτρικές και ηλεκτρονικές βιομηχανίες (27%), και στην παραγωγή 1,2,4-τριχλωροβενζολίου (9%). Το υπόλοιπο παραχθέν 1,4-διχλωροβενζόλιο χρησιμοποιήθηκε ως μικροβιοκτόνο/απολυμαντικό, ως εντομοκτόνο, στην παραγωγή ποικιλίας κίτρινων, κόκκινων

και πορτοκαλί χρωστικών ουσιών, στην παραγωγή φαρμακευτικών ειδών και ως μέσο ελέγχου της μούχλας σε σπόρους καπνού, στο δέρμα και σε μερικά υφάσματα.⁶⁵

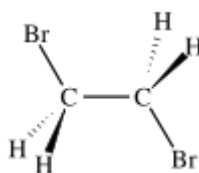
Το πρόβλημα με τα υπολείμματα του 1,4-διχλωροβενζολίου (p-DCB) στο μέλι, εντοπίστηκε το 1991 στην Γερμανία⁶⁶, ενώ υπολείμματα p-DCB στο ελληνικό μέλι βρέθηκαν για πρώτη φορά το 2003⁶⁷. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα παρόμοιο πρόβλημα διαπιστώνεται και στο μέλι που παράγεται στην Ελβετία καθώς το 30% των αναλυόμενων δειγμάτων περιείχαν υπολείμματα p-DCB.⁶⁸

Το 1,4-διχλωροβενζόλιο μπορεί να εισαχθεί στον ανθρώπινο οργανισμό, είτε μέσω της τροφής, είτε μέσω της αναπνοής. Μετά την είσοδό του στον ανθρώπινο οργανισμό μεταβολίζεται σε 2,5-διχλωροφαινόλη. Σε λιγότερο από μια εβδομάδα το 95% του εισερχόμενου στον ανθρώπινο οργανισμό p-DCB αποβάλλεται με τα ούρα, ενώ ένα μικρό ποσοστό απομακρύνεται με την αναπνοή. Παρόλα αυτά, ένα μικρό ποσοστό του (1-2%) παραμένει αποθηκευμένο στο λιπώδη ιστό του ανθρώπου, από όπου λόγω της φύσης του είναι δύσκολο να απομακρυνθεί. Επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου έχουν αναφερθεί όσον αφορά το ήπαρ τα νεφρά και το αίμα. Διεθνή αναγνωρισμένα κέντρα, όπως το Department of Health and Human Services (DHHS), το International Agency for Research on Cancer (IARC) και το Environmental Protection Agency (EPA) αναφέρουν την πιθανότητα καρκινογένεσης σε άτομα που έρχονται σε επαφή με το p-DCB⁶⁵.

Το 1,4-διχλωροβενζόλιο έχει χαρακτηριστεί ως *λογικά αναμενόμενη καρκινογόνος ουσία για τον άνθρωπο (reasonably anticipated to be a human carcinogen)* με βάση ενδείξεις καρκινογένεσης σε πειραματόζωα. Ωστόσο δεν υπάρχει κανένα επαρκές στοιχείο για καρκινογένεση στους ανθρώπους όταν αυτοί εκτίθενται σε 1,4 διχλωροβενζόλιο⁶⁹.

1.3.2. 1,2-Διβρωμοαιθάνιο (1,2-DBE)

Το 1,2-Διβρωμοαιθάνιο (1,2 Dibromoethane, 1,1-DBE) είναι η χημική ένωση με τον τύπο $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$.



Σχήμα 1.4. Δομή 1,2-Διβρωμοαιθανίου

Είναι άχρωμο υγρό με μια ήπια, γλυκιά μυρωδιά ανιχνεύσιμη σε συγκέντρωση 10 mgL^{-1} . Αν και μπορεί να ανιχνευθεί σε ίχνη στον ωκεανό, όπου παράγεται πιθανώς από τα άλγη, είναι κυρίως τεχνητή συνθετική ουσία.

Το 1,2-διβρωμοαιθάνιο χρησιμοποιήθηκε κατά το παρελθόν ως πρόσθετη ουσία στη μολυβδόχο βενζίνη. Το 1978, το 90% της παραγωγής του 1,2-διβρωμοεθανίου στις ΗΠΑ χρησιμοποιήθηκε για αυτόν το λόγο. Μετέπειτα η χρήση του αυτή απαγορεύτηκε από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA), οπότε και μειώθηκε η παραγωγή του⁷⁰. Μια άλλη σημαντική χρήση του 1,2-διβρωμοεθανίου στο παρελθόν ήταν ως φυτοφάρμακο και συστατικό καπνογόνων και για την προστασία του χώματος, του σιταριού, των λαχανικών και των φρούτων. Σχετικά πρόσφατα χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο του σκόρου των κερύθρων. Ως αποτέλεσμα, εμφανίστηκαν κατάλοιπα αυτής της ένωσης σε μελισσοκομικά προϊόντα και κυρίως στο μέλι. Η υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων της Αμερικής (US Food and Drug Administration) έχει θέσει ως «όριο επικυνδυνότητας» την συγκέντρωση των $30\mu\text{g kg}^{-1}$ στο μέλι, πάνω από την οποία λαμβάνονται νομικά μέτρα για την απαγόρευση αυτών των προϊόντων στην αγορά⁷¹.

Το 1,2-διβρωμοαιθάνιο (ή διβρωμίδιο του αιθυλενίου) αναμένεται εύλογα να είναι μια καρκινογόνος για τον άνθρωπο ουσία, καθώς υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις για πρόκληση καρκινογένεσης σε πειραματόζωα. Ωστόσο κανένα επαρκές στοιχείο δεν είναι διαθέσιμο για την αξιολόγηση ενδεχόμενης δυνατότητας καρκινογένεσης στους ανθρώπους⁷². Το διεθνές ινστιτούτο έρευνας για τον καρκίνο (International Agency for Research on Cancer-IARC), έχει καταλήξει στο συμπέρασμα ότι αποτελέσματα από τρεις επιδημιολογικές μελέτες ανθρώπων που εκτέθηκαν στο 1,2-διβρωμοαιθάνιο, στο εργασιακό τους περιβάλλον, δεν μπορεί να είναι αξιόπιστα καθώς οι εργαζόμενοι εκτίθονταν σε μίγματα χημικών ουσιών και όχι στην μεμονομένη ουσία.⁶⁹

1.4. Κυανοτοξίνες

Τα κυανοβακτήρια, γνωστά και ως κυανοφύκη (blue-green algae), είναι μια ομάδα μικροοργανισμών που αναπτύσσονται συχνά σε επιφανειακά, υφάλμυρα ή και θαλασσινά νερά καθώς και σε εδάφη ή υγρές επιφάνειες. Πρόκειται κυρίως για μονοκυτταρικούς ή πολυκυτταρικούς αερόβιους οργανισμούς που διαθέτουν « χλωροφύλλη α » μέσω της οποίας φωτοσυνθέτουν. Τα βακτήρια αυτά έχουν χαρακτηριστεί ως «φωτοαυτότροφα» και για να αναπτυχθούν χρειάζονται μόνο νερό, διοξείδιο του άνθρακα, αέρα, ανόργανα συστατικά και φως. Η απ' ευθείας αφομοίωση του μοριακού αζώτου (N_2) αποτελεί μία θεμελιώδη μεταβολική τους διεργασία, δίνοντάς τους τη δυνατότητα να αναπτύσσονται με τα απλούστερα θρεπτικά υλικά που μπορεί να απαιτήσει ένας ζωντανός οργανισμός. Ένα ακόμη αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να επιβιώνουν σε εξαιρετικά χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες. Για τους λόγους αυτούς, τα κυανοβακτήρια επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα όπου είναι αδύνατο να αναπτυχθούν άλλα μικροάλγη ή μικροοργανισμοί.⁷³

Τα κυανοβακτήρια εμφανίζουν σπουδαίες ευεργετικές αλλά και καταστρεπτικές ιδιότητες⁷⁴. Είναι σημαντικοί «πρωτογενείς παραγωγοί» της τροφικής αλυσίδας, με μεγάλη θρεπτική αξία. Τα είδη των κυανοβακτηρίων που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου συμβάλλουν σημαντικά στη γονιμότητα του χώματος και του ύδατος⁷⁵. Ακόμη, η μελλοντική χρήση των κυανοβακτηρίων στην παραγωγή τροφίμων και στη μετατροπή ηλιακής ενέργειας, χαρακτηρίζεται από κάποιους ελπιδοφόρα⁷⁶. Εντούτοις, σε πολλές περιπτώσεις η παρουσία των κυανοβακτηρίων, στο υδάτινο περιβάλλον, μπορεί να δημιουργήσει πολλά προβλήματα. Πολλά κυανοβακτήρια παράγουν μεταβολίτες οι οποίοι είναι τοξικοί για τα ζώα και τον άνθρωπο. Οι μεταβολίτες αυτοί, γνωστοί και ως κυανοτοξίνες, δεν παράγονται από όλα τα είδη κυανοβακτηρίων. Ωστόσο, τα τοξικά είδη δεν διαφέρουν σε εμφάνιση από τα μη τοξικά, και επομένως απαιτούνται βιολογικές, βιοχημικές και φυσικοχημικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών. Τα κυανοβακτήρια που παράγουν τοξίνες (ηπατοτοξίνες και νευροτοξίνες) ανήκουν κυρίως στα γένη *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Hephalosiphon*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Plankothrix*, *Schizothrix*, *Umezakia*, *Anabaenopsis* και *Aphanocapsa*.^{73,77, 78}

Η ανάπτυξη συγκεκριμένων ειδών κυανοβακτηρίων που περιέχουν τοξίνες, έχει παρατηρηθεί σε ένα πλήθος κλειστών υδάτινων συστημάτων καθώς επίσης και σε παράκτια ύδατα σε όλο τον κόσμο. Κατά συνέπεια οι κυανοβακτηριακές τοξίνες ή "κυανοτοξίνες" όπως ονομάζονται, όταν ανιχνεύονται στα υδάτινα συστήματα, μπορούν να απειλήσουν την ανθρώπινη υγεία.

Η πρώτη οξεία δηλητηρίαση από κυανοτοξίνες, που τεκμηριώνεται στην επιστημονική βιβλιογραφία, αφορά δηλητηρίαση κατοικίδιων ζώων⁷⁹. Πριν από αυτό το περιστατικό όμως, οι αναφορές σε δηλητηριάσεις που προκλήθηκαν από κυανοτοξίνες ήταν κατά ένα μεγάλο μέρος αδημοσίευτες. Ίσως ένα από τα πιο παλιά περιστατικά συνέβη στην Κίνα, στην εποχή της δυναστείας Χαν. Πριν από περίπου 1.000 χρόνια, ο στρατηγός Zhu Ge-Ling ανέφερε ότι έχασε έναν αριθμό στρατιωτών του από δηλητηρίαση, καθώς διέσχισε έναν ποταμό. Περιέγραψε ότι ο ποταμός αυτός ήταν πράσινου χρώματος και ότι τα στρατεύματά του ήπιαν από το πράσινο ύδωρ²¹. Ο Codd το 1996⁸⁰ ανέφερε ότι η πρώτη σαφής αναφορά των τοξικών επιδράσεων των κυανοτοξινών σε ανθρώπινους οργανισμούς έγινε το δωδέκατο αιώνα στο «Μοναστήρι της Πράσινης Λίμνης» -*Monasterium Viridis Stagni*- στη νοτιοδυτική Σκωτία. Σε πιο πρόσφατες μελέτες, διάφοροι ερευνητές έχουν σημειώσει ότι στην Κίνα, την Αφρική, την Βόρεια και Νότια Αμερική και την Αυστραλία, οι ιθαγενείς σκάβουν τρύπες κοντά στην άκρη των υδάτων προκειμένου να φιλτραριστεί το ύδωρ μέσω του εδάφους και να αποτραπεί έτσι η μόλυνση του πόσιμου νερού από το «πράσινο υλικό».²¹

1.4.1. Ευτροφισμός και επεισόδια έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης (blooms)

Τα κυανοβακτήρια είναι συχνό συστατικό πολλών επιφανειακών υδάτων και θαλασσιών οικοσυστημάτων⁷³. Τα είδη που ζουν διασκορπισμένα στο νερό αποτελούν μέρος του φυτοπλαγκτού, ενώ υπάρχουν και είδη που αναπτύσσονται στα ιζήματα (phytobenthos). Κάτω από ορισμένες συνθήκες, ειδικά εκεί όπου τα ύδατα είναι πλούσια σε θρεπτικές ουσίες και εκτίθενται στο φως του ήλιου, τα κυανοβακτήρια μπορεί να πολλαπλασιαστούν σχηματίζοντας επεισόδιο έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης (blooms).⁸¹

Ο ευτροφισμός είναι μία από τις αιτίες που μπορεί να οδηγήσει σε ορατές συγκεντρώσεις κυανοβακτηρίων ή γενικότερα φυκοειδών ανθίσεων στα επιφανειακά ύδατα. Ο ευτροφισμός αναγνωρίστηκε ως πρόβλημα ρύπανσης σε πολλές δυτικές ευρωπαϊκές και βορειοαμερικανικές λίμνες στα μέσα του εικοστού αιώνα⁸². Σε μερικές περιοχές έχει προκαλέσει υποβάθμιση του υδροβίου περιβάλλοντος και σοβαρά προβλήματα στη χρήση ύδατος. Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι στην νοτιοανατολική περιοχή της Ασίας και της Ωκεανίας, 54% των λιμνών είναι ευτροφικές ενώ οι αναλογίες για την Ευρώπη, την Αφρική, τη Βόρεια Αμερική και τη Νότια Αμερική είναι 53, 28, 48 και 41% αντίστοιχα⁸³.

Ο ευτροφισμός έχει επιπτώσεις και στους ποταμούς χαμηλής ροής, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια μιας ξηρής περιόδου. Γενικότερα, όλα τα είδη επιφανειακών υδάτων μπορούν να φιλοξενήσουν έντονη αύξηση αλγών ή κυανοβακτηρίων όταν τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών είναι κατάλληλα και οι θερμοκρασιακές συνθήκες ευνοϊκές. Όπου ο έντονος

αυτός πολλαπλασιασμός αφορά ένα ενιαίο είδος (ή μερικά είδη), το φαινόμενο αναφέρεται ως κυανοβακτηριακή άνθιση. Προβλήματα κυανοβακτηριακής άνθισης είναι πιθανό επίσης να παρουσιάζονται σε περιοχές όπου παρατηρείται έντονη πληθυσμιακή αύξηση όταν υπάρχει συνακόλουθη έλλειψη επεξεργασίας λυμάτων και στις περιοχές με γεωργικές πρακτικές που προκαλούν αύξηση του θρεπτικού φορτίου των επιφανειακών υδάτων μέσω των λιπασμάτων.

Εάν τα κυανοβακτήρια είναι το κυρίαρχο είδος, στη μεγαλύτερη διάρκεια του έτους, παρουσιάζονται πρακτικά προβλήματα που συνδέονται με την υψηλή κυανοβακτηριακή βιομάζα και την πιθανή απειλή της δημόσιας υγείας από την αύξηση των τοξινών τους. Η υψηλή κυανοβακτηριακή βιομάζα μπορεί επίσης να προκαλέσει και αισθητικά προβλήματα, αφού σε πολλές περιπτώσεις απαγορεύεται η χρήση υδάτων για ψυχαγωγικούς σκοπούς λόγω της εμφάνισης στρωμάτων κυανοβακτηρίων (scums), στην επιφάνεια των νερών. Μπορεί όμως να προκαλέσει προβλήματα και στην χρήση του επεξεργασμένου πόσιμου νερού λόγω των δυσάρεστων οσμών που εκλύονται όταν παρατηρείται έντονη άνθιση (blooms).

Τα περιστατικά κυανοβακτηριακών ανθίσεων μπορούν να ελεγχθούν χρησιμοποιώντας μετρήσεις βιομάζας σε συνδυασμό με τον προσδιορισμό των κυρίαρχων ειδών. Ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος τρόπος μέτρησης της φυκώδους και κυανοβακτηριακής βιομάζας είναι ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης. Οι συγκεντρώσεις της «χλωροφύλλης α» για μια ολιγοτροφική λίμνη είναι περίπου $1-10 \mu\text{g l}^{-1}$, ενώ σε μια ευτροφική λίμνη μπορούν να φθάσουν σε $300 \mu\text{g l}^{-1}$. Σε περιπτώσεις υπερτροφικών υδάτων, όπως το φράγμα Hartbeespoort στη Νότια Αφρική, οι συγκεντρώσεις της χλωροφύλλης α μπορούν να φτάσουν ακόμα και $3.000 \mu\text{g l}^{-1}$ ⁸⁴.

Η τοξικότητα των έντονων κυανοβακτηριακών ανθίσεων (blooms), παρατηρήθηκε επιστημονικά μετά από περιστατικά δηλητηρίασης ζώων, ενώ καταγράφηκε επίσημα στην Αυστραλία το 1878⁷⁹. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αν όχι σε όλες, τα ζώα αυτά κατανάλωσαν νερό στο οποίο είχε παρατηρηθεί έντονη κυανοβακτηριακή μάζα στην επιφάνειά του^{85,86}. Έχει διαπιστωθεί παγκοσμίως ότι τα περιστατικά έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης (blooms) χαρακτηρίζονται κυρίως από την παρουσία ηπατοτοξινών, συγκεκριμένα μικροκυστινών, και λιγότερο συχνά από την παρουσία νευροτοξινών. Τέτοια περιστατικά εμφάνισης ηπατοτοξινών έχουν καταγραφεί σε όλες τις ηπείρους και σχεδόν σε όλα τα σημεία του πλανήτη. Ωστόσο, σε μερικά μέρη του πλανήτη όπως: Αυστραλία, βόρεια Αμερική και Ευρώπη, τέτοια περιστατικά εμφανίζονται συχνά και έχουν προκαλέσει πολλές δηλητηριάσεις ζώων. Στον Πίνακα 1.8 παρουσιάζονται μερικά τέτοια περιστατικά τα οποία έχουν καταγραφεί στην διεθνή βιβλιογραφία.

Σήμερα, έρευνες διεξάγονται και σε πολλές άλλες χώρες της Νότιας Αμερικής, της Αφρικής, της Ασίας, της Αυστραλασίας και της Ευρώπης. Το συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από αυτές τις έρευνες είναι ότι τοξικά είδη κυανοβακτηρίων έχουν βρεθεί σε όλο τον

κόσμο και επιπλέον είναι πολύ πιθανό να ανακαλυφθούν καινούρια είδη κυανοτοξινών σε μελλοντικές έρευνες. Είναι ακόμα πολύ σημαντικό να σημειωθεί ότι τα περιστατικά έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης δεν συνδέονται πάντα με το φαινόμενο του ευτροφισμού. Για παράδειγμα έχουν αναφερθεί περιστατικά δηλητηρίασης ζώων από κυανοτοξίνες στην Αυστραλία σε αμόλυντα νερά και στην Ελβετία σε oligotroφικές πηγές υδάτων μεγάλου υψομέτρου.

Πίνακας 1.8. Περιστατικά παρουσίας κυανοτοξινών σε διάφορες λίμνες του κόσμου²¹.

Χώρα	Αριθμός εξεταζόμενων δειγμάτων	% ποσοστό τοξικών δειγμάτων	Τύπος τοξικότητας
Αυστραλία	231	42	Ηπατοτοξικά
Αυστραλία	31	84	Νευροτοξικά
Βραζιλία	16	75	Ηπατοτοξικά
Καναδάς, Αλμπέρτα	24	66	Ηπατοτοξικά
Καναδάς, Αλμπέρτα	39	95	Ηπατοτοξικά
Καναδάς, Saskatchewan	50	10	Ηπατοτοξικά
Κίνα	26	73	Ηπατοτοξικά
Τσεχία και Σλοβακία	63	82	Ηπατοτοξικά
Δανία	296	82	Ηπατοτοξικά
Γερμανία	533	72	Ηπατοτοξικά
Γερμανία	393	22	Νευροτοξικά
Ελλάδα	18	-	Ηπατοτοξικά
Φιλανδία	215	44	Ηπατοτοξικά
Γαλλία			Ηπατοτοξικά
Ουγγαρία	50	66	Ηπατοτοξικά
Ιαπωνία	23	39	Ηπατοτοξικά
Ολλανδία	10	90	Ηπατοτοξικά
Νορβηγία	64	92	Ηπατοτοξικά
Πορτογαλία	30	60	Ηπατοτοξικά
Σκανδιναβία	81	60	Ηπατοτοξικά
Σουηδία	331	47	Ηπατοτοξικά
Ηνωμένο Βασίλειο	50	48	Ηπατοτοξικά
Η.Π.Α. (Μινεσότα)	92	53	Απροσδιόριστα
Η.Π.Α. (Γουινσκόσιν)	102	25	Ηπατοτοξικά

1.4.2. Κυανοβακτήρια στο περιβάλλον

Η πλειοψηφία των κυανοβακτηρίων είναι αερόβιοι φωτοαυτότροφοι οργανισμοί. Προκειμένου να διατηρηθούν στη ζωή απαιτούν μόνο νερό, διοξείδιο του άνθρακα, ανόργανες ουσίες και φως. Η φωτοσύνθεση είναι ο κύριος τρόπος ενεργειακού μεταβολισμού τους. Στο φυσικό περιβάλλον, εντούτοις, είναι γνωστό ότι μερικά είδη είναι σε θέση να επιζήσουν σε πλήρες σκοτάδι για αρκετά μεγάλα χρονικά διαστήματα. Όπως αναφέρθηκε, αρκετά είδη κυανοβακτηρίων διαθέτουν κύστες αερίων, τις οποίες χρησιμοποιούν ως μέσο για να ελέγχουν την άνωση όταν βρίσκονται σε ένα υδάτινο περιβάλλον, ώστε όταν απαιτείται, να ανεβαίνουν στην επιφάνεια του νερού, όπου βρίσκουν ευκολότερα φως για να φωτοσυνθέσουν. Η ιδιότητά τους αυτή, οδηγεί πολλές φορές σε περιόδους μεγάλης ανάπτυξης (**blooms**) στην εμφάνιση στρωμάτων κυανοβακτηρίων (**scums**) στην επιφάνεια των νερών. Στην Εικόνα 1.1 δίνονται παραδείγματα από την ανάπτυξη τέτοιων στρωμάτων τα οποία είναι δυνατό να παρατηρηθούν και μέσω δορυφορικής φωτογράφισης.



Εικόνα 1.1. Ανάπτυξη στρωμάτων βιομάζας (scums) κυανοβακτηρίων και δορυφορική φωτογράφιση μιας έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης (bloom).

Τα κυανοβακτήρια, είναι συχνά, οι πρώτοι μικροοργανισμοί που δημιουργούν αποικίες σε γυμνές περιοχές βράχων και χώματος. Πολλά είδη αναπτύσσονται στο χώμα και σε άλλους επίγειους βιότοπους, όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργικές διαδικασίες των οικοσυστημάτων και στην ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων.⁸⁷

Ωστόσο, οι βιότοποι που εμφανίζονται συχνότερα είναι τα λιμνώδη και θαλάσσια περιβάλλοντα. Ακμάζουν στα ύδατα που είναι αλμυρά, υφάλμυρα ή γλυκά, τις γεωθερμικές πηγές αλλά και σε περιβάλλοντα όπου κανένα άλλο μικροάλγος δεν μπορεί να υπάρξει. Οι περισσότερες θαλάσσιες μορφές⁸⁸ αυξάνονται κατά μήκος των ακτών ως βενθική βλάστηση. Τα κυανοβακτήρια αποτελούν ένα μεγάλο μέρος του θαλάσσιου πλαγκτού σε παγκόσμια κλίμακα. Ωστόσο, διάφορα είδη κυανοβακτηρίων του γλυκού νερού είναι ικανά να αντέξουν σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου. Φαίνεται ότι πολλά είδη κυανοβακτηρίων που απομονώνονται από παράκτια περιβάλλοντα μάλλον ανέχονται τα αλατούχα περιβάλλοντα παρά τα απαιτούν για την ανάπτυξή τους. Ως συχνόι «άποικοι» των

πολύ αλατούχων περιβαλλόντων, τα κυανοβακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν ακόμα και σε συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου που φθάνουν στα 3-4 Μ.⁸⁹ Οι τοποθεσίες, όμως, που εμφανίζονται συχνότερα τα κυανοβακτήρια είναι τα γλυκά ύδατα. Πολλά είδη αναπτύσσονται τόσο στην επιφάνεια όσο και σε μεγάλα βάθη ευφωτικών λιμνών⁸⁷. Άλλα είδη αναπτύσσουν αποικίες στις επιφάνειες βράχων και ιζημάτων οι οποίες όταν αποκοπούν μπορούν να ανέβουν στην επιφάνεια και να επιπλέουν.

Τα κυανοβακτήρια έχουν μια εντυπωσιακή δυνατότητα να αποικούν σε άγονα υποστρώματα όπως η ηφαιστειακή τέφρα, η άμμος ερήμων και οι βράχοι. Είναι εξαιρετικοί εκσκαφείς αφού δημιουργούν τρύπες σε κοιλότητες από ασβεστόλιθο και σε ειδικούς τύπους ψαμμιτών. Ένα άλλο αξιοπρόσεκτο χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η δυνατότητά τους να επιζούν σε εξαιρετικά υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες. Τα κυανοβακτήρια αναπτύσσουν αποικίες σε γεωθερμικές πηγές, σε ρεύματα βουνών, σε αρκτικές και ανταρκτικές λίμνες καθώς και σε χιόνια και πάγους²¹.

Απολιθώματα προκαρυωτικών οργανισμών ηλικίας 3.450 εκατομμυρίων ετών βρέθηκαν στον ιζηματώδη βράχο Warrawoona της βορειοδυτικής Αυστραλίας. Τα κυανοβακτήρια θεωρούνται ότι είναι μεταξύ των πρώτων οργανισμών που εμφανίστηκαν στη γη⁹⁰. Αυτοί οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, εκείνη την περίοδο, ήταν πιθανώς οι «αρχικοί» παραγωγοί οργανικής ύλης, και μεταξύ των πρώτων οργανισμών που απελευθέρωσαν το οξυγόνο στην πρωτόγονη ατμόσφαιρα. Η αλληλουχία του δεσοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (DNA) τους αποδεικνύει ότι οι «πρώτοι» οργανισμοί ήταν θερμοφιλοι και έτσι ικανοί να επιζήσουν στους ωκεανούς, που θερμάνθηκαν από τα ηφαιστεια και τις γεωθερμικές πηγές⁹¹. Η δομή, η οργάνωση, η λειτουργία, και η συμπεριφορά των κυανοβακτηρίων έχουν μελετηθεί και έχουν περιγραφεί πλήρως στην βιβλιογραφία.^{73,92-94}

1.4.3. Κυανοβακτηριακές Τοξίνες

Οι κυανοτοξίνες είναι μία ομάδα φυσικών τοξινών, με ποικίλες χημικές και τοξικολογικές ιδιότητες. Παρά την υδρόβια προέλευσή τους, οι περισσότερες από αυτές που έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα εμφανίζονται να είναι πιο επικίνδυνες για τα επίγεια θηλαστικά παρά για τον υδρόβιο βιόκοσμο. Τα κυανοβακτήρια παράγουν ποικίλους και ασυνήθιστους μεταβολίτες, η φυσική λειτουργία των οποίων είναι ασαφής. Οι επιστήμονες έχουν εστιάσει πρωτίστως στις ενώσεις που επιδρούν στους ανθρώπους και στο ζωικό βασίλειο, είτε ως τοξίνες είτε ως φαρμακευτικά χρήσιμες ουσίες. Εκτός από τα τοξικά είδη ουσιών, τα κυανοβακτήρια παράγουν και άλλα είδη ουσιών, μη τοξικά, των οποίων οι βιοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες τους είναι, ως επί των πλείστων, άγνωστες.

Έρευνες που αφορούσαν την συχνότητα εμφάνισης των τοξικών ειδών κυανοβακτηρίων, διεξήχθησαν σε διάφορες χώρες κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '80, χρησιμοποιώντας μελέτες τοξικότητας σε ποντίκια. Προς το τέλος της δεκαετίας του '80, αναπτύχθηκαν και αναλυτικές μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό τοξινών ενώ οι μελέτες για συγκεκριμένα είδη κυανοτοξινών συνεχίζουν να αυξάνονται μέχρι και σήμερα. Είναι αξιοσημείωτο, εντούτοις, ότι η σημερινή γνώση για τις κυανοτοξίνες είναι αποτέλεσμα της ερευνητικής προσπάθειας που ξεκίνησε τις αρχές της δεκαετίας του '90 σε όλο τον κόσμο και συνεχίζεται έως σήμερα.

Οι μηχανισμοί της κυανοβακτηριακής τοξικότητας που έχουν μελετηθεί είναι ποικίλοι και οι κυανοτοξίνες ταξινομούνται ανάλογα με τα αποτελέσματα που προκαλούν στους οργανισμούς σε ηπατοτοξίνες, νευροτοξίνες, δερματοτοξίνες και τοξίνες που στοχεύουν στην παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Επιπροσθέτως οι κυανοτοξίνες κατατάσσονται σε τρεις κύριες κατηγορίες με βάση την χημική τους δομή: στα κυκλικά πεπτίδια, τα αλκαλοειδή και τους λιποσακχαρίτες (LPS).

Οι κυανοβακτηριακές τοξίνες που παρατηρούνται συχνότερα στα γλυκά και υφάλμυρα ύδατα παγκοσμίως, είναι οι πεπτιδικές κυκλικές τοξίνες της οικογένειας των μικροκυστινών και οι νοντουλαρίνες. Οι μικροκυστίνες παράγονται από διάφορα είδη κυανοβακτηρίων όπως: *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, και *Anabaenopsis*, και *Harposiphon*. Οι νοντουλαρίνες παράγονται μόνο από το *spumigena Nodularia*.

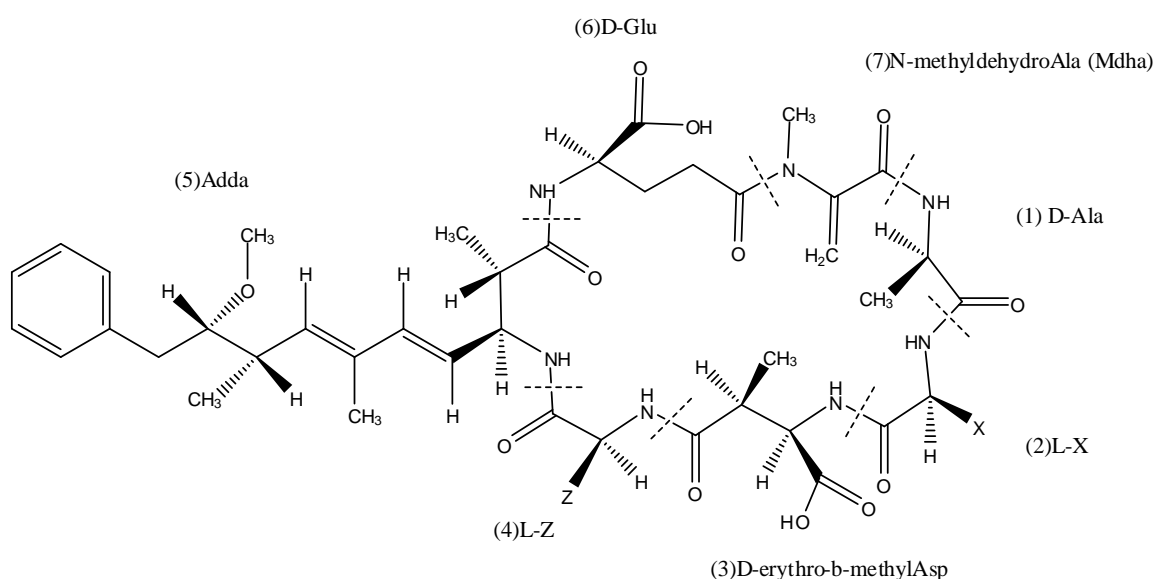
Τα κυκλικά πεπτίδια είναι μεγάλα φυσικά προϊόντα, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 800-1.100. Περιέχουν είτε πέντε (νοντουλαρίνες) είτε επτά (μικροκυστίνες) αμινοξέα, με τα δύο τελικά αμινοξέα να σχηματίζουν μια κυκλική ένωση. Είναι υδατοδιαλυτές ουσίες και είναι ανίκανες να διαπεράσουν άμεσα τις μεμβράνες λιπιδίων των ζώων, των φυτών και των βακτηριακών κυττάρων, εκτός ίσως από μερικά υδροφοβικά είδη μικροκυστινών. Η εισαγωγή τους μέσα στα κύτταρα επιτυγχάνεται μέσω των μεταφορέων μεμβρανών, που η λειτουργία τους είναι να εισάγουν βασικά θρεπτικά συστατικά στο εσωτερικό των κυττάρων. Στα θηλαστικά αυτός ο μηχανισμός προσβάλλει κυρίως το συκώτι. Στο υδάτινο περιβάλλον, αυτές οι τοξίνες παραμένουν συνήθως μέσα στα κυανοβακτηριακά κύτταρα και απελευθερώνονται σε μεγάλες ποσότητες κατά τη λύση των κυττάρων. Αυτή η ενδοκυτταρική κατακράτηση των τοξινών μαζί με την υψηλή χημική σταθερότητά τους και τη διαλυτότητά τους στο νερό, έχει σημαντικές επιπτώσεις στην σταθερότητα που παρουσιάζουν και κατ' επέκταση στην ανθρώπινη υγεία. Στον Πίνακα 1.9 φαίνεται η κατάταξη των κυανοτοξινών με βάση την δομή τους, τις επιδράσεις που προκαλούν και τα είδη των κυανοβακτηρίων από τα οποία παράγονται.

Πίνακας 1.9. Κατάταξη των κυανοτοξινών

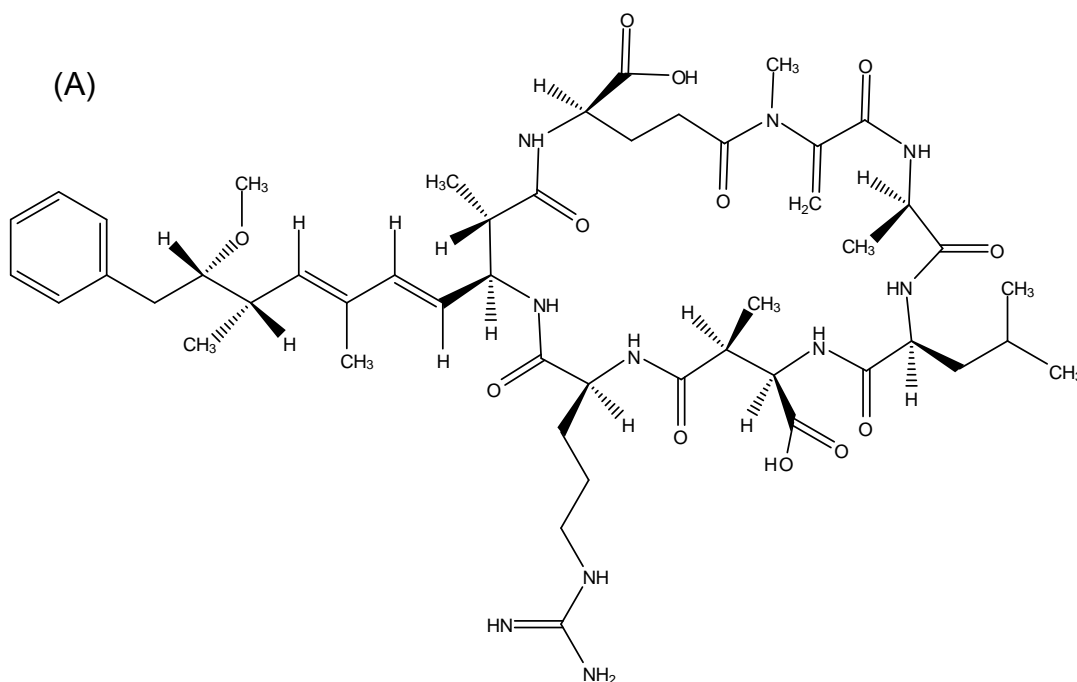
Είδος τοξίνης	Όργανο στόχος στα θηλαστικά	Είδος Κυανοβακτηρίων
Κυκλικά πεπτιδία		
Μικροκυστίνες	Συκώτι	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Nostoc, Hapalosiphon, Anabaenopsis</i>
Νοντουλαρίνη	Συκώτι	<i>Nodularia</i>
Αλκαλοειδή		
<i>Ανατοξίνη-α</i>	Νευρικό σύστημα	<i>Anabaena, Planktothrix (Oscillatoria), Aphanizomenon</i>
Ανατοξίνη-α (S)	Νευρικό σύστημα	<i>Anabaena</i>
Απλυσιατοξίνες	Δέρμα	<i>Lyngbya, Schizothrix, Planktothrix (Oscillatoria)</i>
Κυλινδροσπερμοσίνες	Συκώτι	<i>Cylindrospermopsis, Aphanizomenon, Umezakia</i>
Λυγγκβιατοξίνη-α	Συκώτι, Γαστροεντερικό σύστημα	<i>Lyngbya</i>
Σαξιτοξίνες	Νευρικό σύστημα	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Cylindrospermopsis</i>
Λιποσακχαρίτες	Πιθανώς ερεθιστικά, επιδρούν σε όποιο ιστό εκτίθεται σε αυτές	Όλα τα είδη

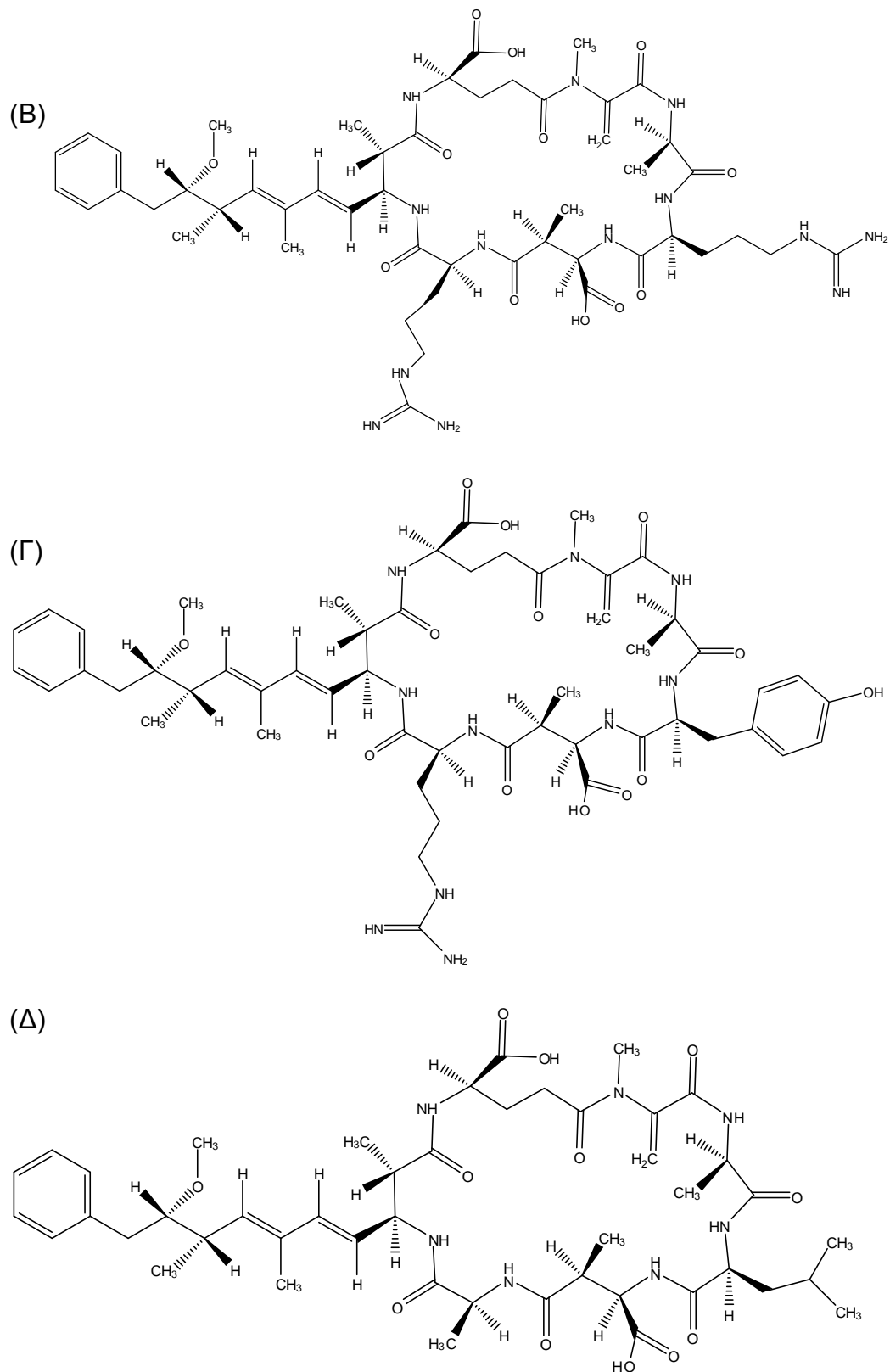
Οι πρώτες χημικές δομές των κυανοβακτηριακών πεπτιδικών κυκλικών τοξινών προσδιορίστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '80, ενώ ο αριθμός των πλήρως χαρακτηρισμένων τοξινών αυξήθηκε πολύ κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '90. Οι πρώτες ενώσεις που βρέθηκαν να παράγονται από τα κυανοβακτήρια στα γλυκά νερά ήταν κυκλικά επταπεπτιδία (τα οποία περιέχουν επτά αμινοξέα συνδεδεμένα μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς) με τη γενική δομή: $cyclo-(D\text{-alanine}^1\text{-}X^2\text{-}D\text{-MeAsp}^3\text{-}Z^4\text{-}Adda^5\text{-}D\text{-}$

*glutamate*⁶-*Mdha*⁷) στα οποία τα X και Z είναι διάφορα L αμινοξέα, D-MeAsp³ είναι το D-έρυθρο-β-μεθυλασπαρτικό οξύ και Mdha είναι η N-μεθυλδεϋδροαλανίνη (Σχήμα 1.5). Το αμινοξύ Adda [(2*S*,3*S*,8*S*,9*S*)-3-αμινο-9-μέθοξυ-2,6,8-τριμέθυλ-10-φένυλδεκα-4,6-διενοϊκό οξύ] θεωρείται η πιο ασυνήθιστη δομή σε αυτήν την ομάδα των κυανοβακτηριακών πεπτιδικών κυκλικών τοξινών. Για παράδειγμα, η πιο συχνή από τις μικροκυστίνες, η μικροκυστίνη -LR, περιέχει λευκίνη (L) στην θέση X και αργινίνη (R) στη θέση Z. Αντίστοιχα η μικροκυστίνη-RR περιέχει αργινίνη (R) στις θέσεις X και Z, η μικροκυστίνη-YR περιέχει τυροσίνη στη θέση X και αργινίνη (R) στη θέση Z και τέλος η μικροκυστίνη-LA περιέχει Λευκίνη (L) στη θέση X και Αλανίνη (A) στη θέση Z (Σχήμα 1.6 A, B, Γ, Δ).



Σχήμα 1.5. Γενική δομή των Μικροκυστινών

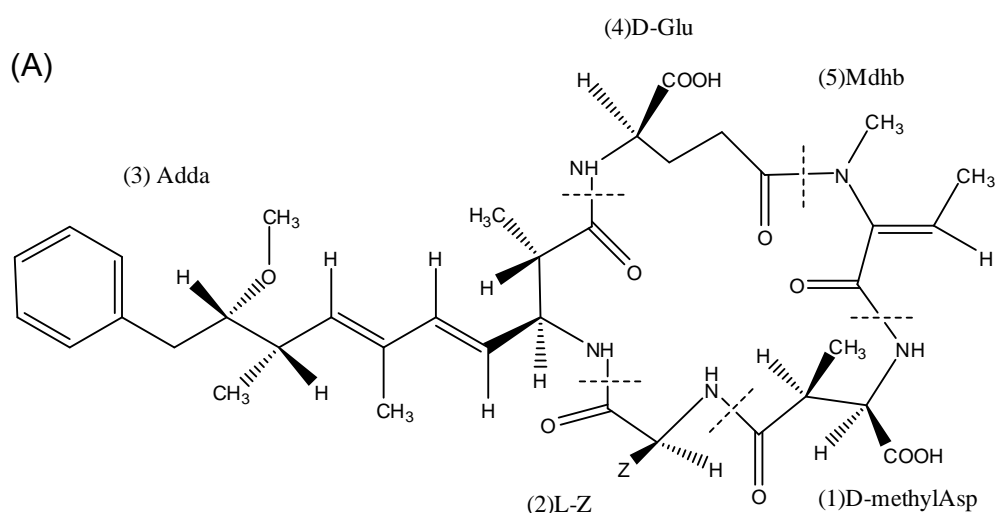


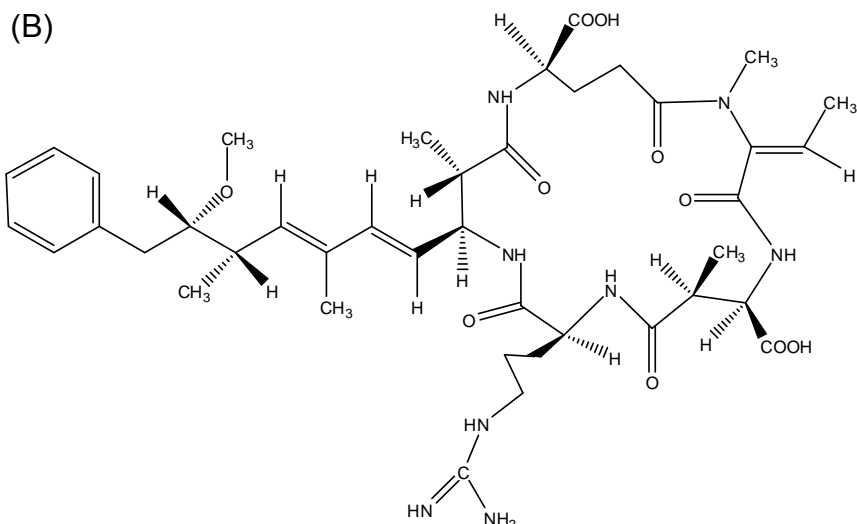


Σχήμα 1.6. (Α) Δομή Μικροκυστίνης-LR, (Β) Δομή Μικροκυστίνης-RR, (Γ) Δομή Μικροκυστίνης-YR, (Δ) Δομή Μικροκυστίνης-LA

Αυτές οι ενώσεις απομονώθηκαν αρχικώς από το κυανοβακτήριο με το επιστημονικό όνομα *Microcystis aeruginosa*, και γι' αυτό το λόγο ονομάστηκαν μικροκυστίνες.⁹⁵ Και στα επτά αυτά αμινοξέα έχουν παρατηρηθεί δομικές παραλλαγές, κυρίως λόγω της αντικατάστασης των L-αμινοξέων στις θέσεις 2 και 4, και της απομεθυλίωσης (demethylation) των αμινοξέων στις θέσεις 3 ή/και 7 (Σχήμα 1.5). Σήμερα έχουν ανακαλυφθεί περίπου 75 είδη μικροκυστινών σε δείγματα κυανοβακτηριακής άνθισης (blooms) και σε απομονωμένα είδη κυανοβακτηρίων.

Στα υφάλμυρα ύδατα υπάρχει ένα είδος κυανοβακτηρίου με το επιστημονικό όνομα *Nodularia spumigena*, το οποίο παράγει κυκλικά πενταπεπτίδια, τις νοντουλαρίνες. Η χημική δομή των νοντουλαρινών είναι *cyclo-(D-MeAsp¹-L-Z-Adda³-D-glutamate⁴-Mdhb⁵)* στο οποίο το *Mdhb* είναι το 2-(methylamino)-2-dehydrobutyric acid (Σχήμα 1.7A). Όταν στην θέση Z υπάρχει το αμινοξύ αργινίνη (L-Arg), τότε, η τοξίνη ονομάζεται νοντουλαρίνη-R ή απλώς νοντουλαρίνη, η οποία είναι και η πιο συχνά εμφανιζόμενη στη φύση (Σχήμα 1.7B). Έχουν ανακαλυφθεί λίγες φυσικά εμφανιζόμενες παραλλαγές των νοντουλαρινών: δύο απομεθυλωμένα είδη, μια με *D-Asp¹* αντί *D-MeAsp¹* και άλλη με *DMAdda³* αντί *Adda³*, και το μη τοξικό είδος που χαρακτηρίζεται από το 6Z-στερεοϊσομερές *Adda³*.⁹⁶ Το ισοδύναμο είδος μικροκυστινών με το στερεοϊσομερές 6Z-*Adda³* είναι επίσης μη τοξικό. Στο θαλάσσιο σφουγγάρι, με το όνομα *Theonella swinhoei*, έχει βρεθεί μία ανάλογη ένωση με την νοντουλαρίνη, αποκαλούμενη μοτοπουρίνη (motuporin). Διαφέρει από την νοντουλαρίνη μόνο σε ένα αμινοξύ, έχει υδροφοβικό L-Val αντί του πολικού L-Arg⁹⁷. Η τοξίνη αυτή ωστόσο, μάλλον, είναι κυανοβακτηριακής προέλευσης, αφού το σφουγγάρι αυτό είναι γνωστό ότι συμβιώνει σε ύδατα που παρατηρούνται κυανοβακτηριακοί πληθυσμοί.





Σχήμα 1.7. (A) Γενική δομή νοντουλαρινών (B) δομή νοντουλαρίνης-R [*cyclo*-(*D*-MeAsp¹-*L*-arginine²-Adda³-*D*-glutamate⁴-Mdha⁵)]

Η τοξικότητα των μικροκυστινών και νοντουλαρινών οφείλεται στην ικανότητα που έχουν να συνδέονται ισχυρά με τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες. Μέσα σε υδατικό διάλυμα, οι τοξίνες αυτές, υιοθετούν μια χημική "μορφή" στο Adda-D-Glu μέρος του μορίου, η οποία ευθύνεται για την τάση τους να συνδέονται με τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες,^{98,99} και επομένως για την τοξικότητα αυτών των κυανοτοξινών^{100,101}. Επιπροσθέτως, οι μικροκυστίνες έχουν την τάση να δημιουργούν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες, με το τμήμα Mdha του μορίου τους.

Τα περισσότερα είδη των μικροκυστινών και των νοντουλαρινών είναι ιδιαίτερος τοξικά ενώ είναι λίγα τα μη τοξικά είδη που έχουν προσδιοριστεί. Γενικά, οποιεσδήποτε δομικές τροποποιήσεις της περιοχής Adda-glutamate των τοξινών, όπως για παράδειγμα μια ισομερίωση του Addadiene (6(E) σε 6 (Z)) ή ακυλίωση της περιοχής glutamate, μετατρέπουν τις μικροκυστίνες και τις νοντουλαρίνες σε μη τοξικά είδη.^{102,103} Οι γραμμικές μικροκυστίνες και νοντουλαρίνες είναι έως και 100 φορές λιγότερο τοξικές από τις ισοδύναμες κυκλικές ενώσεις και θεωρείται ότι είναι πιθανά πρόδρομα μόρια μικροκυστινών ή/και προϊόντα βακτηριακής διάσπασης των κυκλικών μικροκυστινών^{103,104}.

Οι μικροκυστίνες και η νοντουλαρίνη έχουν πλήρως χαρακτηριστεί σε αμιγείς κυανοβακτηριακές καλλιέργειες (δηλ. καλλιέργειες χωρίς προσμίξεις άλλων βακτηριδίων) και έτσι η κυανοβακτηριακή προέλευση αυτών των ενώσεων είναι σαφής. Συγκεκριμένα, οι μικροκυστίνες παράγονται κατά την άνθιση των κυανοβακτηρίων *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Nostoc*, *Anabaenopsis* και κατά την εδαφολογική απομόνωση του *Hapalosiphon hibernicus*. Οι νοντουλαρίνες έχουν βρεθεί, με εξαίρεση το θαλάσσιο σφουγγάρι *Theonella* που αναφέρθηκε ήδη, μόνο στο *Nodularia spumigena*.⁷³

1.4.4. Τοξικότητα των μικροκυστινών και της νοντουλαρίνης

Σε διάφορα δημοσιευμένα περιστατικά δηλητηρίασης ανθρώπων και ζώων, που προκλήθηκαν από κυανοβακτήρια ή τις τοξίνες τους, το κυανοβακτήριο με το επιστημονικό όνομα *Microcystis* ήταν ο πιο συχνά αναφερόμενος οργανισμός. Κατά συνέπεια, εκτενείς πειραματικές μελέτες αφορούν αυτό το κυανοβακτήριο και τις τοξίνες του. Αν και υπάρχουν ποιοτικά στοιχεία που αναφέρονται στη δράση αυτού του κυανοβακτηρίου, τα οποία φανερώνουν την επικινδυνότητά του για τους ανθρώπους, τα στοιχεία αυτά μέχρι τώρα είναι ανεπαρκή για να αξιολογήσουμε τον κίνδυνο που διατρέχει ο άνθρωπος όταν εκτίθεται σε ποικίλες συγκεντρώσεις κυανοτοξινών. Οι τοξικολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζώα αποτελούν μία ένδειξη αυτού του κινδύνου.

Η μικροκυστίνη-LR είναι ιδιαίτερα τοξική. Η δόση που συνεπάγεται το θάνατο του 50% ενός πληθυσμού (Lethal Dose, LD₅₀) κυμαίνεται από 25 έως 150 μg/ Kg⁻¹ σωματικού βάρους στα ποντίκια¹⁰⁵, ενώ μετά από στοματική χορήγηση πάνω από 600 μg/ Kg⁻¹ σωματικού βάρους, μπορεί να εμφανιστεί τοξικότητα στα ποντίκια¹⁰⁶. Αυτό δείχνει ότι, η μικροκυστίνη-LR προκαλεί οξεία τοξικότητα στα τρωκτικά ακόμη και όταν χορηγείται από τη στοματική οδό. Δεν υπάρχει κανένα στοιχείο για υδρόλυση των μικροκυστινών από πεπτιδάσες του στομάχου και είναι προφανές ότι ένα σημαντικό ποσοστό της μικροκυστίνης -LR περνά το εντερικό σύστημα και απορροφάται.

Τα LD₅₀ άλλων εμφανιζόμενων μικροκυστινών (μικροκυστίνες LA, YR, YM) είναι παρόμοια με αυτό της μικροκυστίνης LR, αλλά δεν συμβαίνει το ίδιο και για την μικροκυστίνη-RR, της οποίας το LD₅₀ είναι δέκα φορές υψηλότερο. Λόγω των διαφορών που παρουσιάζονται στην λιποφιλικότητα και την πολικότητα μεταξύ των διαφορετικών μικροκυστινών, δεν μπορεί να εκτιμηθεί η τοξικότητα που θα εμφανιστεί μετά από κατάποση.

Οι μικροκυστίνες είναι πρωτίστως ηπατοτοξικές. Προκαλούν διάσπαση της δομής των κυττάρων του συκωτιού, αύξηση του βάρους του συκωτιού λόγω ενδοηπατικής αιμορραγίας, ανεπάρκεια της καρδιάς και τελικώς θάνατο. Τέλος, μπορεί να επηρεαστούν και άλλα όργανα, όπως είναι τα νεφρά, οι πνεύμονες¹⁰⁷ και άλλα^{108,109}.

Οι Ito et al παρατήρησαν ότι όταν χορηγήθηκε η μικροκυστίνη LR, σε ποντίκια, προκλήθηκαν νεοπλασματικοί κόνδυλοι στο ήπαρ. Στα ζώα χορηγήθηκαν 100 δόσεις τοξίνης με κάθε δόση να περιέχει συγκέντρωση μικροκυστίνης LR 20 μg Kg⁻¹ σωματικού βάρους, για διάστημα 28 εβδομάδων. Στην αυτοψία, που πραγματοποιήθηκε εκ των υστέρων, οι κόνδυλοι αυτοί είχαν διάμετρο μέχρι 5 χιλ. Μερικά ποντίκια εξετάστηκαν δύο μήνες μετά από τη διακοπή της χορήγησης της δόσης, και η αυτοψία έδειξε ότι οι κόνδυλοι συκωτιού παρέμειναν^{110,111}.

Όσον αφορά την νοντουλαρίνη, σε αντίθεση με τις μικροκυστίνες, έχουν υπάρξει λιγότερα περιστατικά ασθένειας ανθρώπων και ζώων που να οφείλονται στην τοξίνη αυτή. Η ηπατοτοξικότητα και η παθολογία του συκωτιού που προκαλείται από την νοντουλαρίνη είναι παρόμοια με αυτήν που προκαλείται από τις μικροκυστίνες, δηλαδή νέκρωση των ηπατοκυττάρων και αιμορραγική διάθεση¹¹². Η νοντουλαρίνη είναι επίσης αναστολέας των πρωτεϊνικών φωσφατασών 1 και 2Α όπως και η μικροκυστίνη LR¹¹³.

1.4.5. Επίδραση των κυανοτοξινών στην ανθρώπινη υγεία. Δηλητηριάσεις ανθρώπων

Οι καταγεγραμμένες περιπτώσεις μαζικών γαστροεντερικών και ηπατικών ασθενειών σε ανθρώπους, στις περισσότερες περιπτώσεις, αποδίδονται στην ύπαρξη κυανοβακτηριακών τοξινών στις παροχές νερού. Ειδικότερα, οι περιπτώσεις αυτές μαζικής δηλητηρίασης έπονται της φυσικής ή τεχνητής διακοπής μιας κυανοβακτηριακής άνθισης (με την εφαρμογή άλατος θεικού χαλκού). Και οι δύο μηχανισμοί οδηγούν στην απελευθέρωση κυανοτοξινών λόγω της αποσύνθεσης των κυανοβακτηριακών κυττάρων. Οι πρώτες καταγεγραμμένες περιπτώσεις εμφάνισης γαστρεντερίτιδας από κυανοβακτήρια ήταν στους κατοίκους μιας σειράς πόλεων κατά μήκος του ποταμού του Οχάιο το 1931¹¹⁴. Οι χαμηλές βροχοπτώσεις εκείνη την χρονιά είχαν ως συνέπεια την ανάπτυξη κυανοβακτηριακής άνθισης στα νερά ενός παραποτάμου που κατέλειξαν έπειτα στον κύριο ποταμό. Παρατηρήθηκαν ξεσπάσματα γαστρεντερίτιδας, τα οποία δεν μπορούσαν να αποδοθούν σε μολυσματικούς παράγοντες. Στο Χαράρε, στη Ζιμπάμπουε, τα παιδιά που ζούσαν σε μια περιοχή της πόλης που υδροδοτούνταν από ένα συγκεκριμένο υδραγωγείο ανέπτυξαν γαστρεντερίτιδα κάθε χρόνο, όταν αποσυντίθονταν οι πληθυσμοί του κυανοβακτηρίου *Microcystis* που υπήρχε στη δεξαμενή. Αλλά παιδιά που ζούσαν στην ίδια πόλη αλλά υδροδοτούνταν από διαφορετικές παροχές νερού, δεν επηρεάστηκαν και κανένας μολυσματικός παράγοντας δεν προσδιορίστηκε.^{21,115} Το πιο θανατηφόρο ξεσπασμα που αποδόθηκε σε κυανοβακτηριακές τοξίνες στο πόσιμο νερό εμφανίστηκε στη Βραζιλία, όταν αναπτύχθηκε μια απέραντη κυανοβακτηριακή άνθιση σε ένα πλημμυρισμένο φράγμα. Αναφέρθηκαν ογδόντα οκτώ θάνατοι, κυρίως παιδιών.¹¹⁶

Στις ΗΠΑ και στην Αυστραλία, αναφέρθηκαν πολλά περιστατικά επιδείνωσης της ανθρώπινης υγείας, μετά από την διακοπή μιας κυανοβακτηριακής άνθισης σε μια δεξαμενή αποθήκευσης ύδατος, με την χρήση άλατος θεικού χαλκού. Σε ένα από αυτά τα περιστατικά, το 62% του πληθυσμού το οποίο υδρεύονταν από μια φιλτραρισμένη, χλωριωμένη παροχή νερού, ανέπτυξε συμπτώματα γαστρεντερίτιδας εντός μιας περιόδου πέντε ημερών. Δεν βρέθηκε κανένας παθογόνος μικροοργανισμός, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε έντονη κυανοβακτηριακή άνθιση (bloom) σε μια ανοικτή δεξαμενή αποθήκευσης ύδατος. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκαν τα είδη *Schizothrix calcola*, *Plectonema*, *Phormidium* και

Lyngbya, σε συγκεντρώσεις πάνω από 100.000 κύτταρα ανά χιλιοστόλιτρο. Στη δεξαμενή αυτή είχε γίνει χρήση άλατος θειικού χαλκού¹¹⁷.

Στο Armidale, στην Αυστραλία, εμφανίστηκε μια ιδιαίτερα πυκνή άνθιση του τοξικού είδους *Microcystis* στην δεξαμενή παροχής νερού της πόλης. Μέσα σε τρεις εβδομάδες η αρμόδια αρχή παροχής νερού επέτρεψε την χρήση άλατος θειικού χαλκού σε συγκέντρωση 1 ppm. Μια επιδημιολογική μελέτη του τοπικού πληθυσμού έδειξε ηπατικές βλάβες που παρουσιάστηκαν ταυτόχρονα με τη διακοπή της άνθισης των κυανοβακτηρίων¹¹⁷.

Ενώ, η οξεία τοξικότητα είναι το πιο εμφανές πρόβλημα των κυανοβακτηριακών δηλητηριάσεων, ο μακροπρόθεσμος κίνδυνος από έκθεση στις κυανοτοξίνες είναι επίσης σοβαρός. Από πειράματα σε ζώα έχει αποδειχτεί ότι προκαλούνται χρόνιες ηπατικές βλάβες από τη συνεχή έκθεση σε μικροκυστίνες. Επίσης, η πιθανότητα καρκινογένεσης και αύξησης όγκων είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς έχει καταγραφεί σε πειράματα σε ζώα.

Η συχνότητα του ανθρώπινου ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στην Κίνα είναι μια από τις υψηλότερες στον κόσμο και εξετάζεται η πιθανότητα εάν οι κυανοβακτηριακές τοξίνες εντάσσονται στους παράγοντες κινδύνου που αυξάνουν τις πιθανότητες αυτής της ασθένειας. Η εμφάνιση του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος στον πληθυσμό της Κίνας ποικίλλει γεωγραφικά. Σε μερικές περιοχές της νοτιοανατολικής Κίνας, τα ποσοστά εμφάνισης αυτής της ασθένειας είναι κάτω από 15 περιστατικά ανά 100.000 ανθρώπους, ενώ σε άλλες περιπτώσεις είναι πάνω από 60 περιστατικά ανά 100.000 ανθρώπους. Δύο αποδεδειγμένοι παράγοντες κινδύνου είναι η μόλυνση με τον ιό ηπατίτιδας Β και η πρόσληψη της αφλατοξίνης Β1 από τρόφιμα, όπως το καλαμπόκι. Το τρίτο σημαντικό στοιχείο κινδύνου είναι οι πηγές πόσιμου νερού. Σε μία συγκεκριμένη περιοχή ενός χωριού τα χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας από καρκίνο παρατηρήθηκαν όταν το πόσιμο νερό προερχόταν από βαθιά πηγάδια, σε αντίθεση με τα πολύ υψηλότερα ποσοστά που παρατηρήθηκαν όταν το πόσιμο νερό προερχόταν από λίμνες και τάφρους. Τα κυανοβακτήρια εμφανίζονται πολύ συχνά σε επιφανειακά ύδατα στη νοτιοανατολική Κίνα, όπου η συχνότητα του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος είναι η υψηλότερη. Έχει προταθεί ότι η παρουσία μικροκυστινών σε πόσιμο νερό που προέρχεται από τα επιφανειακά αυτά ύδατα, ευθύνεται για τις συχνές εμφανίσεις του καρκίνου¹¹⁸. Εντούτοις, βρέθηκαν πολύ χαμηλά επίπεδα κυανοτοξινών σε μια μελέτη που διεξήχθη σε περιορισμένη δειγματοληψία μερικών πηγών πόσιμου νερού στην Κίνα.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO), λαμβάνοντας υπόψη όλα τα επιστημονικά συμπεράσματα για τις κυανοτοξίνες, έθεσε το προσωρινό όριο του 1 μg μικροκυστίνης-LR ανά λίτρο πόσιμου νερού^{119,120}. Σε νερό που περιέχει και κυανοβακτηριακά κύτταρα, αυτό το όριο αφορά την ολική συγκέντρωση τοξίνης,

εξωκυτταρική και ενδοκυτταρική. Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν εκδόθηκε η οδηγία αυτή δεν υπήρχαν αρκετά δεδομένα για να οριστεί όριο και για άλλες κυανοτοξίνες.

Κεφάλαιο 2: Σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές

Εισαγωγή

Η αναλυτική χημεία έχει, μεταξύ των κλάδων της Χημείας, το προνόμιο της μεγάλης προσφοράς στις εξής δύο κατευθύνσεις: α) στην ποιοτική ανάλυση των διαφόρων συστατικών ενός δείγματος, η σύσταση του οποίου είναι άγνωστη β) στην ποσοτική ανάλυση ενός δείγματος, η σύσταση του οποίου είναι γνωστή.

Η συνεισφορά της ενόργανης χημικής ανάλυσης είναι σημαντική τόσο στην ποιοτική όσο και στην ποσοτική χημική ανάλυση. Η ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας έδωσε την δυνατότητα να κατασκευαστούν όργανα υψηλής τεχνολογικής στάθμης τα οποία από μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλα όργανα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη χημική ανάλυση. Τα όργανα αυτά είναι ιδιαίτερα ακριβή και ευαίσθητα και ως εκ τούτου οι αναλύσεις που γίνονται με τα όργανα αυτά είναι αξιόπιστες.

Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής αναπτύχθηκαν μέθοδοι προσδιορισμού οργανικών ρύπων με τη χρήση προηγμένων αναλυτικών συστημάτων όπως αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή δέσμευσης ηλεκτρονίων (GC-ECD), αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας (GC-MS) και υγρός χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Παρακάτω περιγράφονται οι βασικές αρχές λειτουργίας αυτών των αναλυτικών συστημάτων.

2.1. Γενικές αρχές αέριας χρωματογραφίας (Gas Chromatography, GC)¹²¹

Τα τελευταία τριάντα χρόνια αναπτύχθηκε η αεριοχρωματογραφία (GC) ως αναλυτική τεχνική. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή, συγκρινόμενη με άλλες τεχνικές ανάλυσης, και καλύπτει ένα μεγάλο φάσμα εφαρμογών. Σήμερα, χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα, τρόφιμα, στη βιομηχανία πετρελαίου κ.α. Ο αέριος χρωματογράφος είναι ένα όργανο διαχωρισμού η λειτουργία του οποίου στηρίζεται στην αρχή της χρωματογραφίας, δηλαδή την κατανομή των ουσιών ανάμεσα σε δύο φάσεις την κινητή και την στατική.

Αρχικά γίνεται η εισαγωγή του δείγματος στον εισαγωγέα του οργάνου με μικροσύριγγα. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα είναι τουλάχιστον 50 °C πάνω από το σημείο ζέσεως του λιγότερου πτητικού συστατικού του δείγματος, έτσι ώστε όλες οι ενώσεις που αποτελούν το δείγμα να μεταφέρονται στην αέρια φάση. Η κινητή φάση που αποτελείται από κάποιο αδρανές αέριο (φέρων αέριο, carrier gas) όπως άζωτο ή ήλιο παρασύρει τις προς ανάλυση ουσίες από τον εισαγωγέα στη στήλη του οργάνου. Η στατική φάση στην οποία

προσροφώνται οι ουσίες είναι το υλικό πλήρωσης της στήλης μέσα από το οποίο ρέει το φέρον αέριο.

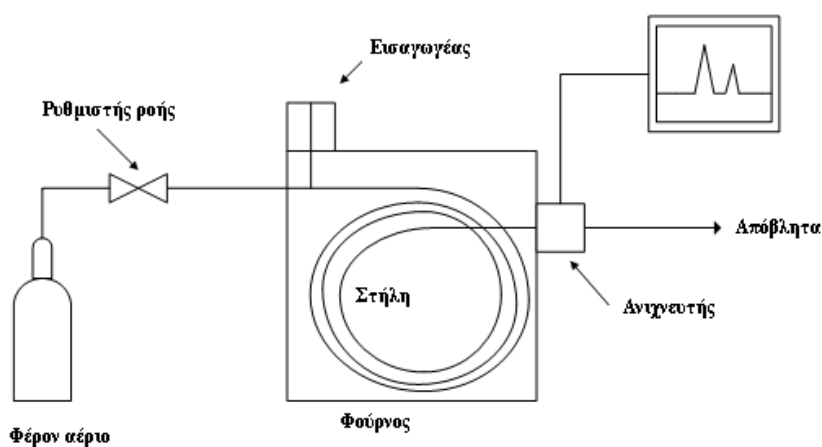
Η στήλη είναι συνήθως γυάλινη ή χαλύβδινη και πληρούται με διάφορα υλικά ανάλογα με τα συστατικά που πρέπει να διαχωριστούν. Οι διαστάσεις της στήλης ποικίλουν, όπως και τα υλικά πλήρωσης. Για την επιλογή της στήλης λαμβάνονται υπόψη η διαχωριστική ικανότητά της ως προς τις υπό ανάλυση ουσίες και η δυνατότητα αυτών των ουσιών να εξέρχονται από τη στήλη και να μην κατακρατούνται. Άλλες παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη στην επιλογή της στήλης είναι το μήκος της (έχει σχέση με τη διαχωριστική ικανότητα της στήλης και το κόστος της), η διάμετρος της (οι στήλες με μεγάλη διάμετρο δεν είναι κατάλληλες για GC/MS) και το πάχος του υλικού πλήρωσης (π.χ. τα αέρια διαχωρίζονται καλύτερα σε στήλες με παχύ στρώμα.). Συνήθως, η διάμετρος της στήλης είναι πολύ μικρή και το μήκος της μεγάλο π.χ. 100 m. Η κλασική στήλη, που χρησιμοποιείται για την ανάλυση φυτοφαρμάκων, είναι η μη πολική γυάλινη τριχοειδής στήλη (capillary column) μήκους 30 m και διαμέτρου 0.25 mm με υλικό πλήρωσης 5% διφαινύλιο και 95% διμέθυλοπολυσιλοξάνιο πάχους 0.25 μm .

Επομένως, η στήλη είναι το μέσο στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος σε οργανικό διαλύτη στα συστατικά του. Το μίγμα των ουσιών εισάγεται στην είσοδο της στήλης και σταδιακά εξέρχονται τα διαχωρισμένα συστατικά του μίγματος από την έξοδο της στήλης που είναι συνδεδεμένη με τον ανιχνευτή. Μετά την εισαγωγή τους στη στήλη οι ουσίες προσροφώνται από το πληρωτικό υλικό λόγω αλληλεπιδράσεων με την στατική φάση. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές εξαρτώνται από τον αριθμό, τα είδη των ατόμων και τα είδη των δεσμών μεταξύ των ατόμων, τον όγκο των μορίων, την έκταση της επιφάνειας των μορίων, τα μερικά φορτία των ατόμων, τη διπολική ροπή, την ισχύ των δεσμών των ατόμων κ.α. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι υπεύθυνες για το χρόνο παραμονής της κάθε μιας ουσίας στη στήλη, δηλαδή για τον χρόνο κατακράτησης ή ανάσχεσης (Retention time, Rt). Ως χρόνος κατακράτησης μιας ουσίας ορίζεται το χρονικό διάστημα από τη στιγμή που γίνεται η ένεση του μίγματος μέχρι τη στιγμή της ανίχνευσης της ουσίας στον ανιχνευτή.

Έτσι, ο διαχωρισμός των ενώσεων οφείλεται στο διαφορετικό χρόνο που παραμένει μέσα στη στήλη η κάθε ένωση. Ο χρόνος αυτός εξαρτάται όχι μόνο από τις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με τη στατική φάση αλλά και από τη ροή του φέροντος αερίου και τη θερμοκρασία που βρίσκεται η στήλη, δηλαδή το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου. Σε αυτούς τους δύο παράγοντες μπορεί κανείς να επέμβει πολύ εύκολα προκειμένου να βελτιώσει τον διαχωρισμό των ενώσεων. Ο άλλος παράγοντας που είναι η αλλαγή της στήλης δεν μπορεί να αλλάξει εύκολα, εξαιτίας του κόστους της, της δυσκολίας αλλαγής της και της διαθεσιμότητας άλλων στηλών.

Οι σύγχρονοι αεριοχρωματογράφοι διαθέτουν συστήματα για τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας του φούρνου. Αυτό το γεγονός επιτρέπει τον θερμοκρασιακό προγραμματισμό του φούρνου, δηλαδή την αρχική θερμοκρασία, τα ενδιάμεσα βήματα και τους ρυθμούς ανόδου της καθώς και την τελική θερμοκρασία. Έτσι, επιλέγοντας κατάλληλο θερμοκρασιακό πρόγραμμα καθίσταται δυνατός ο βέλτιστος διαχωρισμός των ουσιών, αφού με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η κατανομή της κάθε μιας ουσίας ανάμεσα στις δύο φάσεις, την κινητή και την στατική. Με την αύξηση της θερμοκρασίας η κατανομή μετακινείται προς την πλευρά της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να παρασύρεται η ουσία από το φέρον αέριο και να εξέρχεται από την στήλη.

Στο Σχήμα 1.8 απεικονίζεται διαγραμματικά ένας αέριος χρωματογράφος. Το φέρον αέριο από τη φιάλη υψηλής πίεσης μέσω του ρυθμιστή ροής διαβιβάζεται στον εισαγωγέα και στη στήλη η οποία βρίσκεται μέσα στο φούρνο. Πραγματοποιείται ο διαχωρισμός και σταδιακά ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή οι ενώσεις και καταγράφεται η απόκριση του ανιχνευτή. Στην διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο ανιχνευτές αέριου χρωματογράφου ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD) και ο ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας (Mass Spectrometry, MS.)



Σχήμα 1.8. Διαγραμματική διάταξη αεριοχρωματογραφικού συστήματος

Οι βασικότερες παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη κατά τη σχεδίαση μιας GC ανάλυσης είναι οι παρακάτω¹²²:

Θερμοκρασιακό πρόγραμμα : Ο θερμοκρασιακός σχεδιασμός του φούρνου αφορά την αρχική θερμοκρασία, τα ενδιάμεσα βήματα και τους ρυθμούς ανόδου της και την τελική θερμοκρασία. Έτσι, μέσω της θερμοκρασίας γίνεται δυνατός ο βέλτιστος διαχωρισμός ουσιών αφού με τον τρόπο αυτό ελέγχεται η κατανομή της ουσίας ανάμεσα στις δύο φάσεις : την κινητή και την στατική. Ένας γρήγορος ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας έχει ως

αποτέλεσμα το εύρος των κορυφών να είναι μικρότερο και το υψος τους μεγαλύτερο. Αυτό αυξάνει την ευαισθησία της ανάλυσης. Το όριο ευαισθησίας μετράται με τον ελάχιστο αποδεκτό λόγο του σήματος της κορυφής προς το σήμα της % γραμμής βάσης. Εάν ο διαχωρισμός δύο κορυφών δεν είναι αποδεκτός, τότε πρέπει να μειώνεται ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας του φούρνου. Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφήματος είναι σκόπιμο να παραμένει ο ελάχιστος δυνατός. Οι θερμοκρασίες του συστήματος εισαγωγής και του συστήματος σύνδεσης αέριου χρωματογράφου και διαφόρων ανιχνευτών πρέπει να επιλέγονται με βάση τη σταθερότητα των προς ανάλυση ουσιών και την ανάγκη να παραμένουν στην αέρια φάση

Στήλη χρωματογραφίας : Κυρίως χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες. Για την επιλογή του υλικού πληρώσεως της στήλης λαμβάνονται υπόψη η πολικότητα των προς ανάλυση ενώσεων, η διαχωριστική ικανότητα της στήλης και η δυνατότητα αυτών των ουσιών να εξέρχονται και να μην κατακρατούνται. Άλλες παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη στην επιλογή στήλων είναι το μήκος της στήλης (έχει σχέση με τη διαχωριστική ικανότητα της στήλης και το κόστος της), η διάμετρός της (οι στήλες με μεγάλη διάμετρο δεν είναι κατάλληλες για GC/MS) και το πάχος του στρώματος του υλικού στο εσωτερικό (π.χ. τα αέρια διαχωρίζονται καλύτερα από στήλες με παχύ στρώμα).

Οι πιο κοινές χρωματογραφικές στήλες είναι οι DB-5. Η στατική φάση των DB-5, η οποία καλείται «μη πολική στήλη», αποτελείται από 5% διφαινύλιο και 95% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο. Η DB-1 έχει την περισσότερη μη πολική στατική φάση, η οποία αποτελείται από 100% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο.

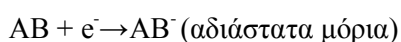
2.1.1. Ανιχνευτές αέριας χρωματογραφίας

Ο σκοπός ενός ανιχνευτή είναι να μας δίνει μία απόκριση, η οποία να είναι ανάλογη με την συγκέντρωση ή την ποσότητα ενός συστατικού που περνά μέσα από αυτόν και η απόκριση αυτή να έχει την μορφή ενός σήματος, το οποίο να μπορεί να μετρηθεί. Μέχρι και σήμερα δεν υπάρχει ανιχνευτής, ο οποίος να συνδυάζει ευαισθησία, γραμμικότητα και εκλεκτικότητα και να μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις αεριοχρωματογραφικές αναλύσεις. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι ανιχνευτών σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία : ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων και ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας.

2.1.1.1. Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων (ECD)¹²²⁻¹²⁴

Ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (Electron Capture Detector, ECD) είναι ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές για περιβαλλοντικά δείγματα, τροφίμων κ.α.

Αυτό οφείλεται στην εκλεκτικότητά του προς τις αλογονούχες ενώσεις, όπως φυτοφάρμακα και πολυχλωριωμένα διφαινύλια. Ο ECD λειτουργεί κατά τρόπο ανάλογο με τον αναλογικό απαριθμητή που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της X ακτινοβολίας. Το έκλουσμα από τη στήλη διέρχεται πάνω από ένα β-ραδιενεργό υλικό, συνήθως ^{63}Ni . Ένα ηλεκτρόνιο από τη ραδιενεργό πηγή προκαλεί ιοντισμό του φέροντος αερίου (συνήθως άζωτο) και την παραγωγή ενός σμήνους ηλεκτρονίων. Απουσία οργανικής ένωσης τα ηλεκτρόνια αυτά προκαλούν την εμφάνιση ενός σταθερού ρεύματος μεταξύ ενός ζεύγους ηλεκτρονίων. Το ρεύμα αυτό μειώνεται σημαντικά παρουσία οργανικών μορίων, τα οποία έχουν την τάση να 'συλλαμβάνουν' ηλεκτρόνια. Όταν μια ηλεκτρονιόφιλη ένωση AB βρεθεί μέσα στο θάλαμο ιοντισμού αντιδρά με τα ελεύθερα ηλεκτρόνια σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Τα ηλεκτρόνια δεσμεύονται από την ένωση (από εδώ βγαίνει και το όνομα του ανιχνευτή) και τα ιόντα που παράγονται κινούνται προς την άνοδο και την κάθοδο. Το στατικό ρεύμα του θαλάμου μειώνεται, όσο διαρκεί η έκλουση της ηλεκτρονιόφιλης ένωσης και η μεταβολή αυτή καταγράφεται με τη μορφή της καμπύλης του Gauss.

Ο ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων είναι πάρα πολύ ευαίσθητος, ιδιαίτερα στα αλογονοπαράγωγα όπου το όριο ανίχνευσης μπορεί να είναι της τάξης του 10^{-12} g. Το βασικό μειονέκτημά του είναι ότι η γραμμική περιοχή του περιορίζεται σε δύο τάξεις μεγέθους.

2.1.1.2. Ανιχνευτής Φασματομετρίας μάζας (MS) ¹²⁵

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) θεωρείται η πιο έγκυρη αναλυτική μέθοδος στις περιπτώσεις ταυτοποίησης άγνωστων ουσιών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι, στη φασματομετρία μάζας τα μόρια της υπό ανάλυσης ουσίας αναλύονται άμεσα, δηλαδή καταγράφονται τα ίδια τα μόρια ή θραύσματά τους, αφού προηγουμένως έχουν μετατραπεί σε ιόντα με την αφαίρεση (σπανιότερα προσθήκη) ενός ηλεκτρονίου. Πρόκειται για μία καταστροφική τεχνική που βρίσκει πολλές εφαρμογές σε τομείς όπως τρόφιμα, περιβάλλον, βιοχημεία, φαρμακολογία κ.α.

Με την τεχνική αυτή άτομα ή μόρια μιας ένωσης ιοντίζονται, θραυσματοποιούνται και στη συνέχεια τα ιοντικά θραύσματα διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z) και τελικά καταγράφονται. Συνήθως, αναλύονται θετικά φορτισμένα ιόντα που παράγονται από μόρια, αν και ορισμένες φορές ενδιαφέρουν και τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Ο ιοντισμός ενός μορίου περιγράφεται με την παρακάτω αντίδραση:



Το ιόν που παράγεται ονομάζεται μοριακό ιόν και διαθέτει ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων. Πολύ σπάνια το φορτίο είναι μεγαλύτερο του +1, οπότε η τιμή του m/z ισούται

με τη μάζα του ιόντος. Η ενέργεια ιοντισμού των πιο πολλών οργανικών ενώσεων κυμαίνεται μεταξύ 8-15 eV. Η ενέργεια ιοντισμού που προσφέρεται κατά την ανάλυση είναι πολύ μεγαλύτερη, συνήθως 70 eV, και έτσι το πλεόνασμα της ενέργειας που δίνεται διοχετεύεται στο μοριακό ιόν οδηγώντας το σε θραυσματοποίηση. Τα προϊόντα θραυσματοποίησης κάθε φορά είναι ένα φορτισμένο και ένα ουδέτερο θραύσμα. Το ουδέτερο θραύσμα είναι κάποιο ουδέτερο μόριο π.χ. H₂O, C₂H₄ ή κάποια ουδέτερη ρίζα όπως OH[•], H[•]. Υπό την προϋπόθεση ότι το ιοντισμένο θραύσμα διαθέτει ικανή εσωτερική ενέργεια ακολουθεί δεύτερη διάσπαση. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται μέχρις ότου σχηματιστούν κάποια θραύσματα που δεν διαθέτουν αρκετή ενέργεια ή μέχρι τη στιγμή που τα ιόντα θα αναλυθούν. Τα ιόντα αυτά καταγράφονται και προκύπτει το φάσμα μάζας της ένωσης το οποίο εξαρτάται από τη μέθοδο ιοντισμού και το χρόνο που μεσολαβεί μεταξύ ιοντισμού και ανίχνευσης των ιόντων. Να σημειωθεί ότι ένα θραύσμα μπορεί να διασπαστεί κατά διάφορα ποσοστά με πολλούς τρόπους. Το πώς θα διασπαστεί ένα θραύσμα εξαρτάται από την εσωτερική ενέργεια που έχει. Ένα φάσμα μάζας έχει στον άξονα x τις τιμές του m/z και στον άξονα y την αφθονία (abundance) των διαφόρων ιόντων.

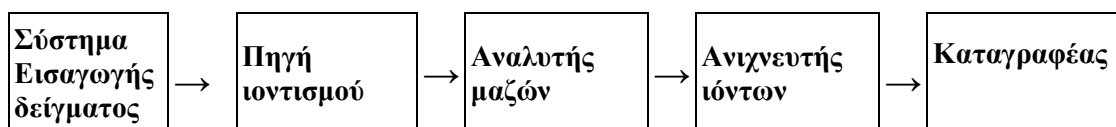
Οι συνήθεις μέθοδοι ιοντισμού είναι ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact Ionization, EI) ή με χημικό ιοντισμό (Chemical Ionization). Κατά τον ιοντισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων το δείγμα υπό την μορφή αερίου ή ατμών εισάγεται στο θάλαμο ιοντισμού (πηγή ιοντισμού), όπου βομβαρδίζεται από μία κάθετη δέσμη ηλεκτρονίων ως προς την πορεία του δείγματος. Η δέσμη αυτή των ηλεκτρονίων παράγεται από ένα νήμα (filament) βολφραμίου ή ρηνίου και στη συνέχεια επιταχύνεται μέσω δυναμικού 70eV στην πηγή. Πρακτικά ο ιοντισμός του δείγματος δεν συμβαίνει λόγω της σύγκρουσής του με τα ηλεκτρόνια αλλά εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων με το ηλεκτρικόμαγνητικό τους πεδίο, όταν κάποια από αυτά περάσουν κοντά ή διαμέσου των μορίων. Η ενέργεια των ηλεκτρονίων της δέσμης είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν που απαιτείται για την διάσπαση του οργανικού μορίου.

Η μορφή αυτή του ιοντισμού έχει το πλεονέκτημα ότι το φάσμα μάζας που λαμβάνεται, έχει το μοριακό ιόν και τα θραύσματα του οπότε οδηγεί στον προσδιορισμό της σχετικής μοριακής μάζας και της δομής της ένωσης. Όμως, για κάποια μόρια η ενέργεια που δίνεται είναι ιδιαίτερα μεγάλη έτσι ώστε τα μοριακά ιόντα να διασπαστούν πλήρως πριν εξέλθουν από την πηγή ιοντισμού και φτάσουν στον αναλυτή μαζών. Ένα από τα σημαντικά μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι η δυσκολία που παρουσιάζεται στο διαχωρισμό ισομερών. Επίσης, κάποια μόρια είναι δυνατόν να μην είναι πτητικά στις θερμοκρασίες λειτουργίας της πηγής ιοντισμού (180-250 °C).

Κατά το χημικό ιοντισμό ένα αέριο αντίδρασης (π.χ. αμμωνία, μεθάνιο) εισάγεται στην πηγή ιόντων σε μεγάλη περίσσεια σε σχέση με την προς ανάλυση ουσία. Το αέριο

αντίδρασης ιοντίζεται με βομβαρδισμό ιόντων, όπως στον ιοντισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων και παράγονται ιόντα πρωτογενούς θραυσματοποίησης. Μετά τον σχηματισμό αυτών των ιόντων ακολουθούν αντιδράσεις ιόντων - μορίων μεταξύ των πρωτογενών ιόντων και των μορίων του αερίου αντιδράσεως και παράγονται τα ιόντα αντίδρασης χημικού ιοντισμού καθώς και «θερμικά ηλεκτρόνια» (ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας). Η τεχνική αυτή έχει το πλεονέκτημα του πιο ήπιου ιοντισμού σε σχέση με τον ιοντισμό ηλεκτρονίων, οπότε παράγονται περισσότερα μοριακά ιόντα κάτω από τις ίδιες υπόλοιπες συνθήκες αλλά έχει το μειονέκτημα της μειωμένης ευαισθησίας. Αυτή η τεχνική ιοντισμού παρουσιάζει αυξημένη δυνατότητα για διαχωρισμό κάποιων ισομερών.

Οι φασματογράφοι μάζας αποτελούνται από τα ακόλουθα τμήματα : 1) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, 2) την πηγή ιοντισμού, 3) τον αναλυτή μαζών, 4) τον ανιχνευτή ιόντων, 5) τον ενισχυτή του σήματος και 6) το σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας των δεδομένων. Στο Σχήμα 1.9 απεικονίζεται διαγραμματικά ένα φασματομέτρο μάζας.



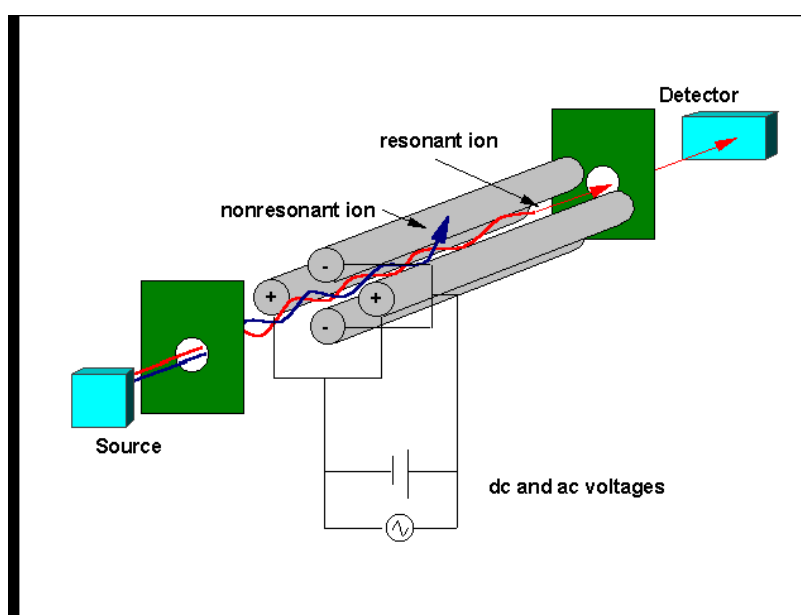
Σχήμα 1.9. Διαγραμματική παράσταση φασματομέτρου μάζας.

Να σημειωθεί ότι όλο το σύστημα βρίσκεται υπό κενό της τάξης των 10^{-6} torr για διάφορους λόγους. Το κενό αυτό παράγεται από αντλίες υψηλών δυνατοτήτων. Η παρουσία κενού εμποδίζει την οξείδωση του νήματος που παράγει τα ηλεκτρόνια και επιπλέον διευκολύνει το εισαγόμενο δείγμα να περάσει στην αέρια φάση. Επίσης, αποφεύγονται οι συγκρούσεις των ιοντισμένων μορίων με τα μόρια του αέρα ενώ τέλος, βοηθάει στην απομάκρυνση του προηγούμενου δείγματος έτσι ώστε να μην απαιτείται μεγάλος χρόνος αναμονής μεταξύ της εισαγωγής των δειγμάτων.

Στο χώρο ιοντισμού έχει δημιουργηθεί ένα ρεύμα από ιόντα σε αέρια φάση το οποίο προέρχεται από τα αέρια μόρια της ουσίας που ιοντίστηκε. Τα ιόντα αυτά πριν καταγραφούν, διαχωρίζονται με βάση το βάρος τους, δηλαδή το άθροισμα των βαρών των ατόμων που απαρτίζουν κάθε ένα από τα ιόντα. Ο διαχωρισμός γίνεται σε μια ειδική διάταξη η οποία ονομάζεται αναλυτής μαζών και η οποία επιτρέπει να την διαπερνούν ιόντα με ένα συγκεκριμένο λόγο βάρους προς φορτίο m/z . Επειδή το φορτίο στις περισσότερες περιπτώσεις είναι 1, αριθμητικά ο λόγος είναι ίσος προς το βάρος του ιόντος.

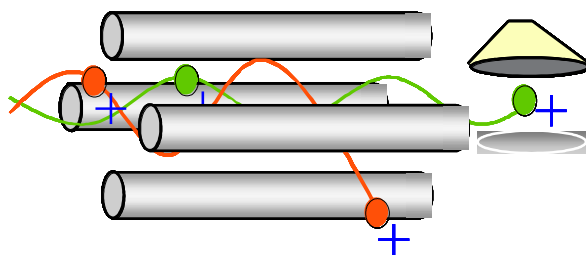
Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι αναλυτή μαζών: ο αναλυτής τύπου τετραπόλου (Quadrupole) (Σχήμα 1.10) και ο αναλυτής τύπου παγίδας ιόντων (Ion Trap). Οι τετραπολικοί αναλυτές μαζών αποτελούνται από 4 παράλληλες μεταλλικές ράβδους τοποθετημένες παράλληλα προς το ρεύμα των ιόντων που εξέρχεται από το χώρο ιοντισμού, το οποίο

διαθέτει ένα συνδυασμό από σταθερά και μεταβλητά με το χρόνο δυναμικά. Τα δυναμικά αυτά επιτρέπουν σε ιόντα συγκεκριμένου λόγου m/z να διαπερνούν το φίλτρο. Τα υπόλοιπα ιόντα διαφορετικού λόγου m/z παρεκκλίνουν από την πορεία και απομακρύνονται από το χώρο του MS από την αντλία κενού. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός δυναμικών των ράβδων διαρκεί μερικά μόνο msec, οπότε αλλάζει με αποτέλεσμα να διαπερνούν στη συνέχεια το φίλτρο ιόντα διαφορετικού λόγου m/z . Τα τετράπολα φίλτρα μαζών καλύπτουν ένα εύρος μαζών, συνήθως από 12 έως 1200. Ένα απλοποιημένο διάγραμμα τετραπολικού ανιχνευτή δίνεται στο Σχήμα 1.10.



Σχήμα 1.10. Τετραπολικός ανιχνευτής

Τέσσερις μεταλλικές κυλινδρικές ράβδοι (πόλοι) βρίσκονται φορτισμένες ανά ζεύγη, το ένα ζεύγος απέναντι στο άλλο, στο ίδιο συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα. Στο σύστημα εφαρμόζεται, με διαφορά φάσης 180 μοίρες, εναλλασσόμενο ρεύμα υψηλής συχνότητας (ραδιοσυχνότητα). Τα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο μετά από επιτάχυνση σε δυναμικό 5-15 V ¹²⁶. Ο συνδυασμός της λειτουργίας των τεσσάρων πόλων επιτρέπει σε ιόντα συγκεκριμένου μόνο m/z να περάσουν τον αναλυτή και να φτάσουν στον ανιχνευτή. Για τη σάρωση σε ένα τετραπολικό αναλυτή τα δυναμικά των δύο ρευμάτων (εναλλασσόμενου και συνεχούς) αυξάνονται από την τιμή 0 έως μια μέγιστη τιμή, με το λόγο των δύο να είναι περίπου στο 6. Με τον τρόπο αυτό τα δυναμικά μεταβάλλονται από 0 έως + 250 V για το συνεχές ρεύμα και από 0 έως +1500 V για το εναλλασσόμενο ¹²⁶. Η σάρωση αυτή των δυναμικών επηρεάζει την κίνηση των ιόντων με τρόπο που ορίζεται από περίπλοκες διαφορικές εξισώσεις. Τα ιόντα ουσιαστικά κινούνται διαγράφοντας ελικοειδείς πορείες μέσα στο τετράπολο (Σχήμα 1.11).



Σχήμα 1.11. Αναπαράσταση ελικοειδούς πορείας ιόντων μέσα στον τετραπολικό ανιχνευτή

Το φάσμα μάζας αποτελεί για μία ένωση το δακτυλικό της αποτύπωμα και μάλιστα τα φάσματα ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI) είναι επαναλήψιμα από όργανο σε όργανο. Έτσι, έχουν καταγραφεί τα φάσματα διαφορετικών ενώσεων γνωστής δομής σε βιβλιοθήκες. Τα λογισμικά των οργάνων δίνουν την δυνατότητα να συγκρίνουν το ληφθέν φάσμα σε πολύ μικρό χρόνο με τα φάσματα της βιβλιοθήκης του οργάνου και να δώσουν το πλησιέστερο φάσμα. Ανάλογα με τον βαθμό ομοιότητας των δύο φασμάτων μπορεί να γίνει ταυτοποίηση της άγνωστης ένωσης. Έαν γνωρίζουμε την ένωση τότε μπορεί να ρυθμιστεί κατάλληλα το όργανο ώστε να καταγράφει συγκεκριμένες μάζες αυξάνοντας έτσι σημαντικά την ευαισθησία του οργάνου (Selected Ions Monitoring, SIM).

2.2. Γενικές αρχές υγρής χρωματογραφίας (LC)¹²¹

Ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας (Liquid Chromatography, LC) αποτελείται από τα εξής τμήματα:

- Δοχεία στα οποία τοποθετούνται οι διαλύτες έκλουσης
- Αντλία, με τη βοήθεια της οποίας ο διαλύτης έκλουσης περνάει μέσα από τη στήλη, υπό υψηλή πίεση
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Στήλη, η οποία περιέχει τη στατική φάση, όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός
- Ανιχνευτή, στον οποίο ανιχνεύονται οι ουσίες που έχουν διαχωριστεί
- Σύστημα επεξεργασίας σήματος ανιχνευτή (καταγραφέας)

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός μίγματος διαφόρων ενώσεων βασίζεται στη διαφορετική συγγένεια του κάθε συστατικού ως προς δύο μη αναμιγνυόμενες φάσεις (στατική και κινητή), οι οποίες βρίσκονται σε σχετική κίνηση η μία με την άλλη. Η στατική φάση είναι δεσμευμένη με χημικό δεσμό σε αδρανή σωματίδια (bonded phase) με εξαιρετικά μικρή διάμετρο (3-15μm). Συνήθως διάφορες δραστικές ομάδες ενώνονται χημικά στην επιφάνεια των σωματιδίων πυριτίας (silica) σχηματίζοντας δεσμούς πυριτίου-οξυγόνου

(σιλοξάνια, Si-O-Si-R). Οι ομάδες αυτές μπορεί να είναι άπολες (π.χ. υδρογονανθρακικές αλυσίδες με 8 ή 18 άτομα άνθρακα, C8 ή C18 αντίστοιχα), πολικές (π.χ. -NH₂, -CN) ή ομάδες που ιοντίζονται (π.χ. σουλφονικά οξέα, τεταρτοταγές αμμώνιο).

Ο διαχωρισμός μίγματος ενώσεων, με υγρή χρωματογραφία είναι αποτέλεσμα διαφορετικών διεργασιών μεταφοράς-μετακίνησής τους στο σύστημα δύο μη αναμιγνυόμενων φάσεων. Η ταχύτητα μετακίνησης εξαρτάται από την ισορροπία και τη συγγένεια της ένωσης για τις δύο φάσεις και επομένως από τη χημική δομή και το είδος των φυσικοχημικών δυνάμεων που επικρατούν στο χρωματογραφικό σύστημα. Οι χημικές δυνάμεις αναφέρονται στο σχηματισμό χημικών δεσμών και εξαρτώνται από τη χημική δομή των ενώσεων. Οι φυσικές δυνάμεις είναι κυρίως ηλεκτροστατικές και εξαρτώνται από την πολικότητα ή την πολοσιμότητα των ενώσεων. Μπορεί όμως να είναι και δυνάμεις συναρμογής ανάμεσα στη στατική φάση και σε άτομα με κενό ηλεκτρονίων (Al, Si, Fe, Mg, Ca), ή δυνάμεις σχηματισμού διπόλων ανάμεσα σε μόρια με ισχυρά μόνιμα δίπολα (-NO₂, -COOH, -NH₂, -CO, -OH, αλογόνα). Επίσης δεσμοί υδρογόνου, σχηματισμός συμπλόκων ανάμεσα σε ενώσεις με ομάδες -OH και ιόντα μετάλλων καθώς επίσης και δυνάμεις διασποράς.

Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι πολικοί. Η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από την πολικότητα των προσδιοριζόμενων ουσιών ώστε να είναι ικανοποιητική η έκλουσή τους και από την χαμηλή τιμή απορρόφησης του διαλύτη στο δεδομένο μήκος κύματος της ακτινοβολίας του ανιχνευτή. Η χαμηλή έως μηδενική τιμή απορρόφησης της κινητής φάσης εξασφαλίζει ότι η απορρόφηση της ακτινοβολίας προέρχεται εξολοκλήρου από το δείγμα. Επιπλέον, ο διαλύτης πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας (HPLC grade), γιατί τυχόν υπάρχοντα αδιάλυτα σωματίδια μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στις αντλίες αλλά και να επικαθήσουν στη στήλη προκαλώντας υπέρμετρη αύξηση της πίεσης. Πριν περάσει η κινητή φάση μέσα από την στήλη πρέπει να απαερωθεί, γιατί οι φυσαλίδες παρεμποδίζουν τη λειτουργία των αντλιών και επιπλέον μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στις κυψελίδες των ανιχνευτών. Αυτό επιτυγχάνεται με διαβίβαση ηλίου στις φιάλες που βρίσκεται η κινητή φάση.

Συνήθως για να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών. Η σύσταση του μίγματος διαλυτών μπορεί είτε να μένει σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια του χρωματογραφήματος (ισοκρατική έκλουση), είτε να μεταβάλλεται βαθμιαία (βαθμιαία έκλουση). Η δεύτερη μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για το διαχωρισμό ουσιών με πολύ κοντινούς χρόνους κατακράτησης αλλά και για να συντομευθεί ο χρόνος ανάλυσης.

Βασική παράμετρο για επιτυχή χρωματογραφικό διαχωρισμό, αποτελεί και η θερμοστάτηση της χρωματογραφικής στήλης. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας στην υγρή χρωματογραφία δεν είναι κρίσιμη παράμετρος αλλά, συνήθως, η αποτελεσματικότητα μιας στήλης μπορεί να επηρεαστεί από αλλαγές στη θερμοκρασία. Πολλές φορές μικρή αύξηση

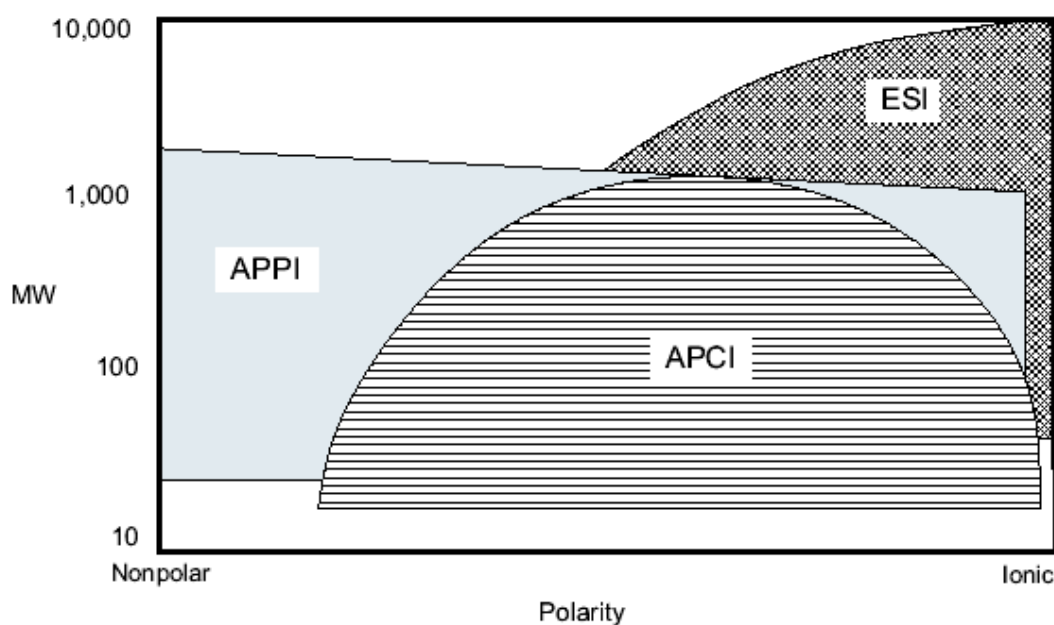
της θερμοκρασίας μπορεί να βελτιώσει τη διαχωριστική ικανότητα της στήλης ενώ ταυτόχρονα μειώνεται το ιξώδες των διαλυτών επιτρέποντας έτσι τη λειτουργία σε χαμηλότερες πιέσεις.

Οι υγροί χρωματογράφοι εφοδιασμένοι με ανιχνευτές υπεριώδους ακτινοβολίας (Ultra Violet, UV), φθορισμού (Fluorescence, FL), φωτοδιόδων (Photodiode Array, PDA), δείκτη διάθλασης και ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές είναι αρκετά διαδεδομένοι στην αναλυτική χημεία. Η σύζευξη όμως υγρού χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) ανήκει στις σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές και επιπλέον αποτελεί αναλυτική μέθοδο επιβεβαίωσης των προς ανάλυση ουσιών. Η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού διαφόρων αναλυτών αποτελεί αντικείμενο έρευνας για πολλές ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο. Σε αυτό το τμήμα της εργασίας παρουσιάζονται οι βασικές αρχές της λειτουργίας του φασματομέτρου μάζας, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου, με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό, χημικό ιοντισμό σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και φωτοϊοντισμό καθώς επίσης και σημαντικά χαρακτηριστικά της, απαραίτητα για την πραγματοποίηση μίας επιτυχούς ανάλυσης.

2.2.1. Τεχνικές ιοντισμού στο σύστημα LC-MS/MS

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η σύζευξη του υγρού χρωματογράφου με το φασματόμετρο μάζας έχει ως αποτέλεσμα ένα πανίσχυρο συνδυασμό με πολύ μεγάλη αποτελεσματικότητα. Από την πλευρά του υγρού χρωματογράφου τα μεγάλα κέρδη από τη σύζευξη (ισχύουν και για το GC-MS) είναι : η εφαρμογή ενός ολικού ανιχνευτή (universal detector), η μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής ανίχνευσης, η μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου (απόλυτη ταυτοποίηση στο φασματογράφο μαζών), η δυνατότητα ταυτοποίησης αγνώστων ενώσεων σε άγνωστα δείγματα. Από την πλευρά του φασματομέτρου μάζας τα κέρδη είναι: η άμεση εισαγωγή μη πτητικών ενώσεων χωρίς την ανάγκη τροποποίησης του μορίου της αναλυόμενης ένωσης και η εκμετάλλευση της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας του υγρού χρωματογράφου. Η σύζευξη με υγρό χρωματογράφο (LC-MS) εφαρμόζεται στις περιπτώσεις που απαιτείται η ανάλυση ενώσεων που είτε δεν είναι πτητικές, είτε διασπώνται σε αυξημένη θερμοκρασία. Στην κατηγορία αυτή ουσιαστικά εντάσσεται η πλειοψηφία των βιολογικά δραστικών ενώσεων, γι αυτό το λόγο και η επίτευξη της δύσκολης αυτής σύζευξης προκάλεσε πραγματική επανάσταση στις βιολογικές επιστήμες. Η τεχνική θεωρείται πια απαραίτητο εργαλείο σε μεγάλη σειρά αναλυτικών εργασιών και απαντάται σε πολλά εργαστήρια με αντικείμενο όπως: φαρμακευτική ανάλυση, βιοανάλυση, έλεγχος τροφίμων, βιοτεχνολογία, πολυμερή κλπ. Βραβεύτηκε δε με το βραβείο Nobel Χημείας το 2002. Η

σύζευξη με υγρό χρωματογράφο απαιτεί τη χρήση ειδικής διάταξης (interface) ιοντισμού, αφού ουσιαστικά το ζητούμενο είναι η σύζευξη δύο ασύμβατων τεχνικών. Από την πλειάδα των ειδικών διατάξεων (interfaces) που έχουν αναπτυχθεί, οι πιο σημαντικές θεωρούνται αυτές που επιτυγχάνουν ιοντισμό σε ήπιες συνθήκες και υπό ατμοσφαιρική πίεση. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες διατάξεις ιοντισμού είναι αυτή του ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο (Electron Spray Ionization, ESI) και του χημικού ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI). Σχετικά πρόσφατα αναπτύχθηκε και η τεχνική φωτοϊοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI). Στο Σχήμα 1.12 που ακολουθεί παρουσιάζεται διαγραμματικά το εύρος της εφαρμοσιμότητας των τριών διατάξεων ανάλογα με το μοριακό βάρος των προς ανάλυση ουσιών και την πολικότητά τους.



Σχήμα 1.12. Εύρος εφαρμοσιμότητας των τεχνικών ESI, APCI, APPI ανάλογα με το μοριακό βάρος και την πολικότητα των προς ανάλυση ουσιών¹²⁷.

Παρακάτω περιγράφονται οι βασικές αρχές λειτουργίας αυτών των διατάξεων ιοντισμού στο σύστημα LC-MS/MS.

2.2.1.1. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

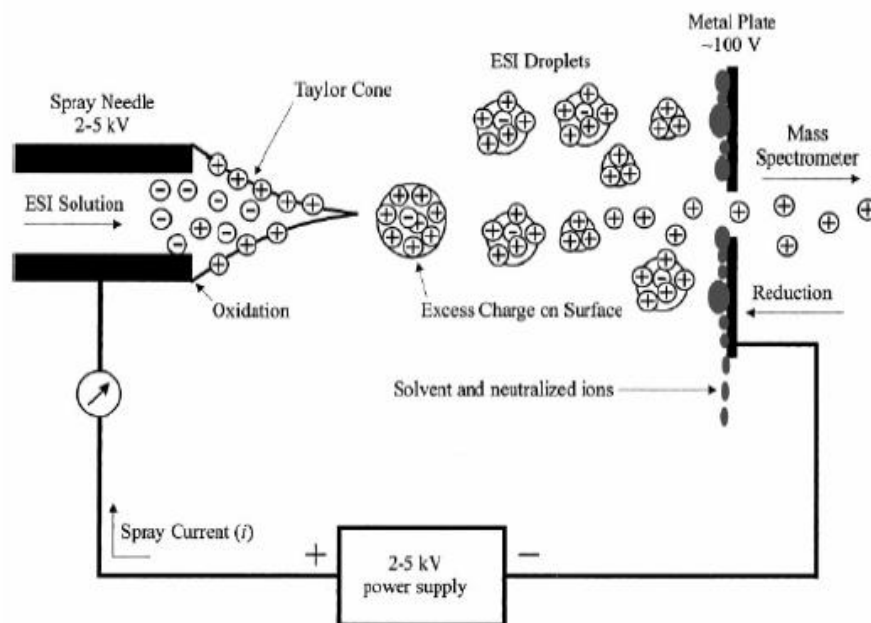
Το φαινόμενο του ηλεκτροψεκασμού (Electron Spray, ES) είναι γνωστό εδώ και αρκετά χρόνια, αλλά μόλις στις αρχές του 20ου αιώνα έγινε πλήρως κατανοητό ¹²⁸. Ο Malcom Dole και οι συνεργάτες του επέδειξαν την δυνατότητα της χρήσης του ηλεκτροψεκασμού ως τρόπο ιοντισμού μορίων το 1970 ^{129,130}. Παρόλα αυτά χρειάστηκε να περάσουν είκοσι χρόνια ώσπου ο John Fenn παρουσίασε για πρώτη φορά την χρήση του ηλεκτροψεκασμού για τον ιοντισμό βιολογικών μορίων με μεγάλη μάζα και την ανάλυση αυτών με φασματομέτρο μάζας ^{131 132}. Αυτή η εργασία του είχε σαν αποτέλεσμα να κερδίσει μέρος του βραβείου Nobel Χημείας το 2002 και να διευρύνει τις δυνατότητες του φασματομέτρου μάζας καθώς κατάφερε να δημιουργήσει μία πηγή ιοντισμού ικανή να παράγει ιόντα από ενώσεις μη-πηκτικές και θερμικά ασταθείς. Αυτή η πηγή ιοντισμού, ήταν ικανή να παράγει πολλαπλά φορτισμένα ιόντα, κάνοντας έτσι πραγματικότητα τη δυνατότητα ανάλυσης πεπτιδίων και πρωτεϊνών με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία και σε μικρότερο χρόνο ανάλυσης από ότι οι παραδοσιακές τεχνικές ανάλυσης βιολογικών μορίων όπως είναι η ηλεκτροφόρηση πηκτής ¹³³. Η απευθείας ανάλυση ιόντων σε διαλύματα σε συνδυασμό με τον υγρό χρωματογράφο (HPLC) δίνει το πλεονέκτημα του χαρακτηρισμού ενώσεων σε ιχνοποσότητες σε βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα, όπως οργανομεταλλικές ενώσεις, σύμπλοκα, φάρμακα, φυσικά προϊόντα, ολιγονουκλεοτίδια, υδρογονάνθρακες καθώς και άλλα μικρά μόρια .

Η τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο (Electron Spray Ionization, ESI) χρησιμοποιείται ως η κυριότερη μέθοδος σύζευξης υγρού χρωματογράφου με φασματομέτρο μάζας. Βασίζεται στην παρατήρηση ότι όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο μερικών χιλιάδων Volts, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «εξάτμιση με ιοντισμό» και εντάσσεται στις μαλακές /ήπιες τεχνικές ιοντισμού. Η διάταξη δίνεται σχηματικά στο Σχήμα 1.13α και η λειτουργίας της αναλύεται παρακάτω.

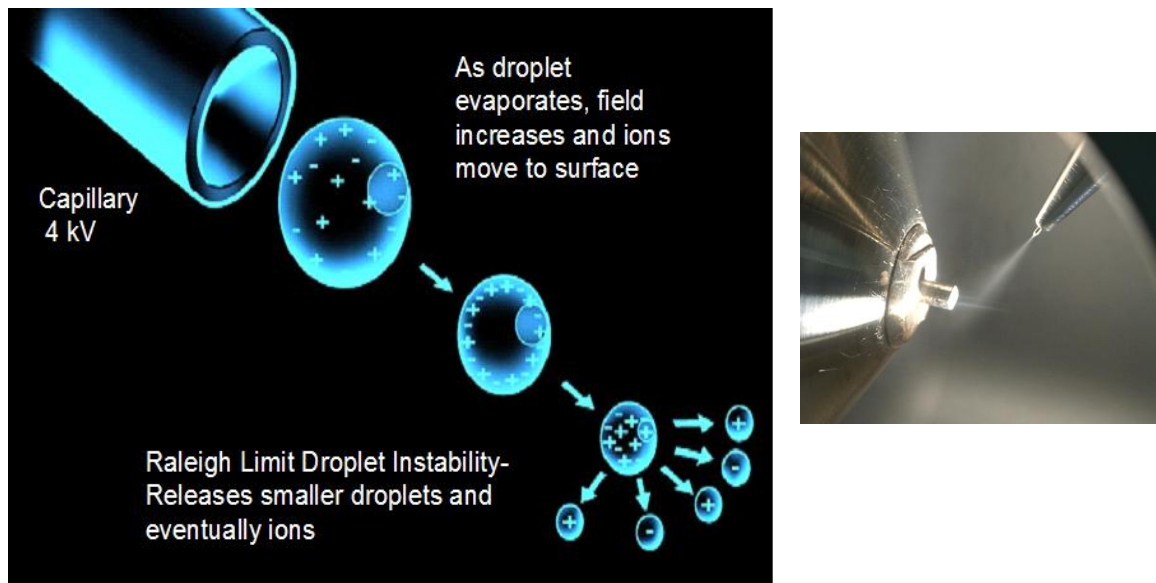
Κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού, διάλυμα του δείγματος εισάγεται σε έναν μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα με την ταχύτητα ροής να κυμαίνεται από 0.02-1 ml/min. Μεταξύ αυτού του τριχοειδούς και ενός αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 3-5 kV, τιμή ικανή να παράγει το ηλεκτρικό πεδίο που επιδρά στα φορτία του διαλύματος διαχωρίζοντας τα και συσσωρεύοντας τα θετικά ή τα αρνητικά φορτία (ανάλογα με το πρόσημο της τάσης που εφαρμόζεται στον τριχοειδή) στην άκρη του τριχοειδούς σχηματίζοντας τον “κώνο του Taylor”. Αυτός ο κώνος είναι τμήμα του διαλύματος που προεξέχει από τον τριχοειδή και φέρει συσσωρευμένο φορτίο, δηλαδή το φορτίο που διαχωρίστηκε, στην επιφάνειά του. Καθώς το δυναμικό αυξάνει, το διάλυμα που σχηματίζει

τον κώνο του Taylor ξεπερνά το σημείο Rayleigh ¹³⁴, δηλαδή το σημείο εκείνο όπου η πίεση από τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων εξισορροπείται από την επιφανειακή τάση του διαλύματος με συνέπεια ο κώνος να υφίσταται σχάση και να παράγονται φορτισμένα σταγονίδια (Σχήμα 1.13β).

Αυτά τα σταγονίδια φέρουν την περίσσεια φορτίου στην επιφάνειά τους, δηλαδή την περίσσεια φορτίου που βρισκόταν στην επιφάνεια του κώνου, και περιλαμβάνει τα ιόντα που θα παραχθούν στην αέρια φάση. Για αυτή την διαδικασία έχουν προταθεί δυο κύριες θεωρίες. Σύμφωνα με την θεωρία της σχάσης Coulomb¹³⁵, τα σταγονίδια εξαιτίας της συνεχούς εξάτμισης του διαλύτη από αυτά συρρικνώνονται και αυξάνονται έτσι οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων τόσο ώστε να υφίστανται σχάση, με αποτέλεσμα να παράγονται μικρότερα σταγονίδια. Αυτά τα νέα μικρότερα σταγονίδια συρρικνώνονται και υφίστανται περαιτέρω σχάση. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι το σημείο που το κάθε σταγονίδιο να περιέχει μόνο ένα ιόν και έτσι με την εξάτμιση και των τελευταίων μορίων του διαλύτη να παράγονται ιόντα στην αέρια φάση. Η εναλλακτική θεωρία εξάτμισης ιόντων ¹³⁶ υποστηρίζει ότι λόγω εξάτμισης του διαλύτη τα σταγονίδια υφίστανται σχάση αλλά μέχρι το σημείο όπου οι απωστικές δυνάμεις των ιόντων στην επιφάνεια της σταγόνας αυξάνουν τόσο ώστε ιόντα να απελευθερώνονται στην αέρια φάση.



Σχήμα 1.13α. Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό για την παραγωγή θετικών ιόντων ¹³⁷.



Σχήμα 1.13β. Αναπαράσταση της διάταξης ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή ιόντων .

Κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού εκτός από τα ιόντα του αναλύτη παράγονται και ένα πλήθος άλλων ιόντων από συσσωματώματα ιόντων του αναλύτη με μόρια του διαλύτη αλλά και συσσωματώματα μορίων του διαλύτη. Αυτό γίνεται διότι στο άκρο του τριχοειδούς λαμβάνει χώρα αδιαβατική εκτόνωση του διαλύματος κατά την σχάση του κώνου και η θερμοκρασία μειώνεται προκαλώντας την συσσωμάτωση ιόντων, ιόντων-μορίων και μορίων-μορίων¹²⁵. Για να γίνει αποδοτικότερος ο ιοντισμός έχουν αναπτυχθεί τεχνικές όπου με την βοήθεια αερίων διασπώνται τα συσσωματώματα. Έτσι σε μία τεχνική υπάρχει αέριο άζωτο στην περιοχή γύρω από το τριχοειδές (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) που βοηθά στην εξάτμιση του διαλύτη, καθώς επίσης και αέριο άζωτο υπό πίεση να απελευθερώνεται γύρω από την άκρη του τριχοειδούς (εκνεφωτικό αέριο, sheath gas) βοηθώντας κατά αυτό τον τρόπο την σχάση του κώνου¹³⁸.

Όπως προαναφέρθηκε, τα ιόντα που παράγονται στην αέρια φάση, συνήθως προϋπάρχουν στο διάλυμα και μέσω του διαχωρισμού των φορτίων στην επιφάνεια του διαλύματος καταλήγουν στην αέρια φάση. Όταν ο αναλύτης είναι φορτισμένος τότε μπορεί να αποτελεί μέρος του φορτίου που διαχωρίζεται κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού και κατά αυτό τον τρόπο να φτάνει στην αέρια φάση.

Όταν ο αναλύτης είναι πολικός και δεν φέρει κάποια βασική ή όξινη λειτουργική ομάδα τότε μπορεί να φορτιστεί μέσω σχηματισμού παραγώγων με κάποιο άλλο ιόν. Στην ουσία, αυτός ο τρόπος ιοντισμού του αναλύτη είναι μια ειδική περίπτωση μεθόδου διαχωρισμού φορτίων, εφόσον αυτό που γίνεται είναι η φόρτιση του αναλύτη μέσω σχηματισμού παραγώγων στο διάλυμα και έπειτα η μεταφορά αυτών των παραγώγων στην αέρια φάση μέσω της διαδικασίας του διαχωρισμού φορτίων. Έτσι ένα πολικό και ουδέτερο μόριο ή πολύ ασθενές οξύ, μπορεί να σχηματίσει ένα παράγωγο, αρνητικά φορτισμένο, με

ίοντα χλωρίου τα οποία προέρχονται από κάποιον χλωριωμένο διαλύτη, όπως το χλωροφόρμιο, παράγοντας ίοντα της μορφής $[M+Cl]^+$, όπου M ο αναλύτης¹³⁹. Στην περίπτωση που ο αναλύτης είναι πολικός και ουδέτερος ή ασθενής βάση και επιδιώκεται να φορτιστεί θετικά, τότε αυτό γίνεται με σχηματισμό παραγώγων του αναλύτη με θετικά ίοντα όπως νάτριο ή λίθιο, τα οποία προέρχονται από την εισαγωγή μικρής ποσότητας των αντίστοιχων αλάτων στο διάλυμα (ή από προσμίξεις), παράγοντας, για παράδειγμα ίοντα της μορφής $[M+Na]^+$ ^{140,141}.

Επειδή κατά τον ηλεκτροψεκασμό εκτός από τα ίοντα του αναλύτη παράγεται και ένα πλήθος άλλων ειδών, όπως τα συσσωματώματα μορίων καθώς και ουδέτερα μόρια του διαλύτη και του αναλύτη, είναι δυνατόν να συμβούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των ειδών¹⁴²⁻¹⁴⁵, αφού ο ηλεκτροψεκασμός γίνεται σε ατμοσφαιρική πίεση, και να επηρεάσουν το σήμα του αναλύτη. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι κατά κύριο λόγο αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων μεταξύ των ειδών που καταλήγουν στην αέρια φάση. Έτσι μόρια τα οποία είναι πρωτονιωμένα - και συνεπώς φορτισμένα - στο διάλυμα, όταν εισέλθουν στην αέρια φάση μπορούν να «δώσουν» το πρωτόνιο, δηλαδή το φορτίο τους σε μόρια του αναλύτη ή του διαλύτη τα οποία δεν είναι φορτισμένα στο διάλυμα και έχουν μεγαλύτερη βασικότητα στην αέρια φάση. Κατά αυτόν τον τρόπο ουδέτερα μόρια του αναλύτη που παράγονται από τα σταγονίδια μπορούν να φορτιστούν αποσπώντας πρωτόνιο από κάποιο άλλο είδος που παράγεται κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού και το οποίο είναι φορτισμένο, φέροντας σαν φορτίο πρωτόνιο.

Για να συμβεί κάτι τέτοιο θα πρέπει να παρατηρηθεί μία αντιστροφή στην βασικότητα των ενώσεων¹⁴⁶ στην αέρια φάση και αυτό μπορεί να γίνει διότι η βασικότητα των χημικών ενώσεων στην υγρή φάση δεν είναι απαραίτητο να είναι ίδια και στην αέρια φάση. Έτσι, ενώσεις με αυξημένη συγγένεια για πρωτόνια στην αέρια φάση μπορεί να έχουν χαμηλή βασικότητα στην υγρή φάση. Αυτό το φαινόμενο αφενός μπορεί να βοηθήσει τον ιοντισμό του αναλύτη, όταν αυτός έχει μεγαλύτερη συγγένεια για πρωτόνια στην αέρια φάση από τον διαλύτη, αφετέρου να παρεμποδίσει τον ιοντισμό του όταν ο αναλύτης έχει μικρότερη συγγένεια για πρωτόνια από τον διαλύτη και συνεπώς ο διαλύτης να αποσπά τα πρωτόνια από τον αναλύτη¹⁴⁴. Επίσης, θα πρέπει να διευκρινισθεί ότι η αντίδραση μεταφοράς πρωτονίου μπορεί να λάβει χώρα όχι μόνο μεταξύ μορίων διαλύτη-αναλύτη αλλά και μεταξύ όλων των ειδών των συσσωματωμάτων που παράγονται με μόρια του αναλύτη και με μόρια του διαλύτη.

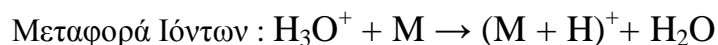
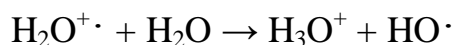
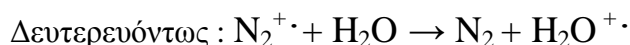
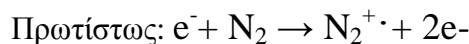
2.2.1.2. Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI)¹⁴⁷

Η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροσπασμό (ESI), που περιγράφεται στο προηγούμενο Κεφάλαιο 2.2.1.1, εφαρμόζεται για ιδιαίτερα πολικές και ιοντικές ενώσεις. Αντιθέτως, ο χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής-πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) εφαρμόζεται σε ενώσεις μη πολικές ή ημιπολικές και σχετικά μικρού μοριακού βάρους. Είναι μία διαφορετική διάταξη ιοντισμού στην οποία το ρεύμα του υγρού που εξέρχεται από μια στήλη HPLC διασκορπίζεται σε μικρά σταγονίδια με την βοήθεια θερμότητας και ενός φέροντος αερίου (αζώτο), όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.14. Η ουσιαστική διαφορά των δύο τεχνικών ιοντισμού εστιάζεται στον μηχανισμό παραγωγής σταγονιδίων από ένα ρεύμα υγρού καθώς και στο τρόπο ιοντισμού των προς ανάλυση ουσιών.



Σχήμα 1.14. Διάταξη χημικού ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης .

Στην τεχνική APCI, το ρεύμα υγρού που εξέρχεται από την HPLC (με ταχύτητα ροής να κυμαίνεται από 0.05-2 ml/min), θερμαίνεται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες (μεγαλύτερες από 400 °C), ενώ ταυτόχρονα ψεκάζεται με ρεύμα αζώτου. Το αερόλυμα που προκύπτει με αυτό τον τρόπο ιοντίζεται με την βοήθεια ενός ηλεκτροδίου (τύπου βελόνας). Έτσι τα μόρια ιοντίζονται αφού πρώτα μεταβούν στην αέρια φάση, σε αντίθεση με τον μηχανισμό ESI στον οποίο ο ιοντισμός πραγματοποιείται στην υγρή φάση του δείγματος. Το υψηλό δυναμικό που εφαρμόζεται, οδηγεί πρωτίστως στον ιοντισμό των μορίων του διαλύτη και του αερίου αζώτου και δευτερευόντως στον ιοντισμό των προς ανάλυση ουσιών. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε θετικό ιοντισμό μπορεί να είναι οι εξής:



Σε αρνητικό ιοντισμό δημιουργούνται ιόντα (M-H)⁻, έπειτα από απόσπαση πρωτονίων από ανιόντα υδροξυλίου.

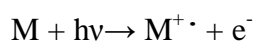
Από την εως τώρα περιγραφή γίνεται φανερό ότι η APCI τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί για ουσίες που είναι θερμικά σταθερές όπως ακριβώς συμβαίνει και με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτρόνια (Electron Impact, EI), με την διαφορά ότι η πρώτη χρησιμοποιείται και για πιο πολικές ενώσεις, γι'αυτό και συνδυάζεται με υγρή χρωματογραφία. Ακόμη, ο χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης είναι πιο «σκληρή» τεχνική από την ESI και χρησιμοποιείται σε ενώσεις με μοριακό βάρος κάτω των 2000 Da.

Το μειονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι το φάσμα μιας ένωσης που έχει ιοντιστεί με την τεχνική APCI μπορεί να περιέχει και σύμπλοκα ιόντα με συστατικά της κινητής φάσης όπως: $(M+NH_4)^+$ και $(M+CH_3COO)^-$. Τα ιόντα αυτά αρκετές φορές παρεμποδίζουν την ερμηνεία των φασμάτων μάζας και για αυτό το λόγο είναι ανεπιθύμητα.

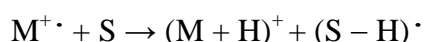
2.2.1.3. Φωτοϊοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (APPI)

Ο φωτοϊοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI) αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα (2000) και αποτελεί μία καινούρια τεχνική ιοντισμού συνδυαστικά με την χρήση υγρού χρωματογράφου-φασματομέτρου μάζας.¹⁴⁸ Ανήκει επίσης στις ήπιες τεχνικές ιοντισμού, όπου τα μόρια των ουσιών αλληλεπιδρούν με φωτόνια που εκπέμπονται από μία λάμπα κρυπτού ή ξένου. Η διαδικασία ιοντισμού στην τεχνική APPI επιτυγχάνεται με φωτόνια ενέργειας περίπου 10eV, και το αποτέλεσμα είναι να ιοντίζονται ενώσεις που έχουν ενέργειες ιοντισμού (EI) χαμηλότερες από την ενέργεια αυτή.

Αναλυτικά η διαδικασία ιοντισμού έχει ως εξής: το ρεύμα υγρού που εξέρχεται από την HPLC θερμαίνεται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες, ενώ ταυτόχρονα ψεκάζεται με ρεύμα αζώτου. Τα μόρια της προς ανάλυση ουσίας (M) εξαερώνονται και ταυτόχρονα ιοντίζονται με φωτόνια ενέργειας 10eV περίπου σύμφωνα με την εξής αντίδραση¹⁴⁸:



Παρουσία πρωτονιωμένων διαλυτών (S) μπορεί να παραχθούν και ιόντα $(M+H)^+$, ύστερα από απόσπαση πρωτονίων σύμφωνα με την αντίδραση¹⁴⁹:



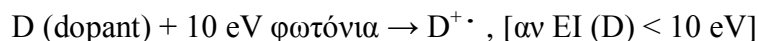
Το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη και το νερό, που συνήθως χρησιμοποιούνται ως διαλύτες στο σύστημα HPLC, έχουν μεγαλύτερες ενέργειες ιοντισμού από την ενέργεια των φωτονίων της λάμπας κρυπτού, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται εκλεκτικός ιοντισμός των προς ανάλυση ουσιών και όχι αύξηση σήματος του υποβάθρου λόγω ιοντισμού των διαλυτών (Σχήμα 1.15).

Ενέργεια φωτονίων λυχνίας Κρυπτού 10eV, 10,6 eV

<u>Ενέργειες ιοντισμού αναλυτών</u>	<u>Ενέργειες ιοντισμού διαλυτών</u>
Ανθρακένιο 7,4eV	Τολουόλιο 8,82eV
Φλουορανθένιο 7,8eV	Ακετόνη 9,70eV
Καφεΐνη 8,0eV	
4-Νιτροτολουόλιο 9,5eV	
	Μεθανόλη 10,85eV
	Ακετονιτρίλιο 12,19eV
	Νερό 12,61eV

Σχήμα 1.15. Ενέργειες ιοντισμού χαρακτηριστικών ενώσεων και διαλυτών¹²⁷

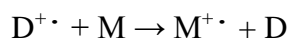
Προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητικότερος ιοντισμός των προς ανάλυση ενώσεων, η διαδικασία του φωτοϊοντισμού μπορεί να ενισχυθεί με την χρήση μίας ένωσης «ενισχυτή» (dopant) (dopant assisted APPI, DA-APPI)^{148,150-154}. Ο ενισχυτής (dopant) (D) μπορεί να δημιουργήσει εναλλακτικούς τρόπους ιοντισμού της προσδιοριζόμενης ένωσης ή ακόμα και να αυξήσει το ποσοστό ιοντισμού της. Παρουσία μίας τέτοιας ένωσης στο σύστημα APPI, η ένωση ενισχυτής ιοντίζεται σύμφωνα με την αντίδραση^{149,155}:



Στη συνέχεια το $D^{+\cdot}$ ιοντίζει την ουσία M μέσω μεταφοράς πρωτονίου αν η ουσία M είναι πιο ισχυρή βάση από το D:

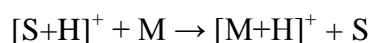


ή σύμφωνα με την αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου:

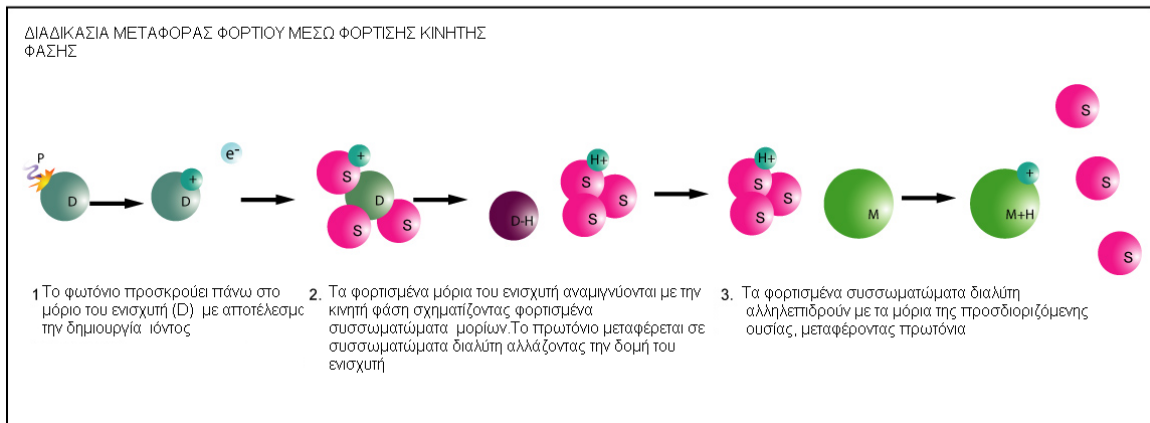
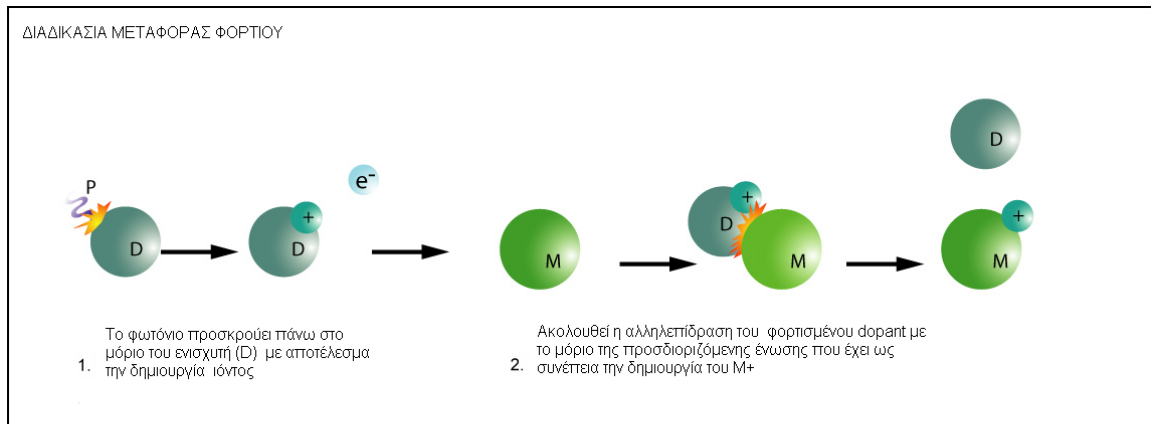


αν η ηλεκτρονιοσυγγένεια (proton affinity) του M είναι μικρότερη από την ηλεκτρονιοσυγγένεια του D.

Στη συνέχεια μπορεί τα μόρια ή τα συσσωματώματα του διαλύτη (S) να δράσουν ως ενδιάμεσα στις παραπάνω αντιδράσεις αφαιρώντας πρωτόνια από το μόριο ενισχυτή (D) τα οποία τα μεταφέρουν στις προς ανάλυση ουσίες, σύμφωνα με τις αντιδράσεις¹⁴⁹:



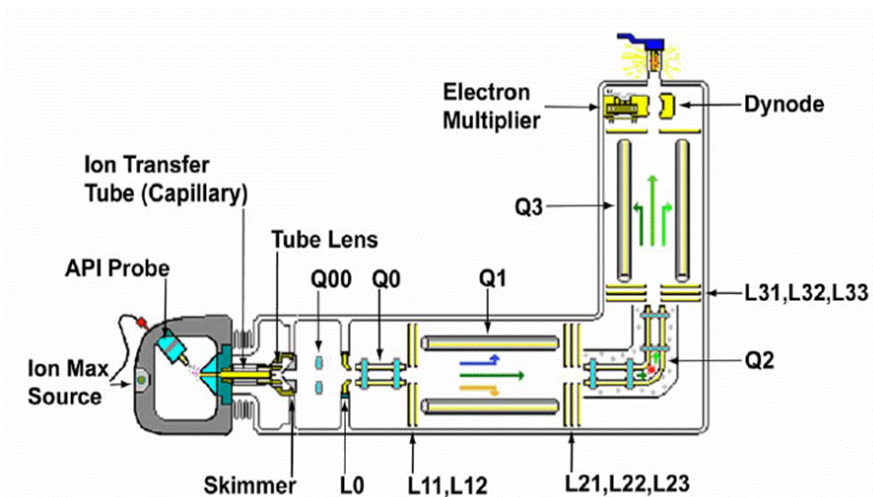
Η διαδικασία μεταφοράς φορτίου από τον «ενισχυτή» στην προσδιοριζόμενη ουσία παρουσιάζεται και στο Σχήμα 1.16.



Σχήμα 1.16. Διαδικασία μεταφοράς φορτίου από το «μόριο-ενισχυτή» στην προσδιοριζόμενη ένωση.

2.2.2 Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών σε σειρά (Tandem MS)^{126,127}

Η λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού και χημικού ιοντισμού πραγματοποιούνται σε ατμοσφαιρικές συνθήκες, αντιθέτως κάθε αναλυτής ιόντων, όπως είναι το σύστημα τριπλού τετραπόλου, λειτουργεί σε συνθήκες υψηλού κενού με συνέπεια να απαιτείται ένα σύστημα που να συνδέει αυτά τα δύο τμήματα του οργάνου και να μεταφέρει αποδοτικά τα ιόντα που παράγονται από την πηγή του ηλεκτροψεκασμού στο σύστημα τριπλού τετραπόλου όπου και αναλύονται. Αυτό το σύστημα μεταφοράς παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.17.



Σχήμα 1.17. Σύστημα μεταφοράς των ιόντων από την πηγή ιοντισμού στην ιοντική παγίδα

Το τριπλό τετράπολο είναι ένας συνδυασμός τριών τετραπόλων όπως φαίνεται και στο σχήμα. Τριπλά τετράπολα απαντώνται συχνότατα, για την εκμετάλλευση των πλεονεκτημάτων του τετραπόλου (ταχεία σάρωση, δυνατότητα εφαρμογής φασματομετρίας μαζών σε σειρά/Tandem MS). Όταν το τριπλό τετράπολο λειτουργεί ως απλός αναλυτής ρυθμίζεται έτσι ώστε τα δύο πρώτα τετράπολα να συνεισφέρουν μόνο στον εστιασμό της δέσμης των ιόντων και ο διαχωρισμός να γίνεται στο τρίτο τετράπολο.

Η μεγάλη χρησιμότητα του συστήματος έγκειται στη δυνατότητα MS-MS, όπου η θραυσματοποίηση πραγματοποιείται στο δεύτερο τετράπολο, συνήθως με αέριο αργό¹²⁶.

Για την ταυτοποίηση της δομής μιας ένωσης πολύ συχνά απαιτούνται από το Φασματόμετρο Μάζας περισσότερες πληροφορίες από τη μάζα του μοριακού ιόντος (δηλαδή το μοριακό βάρος της ένωσης). Για το λόγο αυτό είναι μεγάλης σημασίας η διάσπαση της ένωσης σε χαρακτηριστικά θραύσματα. Η αναγνώριση της ταυτότητας αυτών των θραυσμάτων μας επιτρέπει στη συνέχεια να έχουμε μια ασφαλέστερη αναγνώριση της δομής της αρχικής ένωσης. Η διάσπαση της μητρικής ένωσης γίνεται λόγω του περιβάλλοντος υψηλής ενέργειας μέσα στο οποίο κινούνται τα μόρια της αναλυόμενης ένωσης. Στις λεγόμενες "ήπιες" μεθόδους ιοντισμού που χαρακτηρίζονται από μικρό ποσοστό θραύσης και στις οποίες ανήκει ο ιοντισμός με ηλεκτροσπασμό, θα μπορούσε να επιτευχθεί υψηλό ποσοστό θραύσης εάν εφαρμοζόταν στην πηγή ιόντων υψηλότερη ενέργεια. Όμως αυτό δεν είναι το ζητούμενο. Το επιθυμητό είναι η διατήρηση του μοριακού ιόντος, η ανάλυση του και ο προσδιορισμός της μάζας του και στη συνέχεια η διάσπαση του σε θραύσματα και ο προσδιορισμός της μάζας αυτών.

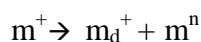
Για τους λόγους αυτούς έχουν αναπτυχθεί τεχνικές και όργανα στα οποία πραγματοποιούνται με την ακόλουθη σειρά οι εξής λειτουργίες:

- ο διαχωρισμός των μαζών των αναλυόμενων ενώσεων

- η απομόνωση της μάζας της ένωσης που μας ενδιαφέρει
- η διάσπαση της σε θραύσματα
- η σάρωση της μάζας των θραυσμάτων
- ο προσδιορισμός των μαζών των θραυσμάτων

Η τεχνική αυτή καλείται Φασματομετρία Μάζας σε σειρά (Tandem MS). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι οι ανιχνευτές ιοντικής παγίδας και τριπλού τετραπόλου (QQQ). Στην τελευταία περίπτωση στο πρώτο τετράπολο διαχωρίζονται τα ιόντα των αναλυόμενων ενώσεων. Το πρώτο τετράπολο λειτουργώντας ως φίλτρο μαζών εξουδετερώνει όλες τις άλλες μάζες, οπότε μόνο η επιλεγμένη μάζα εισέρχεται στο δεύτερο τετράπολο όπου και βομβαρδίζεται από ιόντα, φωτόνια, ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας (eV). Η συνηθέστερη τακτική είναι ο βομβαρδισμός των αναλυόμενων ενώσεων με άτομα He, Ar. Τα παραγόμενα θυγατρικά ιόντα διαχωρίζονται στο τρίτο τετράπολο και ανιχνεύονται στον ανιχνευτή.

Η πιο κοινή αντίδραση στο σύστημα MS-MS είναι η διάσπαση του μητρικού ιόντος σε θυγατρικό ιόν και ένα ουδέτερο μόριο:



Το μόριο m^n δεν ανιχνεύεται, αφού δεν έχει φορτίο, αλλά η μάζα του μπορεί να υπολογιστεί από τη διαφορά μαζών, $m^+ - m_d^+$. Η διάσπαση αυτή μπορεί να ανιχνευθεί με την επιλογή του ιόντος m^+ στο πρώτο τετράπολο και τη σάρωση των προϊόντων της διάσπασης στο τρίτο τετράπολο. Μπορεί επίσης να γίνει σάρωση των μητρικών ιόντων στο πρώτο τετράπολο στην περίπτωση που δύο διαφορετικά μητρικά ιόντα δίνουν το ίδιο θυγατρικό ιόν. Τέλος μπορούν και τα δύο τετράπολα (πρώτο και τρίτο στη σειρά) να επιλέγουν συγκεκριμένες μάζες για παρακολούθηση αντιδράσεων στην αέρια φάση (Selective Reaction Monitoring, SRM). Η χρήση των δυνατοτήτων αυτών έχει μεγάλη σημασία για την ταυτοποίηση ενώσεων σε άγνωστα περίπλοκα δείγματα, κυρίως βιολογικά δείγματα ή περιβαλλοντικά δείγματα όπου οι αναλυόμενες ενώσεις βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτό συμβαίνει γιατί σε ορισμένες περιπτώσεις και κυρίως σε φάσματα ιοντισμού ηλεκτρονίων το σήμα κάποιων θραυσμάτων είναι πολύ μεγαλύτερο από το σήμα της μητρικής ένωσης. Επιπλέον, η συνδυασμένη γνώση του μοριακού βάρους και της μάζας των θραυσμάτων επιτρέπει την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό ενώσεων που η ανάλυση τους παρεμποδίζεται από άλλες ενώσεις ή παρουσιάζει πολύ μικρή απόκριση.

Κεφάλαιο 3. Σύγχρονες μέθοδοι εκχύλισης οργανικών ρύπων

Εισαγωγή

Η αξιόπιστη ανάλυση οργανικών ενώσεων σε ίχνη προϋποθέτει ποσοτική εξαγωγή του αναλυόμενου συστατικού από το υπόστρωμα του δείγματος. Ο γενικός αντικειμενικός σκοπός μίας μεθόδου εκχύλισης οργανικών ενώσεων είναι να διαχωριστεί η προσδιοριζόμενη ουσία από το δείγμα και στην συνέχεια να κατανεμηθεί σε ένα νέο υπόστρωμα, το οποίο θα είναι πιο συμβατό με την υπόλοιπη πορεία μιας αναλυτικής διεργασίας. Οι τεχνικές που αναφέρονται συχνά στη βιβλιογραφία είναι η τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid Liquid Extraction, LLE), η τεχνική της εκδίωξης και παγίδευσης (purge and trap), η τεχνική της απόσταξης μεθ' υδρατμών (steam distillation), η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) και η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME). Η τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης θεωρείται παραδοσιακή αναλυτική μέθοδος εκχύλισης και στηρίζεται στην κατανομή μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων, της οργανικής και της υδατικής. Η διαδικασία περιλαμβάνει απλή ανάμιξη δύο στιβάδων εντός κατάλληλης συσκευής¹⁵⁶. Η τεχνική αυτή παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα αφού χρησιμοποιούνται μεγάλοι όγκοι οργανικών διαλυτών, γεγονός ανεπιθύμητο για οικονομικούς και περιβαλλοντικούς λόγους. Επιπλέον συχνά εμφανίζονται προβλήματα επιμολύνσεων. Η τεχνική της εκδίωξης και παγίδευσης¹⁵⁷ στηρίζεται στην προσρόφιση των οργανικών ουσιών σε στερεό προσροφητικό υλικό και στη συνέχεια την εκρόφησή τους με κατάλληλο φέρον αέριο. Ενώ με την τεχνική της απόσταξης μεθ' υδρατμών¹⁵⁸, αποστάζονται και άρα διαχωρίζονται, ουσίες που είναι ευαίσθητες στην χρήση υψηλών θερμοκρασιών. Και οι δύο προαναφερθείσες τεχνικές απαιτούν πολύπλοκο εργαστηριακό εξοπλισμό και είναι δύσκολο να εφαρμοστούν για αναλύσεις ρουτίνας αφού απαιτούν πολλά και κοπιαστικά στάδια εκχύλισης.⁶⁶

Σε αυτή τη διατριβή αναπτύχθηκαν αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού οργανικών ρύπων με βάση τις σύγχρονες τεχνικές εκχύλισης στερεάς φάσης και μικροεκχύλισης στερεάς φάσης. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται βασικά χαρακτηριστικά των δύο αυτών τεχνικών εκχύλισης.

3.1. Η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης οργανικών ενώσεων από πολύπλοκα δείγματα τροφίμων, νερού, εδάφους, αίματος, ούρων, αέρα κ.α., βασιζόμενη στις φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων που περιέχονται στο δείγμα. Η SPE είναι μία τεχνική προετοιμασίας

δείγματος με ολοένα αυξανόμενες εφαρμογές εξαιτίας των βελτιωμένων υλικών που αναπτύσσονται. Με την τεχνική αυτή πραγματοποιείται απομόνωση συγκεκριμένων οργανικών ενώσεων από ένα επιβαρυμένο δείγμα που περιέχει διάφορες άλλες ενώσεις - παρεμποδιστές. Ταυτόχρονα με τον καθαρισμό του δείγματος λαμβάνει χώρα και προσυγκέντρωσή του, με αποτέλεσμα ο χρωματογραφικός διαχωρισμός να γίνεται ευκολότερα και έτσι η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός να γίνονται με μεγαλύτερη ακρίβεια¹⁵⁹.

Η αρχή της τεχνικής αυτής περιλαμβάνει κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε δύο φάσεις, μία στερεή (στατική φάση) που είναι το προσροφητικό υλικό και μία υγρή (κινητή φάση) που είναι το υγρό υπόστρωμα στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες οι προς ανάλυση ουσίες. Η κατανομή αυτή βασίζεται στη χημική συγγένεια που έχει η κινητή φάση με τη στατική, μέσα από την οποία θα διέλθει. Το δείγμα κατά την διέλευσή του μέσα από το προσροφητικό υλικό είτε συλλέγεται, γιατί περιέχει τις ενώσεις που ενδιαφέρουν ενώ οι υπόλοιπες έχουν κατακρατηθεί στο στερεό, είτε απορρίπτεται γιατί αυτές που ενδιαφέρουν έχουν κατακρατηθεί πάνω στο προσροφητικό υλικό και απορρίπτονται οι υπόλοιπες. Εάν οι επιθυμητοί αναλύτες είναι προσκολλημένοι στη στατική φάση τότε απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο έκπλυσής τους από αυτήν με τον κατάλληλο διαλύτη. Έτσι, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ενώσεων που ενδιαφέρουν από όλες αυτές που περιέχει το υγρό δείγμα.

Υπάρχει μεγάλη ποικιλία προσροφητικών υλικών και καθένα από αυτά είναι κατάλληλο να διαχωρίσει συγκεκριμένους αναλύτες ανάλογα με τις χημικές ιδιότητές τους. Οι περισσότερες στατικές φάσεις είναι προσδεμένη πηκτική πυριτίου (bonded silica gel) με κάποιες υδροξυλομάδες να έχουν αντικατασταθεί από άλλες ομάδες όπως αλκύλ- ή αρυλ-ομάδες, αμινομάδες κ.α. Έτσι, στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού υπάρχουν ενεργά κέντρα ικανά να αλληλεπιδράσουν με τα μόρια των οργανικών ενώσεων που βρίσκονται στη κινητή φάση. Η επιτυχία στο διαχωρισμό στηρίζεται στις προσροφητικές ιδιότητες της στατικής φάσης όπως την ενεργό επιφάνεια, το πορώδες και τη χημική σύστασή της. Τα υλικά αυτά διαχωρίζονται σε τρεις κυρίως κατηγορίες α) υλικά αντίστροφης προσδεμένης φάσης (reversed phase) β) κανονικής φάσης (normal phase) γ) υλικά ιονανταλλαγής είτε ανιόντων είτε κατιόντων (anion exchange, cation exchange)¹⁶⁰.

Υλικά αντίστροφης προσδεμένης φάσης SPE

Ο διαχωρισμός των αναλυτών με χρήση υλικών αντίστροφης προσδεμένης φάσης στηρίζεται στην πολικότητά τους. Το δείγμα, η κινητή φάση είναι πολική ή μέσης πολικότητας συνήθως υδατική και η στατική είναι άπολη. Οι αναλύτες είναι άπολοι ή μέσης πολικότητας και κατακρατούνται από τέτοιου είδους στατική φάση. Η έκπλυσή τους γίνεται με ξέπλυμα του προσροφητικού υλικού με κάποιο μη πολικό διαλύτη ο οποίος εξουδετερώνει τις αλληλεπιδράσεις της στατικής φάσης με τους αναλύτες. Τα υλικά που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι χημικά τροποποιημένη σίλικα (πυριτία SiO_2) με αλκύλ- ή αρυλ-ομάδες

που έχουν προσδεθεί σε αυτήν και την καθιστούν υδρόφοβη. Η κατακράτηση των αναλυτών από το πολικό δείγμα πάνω σε τέτοια υλικά οφείλεται σε δεσμούς άνθρακα – υδρογόνου μεταξύ του αναλύτη και των υδρόφοβων ομάδων που έχουν προσδεθεί στη σίλικα. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις οφείλονται σε δυνάμεις van der Waals.

Η χρήση πολυμερών υλικών βοηθά στην πληρέστερη κάλυψη της πυριτικής επιφάνειας και στην χωρητικότητα της στήλης (μέγιστη ποσότητα κατακρατούμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους υλικού). Τα πολυμερή υλικά είναι ανθεκτικότερα σε ακραίες τιμές του pH και για αυτόν τον λόγο είναι περισσότερο κατάλληλα σε περιβαλλοντικές εφαρμογές για τον διαχωρισμό οργανικών ενώσεων από οξινισμένα υδατικά δείγματα. Όλα τα υλικά τα οποία βασίζονται στην πυριτία μετά τη διαδικασία της σιλανοποίησης εξακολουθούν να περιέχουν έστω και μικρό ποσοστό ελεύθερων ομάδων υδροξυλίου (σιλανόλης) οι οποίες δρουν ως δευτερεύουσες θέσεις αλληλεπίδρασης. Αυτές οι δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι χρήσιμες για τον διαχωρισμό ή την κατακράτηση ισχυρά πολικών ουσιών ή προσμίξεων, αλλά επίσης μπορεί να προκαλέσουν το ανεπιθύμητο αποτέλεσμα της μη αντιστρεπτής δέσμευσης της προσδιοριζόμενης ουσίας.

Άλλα υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται στην SPE αντίστροφης φάσης είναι ανθρακούχα υλικά, καθώς και πολυμερή υλικά τα οποία συνδέονται με το πυριτικό υπόστρωμα. Τα ανθρακούχα υλικά αποτελούνται από μη πορώδη γραφίτη ο οποίος παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα σε πολικές και μη πολικές οργανικές ενώσεις οι οποίες βρίσκονται σε πολικές ή μη πολικές μήτρες. Η επιφάνεια του γραφίτη άνθρακα αποτελείται από άτομα C τα οποία είναι διατεταγμένα σε δομές εξαγωνικού δακτυλίου διασυνδεδεμένες μεταξύ τους. Η δομή εξαγωνικού δακτυλίου παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα προς επίπεδες αρωματικές ενώσεις, μόρια με αντίστοιχη δομή δακτυλίου καθώς και προς ανθρακικές αλυσίδες οι οποίες παρουσιάζουν τάση ταυτόχρονης πρόσδεσης σε πολλά σημεία της επιφάνειας. Η κατακράτηση των προσδιοριζόμενων συστατικών βασίζεται κυρίως στη δομή τους (μέγεθος και δομή), παρά στην ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δραστικών ομάδων του αναλύτη με την επιφάνεια του προσροφητικού. Η έκλυση στην περίπτωση αυτή πραγματοποιείται με διαλύτες μέσης πολικότητας ή μη πολικούς.

Αντί πυριτίας είναι εξίσου συνηθισμένη η χρήση πολυμερών υλικών ως υποστρωμάτων στήριξης των χαρακτηριστικών ομάδων κατά την SPE αντίστροφης φάσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το συμπολυμερές στυρολίου/διβινυλοβενζολίου το οποίο χρησιμοποιείται για την κατακράτηση υδρόφοβων ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν μερικώς υδρόφιλο χαρακτήρα και ιδιαίτερα για αρωματικές οργανικές ενώσεις. Τυπική εφαρμογή αποτελεί η κατακράτηση των φαινολών οι οποίες κατακρατούνται δύσκολα σε χημικώς τροποποιημένη πυριτία C-18 σε συνθήκες αντίστροφης φάσης κυρίως λόγω της μεγαλύτερης διαλυτότητά τους στο νερό. Από αυτήν παραλαμβάνονται εύκολα με

οργανικούς διαλύτες. Η έκλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαλυτών μέσης πολικότητας ή μη πολικών, επειδή το πολυμερές πληρωτικό υλικό είναι σταθερό σχεδόν σε κάθε σύστημα διαλύτη.

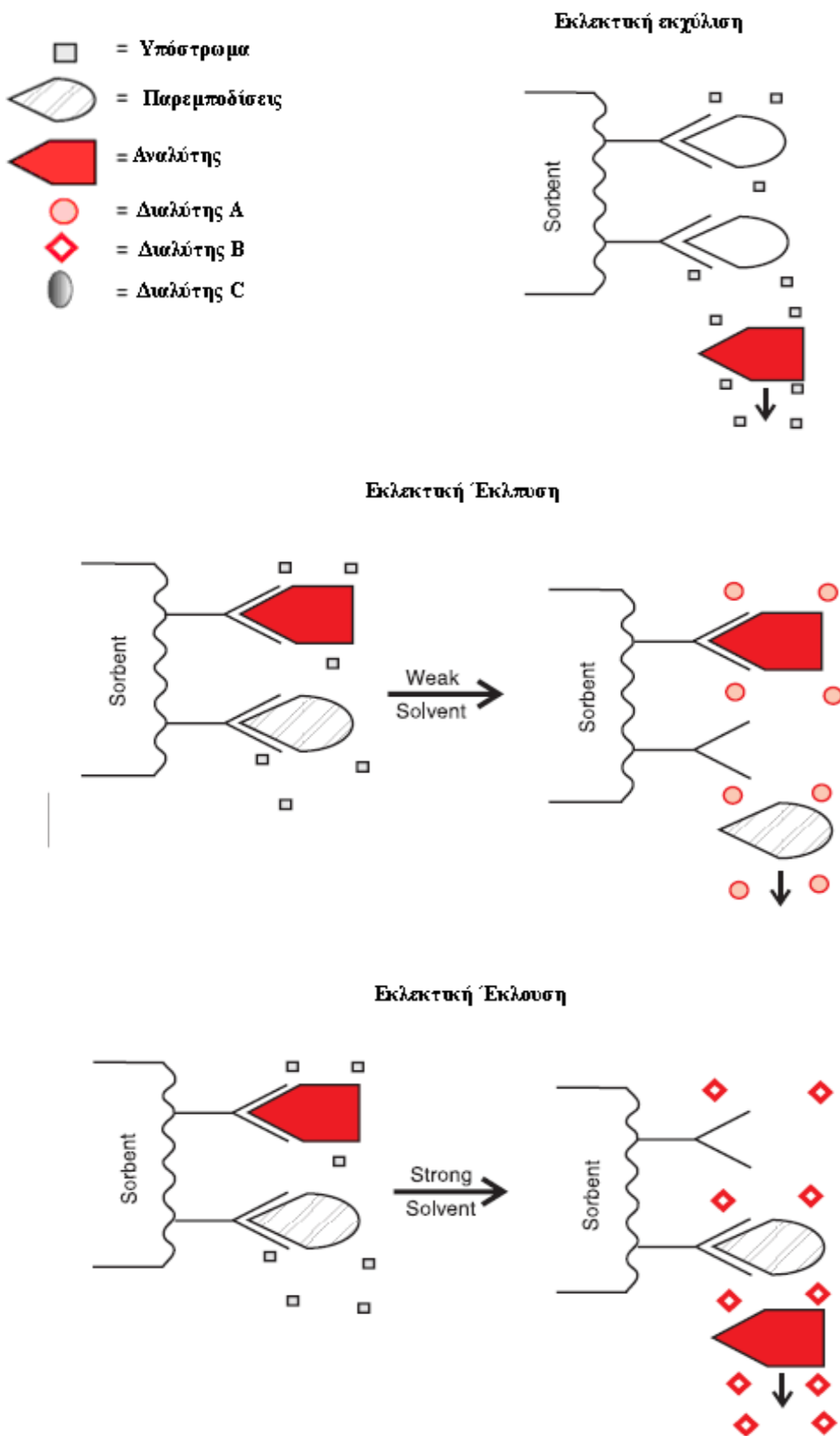
Υλικά κανονικής φάσης SPE

Η SPE που χρησιμοποιεί υλικά κανονικής φάσης αφορά πολικούς αναλύτες και άπολα ή μέσης πολικότητας υποστρώματα (π.χ. ακετόνη, χλωριωμένοι διαλύτες, εξάνιο) ενώ η στατική φάση είναι πολική. Τα υλικά κανονικής φάσης είναι προσδεμένη πηκτή πυριτίου (bonded silica gel) τροποποιημένη με κάποιες πολικές ομάδες στην επιφάνεια όπως διόλες, κυανοομάδες, αμινομάδες. Τα υλικά αυτά είναι πιο υδρόφιλα συγκρινόμενα με της αντίστροφης φάσης. Τέτοια είναι συμπολυμερές στυρένιο-διβινυλοβενζόλιο, διβινυλοβενζόλιο-βινυλοπυρρολιδίνη, πολυαιθυλο-βίνυλο-βενζόλιο, Floricil κ.α. Η κατακράτηση του αναλύτη πάνω σε τέτοια υλικά οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολικών ομάδων του αναλύτη και των πολικών ομάδων της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού. Οι δεσμοί αυτοί είναι κυρίως υδρογόνου, δεσμοί π-π, διπόλου-διπόλου. Οι αναλύτες που κατακρατούνται με αυτό το μηχανισμό εκλούνται με κάποιο διαλύτη που να μπορεί να διασπάσει τους δεσμούς αυτούς συνήθως μεγαλύτερης πολικότητας από αυτήν του δείγματος.

Η SPE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των ενώσεων που ενδιαφέρουν (αναλύτες) με τρεις δυνατούς τρόπους.

- Εκλεκτική εκχύλιση. Το προσροφητικό υλικό κατακρατά από το δείγμα τις ενώσεις που έχουμε επιλέξει είτε τις ενώσεις που ενδιαφέρουν, είτε τους παρεμποδιστές. Οπότε με έκλυση είτε συλλέγονται οι αναλύτες, είτε απορρίπτονται οι παρεμποδιστές.
- Εκλεκτική έκπλυση. Οι ενώσεις που ενδιαφέρουν και οι παρεμποδιστές κατακρατούνται στο προσροφητικό υλικό όταν το διαπερνά το δείγμα. Οι παρεμποδιστές εκλούνται από αυτό με κατάλληλη έκπλυση ώστε να απομακρυνθούν αυτές, αλλά να παραμείνουν οι αναλύτες προσκολλημένοι.
- Εκλεκτική έκλυση. Οι αναλύτες που μας ενδιαφέρουν εκλούνται εκλεκτικά με κατάλληλο διαλύτη αλλά εξακολουθούν να παραμένουν προσκολλημένοι στο προσροφητικό υλικό οι παρεμποδιστές.

Στο Σχήμα 1.18 απεικονίζονται σχηματικά οι τρεις τρόποι διαχωρισμού των ενώσεων που θέλουμε να απομονωθούν.

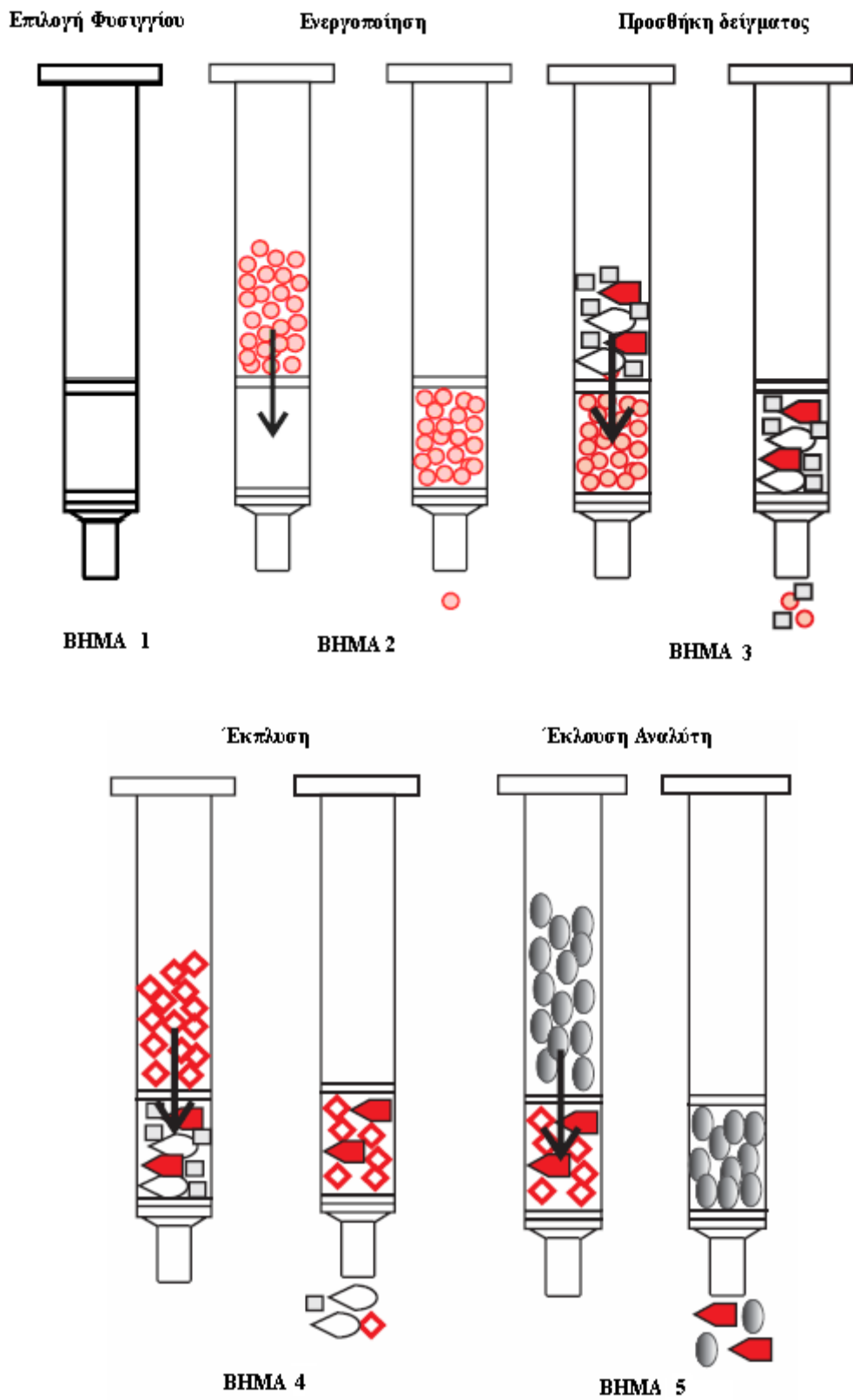


Σχήμα 1.18. Δυνατότητες διαχωρισμού αναλυτών.¹⁶¹

Η τυπική διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια.

- Αρχικά, το φυσιγγίο ενεργοποιείται (conditioning) με ένα μη πολικό ή ελαφρά πολικό διαλύτη, ο οποίος διαβρέχει τη silica. Στόχος του σταδίου αυτού είναι η εξασφάλιση της μέγιστης επιφάνειας επαφής της υγρής φάσης με αυτήν της στερεάς. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι όσο το δυνατόν παρόμοιας πολικότητας, ιοντικής ισχύος και pH με το δείγμα.
- Στη συνέχεια προστίθεται υπερκάθαρο νερό ή κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα ίδιας σύστασης με αυτή του δείγματος, ώστε να επέλθει εξισορρόπηση (equilibration).
- Μετά διαβιβάζεται το δείγμα (loading) μέσω του φυσιγγίου και κάτω διαπερνά το προσροφητικό υλικό οι αναλύτες αλληλεπιδρούν με αυτό και κατακρατούνται ενώ ο διαλύτης, τα άλατα και άλλες ενώσεις που περιέχει το δείγμα και δεν μας ενδιαφέρουν το διαπερνούν και απομακρύνονται.
- Στη συνέχεια, ακολουθεί έκπλυση του προσροφητικού υλικού με κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα ή κάποιο διαλύτη ώστε να αποδεσμευτούν τυχόν ανεπιθύμητες ουσίες που έχουν κατακρατηθεί.
- Επόμενο στάδιο μπορεί να είναι η ξήρανση του φυσιγγίου με διαβίβαση αδρανούς αερίου. Η απομάκρυνση του εναπομείναντος νερού στη στερεά φάση μετά τη διέλευση του δείγματος απλοποιεί το τελικό στάδιο έκλουσης, ώστε να μην είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός του παραλαμβανόμενου εκλούσματος. Έτσι, η μετάβαση από την υδατική φάση σε μία οργανική μη αναμίξιμη με το νερό επιτυγχάνεται με την ξήρανση.
- Τελικά γίνεται εκλεκτική εκρόφηση και συλλογή των επιθυμητών ενώσεων από το προσροφητικό υλικό (elution) με διαλύτη κατάλληλης πολικότητας.

Στο Σχήμα 1.19 φαίνονται σχηματικά τα βασικά στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης.



Σχήμα 1.19. Βασικά στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης¹⁶¹

Η SPE όμως παρουσιάζει και διάφορα προβλήματα όπως πιθανή υπερπλήρωση της στήλης από υψηλή περιεκτικότητα προσμίξεων στο άγνωστο δείγμα, απώλεια αναλυτών εξαιτίας φραγμού των πόρων κ.α.. Ανταγωνιστικές διαδικασίες συμβαίνουν μεταξύ των προς ανάλυση ενώσεων και των προσμίξεων του δείγματος, μειώνοντας την απόδοση της τεχνικής. Η χρήση μιας ακόμη νεότερης τεχνικής, της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (solid-phase microextraction), φαίνεται ότι ξεπερνά τέτοιου είδους παρεμποδίσεις και εμφανίζει ταυτόχρονα πολλά πλεονεκτήματα.

3.2. Τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME)

3.2.1. Εισαγωγή

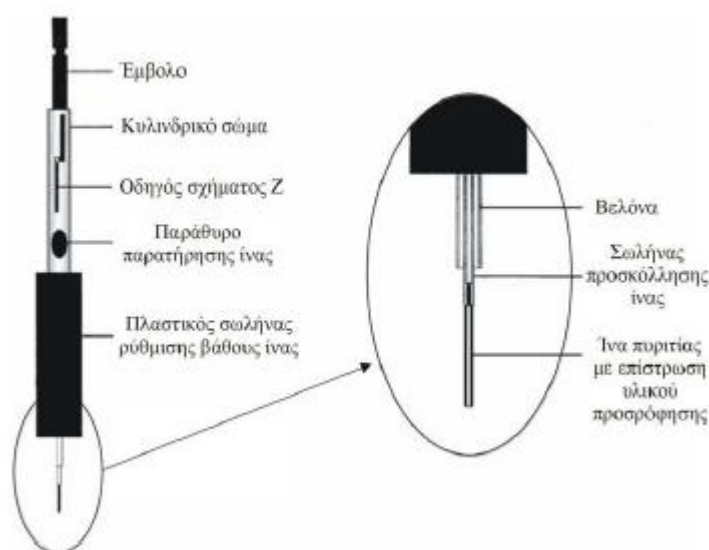
Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME) είναι μια απλή, αποτελεσματική μέθοδος προσυγκέντρωσης αναλυτών, η οποία εφευρέθηκε από τον Pawliszyn το 1990¹⁶². Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε για να καλύψει την ανάγκη ταχείας δειγματοληψίας και προετοιμασίας δείγματος, τόσο στο εργαστήριο όσο και στον χώρο δειγματοληψίας. Έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών διαχωρισμού διότι συνδυάζει δειγματοληψία, προετοιμασία δείγματος και άμεση μεταφορά του αναλύτη σε ένα κλασικό σύστημα αέριας- ή υγρής-χρωματογραφίας, ελαχιστοποιώντας την απώλεια του αναλύτη λόγω των πολυσταδιακών διεργασιών. Η τεχνική αυτή έχει βρει πολλές εφαρμογές τα τελευταία χρόνια, αντικαθιστώντας άλλες μεθόδους προσυγκέντρωσης όπως την υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) και την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), αφού ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματά της είναι ότι δεν γίνεται χρήση οργανικών διαλυτών. Όλα τα βήματα μιας συμβατικής μεθόδου όπως εκχύλιση, προσυγκέντρωση, παραγωγοποίηση και μεταφορά στο χρωματογράφο περιλαμβάνονται σε ένα βήμα, με αποτέλεσμα να καθιστούν την τεχνική αυτή σχετικά απλή¹⁶³.

Κάποια από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:

- Δεν απαιτείται η χρήση διαλυτών
- Είναι οικονομική, απλή και γρήγορη
- Παρέχει σχετικά καθαρά εκχυλίσματα και είναι ιδανική για GC/MS
- Μπορεί να συνδυαστεί με HPLC/MS
- Παρέχει γραμμικά αποτελέσματα για ευρύ φάσμα ενώσεων

Η συσκευή της τεχνικής SPME εξελίχθηκε στη σημερινή μορφή της που φαίνεται και στο Σχήμα 1.20 Αποτελείται από ένα πλαστικό έμβολο με το οποίο ρυθμίζεται η θέση της ίνας, ένα μεταλλικό κυλινδρικό σώμα με οδηγό σχισμής σχήματος Z, που καθορίζει τις θέσεις του εμβόλου, ένα “παράθυρο” παρατήρησης για επιβεβαίωση του χρώματος-είδους

της ίνας, ένα πλαστικό κύλινδρο ρύθμισης του βάθους εισχώρησης της βελόνας και τέλος την ίνα εντός της βελόνας.



Σχήμα 1.20. Συσκευή μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) ¹⁶³

3.2.2 Αρχή της μεθόδου

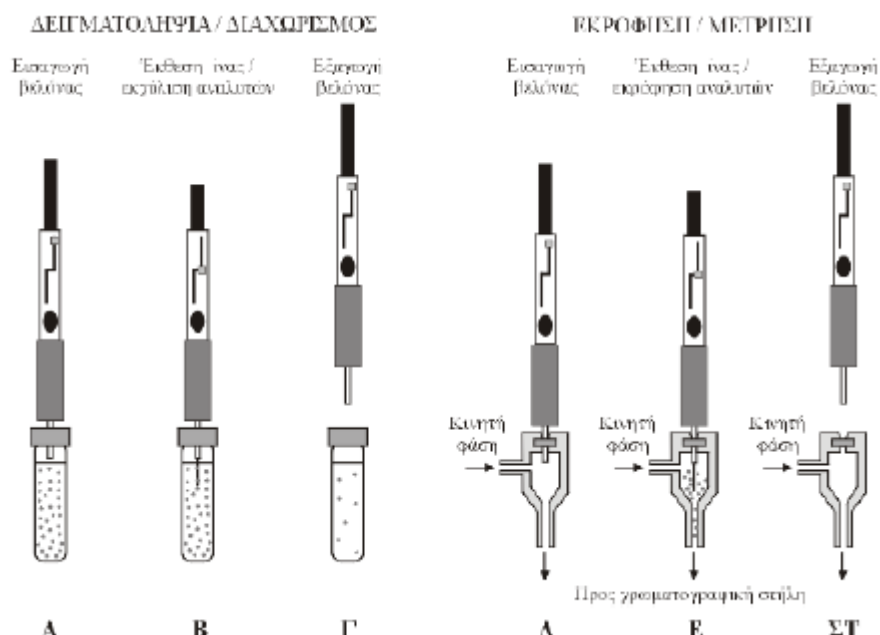
Πρόκειται για μια διαδικασία δύο σταδίων που περιλαμβάνει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των αναλυτών από τη μήτρα των δειγμάτων. Στο πρώτο στάδιο, μια ίνα τετηγμένης πυριτίας (SiO_2) επικαλυμμένη με μια στατική φάση (επίστρωση, coating) από πολυμερές υλικό, εκτίθεται στη μήτρα του δείγματος (υγρή φάση ή εναέριο υπερκείμενο χώρο) και ο αναλύτης κατανέμεται μεταξύ της μήτρας και του πολυμερούς υλικού της στατικής φάσης. Στο δεύτερο στάδιο, η ίνα με τους αναλύτες μεταφέρεται στον εισαγωγέα του αναλυτικού οργάνου για εκρόφιση, διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Σημαντικό στοιχείο είναι ότι δεν απαιτείται ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας του πολυμερούς υλικού ¹⁶⁴.

Στην τεχνική αυτή υπάρχουν δύο στάδια: α) Το στάδιο της **δειγματοληψίας/διαχωρισμού** και β) το στάδιο της **εκρόφησης/μέτρησης**.

Κατά το στάδιο της **δειγματοληψίας/διαχωρισμού** αρχικά η ίνα βρίσκεται μέσα στη βελόνα για μηχανική προστασία (Σχήμα 1.21A), στη συνέχεια η βελόνα (με την ίνα στο εσωτερικό της) διαπερνά το ελαστικό διάφραγμα-πώμα (septum) (συνήθως από σιλκόνη) του φιαλιδίου με το δείγμα, ακολουθεί κίνηση του εμβόλου προς τα κάτω και η ίνα εξάγεται από τη βελόνα και βυθίζεται στο διάλυμα για δειγματοληψία/ διαχωρισμό μη πτητικών ουσιών ή παραμένει στην εναέρια υπερκείμενη φάση (headspace) για δειγματοληψία/ διαχωρισμό πτητικών ουσιών για ορισμένο χρονικό διάστημα (Σχήμα 1.21B). Μετά το πέρας

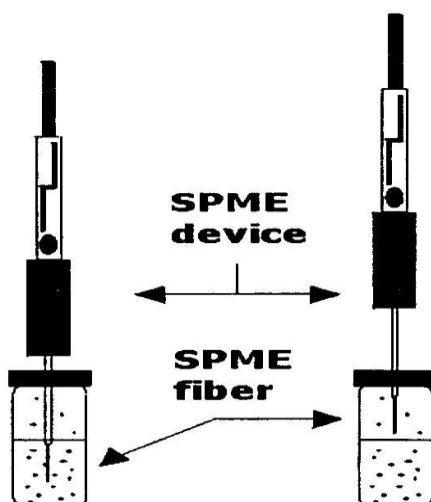
του καθορισμένου χρόνου δειγματοληψίας η ίνα επανεισάγεται στη βελόνα για προστασία, με κίνηση του εμβόλου προς τα επάνω και η βελόνα εξέρχεται από το φιαλίδιο (Σχήμα 1.21Γ).

Κατά το στάδιο της **εκρόφησης/μέτρησης** η βελόνα με την ίνα στο εσωτερικό της διαπερνά το ελαστικό διάφραγμα (septum) του εισαγωγέα δείγματος (Σχήμα 1.21Δ) του αεριο- ή υγρο-χρωματογράφου και στη συνέχεια εξάγεται η ίνα στο εσωτερικό του εισαγωγέα (Σχήμα 1.21Ε), οπότε πραγματοποιείται εκρόφηση των αναλυτών για συγκεκριμένο χρόνο. Τέλος, η ίνα εισέρχεται πάλι εντός της βελόνας και εξάγεται από τον εισαγωγέα του αεριο- ή υγρο-χρωματογράφου (Σχήμα 1.21ΣΤ). Οι αναλύτες παρασύρονται από την κινητή φάση προς τη χρωματογραφική στήλη για χρωματογραφικό διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Μετά την εξαγωγή της από τον εισαγωγέα, η ίνα είναι έτοιμη για την επόμενη δειγματοληψία.



Σχήμα 1.21. Διαδικασία δειγματοληψίας με την τεχνική SPME: Στάδιο δειγματοληψίας / διαχωρισμού: (Α) η βελόνα διαπερνά το πλαστικό διάφραγμα, (Β) μεταφορά των αναλυτών στην ίνα και (Γ) προστασία της ίνας εντός της βελόνας και απόσυρσή της από το φιαλίδιο. Στάδιο εκρόφησης/μέτρησης (με αεριο- ή υγρο-χρωματογράφο): (Δ) η βελόνα διαπερνά το πλαστικό διάφραγμα του εισαγωγέα δείγματος του χρωματογράφου, (Ε) οι αναλύτες εκροφούνται από την ίνα και παρασύρονται από την κινητή φάση προς τη χρωματογραφική στήλη (για διαχωρισμό και στη συνέχεια ανίχνευση/μέτρηση) και (ΣΤ) εξαγωγή της βελόνας από τον εισαγωγέα δείγματος

Η εκχύλιση με την τεχνική SPME βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της υδατικής ή εναέριας υπερκείμενης φάσης του δείγματος και της στατικής φάσης του πολυμερούς (Σχήμα 1.22).

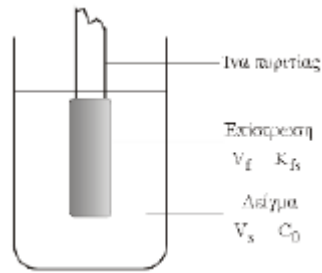


Σχήμα 1.22. Τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης από την υγρή φάση (SPME) ή από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος (HS-SPME).

Τυπικά η εκχύλιση με την τεχνική SPME θεωρείται ότι τελειώνει όταν η συγκέντρωση του αναλύτη έχει φτάσει σε ισορροπία μεταξύ της μήτρας του δείγματος και του πολυμερούς της ίνας. Αυτό σημαίνει ότι όταν επέλθει ισορροπία, το ποσό του αναλύτη που εκχυλίζεται είναι σταθερό, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και ανεξάρτητο του επιπλέον χρόνου εκχύλισης. Οι συνθήκες ισορροπίας έχουν μελετηθεί και η δυναμική της απορρόφησης περιγράφεται μαθηματικά από την παρακάτω σχέση¹⁶⁵:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s}{K_{fs} V_f + V_s} C_o$$

όπου, n είναι τα γραμμομόρια του αναλύτη που προσροφούνται από τη στατική φάση, K_{fs} ο συντελεστής κατανομής μεταξύ της υδατικής και στατικής φάσης, V_s και V_f είναι ο όγκος του δείγματος και της ίνας αντίστοιχα και C_o είναι η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη.



Σχήμα 1.23. Μικροεκχύλιση με την τεχνική SPME (όπου K_{fs} ο συντελεστής κατανομής μεταξύ της υδατικής και στατικής φάσης, V_s και V_f είναι ο όγκος του δείγματος και της ίνας αντίστοιχα και C_0 είναι η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο διάλυμα).

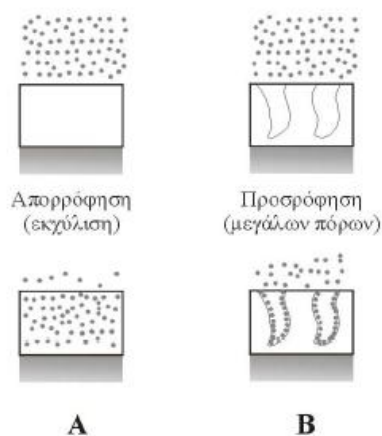
Η εξίσωση αυτή αναφέρεται κυρίως σε υγρά περιβλήματα ινών, όπως το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS), αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεές επιστρώσεις για μικρές όμως συγκεντρώσεις αναλυτών, ώστε να μην επέλθει κορεσμός της πορώδους επίστρωσης. Επίσης προϋποθέτει ότι το διάλυμα είναι ομοιογενές και ότι δεν υπάρχει διαφυγή αναλυτών στην αέρια φάση. Επιπλέον, επειδή ο όγκος του διαλύματος είναι πολύ μεγάλος σε σχέση με τη χωρητικότητα της ίνας ($V_s \gg K_{fs} \cdot V_f$), η προηγούμενη εξίσωση μπορεί να απλοποιηθεί ως εξής:

$$n = K_{fs} V_f C_0$$

Από την τελευταία εξίσωση συμπεραίνεται ότι η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται είναι ανεξάρτητη του όγκου του δείγματος. Πρακτικά, αυτό είναι πολύ χρήσιμο διότι δεν είναι απαραίτητο να συλλέγεται συγκεκριμένος όγκος για ανάλυση αφού η ίνα μπορεί να εκτεθεί κατευθείαν στον αέρα, νερό, ατμό κ.λπ. και η ποσότητα του αναλύτη που θα εκχυλιστεί θα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της μήτρας χωρίς να μας ενδιαφέρει ο όγκος του δείγματος. Έτσι, όταν καταργείται ουσιαστικά το στάδιο της δειγματοληψίας η αναλυτική διαδικασία επιταχύνεται και μηδενίζονται τα λάθη που έχουν σχέση με την απώλεια του αναλύτη μέσω αποσύνθεσης ή προσρόφησής του στα τοιχώματα του δοχείου αποθήκευσης.

Η ικανότητα εκχύλισης της SPME εξαρτάται από:

- τον τύπο της ίνας
- τον χρόνο δειγματοληψίας και εκρόφησης
- τη θερμοκρασία δειγματοληψίας και εκρόφησης
- την ανάδευση του δείγματος
- την ιοντική ισχύ του διαλύματος (αναλόγως της προσδιοριζόμενης ουσίας)



Σχήμα 1.24. Σχηματική αναπαράσταση της απορρόφησης (Α) έναντι της προσρόφησης (Β) αμέσως μετά την έκθεση της ίνας στον αναλύτη και μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Ανάλογα με το εάν το πολυμερές που περιβάλλει ως επίστρωση την ίνα είναι υγρό ή στερεό έχουν παρατηρηθεί ουσιαστικές διαφορές στην απόδοση της ίνας. Στην περίπτωση των υγρών επιστρώσεων, οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ του υγρού δείγματος και της υγρής επίστρωσης όπως προβλέπεται σε μια διαδικασία εκχύλισης υγρού με υγρό και τα μόρια των αναλυτών διαχέονται μέσα στο υγρό πολυμερές (Σχήμα 1.24Α). Ο υψηλός συντελεστής διάχυσης των αναλυτών στις υγρές επιστρώσεις επιτρέπει στα μόριά τους να διεισδύσουν σε όλο τον όγκο του πολυμερούς σε σχετικά μικρό χρόνο εφόσον το πάχος της επίστρωσης είναι λεπτό.

Στην περίπτωση στερεού προσροφητικού (Σχήμα 1.24Β), η επίστρωση έχει μια καλοσηματισμένη κρυσταλλική δομή, η οποία όμως αν είναι πυκνή, ουσιαστικά μειώνει τους συντελεστές διάχυσης των αναλυτών. Συνεπώς, η προσρόφηση πραγματοποιείται μόνο στην επιφάνεια του περιβλήματος και έτσι είναι διαθέσιμο μόνο ένα μικρό τμήμα του συνολικού όγκου της επίστρωσης. Εάν αυτό το επιφανειακό τμήμα είναι κατειλημμένο, είναι ενδεχόμενο να πραγματοποιηθεί αντικατάσταση των μορίων ενός αναλύτη από τα μόρια ενός άλλου που θα δρα ανταγωνιστικά. Επομένως, η ποσότητα σε κατάσταση ισορροπίας που παραλαμβάνεται από την ίνα είναι πολύ πιθανόν να εξαρτάται από τις σχέσεις των συγκεντρώσεων μεταξύ των αναλυτών, αλλά και από την παρουσία άλλων ουσιών του δείγματος που μπορούν να δρουν ανταγωνιστικά προς αυτούς.

Ένας τρόπος υπερνίκησης αυτού του βασικού περιορισμού των πορωδών επιστρώσεων είναι η επιλογή χρόνου δειγματοληψίας πολύ μικρότερου από αυτόν της εξισορρόπησης έτσι, ώστε η συνολική ποσότητα των αναλυτών που συσσωρεύονται στην ίνα να είναι μικρότερη από την ποσότητα κορεσμού της ίνας. Στην περίπτωση αυτή ιδιαίτερη σημασία θα πρέπει να δίνεται στην επαναληψιμότητα των πειραματικών συνθηκών από μέτρηση σε μέτρηση και κυρίως από άποψη χρόνου, της θερμοκρασίας και της ανάδευσης κατά το στάδιο δειγματοληψίας/διαχωρισμού.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι εμπορικά διαθέσιμων ιών. Μερικοί από αυτούς παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.10

Πίνακας1.10. Εμπορικά διαθέσιμες ίνες

Στατική Φάση	Πάχος (μm)	Πολικό-τητα	Θερμοκρασία Λειτουργίας (°C)	Εφαρμογές	Τεχνική
Polydimethylsiloxane (PDMS)	100	Μη-πολικό	280	Πτητικές	GC/HPLC
PDMS	30	Μη-πολικό	280	Μη-πολικές ημιπτητικές	GC/HPLC
PDMS	7	Μη-πολικό	340	Μετρίως πολικές έως μη πολικές ημιπτητικές	GC/HPLC
Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene(PDMS/DVB)	65	Διπολικό	270	Πολικές-πτητικές	GC
PDMS-DVB	60	Διπολικό	270	Γενική χρήση	HPLC
Polydimethylsiloxane/Carboxen (PDMS/Carboxen)	75	Διπολικό	320	Πτητικές και αέρια	GC
Carbowax/ Divinylbenzene (CW/DVB)	65	Πολικό	265	Πολικές (αλκοόλες)	GC
Carbowax/ Templated Resin(CW/TPR)	50	Πολικό	240	Τασιενεργά	HPLC
Polyacrylate (PA)	85	Πολικό	320	Πολικές ημιπτητικές	GC/HPLC

Κεφάλαιο 4: Ανάπτυξη Προηγμένων Αναλυτικών Μεθόδων για τον προσδιορισμό Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων, Αλογονομένων Υδρογονανθράκων, Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων και Κυανοτοξινών

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκαν προηγμένες αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού οργανικών ρύπων που παρουσιάζουν αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον στην Ελλάδα αλλά και διεθνώς, όπως είναι τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια, οι αλογονομένοι υδρογονάνθρακες, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι κυανοτοξίνες.

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) συγκαταλέγονται ανάμεσα στους ρύπους που θεωρούνται παγκόσμιοι-επίμονοι ρυπαντές, και μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στους ζωντανούς οργανισμούς.¹⁶⁶ Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την ανίχνευση των PCBs σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα, κάποιες από αυτές είναι σχετικά πρόσφατες.¹⁶⁷⁻¹⁷¹ Σε ότι αφορά τα νερά, η ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων προσδιορισμού πολυχλωριωμένων διφαινυλίων έχει πλέον ιδιαίτερη σημασία αφού μόλις το 2008 η Ευρωπαϊκή Ένωση με την οδηγία 2008/105/EK κατέταξε τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια στις ουσίες που υπόκεινται σε επανεξέταση για πιθανό χαρακτηρισμό ως «ουσίες προτεραιότητας» ή ως επικίνδυνες ουσίες προτεραιότητας».

Η εκχύλιση των PCBs από υδατικά δείγματα, παραδοσιακά επιτυγχάνονταν με την τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) και την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).¹⁷²⁻¹⁷⁵ Τα τελευταία χρόνια η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME), κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος στην ανάλυση οργανικών ρύπων από υδατικά δείγματα,¹⁷⁶⁻¹⁸⁰ συμπεριλαμβανομένων και των PCBs.¹⁸¹⁻¹⁸³ Η SPME πλεονεκτεί σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές, αφού συνδυάζει εκχύλιση και προσυγκέντρωση των αναλυτών σε ένα βήμα, δεν απαιτεί περίπλοκο εξοπλισμό και δεν απαιτεί την κατανάλωση τοξικών οργανικών διαλυτών. Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού επτά PCBs (τρίχλωρο έως επτάχλωρο διφαινύλια) σε υδατικά δείγματα (επιφανειακά και πόσιμα) με την τεχνική HS-SPME. Τα συγκεκριμένα επτά ισομερή επιλέχθηκαν γιατί αποτελούν δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης από πολυχλωριωμένα διφαινύλια (“PCB markers”).¹⁸⁴

Η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SMPE) αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία στην ανάλυση οργανικών ρύπων όχι μόνο σε υδατικά δείγματα αλλά και σε πολύπλοκα υποστρώματα, όπως είναι π.χ. το μέλι. Το μέλι είναι ένα εξαγόμενο προϊόν της Ελλάδας, με μεγάλη οικονομική σημασία. Σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το μέλι ως φυσικό προϊόν πρέπει να είναι απαλλαγμένο από οργανικά και ανόργανα κατάλοιπα, ξένα προς τη σύστασή του.¹⁸⁵ Ωστόσο

στη διεθνή βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η ανίχνευση καταλοίπων 1,4-διχλωροβενζολίου (p-dichlorobenzene, p-DCB), ναφθαλενίου (Naphthalene, Naphth) και 1,2-Διβρωμοαιθανίου (1,2-Dibromoethane, 1,2-DBE) στο μέλι.^{67,186}

Από τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι η ανάπτυξη γρήγορων, ευαίσθητων και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό αυτών των υπολλειμάτων είναι επιβεβλημένη. Εντούτοις, υπάρχει περιορισμένος αριθμός εργασιών που αναφέρεται στον προσδιορισμό του 1,4-διχλωροβενζολίου και ναφθαλενίου στο μέλι^{158,186-188} και μόνο μία εργασία που αναφέρεται στον προσδιορισμό του 1,2-διβρωμοαιθανίου.¹⁸⁸ Οι αναλυτικές μέθοδοι που προτείνονται σε αυτές τις μελέτες (απόσταξη μεθ' υδρατμών, τεχνική εκδίωξης και παγίδευσης) απαιτούν χρονοβόρα βήματα εκχύλισης που τις καθιστούν ουσιαστικά ανεφάρμοστες για αναλύσεις ρουτίνας. Ο προσδιορισμός των παραπάνω καταλοίπων με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης μπορεί να αποδειχθεί αποτελεσματικότερη τεχνική σε περίπλοκα δείγματα, όπως είναι το μέλι.¹⁸⁹⁻¹⁹² Αυτό αποτέλεσε και στόχο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Μία ακόμη κατηγορία ρύπων με ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον είναι και οι κυανοβακτηριακές τοξίνες. Οι τοξίνες αυτές (κυανοτοξίνες), παράγονται από κυανοβακτήρια και έχουν καταγραφεί σε διάφορα υδάτινα συστήματα. Οι κυανοτοξίνες έχουν αναγνωριστεί ως ένας σοβαρός κίνδυνος για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα όταν τα νερά των λιμνών προορίζονται για επεξεργασία και διανομή ως πόσιμα.⁷³ Για τον λόγο αυτό, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει σχετικά πρόσφατα θεσπίσει όριο 1 μg/L για μία από τις τοξίνες, ενώ αναμένεται ότι σύντομα θα θεσπιστούν όρια για περισσότερες κυανοτοξίνες. Στην εποχή μας γίνονται διάφορες έρευνες ανά τον κόσμο και αφορούν συστήματα παρακολούθησης και ελέγχου της παρουσίας των κυανοτοξινών σε υδάτινους ταμιευτήρες και σε διάφορα στάδια επεξεργασίας του νερού, όταν προορίζεται για πόση. Ειδικότερα, στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ανάπτυξης κυανοβακτηρίων σε πολλές λίμνες, συμπεριλαμβανομένης και της λίμνης του Μαραθώνα,¹⁹³ δεν έχει όμως καταγραφεί η παρουσία κυανοτοξινών στον Ελλαδικό χώρο.

Λόγω της επικινδυνότητας των κυανοτοξινών για την δημόσια υγεία και λόγω της παρουσίας τους σε επιφανειακά ύδατα που ενδέχεται να προορίζονται για πόση, προέκυψε η ανάγκη για την ανάπτυξη αξιόπιστων αλλά και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων, που να έχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησής τους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η δυνατότητα αυτή μπορεί να επιτευχθεί με την συμβολή προηγμένων τεχνολογιών, όπως είναι η σύζευξη του υγρού χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (MS/MS). Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν σχετικά λίγες δημοσιευμένες εργασίες για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αυτών των ενώσεων με την τεχνική (MS/MS)¹⁹⁴⁻

¹⁹⁸.

Αντιθέτως, υπάρχουν αρκετές μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους (HPLC-UV), και ανοσοενζυμικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό κυρίως της μικροκυστίνης-LR, μετά την απομόνωσή της με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές δεν μπορούν να αποτελέσουν επιβεβαιωτικές μεθόδους για την ανίχνευση κυανοτοξινών. Η εμπορική διαθεσιμότητα, αλλά και η διακίνηση άλλων μικροκυστινών και γενικότερα κυανοτοξινών, ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα, για αυτό το λόγο υπάρχει στις μέρες μας μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό τους με σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές.

Στη βιβλιογραφία υπάρχει, επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παρουσία διαφόρων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (ΠΑΥς) στο πόσιμο και επιφανειακό νερό, δεδομένου ότι μπορεί να απειληθεί η υδρόβια ζωή και η υγεία των ανθρώπων από αυτή την κατηγορία ρύπων.²⁰² Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς) είναι καλά μελετημένοι οργανικοί ρύποι οι οποίοι προέρχονται τόσο από φυσικές πηγές όσο και από ανθρωπογενείς πρακτικές.²⁵ Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει εκδόσει συγκεκριμένες οδηγίες που σχετίζονται με τον έλεγχό τους και την θέσπιση ανώτατων επιτρεπόμενων ορίων των ΠΑΥς στα πόσιμα και επιφανειακά νερά. Το 2008 τέθηκαν «αυστηρά» πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος στον τομέα της πολιτικής των επιφανειακών υδάτων με την οδηγία 2008/105/EK (συμπεριλαμβάνονται ποτάμια, λίμνες και λοιπές επιφανειακές υδάτινες δεξαμενές).³²

Η ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων προσδιορισμού πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στα νερά έχει πλέον ιδιαίτερη σημασία, δεδομένων των νέων χαμηλών ανώτατων ορίων που τέθηκαν με την παραπάνω πρόσφατη οδηγία. Παραδοσιακά, η ανάλυση των ΠΑΥς σε υδατικά δείγματα, επιτυγχάνονταν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους ή φθορισμομετρικό ανιχνευτή.²⁰³⁻²⁰⁷ Ωστόσο αυτές οι αναλυτικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο ως μέθοδοι διαλογής (screening methods) και όχι ως μέθοδοι επιβεβαίωσης, αφού δεν μπορούν να παρέχουν αδιαφιλονίκητη ταυτοποίηση των αναλυτών ουσιών και εάν είναι αναγκαίο, τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στο επίπεδο που ενδιαφέρει.²⁰⁸ Αντιθέτως, οι αεριοχρωματικές μέθοδοι που συνδυάζονται με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS) αποτελούν επιβεβαιωτικές μεθόδους, αφού μπορούν να παρέχουν το φάσμα μάζας των αναλυτών ουσιών.²⁰⁹⁻²¹¹ Το μειονέκτημα των GC-MS μεθόδων είναι ότι συνήθως απαιτείται εκτεταμένη εκχύλιση-προσυγκέντρωση των αναλυτών προκειμένου να επιτευχθούν τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που απαιτούνται στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων²¹². Γενικότερα όμως η ανάλυση ρύπων με αέριο χρωματογράφο απαιτεί πρόσθετα βήματα εκχύλισης και δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε μη πτητικές ενώσεις ούτε και στην ανάλυση των θερμικά ασταθών μορίων. Αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση των ΠΑΥς, αφού με αέριο χρωματογράφο και ανιχνευτή φασματομέτρο μάζας, παρουσιάζονται επιπρόσθετες δυσκολίες για τους αναλύτες

με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 300. Οι δυσκολίες αυτές αίρονται με την σύζευξη του υγρού χρωματογράφου με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Η τεχνική αυτή ανήκει στις προηγμένες μεθόδους ανάλυσης στις οποίες συνδυάζονται τα πλεονεκτήματα της υγρής χρωματογραφίας με την επιβεβαίωση που επιτυγχάνεται μέσω της φασματομετρίας μάζας. Στην διατριβή αυτή στόχος ήταν η ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού οχτώ ΠΑΥς με την τεχνική LC-MS/MS, έπειτα από φωτοϊονισμό σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (APPI). Η μέθοδος του φωτοϊονισμού δεν χρησιμοποιείται συχνά για την ανάλυση οργανικών μορίων και αποτελεί μία μέθοδο ιοντισμού σε ερευνητικό επίπεδο για την ανάλυση μορίων που δεν ιοντίζονται εύκολα, όπως είναι και τα ΠΑΥς.

B.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5: Πειραματικές μέθοδοι προσδιορισμού αναλυτών

Εισαγωγή

Η ανάπτυξη νέων μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αναλυτών, με την χρήση σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών, περιλαμβάνει μια σειρά βημάτων που όλα έχουν ως στόχο την βελτιστοποίηση του σήματος των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Αρχικά, επιχειρείται βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν την εκχύλιση και προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ουσιών σε πραγματικά δείγματα. Τα πραγματικά δείγματα αυτά, αφού διαπιστωθεί ότι είναι απαλλαγμένα από τις προσδιοριζόμενες ουσίες, εμβολιάζονται με κατάλληλες ποσότητες των προσδιοριζόμενων ουσιών και στη συνέχεια προτείνονται τρόποι ποσοτικής εκχύλισης και προσυγκέντρωσης των ουσιών αυτών. Δευτερευόντως, επιχειρείται χρωματογραφικός διαχωρισμός, με διάφορες στήλες υγρής ή αέριας χρωματογραφίας. Στην φασματομετρία μάζων, ακόμα και αν δεν διαχωρίζονται πλήρως οι προσδιοριζόμενες ουσίες στο χρωματογραφικό μέρος, μπορούν να διαχωριστούν και άρα να ταυτοποιηθούν τα μοριακά ιόντα τους στο φασματογράφο μάζας. Ωστόσο, αν υπάρξει πλήρης χρωματογραφικός διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων ουσιών, το σύστημα του φασματογράφου μάζας ρυθμίζεται έτσι ώστε να ανιχνεύει μία μόνο μάζα σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της προτεινόμενης μεθόδου. Τελευταίο βήμα, σε ό,τι αφορά την ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων σε φασματογράφο μάζας είναι η ανίχνευση των μητρικών και θυγατρικών ιόντων των προσδιοριζόμενων ουσιών.

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκαν προηγμένες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό:

- Πολυχλωριωμένων διφαινυλίων σε επιφανειακά και πόσιμα νερά, με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) και αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD).
- 1,2- Διβρωμοαιθανίου, 1,4-Διχλωροβενζολίου και Ναφθαλενίου στο μέλι, με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) και αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας (GC-ECD).
- Κυανοτοξινών σε επιφανειακά και πόσιμα νερά με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) .
- Πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε επιφανειακά και πόσιμα νερά με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία

μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) σε συνδυασμό με την τεχνική του φωτοϊοντισμού (APPI).

5.1. Ανάλυση Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (PCBs) στο νερό

5.1.1. Αντιδραστήρια-Συσκευές-Υλικά-Όργανα για την ανάλυση των Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (PCBs) στο νερό. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Τα επτά Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή δίνονται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1. Πολυχλωριωμένα Διφαινύλια που μελετήθηκαν

a/a	Όνομα ουσίας	Ονομασία κατά IUPAC
1	PCB 28	[2,4,4'-τριχλωροδιφαινύλιο]
2	PCB 52	[2,2',5,5'-τετραχλωροδιφαινύλιο]
3	PCB 101	[2,2',4,5,5'-πενταχλωροδιφαινύλιο]
4	PCB 118	[2,3',4,4',5- πενταχλωροδιφαινύλιο]
5	PCB 138	[2,2',4,4',5,5' - εξαχλωροδιφαινύλιο]
6	PCB 153	[2,2',3,4,4',5' - εξαχλωροδιφαινύλιο]
7	PCB 180	[2,2',3,4,4',5,5' - επταχλωροδιφαινύλιο]

Για την παρασκευή των διαλυμάτων PCBs χρησιμοποιήθηκαν υγρές πρότυπες ουσίες, της εταιρίας Dr. Ehrenstorfer GmbH, σε συγκέντρωση 10 µg/ml σε ισοοκτάνιο. Όλες οι πρότυπες ουσίες συνοδεύονταν από πιστοποιητικό ανάλυσης και ήταν επισημασμένες με ημερομηνία λήξης.

Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- ◆ Υπερκαθαρό νερό (18.2 MΩ/cm) που λαμβάνεται από τη συσκευή TEMAK
- ◆ Ισοοκτάνιο (pesticide grade) της Merck
- ◆ Χλωριούχο Νάτριο (analytical grade) της Merck
- ◆ Άζωτο καθαρότητας ECD (99.99995%) της Air Liquid
- ◆ Ήλιο καθαρότητας 99.99995% της Air Liquid

Για την παρασκευή των διαλυμάτων και την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συσκευές-υλικά:

- ◆ Αυτόματες πιπέττες 10-100 µl και 100-1000 µl της Eppendorf.
- ◆ Χρονόμετρο

- ◆ Μαγνητάκια μήκους 0.5 cm και γυάλινα φιαλίδια όγκου 4 ml με βιδωτό καπάκι και πόμα κατασκευασμένο απο Teflon/Silica.
- ◆ Συσκευή υπερκάθαρου νερού (18.2 MΩ/cm) της εταιρίας TEMAK (Type:TSDW10)
- ◆ Πλυντήριο Γυαλικών Miele Professional G7883
- ◆ Τροποποιημένη σύριγγα της Supelco πάνω στην οποία είναι τοποθετημένη η ίνα με πολυμερές υλικό πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (Polydimethylsiloxane-PDMS) πάχους 100μm.

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων της εταιρίας Hewlett Packard (*Gas Chromatograph 5890 Series II*). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων ήταν: *HP Chemstation Rev.A.06.01*. Ως «φέρων αέριο» χρησιμοποιήθηκε το ήλιο και το άζωτο ως «αντιδρών αέριο».

Οι ακριβείς συνθήκες είχαν ως εξής: ροή ηλίου 1,5 ml/min, ροή αζώτου 20 ml/min, θερμοκρασία εισαγωγέα 280 °C, η βαλβίδα εισαγωγέα άνοιγε στα 3 min μετά την ένεση (splitless injection), θερμοκρασία ανιχνευτή 290 °C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης είχε ως εξής: αρχική θερμοκρασία 100 °C, ανυψώνεται στους 218 °C με βήμα 8 °C/min, κρατείται σταθερή στους 218 °C για 18 min. Η θερμοκρασία στήλης ανυψώνεται περαιτέρω στους 250 °C με βήμα 4 °C/min και κρατείται σταθερή για 10 min. Η στήλη αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν τριχοειδής στήλη τηγμένης πυριτίας (fused silica) (30m, 0,25mm i.d., υλικού πληρώσεως 0,25 μm) μοντέλο DB-5 της εταιρείας Jand W Scientific Inc.

Για την παρασκευή διαλυμάτων των PCBs, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα των μεμονομένων ουσιών σε ισοοκτάνιο (συγκέντρωσης 10 mg/L). Από τα μεμονομένα αυτά διαλύματα PCBs παρασκευάστηκε πολυπρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1mg/L σε ισοοκτάνιο. Τα τελικά υδατικά διαλύματα των PCBs παρασκευάστηκαν από το πολυπρότυπο αυτό διάλυμα ως εξής: Κατάλληλες ποσότητες διαλύματος τοποθετούνταν σε άδειες γυάλινες ογκομετρικές φιάλες και εξατμίζονταν ο οργανικός διαλύτης με ελαφρύ ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια οι φιάλες γεμίζονταν με υπερκάθαρο νερό και αφήνονταν υπό ανάδευση για περίοδο 2 εβδομάδων.

5.1.2. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης για την ανάλυση Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων (PCBs) στο νερό

Τα PCBs που αναλύθηκαν ήταν τρίχλωρο εως επτάχλωρο διφαινύλια και όλα τα πρότυπα διαλύματα ήταν υδατικά και εμβολιασμένα με γνωστή ποσότητα αναλυτών. Ποσότητα 2 ml εμβολιασμένου προτύπου διαλύματος (ή άγνωστου υδατικού δείγματος) τοποθετούνταν σε γυάλινο φιαλίδιο (χωρητικότητας 4 ml) με βιδωτό καπάκι και πόμα από Teflon.

Η τεχνική που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των αναλυτών ήταν η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος (Head Space Solid Phase Microextraction, HS-SPME). Τα δείγματα αναδεύονταν αρχικά σε μαγνητικό αναδευτήρα (900 rpm) για 30 min στους 60 °C. Στη συνέχεια το πολυμερές υλικό της ίνας εκτίθονταν στον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος για ακόμα 30 min.

Μετά την προσρόφηση των αναλυτών, η ίνα τοποθετούνταν στον εισαγωγέα του συστήματος αέριας χρωματογραφίας στους 280 °C για 2 min, οπότε οι ουσίες εκροφώνταν και αναλύονταν.

Έπειτα από κάθε ανάλυση η ίνα τοποθετούνταν και πάλι στον εισαγωγέα του συστήματος αέριας χρωματογραφίας, για ακόμα 5 min, προκειμένου να αποφευχθεί πιθανότητα επιμόλυνσης των δειγμάτων (carry over). Για κάθε ανάλυση εχρησιμοποιείτο νέο φιαλίδιο και τα μαγνητάκια που χρησιμοποιούνταν για την ανάλυση δειγμάτων καθαρίζονταν σχολαστικά με νερό-σαπούνι, εξάνιο, ακετόνη, νερό και τελικώς πάλι ακετόνη.

5.2. Ανάλυση Αλογονομένων Υδρογονανθράκων (p-DCB, 1,2-DBE) και Ναφθαλενίου στο μέλι

5.2.1. Αντιδραστήρια-Συσκευές-Υλικά-Όργανα για την ανάλυση των Αλογονομένων Υδρογονανθράκων (p-DCB, 1,2-DBE) και του Ναφθαλενίου στο μέλι. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω πρότυπες ουσίες : 1,4-Διχλωροβενζόλιου (p-DCB) (99% καθαρότητας) της εταιρίας Riedel de Haen (Seelze, Γερμανία), Ναφθαλένιο υπό τη μορφή διαλύματος συγκέντρωσης 100 mgL⁻¹ σε μεθανόλη της εταιρίας Chem Service (West Chester, PA, ΗΠΑ), 1,2-Διβρωμοαιθάνιο (99% καθαρότητας) της εταιρίας Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία). Όλες οι πρότυπες ουσίες συνοδεύονταν από πιστοποιητικό ανάλυσης και ήταν επισημασμένες με ημερομηνία λήξης.

Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- ◆ Υπερκαθαρό νερό (18.2 MΩ/cm) από τη συσκευή TEMAK
- ◆ Μεθανόλη (HPLC grade) της Merck
- ◆ Χλωριούχο Νάτριο (analytical grade) της Merck
- ◆ Ήλιο καθαρότητας 99.99995% της Air Liquid

Για την παρασκευή διαλυμάτων και για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές-υλικά:

- ◆ Αυτόματες πιπέττες 10-100 μl και 100-1000 μl της Eppendorf.

- ◆ Χρονόμετρο
- ◆ Μαγνητάκια (μήκους 0.5 cm) και γυάλινα φιαλίδια (4ml) με βιδωτό καπάκι και πώμα κατασκευασμένο απο Teflon/Silica.
- ◆ Συσκευή υπερκάθαρου νερού (18.2 MΩ/cm) της εταιρίας TEMAK (Type:TSDW10)
- ◆ Πλυντήριο Γυαλικών Miele Professional G7883
- ◆ Τροποποιημένη σύριγγα (Supelco) πάνω στην οποία είναι τοποθετημένη η ίνα με πολυμερές υλικό πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (Polydimethylsiloxane-PDMS) πάχους 100 μm.

Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας (αέριος χρωματογράφος της Agilent μοντέλο 6890, συνδυασμένος με φασματογράφο μάζας της Agilent μοντέλο 5793). Ως «φέρον αέριο» χρησιμοποιήθηκε το ήλιο.

Οι ακριβείς συνθήκες του αέριου χρωματογράφου είχαν ως εξής: ροή ηλίου 1 ml/min, θερμοκρασία εισαγωγή 220 °C, η βαλβίδα εισαγωγή άνοιγε στα 5 min μετά την ένεση (splitless injection). Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 40 °C (σταθερή για 5 min), ανυψώνεται στους 55°C με βήμα 1 °C/min, ακολούθως στους 120 °C με βήμα 10 °C/min και τέλος φθάνει στους 280 °C με βήμα 20 °C/min (όπου και κρατείται σταθερή για 5 min). Η στήλη αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν τριχοειδής στήλη τηγμένης πυριτίας (fused silica) (30m, 0,25mm i.d., υλικού πληρώσεως 0,25 μm) μοντέλο DB5 της εταιρείας Agilent Technologies.

Για την παρασκευή διαλυμάτων των τριών αναλυτών, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα των μεμονομένων ουσιών. Από τα μεμονομένα αυτά διαλύματα παρασκευάστηκαν αρχικά μεμονομένα διαλύματα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 200 mgL⁻¹ για το p-DCB και το 1,2-DBE σε μεθανόλη (θερμοκρασία φύλαξης -18 °C). Ενδιάμεσα διαλύματα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1mgL⁻¹ σε μεθανόλη, παρασκευάστηκαν από τα αρχικά διαλύματα παρακαταθήκης (θερμοκρασία φύλαξης 5 °C). Εμβολιασμένα δείγματα μελιού (*Spiked honey samples*) παρασκευάστηκαν με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων ενδιάμεσων πυκνών διαλυμάτων ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις στο μέλι να είναι 0.1–2500 μg kg⁻¹ για το p-DCB και Ναφθαλένιο και 3–500 ng mL⁻¹ για το 1,2-DBE. Τα εμβολιασμένα διαλύματα μελιού (*Spiked honey standard solutions*) παρασκευάστηκαν αραιώνοντας 10g εμβολιασμένων δειγμάτων μελιού μέχρι τα 25 mL. Από αυτά τα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε ποσότητα 2 mL για την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος. Σε όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε μέλι το οποίο ήταν απαλλαγμένο από τα προς ανάλυση κατάλοιπα.

5.2.2. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης για την ανάλυση 1,2-Διβρωμοαιθανίου, 1,4-Διχλωροβενζολίου και Ναφθαλενίου στο μέλι

Ποσότητα 2 ml εμβολιασμένων διαλυμάτων μελιού (*Spiked honey standard solutions*) τοποθετούνταν σε γυάλινο φιαλίδιο χωρητικότητας 4ml με βιδωτό καπάκι και πώμα από Teflon. Χρησιμοποιήθηκε ίνα πολυδιμεθυλοσιλοξανίου (Polydimethylsiloxane, PDMS) πάχους 100 μm.

Η τεχνική που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των αναλυτών ήταν η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος (HS-SPME). Το πολυμερές υλικό της ίνας εκτίθονταν στον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος για 30 min, ενώ το διάλυμα θερμαινόταν ταυτόχρονα στους 40 °C και αναδεύονταν στις 900 στροφές το λεπτό (rpm) με μαγνητικό αναδευτήρα. Όλα τα διαλύματα περιείχαν χλωριούχο νάτριο συγκέντρωσης 26.4% (w/v)

Μετά την προσρόφηση των αναλυτών, η ίνα τοποθετούνταν στον εισαγωγέα του συστήματος αέριας χρωματογραφίας στους 220 °C για 2 min οπότε οι ουσίες εκροφόνταν και αναλύονταν. Σε πειράματα λευκών (τυφλών) προσδιορισμών στην ίνα, μετά από αυτή την εκρόφιση των 2 min δεν παρατηρήθηκαν κορυφές στους χρόνους κατακράτησης των τριών αναλυτών.

5.3. Ανάλυση Κυανοτοξινών στο νερό.

5.3.1. Αντιδραστήρια-Συσκευές-Υλικά-Όργανα για την ανάλυση Κυανοτοξινών. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Οι κυανοτοξίνες που προσδιορίστηκαν στην παρούσα διατριβή δίνονται στον Πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.2. Κυανοτοξίνες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

a/a	Όνομα ουσίας	CAS registry number ¹
1	Μικροκυστίνη RR / MC-RR	111755-37-4
2	Νοντουλαρίνη	118399-22-7
3	Μικροκυστίνη YR / MC-YR	101064-48-6
4	Μικροκυστίνη LR / MC-LR	101043-37-2
5	Μικροκυστίνη LA / MC-LA	96180-79-9

¹ Chemical Abstracts Service, CAS registry number

Για την παρασκευή των διαλυμάτων των μικροκυστινών και της νοντουλαρίνης χρησιμοποιήθηκαν στερεές πρότυπες ουσίες των εταιριών *Sigma* και *Abraxis*, ή πρότυπα διαλύματα των μεμονωμένων ουσιών σε μεθανόλη συγκέντρωσης περίπου 10 mg/L, της εταιρίας *DHI Water and Environment*. Όλες οι πρότυπες ουσίες συνοδεύονταν από πιστοποιητικό ανάλυσης και ήταν επισημασμένες με ημερομηνία λήξης.

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- ◆ Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC της Merck
- ◆ Μεθανόλη καθαρότητας HPLC της Merck
- ◆ Υπερκαθαρό νερό (18.2 MΩ/cm) από τη συσκευή TEMAK
- ◆ Μυρμηκικό Οξύ (HCOOH) αναλυτικής καθαρότητας της Merck
- ◆ Ακετόνη αναλυτικής καθαρότητας της Merck
- ◆ Υδροξείδιο του αμμωνίου (~ 1 mol/l) της Merck
- ◆ Θειοθειικό νάτριο (1g στα 100 ml νερού) της Merck
- ◆ Πρότυπο διάλυμα διαλυτοποίησης μικροκυστινών: Μεθανόλη/νερό 20/80 v/v
- ◆ Άζωτο καθαρότητας ECD (99.99995%) της Air Liquid

Για την παρασκευή των διαλυμάτων και για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές:

- ◆ Αυτόματες πιπέττες 10-100μl και 100-1000 μl της Eppendorf.
- ◆ Χρονόμετρο.
- ◆ Γυάλινη συσκευή διήθησης με υποδοχέα για φίλτρα 47 mm της Millipore.
- ◆ Συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) της Supelco η οποία αποτελείται από:
 - α. Αντλία κενού
 - β. Συστοιχία (manifold) SPE 12 θέσεων λειτουργίας υπό κενό, με σωληνώσεις από Teflon.
 - γ. Φιάλη συλλογής, όγκου τουλάχιστον 10 L.
 - δ. Γυάλινες φιάλες δειγμάτων όγκου 1 L βαθμονομημένες.
 - ε. Γυάλινοι σωλήνες συλλογής εκλουσμάτων των 10 ml.
 - στ. Συστοιχία διανομής αερίου 12 θέσεων.
- ◆ Πεχάμετρο Metrohm 632 με ηλεκτρόδιο υάλου.
- ◆ Φασματοφωτόμετρο UV/Vis Lamda 19 της Perkin Elmer
- ◆ Συσκευή Υπερήχων Sonorex Super RK 106 της Bandelin
- ◆ Συσκευή υπερκάθαρου νερού (18.2 MΩ/cm) της εταιρίας TEMAK (Type:TSDW10)
- ◆ Πλυντήριο Γυαλικών Miele Professional G7883

Οι αναλυτικές στήλες υγρής χρωματογραφίας που δοκιμάστηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- ◆ Restek C18 (30mm x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3 μm) .
- ◆ Zorbax SB-C18 (30 x 2.1 mm, υλικού πληρώσεως 1.8 μm)
- ◆ Waters Spherisorb (250 x 4.6mm, υλικού πληρώσεως 5 μm)
- ◆ Merck Lichospher (250 x 4mm, υλικού πληρώσεως 5 μm)
- ◆ Thermo Hypersil gold (100 x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3 μm)

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση των κυανοτοξινών ήταν:

- Φιάλες δειγματοληψίας: Χρησιμοποιούνται γυάλινες φιάλες του 1 L (π.χ. φιάλες διαλυτών) οι οποίες καθαρίζονται προσεκτικά πριν από κάθε χρήση (βλ. παρακάτω).
- ◆ Φυσίγγια (cartridges) SPE: Oasis HLB της Malva , 200mg χωρητικότητας 6ml
- ◆ Φυσίγγια Superclean ENVI-C18 της Supelco, 500mg χωρητικότητας 6ml
- ◆ Φίλτρα Glass Microfiber με διάμετρο πόρων 47μm
- ◆ Γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη όγκου 2ml.

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε Υγρός Χρωματογράφος με ανιχνευτή Φασματογράφο Μάζας με τριπλό τετράπολο LC-ESI-MS/MS, της Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA) (Σχήμα 5.1) αποτελούμενος από τα εξής μέρη:

Αντλία HPLC Finnigan Surveyor LC pump Plus δύο εμβόλων βαθμωτής έκλουσης τεσσάρων διαλυτών

Αυτόματο δειγματολήπτη Finnigan Surveyor Autosampler Plus με ενσωματωμένο θερμοστάτη στηλών

Ανιχνευτή Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας (MS/MS) της Finnigan TSQ Quantum Discovery Max που περιλαμβάνει:

- α) Πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI)
- β) Αναλυτή Μάζας με τρία τετράπολα (triple stage quadrupole analyzer)



Σχήμα 5.1. Υγρός χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου και πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού, LC-ESI-MS/MS (Thermo Finnigan)

Για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών, με το σύστημα LC-MS/MS, επιλέχθηκαν οι παρακάτω παράμετροι του φασματογράφου μάζας, συνολικά και για τις 5 ουσίες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό (Spray Voltage) 4000 V
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature) 350 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N₂ (Sheath gas pressure) 20 αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N₂ (Auxilliary gas) 5 αυθαίρετες μονάδες (Arbitrary Units, A.U.)

- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο και τρίτο τετράπολο : 0.7 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum ,FWHM)

Τα επιλεγμένα μητρικά και θυγατρικά ιόντα και οι αντίστοιχες ενδεικτικές ενέργειες διάσπασής τους (collision energies) παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3.

Πίνακας 5.3. Μητρικά και θυγατρικά ιόντα των υπό προσδιορισμό ουσιών

Μικροκυστίνες	Σχετική μοριακή μάζα (Da)	Χρόνος ανάσχεσης (min)	Μητρικό ιόν (m/z)	Θυγατρικό ιόν (m/z) Q ₁ ¹	Θυγατρικό ιόν (m/z) Q ₂	[Q ₂]/[Q ₁] ² (RSD%)	Ενέργεια διάσπασης Q ₁ /Q ₂ (V)
Μικροκυστίνη-RR	1037	5.69	(M+2H) ⁺² 519.8	135	213	14.84 (3.4)	32/40
Νοντουλαρίνη	824	8.72	(M+H) ⁺ 825.3	135	227	95.41 (4.88)	54/46
Μικροκυστίνη -YR	1044	9.52	(M+H) ⁺ 1045.4	135	213	65.19 (7.72)	52/60
Μικροκυστίνη -LR	994	9.97	(M+H) ⁺ 995.47	135	213	93.17 (9.32)	58/60
Μικροκυστίνη -LA	909	11.87	(M+Na) ⁺ 932.2	508	347	24.43 (8.46)	58/49

¹ Ιόν ποσοτικοποίησης

² Λόγος ιόντων (εκφρασμένος ως μέσος λόγος των εμβαδών των κορυφών με τις αντίστοιχες τιμές RSD% , για εύρος συγκεντρώσεων 10 µg/L, 20µg/L, 50 µg/L και 100µg/L / κυανοτοξίνη –ανάλυση εις τριπλούν)

Πλήρης διαχωρισμός όλων των κυανοτοξινών επιτεύχθηκε με την στήλη HPLC C-18, 30mm x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3µm (Restek), με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης, το οποίο ξεκινούσε από την αναλογία 75:25 νερό / ακετονιτρίλιο και κατέληγε στην αναλογία 10:90 νερό/ακετονιτρίλιο. Η περιεκτικότητα σε μυρμηγκικό οξύ ήταν 0.5% και στις δύο φάσεις: υδατική και οργανική (Πίνακας 5.4).

Πίνακας 5.4. Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	Ταχύτητα ροής (mL/min)	ACN (0.5% HCOOH)	H ₂ O (0.5% HCOOH)
0	0.2	25	75
1	0.2	25	75
10.5	0.2	70	30
12.5	0.2	90	10
13.5	0.2	90	10
14	0.2	25	75
27	0.2	25	75

Η θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης ορίστηκε στους 30 °C και ο όγκος της ένεσης ορίστηκε στα 20 µl.

Για την παρασκευή διαλυμάτων των μικροκυστινών και της νοντουλαρίνης, χρησιμοποιήθηκαν στερεές πρότυπες ουσίες ή πρότυπα διαλύματα των μεμονωμένων ουσιών σε μεθανόλη συγκέντρωσης περίπου 10 mgL^{-1} .

Οι στερεές πρότυπες ουσίες των κυανοτοξινών έχουν την μορφή ενός διάφανου υμενίου (φίλμ) το οποίο δεν συνοδεύεται από πληροφορίες όπως καθαρότητα ή ακριβές βάρος. Επομένως η ζύγιση στερεών προτύπων ουσιών ήταν αδύνατη. Η παρασκευή των Stock διαλυμάτων, που προέρχονταν από αυτές τις στερεές ουσίες, γινόταν με διάλυση όλης της ποσότητας σε 2ml μεθανόλης και μέτρηση της απορρόφησης στα 220-250 nm με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Σε περίπτωση που το διάλυμα ήταν πολύ πυκνό γινόταν κατάλληλη αραιώση. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ουσιών (σε mg/l) γίνεται με βάση τον τύπο των Lambert και Beer $A_{max} = \epsilon_i C l$, ο οποίος γράφεται πό την μορφή:

$$C = A_{max} M_i 1000 / \epsilon_i l$$

Όπου:

A_{max} , η μέγιστη απορρόφηση

M_i , το μοριακό βάρος κάθε ουσίας σε gr/mol (βλ. Πίνακα 5.5)

ϵ_i , ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας κάθε ουσίας σε μεθανόλη στο συγκεκριμένο μήκος κύματος της απορρόφησης σε $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (βλ. Πίνακα 5.5)

l , η οπτική διαδρομή της κυψελίδας που χρησιμοποιείται, σε cm

Πίνακας 5.5 . Μοριακά βάρη των υπό προσδιορισμό ουσιών και συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας (σε μεθανόλη στα 238 nm).

Όνομα ουσίας	$M_i, \text{g mol}^{-1}$	$\epsilon_i, \text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
Μικροκυστίνη RR (MC-RR)	1037	39800
Μικροκυστίνη YR (MC-YR)	1044	39800
Μικροκυστίνη LR (MC-LR)	994	39800
Μικροκυστίνη LA (MC-LA)	909	39800

Με τον τρόπο αυτό παρασκευάστηκαν stock διαλύματα των μεμονωμένων ουσιών σε συγκεντρώσεις $10 - 100 \text{ mgL}^{-1}$. Τα διαλύματα αυτά φυλάχτηκαν στην κατάψυξη.

Με βάση τα παραπάνω stock διαλύματα παρασκευάστηκαν για την κάθε ουσία διαλύματα συγκέντρωσεων 1, 2, 5 mgL^{-1} σε μεθανόλη/νερό 20/80 v/v. Τα διαλύματα αυτά ελέγχονταν συχνά για πιθανή αποικοδόμηση ή εξάτμιση, ειδικά πριν την παρασκευή προτύπων βαθμονόμησης από αυτά.

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν μίγματα προτύπων διαλυμάτων των 5 κυανοτοξινών (μικροκυστίνη LR, μικροκυστίνη RR,

μικροκυστίνη YR, μικροκυστίνη LA και νοντουλαρίνη) σε συγκεντρώσεις 0,5 μgL^{-1} , 1 μgL^{-1} , 5 μgL^{-1} , 20 μgL^{-1} , 50 μgL^{-1} , 100 μgL^{-1} , 250 μgL^{-1} , 500 μgL^{-1} και 750 μgL^{-1} ανά κυανοτοξίνη.

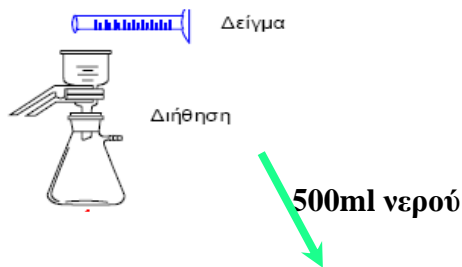
5.3.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης για την ανάλυση κυανοτοξινών στο νερό. Δειγματοληψία Κυανοτοξινών

Ο προσδιορισμός κυανοτοξινών στο νερό με LC/MS/MS απαιτεί απομόνωση και προσυγκέντρωση – καθαρισμό (clean up) πριν το χρωματογραφικό διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους με το φασματογράφο μάζας. Η αρχή της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών στις δύο φάσεις, την στερεή που είναι το προσροφητικό υλικό και την υγρή φάση που είναι το υγρό υπόστρωμα στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες οι προς ανάλυση ουσίες. Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι τέσσερα. Πρώτα γίνεται η ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού, ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσροφητικού υλικού και του δείγματος. Το δεύτερο στάδιο είναι η προσθήκη του δείγματος, το τρίτο η εκλεκτική έκπλυση για την απομάκρυνση των τυχόν παρεμποδιστών και το τέταρτο η έκλυση των προσδιοριζόμενων συστατικών.

Στην παρούσα μελέτη, για την απομόνωση των κυανοτοξινών χρησιμοποιήθηκαν τα φυσίγγια Oasis HLB 200mg χωρητικότητας 6ml. Η πορεία της εκχύλισης και παραλαβής των κυανοτοξινών από πόσιμα και επιφανειακά νερά είχε ως εξής:

Τα δείγματα επιφανειακών νερών διηθούνται με φίλτρα Glass fiber 47 μm , ενώ στα δείγματα που υπάρχει υπολειμματικό χλώριο (π.χ. δείγματα επεξεργασμένου νερού) προστίθενται 5 mg διαλύματος θειοθειικού νατρίου, αναδεύονται και αφήνονται για 5 min. Το pH ρυθμίζεται στην περιοχή 5-8 με NH_4OH ή HCOOH . Το δείγμα (500 ml) μεταφέρεται σε γυάλινη φιάλη του 1L, προστίθενται 5 ml μεθανόλης και ακολουθεί ανάδευση. Τα φυσίγγια SPE προετοιμάζονται με διαδοχική έκπλυση με 4 ml μεθανόλης και 4 ml νερού (με ροή 5 ml/min) και στη συνέχεια το δείγμα περνά από το φυσίγγιο με ροή 10 ml/min (διακριτές σταγόνες). Τα φυσίγγια εκπλένονται με 4 ml μίγματος μεθανόλης/νερού 20:80 v/v (με ροή 10 ml/min) και ακολούθως στεγνώνονται με ρεύμα αέρα για 15 min. Η έκλυση των κυανοτοξινών επιτυγχάνεται με 4 ml μεθανόλης. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη μέχρι ξηρού σε υδατόλουτρο 40 $^{\circ}\text{C}$ και επαναδιάλυση των κυανοτοξινών σε 0,5 ml μίγματος μεθανόλης/νερού 20:80 v/v.

Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζεται σχηματικά η πειραματική διαδικασία εκχύλισης-προσυγκέντρωσης δειγμάτων κυανοτοξινών.



Προστίθεται $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ στα πόσιμα νερά και ρυθμίζεται το PH στην περιοχή 5-8 για τα επιφανειακά νερά.

Προσθήκη 5 ml μεθανόλης και ανάδευση

Προετοιμασία φυσιγγίων με 4 ml μεθανόλης και 4ml νερού (5ml/min). Ροή δείγματος σε διακριτές σταγόνες περίπου 10ml/min. Στέγνωμα φυσιγγίων με ρεύμα αέρα για 15 min

SPE Oasis HLB 200 mg (6 ml)



Έκπλυση φυσιγγίων με 4ml μίγματος μεθανόλης/νερού 20/80 v/v και ακολούθως έκλυση κυανοτοξινών με 4 ml Μεθανόλης (5ml/min), ξήρανση με ρεύμα αζώτου στους 40 °C και επαναδιάλυση σε 500 μl μίγματος μεθανόλης/νερού 20/80 v/v

LC-MS/MS

20 μl ένεση

Σχήμα 5.2. Σχηματική παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας εκχύλισης-προσυγκέντρωσης δειγμάτων κυανοτοξινών.

5.3.3 Δειγματοληψία επιφανειακού ύδατος από τη λίμνη του Μαραθώνα καθώς και πόσιμου νερού της Αθήνας. Διαρκής έλεγχος για την παρουσία κυανοτοξινών

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία επιφανειακού ύδατος από την λίμνη του Μαραθώνα και πόσιμου νερού από τα διωλιστήρια της ΕΥΔΑΠ. Οι δειγματοληψίες στην λίμνη του Μαραθώνα ξεκίνησαν τον Ιούλιο του 2007 και διενεργήθηκαν από την Ε.ΥΔ.ΑΠ. Συνολικά αναλύθηκαν 86 άγνωστα δείγματα νερού (6 δείγματα νερού πόσιμα από τα διωλιστήρια της Ε.ΥΔ.ΑΠ, 78 δείγματα από την λίμνη του Μαραθώνα, 1 δείγμα από την λίμνη Υλίκη και 1 δείγμα από το Μόρνο).

Παρότι η δειγματοληψία φαίνεται να αποτελεί μια σχετικά απλή υπόθεση, αποτελεί γενικά ένα από τα περισσότερο προβληματικά στάδια μιας περιβαλλοντικής ανάλυσης. Η κύρια δυσκολία έγκειται στη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος. Το δείγμα αντιπροσωπεύει μόνο ένα μικρό ποσοστό του συστήματος που ερευνάται και είναι σημαντικό το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό του συνολικού συστήματος όσο το δυνατό περισσότερο. Στην περιβαλλοντική ανάλυση αυτό δεν είναι πάντοτε εφικτό. Συνήθως είναι πιο εύκολο να ληφθεί αντιπροσωπευτικό δείγμα από ομοιογενές παρά από ετερογενές υπόστρωμα. Στην παρούσα διατριβή διενεργήθηκε έρευνα για την παρουσία κυανοτοξινών στα επιφανειακά ύδατα και στο πόσιμο νερό της Αθήνας. Ο αρχικός στόχος ήταν να πραγματοποιηθεί η έρευνα ταυτόχρονα σε επιφανειακά και πόσιμα νερά της Αθήνας, ώστε να διαπιστωθεί αν η παρουσία κυανοτοξινών επηρεάζεται από την επεξεργασία του νερού στα διωλιστήρια της ΕΥΔΑΠ.

Σε ότι αφορά τον αριθμό των δειγμάτων που πρέπει να λαμβάνονται προκειμένου να διενεργείται μία ολοκληρωμένη έρευνα, έχουν αναπτυχθεί κάποιες σύνθετες στατιστικές δειγματοληπτικές διαδικασίες οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν τον αναλυτή να αποφασίσει. Παρόλα αυτά οι περισσότερες από τις δειγματοληψίες πραγματοποιούνται χωρίς αναφορά σε αυτές τις στατιστικές θεωρήσεις. Ο αναλυτής αποφασίζει συνήθως για την καλύτερη τοποθεσία, χρόνο και αριθμό δειγμάτων που θα ληφθούν (κάτι το οποίο ονομάζεται τυχαία δειγματοληψία). Θεωρήσεις σχετικά με την προσεγγιστικότητα του τόπου, το χρόνο και τα έξοδα είναι συνήθως πιο σημαίνοντες παράγοντες από τις καθαρά επιστημονικές θεωρήσεις. Είναι επιτακτική ανάγκη να λαμβάνεται κάθε φορά ένα όσο το δυνατό πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα, αφού δειγματοληπτικά δεν μπορεί να ληφθεί το ίδιο δείγμα δεύτερη φορά. Το περιβάλλον είναι ένα δυναμικό σύστημα το οποίο αλλάζει συνεχώς, κι έτσι η επιστροφή στον ίδιο σταθμό σε άλλο χρόνο ίσως δώσει τελείως διαφορετικά αποτελέσματα.

Στην παρούσα εργασία, αποφασίστηκε η λήψη 4-5 δειγμάτων ανά 15 μέρες περίπου, για το χρονικό διάστημα από 25/7/2007 έως και 20/1/2009). Η επιλογή των τοποθεσιών της

δειγματοληψίας έγινε με σκοπό αυτά τα δείγματα να είναι αντιπροσωπευτικά της ευρύτερης περιοχής της λίμνης. Συγκεκριμένα αποφασίστηκε η δειγματοληψία από το κέντρο της λίμνης, από τον πύργο υδροληψίας της λίμνης και από το φράγμα.

Τα επιφανειακά δείγματα λαμβάνονταν απ' ευθείας σε γυάλινες σκουρόχρωμες φιάλες των 2.5 λίτρων. Τα δείγματα βάθους λαμβάνονταν με δειγματολήπτη τύπου Ruttner και μεταφέρονταν σε φιάλες όπως προηγουμένως. Η απομόνωση των κυανοτοξινών πραγματοποιήθηκε με την SPE μέθοδο που περιγράφηκε προηγουμένως και στη συνέχεια τα προσυγκεντρωμένα δείγματα αναλύονταν στο σύστημα LC/MS/MS. Η ολοκλήρωση των κορυφών και η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων που ελήφθησαν, από τα αναλυόμενα δείγματα επιφανειακών και πόσιμων νερών, έγινε με το πρόγραμμα Xcalibur.

Σε κάθε δειγματοληψία η σειρά ανάλυσης των δειγμάτων ήταν η ακόλουθη:

- 1) Τυφλό (διαλύτης)
- 2) Πρότυπα διαλύματα 10 µg/L, 50 µg/L και 100µg/L ανά κυανοτοξίνη
- 3) Τυφλό (διαλύτης)
- 4) Άγνωστα δείγματα νερού
- 5) Δείγμα Ποιοτικού ελέγχου (εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 0.1µg/L)
- 6) Τυφλό (διαλύτης)

Σε περίπτωση που η τιμή ενός δείγματος βρισκόταν εκτός της περιοχής της βαθμονόμησης, επαναλαμβάνονταν η βαθμονόμηση με άλλα πρότυπα διαλύματα που περιείκλειαν την τιμή του δείγματος.

Οι συγκεντρώσεις των υπό προσδιορισμό ουσιών στο ενυόμενο στο LC/MS/MS δείγμα όγκου 500 µl, υπολογίστηκαν με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης των ενυόμενων προτύπων. Η συγκέντρωση στα δείγματα υπολογίστηκε από τη συγκέντρωση στο τελικό εκχύλισμα διαιρεμένη με το συντελεστή προσυγκέντρωσης που είναι 1000, όταν το αρχικό υδατικό δείγμα είναι 500 ml. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ng/L. Όταν η ευρεθείσα τιμή ήταν μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου αναφερόταν ως «Μή ανιχνεύσιμη» (M.A.).

5.4. Ανάλυση Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων (ΠΑΥς) στο νερό

5.4.1. Αντιδραστήρια-Συσκευές-Όργανα για την ανάλυση Πολυκυκλικών Αρωματικών Υδρογονανθράκων (ΠΑΥς). Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς) (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την διατριβή αναφέρονται στον Πίνακα 5.6.

Πίνακας 5.6 . Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες που μελετήθηκαν

α/α	Όνομα ουσίας	Συντομογραφία
1	Ναφθαλένιο (Naphthalene)	Naphth
2	Ανθρακένιο (Anthracene)	Anthr
3	Φλουορανθένιο (Fluoranthene)	Fluor
4	Βενζο(β)Φλουορανθένιο (Benzo(b)fluoranthene)	B(b)F
5	Βενζο(κ)Φλουορανθένιο (Benzo(k)fluoranthene)	B(k)F
6	Βενζο(α)πυρένιο (Benzo(a)pyrene)	B(a)P
7	Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο (Benzo(g,h,i)perylene)	B(g,h,i)P
8	Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο (Indeno(1,2,3-cd)pyrene)	Indeno

Εσωτερικά πρότυπα δευτεριωμένων ΠΑΥς

9	Ναφθαλένιο D-8 (Naphthalene D-8)	Naphth D-8
10	Ανθρακένιο D-10 (Anthracene D-10)	Anthr D-10
11	Βενζο(α)πυρένιο D-12 (Benzo(a)pyrene D-12)	B(a)P D-12

Ως διαλύματα παρακαταθήκης για την παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν εμπορικώς διαθέσιμα, πιστοποιημένα διαλύματα των μεμονωμένων ουσιών του Πίνακα 5.6 σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 100 µg/ml της εταιρίας Chem Service. Οι δευτεριωμένοι ΠΑΥς της εταιρίας Cambridge isotope laboratories είχαν συγκέντρωση 200 µg/ml. Τα διαλύματα αυτά φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8 °C μέχρι την ημερομηνία λήξης τους.

Τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- ♦ Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC της Merck
- ♦ Διχλωρομεθάνιο κατάλληλης καθαρότητας για προσδιορισμούς υπολειμμάτων της Merck
- ♦ Μεθανόλη κατάλληλης καθαρότητας για προσδιορισμούς υπολειμμάτων της Merck
- ♦ Υπερκαθαρό νερό (18.2 ΜΩ/cm) της εταιρείας TEMAK
- ♦ Ακετόνη αναλυτικής καθαρότητας της Merck
- ♦ Θειϊκό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας της Merck
- ♦ Θειοθειϊκό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας της Merck
- ♦ Ανισόλη καθαρότητας >99% της Merck

Για την παρασκευή των διαλυμάτων και την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συσκευές-υλικά:

- ◆ Φιάλες δειγματοληψίας γυάλινες σκουρόχρωμες του 1L.
- ◆ Γυάλινη συσκευή διήθησης υπό κενό.
- ◆ Φίλτρα Glass Microfiber διαμέτρου 47mm.
- ◆ Ογκομετρικός κύλινδρος 1L.
- ◆ Πιπέττες pasteur.
- ◆ Ογκομετρικές φιάλες 1ml και 10 ml, Class A.
- ◆ Αυτόματη πιπέττα 10-100 μl, διακριβωμένη.
- ◆ Πιπέττα 100-1000 μl, διακριβωμένη.
- ◆ Χρονόμετρο.
- ◆ Συστοιχία (manifold) SPE 12 θέσεων λειτουργίας υπό κενό.
- ◆ Αντλία κενού διαφραγματικού τύπου.
- ◆ Φιάλη συλλογής ανθεκτική στο κενό, όγκου 10 L.
- ◆ Γυάλινες φιάλες δειγμάτων 1 L βαθμονομημένες.
- ◆ Σωληνώσεις και πλαστικά μέρη από Teflon για σύνδεση των φιαλών με τα φυσίγγια SPE.
- ◆ Συσκευή διανομής αζώτου (manifold) 12 θέσεων.
- ◆ Αέριο άζωτο χρωματογραφικής καθαρότητας (99.9995 %).
- ◆ Φυσίγγια (cartridges) SPE, C18 (17% C) επικαλυμμένα, 500mg χωρητικότητας 6 ml (ENVI-18 της Supelco ή αντίστοιχα).

Η συσκευή SPE μαζί με τις σωληνώσεις της πλένεται περνώντας ακετόνη αναλυτικής καθαρότητας (περίπου 50 ml ανά θέση) με ροή 5ml/min και στη συνέχεια υπερκαθαρό νερό (περίπου 50ml ανά θέση) με ροή 5ml/min. Οι γυάλινες φιάλες δειγματοληψίας και οι φιάλες δειγμάτων της SPE καθαρίζονται διαδοχικά με απορρυπαντικό, απιονισμένο νερό, υπερκαθαρό νερό, ακετόνη αναλυτικής καθαρότητας και στη συνέχεια αφήνονται για στέγνωμα.

Η αναλυτική στήλη υγρής χρωματογραφίας με την οποία αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού των ΠΑΥς ήταν :C18, 250mm x 3.2mm, υλικού πληρώσεως 4μm (Pinnacle II ΠΑΥ της Restek)

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκε ο Υγρός Χρωματογράφος με ανιχνευτή Φασματογράφο Μάζας με τριπλό τετράπολο (LC-MS/MS της Thermo Finnigan TSQ Quantum Discovery, βλ. Κεφάλαιο 5.3.1.). Ωστόσο, ο ιοντισμός των μοριακών ιόντων επιτεύχθηκε με πηγή χημικού ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) και πηγή φωτο-ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric

pressure photo ionization, APPI). Για τον προσδιορισμό των ΠΑΥς, με το σύστημα LC-MS/MS, επιλέχθηκαν οι παρακάτω παράμετροι του φασματογράφου μάζας:

- ◆ Εφαρμοζόμενο δυναμικό (Spray Voltage) 5000 V
- ◆ Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature) 350 °C
- ◆ Παροχή αερίου εκνέφωσης N₂ (Sheath gas pressure) 30 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- ◆ Παροχή βοηθητικού αερίου N₂ (Auxilliary gas) 20 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- ◆ Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- ◆ Πίεση αερίου θραυσματοποίησης (αργού) (Collision gas pressure (argon)): (1.5 mTorr)
- ◆ Διαχωριστικότητα στο πρώτο και τρίτο τετράπολο : 0.7 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)
- ◆ Ενισχυτής σήματος (dopant) : Ανισόλη (20μl/min) από 0-12 min και από 18-60 min

Τα επιλεγμένα μητρικά και θυγατρικά ιόντα, οι αντίστοιχες ενδεικτικές ενέργειες διάσπασής τους (collision energies) και οι εφαρμοζόμενες τάσεις στις διατάξεις επιτάχυνσης και εστίασης των ιόντων (Tube lens offset) παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.7.

Πίνακας 5.7. Μητρικά και θυγατρικά ιόντα των υπό προσδιορισμό ουσιών

ΠΑΥ	Σχετική μοριακή ή μάζα (Da)	Χρόνος ανάσχεσης (min)	Μητρικό ιόν (m/z) [M] ⁺	Θυγατρικό ιόν (m/z) Q ₁ ¹	Θυγατρικό ιόν (m/z) Q ₂	[Q ₂]/[Q ₁] ² (RSD %)	Ενέργεια διάσπασης Q ₁ /Q ₂ (V)
Ναφθαλένιο	128	14,7	128	102	127	0.51 (8.5%)	33/35
Ανθρακένιο	178	24,0	178	176	152	0.99 (2.24%)	47/32
Φλορανθένιο	202	26,1	202	200	150	0.17 (1.40%)	70/50
Βενζο(β)φλορανθένιο	252	36,7	252	250	224	0.29 (3.45%)	54/58
Βενζο(κ)φλορανθένιο	252	38,2	252	250	224	0.24 (4.61%)	54/58
Βενζο(α)πυρένιο	252	39,9	252	250	224	0.20 (6.76%)	54/58
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	276	44,4	276	274	272	0.29 (7.49%)	53/70
Ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο	276	45,6	276	274	272	0.31 (6.79%)	53/70

¹ Ιόν ποσοτικοποίησης

² Λόγος ιόντων (εκφρασμένος ως μέσος λόγος εμβαδών των κορυφών με τις αντίστοιχες τιμές RSD% , για εύρος συγκεντρώσεων 1–100 μg L⁻¹ για τα έξι ΠΑΥς και 10-1000 μg L⁻¹ για τα Ναφθαλένιο, Φλορανθένιο)-ανάλυση εις τριπλούν.

Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών έγινε με την μέθοδο εσωτερικού προτύπου και την χρήση τριών δευτεριωμένων υδρογονανθράκων. Τα μητρικά και ένα θυγατρικό ιόν σε κάθε δευτεριωμένο αναλύτη αναφέρονται παρακάτω :

Ναφθαλένιο D-8[136.100→108.070],
Ανθρακένιο D-10[188.100→159.790],
Βενζο(α)πυρενίο D-12[264.090→260.000].

Συγκεκριμένα: το εμβαδόν της κορυφής του Ναφθαλενίου συσχετίστηκε με το εμβαδόν της κορυφής του Ναφθαλενίου-D8, τα εμβαδά των κορυφών Ανθρακενίου, Φλορανθενίου συσχετίστηκαν με το εμβαδό της κορυφής του Ανθρακενίου -D10, τα εμβαδά των κορυφών Βενζο(β)φλορανθενίου, Βενζο(κ)φλορανθενίου, Βενζο(α)πυρενίου, Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου, Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρενίου συσχετίστηκαν με το εμβαδό της κορυφής του Βενζο(α)πυρενίου-D12.

Πλήρης διαχωρισμός όλων των ΠΑΥς επιτεύχθηκε με την στήλη HPLC C18, 250mm x 3.2mm, υλικό πλήρωσεως 4μm (Pinnacle II ΠΑΥ της Restek), με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης, το οποίο ξεκινούσε από 50:50 νερό / ακετονιτρίλιο (Πίνακας 5.8).

Πίνακας 5.8. Πρόγραμμα έκλουσης για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των ΠΑΥς

Χρόνος (min)	Ροή (ml/min)	MeCN (%)	H ₂ O (%)
0	0.5	50	50
5	0.5	50	50
35	0.5	100	0
48	0.5	100	0
50	0.5	50	50
60	0.5	50	50

Η θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης ορίστηκε στους 30⁰C και ο όγκος της ένεσης ορίστηκε στα 50 μl.

Για την παρασκευή διαλυμάτων των οκτώ ΠΑΥς χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα διαλύματα των ουσιών σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 100 μg/ml. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε διάλυμα μίγματος ΠΑΥς, συγκέντρωσης 1 μg/ml για κάθε ΠΑΥ, με προσθήκη 100 μl από κάθε αρχικό διάλυμα μεμονωμένης ουσίας (100 μg/ml) (εκτός από Ναφθαλένιο και Φλορανθένιο από τα οποία προστίθενται 1000μl και η τελική συγκέντρωση είναι 10 μg/ml) και αραιώση στα 10 ml με ακετονιτρίλιο. Το μίγμα αυτό ονομάζεται διάλυμα S1 και φυλάσσεται μακριά από άμεσο φως, σε ψύξη, για διάστημα όχι μεγαλύτερο από 6 μήνες. Από το διάλυμα S1, παρασκευάστηκε διάλυμα μίγματος ΠΑΥ 0.1 μg/ml εκτός από Ναφθαλένιο και Φλορανθένιο στα οποία η συγκέντρωση είναι 1 μg/ml με προσθήκη 1000 μl διαλύματος S1 σε 10 ml ακετονιτρίλιου (διάλυμα S2).

Ξεχωριστά, παρασκευάστηκαν μεμονωμένα διαλύματα των 3 δευτεριωμένων ΠΑΥ, συγκέντρωσης 10 μg/ml για κάθε δευτεριωμένο ΠΑΥ, με προσθήκη 500 μl από κάθε αρχικό διάλυμα μεμονωμένης ουσίας (200 μg/ml) και αραιώση στα 10 ml με ακετονιτρίλιο. Στη

συνέχεια παρασκευάστηκε μίγμα των 3 δευτεριωμένων ΠΑΥ, συγκέντρωσης 0.25 μg/ml για Ανθρακένιο D-10, Βενζο(α)πυρένιο D-12 και 2.5 μg/ml για Ναφθαλένιο D-8, με προσθήκη 250 μl από κάθε διάλυμα μεμονωμένης ουσίας (εκτός από Ναφθαλένιο D-8 από το οποίο προστίθενται 2500 μl) και αραιώση στα 10 ml με ακετονιτρίλιο. Το μίγμα αυτό ονομάζεται διάλυμα D-S1 και φυλάσσεται μακριά από άμεσο φως, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για διάστημα όχι μεγαλύτερο από 6 μήνες.

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν μίγματα προτύπων διαλυμάτων των 8 αναλυτών, από τα παραπάνω διαλύματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.9 που ακολουθεί:

Πίνακας 5.9. Διαλύματα βαθμονόμησης ΠΑΥς

Διάλυμα βαθμονόμησης	Προστιθέμενος όγκος διαλύματος διάλυμα S1	Τελικός Όγκος διαλύματος	Τελική συγκέντρωση ΠΑΥς στο διάλυμα	Τελική συγκέντρωση Ναφθαλενίου, Φλορανθενίου
StdB1	10 μl	10 ml	1 ng/ml	10 ng/ml
StdB2	50 μl	10 ml	5 ng/ml	50 ng/ml
StdB3	100 μl	10 ml	10 ng/ml	100 ng/ml
StdB4	250 μl	10 ml	25 ng/ml	250 ng/ml
StdB5	500 μl	10 ml	50 ng/ml	500 ng/ml
StdB6	750 μl	10 ml	75 ng/ml	750 ng/ml
StdB7	1000 μl	10 ml	100 ng/ml	1000 ng/ml
Σε όλα τα παραπάνω διαλύματα (StdB1-StdB7) προστίθεται σταθερή ποσότητα 3 εσωτερικών προτύπων δευτεριωμένων ΠΑΥς				
Δευτεριωμένα ΠΑΥς	Προστιθέμενος όγκος διαλύματος ΠΑΥ (διάλυμα D-S1) (μl)	Τελικός όγκος διαλύματος (ml)	Τελική συγκέντρωση Δευτεριωμένου ΠΑΥ στο διάλυμα (ng/ml)	
Ναφθαλένιο D-8	1000	10	250	
Ανθρακένιο D-10	1000	10	25	
Βενζο(α)πυρένιο D-12	1000	10	25	

5.4.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης για την ανάλυση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων

Στην παρούσα μελέτη, για την απομόνωση των ΠΑΥς χρησιμοποιήθηκαν τα φυσίγγια (cartridges) SPE, C18 (17% C) επικαλυμμένα, 500mg χωρητικότητας 6 ml (ENVI-18 της Supelco). Η πορεία της εκχύλισης και παραλαβής των αναλυτών από πόσιμα και επιφανειακά νερά είχε ως εξής:

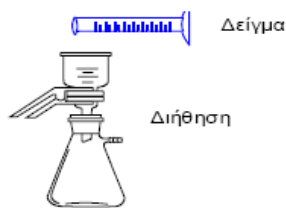
Τα φυσίγγια SPE προετοιμάζονται περνώντας διαδοχικά ~2x5ml Διχλωρομεθάνιο, ~2x5ml Μεθανόλη και ~2x5ml νερό, με ροή ~5ml/min, με χρήση κενού.

Στη συνέχεια συνδέονται οι σωλήνες Teflon με τα φυσίγγια και τις φιάλες δειγμάτων και αφήνεται το δείγμα να περάσει μέσα από τα φυσίγγια με ροή ~5mL/min, με χρήση κενού. Η ροή ελέγχεται από την πτώση της στάθμης των δειγμάτων στις βαθμονομημένες φιάλες με τη βοήθεια χρονομέτρου και ρυθμίζεται από τη βαλβίδα της αντλίας, το ρυθμιστή της συστοιχίας και τους ρυθμιστές στη βάση κάθε φυσιγγίου. Αφού περάσει όλο το δείγμα, αποσυνδέονται οι σωλήνες Teflon και τα φυσίγγια ξηραίνονται για ~40 min με διαβίβαση αέρα υπό κενό.

Αφού τελειώσει το στάδιο της ξήρανσης, προσθέτουμε περίπου 1 g θειϊκό νάτριο σε κάθε φυσιγγίο. Στη συνέχεια, τοποθετούμε στη συσκευή SPE τον υποδοχέα φιαλιδίων και τοποθετούμε ένα άδειο σωλήνα των 10 ml κάτω από κάθε σύριγγα της συσκευής. Η φιάλη του δείγματος εκπλένεται δύο φορές με 5 ml διχλωρομεθανίου, το οποίο στη συνέχεια περνά από το φυσιγγίο. Ακολουθεί νέα έκλυση του φυσιγγίου με 5ml Διχλωρομεθάνιο, με ροή όχι μεγαλύτερη από 5ml/min (ελαφρό κενό). Στο τέλος της έκλυσης αφήνουμε το κενό για λίγα δευτερόλεπτα, ώστε να συλλεχθεί όλο το έκλυσμα (που είναι περίπου 10 ml).

Οι σωλήνες μεταφέρονται στη συστοιχία διανομής αερίου αζώτου και τα δείγματα εξατμίζονται μέχρι περίπου 0,5 ml με ρεύμα αζώτου στους 25 °C. Προστίθενται 1,5 ml ακετονιτριλίου και επαναλαμβάνεται η εξάτμιση μέχρι περίπου 0,5 ml. Τα εκχυλίσματα μεταφέρονται σε ογκομετρικές φιάλες του 1 ml με τη βοήθεια μικρών όγκων ακετονιτριλίου. Ρυθμίζεται ο όγκος στο 1ml σε ακετονιτρίλιο. Στη συνέχεια γίνεται μεταφορά των εκχυλισμάτων σε φιαλίδια δειγματολήπτη.

Τα ως άνω παρασκευασμένα εκχυλίσματα καλό είναι να αναλύονται άμεσα. Σε περιπτώσεις που αυτό δεν είναι δυνατό, μπορούν να φυλαχθούν στο ψυγείο (2-8 °C) για διάστημα έως 40 ημέρες. Στο Σχήμα 5.3 παρουσιάζεται σχηματικά η πειραματική διαδικασία της εκχύλισης πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων από υδατικά δείγματα.



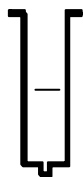
1000 ml δείγμα νερού

Προστίθεται $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ στα πόσιμα νερά ενώ τα επιφανειακά νερά διηθούνται με φίλτρο υάλου
Ακολουθεί εμβολιασμός με εσωτερικά πρότυπα δευτεριωμένων ΠΑΥς



Προετοιμασία φυσιγγίων με 2x5ml
Διχλωρομεθανίου, 2x5ml μεθανόλης και
2x5ml νερού.
Ροή δείγματος σε διακριτές σταγόνες,
περίπου 5ml/min. Ξήρανση για 40min.

SPE C18 (6 ml)



Προσθήκη 1g θειικού νατρίου. Έκλουση με 5 ml Διχλωρομεθανίου (5ml/min),
ξήρανση με ρεύμα αζώτου στους 25 °C μέχρι 0,5ml, προσθήκη 1,5 ml ακετονιτριλίου
και ξήρανση μέχρι 0,5ml. Μεταφορά και ρύθμιση του όγκου σε ογκομετρική φιάλη
του 1ml.



LC-MS/MS

50 μl ένεση

Σχήμα 5.3. Σχηματική παρουσίαση της πειραματικής διαδικασίας εκχύλισης-προσυγκέντρωσης δειγμάτων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογοναθράκων.

5.5 Επικύρωση αναλυτικών μεθόδων

Ως «επικύρωση» νοείται η επιβεβαίωση, κατόπιν εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για συγκεκριμένη χρήση. Η επικύρωση των προτεινόμενων αναλυτικών μεθόδων αποτελεί βασική προϋπόθεση διαφόρων διεθνών προτύπων, όπως είναι το ISO 17025 και πρέπει να είναι τόσο εκτεταμένη, όσο είναι απαραίτητο για να ικανοποιήσει τις ανάγκες της δεδομένης εφαρμογής ή του πεδίου εφαρμογής. Στα πλαίσια της επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων πρέπει να περιλαμβάνονται: α) προδιαγραφή των απαιτήσεων (κριτήρια αποδοχής), β) μελέτη / προσδιορισμός των αναλυτικών χαρακτηριστικών των μεθόδων, γ) έλεγχος ότι οι απαιτήσεις μπορούν να ικανοποιηθούν με τη χρήση της μεθόδου και γ) δήλωση για την εγκυρότητα (καταλληλότητα) της μεθόδου.

Σε αυτή τη διατριβή, η επικύρωση των προτεινόμενων μεθόδων προσδιορισμού οργανικών ρύπων αποτέλεσε σημαντικό στόχο, προκειμένου οι μέθοδοι αυτές να θεωρηθούν κατάλληλες για τον σκοπό για τον οποίο επιλέχθηκαν και να παράγουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Οι παράμετροι επικύρωσης/επαλήθευσης που εκτιμήθηκαν ήταν:

- Η επάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού των υπό προσδιορισμό ουσιών

Η διαχωριστικότητα (Resolution) για κάθε ζεύγος κορυφών, που εκφράζεται με τον συντελεστή διαχωρισμού, R_s , υπολογίζεται με βάση τα ληφθέντα χρωματογραφήματα πρότυπων διαλυμάτων. Από τα ληφθέντα χρωματογραφήματα καταγράφονται οι χρόνοι ανάλυσης (t_R) κάθε ουσίας. Οι συντελεστές διαχωρισμού (R_s) για κάθε ζεύγος γειτονικών ουσιών δίδεται από τον τύπο:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_{b1} + w_{b2})$$

Όπου: t_{R1} , t_{R2} , οι χρόνοι ανάλυσης δύο γειτονικών κορυφών, w_{b1} , w_{b2} , το μέσο πλάτος δύο γειτονικών κορυφών μετρούμενο στο μέσο ύψος της κορυφής. Τα κριτήρια αποδοχής που τέθηκαν για την επάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού των υπό προσδιορισμό ουσιών ήταν:

1. $t_{R2} - t_{R1} > 0,2 \text{ min}$ για κάθε ζεύγος γειτονικών κορυφών
2. % RSD t_R για τους χρόνους ανάλυσης < 1 .
3. $R_s > 1$ για όλα τα ζεύγη γειτονικών κορυφών

- Η επιτυχής ταυτοποίηση των ουσιών (στις μεθόδους φασματομετρίας μάζας).

Η επιτυχής ταυτοποίηση των ουσιών με φασματομετρία μάζας μπορεί να γίνει με τεχνικές MS, όπως η καταγραφή των φασμάτων πλήρους σάρωσης ή η παρακολούθηση

επιλεγμένου ιόντος (SIM) καθώς και με τεχνικές MS-MSⁿ, όπως η παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (SRM).

Εάν ο προσδιορισμός με φασματομετρία μάζας πραγματοποιείται με θραυσματογράφημα, το μοριακό ιόν πρέπει κατά προτίμηση να είναι ένα από τα επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα. Σε ότι αφορά τα επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα, αυτά δεν πρέπει να προέρχονται αποκλειστικά από το ίδιο μέρος του μορίου. Ο λόγος σήματος προς θόρυβο για κάθε διαγνωστικό ιόν πρέπει να είναι $\geq 3:1$. Ακόμη, οι σχετικές εντάσεις των ανιχνευθέντων ιόντων, εκφραζόμενες ως ποσοστό της έντασης των ιόντων ή των προϊόντων της μετάπτωσης με τη μεγαλύτερη ένταση, πρέπει να αντιστοιχούν σε εκείνες του προτύπου βαθμονόμησης.

- Η εκλεκτικότητα του προσδιορισμού και οι παρεμποδίσεις.

Μια μέθοδος πρέπει να είναι σε θέση να διακρίνει την αναλυτέα ουσία από άλλες ουσίες υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Πρέπει να γίνεται εκτίμηση σχετικά με την έκταση στην οποία αυτό είναι δυνατό να συμβεί. Πρέπει να χρησιμοποιούνται στρατηγικές για την υπέρβαση τυχόν προβλεπτών παρεμποδίσεων. Έχει πρωταρχική σημασία να διερευνάται η παρεμπόδιση που μπορεί να προκληθεί από συστατικά της μήτρας. Για τις μεθόδους στις οποίες πραγματοποιείται ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών αναλυτέων ουσιών είναι επιβεβλημένο να αποκλειστούν προηγουμένως οι πιθανές σχετικές παρεμποδίσεις. Γι αυτό το σκοπό εκτελούνται αναλύσεις σε δείγματα τα οποία θεωρούνται αρχικώς «τυφλά».

- Η γραμμικότητα και το εύρος των μετρήσεων.

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα των αναλυτέων ουσιών και εγχύονται στο αναλυτικό σύστημα μέτρησής τους. Κατασκευάζονται πρότυπες καμπύλες της απόκρισης του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση κάθε αναλύτη. Με βάση τα αποτελέσματα γίνεται εκτίμηση της γραμμικότητας και υπολογίζεται ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 της ευθείας που προκύπτει.

- Η πιστότητα (precision) της μεθόδου

Ως πιστότητα νοείται η εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών υπό ρητά καθορισμένες (προκαθορισμένες) συνθήκες. Το μέτρο της πιστότητας εκφράζεται συνήθως με όρους μη πιστότητας και υπολογίζεται ως τυπική απόκλιση (RSD%) του αποτελέσματος της δοκιμής. Μικρότερη πιστότητα προσδιορίζεται με μια μεγαλύτερη τυπική απόκλιση. Η πιστότητα της μεθόδου υπολογίζεται με χρήση των δεδομένων που προέκυψαν από τα πειράματα για τον προσδιορισμό των ανακτήσεων. Εκφράζεται ως ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα (repeatability, %RSD_r) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (reproducibility, %RSD_R). Ως συνθήκες επαναληψιμότητας νοούνται οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα ανεξάρτητων δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο εργαστήριο, με

τον ίδιο χειριστή που χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό. Από την άλλη πλευρά, ως συνθήκες αναπαραγωγιμότητας νοούνται οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα των δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο σε διαφορετικά εργαστήρια με διαφορετικούς χειριστές που χρησιμοποιούν διαφορετικό εξοπλισμό ή με την ίδια μέθοδο στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή αλλά σε διαφορετικές μέρες.

- Η ορθότητα-ανάκτηση (trueness-recovery) της μεθόδου.

Ως ανάκτηση νοείται το ποσοστό της αληθούς συγκέντρωσης μιας ουσίας που ανακτάται κατά την αναλυτική διαδικασία. Η ορθότητα των μετρήσεων αξιολογείται μέσω ανάκτησης των προσθηκών των γνωστών ποσοτήτων αναλυτών ουσιών σε άγνωστα δείγματα. Εφιστάται η προσοχή στο γεγονός ότι οι προστιθέμενοι αναλύτες δεν είναι χημικώς δεσμευμένοι με την πραγματική μήτρα, όπως, και ότι συνεπώς τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την προσέγγιση αυτή έχουν μικρότερη εγκυρότητα από εκείνα που λαμβάνονται με τη χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς. Η ανάκτηση της μεθόδου υπολογίζεται για κάθε αναλύτη με τη βοήθεια της ακόλουθης σχέσης:

$$\% \text{ ανάκτηση (\% R)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

όπου

C_1 = η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο εμβολιασμένο δείγμα.

C_2 = η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο τυφλό δείγμα.

C_3 = η συγκέντρωση εμβολιασμού.

Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικότερα η μελέτη των ορίων ανίχνευσης και της ανθεκτικότητας των προτεινόμενων μεθόδων.

5.5.1. Υπολογισμός ορίων ανίχνευσης

Ο προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) των προτεινόμενων μεθόδων πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους:

ΜΕΘΟΔΟΣ A²¹³: Σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο υπολογίζεται το όριο ανίχνευσης του αναλυτικού οργάνου, μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης προτύπων ουσιών, από τον τύπο:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 * S_{res}}{a}$$

Όπου:

- a , η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης κάθε αναλύτη

- S_{res} , δίνεται από τον τύπο :
$$S_{res} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_{est})^2}{n - 2}}$$

Όπου:

- y , η πραγματική απόκριση (εμβαδό κορυφής) σε κάθε συγκέντρωση αναλύτη
- y_{est} , η εκτιμώμενη απόκριση, για την αντίστοιχη συγκέντρωση αναλύτη, υπολογισμένη από την καμπύλη βαθμονόμησης, (εμβαδό κορυφής)
- n , ο αριθμός των σημείων της καμπύλης βαθμονόμησης

ΜΕΘΟΔΟΣ B²¹⁴: Σύμφωνα με την δεύτερη μέθοδο υπολογίζεται το όριο ανίχνευσης όλης της μεθόδου συνολικά από την τυπική απόκλιση επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών. Γίνεται χρήση των δεδομένων που προέκυψαν από τα πειράματα για τον προσδιορισμό της αναπαραγωγιμότητας στο χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη. Ο υπολογισμός γίνεται βάσει του τύπου:

$$\text{LOD} = S * t_{(n-1, 0.99)}$$

Όπου:

- S , η τυπική απόκλιση επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών
- t , η τιμή student (όπου $t_{(5, 0.99)} = 4.032$)
- n , ο αριθμός των επαναλήψεων ($n-1$ βαθμοί ελευθερίας)
- 0.99 το επίπεδο εμπιστοσύνης

Σε κάθε περίπτωση τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης που προέκυπταν από τις παραπάνω μεθόδους επιβεβαιώνονταν και πειραματικά.

Όσον αφορά στις προτεινόμενες SPME μεθόδους, τα όρια ανίχνευσης προσδιορίστηκαν μέσω της ανάλυσης εμβολιασμένων δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης και συγκεκριμένα εμβολιασμένων δειγμάτων με επίπεδα αναλυτών που δίνουν λόγο σήματος προς θόρυβο μεγαλύτερο του 3 ($S/N=3$)²¹⁵.

5.5.2. Μελέτη ανθεκτικότητας αναλυτικών μεθόδων

Ως ανθεκτικότητα νοείται η σταθερότητα μιας μεθόδου σε μικρές μεταβολές στις πειραματικές συνθήκες, οι οποίες είναι δυνατόν να συμβούν κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε βάθος χρόνου (π.χ. σταθερότητα των αντιδραστηρίων, σύνθεση του δείγματος, pH, θερμοκρασία).

Για να εντοπιστούν οι παράγοντες που είναι δυνατό να μεταβληθούν από τις καθορισμένες τιμές τους και ενδεχομένως να επηρεάσουν το αποτέλεσμα μιας προτεινόμενης μεθόδου, αποτυπώθηκαν οι αναλυτικές πορείες σε διαγράμματα ροής και στη συνέχεια έγινε επιλογή των κρίσιμων παραγόντων καθώς και του εύρους στο οποίο μπορεί ο κάθε ένας να μεταβληθεί. Η μελέτη της επίδρασης παραγόντων πραγματοποιήθηκε με πειραματικούς σχεδιασμούς επιφανειών-απόκρισης και συγκεκριμένα τύπου Box-Behnken. Με τους σχεδιασμούς αυτούς είναι δυνατή η μελέτη των πρωτοβάθμιων και δευτεροβάθμιων επιδράσεων κάθε παράγοντα ξεχωριστά, καθώς και των αλληλεπιδράσεων των παραγόντων με πολύ μικρό αριθμό πειραμάτων²¹⁶. Για παράδειγμα, για τρεις παράγοντες σε τρία επίπεδα ο σχεδιασμός Box-Behnken περιλαμβάνει μόλις 15 πειράματα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.10, αντί 27 πειράματα που θα περιλάμβανε ο κλασικός παραγοντικός σχεδιασμός.

Πίνακας 5.10. Συνδυασμός πειραμάτων για πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken τριών παραγόντων

X_1	X_2	X_3	Αριθμός πειραμάτων
± 1	± 1	0	4
± 1	0	± 1	4
0	± 1	± 1	4
0	0	0	3

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι πιθανοί συνδυασμοί πειραμάτων για τρεις παράγοντες (X_1 , X_2 , X_3) σε τρία επίπεδα διακύμανσης (+1, 0, -1).

Ο καθορισμός της σειράς των πειραμάτων και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγιναν με το πρόγραμμα στατιστικής Minitab. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τυχαιοποιημένη σειρά σε μία αναλυτική παρτίδα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την εφαρμογή ενός δευτεροβάθμιου μοντέλου. Η εξίσωση που περιγράφει το μοντέλο περιλαμβάνει όρους για τις γραμμικές (α' βαθμού) επιδράσεις, τις δευτεροβάθμιες επιδράσεις καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

Για να εκτιμηθεί το κατά πόσο οι διάφορες επιδράσεις είναι στατιστικώς σημαντικές, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές P , οι οποίες συγκρίνονται με την τιμή $\alpha=0.05$ (επίπεδο εμπιστοσύνης 95%). Όταν $P<\alpha$, η επίδραση θεωρείται σημαντική.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού πολυχλωριωμένων διφαινυλίων (PCBs)

6.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού PCBs με την τεχνική HS-SPME

Εισαγωγή

Η εκχύλιση αναλυτών με την τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης, βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της υδατικής ή εναέριας υπερκείμενης φάσης του δείγματος και της στατικής φάσης του πολυμερούς υλικού μιας ίνας (SPME / HS-SPME). Η τεχνική HS-SPME αποτελεί μέθοδο ισορροπίας τριών φάσεων και συγκεκριμένα μεταφορά των αναλυτών από την υγρή φάση του δείγματος στον εναέριο υπερκείμενο χώρο και από εκεί στο πολυμερές υλικό της ίνας. Ωστόσο η ισορροπία αυτή δεν επιτυγχάνεται πάντα αφού συχνά δεν είναι το ζητούμενο¹⁶². Επομένως, η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν την HS-SPME τεχνική έχει ιδιαίτερη σημασία προκειμένου να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά εκχύλισης των αναλυτών και επομένως να αναπτυχθούν ευαίσθητες αναλυτικές μέθοδοι⁶⁶. Το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη μεθόδου είναι η επιλογή κατάλληλης ίνας για τον προσδιορισμό των προς ανάλυση ουσιών. Έπειτα πρέπει να επιλεγούν οι καταλληλότερες συνθήκες εκχύλισης και συγκεκριμένα η κατάλληλη ιοντική ισχύς της υδατικής φάσης του δείγματος, η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης των αναλυτών από την ίνα καθώς και ο χρόνος - θερμοκρασία εκρόφησης των αναλυτών από την ίνα.

Στη συνέχεια, η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού των προς ανάλυση ουσιών εκτιμήθηκε ως προς τα χαρακτηριστικά επίδοσής της, σύμφωνα με διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025), προκειμένου να εκτιμηθεί η εφαρμοσιμότητά της.

6.1.1. Επιλογή ίνας και θερμοκρασίας-χρόνου εκρόφησης αναλυτών

Η ίνα που επιλέχθηκε για την ποσοτική προσρόφηση των PCBs από υδατικά δείγματα, είναι εμπορικά διαθέσιμη και χαρακτηρίζεται από επικάλυψη 100μm πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (polydimethylsiloxane, PDMS) περιμετρικά μιας ράβδου πυριτίας (silica).

Σε ό,τι αφορά την βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας εκρόφησης των ουσιών από την ίνα συνήθως εφαρμόζεται η μέγιστη επιτρεπόμενη θερμοκρασία λειτουργίας της ίνας (οδηγίες κατασκευαστή) στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου. Δευτερευόντως

καταγράφεται ο πειραματικός χρόνος που απαιτείται για την πλήρη απομάκρυνση των ουσιών από το πολυμερές υλικό της ίνας. Στην περίπτωση των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων η ίνα εκτίθονταν για 2min εκρόφησης στους 280°C, ενώ πριν από νέα προσρόφηση αναλυτών, εκτίθονταν για άλλα 5min προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα επιμόλυνσης των δειγμάτων. Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται τα % ποσοστά κατακράτησης (carry over) PCBs στην ίνα μετά τα 2 πρώτα λεπτά εκρόφησης, για διάφορες συγκεντρώσεις των 7 αναλυτών.

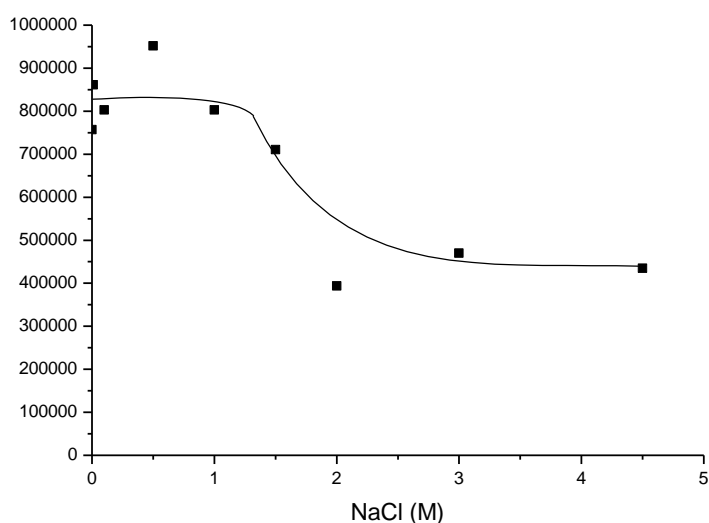
Πίνακας 6.1. Ποσοστά κατακράτησης (carry over) PCBs στην ίνα μετά τα πρώτα 2min εκρόφησης στον εισαγωγέα του αεριοχρωματογράφου.

Συγκέντρωση PCB στην υδατική φάση (μgL^{-1})	% ποσοστό κατακράτησης PCBs στην ίνα						
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
2	3	3	3	4	2	3	8
5	1	2	3	3	2	2	7
10	1	1	5	3	1	2	7

6.1.2. Αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης του δείγματος

Έχει παρατηρηθεί ότι η σταθερά κατανομής ουδέτερων οργανικών μορίων ευνοείται με την αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης των δειγμάτων¹⁶⁴. Ωστόσο, η εκχύλιση αναλυτών με την τεχνική HS-SPME είναι πιο αποδοτική όταν αυξάνεται η ιοντική ισχύς των διαλυμάτων που περιέχουν πολικούς αναλύτες (salt effect).

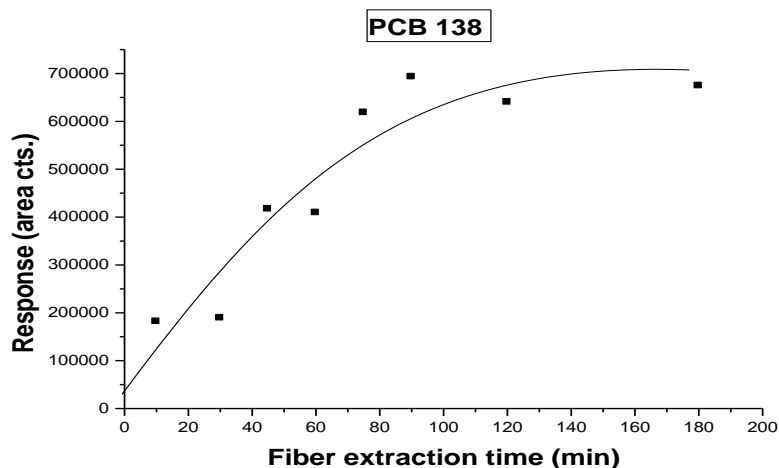
Στην προτεινόμενη μέθοδο μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της ιοντικής ισχύος υδατικών δειγμάτων του PCB 153 (εξαχλωροδιφαινύλιο), τα οποία περιείχαν διάφορες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl) από 0 έως 4.5 M (Σχήμα 6.1). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε 2 ml εμβολιασμένων υδατικών δειγμάτων PCB153, συγκέντρωσης $5\mu\text{gL}^{-1}$, θερμοκρασίας 60°C, υπό συνεχή ανάδευση. Τα υπόλοιπα PCBs εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά.



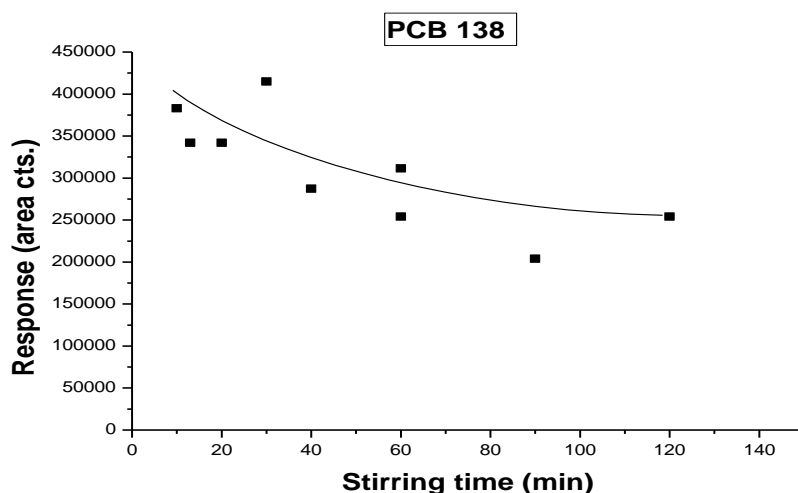
Σχήμα 6.1. Επίδραση της αύξησης της ιοντικής ισχύος σε εμβολιασμένο υδατικό διάλυμα PCB 153 συγκέντρωσης $5\mu\text{gL}^{-1}$.

6.1.3. Επίδραση του χρόνου ανάδευσης και εκχύλισης των PCBs στην HS-SPME μέθοδο

Η μεταβολή του χρόνου έκθεσης της ίνας στον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος μετρήθηκε σε εμβολιασμένο δείγμα PCB 138 (εξαχλωροδιφαινύλιο) συγκέντρωσης $5\mu\text{gL}^{-1}$. Πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων: Στην πρώτη σειρά, ο χρόνος ανάδευσης των υδατικών δειγμάτων κρατήθηκε σταθερός (30 min) ενώ ταυτόχρονα μεβάλλονταν ο χρόνος έκθεσης της ίνας στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων (Σχήμα 6.2). Στην άλλη σειρά πειραμάτων, μεταβάλλονταν ο χρόνος ανάδευσης των δειγμάτων και μετά το πέρας της ανάδευσης η ίνα εκτίθονταν στον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων για σταθερό χρονικό διάστημα (30 min) (Σχήμα 6.3)



Σχήμα 6.2. Επίδραση του χρόνου έκθεσης της ίνας στην εναέρια υπερκείμενη φάση υδατικού διαλύματος PCB 138 συγκέντρωσης $5\mu\text{gL}^{-1}$, στην HS-SPME τεχνική.

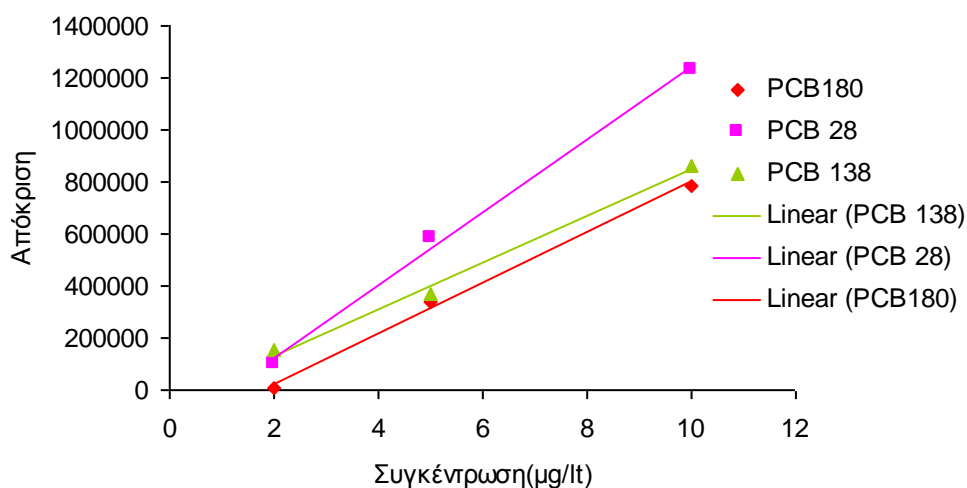


Σχήμα 6.3. Επίδραση του χρόνου ανάδευσης υδατικού διαλύματος PCB 138 συγκέντρωσης $5\mu\text{gL}^{-1}$, στην HS-SPME τεχνική.

6.1.4. Σύγκριση HS-SPME και SPME μεθόδων για την ανάλυση των PCBs

Η ανάλυση των PCBs πραγματοποιήθηκε και στην υγρή φάση του δείγματος, με την ίδια PDMS ίνα, για συγκριτικούς λόγους. Όλα τα εμβολιασμένα δείγματα νερού αναδεύονταν για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αμέσως μετά η ίνα εκτίθονταν στην υγρή φάση των δειγμάτων για ακόμα 30min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις από $2-10\mu\text{gL}^{-1}$, για τρία πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB28, PCB138, PCB180). Στο Σχήμα 6.4 παρουσιάζονται οι καμπύλες γραμμικότητας για

τα τρία PCBs και στον Πίνακα 6.2 αναφέρονται οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης των καμπυλών αυτών καθώς και τα ποσοστά ανάκτησης της μεθόδου σε σύγκριση με την HS-SPME τεχνική.

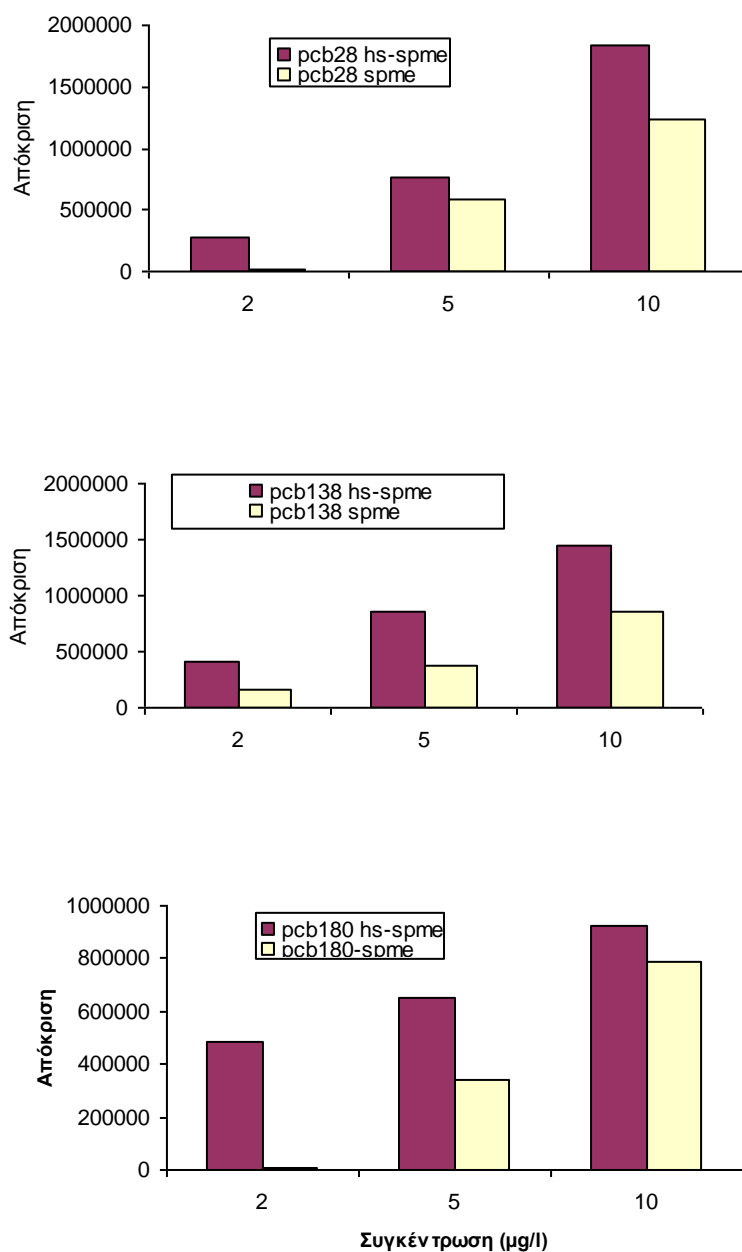


Σχήμα 6.4 .Καμπύλες γραμμικότητας για τρία PCBs με την τεχνική SPME

Πίνακας 6.2. Σύγκριση συντελεστών γραμμικής συσχέτισης και ποσοστών ανάκτησης με τις τεχνικές SPME/ HS και SPME

Εύρος δοκιμών 2-10 $\mu\text{g l}^{-1}$	HS-SPME		SPME	
	Συντελεστής γραμμικότητας (R^2)	Ανάκτηση (%)	Συντελεστής γραμμικότητας (R^2)	Ανάκτηση (%)
PCB 138	0,9961	115	0,994	110
PCB180	0,9951	85	0,9969	105
PCB 28	0,9767	123	0,9888	135

Ωστόσο η σύγκριση των αποκρίσεων των τριών PCBs με τις τεχνικές SPME και HS-SPME, σε κάθε συγκέντρωση, απεικονίζεται στο Σχήμα 6.4 και ο λόγος των αποκρίσεων στον Πίνακα 6.3.



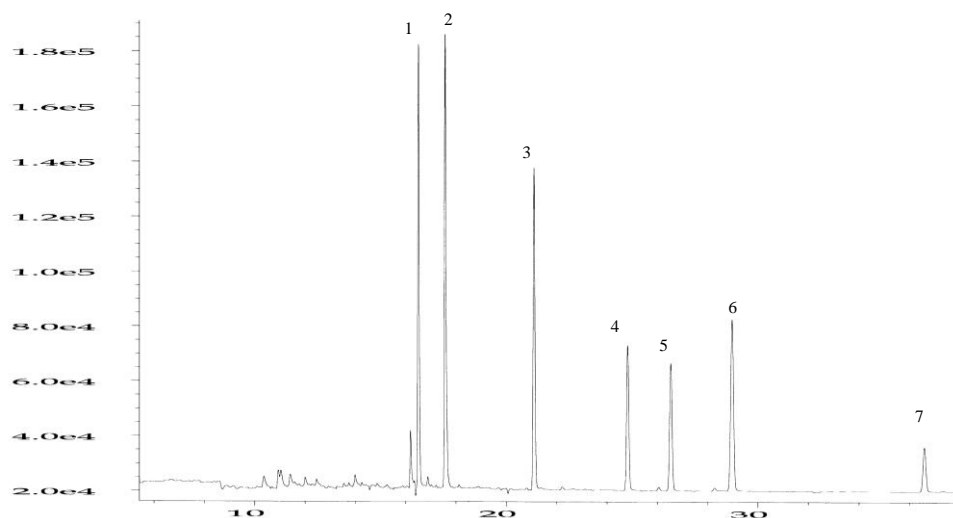
Σχήμα 6.4. Σύγκριση των αποκρίσεων των τριών PCBs (PCB 28, PCB 138 και PCB 180) με τις τεχνικές HS-SPME (κόκκινο χρώμα) και SPME (κίτρινο χρώμα)

Πίνακας 6.3. Λόγος των αποκρίσεων των τριών PCBs με τις τεχνικές SPME και HS-SPME για συγκέντρωση PCB 5 µgL⁻¹

	Λόγος αποκρίσεων (HSSPME/SPME)
PCB 28 (τριγλωροδιφαινύλιο)	1,3
PCB138 (εξάγλωροδιφαινύλιο)	2,3
PCB180 (επτάγλωροδιφαινύλιο)	1,9

Στο Σχήμα 6.5 απεικονίζεται ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα πόσιμου νερού εμβολιασμένο με μίγμα προτύπων των επτά PCBs, στο οποίο η συγκέντρωση κάθε ενός PCB

ήταν $5 \mu\text{g l}^{-1}$. Ο προσδιορισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την προτεινόμενη HS-SPME μέθοδο.



Σχήμα 6.5. GC/ECD χρωματογράφημα πόσιμου νερού εμβολιασμένο με μίγμα προτύπων των επτά PCBs, συγκέντρωσης $5 \mu\text{g l}^{-1}$ ανά PCB. (1) PCB28, (2) PCB52, (3) PCB101, (4) PCB118, (5) PCB153, (6) PCB138, (7) PCB180.

6.1.5. Συντελεστές κατανομής των PCBs στην τεχνική HS-SPME

Η τεχνική SPME είναι αναλυτική τεχνική ισορροπίας και ποσοτική μεταφορά των προς ανάλυση ουσιών στην πολυμερή φάση μιας ίνας είναι μάλλον απίθανη. Η διερεύνηση του ποσοστού των PCBs που προσροφάται στην ίνα σε σχέση με την συνολική ποσότητα των αναλυτών στην υγρή φάση του δείγματος έχουν μελετηθεί στη βιβλιογραφία με βάση τους συντελεστές κατανομής των PCBs στην επιφάνεια και στον όγκο του πολυμερούς υλικού της ίνας.²¹⁷

Ωστόσο, στην HS-SPME τεχνική ο συντελεστής κατανομής των αναλυτών μεταξύ του πολυμερούς υλικού της ίνας και του δείγματος (K_{fs}), περιλαμβάνει κατανομή των αναλυτών αφενός ανάμεσα στην υγρή και την αέρια φάση του δείγματος και αφετέρου στο πολυμερές υλικό της ίνας (και συγκεκριμένα στον όγκο της ίνας) σύμφωνα με τον τύπο :

$$K_{fs} = \frac{n(K_{hs}V_h + V_s)}{V_f(C_0V_s - n)}$$

Όπου, n είναι η ποσότητα της ουσίας που κατανέμεται στο πολυμερές υλικό της ίνας, V_h είναι ο όγκος του εναέριου υπερκείμενου χώρου του φυαλιδίου στο οποίο γίνεται η ανάλυση, V_s ο όγκος του δείγματος, V_f ο όγκος του πολυμερούς υλικού της ίνας και C_0 η αρχική συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στο υπόστρωμα. Οι συντελεστές κατανομής των ουσιών

(K_{hs}) ανάμεσα στην υδατική και την αέρια φάση των προς ανάλυση ουσιών υπολογίστηκαν από τις σταθερές Henry, στους 25°C, σύμφωνα με τον τύπο:

$$K_{hs} = \frac{K_H}{RT}$$

(Πίνακας 6.4).²¹⁸ Οι συντελεστές K_{fs} , προσδιορίστηκαν και για τους 3 αναλύτες σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (2, 5 και 10 $\mu\text{g L}^{-1}$). Σε κάθε πείραμα οι όγκοι της ίνας, του δείγματος, του εναέριου υπερκείμενου χώρου του δείγματος και της θερμοκρασίας εκχύλισης παρέμεναν σταθεροί ($V_f = 6.12 \times 10^{-4}$ mL, $V_s = 2$ mL, $V_h = 2$ mL and $T = 333.15$ K). Η ποσότητα της ουσίας που προσροφάται κάθε φορά από την ίνα συγκρίνεται και ποσοτικοποιείται άμεσα με αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα σε οργανικό διαλύτη (ισοοκτάνιο στην περίπτωση των PCBs).

Πίνακας 6.4. Συντελεστές κατανομής K_{fs} των PCBs στην πολυμερική ίνα PDMS

Συγκέντρωση ($\mu\text{g L}^{-1}$)	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 153	PCB 138	PCB 180
2	98	127	105	88	87	87	51
5	105	382	91	84	63	68	30
10	128	430	85	70	43	60	21

6.1.6. Γραμμικότητα της προτεινόμενης μεθόδου

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους της μεθόδου αναλύθηκαν εμβολιασμένα δείγματα υπερκάθαρου νερού, των επτά PCBs. Κάθε σειρά εμβολιασμένων δειγμάτων αποτελούνταν από επτά συγκεντρώσεις και κάθε συγκέντρωση αναλύονταν εις τριπλούν. Το εύρος συγκεντρώσεων για κάθε αναλύτη καθώς και τα αποτελέσματα γραμμικότητας της μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5.

Η πρότυπη καμπύλη για κάθε PCB προέκυψε μετά από γραμμική συσχέτιση μεταξύ του εμβαδού της κορυφής για κάθε συγκέντρωση και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων. Προσδιορίστηκε η κλίση b και η αποτέμνουσα a της ευθείας που προκύπτει για κάθε αναλύτη. Με βάση τα αποτελέσματα έγινε εκτίμηση της γραμμικότητας και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης R^2 της ευθείας που προκύπτει.

Πίνακας 6.5. Συντελεστές συσχέτισης των ευθειών ($Y=a+bX$)^a που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της γραμμικότητας της προτεινόμενης μεθόδου.

Αναλύτης	Αποτέμνουσα (Intercept)	Κλίση (Slope)	Τυπική Απόκλιση κλίσης (S.D. Slope)	Τυπική Απόκλιση (S.D. regression)	R ²	Εύρος γραμμικότητας (μg l ⁻¹)
PCB28	9710	364393	9198	55394	0,9921	0,002-5
PCB52	540716	413349	17487	99948	0,9830	0,002-5
PCB101	252504	254713	23337	224859	0,9742	0,001-10
PCB118	25691	170266	5451	61750	0,9852	0,001-10
PCB138	84383	153288	8405	95622	0,9735	0,001-10
PCB153	125741	122481	8690	161198	0,9908	0,001-10
PCB180	28378	99870	4499	90863	0,9782	0,005-10

^a όπου X είναι η συγκέντρωση κάθε ενός αναλύτη σε μg L⁻¹ νερού και Y το εμβαδό κάθε μίας κορυφής.

6.1.7. Ανάκτηση και ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου

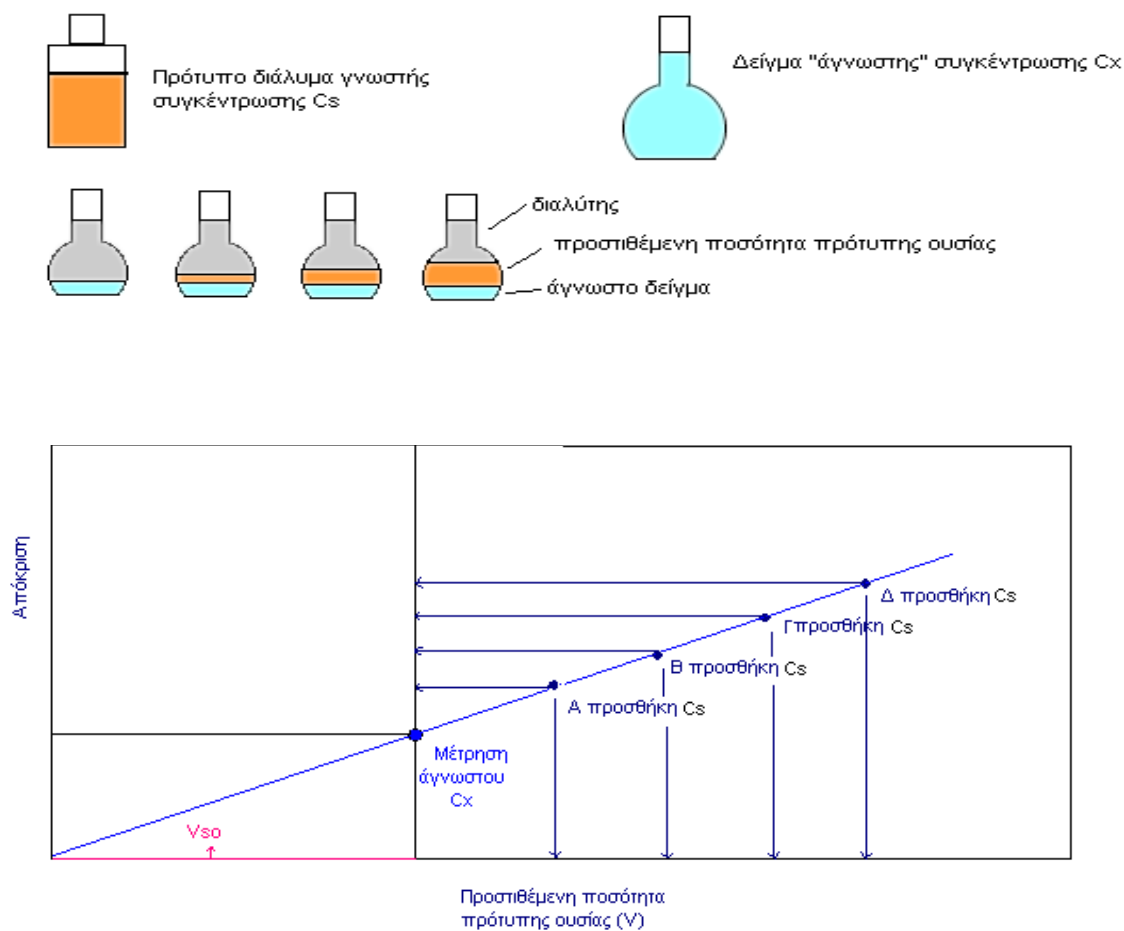
Η τεχνική HS-SPME, είναι μια αναλυτική τεχνική ισορροπίας οπότε ποσοτική μεταφορά αναλυτών από την υδατική φάση των δειγμάτων στο πολυμερές υλικό της ίνας είναι μάλλον απίθανη. Επιπλέον, η διαφορετική προέλευση των υδατικών δειγμάτων (πόσιμων και επιφανειακών νερών), μπορεί να επηρεάσει την επίδοση της μεθόδου λόγω προβλημάτων επίδρασης μήτρας (matrix effect). Είναι γνωστό ότι η σύσταση ιδιαίτερα των επιφανειακών υδάτων είναι ισχυρά εξαρτώμενη από την προέλευση των υδάτων, οπότε οι ποσοτικές μετρήσεις σε πραγματικά δείγματα απαιτούν την εφαρμογή της τεχνικής «σταθερής προσθήκης».

Υδατικά δείγματα που ήταν απαλλαγμένα από PCBs, εμβολιάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και ακρίβειας της μεθόδου. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για κάθε αναλύτη χωριστά αλλά και για κάθε αναλύτη όταν αυτός βρισκόταν μέσα σε μίγμα με τα υπόλοιπα έξι PCBs, με την τεχνική της σταθερής προσθήκης. Τα εμβολιασμένα δείγματα χωρίστηκαν σε 4 φυαλίδια και στο κάθε φυαλίδιο προσθέτονταν διαφορετική ποσότητα αναλύτη. Όλα τα δείγματα αναλύονταν εις τριπλούν.

Η ανάλυση για κάθε PCB πραγματοποιούνταν κατασκευάζοντας καμπύλες με τις αποκρίσεις του κάθε αναλύτη σε σχέση με τον όγκο της προστιθέμενης ποσότητας πρότυπης ουσίας (V), με την οποία εφαρμόζεται η τεχνική σταθερής προσθήκης. Η συγκέντρωση C_x της προσδιοριζόμενης ουσίας, στο εμβολιασμένο-«άγνωστο» δείγμα, προσδιορίστηκε πειραματικά από την παρακάτω σχέση:

$$C_x = (V_{s_0} * C_s) / V_x$$

όπου C_s η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος με το οποίο γίνεται ο εμβολιασμός του «άγνωστου» δείγματος, V_{s_0} ο όγκος προτύπου διαλύματος που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με αυτή του «άγνωστου» δείγματος (υπολογίζεται από την καμπύλη συσχέτισης) και V_x ο όγκος του εμβολιασμένου-«άγνωστου» δείγματος πριν την τεχνική της σταθερής προσθήκης. Στο Σχήμα 6.6 απεικονίζονται τα απαραίτητα διαλύματα για την εφαρμογή της τεχνικής καθώς και μία θεωρητική καμπύλη συσχέτισης των αποκρίσεων του προσδιοριζόμενου αναλύτη σε σχέση με τον όγκο της προστιθέμενης ποσότητας πρότυπης ουσίας (V).



Σχήμα.6.6. Σχηματική απεικόνιση τεχνικής σταθερής προσθήκης

Οι ανακτήσεις για κάθε αναλύτη εκφράστηκαν ως % ποσοστό του λόγου C_x (πειραματικά προσδιοριζόμενη συγκέντρωση) προς την θεωρητική συγκέντρωση (C_{th}) του εμβολιασμένου-«άγνωστου» δείγματος σύμφωνα με την σχέση:

$$(C_x / C_{th}) * 100$$

Ο μέσος όρος των ανακτήσεων, για όλες τις μετρήσεις παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.6. Οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 75% μέχρι 125% για κάθε PCB ξεχωριστά και για κάθε PCB μέσα σε μίγμα των υπολοίπων αναλυτών. Η ακρίβεια, μετρημένη σε ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης, υπολογίστηκε από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της ίδιας μέρας ή διαφορετικών ημερών.

Πίνακας 6.6. Ανάκτηση και ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου

	Θεωρητική συγκέντρωση αναλυτών (1μg L ⁻¹ νερού)						
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Μέση ανάκτηση %	123	118	98	115	79	84	85
	125 ^γ	110 ^γ	95 ^γ	98 ^γ	75 ^γ	80 ^γ	110 ^γ
(%RSD) ^α	2.5	7.3	7.7	6.9	5.3	4.1	7.8
(%RSD) ^β	2.3	5.7	8.2	5.6	4.2	6.0	9.3

^α Ίδια μέρα (N=3)

^β Διαφορετικές ημέρες (N=9)

^γ Μετρήσεις μεμονωμένων αναλυτών μέσα σε μίγμα των υπολοίπων αναλυτών

6.1.8 Επίδραση της συνολικής συγκέντρωσης των PCBs στην ανάκτηση του κάθε αναλύτη με την προτεινόμενη HS-SPME μεθοδο

Η ανάκτηση για κάθε PCB μελετήθηκε επίσης σε σχέση με την επίδραση της ολικής συγκέντρωσης μίγματος PCBs. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για τον κάθε αναλύτη με την τεχνική της σταθερής προσθήκης προτύπου υδατικού διαλύματος, που περιείχε μίγμα PCBs συγκεκριμένης συνολικής συγκέντρωσης και ταυτόχρονα αυξανόμενες συγκεντρώσεις της προς ανάλυση ουσίας. Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα συνολικής συγκέντρωσης PCBs από 0.002 μg L⁻¹ έως 20 μg L⁻¹ όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.7. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων διαπιστώθηκε ότι όταν η συνολική συγκέντρωση PCBs κυμαίνονταν από 0.002 έως 8 μg L⁻¹ η προτεινόμενη μέθοδος ήταν εφαρμόσιμη. Όταν όμως η συνολική συγκέντρωση των PCBs ξεπερνούσε τα 8 μg L⁻¹ η προτεινόμενη μέθοδος δεν έδινε την ίδια απόκριση για κάθε αναλύτη σε σχέση με την απόκριση που είχε παρατηρηθεί όταν ο αναλύτης αυτός βρισκόταν μόνος του στο διάλυμα.

Πίνακας 6.7. Επίδραση της συνολικής συγκέντρωσης PCBs στην ανάκτηση κάθε αναλύτη ξεχωριστά

Συνολική συγκέντρωση των PCBs (μgL^{-1})	PCB28	PCB52	PCB101	PCB118	PCB153	PCB138	PCB180
0,002-8	-	-	-	-	-	-	-
8-20	+	+	+	+	+	+	+

- Χωρίς επιρροή

+ Με επιρροή

6.1.9. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της προτεινόμενης μεθόδου. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα

Τα όρια ανίχνευσης (Limits of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) προσδιορίστηκαν μέσω της ανάλυσης εμβολιασμένων δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης και συγκεκριμένα εμβολιασμένων δειγμάτων με επίπεδα αναλυτών που δίνουν λόγο σήματος προς θόρυβο 3 και 10 αντίστοιχα (Πίνακας 6.8). Τα όρια ανίχνευσης για όλα τα PCBs κυμάνθηκαν από 1 έως 5 ngL^{-1}

Πίνακας 6.8. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αναλυθέντων PCBs με την τεχνική HS-SPME.

Αναλύτης	Όρια ανίχνευσης ($\text{ngL}^{-1} \pm \% \text{RSD}$)	Όρια ποσοτικοποίησης (ngL^{-1})
PCB28	2 (4.7)	6
PCB52	2 (5.1)	6
PCB101	1 (10.2)	3
PCB118	1 (12.9)	3
PCB138	1 (8.5)	4
PCB153	1 (8.4)	4
PCB180	5 (8.8)	14

Προκειμένου να μελετηθεί η εφαρμοσιμότητα της προτεινόμενης HS-SPME μεθόδου σε πραγματικά δείγματα νερού (πόσιμα και επιφανειακά), αναλύθηκαν δείγματα από δειγματοληψία που διεξήχθη στην ΕΥΔΑΠ (Πίνακας 6.9). Για την αποφυγή επιμολύνσεων, στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν καινούργια φυαλίδια και

καινούργιοι μαγνήτες ανάδευσης. Σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν δεν ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις PCBs πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης.

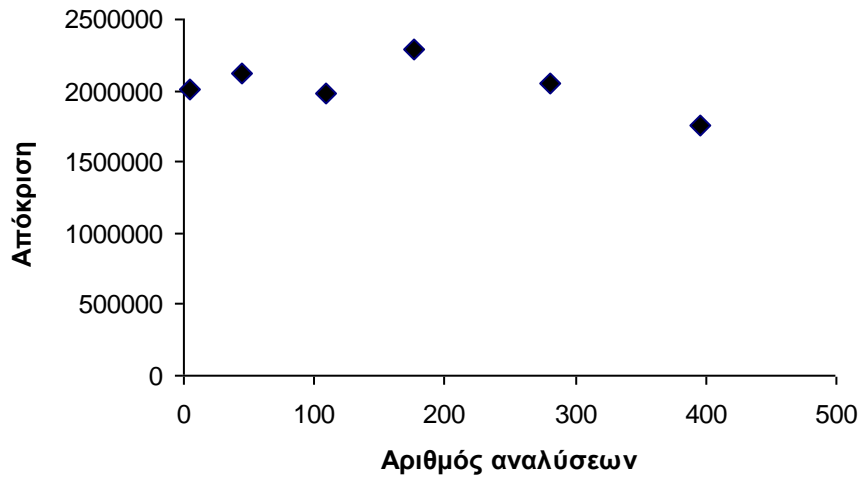
Πίνακας 6.9. Αποτελέσματα ανάλυσης πραγματικών πόσιμων και επιφανειακών δειγμάτων νερού με την προτεινόμενη HS-SPME μέθοδο

Δείγματα νερού Ε.ΥΔ.ΑΠ.	PCB 28	PCB52	PCB101	PCB118	PCB138	PCB153	PCB180
Δεξαμενή 9208	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.
Δεξαμενή 9012	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.
Δεξαμενή 9113	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.
Λίμνη Υλίκη	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.
Μόρνος	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.
Λίμνη Μαραθώνα	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.	< L.O.Q.

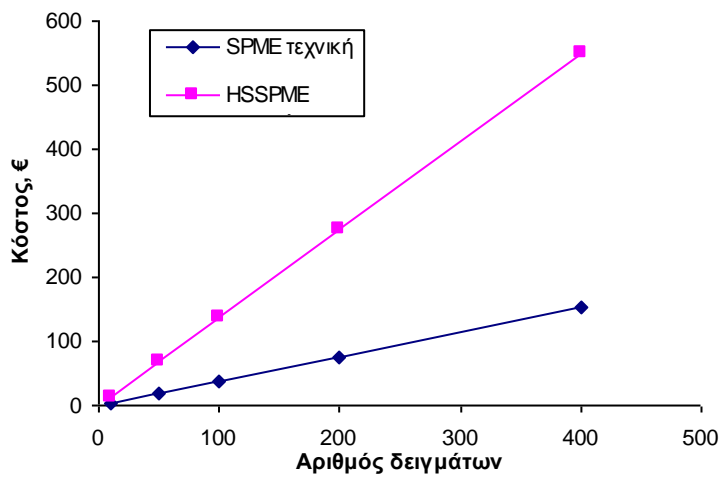
< L.O.Q.: Όριο ποσοτικοποίησης.

Τα δείγματα των δεξαμενών αφορούν σε πόσιμα νερά.

Σε όλο το διάστημα της ανάπτυξης της προτεινόμενης μεθόδου αλλά και κατά την διάρκεια των αναλύσεων των πραγματικών δειγμάτων η σταθερότητα της PDMS ίνας ελέγχονταν ως προς το πρότυπο διάλυμα 1,2,3,4,5,6-εξαχλωροκυκλοεξανίου (lindane). Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 1,2,3,4,5,6-εξαχλωροκυκλοεξανίου σε νερό συγκέντρωσης $1\mu\text{gL}^{-1}$. Στην συνέχεια το πρότυπο διάλυμα αναλύονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα με την προτεινόμενη HS-SPME μέθοδο και κατάλληλες χρωματογραφικές συνθήκες στον αέριο χρωματογράφο. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.7 Η χρήση καινούριας ίνας με τα ίδια χαρακτηριστικά έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με την παλαιότερη ίνα, με ένα εύρος αποκλίσεων RSD 5.4%. Αξίζει να σημειωθεί, ακόμη, ότι η PDMS ίνα παρέμεινε λειτουργική μετά από 400 περίπου αναλύσεις με την τεχνική HS-SPME, ενώ στην τεχνική SPME καταστράφηκε μετά από ένα σύνολο 100 αναλύσεων. Στο Σχήμα 6.8 παρουσιάζεται το συγκριτικό κόστος (σε €) των δύο μεθόδων.



Σχήμα 6.7. Σταθερότητα της PDMS ίνας, ελεγμένη σε τακτά χρονικά διαστήματα με την τεχνική HS-SPME, ως προς το πρότυπο διάλυμα 1,2,3,4,5,6-εξαχλωροκυκλοεξανίου (lindane)



Σχήμα 6.8. Κόστος των μεθόδων μικροεκχύλισης στερεάς φάσης από την υγρή φάση (SPME) και από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο (HS-SPME) των δειγμάτων

Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού 1,2- Διβρωμοαιθανίου, 1,4-Διχλωροβενζολίου και Ναφθαλενίου στο μέλι, με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (HS-SPME) και αέρια χρωματογραφία-ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS)

7.1. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού 1,2- Διβρωμοαιθανίου (1,2-DBE), 1,4-Διχλωροβενζολίου (p-DCB) και Ναφθαλενίου στο μέλι με την τεχνική HS-SPME-Εισαγωγή

Εισαγωγή

Όπως προαναφέρθηκε, η εκχύλιση αναλυτών με την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης, βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της υδατικής (SPME) ή της εναέριας υπερκείμενης (HS-SPME) φάσης του δείγματος και της στατικής φάσης του πολυμερούς υλικού μιας ίνας. Η τεχνική HS-SPME αποτελεί μέθοδο ισορροπίας τριών φάσεων και συγκεκριμένα μεταφορά των αναλυτών από την υγρή φάση του δείγματος στον εναέριο υπερκείμενο χώρο και από εκεί στο πολυμερές υλικό της ίνας. Επομένως, η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν την HS-SPME τεχνική έχει ιδιαίτερη σημασία προκειμένου να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά εκχύλισης των αναλυτών.

Αρχικά επιλέχθηκε η κατάλληλη ίνα, για τον προσδιορισμό των προς ανάλυση ουσιών, και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης και συγκεκριμένα η κατάλληλη ιοντική ισχύς της υδατικής φάσης του δείγματος, η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης των αναλυτών από την ίνα καθώς και ο χρόνος - θερμοκρασία εκρόφησης των αναλυτών από την ίνα.

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού των προς ανάλυση ουσιών εκτιμήθηκε και ως προς τα χαρακτηριστικά επίδοσής της σύμφωνα με διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025).

7.1.1. Επιλογή ίνας και θερμοκρασίας-χρόνου εκρόφησης αναλυτών

Η ίνα που επιλέχθηκε για την ποσοτική προσρόφηση του p-DCB, Ναφθαλενίου και 1,2-DBE από υδατικά δείγματα, είναι εμπορικά διαθέσιμη και χαρακτηρίζεται από επικάλυψη 100μm πολυδιμεθυλοσιλοξανίου (polydimethylsiloxane, PDMS) περιμετρικά μιας ράβδου πυριτίας (silica).

Σε ό,τι αφορά την βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας εκρόφησης των ουσιών από την ίνα, συνήθως, εφαρμόζεται η μέγιστη επιτρεπόμενη θερμοκρασία λειτουργίας της ίνας (οδηγίες κατασκευαστή) στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου. Δευτερευόντως καταγράφεται ο πειραματικός χρόνος που απαιτείται για την πλήρη απομάκρυνση των ουσιών

από το πολυμερές υλικό της ίνας. Στην περίπτωση των τριών προσδιορισθέντων αναλυτών η έκθεση της ίνας για 2min στον εισαγωγέα του αεριοχρωματογράφου, σε θερμοκρασία εκρόφησης 220°C, ήταν αρκετή για να μην εμφανίζονται φαινόμενα επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων (carry over effects).

7.1.2. Συντελεστές κατανομής των 1,2-DBE, p-DCB και Ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο

Η τεχνική HS-SPME, είναι αναλυτική τεχνική ισορροπίας και ποσοτική μεταφορά των προς ανάλυση ουσιών στην πολυμερή φάση μιας ίνας είναι μάλλον απίθανη. Γι' αυτό το λόγο έχει μεγάλη σημασία η διερεύνηση του ποσοστού των αναλυτών που προσροφώνται στην ίνα σε σχέση με την συνολική ποσότητα των αναλυτών στην υγρή φάση του δείγματος. Οι συντελεστές κατανομής των αναλυτών μεταξύ του πολυμερούς υλικού της ίνας και του δείγματος, K_{fs} , των τριών αναλυτών σε όλη την επιφάνεια του πολυμερούς υλικού της PDMS ίνας περιγράφονται από τον τύπο :

$$K_{fs} = \frac{n(K_{hs}V_h + V_s)}{V_f(C_0V_s - n)}$$

Όπου, n είναι η ποσότητα της ουσίας που κατανέμεται στο πολυμερές υλικό της ίνας, V_h είναι ο όγκος του εναέριου υπερκείμενου χώρου του φυαλιδίου στο οποίο γίνεται η ανάλυση, V_s ο όγκος του δείγματος, V_f ο όγκος του πολυμερούς υλικού της ίνας και C_0 η αρχική συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στο υπόστρωμα. Οι συντελεστές κατανομής των ουσιών (K_{hs}) ανάμεσα στην υδατική και την αέρια φάση των προς ανάλυση ουσιών υπολογίστηκαν από τις σταθερές Henry, στους 25°C, σύμφωνα με τον τύπο:

$$K_{hs} = \frac{K_H}{RT}$$

(Πίνακας 7.1).^{218,219} Οι συντελεστές K_{fs} , προσδιορίστηκαν και για τους 3 αναλύτες σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (12.5, 25 και 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Σε κάθε πείραμα οι όγκοι της ίνας, του δείγματος, του εναέριου υπερκείμενου χώρου του δείγματος και της θερμοκρασίας εκχύλισης παρέμεναν σταθεροί ($V_f = 6.12 \times 10^{-4}$ mL, $V_s = 2$ mL, $V_h = 2$ mL and $T = 313.15$ K). Η ποσότητα της ουσίας που προσροφάται κάθε φορά από την ίνα συγκρίνεται και ποσοτικοποιείται άμεσα με αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα σε οργανικό διαλύτη.

Πίνακας 7.1. Συντελεστές κατανομής ίνας- δείγματος, K_{fs} , για τους τρεις προσδιοριζόμενους αναλύτες, υπολογισμένοι με την τεχνική HS-SPME σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις με ίδιες πειραματικές συνθήκες.

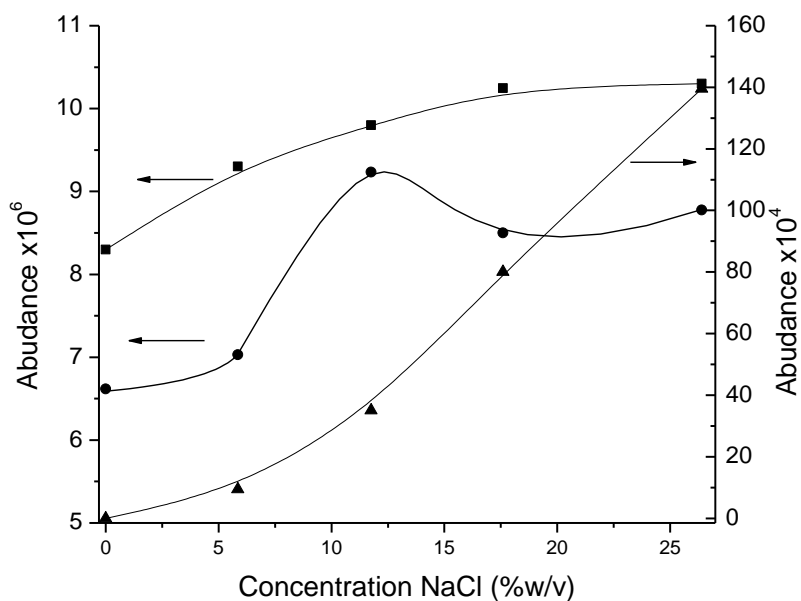
Αναλύτες	Συγκέντρωση ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		
	12,5 ($\pm\%$ RSD)*	25 ($\pm\%$ RSD)*	100 ($\pm\%$ RSD)*
p-DCB	234.73 (2.88)	227.24 (6.63)	217.92 (6.55)
Ναφθαλένιο	383.41 (3.14)	341.07 (3.25)	313.38 (6.90)
1,2-DBE ^a	23.70 (7.52)	20.06 (11.20)	21.17 (3.64)

^a Οι τιμές του K_{fs} για το 1,2-DBE υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις σταθερές Henry στους 25 °C.

* Στις παρενθέσεις παρατίθενται οι τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης \pm RSD (%) των τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

7.1.3. Αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης του δείγματος

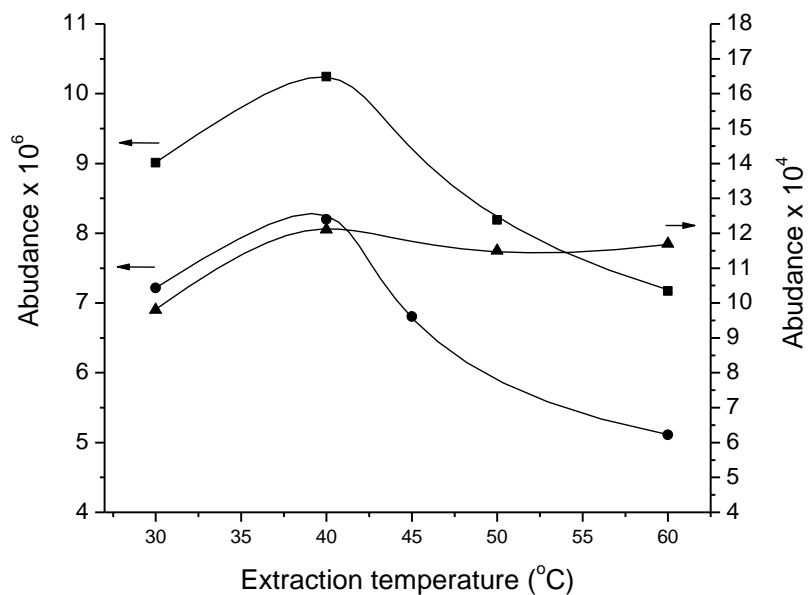
Έχει παρατηρηθεί ότι η σταθερά κατανομής ουδέτερων οργανικών μορίων ευνοείται με την αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης των δειγμάτων¹⁶⁴. Ωστόσο, η εκχύλιση αναλυτών με την τεχνική HS-SPME είναι πιο αποδοτική όταν αυξάνεται η ιοντική ισχύς των διαλυμάτων που περιέχουν πολικούς αναλύτες (salt effect). Η επίδραση της αύξησης της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων στην εκχύλιση των τριών αναλυτών μελετήθηκε με την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων μελιού, τα οποία περιείχαν συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl) από 0 έως 26.4 (% w/v) (Σχήμα 7.1) Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου στα εμβολιασμένα δείγματα αποφεύχθηκαν, γιατί οδηγούσαν σε κορεσμένα διαλύματα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε 2 ml εμβολιασμένων δειγμάτων μελιού θερμοκρασίας 40°C υπό συνεχή ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις των τριών αναλυτών ήταν 25, 25 and 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για τα p-DCB, Ναφθαλένιο και 1,2-DBE αντίστοιχα



Σχήμα 7.1. Επίδραση της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων στην εκχύλιση των τριών αναλυτών εμβολιασμένου υδατικού διαλύματος μελιού. [(●) p-DCB, (■) Naphth και (▲) 1,2-DBE]

7.1.4. Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης των 1,2-DBE, p-DCB, Ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο

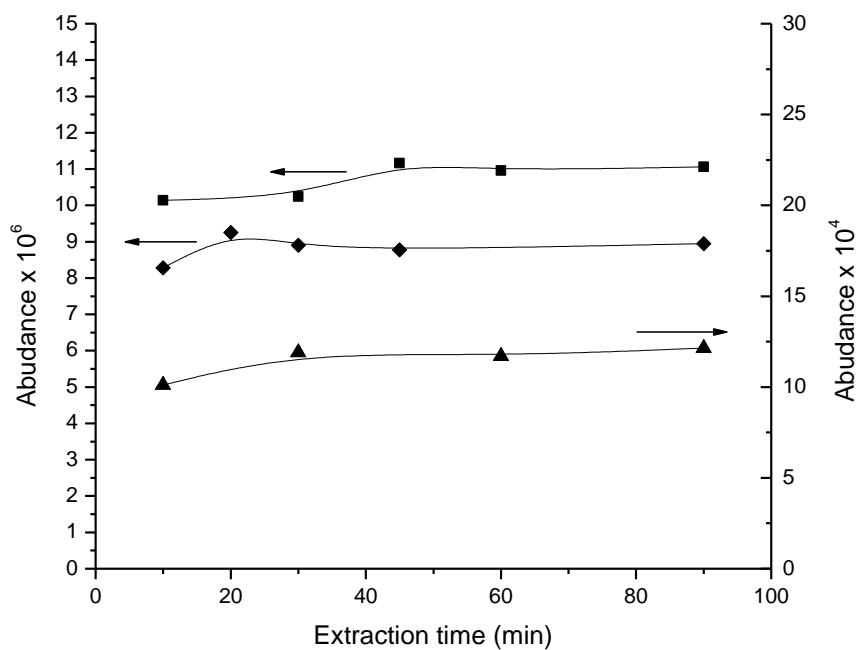
Στο Σχήμα 7.2 απεικονίζεται η αλλαγή στην απόκριση των τριών αναλυτών σε σχέση με την μεταβολή της θερμοκρασίας εκχύλισης των δειγμάτων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ για p-DCB, Ναφθαλένιο και 1,2-DBE, 26.4 % w/v συγκέντρωση NaCl για όλα τα δείγματα, όγκος υδατικού δείγματος μελιού 2 ml και συνεχή ανάδευση της υδατικής φάσης για 30 min σε 900 rpm.



Σχήμα 7.2. Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης στην ανάλυση των τριών αναλυτών [(●) p-DCB, (■)Naphth και (▲) 1,2 -DBE.]

7.1.5. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης των 1,2-DBE, p-DCB, και Ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο

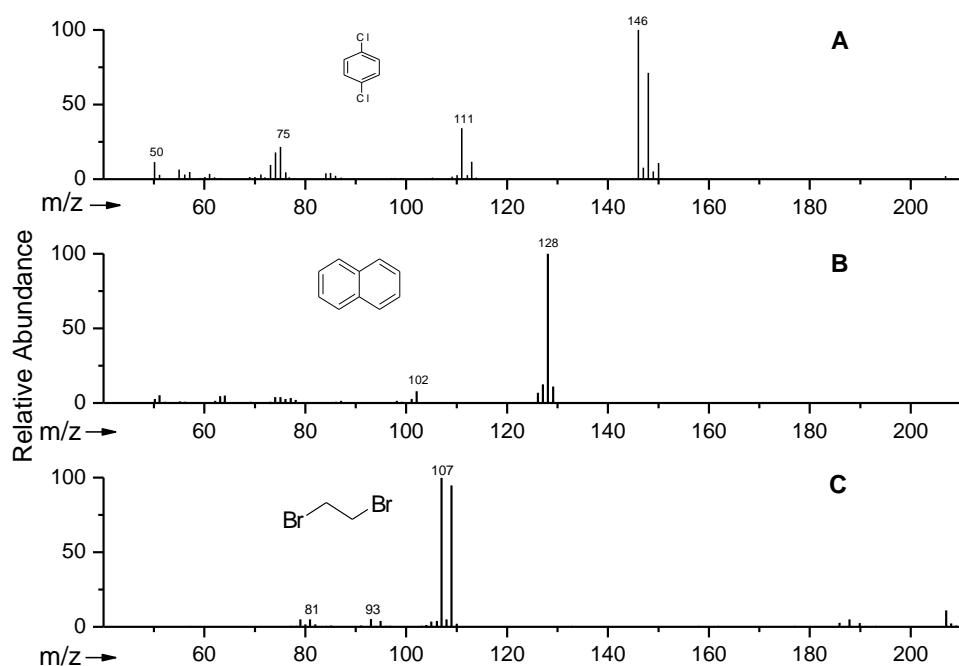
Η επίδραση της μεταβολής του χρόνου έκθεσης της ίνας στον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων μετρήθηκε και για τους τρεις αναλύτες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.3. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν μεταβάλλοντας τον χρόνο έκθεσης της ίνας στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων ενώ ταυτόχρονα η υδατική φάση αναδεύονταν στις 900 στροφές το λεπτό (rpm) στους 40°C. Τα πειράματα διενεργήθηκαν σε συγκεντρώσεις 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για p-DCB, Ναφθαλένιο και 1,2-DBE και 26.4 % w/v συγκέντρωση NaCl για όλα τα δείγματα.



Σχήμα 7.3. Επίδραση του χρόνου έκθεσης της ίνας στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων [(●) p-DCB, (■) Naphth και (▲) 1,2-DBE]

7.1.6. Ανάλυση των 1,2-DBE, p-DCB και Ναφθαλενίου στο φασματογράφο μάζας

Στο Σχήμα 7.4 απεικονίζεται το φάσμα μάζας των τριών αναλυτών p-DCB, Ναφθαλενίου και 1,2-DBE στα 70 eV. Τρία χαρακτηριστικά ιόντα για το p-DCB (m/z 75, 111 and 146) και δύο για τα 1,2 DBE (m/z 107 and 109) και Ναφθαλένιο (m/z 127 and 128) επιλέχθηκαν ως ιόντα ταυτοποίησης των ουσιών (Πίνακας 7.2).



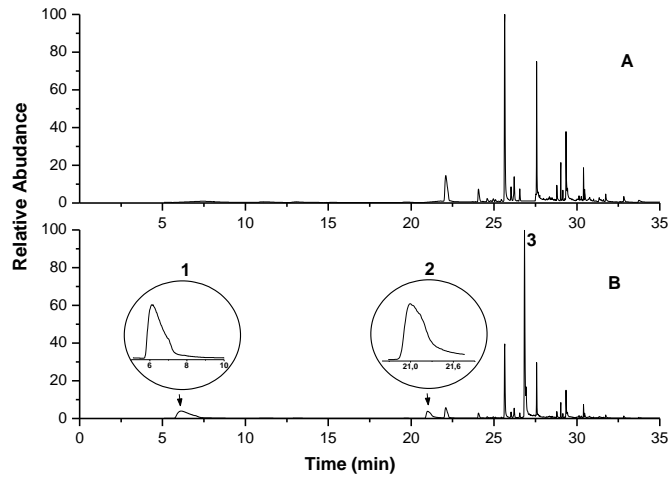
Σχήμα 7.4. Φάσματα μάζας των τριών αναλυτών: p-DCB (A), Naphth (B) και 1,2-DBE (C).

Πίνακας 7.2. GC-MS χαρακτηριστικά των προς ανάλυση ουσιών

Αναλύτης	Χαρακτηριστικά ιόντα	Χρόνος ανάσχεσης t_R (min)	% Σχετική αναλογία εντάσεων των ιόντων (\pm RSD%)
1,2- DBE	107, 109	6.28	95 (1)
p- DCB	146, 111, 75	21.05	35 ^a (15)
Naphthalene	127, 128	26.84	15 (4)

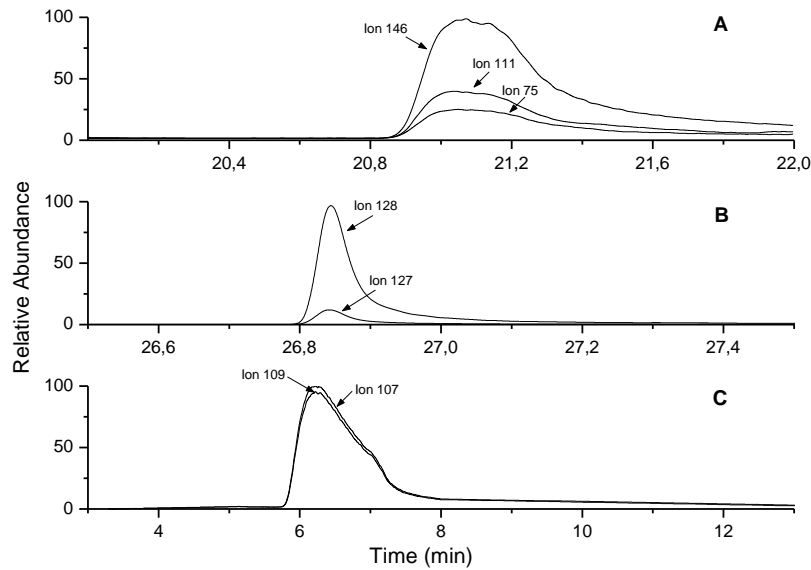
^a σχετική αναλογία εντάσεων των ιόντων [111/146]

Στο Σχήμα 7.5 απεικονίζονται δύο χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα επιλεγθέντων ιόντων (Selective Ion Monitoring, SIM), για ένα μη εμβολιασμένο (τυφλό) δείγμα μελιού και για ένα εμβολιασμένο δείγμα με συγκεντρώσεις $250\mu\text{g kg}^{-1}$ για το 1,2-DBE και $25\mu\text{g kg}^{-1}$ για p-DCB Ναφθαλένιο. Ο προσδιορισμός των τριών αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την προτεινόμενη HS-SPME μέθοδο.



Σχήμα 7.5. Χρωματογράφημα επιλεχθέντων ιόντων (SIM): (A) ενός τυφλού δείγματος μελιού και (B) ενός δείγματος μελιού εμβολιασμένο με p-DCB(2), Ναφθαλένιο (3) σε συγκέντρωση $25 \mu\text{g Kg}^{-1}$ και $250 \mu\text{g Kg}^{-1}$ για το 1,2-DBE (1).

Στο Σχήμα 7.6 απεικονίζεται η ταυτοποίηση κάθε μιάς ουσίας από τα χαρακτηριστικά της ιόντα.



Σχήμα 7.6. Ταυτοποίηση των τριών αναλυτών από τα χαρακτηριστικά τους ιόντα στο φασματογράφο μάζας [p-DCB (A), Naphth (B) και 1,2-DBE (C)].

7.1.7. Γραμμικότητα της προτεινόμενης μεθόδου

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους της μεθόδου αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο δείγματα μελιού εμβολιασμένα με τις τρεις προς ανάλυση ουσίες. Κάθε σειρά εμβολιασμένων δειγμάτων αποτελούνταν από 12 συγκεντρώσεις και κάθε μία συγκέντρωση αναλύονταν εις τριπλούν. Το εύρος συγκεντρώσεων για κάθε αναλύτη καθώς και τα αποτελέσματα γραμμικότητας της μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.3.

Η πρότυπη καμπύλη για κάθε αναλύτη προέκυψε μετά από γραμμική συσχέτιση μεταξύ του εμβαδού της κορυφής για κάθε συγκέντρωση και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων. Προσδιορίστηκε η κλίση (b) και η αποτέμνουσα (a) της ευθείας που προκύπτει για κάθε αναλύτη. Με βάση τα αποτελέσματα έγινε εκτίμηση της γραμμικότητας και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης R^2 της ευθείας που προκύπτει.

Πίνακας 7.3. Αποτελέσματα γραμμικότητας των τριών προς ανάλυση ουσιών, βασισμένα στο μοντέλο ($Y=a+bX$)^a

Αναλύτης	Τεταγμένη	Τυπική απόκλιση (S.D.) Τεταγμένης	Κλίση	Τυπική απόκλιση (S.D.) Κλίσης	Τυπική απόκλιση (S.D.) Παλινδρόμησης	R^2	Εύρος γραμμικότητας ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
p-DCB	570536	335543	300504	560	1483646	0.9999	5-2500
Ναφθαλένιο	1411364	801182	446559	5933	3055650	0.9972	0.5-500
1,2-DBE	28004	47176	5487.7	174	113355	0.9901	5-500

^a όπου X η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη σε $\mu\text{g kg}^{-1}$ μελιού και Y το εμβαδό κάθε κορυφής.

7.1.8. Ανάκτηση και ακρίβεια της προτεινόμενης μεθόδου

Στην τεχνική HS-SPME η διαφορετική προέλευση δειγμάτων μελιού, μπορεί να επηρεάσει την επίδοση της μεθόδου, λόγω προβλημάτων επίδρασης μήτρας (matrix effect). Για αυτό το λόγο οι ποσοτικές μετρήσεις σε πραγματικά δείγματα απαιτούν την εφαρμογή της τεχνικής «σταθερής προσθήκης» .

Δείγματα μελιού, που ήταν απαλλαγμένα από τα τρία προς ανάλυση κατάλοιπα, εμβολιάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και ακρίβειας της μεθόδου. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για κάθε αναλύτη χωριστά αλλά και για κάθε αναλύτη όταν αυτός βρισκόταν μέσα σε μίγμα με τους υπόλοιπους δύο αναλύτες, με την τεχνική της σταθερής προσθήκης. Οι συγκεντρώσεις εμβολιασμού ήταν: 5, 12.5 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για το p-DCB και Ναφθαλένιο και 12.5, 25 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για το 1,2-DBE. Όλα τα δείγματα αναλύονταν εις τριπλούν.

Για κάθε αναλύτη κατασκευάστηκαν καμπύλες συσχέτισης των αποκρίσεων στο χρωματογράφο σε συνδυασμό με τον όγκο της προστιθέμενης ποσότητας πρότυπης ουσίας

(V_{s_0}), με την οποία εφαρμόζεται η τεχνική σταθερής προσθήκης. Η συγκέντρωση C_x της προσδιοριζόμενης ουσίας, στο εμβολιασμένο δείγμα, προσδιορίστηκε πειραματικά από την παρακάτω σχέση:

$$C_x = (V_{s_0} * C_s) / V_x$$

όπου C_s η συγκέντρωση του προτύπου διαλύματος με το οποίο γίνεται ο εμβολιασμός του «άγνωστου» δείγματος, V_{s_0} ο όγκος προτύπου διαλύματος που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με αυτή του «άγνωστου» δείγματος (υπολογίζεται από την καμπύλη συσχέτισης) και V_x ο όγκος του εμβολιασμένου-«άγνωστου» δείγματος πριν την τεχνική της σταθερής προσθήκης. Οι ανακτήσεις για κάθε αναλύτη εκφράστηκαν ως % ποσοστό του λόγου C_x (πειραματικά προσδιοριζόμενη συγκέντρωση) προς την θεωρητική συγκέντρωση (C_{th}) του «άγνωστου» δείγματος σύμφωνα με την σχέση:

$$(C_x / C_{th}) * 100$$

Ο μέσος όρος των ανακτήσεων, για όλες τις μετρήσεις παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.4. Οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 72.8% μέχρι 104.3% για κάθε ουσία ξεχωριστά και για κάθε ουσία μέσα σε μίγμα των υπολοίπων αναλυτών. Η ακρίβεια, μετρημένη σε ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης, υπολογίστηκε από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της ίδιας μέρας και διαφορετικών ημερών. Σε κάθε περίπτωση τα ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSDs) ήταν μικρότερα από 6.3%.

Πίνακας 7.4. Ποσοστά μέσης ανάκτησης των τριών αναλυτών με την προτεινόμενη HS-SPME μέθοδο και την τεχνική σταθερής προσθήκης σε τρεις συγκεντρώσεις.

	Θεωρητική συγκέντρωση αναλυτών ($\mu\text{g kg}^{-1}$ μελιού)								
	p-DCB			Ναφθαλένιο			1,2-DBE		
	5	12.5	100	5	12.5	100	12.5	25	100
Μέση ανάκτηση %	90.1	77.8 / 72.8 ^c	104.3	85.3	100.2 / 100.5 ^γ	75	98.4	100.0 / 95.0 ^c	83.3
(%RSD) ^α	6.3	3.6	4.5	6.3	4.0	3.5	5.0	4.3	3.4
(%RSD) ^β	5.8	3.8	5.0	4.8	4.2	3.7	4.7	3.3	3.5

^α Την ίδια μέρα (N=3)

^β Διαφορετικές ημέρες (N=9)

^γ Μετρήσεις μεμονωμένων αναλυτών μέσα σε μίγμα των τριών αναλυτών

7.1.9. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της προτεινόμενης μεθόδου. Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα

Τα όρια ανίχνευσης (Limits of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) προσδιορίστηκαν μέσω της ανάλυσης εμβολιασμένων δειγμάτων

χαμηλής συγκέντρωσης και συγκεκριμένα εμβολιασμένων δειγμάτων με συγκεντρώσεις αναλυτών που δίνουν λόγο σήματος προς θόρυβο 3 και 10 αντίστοιχα (Πίνακας 7.5). Τα όρια ανίχνευσης και για τους τρεις προσδιοριζόμενους αναλύτες κυμάνθηκαν από 1 έως 5 ngl⁻¹.

Πίνακας 7.5: Όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) των τριών αναλυτών με την προτεινόμενη μέθοδο

Αναλύτης	Όριο ανίχνευσης ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Όριο ποσοτικοποίησης ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
p-DCB	1	4
Ναφθαλένιο	0.1	0.3
1,2-DBE	2	5

Προκειμένου να μελετηθεί η εφαρμοσιμότητα της προτεινόμενης HS-SPME μεθόδου σε πραγματικά δείγματα μελιού, αναλύθηκαν δείγματα από επίσημη δειγματοληψία του Γενικού Χημείου του Κράτους. Για την αποφυγή επιμολύνσεων, στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν καινούργια φυαλίδια και καινούργιοι μαγνήτες ανάδευσης. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για συγκριτικούς σκοπούς, για αυτό και αναλύθηκαν και από το Γενικό Χημείο του Κράτους με την τεχνική της απόσταξης μεθ' υδρατμών και αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας. Από τα πραγματικά δείγματα που αναλύθηκαν δύο βρέθηκαν επιμολυσμένα με p-DCB σε συγκεντρώσεις 11 gkg⁻¹(3.5% R.S.D.) και 42 gkg⁻¹ (4.1% R.S.D.). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με τις μετρήσεις που πραγματοποίησε το Γενικό Χημείο του κράτους.

Κεφάλαιο 8: Αποτελέσματα ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS)

8.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών

Εισαγωγή

Η ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, στηρίχτηκε στην τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) σε συνδυασμό με ανίχνευση σε υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS).

Η αρχή της τεχνικής SPE περιλαμβάνει κατανομή των προς ανάλυση ουσιών ανάμεσα σε δύο φάσεις, μία στερεή (στατική φάση) που είναι το προσροφητικό υλικό και μία υγρή (κινητή φάση) που είναι το υγρό υπόστρωμα στο οποίο βρίσκονται διαλυμένες οι προς ανάλυση ουσίες. Για την ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των 5 κυανοτοξινών (μικροκυστίνη RR, νοντουλαρίνη, μικροκυστίνη YR, μικροκυστίνη LR, μικροκυστίνη LA) επιλέχθηκε το κατάλληλο προσροφητικό υλικό και προσδιορίστηκε πειραματικά το πρωτόκολλο εκχύλισής τους.

Στην συνέχεια επιχειρήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών στην υγρή χρωματογραφία με εμπορικές στήλες που είχαν διαφορετικά μήκη, διάμετρο και μέγεθος προσροφητικού υλικού. Τελικό στάδιο στην ανάπτυξη της μεθόδου αποτέλεσε η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν το σύστημα φασματομετρίας μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου. Για την επίτευξη αυτού του στόχου πραγματοποιήθηκαν πειράματα με απευθείας έκχυσης (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά καθώς και με πειράματα έκχυσης προτύπου διαλύματος μίγματος κυανοτοξινών ίδιας σύστασης, μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections), παρουσία κινητής φάσης.

Στη συνέχεια η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού των 5 κυανοτοξινών, εκτιμήθηκε ως προς τα χαρακτηριστικά επίδοσής της, σύμφωνα με διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025).

8.1.1. Απομόνωση και προσυγκέντρωση κυανοτοξινών

Για την απομόνωση των κυανοτοξινών εφαρμόστηκε η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) με προσροφητικό υλικό το συμπολυμερές υλικό των μικροστηλών Oasis HLB

(όπου HLB ακρωνύμιο των λέξεων Hydrophilic-Lipophilic Balance). Επιλέχθηκαν τα Oasis HLB αντί των C-18 ή Disk-type SPE γιατί οι μικροστήλες Oasis HLB είναι πιο εύχρηστες από τις μικροστήλες C-18 δεδομένου ότι επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα για όξινα, βασικά και ουδέτερα συστατικά, ακόμη και αν η μικροστήλη ξεραθεί. Επιπλέον, τα Oasis HLB έχουν την ιδιότητα να κατακρατούν αποτελεσματικά και πολικούς αναλύτες, όπως είναι οι προσδιοριζόμενες τοξίνες οπότε επιτυγχάνονται καλύτερα ποσοστά ανάκτησης της μεθόδου σε σχέση με το άπολο προσροφητικό υλικό C-18.

Για την ενεργοποίηση των μικροστηλών Oasis HLB εφαρμόστηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τον κατασκευαστή στην περίπτωση των πολικών ουσιών, (4ml μεθανόλη και 4ml νερό) Μετά από δοκιμές προτιμήθηκε η έκλουση να γίνεται με 100% μεθανόλη (αντί μεθανόλη-νερό 80-20%), ώστε να επιτυγχάνεται πιο αποτελεσματικά το στάδιο εξάτμισης των αναλυτών. Η ενεργοποίηση των μικροστηλών πραγματοποιήθηκε με ταχύτητα ροής 5ml/min, η ταχύτητα ροής δείγματος νερού ορίστηκε στα 10ml/min και η ταχύτητα έκλουσης στα 5ml/min.

8.1.2. Επιλογή στήλης και εκλουστικού συστήματος για το σύστημα υγρής χρωματογραφίας (HPLC)

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν διάφορες στήλες υγρής χρωματογραφίας καθώς και διάφορα εκλουστικά συστήματα, προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των 5 κυανοτοξινών. Χαρακτηριστικά δοκιμάστηκαν οι στήλες:

Waters Spherisorb (250 x 4.6mm, υλικού πληρώσεως 5 μ m), Merck Lichospher (250 x 4mm, υλικού πληρώσεως 5 μ m), Thermo Hypersil gold (100 x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3 μ m), Zorbax SB (30 x 2.1 mm, υλικού πληρώσεως 1.8 μ m), Restek (30 x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3 μ m). Το προσροφητικό υλικό σε όλες τις παραπάνω στήλες ήταν C-18.

Προκειμένου να διαχωριστεί ένα διάλυμα μίγματος κυανοτοξινών συγκέντρωσης 100 μ g/L σε αυτές τις χρωματογραφικές στήλες, δοκιμάστηκαν διάφορα εκλουστικά συστήματα ακετονιτρίλιου/νερού με ροή 0.2 ml/min (βέλτιστη ροή για σύστημα ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο (ESI). Πλήρης διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τις στήλες (α) Zorbax SB-C18 [(30 x 2.1 mm, υλικού πληρώσεως 1.8 μ m) (πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που ξεκινούσε από 30:70 και κατέληγε σε 70:30 ακετονιτρίλιο/νερό παρουσία 0.1% φορμικού οξέος)] και (β) Restek C-18 [(30 x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3 μ m) (πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης, το οποίο ξεκινούσε από 75:25 και κατέληγε σε 10:90 νερό/ακετονιτρίλιο παρουσία 0.5% φορμικού οξέος, και στις δύο φάσεις: υδατική και οργανική) (Πίνακας 5.4). Με τις υπόλοιπες στήλες δεν επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των μικροκυστινών YR και LR. Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη Restek C-18.

8.1.3. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών στο φασματογράφο μάζας

Η βελτιστοποίηση διαφόρων παραμέτρων στο φασματογράφο μάζας είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την επίτευξη όσο το δυνατό μεγαλύτερης έντασης κορυφών και άρα την αύξηση της ευαισθησίας της προτεινόμενης μεθόδου. Πρωταρχικό ρόλο στην όλη διεργασία παίζει η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής ιοντισμού για την παραγωγή ιόντων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σε ότι αφορά την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI), αυτή επιτυγχάνεται με εφαρμογή υψηλής τάσης κατάλληλης πολικότητας (θετική ή αρνητική) στο, εισερχόμενο στο θάλαμο ιοντισμού, ρεύμα υγρού. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό μορίων μεγάλου εύρους μαζών (από μικρά πολικά μόρια έως μεγάλα βιομόρια). Για την ανάλυση των κυανοτοξινών επιλέχθηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, αφού πρόκειται για πολικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Η τεχνική αυτή έχει τη δυνατότητα να παράγει ιόντα της προς ανάλυση ένωσης στην υγρή φάση και να τα μετατρέπει σε ιόντα στην αέρια φάση. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι εκτός από την επιλογή κατάλληλης τεχνικής ιοντισμού στην διεργασία παραγωγής ιόντων σημαντικό ρόλο παίζουν και μια σειρά άλλων παραμέτρων όπως:

- ◆ Η θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (probe).
- ◆ η σύσταση, το pH και η ροή της κινητής φάσης (για ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό, ροή μέχρι 500 $\mu\text{l}/\text{min}$)
- ◆ Η τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού (Spray Voltage)
- ◆ Οι παροχές του αερίου εκνέφωσης και του βοηθητικού αερίου (N_2) (sheath gas και auxiliary gas)
- ◆ Η θερμοκρασία του αγωγού μεταφοράς των ιόντων από τα θάλαμο ιοντισμού στο εσωτερικό του φασματογράφου (Ion transfer capillary temperature)
- ◆ Η εφαρμοζόμενη τάση στις διατάξεις επιτάχυνσης και εστίασης των ιόντων (Tube lens offset)

Όλες οι παράμετροι που αναφέρθηκαν παραπάνω βελτιστοποιούνται με πειράματα απευθείας έγχυσης (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε μίας ένωσης χωριστά, προκειμένου να προσδιοριστούν τα μοριακά ιόντα. Κάποιες από τις προαναφερόμενες παραμέτρους δεν πρέπει να διαφοροποιούνται από ένωση σε ένωση, όταν αναπτύσσεται μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού αναλυτών. Για παράδειγμα, η θέση του “probe” βελτιστοποιείται χειροκίνητα, και επιλέγεται να είναι η βέλτιστη δυνατή για όλες τις προσδιοριζόμενες ουσίες, αφού θα μένει σταθερή κατά την διάρκεια ενός χρωματογραφήματος. Επίσης, η θερμοκρασία του σωλήνα μεταφοράς ιόντων δεν πρέπει να διαφοροποιείται κατά την διάρκεια ενός χρωματογραφήματος, γιατί δεν σταθεροποιείται

εύκολα στη νέα θερμοκρασία στο μικρό χρονικό διάστημα που συνήθως διαρκεί ένα χρωματογράφημα (30 min ή λιγότερο). Οι παράμετροι αυτές βελτιστοποιούνται ταυτόχρονα για όλες τις κυανοτοξίνες με την διαδικασία έγχυσης μίγματος κυανοτοξινών, μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections) παρουσία κινητής φάσης.

Δεύτερο, αλλά εξίσου σημαντικό βήμα στην διαδικασία βελτιστοποίησης της μεθόδου στο χρωματογράφο μάζας, είναι η διαδικασία εύρεσης των μητρικών και θυγατρικών ιόντων των κυανοτοξινών και η γενικότερη ρύθμιση διαφόρων συναφών παραμέτρων προς την κατεύθυνση αυτή. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή ως επιλεκτική παρακολούθηση ιόντων (Selected Reaction Monitoring, SRM) και αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική λειτουργίας των συστημάτων LC/MS/MS για αναλυτικούς σκοπούς. Χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης της θραυσματοποίησης πολλαπλών (επιλεγμένων) μητρικών ιόντων και καταγραφής του σήματος των αντίστοιχων θυγατρικών ιόντων τους. Συγκεκριμένα, στην τεχνολογία τριπλού τετραπόλου, στο πρώτο τετράπολο επιλέγονται τα μητρικά ιόντα τα οποία θραυσματοποιούνται στο δεύτερο τετράπολο και τα θραύσματά τους (θυγατρικά ιόντα) ανιχνεύονται στο τρίτο τετράπολο. Ο συνδυασμός επιλεγμένου μητρικού και θυγατρικού ή θυγατρικών ιόντων αποτελεί ένα είδος αποτυπώματος για την κάθε χημική ουσία ικανού, σε συνδυασμό με το χρόνο ανάλυσης R_t , να οδηγήσει στην ταυτοποίησή της. Επιπλέον, η απόρριψη και μη καταγραφή όλων των άλλων ιόντων που μπορεί να παράγονται από τον ιοντισμό ενώσεων που τυχόν βρίσκονται στο υπόστρωμα ή στην κινητή φάση οδηγεί σε υψηλούς λόγους σήματος/θορύβου με επακόλουθη συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με πειράματα απευθείας έγχυσης (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά. Στο στάδιο της ανάλυσης των παραγόμενων μητρικών ιόντων καθώς και στο στάδιο παραγωγής των θυγατρικών ιόντων σημαντική επίδραση έχουν παράμετροι που επηρεάζουν την διακριτική ικανότητα του φασματογράφου μάζας, όπως το πλάτος της κορυφής (peak width) στα δύο τετράπολα Q1 και Q2, ή την θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων στο τετράπολο Q2 [ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy) και πίεση του αερίου θραυσματοποίησης (χρησιμοποιείται αργό υψηλής καθαρότητας)].

Για την βελτιστοποίηση του σήματος των κυανοτοξινών στο φασματογράφο μάζας χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μεμονωμένων ουσιών συγκέντρωσης 1mg/L σε διαλύτη μεθανόλη/νερό 90/10 (v/v) περιεκτικότητας 0.1% σε μυρμηγκικό οξύ. Η τεχνική που βρίσκει την μεγαλύτερη εφαρμογή στον ιοντισμό των κυανοτοξινών είναι αυτή του ηλεκτροψεκασμού με εφαρμογή υψηλής τάσης θετικής πολικότητας (positive electrospray ionization, ESI) στο, εισερχόμενο στο θάλαμο ιοντισμού, ρεύμα υγρού. Για την κάθε κυανοτοξίνη καταγράφηκαν και επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες που αφορούν την πηγή ιοντισμού και την διαδικασία θραυσματοποίησης. Όλες οι παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν με πειράματα απευθείας έγχυσης (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά,

καθώς, και με πειράματα έκχυσης προτύπου διαλύματος μίγματος κυανοτοξινών ίδιας σύστασης, μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections), παρουσία κινητής φάσης..

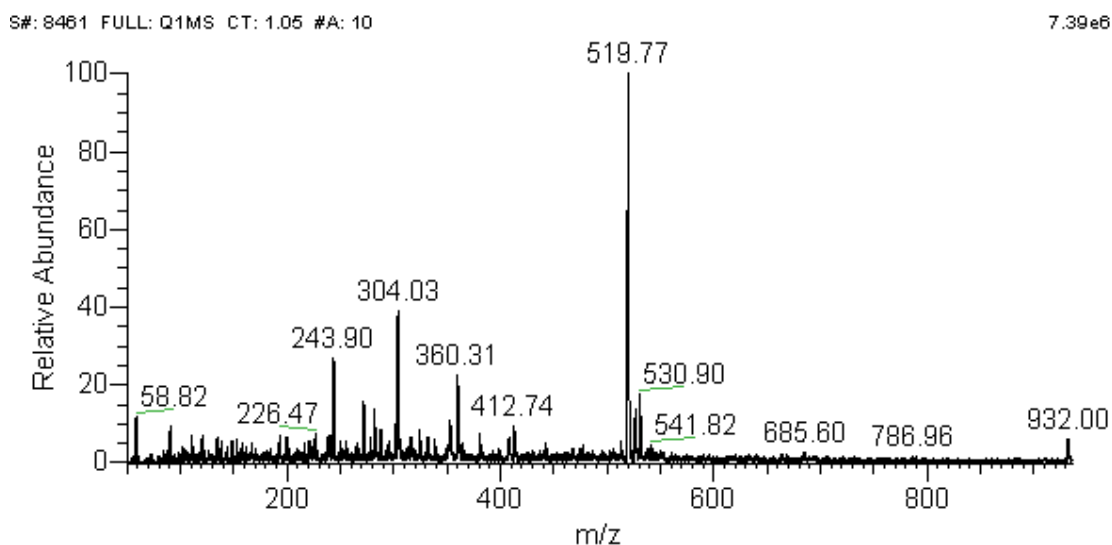
Στις επόμενες παραγράφους παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας και οι καμπύλες θραυσματοποίησης, για κάθε κυανοτοξίνη ξεχωριστά. Γενικά, με την εφαρμοζόμενη τεχνική ESI και την παρουσία υδρογονοκατιόντων στην κινητή φάση, σχηματίζονται μοριακά ιόντα κυανοτοξινών αυξημένα κατά μία μονάδα μάζας: $[M+H]^+$. Δεν αποκλείεται ωστόσο να εμφανιστούν και μοριακά ιόντα αναλυτών προσυζητημένα κατά 2 μονάδες μάζας $[M+2H]^{+2}$ ή ακόμα και κατά 23 μονάδες μάζας $[M+Na]^+$. Στον Πίνακα 8.1 παρουσιάζονται τα μοριακά βάρη των κυανοτοξινών, με βάση τα οποία προσδιορίστηκαν τα μητρικά ιόντα κάθε μίας κυανοτοξίνης.

Πίνακας 8.1. Μοριακά βάρη των κυανοτοξινών που αναλύθηκαν

Όνομα ουσίας	Μοριακό Βάρος
Μικροκυστίνη RR (MC-RR)	1037
Νοντουλαρίνη (NOD)	824
Μικροκυστίνη YR (MC-YR)	1044
Μικροκυστίνη LR (MC-LR)	994
Μικροκυστίνη LA (MC-LA)	909

8.1.3.1. Προσδιορισμός της Μικροκυστίνης RR

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού της μικροκυστίνης RR, με την τεχνική φασματομετρίας μάζας ESI-MS/MS, πραγματοποιήθηκαν πειράματα απευθείας έκχυσης προτύπου διαλύματος (infusion) 1mg/L, σε διαλύτη μεθανόλη-νερό 90:10 (v/v), περιεκτικότητας 0,1% σε μυρμηγκικό οξύ. Στο Σχήμα 8.1 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της MC-RR. Η ανίχνευση της μικροκυστίνης RR βασίστηκε στο διπλά φορτισμένο μοριακό ιόν της : $[M+2H]^{+2} \rightarrow 519.8 [(m+2H)/2=1039/2]$ το οποίο ανιχνεύθηκε με ένταση 7.39×10^6 .



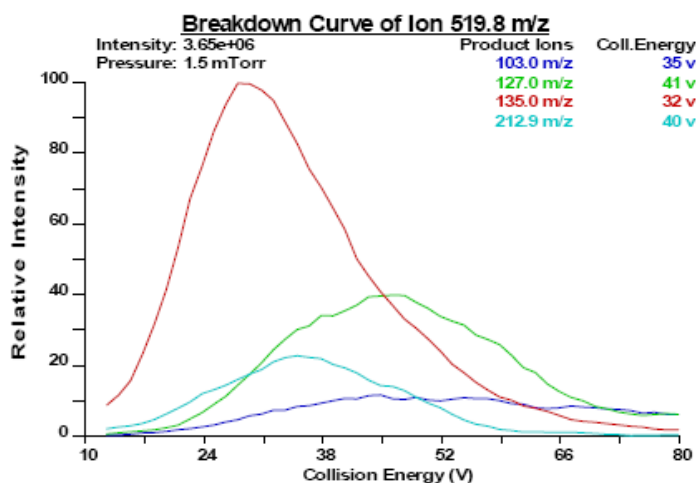
Σχήμα 8.1. Φάσμα μάζας της μικροκυστίνης RR

Οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα μάζας της μικροκυστίνης RR (m/z 58, 226, 243, 304, 360, 412, 530, 932), οφείλονται πιθανότατα σε προσμίξεις του προτύπου της ή του διαλύτη.

Το φάσμα μάζας της μικροκυστίνης-RR είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος με τις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό (Spray Voltage):4000 V
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature):350 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N_2 (Sheath gas pressure):20 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N_2 (Auxilliary gas):5 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Εφαρμοζόμενη τάση στις διατάξεις επιτάχυνσης και εστίασης των ιόντων (Tube lens offset): 91 Volt
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο και τρίτο τετράπολο : 0.7 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum,FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την μικροκυστίνη RR, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.2. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM).

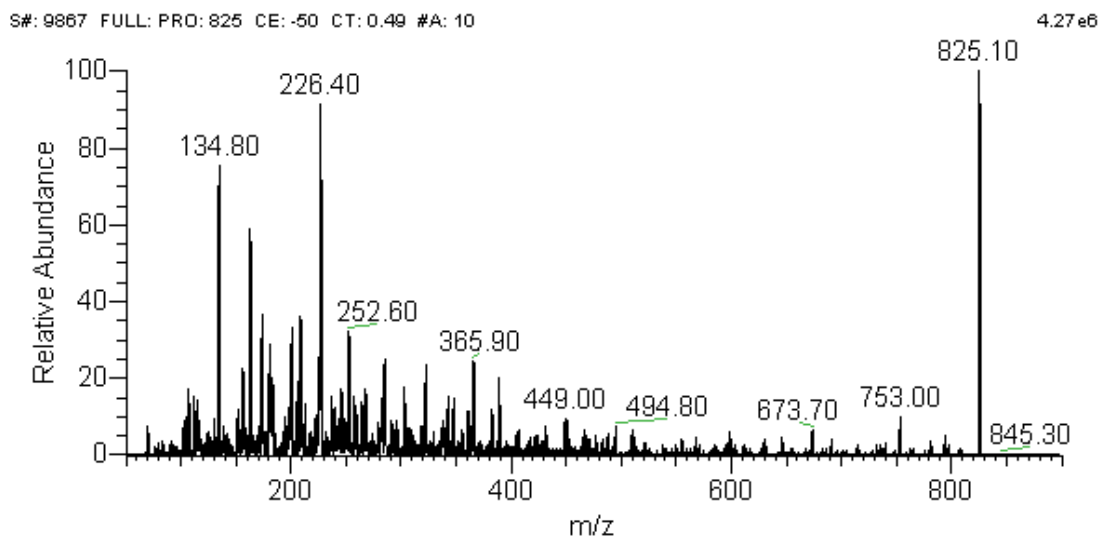


Σχήμα 8.2. Καμπύλη θραυσματοποίησης της μικροκυστίνης RR.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της μικροκυστίνης-RR επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 135 και 212.9 του μητρικού ιόντος m/z 519.8. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο ιόν m/z 135.

8.1.3.2. Προσδιορισμός της Νοντουλαρίνης

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού της νοντουλαρίνης, με την τεχνική φασματομετρίας μάζας (ESI-MS/MS), πραγματοποιήθηκαν πειράματα απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος 1mg/L (infusion), σε διαλύτη μεθανόλη-νερό 90:10 (v/v), περιεκτικότητας 0,1% σε μυρμηγκικό οξύ. Στο Σχήμα 8.3 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της νοντουλαρίνης.



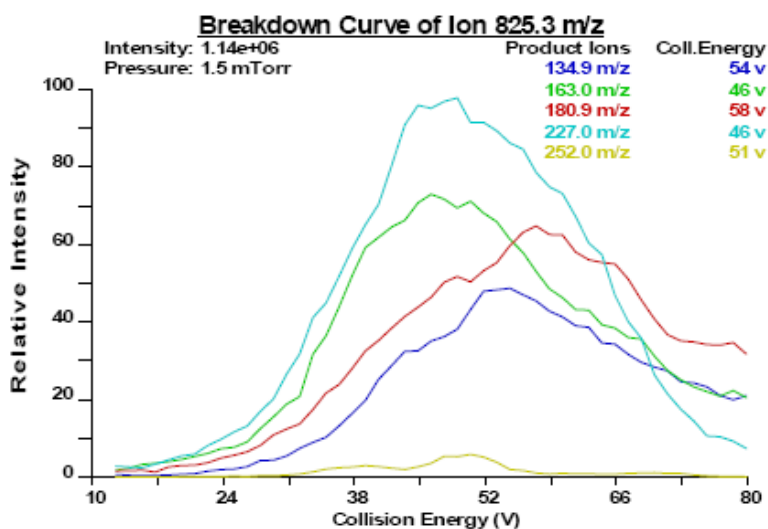
Σχήμα 8.3 .Φάσμα μάζας της Νοντουλαρίνης.

Ανιχνεύθηκε με μεγάλη ένταση (4.27×10^6), το μοριακό ιόν $[M+H]^+$ της νοντουλαρίνης: $m/z:825.1$. Το παραπάνω φάσμα μάζας, είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος στις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό (Spray Voltage):4000 V
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature):350 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N_2 (Sheath gas pressure):20 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N_2 (Auxilliary gas):5 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Εφαρμοζόμενη τάση στις διατάξεις επιτάχυνσης και εστίασης των ιόντων (Tube lens offset): 157Volt
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο και τρίτο τετράπολο : 0.7 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum,FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την νοντουλαρίνη, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.4. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr

Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM)

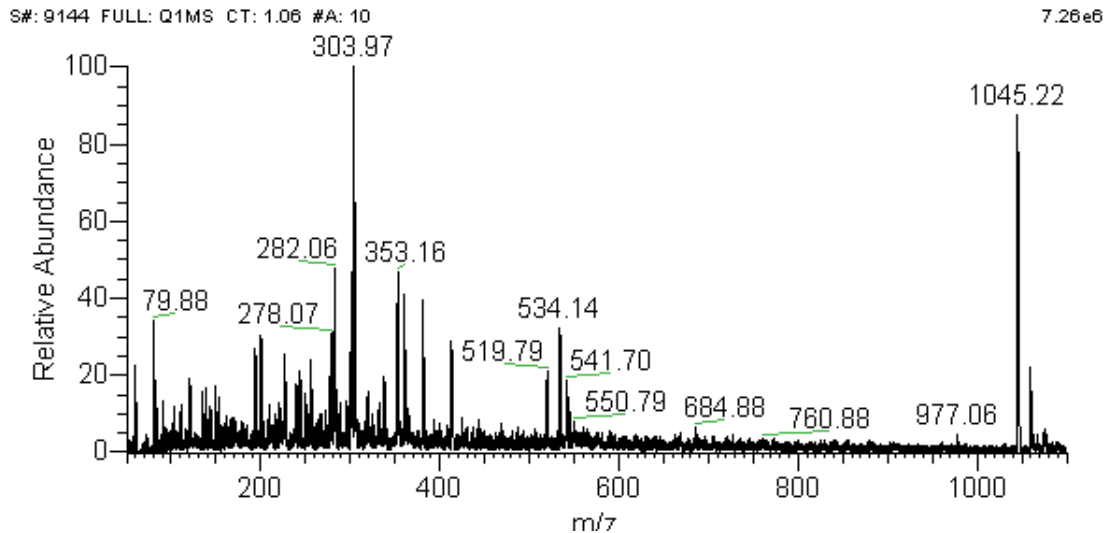


Σχήμα 8.4. Καμπύλη θραυσματοποίησης της νοντουλαρίνης

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της νοντουλαρίνης επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 135 και 227 του μητρικού ιόντος m/z 825.3. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο ιόν m/z 135.

8.1.3.3. Προσδιορισμός της Μικροκυστίνης YR

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού της μικροκυστίνης YR, με την τεχνική φασματομετρίας μάζας (ESI-MS/MS) πραγματοποιήθηκαν πειράματα απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος 2 mg/L, σε διαλύτη μεθανόλη-νερό 90:10 (v/v), περιεκτικότητας 0,1% σε μυρμηγκικό οξύ. Στο Σχήμα 8.5 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της MC-YR.

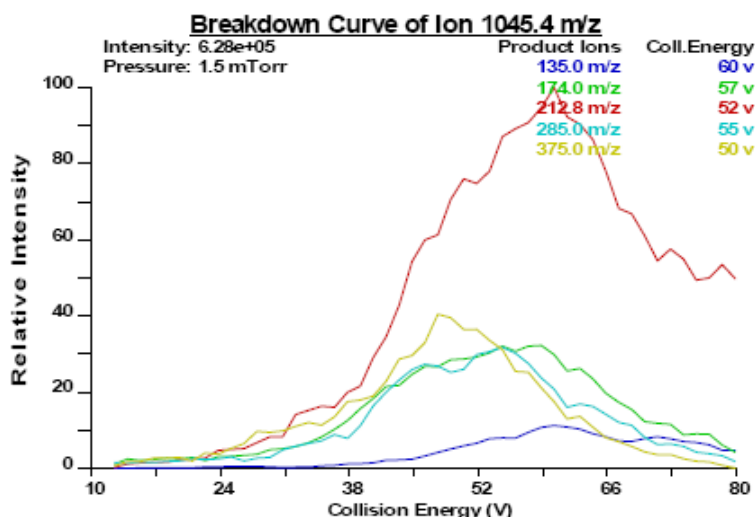


Σχήμα 8.5. Φάσμα μάζας της μικροκυστίνης YR

Παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται με μεγάλη ένταση (7.26×10^6) το μητρικό ιόν $[M+H]^+$ της μικροκυστίνης YR (m/z : 1045.22). Το φάσμα μάζας της μικροκυστίνης-YR είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος στις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό (Spray Voltage):4000 V
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature):350 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N_2 (Sheath gas pressure):20 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N_2 (Auxilliary gas):5 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Εφαρμοζόμενη τάση στις διατάξεις επιτάχυνσης και εστίασης των ιόντων (Tube lens offset): 157Volt
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστότητα στο πρώτο και τρίτο τετράπολο : 0.7 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum,FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την μικροκυστίνη YR, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.6. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM)

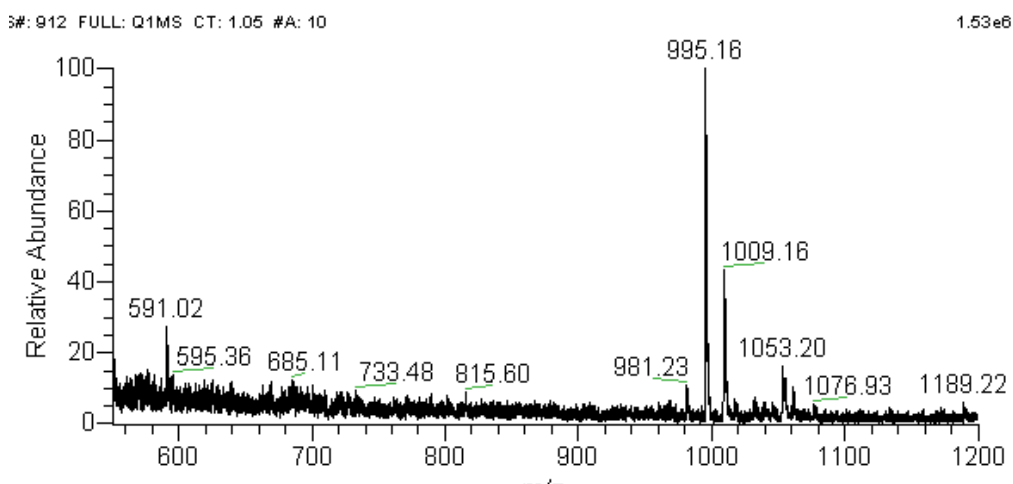


Σχήμα 8.6. Καμπύλη θραυσματοποίησης της μικροκυστίνης YR

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της μικροκυστίνης-YR επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 135 και 212.8 του μητρικού ιόντος m/z 1045.4. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε επίσης στα ιόντα m/z 135 και 212.8.

8.1.3.4. Προσδιορισμός της Μικροκυστίνης LR

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού της μικροκυστίνης LR, με την τεχνική φασματομετρίας μάζας (ESI-MS/MS), πραγματοποιήθηκαν πειράματα απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος 1mg/L (infusion), σε διαλύτη μεθανόλη-νερό 90:10 (v/v), περιεκτικότητας 0,1% σε μυρμηγκικό οξύ. Στο Σχήμα 8.7 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της μικροκυστίνης LR.

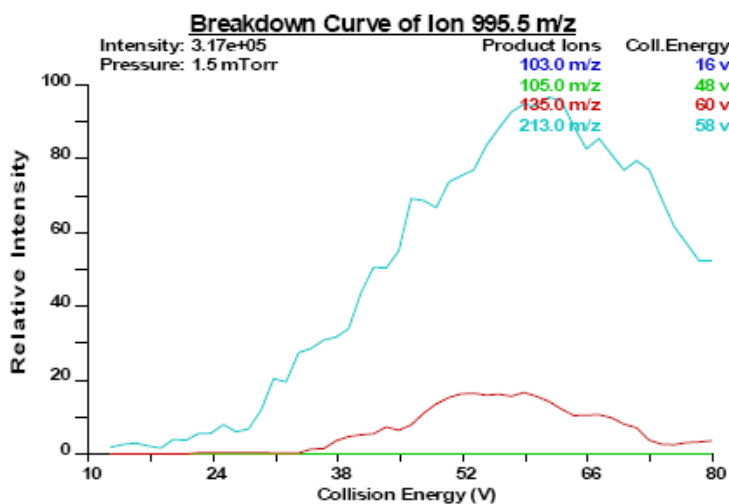


Σχήμα 8.7. Φάσμα μάζας της μικροκυστίνης LR

Παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται με μεγάλη ένταση (1.53×10^6), το μητρικό ιόν $[M+H]^+$ της μικροκυστίνης LR ($m/z:995.16$). Το φάσμα μάζας της μικροκυστίνης LR είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος στις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό (Spray Voltage):4000 V
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature):350 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N_2 (Sheath gas pressure):20 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N_2 (Auxilliary gas):5 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Εφαρμοζόμενη τάση στις διατάξεις επιτάχυνσης και εστίασης των ιόντων (Tube lens offset): 156Volt
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο και τρίτο τετράπολο : 0.7 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum,FWHM)

Στη συνέχεια βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι που αφορούν την λειτουργία του MS/MS. Ο προσδιορισμός των κυανοτοξινών πραγματοποιήθηκε μέσω ταυτόχρονης ανίχνευσης των μητρικών ιόντων στο Q1 τετράπολο και των αντίστοιχων θυγατρικών τους ιόντων στο Q2 τετράπολο. Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την μικροκυστίνη LR, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.8. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM).

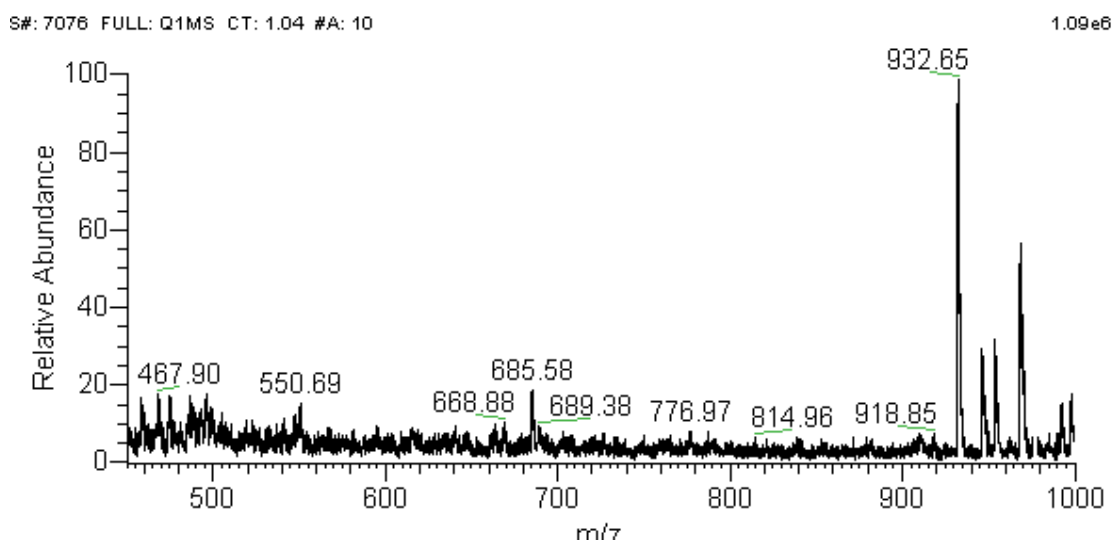


Σχήμα 8.8. Καμπύλη θραυσματοποίησης της μικροκυστίνης LR

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της μικροκυστίνης LR επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 135 και 213 του μητρικού ιόντος της m/z 995.5. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο ιόν m/z 135.

8.1.3.5. Προσδιορισμός της Μικροκυστίνης LA

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού της μικροκυστίνης LA, με την τεχνική φασματομετρίας μάζας ESI-MS/MS πραγματοποιήθηκαν πειράματα έγχυσης προτύπου διαλύματος 2 mg/L, σε διαλύτη μεθανόλη-νερό 90:10 (v/v), περιεκτικότητας 0,1% σε μυρμηγκικό οξύ. Στο Σχήμα 8.9 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας της μικροκυστίνης LA.

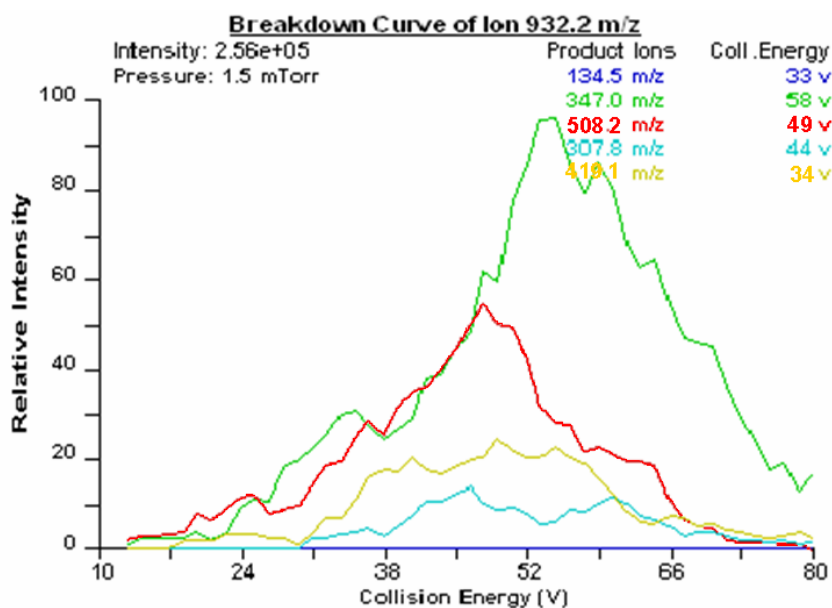


Σχήμα 8.9. Φάσμα μάζας της μικροκυστίνης LA

Παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται με μεγάλη ένταση (1.09×10^6) το μοριακό ιόν $[M+Na]^+$ (m/z : 932.65), της μικροκυστίνης LA (M.B 909). Το φάσμα μάζας της μικροκυστίνης LA είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος στις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό (Spray Voltage): 4000 V
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature): 350 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N_2 (Sheath gas pressure): 20 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N_2 (Auxilliary gas): 5 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Εφαρμοζόμενη τάση στις διατάξεις επιτάχυνσης και εστίασης των ιόντων (Tube lens offset): 140 Volt
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο και τρίτο τετράπολο : 0.7 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την μικροκυστίνη LA, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.10. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM).



Σχήμα 8.10. Καμπύλη θραυσματοποίησης της μικροκυστίνης LA

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της μικροκυστίνης LA επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 347 και 508 του μητρικού ιόντος της m/z 932.2. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στα ιόντα m/z 347 και 508.

8.1.4. Επιλογή παραμέτρων στο σύστημα φασματομετρίας μάζας LC-MS/MS

Για τον προσδιορισμό των κυανοτοξινών, με το σύστημα LC-MS/MS, επιλέχθηκαν οι παρακάτω παράμετροι του φασματογράφου μάζας, συνολικά και για τις 5 ουσίες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό (Spray Voltage): 4000 V
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature): 350 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N_2 (Sheath gas pressure): 20 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N_2 (Auxilliary gas): 5 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο και τρίτο τετράπολο : 0.7 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)

Ο προσδιορισμός των κυανοτοξινών πραγματοποιείται μέσω των μητρικών και των αντίστοιχων θυγατρικών τους ιόντων. Τα επιλεγμένα μητρικά και θυγατρικά ιόντα και οι αντίστοιχες ενδεικτικές ενέργειες διάσπασής τους (collision energies) παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2.

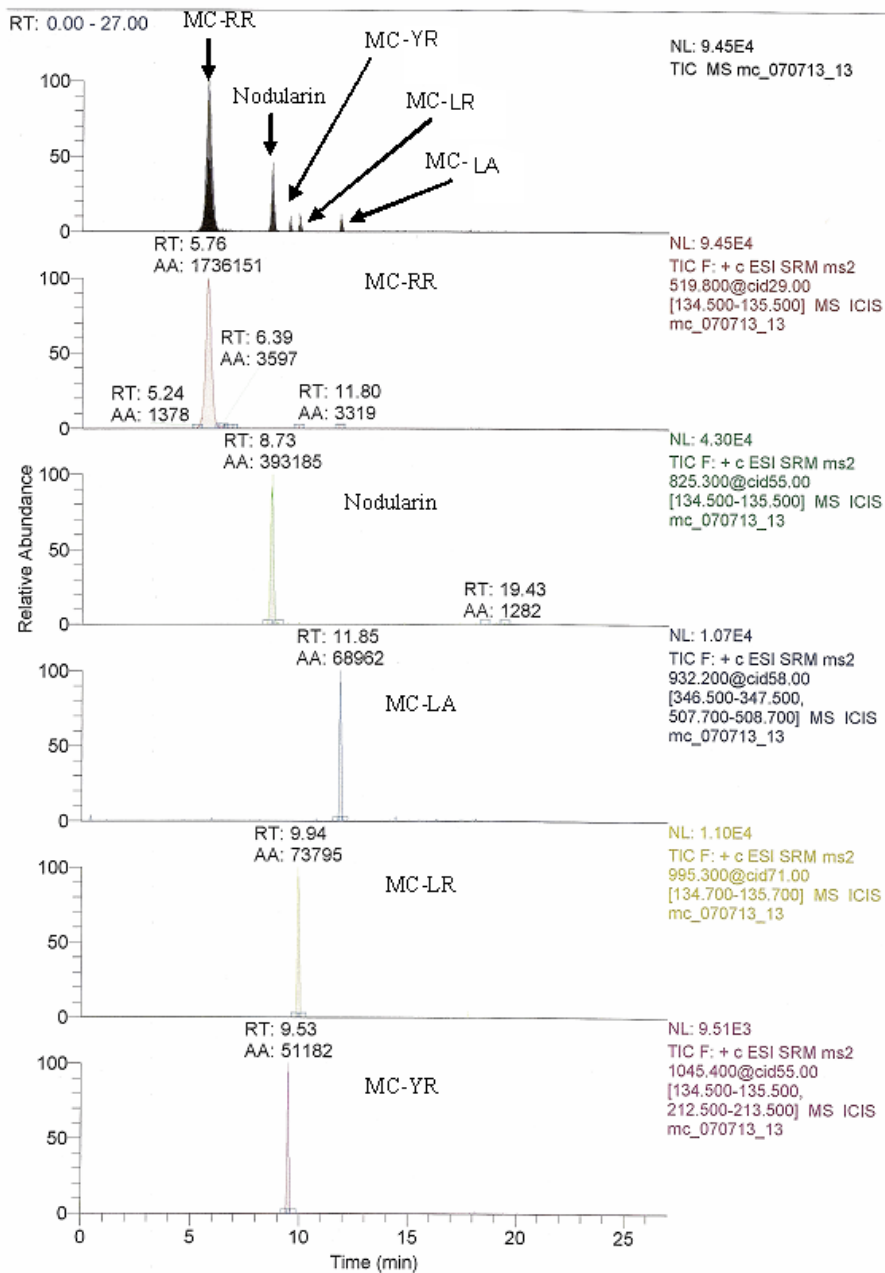
Πίνακας 8.2. Μητρικά και θυγατρικά ιόντα των υπό προσδιορισμό ουσιών

Κυανοτοξίνες	Σχετική μοριακή μάζα (Da)	Χρόνος ανάσχεσης (min)	Μητρικό ιόν (m/z)	Θυγατρικό ιόν (m/z) Q ₁ ¹	Θυγατρικό ιόν (m/z) Q ₂	[Q ₂]/[Q ₁] ² (RSD%)	Ενέργεια διάσπασης Q ₁ /Q ₂ (V)
Μικροκυστίνη RR	1037	5.69	(M+2H) ⁺² 519.8	135	213	14.84 (3.4)	32/40
Νοντουλαρίνη	824	8.72	(M+H) ⁺ 825.3	135	227	95.41 (4.88)	54/46
Μικροκυστίνη YR	1044	9.52	(M+H) ⁺ 1045.4	135	213	65.19 (7.72)	52/60
Μικροκυστίνη LR	994	9.97	(M+H) ⁺ 995.47	135	213	93.17 (9.32)	58/60
Μικροκυστίνη LA	909	11.87	(M+Na) ⁺ 932.2	508	347	24.43 (8.46)	58/49

¹ Ιόν ποσοτικοποίησης

² Λόγος ιόντων (εκφρασμένος ως μέσος λόγος εμβαδών των κορυφών με τις αντίστοιχες τιμές RSD% , για εύρος συγκεντρώσεων 10 µg/L, 20µg/L, 50 µg/L και 100µg/L / κυανοτοξίνη –ανάλυση εις τριπλούν)

Για την ποσοτικοποίηση της μικροκυστίνης RR, νοντουλαρίνης και μικροκυστίνης LR επιλέχθηκε ένα ιόν ποσοτικοποίησης (Q₁) και συγκεκριμένα το ιόν με το μεγαλύτερο σήμα προς θόρυβο. Για την ποσοτικοποίηση της μικροκυστίνης YR, και της μικροκυστίνης LA επιλέχθηκαν δύο ιόντα ποσοτικοποίησης λόγω χαμηλής έντασης σήματος των θυγατρικών τους ιόντων Ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα ενός προτύπου των 5 κυανοτοξινών, στη συγκέντρωση των 20 µg/L για κάθε μία κυανοτοξίνη, με βάση τις επιλεγμένες χρωματογραφικές και φασματομετρικές συνθήκες, φαίνεται στο Σχήμα 8.11.



Σχήμα 8.11. Χρωματογράφημα προτύπου των 5 κυανοτοξινών σε συγκέντρωση 20 µg/L ανά κυανοτοξίνη. Διακρίνονται επίσης τα χρωματογραφήματα που προκύπτουν για κάθε κυανοτοξίνη μετά από επιλογή των χαρακτηριστικών αντιδράσεων θραυσματοποίησης (SRM).

Στο παραπάνω χρωματογράφημα εμφανίζονται και οι πέντε κυανοτοξίνες στο πρώτο πλαίσιο και ξεχωριστά η κάθε κυανοτοξίνη, με τα επιλεγμένα ιόντα ποσοτικοποίησης κάθε μίας, στα επόμενα πέντε πλαίσια. Σημειώνεται επίσης ο χρόνος ανάσχεσης (R.T.) και το εμβαδό κάθε ουσίας (A.A)

8.1.5. Επάρκεια χρωματογραφικού διαχωρισμού

Η επάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού υπολογίζεται με τη λήψη χρωματογραφημάτων μιγμάτων των 5 κυανοτοξινών (μικροκυστίνη RR, νοντουλαρίνη, μικροκυστίνη YR, μικροκυστίνη LR, μικροκυστίνη LA) συγκέντρωσης 20, 50, 100, 250, 500 και 750 $\mu\text{g/L}$ ανά κυανοτοξίνη σε διαλύτη $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 20/80 v/v. Από τα ληφθέντα χρωματογραφήματα υπολογίζονται οι χρόνοι ανάσχεσης t_R κάθε ουσίας και οι συντελεστές διαχωρισμού R_s , για κάθε ζεύγος γειτονικών ουσιών, βάσει του τύπου:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_{b1} + w_{b2})$$

Όπου: R_s , συντελεστής διαχωρισμού

t_{R1} , t_{R2} , οι χρόνοι ανάσχεσης δύο γειτονικών κορυφών

w_{b1} , w_{b2} , το μέσο πλάτος δύο γειτονικών κορυφών μετρούμενο στο μέσο ύψος της κορυφής.

Τα αποτελέσματα της επάρκειας του χρωματογραφικού διαχωρισμού φαίνονται στον Πίνακα 8.3.

Πίνακας 8.3. Αποτελέσματα εκτίμησης επάρκειας χρωματογραφικού διαχωρισμού.

Κυανοτοξίνες	Αρ. ενέσεων (N)	t_R ελάχ. (min)	t_R μέγ. (min)	t_R μέση τιμή (min)	$t_{R2} - t_{R1}$ (min)	S (t_R) (min)	% RSD	R_s
Μικροκυστίνη RR	6	5,68	5,78	5,73	-	0,0354	0,6185	-
Νοντουλαρίνη	6	8,68	8,73	8,71	2,98	0,0183	0,2106	11,84
Μικροκυστίνη YR	6	9,52	9,57	9,53	0,82	0,0186	0,1953	3,20
Μικροκυστίνη LR	6	9,94	9,98	9,96	0,43	0,0126	0,1270	1,85
Μικροκυστίνη LA	6	11,85	11,88	11,86	1,90	0,0155	0,1306	7,58

Τα κριτήρια αποδοχής που τεθηκαν προκειμένου να θεωρηθεί επαρκής ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν²⁰⁸ :

1. $t_{R2} - t_{R1} > 0,2 \text{ min}$ για κάθε ζεύγος γειτονικών κορυφών
2. % RSD για τους χρόνους ανάσχεσης $< 2 \%$.
3. $R_s > 0,8$ για όλα τα ζεύγη γειτονικών κορυφών

8.1.6. Ταυτοποίηση κυανοτοξινών

Η ταυτοποίηση των προσδιοριζόμενων κυανοτοξινών σε πόσιμα και επιφανειακά ύδατα έγινε μέσω της ανίχνευσης των μητρικών και των αντίστοιχων θυγατρικών ιόντων τους στους συγκεκριμένους χρόνους ανάσχεσης. Οι μεταπτώσεις που εξετάζονται για κάθε κυανοτοξίνη

παρατίθενται στον Πίνακα 5.3. Οι κορυφές που λαμβάνονται θα πρέπει να δίνουν λόγο σήματος προς θόρυβο $S/N > 3$. Για τον έλεγχο της ταυτοποίησης των κυανοτοξινών εξετάστηκαν 2 δείγματα πόσιμου νερού όγκου 0.5 L έκαστο εμβολιασμένα με τελική συγκέντρωση έκαστης κυανοτοξίνης 0.1 $\mu\text{g/L}$ και 1 $\mu\text{g/L}$, αντίστοιχα και 2 δείγματα νερού λίμνης όγκου 0.5 L έκαστο εμβολιασμένα με τελική συγκέντρωση έκαστης κυανοτοξίνης 0.1 $\mu\text{g/L}$ και 1 $\mu\text{g/L}$, αντίστοιχα. Ο λόγος σήματος προς θόρυβο, για όλες τις μεταπτώσεις και για όλες τις κυανοτοξίνες που εξετάστηκαν, ήταν πολύ μεγαλύτερος από $S/N > 3$ για τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις πόσιμων και επιφανειακών νερών.

8.1.7. Εκλεκτικότητα. Παρεμποδιστές

Για τον εντοπισμό πιθανών παρεμποδιστών αναλύθηκαν 3 δείγματα νερού λίμνης όγκου 0.5 L έκαστο και 3 δείγματα του δικτύου ύδρευσης της Αθήνας όγκου 0.5 L έκαστο. Όλα τα παραπάνω δείγματα θεωρούνται αρχικώς «τυφλά» (μή εμπλουτισμένα με κυανοτοξίνες). Τα δείγματα αυτά εκχυλίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο εκχύλισης-προσυγκέντρωσης (Κεφάλαιο 5.3.2) και αναλύθηκαν στο σύστημα LC/MS-MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχαν συνεκλούμενες κορυφές πάνω από 0.002 $\mu\text{g/L}$ ισοδύναμα μικροκυστίνης LR στο δείγμα και στους χρόνους ανάλυσης των κυανοτοξινών (ή 2 $\mu\text{g/L}$ στο αντίστοιχο ενυόμενο διάλυμα στο LC-MS-MS).

8.1.8. Γραμμικότητα-Εύρος μεθόδου

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους της μεθόδου αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα των 5 κυανοτοξινών (μικροκυστίνη RR, νοντουλαρίνη, μικροκυστίνη YR, μικροκυστίνη LR, μικροκυστίνη LA) συγκεντρώσεων 0,5, 1, 5, 20, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 5000, 10000 $\mu\text{g/L}$ ανά κυανοτοξίνη σε διαλύτη MeOH/H₂O 20/80 v/v. Από κάθε πρότυπο διάλυμα πραγματοποιήθηκαν 3 ενέσεις στο σύστημα LC-MS/MS. Η πρότυπη καμπύλη για κάθε κυανοτοξίνη προέκυψε μετά από γραμμική συσχέτιση μεταξύ του εμβαδού της κορυφής για κάθε συγκέντρωση κυανοτοξίνης και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων. Προσδιορίστηκε η κλίση (b) και η αποτέμνουσα (a) της ευθείας που προκύπτει για κάθε κυανοτοξίνη. Με βάση τα αποτελέσματα έγινε εκτίμηση της γραμμικότητας και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης R^2 της ευθείας που προκύπτει. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.4.

Πίνακας 8.4. Γραμμικότητα Κυανοτοξινών

Κυανοτοξίνες	Εξισώσεις	Συντελεστής Γραμμικό- τητας (R^2)	Εύρος γραμμικό- τητας ($\mu\text{g/L}$)	Αριθμός Συγκεντρώσεων
Μικροκυστίνη RR	$y=96515x-2000000$	0,9994	1-10000	13
Νοντουλαρίνη	$y=19103x+128455$	0,997	1-5000	12
Μικροκυστίνη YR	$y=4630,1x-406615$	0,994	1-5000	12
Μικροκυστίνη LR	$y=5878,1x-880223$	0,993	1-10000	13
Μικροκυστίνη LA	$y=6287x-375103$	0,994	1-10000	13

8.1.9. Πιστότητα της προτεινόμενης μεθόδου

Για την εκτίμηση της πιστότητας (precision) της μεθόδου εξετάστηκε η επαναληψιμότητα για δύο συγκεντρώσεις των υπό προσδιορισμό ουσιών. Συλλέχθηκαν 20 L πόσιμο νερό από το Δίκτυο της Αθήνας και 20 L επιφανειακού νερού από τον ταμιευτήρα του Μόρνου.

Έπειτα παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα:

α) Διάλυμα μίγματος κυανοτοξινών τελικής συγκέντρωσης 2000 $\mu\text{g/L}$ ανά μικροκυστίνη και 1718 $\mu\text{g/L}$ για την νοντουλαρίνη σε μεθανόλη (Κωδική ονομασία: StckMixA).

β) Διάλυμα μίγματος κυανοτοξινών τελικής συγκέντρωσης 500 $\mu\text{g/L}$ ανά μικροκυστίνη και 428 $\mu\text{g/L}$ για την νοντουλαρίνη σε μεθανόλη (Κωδική ονομασία: StckMixB).

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα πόσιμου και επιφανειακού νερού με τα ανωτέρω διαλύματα του μίγματος κυανοτοξινών (StkMixA και StkMixB).

Η πρώτη σειρά δειγμάτων αποτελούνταν από:

- i) 6 δείγματα πόσιμο νερό από το δίκτυο της Αθήνας 500 ml έκαστο, εμπλουτισμένα με 250ml πρότυπου μίγματος Stck MixA, τελικής συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/L}$ ανά κυανοτοξίνη.
- ii) 6 δείγματα πόσιμο νερό από το δίκτυο της Αθήνας 500 ml έκαστο, εμπλουτισμένα με 100 ml πρότυπου μίγματος Stck MixB, τελικής συγκέντρωσης 0.1 $\mu\text{g/L}$ ανά κυανοτοξίνη.
- iii) 2 δείγματα πόσιμο νερό από το δίκτυο της Αθήνας 500 ml έκαστο (τυφλά).

Η δεύτερη σειρά δειγμάτων αποτελούνταν από:

- i) 6 δείγματα νερού από τον ταμιευτήρα του Μόρνου 500 ml έκαστο, εμπλουτισμένα με 250 μl πρότυπου μίγματος Steck MixA, τελικής συγκέντρωσης 1 μg/L ανά κυανοτοξίνη,
- ii) 6 δείγματα νερού από τον ταμιευτήρα του Μόρνου 500 ml έκαστο, εμπλουτισμένα με 100 μl πρότυπου μίγματος, τελικής συγκέντρωσης 0.1 μg/L ανά κυανοτοξίνη,
- iii) 2 δείγματα νερού από τον ταμιευτήρα του Μόρνου 500 ml έκαστο (τυφλά).

Η ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση την προτεινόμενη μέθοδο εκχύλισης και προσυγκέντρωσης σε συνθήκες επαναληψιμότητας (ίδιος αναλυτής, την ίδια μέρα). Με βάση τα ληφθέντα αποτελέσματα υπολογίστηκαν : α) η τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας, S_r β) η σχετική τυπική απόκλιση, RSD_r γ) το όριο επαναληψιμότητας, r ($r = 2.8 \times S_r$). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της πιστότητας δίνονται στους Πίνακες 8.5 έως 8.8 που ακολουθούν.

Πίνακας 8.5. Αποτελέσματα πειραμάτων πιστότητας για συγκέντρωση 0,1μg/L ανά κυανοτοξίνη, σε πόσιμα νερά

Κυανοτοξίνες	Αριθμός επαναλήψεων (N)	Μέση τιμή (μg/L)	Τυπική απόκλιση (Sr)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD _r)	Όριο επαναληψιμότητας (r)
Μικροκυστίνη RR	6	0.07611	0.00238	3.13	0.00667
Νοντουλαρίνη	6	0.09222	0.00258	2.79	0.00721
Μικροκυστίνη YR	6	0.07876	0.00830	10.53	0.02323
Μικροκυστίνη LR	6	0.09809	0.00468	4.77	0.01311
Μικροκυστίνη LA	6	0.09486	0.00638	6.73	0.01787

Πίνακας 8.6. Αποτελέσματα πειραμάτων ακρίβειας για συγκέντρωση 1μg/L ανά κυανοτοξίνη, σε πόσιμα νερά

Κυανοτοξίνες	Αριθμός επαναλήψεων (N)	Μέση τιμή (μg/L)	Τυπική απόκλιση (Sr)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD _r)	Όριο επαναληψιμότητας (r)
Μικροκυστίνη RR	6	0.78429	0.02769	3.53	0.07753
Νοντουλαρίνη	6	0.85683	0.05124	5.98	0.14347
Μικροκυστίνη YR	6	1.13421	0.04897	4.32	0.13710
Μικροκυστίνη LR	6	1.03115	0.05890	5.71	0.16493
Μικροκυστίνη LA	6	0.89247	0.04246	4.76	0.11889

Πίνακας 8.7. Αποτελέσματα πειραμάτων ακρίβειας για συγκέντρωση 0,1μg/L ανά κυανοτοξίνη, σε επιφανειακά νερά

Κυανοτοξίνες	Αριθμός επαναλήψεων (N)	Μέση τιμή (μg/L)	Τυπική απόκλιση (Sr)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD _r)	Όριο επαναληψιμότητας (r)
Μικροκυστίνη RR	6	0.08370	0.00706	8.44	0.01978
Νοντουλαρίνη	6	0.09184	0.00859	9.35	0.02404
Μικροκυστίνη YR	6	0.09508	0.00944	9.93	0.02643
Μικροκυστίνη LR	6	0.09822	0.01028	10.47	0.02878
Μικροκυστίνη LA	6	0.10295	0.00803	7.80	0.02248

Πίνακας 8.8. Αποτελέσματα πειραμάτων ακρίβειας για συγκέντρωση 1μg/L ανά κυανοτοξίνη, σε επιφανειακά νερά, σε επιφανειακά νερά

Κυανοτοξίνες	Αριθμός επαναλήψεων (N)	Μέση τιμή (μg/L)	Τυπική απόκλιση (Sr)	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD _r)	Όριο επαναληψιμότητας (r)
Μικροκυστίνη RR	6	0.69044	0.05701	8.26	0.15962
Νοντουλαρίνη	6	0.82751	0.07100	8.58	0.19881
Μικροκυστίνη YR	6	0.84036	0.04932	5.87	0.13809
Μικροκυστίνη LR	6	0.83629	0.03873	4.63	0.10843
Μικροκυστίνη LA	6	0.90727	0.06522	7.19	0.18262

Η οδηγία SANCO 3131²¹⁵ αναφέρει ως αποδεκτά ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης αυτά που βρίσκονται κάτω από 20%.

8.1.10 Ορθότητα της προτεινόμενης μεθόδου

Η ορθότητα-ανάκτηση (truness-recovery) της μεθόδου υπολογίζεται ως % ανάκτηση (R) των υπό προσδιορισμό ουσιών. Η % ανάκτηση υπολογίζεται από τον τύπο

$$\% R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Όπου C₁= η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο εμβολιασμένο δείγμα.

C₂= η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο τυφλό δείγμα.

C₃= η συγκέντρωση εμβολιασμού.

Ο υπολογισμός των ανακτήσεων των υπό προσδιορισμό ουσιών πραγματοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις (0.1 μg/L και 1μg/L) και σε δύο είδη δειγμάτων, πόσιμο και επιφανειακό νερό. Συλλέχθηκαν 20 L πόσιμο νερού από το Δίκτυο της Αθήνας και 20 L νερού από τον ταμιευτήρα του Μόρνου.

Η πρώτη σειρά δειγμάτων αποτελούνταν από:

- iv) 6 δείγματα πόσιμου νερού απο το δίκτυο της Αθήνας 500 ml έκαστο, εμπλουτισμένα με 250μl πρότυπου μίγματος Steck MixA, τελικής συγκέντρωσης 1 μg/L ανά κυανοτοξίνη
- v) 6 δείγματα πόσιμου νερού απο το δίκτυο της Αθήνας 500 ml έκαστο, εμπλουτισμένα με 100 μl πρότυπου μίγματος Steck MixB, τελικής συγκέντρωσης 0.1 μg/L ανά κυανοτοξίνη
- vi) 2 δείγματα πόσιμου νερού απο το δίκτυο της Αθήνας 500 ml έκαστο (τυφλά)

Η δεύτερη σειρά δειγμάτων αποτελούνταν από:

- iv) 6 δείγματα νερού από τον ταμιευτήρα του Μόρνου 500 ml έκαστο, εμπλουτισμένα με 250 μl πρότυπου μίγματος Steck MixA , τελικής συγκέντρωσης 1 μg/L/κυανοτοξίνη
- v) 6 δείγματα νερού από τον ταμιευτήρα του Μόρνου 500 ml έκαστο, εμπλουτισμένα με 100 μl πρότυπου μίγματος, τελικής συγκέντρωσης 0.1 μg/L/κυανοτοξίνη
- vi) 2 δείγματα νερού από τον ταμιευτήρα του Μόρνου 500 ml έκαστο (τυφλά)

Τα αποτελέσματα που αφορούν στον υπολογισμό των ανακτήσεων δίνονται στους Πίνακες 8.9 έως 8.12.

Πίνακας 8.9. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης για συγκέντρωση 0,1 μg/L ανά κυανοτοξίνη σε πόσιμα νερά

Κυανοτοξίνες	Αριθμός επαναλήψεων (N)	Ελάχιστη τιμή ανάκτησης (%R)	Μέγιστη τιμή ανάκτησης (%R)	Μέση τιμή ανάκτησης (%R)	Τυπική απόκλιση (Sr)
Μικροκυστίνη RR	6	74,3	80,7	76,1	2,4
Νοντουλαρίνη	6	88,6	94,6	92,2	2,6
Μικροκυστίνη YR	6	68,9	89,5	78,8	8,3
Μικροκυστίνη LR	6	96,3	105,9	98,1	4,7
Μικροκυστίνη LA	6	88,2	104,4	94,9	6,4

Πίνακας 8.10. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης για συγκέντρωση 1μg/L ανά κυανοτοξίνη σε πόσιμα νερά

Κυανοτοξίνες	Αριθμός επαναλήψεων (N)	Ελάχιστη τιμή ανάκτησης (%R)	Μέγιστη τιμή ανάκτησης (%R)	Μέση τιμή ανάκτησης (%R)	Τυπική απόκλιση (Sr)
Μικροκυστίνη RR	6	74.5	81.9	78,4	2,8
Νοντουλαρίνη	6	81.0	95.1	85,7	5,1
Μικροκυστίνη YR	6	108.3	119.7	113,4	4,9
Μικροκυστίνη LR	6	92.2	107.1	103,1	5,9
Μικροκυστίνη LA	6	86.9	93.0	89,2	4,2

Πίνακας 8.11. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης για συγκέντρωση 0,1μg/L ανά κυανοτοξίνη σε επιφανειακά νερά

Κυανοτοξίνες	Αριθμός επαναλήψεων (N)	Ελάχιστη τιμή ανάκτησης (%R)	Μέγιστη τιμή ανάκτησης (%R)	Μέση τιμή ανάκτησης (%R)	Τυπική απόκλιση (Sr)
Μικροκυστίνη RR	6	69,9	89,1	83,7	7,1
Νοντουλαρίνη	6	75,3	100,1	91,8	8,6
Μικροκυστίνη YR	6	82	104,5	95,1	9,4
Μικροκυστίνη LR	6	80,6	109,4	98,2	10,3
Μικροκυστίνη LA	6	88,2	108,6	103	8,0

Πίνακας 8.12. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης για συγκέντρωση 1μg/L ανά κυανοτοξίνη σε επιφανειακά νερά

Κυανοτοξίνες	Αριθμός επαναλήψεων (N)	Ελάχιστη τιμή ανάκτησης (%R)	Μέγιστη τιμή ανάκτησης (%R)	Μέση τιμή ανάκτησης (%R)	Τυπική απόκλιση (Sr)
Μικροκυστίνη RR	6	61,9	76,9	69,7	5,7
Νοντουλαρίνη	6	81,0	92,6	82,8	7,1
Μικροκυστίνη YR	6	76,1	90,8	84,0	4,9
Μικροκυστίνη LR	6	77,1	87,5	83,6	3,9
Μικροκυστίνη LA	6	80,2	98,9	90,7	6,5

8.1.11 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις δύο θεωρητικές μεθόδους που αναφέρονται στο πειραματικό μέρος αυτής της διατριβής (Κεφάλαιο 5.5.1). Τα θεωρητικά χαμηλότερα όρια ανίχνευσης επιβεβαιώθηκαν και πειραματικά.

Η μέθοδος Α έδωσε χαμηλότερα όρια ανίχνευσης τα οποία επαληθεύτηκαν και πειραματικά με την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων πόσιμου και επιφανειακού νερού.

Συγκεκριμένα εμβολιάστηκαν δείγματα πόσιμου και επιφανειακού νερού, με μίγματα προτύπων κυανοτοξινών, ώστε η τελική συγκέντρωση κάθε κυανοτοξίνης να είναι ίση με 17, 13, 10, 3, 2 ng/L. Οι 5 προσδιοριζόμενες κυανοτοξίνες ανιχνεύτηκαν σε όλες τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις. Το όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) της μεθόδου υπολογίστηκε από το όριο ανίχνευσης με βάση τον τύπο:

$$LOQ = 3 \times LOD.$$

Στους πίνακες 8.13 και 8.14 παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης που υπολογίστηκαν θεωρητικά

Πίνακας 8.13. Όρια ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθόδου για τα πόσιμα νερά

Κυανοτοξίνες	LOD ¹ (µg/L)	LOD ² (µg/L)
Μικροκυστίνη RR	0,003	0,010
Νοντουλαρίνη	0,002	0,010
Μικροκυστίνη YR	0,013	0,026
Μικροκυστίνη LR	0,017	0,019
Μικροκυστίνη LA	0,010	0,034

¹Υπολογισμοί με τη μέθοδο A, ²Υπολογισμοί με τη μέθοδο B

Πίνακας 8.14. Όρια ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθόδου για τα επιφανειακά νερά

Ουσίες	LOD ¹ (µg/L)	LOD ² (µg/L)
Μικροκυστίνη RR	0,003	0,028
Νοντουλαρίνη	0,002	0,035
Μικροκυστίνη YR	0,013	0,032
Μικροκυστίνη LR	0,017	0,041
Μικροκυστίνη LA	0,010	0,038

¹Υπολογισμοί με τη μέθοδο A, ²Υπολογισμοί με τη μέθοδο B

8.1.12 Ανθεκτικότητα της προτεινόμενης μεθόδου

Προκειμένου να μελετηθεί η ανθεκτικότητα της μεθόδου σε μεταβολές των πειραματικών συνθηκών, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων στα αποτελέσματα της ανάλυσης. Για να εντοπιστούν οι παράγοντες που είναι δυνατό να μεταβληθούν από τις καθορισμένες τιμές τους, και ενδεχομένως να επηρεάσουν το αποτέλεσμα, αποτυπώθηκε η όλη αναλυτική πορεία σε διάγραμμα ροής και έγινε επιλογή τριών παραγόντων. Οι παράγοντες που επελέγησαν και τα επίπεδα στα οποία πραγματοποιήθηκε η μελέτη, φαίνονται στον Πίνακα 8.15.

Η μελέτη έγινε βάσει πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken για 3 παράγοντες σε 3 επίπεδα (Κεφάλαιο 5.5.2) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τυχαιοποιημένη σειρά σε μία αναλυτική παρτίδα. Σε όλα τα πειράματα αναλύθηκε το ίδιο δείγμα πόσιμου νερού (βρύση εργαστηρίου) εμπλουτισμένο με 1 µg/L της μικροκυστίνης LR

και μετρήθηκε ως απόκριση το εμβαδόν της κορυφής της μικροκυστίνης LR. Στον Πίνακα 8.16 φαίνονται οι πειραματικές συνθήκες και τα αποτελέσματα των πειραμάτων.

Πίνακας 8.15. Παράγοντες που μελετήθηκαν και επίπεδα μελέτης

a/a	Παράγοντας	Επίπεδο -1	Επίπεδο 0	Επίπεδο +1
1	Ταχύτητα ροής δείγματος στην SPE	5 ml/min	10 ml/min	15 ml/min
2	Θερμοκρασία εξάτμισης εκχυλίσματος	30 °C	40 °C	50 °C
3	Όγκος διαλύματος έκλουσης	3 ml	4 ml	5 ml

Πίνακας 8.16. Σειρά πειραμάτων και αποτελέσματα

Τυπική Σειρά	Σειρά εκτέλεσης (τυχαιοποιημένη)	Ταχύτητα ροής δείγματος (ml/min)	Θερμοκρασία εξάτμισης (°C)	Όγκος Έκλουσης (ml)	Εμβαδόν κορυφής MC-LR (counts)
4	1	15	50	4	2321537
8	2	15	40	5	2849997
9	3	10	30	3	2825721
2	4	15	30	4	2891441
15	5	10	40	4	2982087
7	6	5	40	5	2843107
6	7	15	40	3	3021790
10	8	10	50	3	3047811
1	9	5	30	4	3105220
11	10	10	30	5	3191470
14	11	10	40	4	3151688
12	12	10	50	5	948374
5	13	5	40	3	870484
3	14	5	50	4	3357169
13	15	10	40	4	3067644

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι όλες οι επιδράσεις, γραμμικές, δευτεροβάθμιες και αλληλεπιδράσεις παραγόντων είναι στατιστικώς μη σημαντικές ($P>0.05$).

8.1.13 Εφαρμοσιμότητα της μεθόδου. Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία επιφανειακού ύδατος από την λίμνη του Μαραθώνα και πόσιμο νερού από τα διυλιστήρια της ΕΥΔΑΠ. Οι δειγματοληψίες στον Μαραθώνα ξεκίνησαν τον Ιούλιο του 2007 και διενεργήθηκαν από την Ε.ΥΔ.ΑΠ. Συνολικά αναλύθηκαν 86 άγνωστα δείγματα νερού (6 πόσιμα από διυλιστήρια της

Ε.ΥΔ.ΑΠ , 78 δείγματα από την λίμνη του Μαραθώνα και 1 δείγμα από την λίμνη Υλίκη και 1 δείγμα από το Μόρνο).

Πραγματοποιήθηκε η λήψη 4-5 δειγμάτων, ανά 15 μέρες περίπου, για το χρονικό διάστημα από 25/7/2007 έως και 20/1/2009). Η επιλογή των τοποθεσιών της δειγματοληψίας, έγινε με σκοπό αυτά τα δείγματα να είναι αντιπροσωπευτικά της ευρύτερης περιοχής της λίμνης. Συγκεκριμένα αποφασίστηκε η δειγματοληψία από το κέντρο της λίμνης, από τον πύργο υδροληψίας της λίμνης και από το φράγμα. Τα δείγματα 1 και 5 προέρχονταν από το σημείο που βρίσκεται ο πύργος υδροληψίας της ΕΥΔΑΠ. Το δείγμα από το σημείο 1 ήταν επιφανειακό νερό ενώ το δείγμα από το το σημείο 5 ήταν μίγμα επιφανειακού νερού και νερού βάθους μεγαλύτερου των 20 μέτρων, του ίδιου σημείου. Από τον πύργο υδροληψίας, και συγκεκριμένα από το σημείο 5, ξεκινά το υδρευτικό σύστημα της ΕΥΔΑΠ, το οποίο συνδέει τη λίμνη του Μαραθώνα με το διωλιστήριο επεξεργασίας νερού του Γαλασίου και αντιπροσωπεύει το νερό που καταλήγει στο διωλιστήριο αυτό. Το σημείο 2, βρισκόταν στο κέντρο της λίμνης, αρκετά μακριά από τον πύργο υδροληψίας. Τα σημεία δειγματοληψίας 3 και 4 βρίσκονταν στο φράγμα της λίμνης. Έχει παρατηρηθεί οπτικά ότι στην επιφάνεια του φράγματος της λίμνης συσσωρεύονται, λόγω ανέμων και ρευμάτων, στερεά σωματίδια αλλά και φύκη. Οπότε, είναι πιθανό να μεταφέρονται κυανοβακτήρια και κυανοτοξίνες, στην συγκεκριμένη περιοχή, εφόσον παρατηρηθούν. Για αυτούς τους λόγους, το φράγμα της λίμνης, επιλέχθηκε ως σημείο δειγματοληψίας για δύο είδη δειγμάτων, ένα επιφανειακό και ένα σε βάθος 5 μέτρων. Τα σημεία δειγματοληψίας από την λίμνη Μαραθώνα φαίνονται στον Πίνακα 8.19 και στο Σχήμα 8.12

Πίνακας 8.19. Σημεία δειγματοληψίας λίμνης Μαραθώνα.

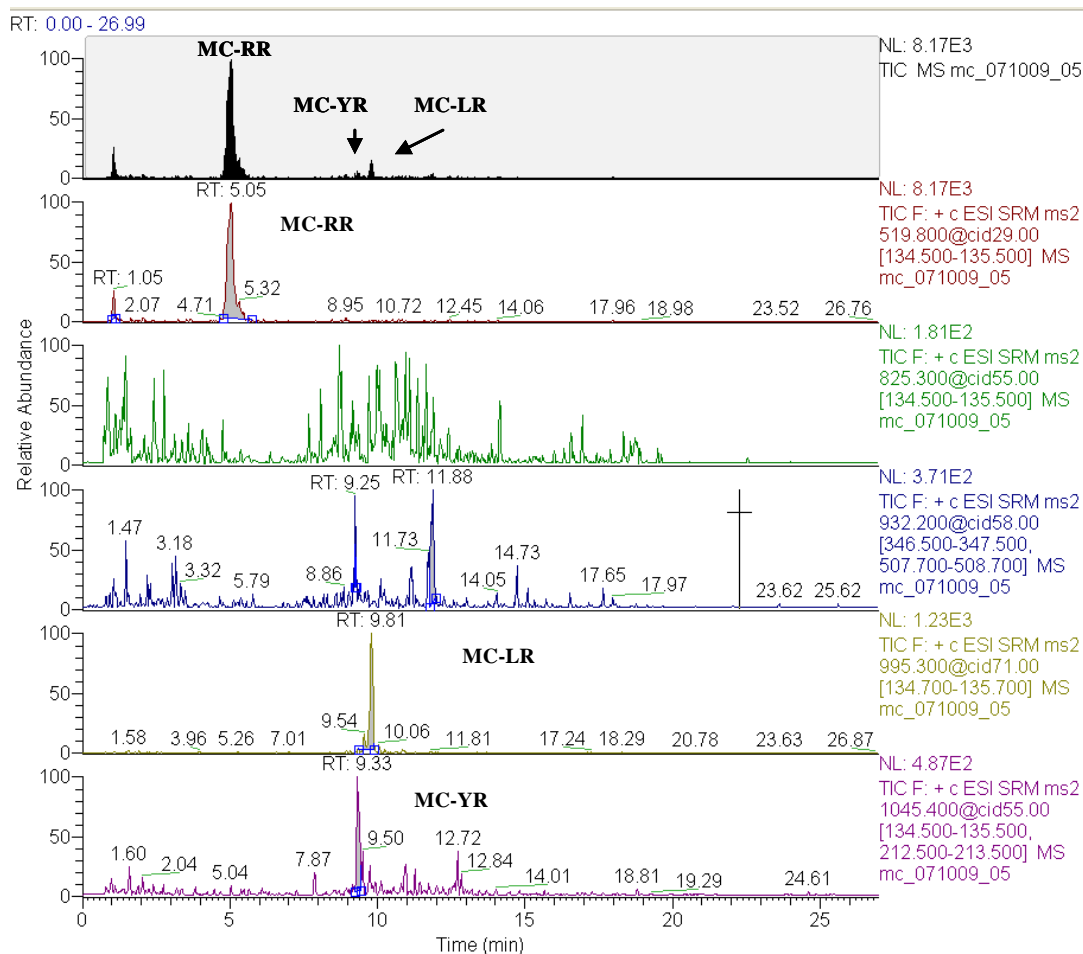
Σημείο	Θέση	Βάθος
1	Πύργος Υδροληψίας	Επιφανειακό
2	Κέντρο Λίμνης	Επιφανειακό
3	Κέντρο Φράγματος	Επιφανειακό
4	Κέντρο Φράγματος	5 m
5	Πύργος Υδροληψίας	Μίγμα επιφανειακού νερού και νερού βάθους > 20m



Σχήμα 8.12. Σημεία Δειγματοληψίας στη λίμνη του Μαραθώνα.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ng/L (όριο WHO :1 μg μικροκυστίνης LR ανά λίτρο πόσιμου νερού^{119,120}). Όταν η ευρεθείσα τιμή ήταν μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, αναφερόταν ως «Μή ανιχνεύσιμη».

Ένα τυπικό χρωματογράφημα, που λήφθηκε από δείγμα νερού της λίμνης του Μαραθώνα στις 06/09/2007, και αναλύθηκε με την προτεινόμενη μέθοδο παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.13. Διακρίνονται οι μικροκυστίνες RR, LR και YR (S/N>3), ενώ δεν ανιχνεύθηκαν η μικροκυστίνη LA και η νοντουλαρίνη (S/N<3).



Σχήμα 8.13 . Χρωματογράφημα δείγματος νερού από την λίμνη του Μαραθώνα (η δειγματοληψία διεξήχθη στις 06/09/2007).

Στον Πίνακα 8.20 δίνονται τα αποτελέσματα των προσδιορισμών των τοξινών μικροκυστίνη RR, νοντουλαρίνη, μικροκυστίνη YR, μικροκυστίνη LR, μικροκυστίνη LA στα δείγματα νερού από την λίμνη του Μαραθώνα ενώ στον Πίνακα 8.21 αναφέρονται τα αποτελέσματα από πόσιμα νερά του διυλιστηρίου της ΕΥΔΑΠ, από το ποτάμι του Μόρνου και από την λίμνη Υλίκη (η συντομογραφία M.A. σημαίνει Μη Ανιχνεύσιμη).

Η ταυτοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με την παρακολούθηση δύο χαρακτηριστικών μεταπτώσεων (θυγατρικών ιόντων) για κάθε ουσία (βλέπε Πίνακα 5.3). Σε κάθε περίπτωση ελέγχθηκε ο λόγος σήματος προς θόρυβο (κριτήριο: $S/N > 3$) για κάθε μετάπτωση των κυανοτοξινών, όταν εμφανίζονταν κορυφές στους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυανοτοξινών πραγματοποιήθηκε με την μέτρηση των εμβαδών των ιόντων ποσοτικοποίησης των κυανοτοξινών.

Πίνακας 8.20. Αποτελέσματα προσδιορισμών κυανοτοξινών στο νερό από την λίμνη του Μαραθώνα

a/a	Ημερομηνία	Σημείο	Περιγραφή	Μικροκυστίνη RR (ng L ⁻¹)	Νοντουλαρίνη (ng L ⁻¹)	Μικροκυστίνη YR (ng L ⁻¹)	Μικροκυστίνη LR (ng L ⁻¹)	Μικροκυστίνη LA (ng L ⁻¹)
1	25/7/2007	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	0,5	M..A	M..A	M..A	M.A
2	25/7/2007	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	M.A	M..A	M..A	M..A	M.A
3	25/7/2007	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	M.A	M.A	M.A	M.A	M.A
4	25/7/2007	4	Κέντρο Φράγματος –Βάθος 5m	M.A	M.A	M.A	M.A	M.A
5	22/08/07	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	1,2	M.A	M.A	M.A	M.A
6	22/08/07	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	0,7	M.A	M.A	M.A	M.A
7	22/08/07	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	1,3	M.A	M.A	M.A	M.A
8	22/08/07	4	Κέντρο Φράγματος –Βάθος 5m	0,8	M.A	M.A	M.A	M.A
9	6/9/2007	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	6,5	M.A.	1,2	4,5	M.A.
10	6/9/2007	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	7,0	M.A.	1,3	5,6	M.A.
11	6/9/2007	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	7,6	M.A.	1,6	5,2	M.A.

a/a	Ημερομηνία	Σημείο	Περιγραφή	Μικροκυστίνη RR (ng L⁻¹)	Νοντουλαρίνη (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη YR (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη LR (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη LA (ng L⁻¹)
12	6/9/2007	4	Κέντρο Φράγματος –Βάθος 5m	5,5	M.A.	0,4	4,6	M.A.
13	20/9/2007	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	15,6	M.A.	2,0	10,9	0,5
14	20/9/2007	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	12,5	M.A.	2,7	9,3	0,6
15	20/9/2007	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	59,6	M.A.	4,0	14,6	M.A.
16	20/9/2007	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	14,6	M.A.	3,9	11,2	M.A.
17	16/11/2007	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	7,0	M.A.	0,1	1,0	M.A.
18	16/11/2007	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	43,0	M.A.	M.A.	8,7	M.A.
19	16/11/2007	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	43,2	M.A.	0,7	8,8	M.A.
20	16/11/2007	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	54,4	M.A.	1,3	11,7	M.A.
21	30/11/2007	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	18,9	M.A.	M.A.	20,3	M.A.
22	30/11/2007	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	15,1	M.A.	M.A.	17,8	M.A.
23	30/11/2007	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	9,4	M.A.	M.A.	28,7	M.A.

a/a	Ημερομηνία	Σημείο	Περιγραφή	Μικροκυστίνη RR (ng L⁻¹)	Νοντουλαρίνη (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη YR (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη LR (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη LA (ng L⁻¹)
24	30/11/2007	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	20,1	M.A.	9,2	17,8	M.A.
25	30/11/2007	5	Πύργος Υδροληψίας – Σύνθ.	15,1	M.A.	M.A.	16,6	M.A.
26	30/11/2007	6	Σύνθετο επιφανειακό δείγμα	22,8	M.A.	M.A.	13,7	M.A.
27	17/01/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	8,2	M.A.	M.A.	14,6	M.A.
28	17/01/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	7,1	M.A.	M.A.	1,6	M.A.
29	17/01/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	5,9	M.A.	M.A.	0,5	M.A.
30	17/01/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	6,8	M.A.	M.A.	1,6	M.A.
31	17/01/2008	5	Πύργος Υδροληψίας – Σύνθ.	6,2	M.A.	M.A.	1,1	M.A.
32	5/2/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	4,7	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
33	5/2/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	4,7	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
34	5/2/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	4,3	M.A.	M.A.	1,0	M.A.
35	5/2/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	0,7	M.A.	M.A.	2,5	M.A.

a/a	Ημερομηνία	Σημείο	Περιγραφή	Μικροκυστείνη RR (ng L⁻¹)	Νοντουλαρίνη (ng L⁻¹)	Μικροκυστείνη YR (ng L⁻¹)	Μικροκυστείνη LR (ng L⁻¹)	Μικροκυστείνη LA (ng L⁻¹)
36	5/2/2008	5	Πύργος Υδροληψίας – Σύνθ.	3,9	M.A.	M.A.	0,6	M.A.
37	15/2/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	5,0	M.A.	M.A.	1,0	M.A.
38	15/2/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	4,4	M.A.	M.A.	1,8	M.A.
39	15/2/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	4,2	M.A.	M.A.	0,7	M.A.
40	15/2/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	3,9	M.A.	M.A.	0,6	M.A.
41	15/2/2008	5	Πύργος Υδροληψίας – Σύνθ.	4,6	M.A.	M.A.	0,6	M.A.
42	5/3/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	5,1	M.A.	M.A.	0,6	M.A.
43	5/3/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	4,7	M.A.	M.A.	0,7	M.A.
44	5/3/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	4,3	M.A.	M.A.	0,6	M.A.
45	5/3/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	3,4	M.A.	M.A.	0,8	M.A.
46	5/3/2008	5	Πύργος Υδροληψίας – Σύνθ.	3,6	M.A.	M.A.	0,7	M.A.
47	31/3/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	3,5	M.A.	M.A.	0,8	M.A.

a/a	Ημερομηνία	Σημείο	Περιγραφή	Μικροκυστείνη RR (ng L⁻¹)	Νοντουλαρίνη (ng L⁻¹)	Μικροκυστείνη YR (ng L⁻¹)	Μικροκυστείνη LR (ng L⁻¹)	Μικροκυστείνη LA (ng L⁻¹)
48	31/3/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	4,1	M.A.	M.A.	0,7	M.A.
49	31/3/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	3,6	M.A.	M.A.	0,4	M.A.
50	31/3/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	3,9	M.A.	M.A.	0,0	M.A.
51	31/3/2008	5	Πύργος Υδροληψίας – Σύνθ.	5,3	M.A.	M.A.	0,7	M.A.
52	15/4/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	1,8	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
53	15/4/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	2,5	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
54	15/4/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	3,0	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
55	15/4/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος 5m	3,3	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
56	15/4/2008	5	Πύργος Υδροληψίας – Σύνθ.	6,8	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
57	15/5/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	2,0	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
58	15/5/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
59	15/5/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	2,6	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.

a/a	Ημερομηνία	Σημείο	Περιγραφή	Μικροκυστίνη RR (ng L⁻¹)	Νοντουλαρίνη (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη YR (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη LR (ng L⁻¹)	Μικροκυστίνη LA (ng L⁻¹)
60	15/5/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος	2,6	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
61	29/8/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	19,5	M.A.	M.A.	2,0	M.A.
62	29/8/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	18,7	M.A.	M.A.	1,0	M.A.
63	29/8/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	21,3	M.A.	M.A.	1,8	M.A.
64	29/8/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
65	23/9/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	45,4	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
66	23/9/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	46,1	M.A.	M.A.	1,1	M.A.
67	23/9/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	38,4	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
68	23/9/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος	36,0	M.A.	M.A.	1,5	M.A.
69	6/10/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	16,7	M.A.	M.A.	2,2	M.A.
70	6/10/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	23,4	M.A.	M.A.	3,9	M.A.
71	6/10/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	27,8	M.A.	M.A.	5,3	M.A.
72	6/10/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος	24,6	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
73	2/12/2008	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	4,5	M.A.	M.A.	3,5	M.A.
74	2/12/2008	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	4,3	M.A.	M.A.	3,3	M.A.
75	2/12/2008	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	5,8	M.A.	M.A.	4,5	M.A.
76	2/12/2008	4	Κέντρο Φράγματος–Βάθος	2,8	M.A.	M.A.	2,1	M.A.

a/a	Ημερομηνία	Σημείο	Περιγραφή	Μικροκυστείνη RR (ng L ⁻¹)	Νοντουλαρίνη (ng L ⁻¹)	Μικροκυστείνη YR (ng L ⁻¹)	Μικροκυστείνη LR (ng L ⁻¹)	Μικροκυστείνη LA (ng L ⁻¹)
77	20/1/2009	1	Πύργος Υδροληψίας – Επιφ.	1,4	M.A.	M.A.	1,1	M.A.
78	20/1/2009	2	Κέντρο Λίμνης – Επιφ.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
79	20/1/2009	3	Κέντρο Φράγματος – Επιφ.	1,4	M.A.	M.A.	1,1	M.A.
80	20/1/2009	4	Κέντρο Φράγματος – Βάθος	1,5	M.A.	M.A.	1,2	M.A.

M.A.: Μή ανιχνεύσιμη

Πίνακας 8.21. Αποτελέσματα προσδιορισμών κυανοτοξινών στον ταμιευτήρα του Μόρνου, στην λίμνη Υλίκη και στο πόσιμο νερό της ΕΥΔΑΠ

a/a	Ημερομηνία	Σημείο	Περιγραφή	Μικροκυστείνη RR (ng L-1)	Νοντουλαρίνη (ng L-1)	Μικροκυστείνη YR (ng L-1)	Μικροκυστείνη LR (ng L-1)	Μικροκυστείνη LA (ng L-1)
1	16/11/2007	-	Ασπρόπυργος, πόσιμο νερό	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
2	16/11/2007	-	Πολυδένδρι, πόσιμο νερό	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
3	10/07/2007	-	Πολυδένδρι, πόσιμο νερό	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
4	10/07/2007	-	Πολυδένδρι, πόσιμο νερό	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
5	16/11/2007	-	Γαλάτσι, πόσιμο νερό	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
6	16/11/2007	-	Μενίδι, πύργος υδροληψίας	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
7	16/11/2007	-	Μόρνος πύργος υδροληψίας	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.
8	9/5/2008	-	Υλίκη επιφανειακό	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.	M.A.

M.A.: Μή ανιχνεύσιμη

Κεφάλαιο 9: Αποτελέσματα ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού πολυκυκλικών αρωματικών υδρογοναθράκων (ΠΑΥς) με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS)

9.1 Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ΠΑΥς

Εισαγωγή

Η ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογοναθράκων (ΠΑΥς) σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, στηρίχτηκε στην τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) σε συνδυασμό με ανίχνευση σε υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Ο ιοντισμός των ΠΑΥς επιτεύχθηκε με συνδυασμό τεχνικών ιοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI) και με φωτοϊονισμό σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photo Ionization, APPI).

Η εκχύλιση των ΠΑΥς, από πόσιμα και επιφανειακά νερά επιτεύχθηκε με την τεχνική SPE μετά την επιλογή κατάλληλου προσροφητικού υλικού. Επιχειρήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών στην υγρή χρωματογραφία με εμπορικές στήλες που είχαν διαφορετικά μήκη, διάμετρο και μέγεθος προσροφητικού υλικού (C18). Τελικό στάδιο στην ανάπτυξη μεθόδου αποτέλεσε η βελτιστοποίηση παραμέτρων που αφορούν το σύστημα φασματομετρίας μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με απευθείας έκχυση (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά καθώς και με πειράματα έκχυσης προτύπου διαλύματος μίγματος ΠΑΥς ίδιας σύστασης, μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections), παρουσία κινητής φάσης.

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού των οκτώ ΠΑΥς στη συνέχεια εκτιμήθηκε ως προς τα χαρακτηριστικά επίδοσής της σύμφωνα με διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025), όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 5.5.

9.1.1. Απομόνωση και προσυγκέντρωση των ΠΑΥς

Στην παρούσα μελέτη, για την απομόνωση των ΠΑΥς χρησιμοποιήθηκαν τα φουσίγγια (cartridges) SPE-C18 (17% C, επικαλυμμένα) 500mg, χωρητικότητας 6 ml (ENVI-

18 της Supelco). Το άπολο προσροφητικό υλικό C18 επιλέχθηκε γιατί οι προσδιοριζόμενοι αναλύτες είναι άπολα μόρια.

Για την ενεργοποίηση των φουσιγγίων SPE χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά ~2x5ml διχλωρομεθανίου, ~2x5ml μεθανόλης και ~2x5ml νερού, με ροή ~5ml/min, με χρήση κενού. Η ταχύτητα ροής δείγματος νερού ορίστηκε στα 10ml/min και η ταχύτητα έκλουσης στα 5ml/min.

9.1.2. Επιλογή στήλης και συστήματος έκλουσης για τον υγρό χρωματογράφο (HPLC)

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν διάφορες στήλες υγρής χρωματογραφίας καθώς και διάφορα εκλουστικά συστήματα, προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των οκτώ ΠΑΥς. Χαρακτηριστικά δοκιμάστηκαν οι στήλες:

Waters Spherisorb (250 x 4.6mm, υλικού πληρώσεως 5μm), Merck Lichospher (250 x 4mm, υλικού πληρώσεως 5μm), Thermo Hypersil gold (100 x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3μm), Zorbax SB-C18 (30 x 2.1 mm, υλικού πληρώσεως 1.8 μm) , Restek C-18 (30 x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3μm). Προκειμένου να διαχωριστεί ένα διάλυμα μίγματος πολυκυκλικών αρωματικών υδρογοναθράκων συγκέντρωσης 50 μg/L (500 μg/L για το ναφθαλένιο και το φλουορανθένιο), σε αυτές τις χρωματογραφικές στήλες, δοκιμάστηκαν διάφορα εκλουστικά συστήματα ακετονιτρίλιου / νερού με ροή 0.5 ml/ min (βέλτιστη ροή για σύστημα ιοντισμού με φωτοϊοντισμό (APPI)). Πλήρης διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τη στήλη C18, 250mm x 3.2mm, υλικού πληρώσεως 4μm (Pinnacle II ΠΑΥ της Restek) με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης, το οποίο ξεκινούσε από 50:50 σε νερό/ακετονιτρίλιο (Πίνακας 5.8). Με τις υπόλοιπες στήλες και δεδομένων των περιορισμών ροής που τίθενται από το σύστημα φωτοϊοντισμού (APPI), δεν επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός του Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου.

9.1.3. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ΠΑΥς στο σύστημα LC-MS/MS

Για την βελτιστοποίηση του σήματος των ΠΑΥς στο φασματογράφο μάζας χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μεμονωμένων ουσιών, συγκέντρωσης 5mgL⁻¹ σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό 50/50 (v/v) με ροή 0,02 ml min⁻¹. Για κάθε ΠΑΥ καταγράφηκαν και επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες που αφορούν την πηγή ιοντισμού και την διαδικασία θραυσματοποίησης των μοριακών ιόντων. Όλες οι παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν με πειράματα απευθείας έκχυσης (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά

καθώς και με πειράματα έκχυσης προτύπου διαλύματος μίγματος ΠΑΥς, μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections), παρουσία κινητής φάσης.

9.1.3.1. Βελτιστοποίηση παραμέτρων που αφορούν την θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων

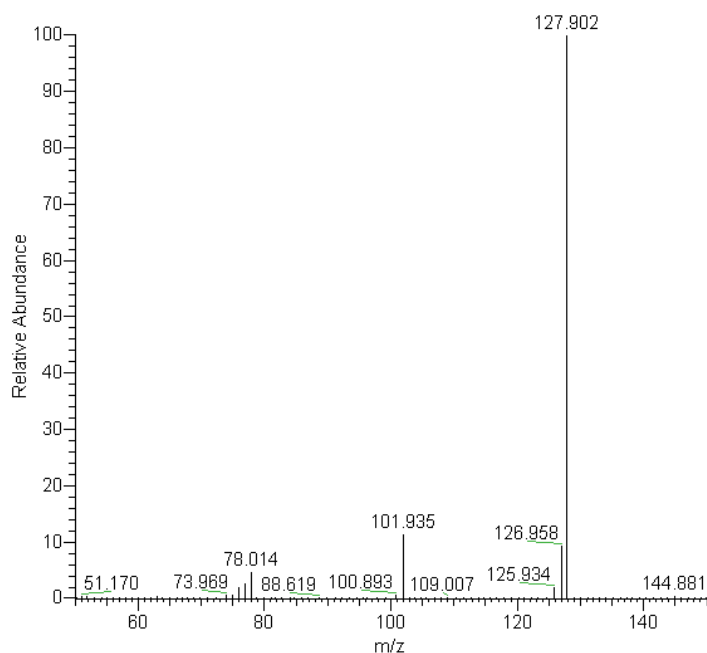
Στις επόμενες παραγράφους, παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας και οι καμπύλες θραυσματοποίησης, για κάθε αναλύτη ξεχωριστά. Στον Πίνακα 9.1 παρουσιάζονται τα μοριακά βάρη των ΠΑΥς, με βάση τα οποία προσδιορίστηκαν τα μητρικά και θυγατρικά ιόντα για κάθε ΠΑΥ.

Πίνακας 9.1. Μοριακά βάρη των ΠΑΥς που αναλύθηκαν

Όνομα ουσίας	Μοριακό Βάρος
Ναφθαλένιο (Naphthalene, Naphth)	128
Ανθρακένιο (Anthracene, Anthr)	178
Φλουορανθένιο (Fluoranthene, Fluor)	202
Βενζο(β)Φλουορανθένιο (Benzo(b)fluoranthene, B(b)F)	252
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο (Benzo(k)fluoranthene, B(k)F)	252
Βενζο(α)πυρένιο (Benzo(a)pyrene, B(a)P)	252
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο (Benzo(g,h,i)perylene, B(g,h,i)P)	276
Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο (Indeno(1,2,3-cd)pyrene, Indeno)	276

9.1.3.1.1. Προσδιορισμός Ναφθαλενίου

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού του Ναφθαλενίου, με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας APCI/APPI-MS/MS πραγματοποιήθηκε απευθείας έγχυση προτύπου διαλύματος (infusion) 5mgL^{-1} σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό (50/50v/v) με ροή $0,02\text{ mlmin}^{-1}$. Στο Σχήμα 9.1 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας θυγατρικών ιόντων του Ναφθαλενίου, προερχόμενα από το μοριακό ιόν $[M]^+ \rightarrow 127.9$.

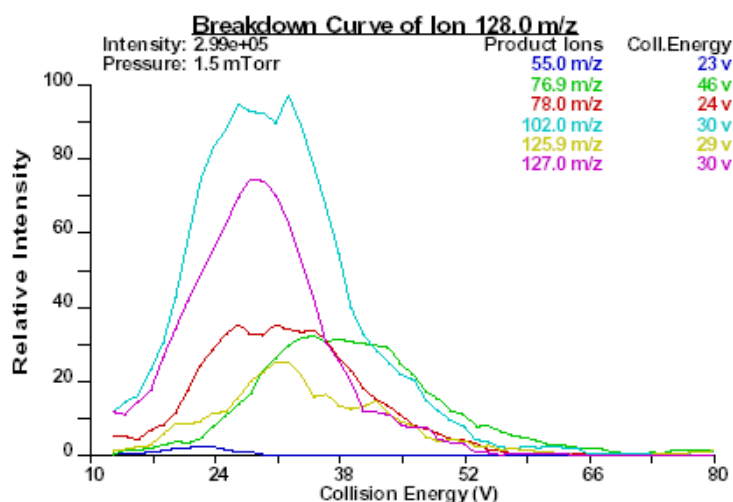


Σχήμα 9.1. Φάσμα μάζας του Ναφθαλενίου

Το φάσμα μάζας του Ναφθαλενίου είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος με τις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό στην ακίδα (Discharge current): 10000 V
- Θερμοκρασία εξάτμισης (Vaporizer temperature): 450 °C
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature): 300 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N₂ (Sheath gas pressure): 45 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N₂ (Auxilliary gas): 10 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο τετράπολο 0.2 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.2. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM).

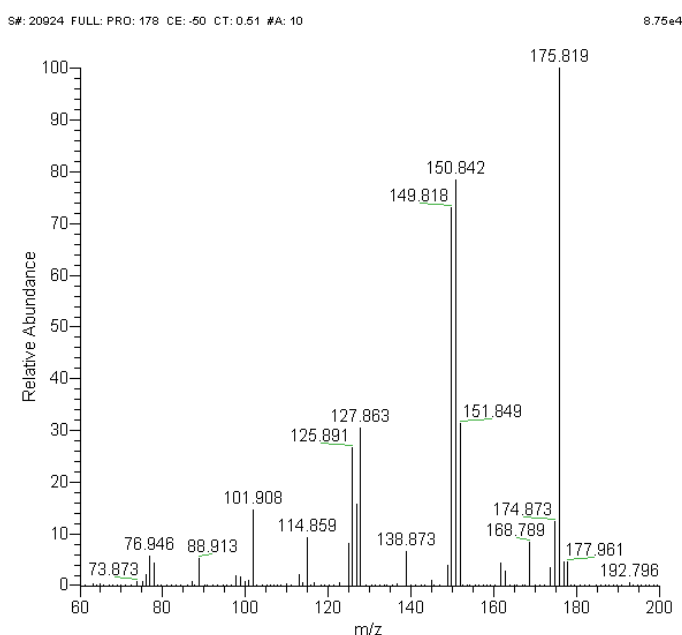


Σχήμα 9.2. Καμπύλη θραυσματοποίησης του Ναφθαλενίου

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του Ναφθαλενίου επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 127 και 102 του μητρικού ιόντος m/z 128. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 102.

9.1.3.1.2. Προσδιορισμός Ανθρακενίου

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού του Ανθρακενίου, με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας APCI/APPI-MS/MS πραγματοποιήθηκε απευθείας έγχυση προτύπου διαλύματος (infusion) 5mgL^{-1} σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό (50/50v/v) με ροή $0,02\text{ mlmin}^{-1}$. Στο Σχήμα 9.3 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας θυγατρικών ιόντων του Ανθρακενίου, προερχόμενα από το μοριακό ιόν $[M]^+ \rightarrow 177.9$.

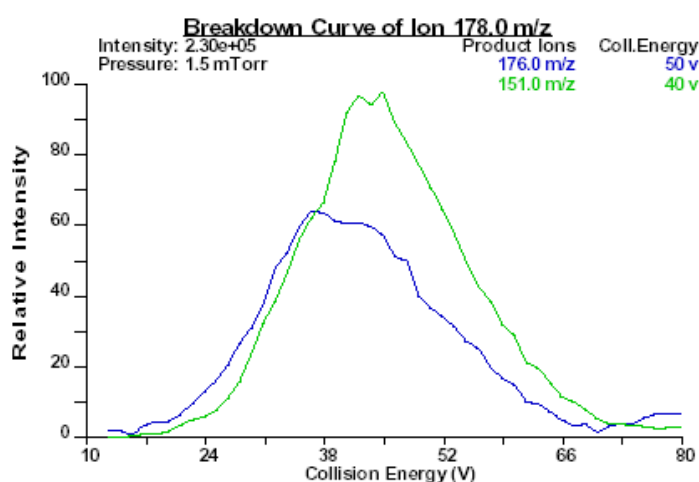


Σχήμα 9.3. Φάσμα μάζας του Ανθρακενίου

Το φάσμα μάζας του Ανθρακενίου είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος με τις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό στην ακίδα (Discharge current): 10000 V
- Θερμοκρασία εξάτμισης (Vaporizer temperature): 450 °C
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature): 300 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N₂ (Sheath gas pressure): 45 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N₂ (Auxilliary gas): 10 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστότητα στο πρώτο τετράπολο 0.2 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.4. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM).

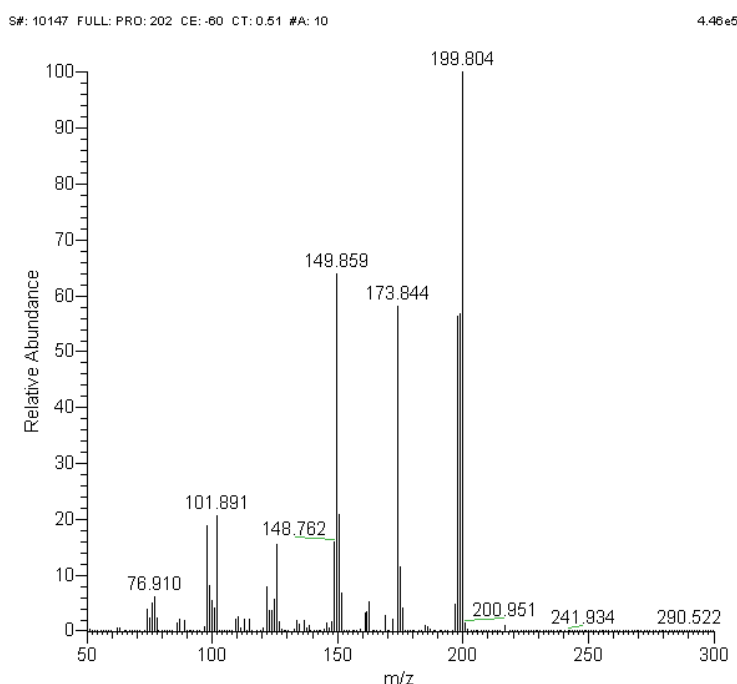


Σχήμα 9.4. Καμπύλη θραυσματοποίησης του Ανθρακενίου

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του Ανθρακενίου επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 176 και 152 του μητρικού ιόντος m/z 178. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 176.

9.1.3.1.3 Προσδιορισμός Φλορανθενίου

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού του Φλορανθενίου, με την τεχνική φασματομετρίας μάζας (APCI/APPI-MS/MS) πραγματοποιήθηκε απευθείας έγχυση προτύπου διαλύματος (infusion) 5mgL^{-1} σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό (50/50v/v) με ροή $0,02\text{ ml min}^{-1}$. Στο Σχήμα 9.5 παρουσιάζεται το φάσμα μάζας θυγατρικών ιόντων του Φλορανθενίου, προερχόμενα από το μοριακό ιόν $[\text{M}]^+ \rightarrow 202$.



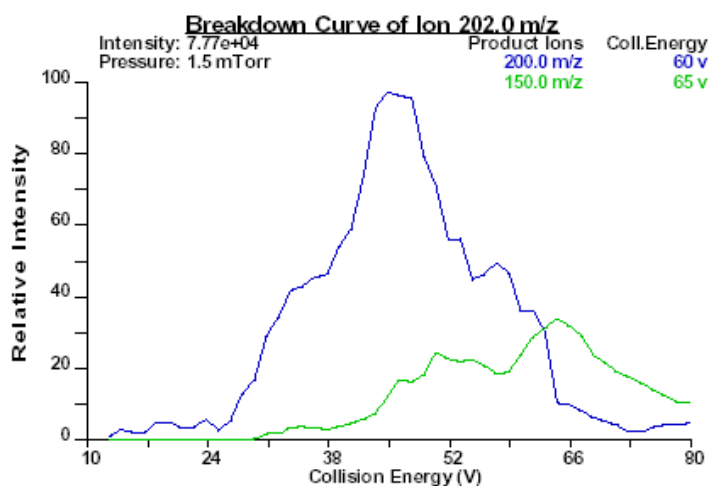
Σχήμα 9.5. Φάσμα μάζας του Φλορανθενίου

Το φάσμα μάζας του Φλορανθενίου είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος με τις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό στην ακίδα (Discharge current): 10000 V
- Θερμοκρασία εξάτμισης (Vaporizer temperature): 450 °C
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature): 300 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N_2 (Sheath gas pressure): 45 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N_2 (Auxilliary gas): 10 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο τετράπολο 0.2 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.6. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή

διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (0.7 Full Width Half Maximum -FWHM).

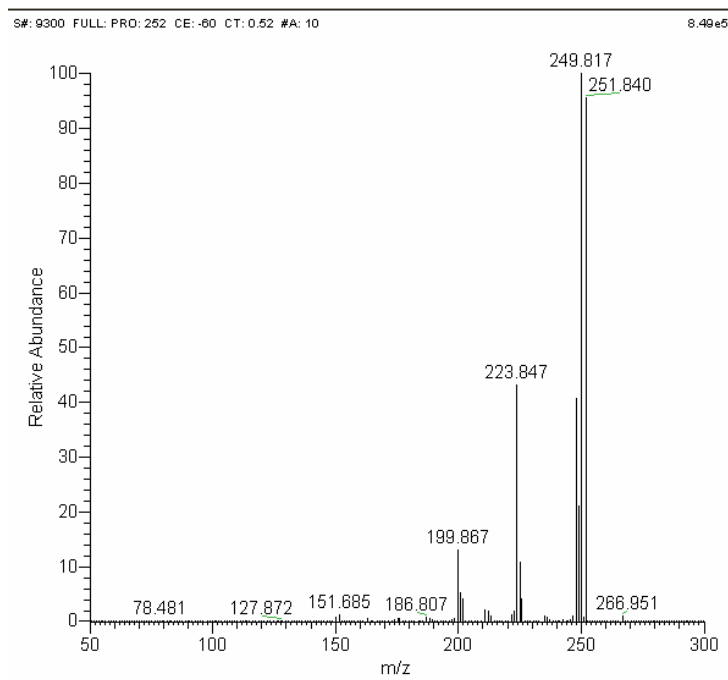


Σχήμα 9.6. Καμπύλη θραυσματοποίησης του Φλορανθενίου

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του Φλορανθενίου επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 200 και 150 του μητρικού ιόντος m/z 202. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 200.

9.1.3.1.4. Προσδιορισμός Βενζο(β)φλορανθενίου, Βενζο(κ)φλορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού των ισομερών ενώσεων Βενζο(β)φλορανθενίου, Βενζο(κ)φλορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας APCI/APPI-MS/MS πραγματοποιήθηκε απευθείας έγχυση μεμονωμένων προτύπων διαλυμάτων (infusion), συγκέντρωσης 5mgL⁻¹ σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό (50/50v/v), με ροή 0,02 ml min⁻¹. Το φάσμα μάζας θυγατρικών ιόντων, προερχόμενα από το μοριακό ιόν [M]⁺ → 252, ήταν παρόμοιο και για τα τρία προαναφερθέντα ισομερή. Ενδεικτικά παρατίθεται το φάσμα μάζας των θυγατρικών ιόντων Βενζο(κ)φλορανθενίου (Σχήμα 9.7).

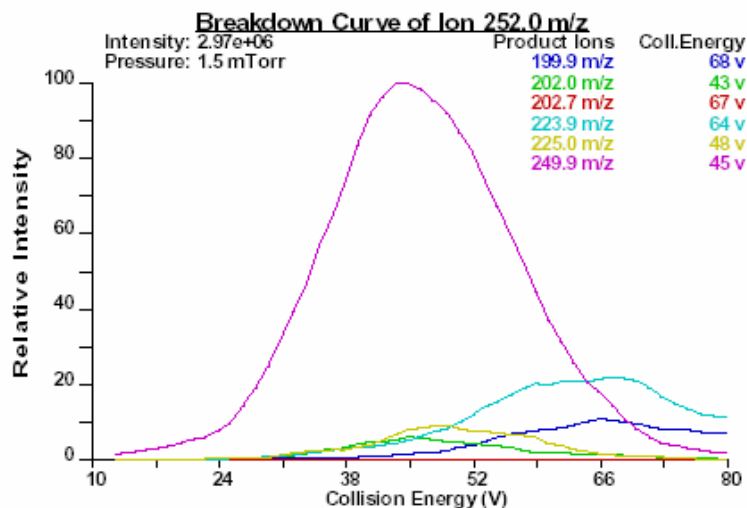


Σχήμα 9.7. Φάσμα μάζας του Βενζο(κ)φλορανθενίου

Το φάσμα μάζας του Βενζο(β)φλορανθενίου, Βενζο(κ)φλορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος με τις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό στην ακίδα (Discharge current): 10000 V
- Θερμοκρασία εξάτμισης (Vaporizer temperature): 450 °C
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature): 300 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N₂ (Sheath gas pressure): 45 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N₂ (Auxilliary gas): 10 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο τετράπολο 0.2 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος Βενζο(κ)φλορανθενίου, στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.8. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM).

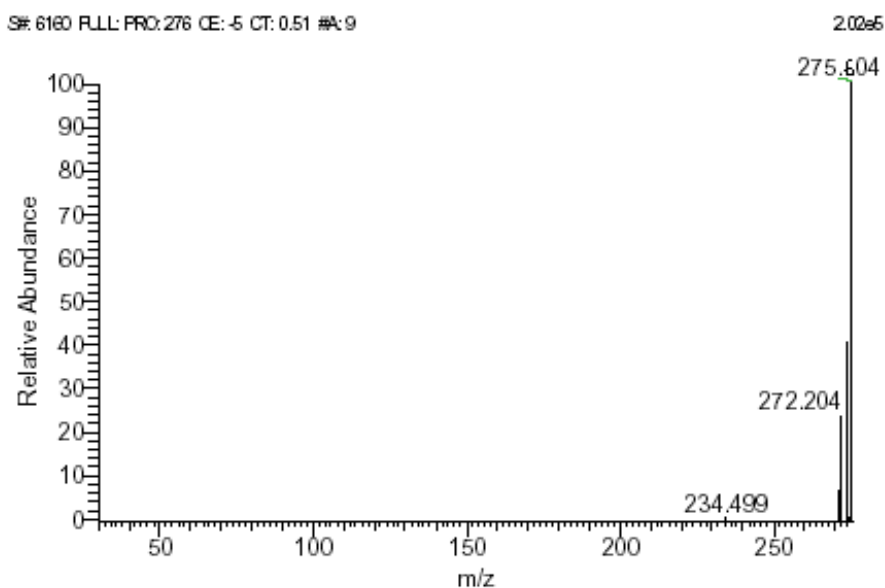


Σχήμα 9.8. Καμπύλη θραυσματοποίησης Βενζο(β)φλορανθενίου, Βενζο(κ)φλορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των Βενζο(β)φλορανθενίου, Βενζο(κ)φλορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 250 και 224 του μητρικού ιόντος m/z 202. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 250.

9.1.3.1.5. Προσδιορισμός Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Βενζο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου

Στα πειράματα ανάπτυξης της μεθόδου προσδιορισμού των ισομερών ενώσεων Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Βενζο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας APCI/APPI-MS/MS πραγματοποιήθηκε απευθείας έγχυση μεμονωμένων προτύπων διαλυμάτων (infusion), συγκέντρωσης 5mgL^{-1} σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό (50/50v/v), με ροή $0,02\text{ ml min}^{-1}$. Το φάσμα μάζας θυγατρικών ιόντων, προερχόμενα από το μοριακό ιόν $[M]^+ \rightarrow 276$, ήταν παρόμοιο για τα δύο προαναφερθέντα ισομερή. Ενδεικτικά παρατίθεται το φάσμα μάζας θυγατρικών ιόντων του Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου (Σχήμα 9.9).

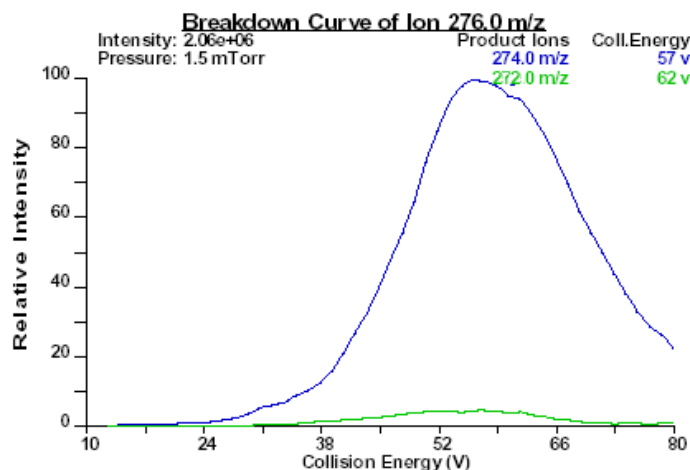


Σχήμα 9.9. Φάσμα μάζας του Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου.

Το φάσμα μάζας του Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Βενζο(1,2,3-c,d)πυρενίου είχε την μεγαλύτερη ένταση σήματος με τις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό στην ακίδα (Discharge current): 10000 V
- Θερμοκρασία εξάτμισης (Vaporizer temperature): 450 °C
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature): 300 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N₂ (Sheath gas pressure): 45 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N₂ (Auxilliary gas): 10 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο τετράπολο 0.2 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)

Η καμπύλη θραυσματοποίησης, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου, στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.10. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM).

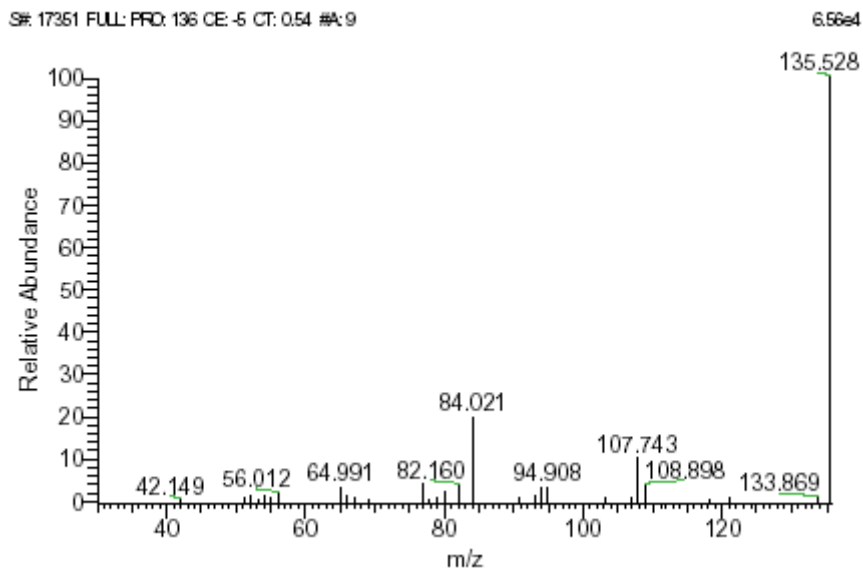


Σχήμα 9.10. Καμπύλη θραυσματοποίησης του Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου

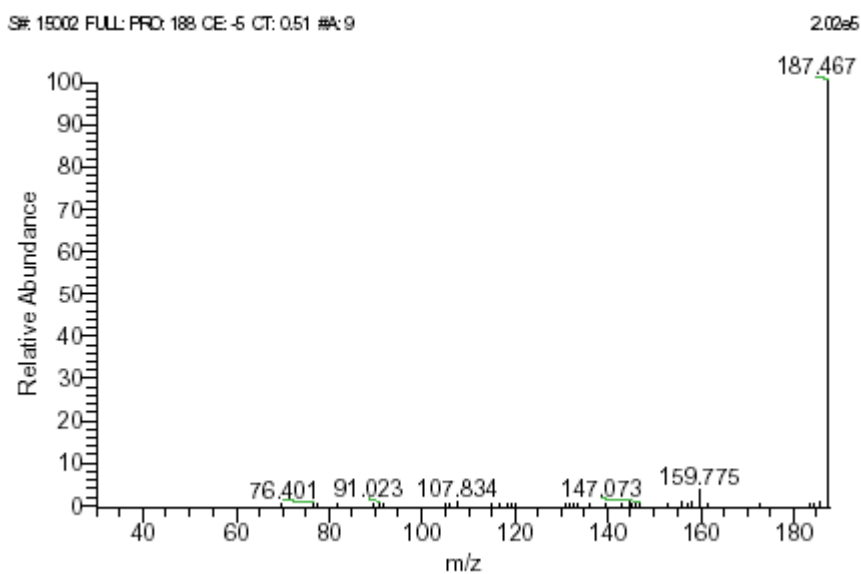
Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Βενζο(1,2,3-c,d)πυρενίου επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 274 και 272 του μητρικού ιόντος m/z 276. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 274.

9.1.3.1.6. Προσδιορισμός δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων Ναφθαλενίου-D8, Ανθρακενίου-D10, Benzo(α) πυρενίου-D12

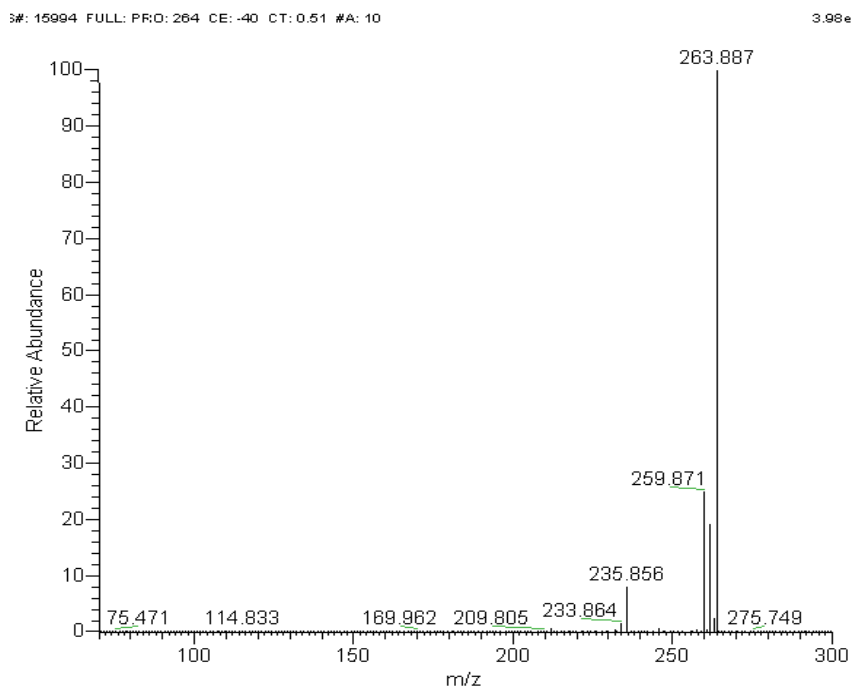
Ο προσδιορισμός των δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων του Ναφθαλενίου-D8, Ανθρακενίου-D10 και Benzo(α)πυρενίου-D12, με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας APCI/APPI-MS/MS πραγματοποιήθηκε με απευθείας έγχυση μεμονωμένων προτύπων διαλυμάτων (infusion), συγκέντρωσης 5mgL^{-1} σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό (50/50v/v), με ροή $0,02\text{ ml min}^{-1}$. Τα μοριακά ιόντα που ανιχνεύθηκαν ήταν αντίστοιχα με αυτά των μη δευτεριωμένων αναλυτών, προσαυξημένα κατά τόσες μονάδες μάζας όσα και τα δευτέρια κάθε μορίου. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα φάσματα μάζας θυγατρικών ιόντων των δευτεριωμένων αναλυτών. Στα Σχήματα 9.11 έως 9.13 παρατίθενται τα φάσματα μάζας θυγατρικών ιόντων, για κάθε ένα δευτεριωμένο αναλύτη.



Σχήμα 9.11. Φάσμα μάζας του Ναφθαλενίου-D8



Σχήμα 9.12. Φάσμα μάζας του Ανθρακενίου-D10

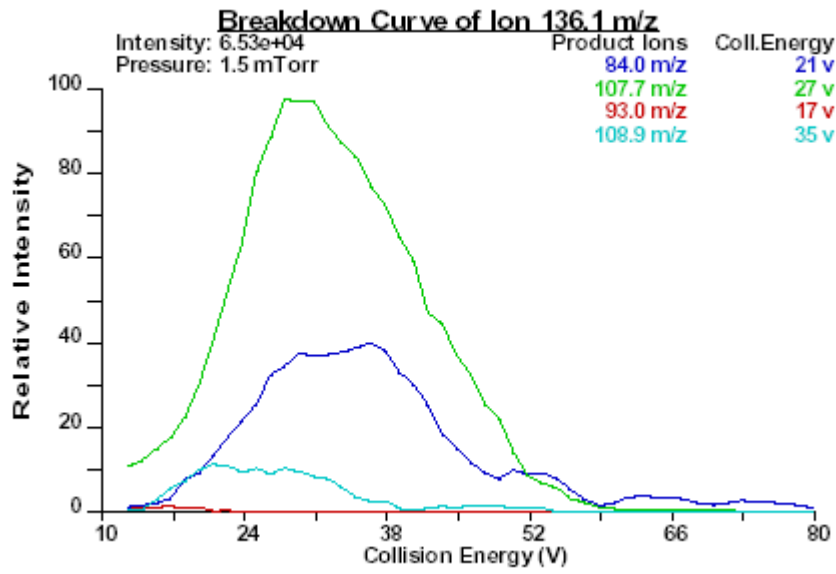


Σχήμα 9.13. Φάσμα μάζας του Benzo(α)πυρενίου-D12

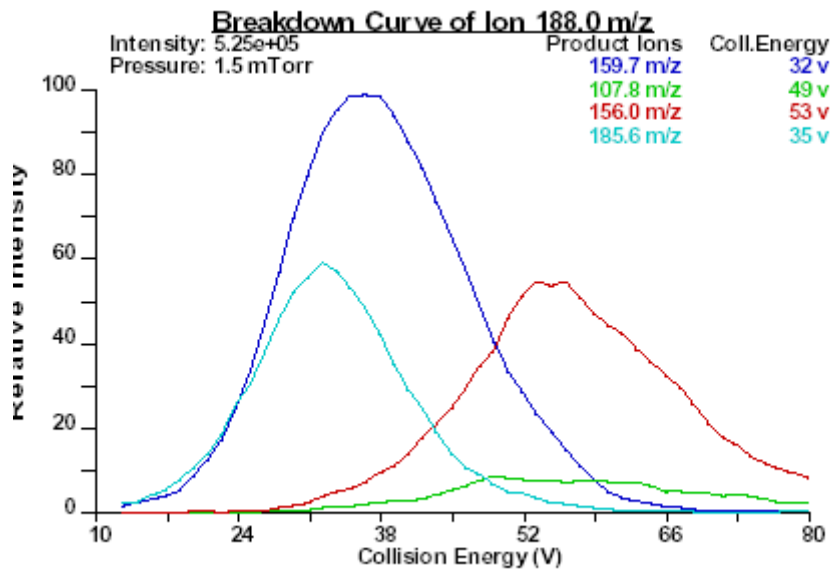
Τα φάσματα μάζας του Ναφθαλενίου-D8, Ανθρακενίου-D10 και, Benzo(α)πυρενίου-D12 είχαν την μεγαλύτερη ένταση σήματος με τις παρακάτω συνθήκες:

- Εφαρμοζόμενο δυναμικό στην ακίδα (Discharge current): 10000 V
- Θερμοκρασία εξάτμισης (Vaporizer temperature): 450 °C
- Θερμοκρασία σωλήνα μεταφοράς ιόντων (Ion transfer capillary temperature): 300 °C
- Παροχή αερίου εκνέφωσης N₂ (Sheath gas pressure): 45 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Παροχή βοηθητικού αερίου N₂ (Auxilliary gas): 10 αυθαίρετες μονάδες (A.U.)
- Θέση του ακροσωληνίου ιοντισμού (Probe): θέση C
- Διαχωριστικότητα στο πρώτο τετράπολο 0.2 m/z στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (Full Width Half Maximum, FWHM)

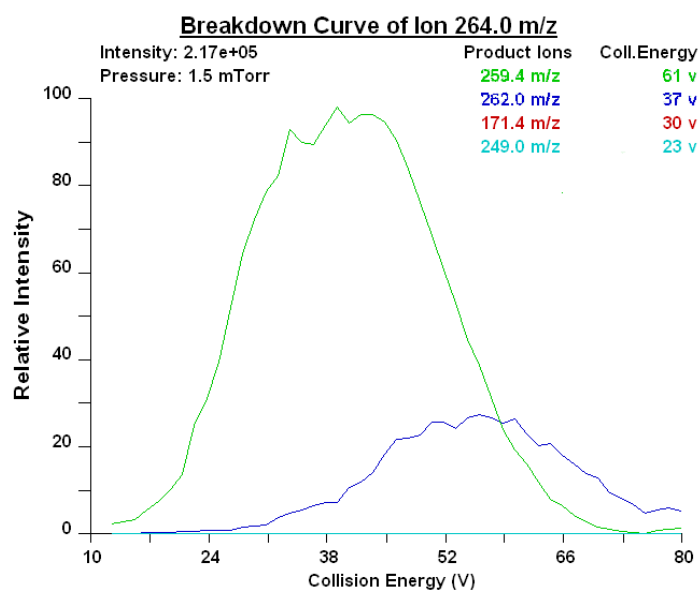
Οι καμπύλες θραυσματοποίησης, όπως αυτές προέκυψαν με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπων διαλυμάτων δευτεριωμένων αναλυτών, στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζονται στα Σχήματα 9.14 έως 9.16. Η ενέργεια θραυσματοποίησης καθορίστηκε στα 1,5 Torr Αργού και η τιμή διαχωρισμού μαζών στο τρίτο τετράπολο ορίστηκε σε 0.7 μονάδες μάζας στο μέγιστο πλάτος της μέσης μιας κορυφής (0.7 Full Width Half Maximum, FWHM).



Σχήμα 9.14. Καμπύλη θραυσματοποίησης του Ναφθαλενίου-D8



Σχήμα 9.15. Καμπύλη θραυσματοποίησης του Ανθρακενίου-D10



Σχήμα 9.16. Καμπύλη θραυσματοποίησης του Benzo(α)πυρενίου-D12

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του Ναφθαλενίου-D8, Ανθρακενίου-D10 και Benzo(α)πυρενίου-D12 επιλέχθηκαν οι παρακάτω μεταπτώσεις μάζας:

Ναφθαλενίου-D8 [136.100→108.070],

Ανθρακενίου-D10 [188.100→159.790],

Benzo(α)πυρενίου-D12 [264.090→260.000].

9.1.3.2. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν στον ιοντισμό των μοριακών ιόντων

Η τεχνική που βρίσκει ολοένα και μεγαλύτερη εφαρμογή στον ιοντισμό άπολων οργανικών μορίων είναι αυτή του φωτοϊοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI). Είναι σχετικά καινούργια τεχνική²²⁰ και αναπτύχθηκε προκειμένου να επεκταθεί η ανάλυση με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας σε μόρια που ήταν αδύνατο να ιοντιστούν με τις μέχρι τότε τεχνικές ιοντισμού: ESI και APCI. Στην τεχνική φωτοϊοντισμού, οι αναλύτες ιοντίζονται απευθείας μέσω φωτονίων που εκπέμπονται από μία λάμπα κρυπτού ή έμμεσα μέσω της μεταφοράς φορτίου από ενώσεις (dopants) που αρχικά ιοντίζονται από την απορρόφηση φωτονίων.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι που αφορούν τον ιοντισμό των οχτώ πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, εγχύθηκε πρότυπο διάλυμα μίγματος ΠΑΥς μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections), παρουσία κινητής φάσης (ακετονιτρίλιο/νερό 50/50 v/v με ροή 0,5ml min⁻¹). Ο κάθε μεμονωμένος αναλύτης είχε συγκέντρωση 2mgL⁻¹ σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό 50/50 (v/v).

Τα αρχικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με ιοντισμό των αναλυτών μόνο μέσω της APCI τεχνικής, δηλαδή με την βοήθεια μιας ακίδας που έφερε ηλεκτρικό φορτίο (10kV). Παρατηρήθηκαν μοριακά ιόντα M^+ καθώς και μοριακά ιόντα προσυζημένα κατά μία μονάδα μάζας $[M+H]^+$. Παρόμοια εικόνα, αλλά με βελτιωμένη ευαισθησία, παρατηρήθηκε και όταν τα ΠΑΥς ιοντίζονταν ταυτόχρονα μέσω APCI και APPI, δηλαδή μέσω ηλεκτρικού φορτίου 10kV και φωτονίων ενέργειας 10eV. Η ταυτόχρονη εισαγωγή διαφόρων ενώσεων που λειτουργούν ως ενισχυτές σήματος (dopants) ή μίγματα ενισχυτών σήματος, επηρέασε τον ιοντισμό των ΠΑΥς (Πίνακας 9.2.). Η εισαγωγή των ενισχυτών στην ροή της κινητής φάσης, πραγματοποιήθηκε μέσω ενός «Ταυ» και στη συνέχεια το μίγμα εισάγονταν στο θάλαμο ιοντισμού των μορίων. Η εισαγωγή αυτή ελέγχονταν ηλεκτρονικά μέσω του λογισμικού του συστήματος LC-MS/MS. Για κάθε ΠΑΥ καταγράφονταν οι μεταπτώσεις μάζας από το μητρικό ιόν στο αντίστοιχο θυγατρικό ιον-ποσοτικοποιητή (quantifier ion). Για κάθε ΠΑΥ, ο Πίνακας 9.2 περιλαμβάνει τις ενέργειες ιοντισμού και τις αποκρίσεις σήματος των αναλυτών, μετά από επίδραση διαφόρων ενισχυτών. Επιπλέον, για κάθε αναλύτη, τα εμβαδά των αποκρίσεων στο σύστημα LC-MS/MS κανονικοποιήθηκαν με βάση την απόκριση από τον ενισχυτή που είχε την σημαντικότερη επίδραση στο σήμα του αναλύτη.

Πίνακας 9.2. Ενέργειες ιοντισμού (IEs) και κανονικοποιημένες αποκρίσεις των ΠΑΥς με την χρήση διαφορετικών μορίων ενισχυτών σήματος (dopants)^a

Λάμπα	Ένωση	IE (eV)							
	Νερό	12.62							
	Ακετονιτρίλιο	12.20							
Kr: 10.0eV									
	Ακετόνη	9.70							
	Τολουόλιο	8.83							
	Ανισόλη	8.20							
Ένωση	IE ^b (eV)	Ακετόνη 10μl/min	Ακετόνη 100μl/min	Τολουόλιο 10μl/min	Τολουόλιο 100μl/min	Τολουόλιο /Ανισόλη (50/50 v/v) 10μl/min	Τολουόλιο /Ανισόλη (99.5/0.5 v/v) 10μl/min	Ανισόλη 10μl/min	Ανισόλη 100μl/min
Ναφθαλένιο	8.14	25	2	0	0	78	100	0	0
Φλουορανθένιο	7.90	4	0	13	37	11	13	100	60
Ανθρακένιο	7.44	4	0	14	36	12	17	100	19
Βενζο(β)Φλουορανθένιο ^γ	μ.δ.	4	1	14	38	10	14	100	71
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο ^γ	μ.δ.	4	1	14	38	10	14	100	71
Βενζο(α)πυρένιο	7.12	4	1	14	38	10	14	100	71
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	7.17	4	0	14	42	9	13	100	100
Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο ^γ	μ.δ.	4	0	14	42	9	13	100	100

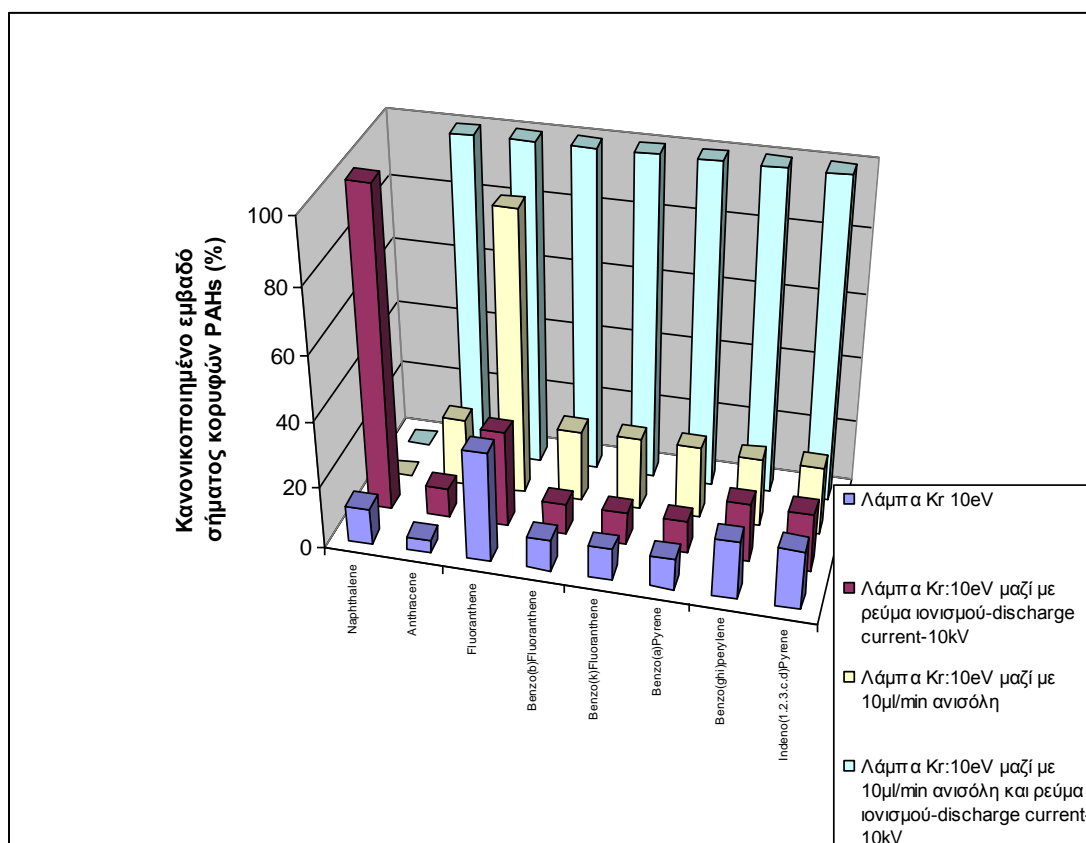
^aΓια κάθε αναλύτη τα εμβαδά των αποκρίσεων στο σύστημα LC-MS/MS κανονικοποιήθηκαν με βάση την απόκριση από τον ενισχυτή (dopant) που είχε την σημαντικότερη επίδραση στο σήμα του αναλύτη.

^bΌλες οι ενέργειες ιοντισμού προέρχονται από την διαδικτυακή διεύθυνση: [http:// webbook.nist.gov/chemistry](http://webbook.nist.gov/chemistry)) (μ.δ.: μη διαθέσιμα δεδομένα)

^γΟι ενέργειες ιοντισμού (IEs) για τους τρεις πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες είναι πιθανότατα μικρότερες από IE<7.60, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους. (Η αύξηση του μεγέθους των αρωματικών ενώσεων οδηγεί σε μείωση της ενέργειας ιοντισμού των οργανικών αυτών μορίων)²²¹

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του συνδυασμού των τεχνικών APCI και APPI με ή χωρίς την παρουσία του ενισχυτή (20μl/min ανισόλη), στο σύνολο των ΠΑΥς (Σχήμα 9.17). Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι παρακάτω τέσσερις συνδυασμοί των τεχνικών ιοντισμού:

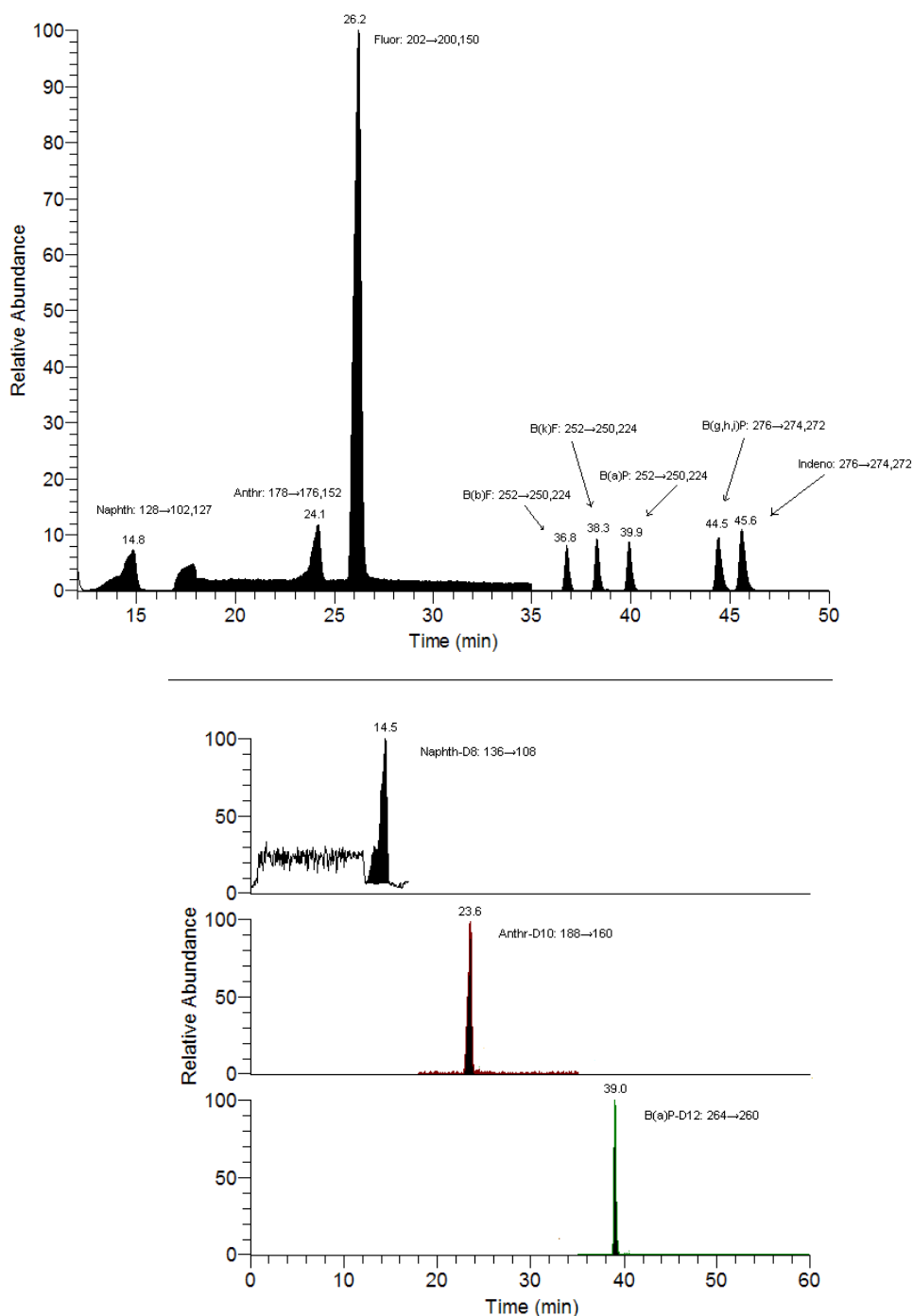
- Επίδραση APPI (Λάμπα Kr 10eV)
- Επίδραση APPI και APCI ταυτόχρονα (Λάμπα Kr 10eV μαζί με ρεύμα ιοντισμού (discharge current) 10kV)
- Επίδραση APPI σε συνδυασμό με ένωση ενισχυτή (Λάμπα Kr:10eV μαζί με 10μl/min ανισόλη)
- Επίδραση APPI σε συνδυασμό με ένωση ενισχυτή και ταυτόχρονη λειτουργία APCI (Λάμπα Kr:10eV μαζί με 10μl/min ανισόλη και ρεύμα ιοντισμού (discharge current)10kV)



Σχήμα 9.17. Επίδραση συνδυασμού των τεχνικών ιοντισμού APCI και APPI με ή χωρίς την παρουσία του ενισχυτή (20μl/min ανισόλη) στο σήμα των οκτώ ΠΑΥς. Τα εμβάδα σήματος κορυφών κανονικοποιήθηκαν με βάση την τεχνική που είχε τη σημαντικότερη επίδραση.

Ο προσδιορισμός των ΠΑΥς πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού των μητρικών και των αντίστοιχων θυγατρικών ιόντων. Τα επιλεγμένα μητρικά και θυγατρικά ιόντα και οι αντίστοιχες ενδεικτικές ενέργειες διάσπασής τους (collision energies) παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 5.7.

Ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα, ενός προτύπου των οκτώ ΠΑΥς, στη συγκέντρωση των 100 µg/L, με βάση τις επιλεγμένες χρωματογραφικές, φασματομετρικές συνθήκες και ιοντισμό των μορίων με επίδραση APPI (με ενισχυτή 20µl/min ανισόλη) και APCI ταυτόχρονα (λάμπα Kr:10eV μαζί με ρεύμα ιοντισμού (discharge current) 10kV φαίνεται στο Σχήμα 9.18.



Σχήμα 9.18. LC-MS/MS SRM χρωματογράφημα προτύπου των οκτώ ΠΑΥς, σε συγκέντρωση 100 µgL⁻¹ για όλα τα ΠΑΥς εκτός από Ναφθαλένιο και Φλορανθένιο των οποίων η συγκέντρωση ήταν 1000 µgL⁻¹. Διακρίνονται επίσης τα χρωματογραφήματα που προκύπτουν για κάθε δευτεριωμένο αναλύτη μετά από επιλογή των χαρακτηριστικών αντιδράσεων θραυσματοποίησης (SRM). Οι αριθμοί στις κορυφές των αναλυτών δηλώνουν τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης.

9.1.4 Επάρκεια χρωματογραφικού διαχωρισμού

Η διαχωριστικότητα (Resolution, R_s) για κάθε ζεύγος κορυφών υπολογίζεται με βάση τα ληφθέντα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων (StdB1 έως StdB7, Πίνακας 5.9), που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της γραμμικότητας της μεθόδου. Από τα ληφθέντα χρωματογραφήματα υπολογίζονται οι χρόνοι ανάλυσης t_R κάθε ουσίας και οι συντελεστές διαχωρισμού R_s , για κάθε ζεύγος γειτονικών ουσιών, βάσει του τύπου:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_{b1} + w_{b2})$$

Όπου: R_s , συντελεστής διαχωρισμού,

t_{R1}, t_{R2} , οι χρόνοι ανάλυσης δύο γειτονικών κορυφών

w_{b1}, w_{b2} , το μέσο πλάτος δύο γειτονικών κορυφών μετρούμενο στο μέσο ύψος της κορυφής

Από τα πειράματα της γραμμικότητας, υπολογίζονται:

- Η διαχωριστικότητα για κάθε ζεύγος κορυφών, από τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων StdB2, StdB4 και StdB7 (3 προσδιορισμοί ανα διάλυμα και ΠΑΥ, N=9 για κάθε ΠΑΥ).
- Οι μέσοι χρόνοι ανάλυσης των ουσιών και οι %RSDs τους από το σύνολο των χρωματογραφημάτων (πρότυπα διαλύματα StdB1-StdB7, 3 προσδιορισμοί ανα διάλυμα και ΠΑΥ, N=21 για κάθε ΠΑΥ).

Τα αποτελέσματα της επάρκειας του χρωματογραφικού διαχωρισμού φαίνονται στον Πίνακα 9.3.

Πίνακας 9.3 : Αποτελέσματα εκτίμησης επάρκειας χρωματογραφικού διαχωρισμού.

ΠΑΥς	t_R min (min)	t_R max (min)	t_R mean (min)	$t_{R2}-t_{R1}$ (min)	SDEV t_R (min)	%RSD t_R	R_s
Ναφθαλένιο	14,750	14,883	14,857	9,321	0,028	0,192	45,2
Φλουορανθένιο	24,083	24,213	24,178	2,042	0,027	0,110	10,7
Ανθρακένιο	26,127	26,253	26,221	10,555	0,026	0,099	57,0
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	36,703	36,820	36,776	1,520	0,026	0,070	8,4
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	38,230	38,343	38,295	1,636	0,026	0,067	8,7
Βενζο(α)πυρένιο	39,873	39,980	39,931	4,511	0,025	0,063	19,8
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	44,317	44,497	44,443	1,196	0,035	0,079	4,5
Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο	45,530	45,687	45,639		0,034	0,075	

Τα κριτήρια αποδοχής που τέθηκαν προκειμένου να θεωρηθεί επαρκής ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν²⁰⁸ :

1. $t_{R2}-t_{R1} > 0,2 \text{ min}$ για κάθε ζεύγος γειτονικών κορυφών
2. % RSD για τους χρόνους ανάσχεσης $< 2 \%$.
3. $R_s > 0.8$ για όλα τα ζεύγη γειτονικών κορυφών

9.1.5. Ταυτοποίηση των ΠΑΥς

Η ταυτοποίηση των προσδιοριζόμενων ΠΑΥς σε πόσιμα και επιφανειακά ύδατα έγινε μέσω της ανίχνευσης των μητρικών και των αντίστοιχων θυγατρικών ιόντων τους στους συγκεκριμένους χρόνους ανάσχεσης. Οι μεταπτώσεις που εξετάζονται για κάθε αναλύτη παρατίθενται στον πίνακα 5.7. Οι κορυφές που λαμβάνονται θα πρέπει να δίνουν λόγο σήματος προς θόρυβο $S/N > 3$. Για τον έλεγχο της ταυτοποίησης των ΠΑΥς εξετάστηκαν 2 δείγματα πόσιμου νερού όγκου 1 L το καθένα εμβολιασμένα με τελική συγκέντρωση έκαστου αναλύτη 0,01 μg/L ανά ΠΑΥ (εκτός από το Ναφθαλένιο και Φλουρανθένιο, τα οποία έχουν συγκέντρωση 0,1 μg/L) και 2 δείγματα νερού λίμνης όγκου 1 L το καθένα εμβολιασμένα με τελική συγκέντρωση έκαστου αναλύτη 0,01 μg/L ανά ΠΑΥ (εκτός από το Ναφθαλένιο και Φλουρανθένιο, τα οποία έχουν συγκέντρωση 0,1 μg/L). Ο λόγος σήματος προς θόρυβο για όλες τις μεταπτώσεις και για όλα τα ΠΑΥς που εξετάστηκαν ήταν πολύ μεγαλύτερος από $S/N > 3$, για τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις πόσιμων και επιφανειακών νερών.

9.1.6. Εκλεκτικότητα. Παρεμποδιστές

Για τον εντοπισμό πιθανών παρεμποδιστών αναλύθηκαν 2 δείγματα νερού λίμνης όγκου 1L το καθένα και 2 δείγματα του δικτύου ύδρευσης της Αθήνας (βρύση Εργαστηρίου) όγκου 1L το καθένα. Τα παραπάνω δείγματα θεωρήθηκαν αρχικώς «τυφλά» (μή εμπλουτισμένα με ΠΑΥς) ενώ χρησιμοποιήθηκαν και για τα πειράματα πιστότητας και ακρίβειας.

Τα δείγματα αυτά εκχυλίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο εκχύλισης-προσυγκέντρωσης και αναλύθηκαν στο σύστημα LC/MS-MS. Δεν υπήρξαν κορυφές ισοδύναμες με μεγαλύτερη συγκέντρωση από 0.003 μg/L ισοδύναμα των Βενζο(β)Φλουρανθενίου, Βενζο(κ)Φλουρανθενίου, Βενζο(α)πυρενίου, Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου, και Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρενίου σε κανένα από τα παραπάνω δείγματα και 0.010 μg/L ισοδύναμα των Ναφθαλενίου, Φλουρανθενίου σε κανένα από τα εξετασθέντα δείγματα επιφανειακού νερού.

9.1.7. Γραμμικότητα και Εύρος της μεθόδου

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των οκτώ ΠΑΥς όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 5.4.1 και συγκεκριμένα στον Πίνακα 5.9. Από κάθε πρότυπο πραγματοποιήθηκαν 3 ενέσεις στο σύστημα LC-MS/MS. Η πρότυπη καμπύλη για κάθε ΠΑΥ προέκυψε μετά από γραμμική συσχέτιση μεταξύ του πηλίκου του εμβαδού της κορυφής για κάθε συγκέντρωση ΠΑΥ με τα εμβαδά δευτεριωμένων ΠΑΥς και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων (η γραμμική συσχέτιση γίνεται με όλα τα σημεία). Συγκεκριμένα το εμβαδό της κορυφής Ναφθαλενίου διαιρείται με το εμβαδό της κορυφής του Ναφθαλενίου-D8, τα εμβαδά των κορυφών Ανθρακενίου, Φλορανθενίου διαιρούνται με το εμβαδό της κορυφής του Ανθρακενίου-10 και τέλος τα εμβαδά των κορυφών Βενζο(β)Φλουορανθενίου, Βενζο(κ)Φλουορανθενίου, Βενζο(α)πυρενίου, Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου, Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρενίου διαιρούνται με το εμβαδό της κορυφής του Βενζο(α)πυρενίου –D12.

Προσδιορίστηκε η κλίση (b) και η αποτέμνουσα (a) της ευθείας που προκύπτει για κάθε ΠΑΥ. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά έγινε εκτίμηση της γραμμικότητας και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης R^2 της ευθείας που προκύπτει. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.4.

Πίνακας 9.4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των καμπυλών βαθμονόμησης των ΠΑΥς

ΠΑΥς	Εξισώσεις των καμπυλών βαθμονόμησης	Συντελεστής Προσδιορισμού (R^2)	Εύρος Προσδιορισμού (ng/ml)	Αριθμός συγκεντρώσεων
Ναφθαλένιο	$y = 0.0044x - 0.0203$	0,98186	10-1000	7
Φλουορανθένιο	$y = 0.0301x + 0.0597$	0,99565	1-100	7
Ανθρακένιο	$y = 0.0465x + 0.3965$	0,99943	10-1000	7
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	$y = 0.0424x - 0.0358$	0,99906	1-100	7
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	$y = 0.053x - 0.0252$	0,99936	1-100	7
Βενζο(α)πυρενίου	$y = 0.0533x - 0.0308$	0,99851	1-100	7
Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου	$y = 0.0456x - 0.0189$	0,99666	1-100	7
Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρενίου	$y = 0.0538x - 0.0266$	0,99715	1-100	7

9.1.8. Πιστότητα της προτεινόμενης μεθόδου

Για την εκτίμηση της πιστότητας (precision) της μεθόδου εξετάστηκε η επαναληψιμότητα σε δύο συγκεντρώσεις των υπό προσδιορισμό ουσιών. Συλλέχθηκαν 20 L πόσιμου νερού από το Δίκτυο της Αθήνας και 20 L επιφανειακού νερού από τον ταμιευτήρα του Μαραθώνα. Έπειτα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα: *“stock 8 ΠΑΥ”-διάλυμα S1* (1 µg/ml για κάθε ΠΑΥ εκτός από Ναφθαλένιο και Φλορανθένιο στα οποία η τελική συγκέντρωση είναι 10 µg/ml), *διάλυμα S2* (0.1 µg/ml για κάθε ΠΑΥ εκτός από Ναφθαλένιο και Φλουορανθένιο στα οποία η τελική συγκέντρωση είναι 1 µg/ml), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 5.4.1. Ξεχωριστά, παρασκευάστηκε *“stock 3 δευτεριωμένων ΠΑΥ” (διάλυμα D-S1)*, συγκέντρωσης 0.25 µg/ml για Ανθρακένιο D-10, Βενζο(α)πυρένιο D-12 και 2.5 µg/ml για Ναφθαλένιο D-8.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα πόσιμου και επιφανειακού νερού όγκου 1 L με τα ανωτέρω διαλύματα και αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο, σε διαφορετικές μέρες, σύμφωνα με την σειρά πειραμάτων που περιγράφεται στον παρακάτω Πίνακα 9.5.

Πίνακας 9.5. Προετοιμασία δειγμάτων για τον υπολογισμό της πιστότητας της μεθόδου

Ημέρα	Υπόστρωμα	Επίπεδο συγκέντρωσης (µg/L)	Εμβολιασμός δείγματος νερού 1L	Αριθμός προσδιορισμών στο δείγμα (N)	Διάλυμα βαθμονόμησης (2 προσδιορισμοί)
1	Νερό λίμνης	0.010	100 µl S2 +100µl D-S1	3	100 µl S2+100µl D-S1 + 800 µl ACN
1	Νερό λίμνης	0.100	100 µl S1 +100µl D-S1	3	100 µl S1+100µl D-S1 + 800 µl ACN
1	Νερό λίμνης	Τυφλό	Μη εμβολιασμός	1	-
2	Νερό λίμνης	0.010	100 µl S2 +100µl D-S1	3	100 µl S2+100µl D-S1 + 800 µl ACN
2	Νερό λίμνης	0.100	100 µl S1 +100µl D-S1	3	100 µl S1+100µl D-S1 + 800 µl ACN
2	Νερό λίμνης	Τυφλό	Μη εμβολιασμός	1	-
3	Πόσιμο νερό	0.010	100 µl S2 +100µl D-S1	3	100 µl S2+100µl D-S1 + 900 µl ACN
3	Πόσιμο νερό	0.100	100 µl S1 +100µl D-S1	3	100 µl S1+100µl D-S1 + 800 µl ACN

3	Πόσιμο νερό	Τυφλό	Μη εμβολιασμός	1	-
4	Πόσιμο νερό	0.010	100 µl S2 +100µl D-S1	3	100 µl S2+100µl D-S1 + 800 µl ACN
4	Πόσιμο νερό	0.100	100 µl S1 +100µl D-S1	3	100 µl S1+100µl D-S1 + 800 µl ACN
4	Πόσιμο νερό	Τυφλό	Μη εμβολιασμός	1	-

Με βάση τα ληφθέντα αποτελέσματα υπολογίστηκαν :

α) η τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας, S_r

β) η σχετική τυπική απόκλιση, RSD_r

γ) το όριο επαναληψιμότητας r ($r= 2.8 \times S_r$)

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της πιστότητας δίνονται στους Πίνακες 9.6 έως 9.9 που ακολουθούν.

Πίνακας 9.6. Αποτελέσματα πειραμάτων πιστότητας για συγκέντρωση 0,01µg/L ανά ΠΑΥ, σε πόσιμα νερά

ΠΑΥ	N	Μέση συγκέντρωση (µg/L)	Αναπαραγωγικότητα			Επαναληψιμότητα		
			Std.Dev.(S_R)	% RSD_R	R	Std.Dev. ^{poole} (S_r pooled)	% RSD_r pooled	r
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	6	0,01186	0,00080	6,7	0,00221	0,00067	5,5	0,00187
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	6	0,01068	0,00067	6,3	0,00187	0,00042	3,8	0,00116
Βενζο(α)πυρένιο	6	0,01049	0,00022	2,1	0,00061	0,00023	2,2	0,00063
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	6	0,00975	0,00067	6,8	0,00185	0,00041	4,1	0,00113
Ινδανο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο	6	0,00973	0,00136	14,0	0,00377	0,00041	4,1	0,00114

Όπου R: Όριο αναπαραγωγικότητας, r: Όριο επαναληψιμότητας

Πίνακας 9.7. Αποτελέσματα πειραμάτων πιστότητας για συγκέντρωση 0,1µg/L ανά ΠΑΥ, σε πόσιμα νερά

ΠΑΥ	N	Μέση συγκέντρωση (µg/L)	Αναπαραγωγικότητα			Επαναληψιμότητα		
			Std.Dev.(S_R)	% RSD_R	R	Std.Dev. ^{poole} (S_r pooled)	% RSD_r pooled	r
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	6	0,08680	0,00409	4,7	0,01134	0,00175	2,0	0,00484
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	6	0,08363	0,00400	4,8	0,01108	0,00261	3,1	0,00724
Βενζο(α)πυρένιο	6	0,08048	0,00472	5,9	0,01309	0,00215	2,6	0,00597
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	6	0,08265	0,00591	7,1	0,0163	0,00188	2,2	0,0052

					8			2
Ινδανο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο	6	0,08423	0,00988	11,7	0,0273 8	0,00231	2,9	0,0064 1

Όπου R: Όριο αναπαραγωγικότητας, r: Όριο επαναληψιμότητας

Πίνακας 9.8. Αποτελέσματα πειραμάτων πιστότητας για συγκέντρωση 0,01µg/L ανά ΠΑΥ (εκτός Ναφθαλενίου και Φλορανθενίου, τα οποία έχουν συγκέντρωση 0,1 µg/L), σε επιφανειακά νερά

ΠΑΥ	N	Μέση συγκέντρωση (µg/L)	Αναπαραγωγικότητα			Επαναληψιμότητα		
			Std.Dev.(S _R)	%RSD _R	R	Std.Dev. ^{-pooled} (S _{r pooled})	%RSD _{r pooled}	r
Ναφθαλένιο	6	0,08272	0,01090	13,2	0,03022	0,00360	4,7	0,00998
Φλουορανθένιο	6	0,00961	0,00173	18,0	0,00480	0,00059	7,6	0,00164
Ανθρακένιο	6	0,09477	0,01000	10,6	0,02773	0,00604	5,6	0,01674
Βενζο(β)Φλοουορανθένιο	6	0,01120	0,00061	5,5	0,00170	0,00052	4,7	0,00143
Βενζο(κ)Φλοουορανθένιο	6	0,01031	0,00071	6,9	0,00197	0,00031	2,8	0,00085
Βενζο(α)πυρένιο	6	0,01028	0,00028	2,7	0,00077	0,00031	3,0	0,00086
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	6	0,00884	0,00120	13,6	0,00332	0,00062	6,5	0,00173
Ινδανο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο	6	0,00864	0,00156	18,0	0,00432	0,00081	9,8	0,00224

Όπου R: Όριο αναπαραγωγικότητας, r: Όριο επαναληψιμότητας

Πίνακας 9.9. Αποτελέσματα πειραμάτων πιστότητας για συγκέντρωση 0,1µg/L ανά ΠΑΥ(εκτός Ναφθαλενίου και Φλορανθενίου, τα οποία έχουν συγκέντρωση 1 µg/L), σε επιφανειακά νερά

ΠΑΥ	N	Μέση συγκέντρωση (µg/L)	Αναπαραγωγικότητα			Επαναληψιμότητα		
			Std.Dev.(S _R)	%RSD _R	R	Std.Dev. ^{-pooled} (S _{r pooled})	%RSD _{r pooled}	r
Ναφθαλένιο	6	0,71005	0,10559	14,9	0,29267	0,06983	9,1	0,19357
Φλουορανθένιο	6	0,08862	0,00465	5,2	0,01288	0,00464	5,2	0,01285
Ανθρακένιο	6	0,92408	0,05072	5,5	0,14060	0,04778	5,2	0,13245
Βενζο(β)Φλοουορανθένιο	6	0,08455	0,00402	4,8	0,01113	0,00433	4,9	0,01199
Βενζο(κ)Φλοουορανθένιο	6	0,08246	0,00476	5,8	0,01320	0,00441	5,1	0,01222
Βενζο(α)πυρένιο	6	0,07483	0,00386	5,2	0,01069	0,00366	4,7	0,01015
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	6	0,07162	0,00674	9,4	0,01869	0,00500	6,4	0,01386
Ινδανο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο	6	0,07070	0,00819	11,6	0,02269	0,00448	5,7	0,01243

Όπου R: Όριο αναπαραγωγικότητας, r: Όριο επαναληψιμότητας

Η οδηγία SANCO 3131²¹⁵ αναφέρει ως αποδεκτά ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης αυτά που βρίσκονται κάτω από 20%.

9.1.9. Ορθότητα της προτεινόμενης μεθόδου

Η ορθότητα-ανάκτηση (trueness-recovery) της μεθόδου υπολογίζεται ως % ανάκτηση (R) των υπό προσδιορισμό ουσιών. Η % ανάκτηση υπολογίζεται από τον τύπο

$$\frac{C_1 - C_2}{C_3}$$

$$\% R = \quad \quad \quad \times 100$$

Όπου C_1 = η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο εμβολιασμένο δείγμα.

C_2 = η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο τυφλό δείγμα.

C_3 = η συγκέντρωση εμβολιασμού.

Ο υπολογισμός των ανακτήσεων των υπό προσδιορισμό ουσιών πραγματοποιήθηκε για δύο συγκεντρώσεις 0,010 και 0,100 μg/L για όλα τα ΠΑΥς εκτός του Ναφθαλενίου και του Φλορανθενίου για τα οποία οι συγκεντρώσεις των οποίων είναι 0,100 και 1 μg/L Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκαν 6 τουλάχιστον προσδιορισμοί σε κάθε μία από τις συγκεντρώσεις και για κάθε ΠΑΥ, σύμφωνα με τον Πίνακα 9.5. Στους Πίνακες 9.10 έως 9.13 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάκτησης της προτεινόμενης μεθόδου.

Πίνακας 9.10. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης για συγκέντρωση 0,01μg/L ανά ΠΑΥ, σε πόσιμα νερά

ΠΑΥ	N	Minimum	Maximum	Range	Mean	Std.Dev.(S _R)	%RSD _R
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	6	109,4	134,3	24,9	121,5	9,8	8,1
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	6	99,9	123,2	23,3	109,9	8,3	7,5
Βενζο(α)πυρένιο	6	100,8	108,4	7,7	104,5	3,0	2,8
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	6	90,6	112,1	21,5	100,5	8,1	8,1
ΙνδENO(1,2,3,γ,δ)πυρένιο	6	86,3	124,4	38,1	104,6	16,4	15,7

Πίνακας 9.11. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης για συγκέντρωση 0,1μg/L ανά ΠΑΥ, σε πόσιμα νερά

ΠΑΥ	N	Minimum	Maximum	Range	Mean	Std.Dev.(S _R)	%RSD _R
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	6	95,0	114,3	19,3	103,6	6,2	5,9
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	6	106,3	122,2	16,0	114,5	7,1	6,2
Βενζο(α)πυρένιο	6	99,0	108,4	9,4	104,2	3,2	3,1
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	6	82,9	105,1	22,2	95,8	7,2	7,6
ΙνδENO(1,2,3,γ,δ)πυρένιο	6	83,9	106,7	22,8	95,3	7,2	7,6

Πίνακας 9.12. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης για συγκέντρωση 0,01μg/L ανά ΠΑΥ (εκτός από Ναφθαλένιο, Φλορανθένιο, τα οποία έχουν συγκέντρωση 0,1 μg/L), σε επιφανειακά νερά

ΠΑΥ	N	Minimum	Maximum	Range	Mean	Std.Dev.(S _R)	%RSD _R
Ναφθαλένιο	6	68,2	81,1	12,9	72,8	5,4	7,5
Φλουορανθένιο	6	69,1	89,5	20,5	80,8	9,6	11,9
Ανθρακένιο	6	89,2	121,6	32,4	99,3	12,8	12,9
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	6	103,4	118,9	15,4	113,8	6,3	5,5
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	6	97,3	118,6	21,3	106,6	8,5	8,0
Βενζο(α)πυρένιο	6	99,5	107,5	8,0	102,2	1,6	1,5
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	6	77,5	116,0	38,5	94,0	14,9	15,8
ΙνδENO(1,2,3,γ,δ)πυρένιο	6	69,0	114,1	45,1	93,6	18,3	19,5

Πίνακας 9.13. Αποτελέσματα πειραμάτων ανάκτησης για συγκέντρωση 0,1μg/L ανά ΠΑΥ(εκτός από Ναφθαλένιο, Φλορανθένιο, τα οποία έχουν συγκέντρωση 1 μg/L), σε επιφανειακά νερά

ΠΑΥ	N	Minimum	Maximum	Range	Mean	Std.Dev.(S _R)	%RSD _R
Ναφθαλένιο	6	88,2	119,6	31,4	99,8	11,9	12,0

Φλουορανθένιο	6	92,1	121,9	29,8	106,4	10,6	10,0
Ανθρακένιο	6	77,9	114,6	36,7	102,1	12,8	12,5
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	6	105,9	154,0	48,1	120,2	17,6	14,7
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	6	99,8	116,6	16,8	107,8	7,0	6,5
Βενζο(α)πυρένιο	6	100,3	110,0	9,7	107,0	3,9	3,7
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	6	89,2	108,2	19,0	100,0	6,4	6,4
Ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο	6	92,5	111,4	18,9	101,7	6,2	6,1

9.1.10. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις δύο θεωρητικές μεθόδους που αναφέρονται στο Πειραματικό Μέρος αυτής της διατριβής (κεφάλαιο 5.5.1). Τα θεωρητικά χαμηλότερα όρια ανίχνευσης επιβεβαιώθηκαν και πειραματικά. Ωστόσο τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου μελετήθηκαν και με βάση το λόγο σήματος αναλυτών προς θόρυβο ($S/N \geq 3$). Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε εμβολιασμένα δείγματα πόσιμου και επιφανειακού νερού, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του κάθε ΠΑΥ στο δείγμα να αντιστοιχεί σε λόγο σήματος προς θόρυβο μεγαλύτερο ή ίσο του 3.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου υπολογίζεται από το όριο ανίχνευσης με βάση τον τύπο:

$$LOQ = 3 \times LOD.$$

Στους Πίνακες 9.14 και 9.15 παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης που υπολογίστηκαν θεωρητικά και πειραματικά, για πόσιμα και επιφανειακά νερά..

Πίνακας 9.14. Όρια ανίχνευσης της προτεινόμενης μεθόδου για τα πόσιμα νερά

ΠΑΥ	LOD ¹ (µg/L)	LOD ² (µg/L)	LOD ³ (µg/L)
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	0,0038	0,0025	0.0005
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	0,0031	0,0021	0.0005
Βενζο(α)πυρένιο	0,0047	0,0007	0.0005
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	0,0071	0,0021	0.0005
Ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο	0,0066	0,0042	0.0005

¹Υπολογισμοί με τη μέθοδο Α, ²Υπολογισμοί με τη μέθοδο Β, ³Επιβεβαιωμένα πειραματικά

ΠΑΥ	LOD ¹ (µg/L)	LOD ² (µg/L)	LOD ³ (µg/L)
Ναφθαλένιο	0,1669	0,0346	0.005
Φλουορανθένιο	0,0081	0,0055	0.002
Ανθρακένιο	0,0293	0,0317	0.005
Βενζο(β)Φλουορανθένιο	0,0038	0,0019	0.0005
Βενζο(κ)Φλουορανθένιο	0,0031	0,0023	0.0005
Βενζο(α)πυρένιο	0,0047	0,0009	0.0005
Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο	0,0071	0,0038	0.0005
Ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο	0,0066	0,0049	0.0005

¹Υπολογισμοί με τη μέθοδο Α, ²Υπολογισμοί με τη μέθοδο Β, ³Επιβεβαιωμένα πειραματικά

9.1.11. Ανθεκτικότητα της προτεινόμενης μεθόδου

Προκειμένου να μελετηθεί η ανθεκτικότητα της μεθόδου σε μεταβολές των πειραματικών συνθηκών, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων στα αποτελέσματα της ανάλυσης. Για να εντοπιστούν οι παράγοντες που είναι δυνατό να μεταβληθούν από τις καθορισμένες τιμές τους και ενδεχομένως να επηρεάσουν το αποτέλεσμα, αποτυπώθηκε η όλη αναλυτική πορεία σε διάγραμμα ροής και έγινε επιλογή τριών παραγόντων. Οι παράγοντες που επελέγησαν και τα επίπεδα στα οποία πραγματοποιήθηκε η μελέτη, φαίνονται στον Πίνακα 9.16.

Πίνακας 9.16. Παράγοντες που μελετήθηκαν και επίπεδα μελέτης

a/a	Παράγοντας	Επίπεδο -1	Επίπεδο 0	Επίπεδο +1
1	Ταχύτητα ροής δείγματος στην SPE	5 ml/min	10 ml/min	15 ml/min
2	Θερμοκρασία εξάτμισης εκχυλίσματος	25 °C	35 °C	45 °C
3	Όγκος διαλύματος έκπλυσης φιάλης	0 ml	5 ml	10 ml

Η μελέτη έγινε βάσει πειραματικού σχεδιασμού τύπου Box-Behnken για 3 παράγοντες σε 3 επίπεδα (Κεφάλαιο 5.5.2). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με τυχαιοποιημένη σειρά σε μία αναλυτική παρτίδα. Σε όλα τα πειράματα αναλύθηκε το ίδιο δείγμα πόσιμο νερού (βρύση εργαστηρίου) εμπλουτισμένο με 0,01 µg/L Βενζο(κ)φλορανθενίο και μετρήθηκε ως απόκριση το εμβαδόν της κορυφής του Βενζο(κ)φλορανθενίου. Στον Πίνακα 9.17 φαίνονται οι πειραματικές συνθήκες και τα αποτελέσματα των πειραμάτων.

Πίνακας 9.17. Σειρά πειραμάτων και αποτελέσματα

Τυπική ή Σειρά	Σειρά εκτέλεσης (τυχαιοποιημένη)	Ταχύτητα ροής δείγματος (ml/min)	Θερμοκρασία εξάτμισης (°C)	Όγκος Έκπλυσης (ml)	Εμβαδόν κορυφής Βενζο(κ)φλορανθενίου (counts)
8	1	15	35	10	378423
14	2	10	35	5	465707
15	3	10	35	5	360702
6	4	15	35	0	409199
3	5	5	45	5	413342
5	6	5	35	0	467599
7	7	5	35	10	455039
4	8	15	45	5	409006
12	9	10	45	10	403389
1	10	5	25	5	436951
9	11	10	25	0	344991
11	12	10	25	10	520160

2	13	15	25	5	323765
13	14	10	35	5	400629
10	15	10	45	0	365521

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι όλες οι επιδράσεις, γραμμικές, δευτεροβάθμιες και αλληλεπιδράσεις παραγόντων είναι στατιστικώς μη σημαντικές ($P > 0.05$).

9.1.12. Εφαρμοσιμότητα της μεθόδου-Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση πραγματικών επιφανειακών και πόσιμων υδάτων. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες επιφανειακού ύδατος από την λίμνη του Μαραθώνα και πόσιμο νερού από διαφορετικές δεξαμενές διυλιστηρίων της ΕΥΔΑΠ. Η απομόνωση των ΠΑΥς πραγματοποιήθηκε με την SPE μέθοδο που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 5.4.2 και στη συνέχεια τα προσυγκεντρωμένα δείγματα αναλύονταν στο σύστημα LC/MS/MS. Η ολοκλήρωση των κορυφών και η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων που ελήφθησαν, από τα αναλύόμενα δείγματα επιφανειακών και πόσιμων νερών, έγινε με το πρόγραμμα Xcalibur.

Σε κάθε δειγματοληψία η σειρά ανάλυσης των δειγμάτων ήταν η ακόλουθη:

- 1) Τυφλό (διαλύτης),
- 2) Πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1 ng/ml, 5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml ανά ΠΑΥ (εκτός από Ναφθαλένιο, Φλορανθένιο οι συγκεντρώσεις των οποίων ήταν 10 ng/ml, 50 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 1000 ng/ml)
- 3) Τυφλό (διαλύτης),
- 4) Άγνωστα δείγματα νερού
- 5) Δείγμα Ποιοτικού ελέγχου (εμβολιασμένο δείγμα συγκέντρωσης 0.01 μg/L).
- 6) Τυφλό (διαλύτης)

Οι συγκεντρώσεις των υπό προσδιορισμό ουσιών στο ενυόμενο στο LC/MS/MS δείγμα (1000 μl), υπολογίστηκαν με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης των ενυόμενων προτύπων. Η συγκέντρωση στα δείγματα υπολογίστηκε από τη συγκέντρωση στο τελικό εκχύλισμα διαιρεμένη με το συντελεστή προσυγκέντρωσης που είναι 1000, όταν το δείγμα είναι 1000 ml. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ng/L. Όταν η ευρεθείσα τιμή ήταν μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, αναφερόταν ως «Μή ανιχνεύσιμη, Μ.Α.». Θετικά δείγματα ορίστηκαν αυτά στα οποία παρατηρήθηκαν κορυφές σε χρόνο κατακράτησης των προς ανάλυση ουσιών (με ένα εύρος $\pm 2\%$) και ταυτόχρονα καταγράφονταν και τα δύο ιόντα της ευρεθείσας ουσίας με ορισμένη αναλογία μεταξύ τους (Πίνακας 5.7), όπως ορίζεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση²⁶.

Ναφθαλένιο και Φλορανθένιο προσδιορίστηκαν σε όλα τα πόσιμα και επιφανειακά υδατικά δείγματα σε συγκεντρώσεις κάτω από 0.010 μg/L, ενώ τα υπόλοιπα ΠΑΥς

Βενζο(β)Φλουορανθένιο, Βενζο(κ)Φλουορανθένιο, Βενζο(α)πυρένιο, Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο και Ινδανο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο δεν ανιχνεύθηκαν ή ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις κάτω από 0.003μg/L.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 10: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού Πολυχλωριωμένων Διφαινυλίων

10.1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες η φυσική ποιότητα των υδάτινων πόρων μεταβλήθηκε σημαντικά εξ' αιτίας διαφόρων ανθρώπινων δραστηριοτήτων και χρήσεων του νερού. Οι περισσότερες περιπτώσεις ρύπανσης αναπτύχθηκαν βαθμιαία μέχρις ότου έγιναν φανερές και μετρήσιμες. Πολλοί Έλληνες και ξένοι επιστήμονες ασχολήθηκαν με την μελέτη της ποιότητας των νερών (υπόγειων και επιφανειακών) και ειδικότερα με προβλήματα ρύπανσης που προκάλεσε η ταφή των στερεών αποβλήτων (χωματερές από σκουπίδια οικισμών και στερεών αποβλήτων βιομηχανιών).²²² Η έκπλυση (leaching) που προκαλεί το νερό που διέρχεται από τη μάζα των αποβλήτων μπορεί να αποτελέσει αιτία υποβάθμισης της ποιότητας των υπόγειων και κατ'επέκταση των επιφανειακών νερών.

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinated Biphenyls, PCBs) συγκαταλέγονται ανάμεσα στους ρύπους που μπορεί να εμφανίζονται στα υγρά απόβλητα και επιπλέον θεωρούνται παγκόσμιοι και επίμονοι ρυπαντές, ενώ μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά προβλήματα στους ζωντανούς οργανισμούς.¹⁶⁶ Στην βιβλιογραφία έχουν δημοσιευτεί πολυάριθμες έρευνες που σχετίζονται με την διασυννοριακή μεταφορά των ρύπων αυτών,²²³ γιατί για χρόνια τα PCBs χρησιμοποιήθηκαν διεθνώς σε πολυάριθμες χρήσεις όπως για παράδειγμα ως διηλεκτρικά υγρά σε πυκνωτές και μετασχηματιστές. Πολλά από αυτά τα ηλεκτρονικά εξαρτήματα εναποτέθηκαν σε χωματερές με αποτέλεσμα την άμεση εισροή των PCBs στο περιβάλλον.² Πολλές αναφορές σχετίζονται με την ανίχνευση PCBs σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα και μάλιστα αρκετές από αυτές είναι πολύ πρόσφατες.¹⁶⁷⁻¹⁷¹ Επιπλέον, το 2004 το Ευρωπαϊκό Δικαστήριο καταδίκασε τη χώρα μας για μη σωστή διαχείριση και απόθεση ηλεκτρικού εξοπλισμού που αποδεδειγμένα περιείχε PCBs²²⁴. Από τα παραπάνω γίνεται φανερή η ανάγκη γενικότερου περιβαλλοντικού ελέγχου για ρύπανση από PCBs και άρα η ανάγκη για ανάπτυξη γρήγορων ευαίσθητων και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού αυτών των ρύπων σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα.

Ο στόχος αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας εύκολης αξιόπιστης και ευαίσθητης μεθοδολογίας για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτών των ρύπων, σε διάφορους τύπους επιφανειακών και πόσιμων υδάτων. Τα αναλυτικά πρωτόκολλα που σχετίζονται με την εκχύλιση των PCBs από υδατικά δείγματα, συνήθως, περιλαμβάνουν πολλαπλά βήματα προσυγκέντρωσης. Αυτό συμβαίνει λόγω των εξαιρετικά μικρών συγκεντρώσεων που ανιχνεύονται οι ρύποι αυτοί στα υδατικά δείγματα (πικογραμμάρια ανά

χιλιοστόλιτρο ή μικρότερες).²²⁵ Η εκχύλιση των PCBs σε υδατικά δείγματα, παραδοσιακά επιτυγχάνονταν με την τεχνική υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) και την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).¹⁷²⁻¹⁷⁵ Τα τελευταία χρόνια η τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME), κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος στην ανάλυση οργανικών ρύπων σε υδατικά δείγματα,¹⁷⁶⁻¹⁸⁰ συμπεριλαμβανομένων και των PCBs.¹⁸¹⁻¹⁸³ Η SPME πλεονεκτεί σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές αφού συνδυάζει εκχύλιση και προσυγκέντρωση των αναλυτών σε ένα βήμα, δεν απαιτεί περίπλοκο εξοπλισμό και δεν απαιτεί την κατανάλωση τοξικών οργανικών διαλυτών. Οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες εργασίες που σχετίζονται με την ανάλυση των PCBs με την τεχνική SPME, επικεντρώνονται στον μηχανισμό ρόφησης των ουσιών αυτών και μάλιστα υπάρχει κυκλώνας συζητήσεων για την προσρόφηση ή απορρόφηση των αναλυτών αυτών στο πολυμερές υλικό των ινών πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (Polydimethylsiloxane, PDMS).^{217,226-229} Ωστόσο υπάρχουν πολύ λίγες εργασίες που αναφέρονται στην ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού των PCBs σε υδατικά δείγματα με την SPME τεχνική. Οι Potter et al¹⁸¹ πρότειναν μία μέθοδο προσδιορισμού των PCBs στην υγρή φάση δειγμάτων νερού (SPME) ενώ οι Liompart et al¹⁸³ συνέκριναν για πρώτη φορά την εκχύλιση μίγματος PCBs (Aroclor 1260) από την υγρή (Solid Phase Microextraction, SPME) και εναέρια υπερκείμενη φάση (Head Space-Solid Phase Microextraction HS-SPME) υδατικών δειγμάτων και συμπέραναν ότι η δεύτερη ήταν πιο ευαίσθητη. Η παρούσα διατριβή είναι επικεντρωμένη στην σύγκριση των δύο διαφορετικών τεχνικών SPME και HS-SPME και λιγότερο επικεντρωμένη στην ανάπτυξη της HS-SPME μεθόδου. Τέλος οι Landin et al²²⁵ ανέπτυξαν μέθοδο προσδιορισμού από την εναέρια υπερκείμενη φάση των υδατικών δειγμάτων, η οποία χαρακτηρίζεται από σχετικά μικρό εύρος γραμμικότητας και μεγάλους όγκους δείγματος (100ml). Η εργασία αυτή είναι επικεντρωμένη στην σύγκριση της απόδοσης δύο διαφορετικών ινών.

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού επτά PCBs (τρίχλωρο έως επτάχλωρο διφαινύλια) σε υδατικά δείγματα (επιφανειακά και πόσιμα) με την τεχνική HS-SPME. Τα συγκεκριμένα επτά ισομερή επιλέχθηκαν γιατί αποτελούν δείκτες περιβαλλοντικής ρύπανσης από πολυχλωριωμένα διφαινύλια ("PCB markers")¹⁸⁴. Για πρώτη φορά στην εργασία αυτή, προτάθηκε εκχύλιση των PCBs σε όγκο δείγματος 2ml και με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (πικογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο υδατικού δείγματος). Για πρώτη φορά επίσης διερευνήθηκε η επίδραση μίγματος PCBs στην εκχύλιση κάθε αναλύτη ξεχωριστά καθώς και η σταθερότητα της ίνας, σε όλη την διάρκεια των πειραμάτων. Εξήχθησαν σημαντικά συμπεράσματα για το κόστος των SPME και HS-SPME τεχνικών. Η προτεινόμενη μέθοδος βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε για ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων των επτά αναλυτών. Αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μία εξαιρετικά απλή, γρήγορη, εφαρμόσιμη και ευαίσθητη μέθοδο. Εξάλλου η ανάπτυξη ευαίσθητων και

αξιόπιστων μεθόδων προσδιορισμού πολυχλωριωμένων διφαινυλίων στα νερά, έχει πλέον ιδιαίτερη σημασία αφού μόλις το 2008 η Ευρωπαϊκή Ένωση με την οδηγία 2008/105/EK, σχετικά με πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, κατατάσσει τα πολυχλωριωμένα διφαινυλία στις ουσίες υποκείμενες σε επανεξέταση για πιθανό χαρακτηρισμό ως «ουσίες προτεραιότητας» ή ως επικίνδυνες ουσίες προτεραιότητας». Μέχρι τώρα δεν έχει εκδοθεί Ευρωπαϊκή οδηγία που να αφορά ανώτατα επιτρεπόμενα όρια των PCBs σε νερά (πόσιμα ή επιφανειακά).

10.2. Ανάπτυξη της HS-SPME μεθόδου

Η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης από την υπερκείμενη εναέρια φάση (Head Space Solid Phase Microextraction, HS-SPME) είναι μία τεχνική ισορροπίας που σχετίζεται με την κατανομή των προς ανάλυση ουσιών από την υγρή φάση των δειγμάτων στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων και από εκεί στο πολυμερές υλικό της ίνας. Συχνά, όμως η ισορροπία δεν είναι το ζητούμενο στην ανάπτυξη μιας HS-SPME τεχνικής.¹⁶² Αυτό που είναι μεγίστης σημασίας, είναι η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που μπορούν να οδηγήσουν σε μεγαλύτερα ποσοστά προσρόφησης των προς ανάλυση ουσιών.

10.2.1. Επιλογή ίνας, χρόνου και θερμοκρασίας εκρόφησης των αναλυτών

Το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη μιας ευαίσθητης SPME μεθόδου είναι η επιλογή της κατάλληλης ίνας. Το πιο διαδεδομένο υλικό επικάλυψης ίνας είναι το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Θεωρείται πολύ ανθεκτικό υλικό και αντέχει ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες του εισαγωγέα του συστήματος αέριου χρωματογράφου, μέχρι και 300°C. Το PDMS θεωρείται άπολο προσροφητικό υλικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην προσρόφηση μη πολικών αναλυτών, όπως είναι και τα πολυχλωριωμένα διφαινυλία.

Στη βιβλιογραφία έχει μελετηθεί και προταθεί το PDMS ως κατάλληλο πολυμερές υλικό για την εκχύλιση των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων σε υδατικά δείγματα. Συγκεκριμένα, οι Yu Yang et al²¹⁷ μελέτησαν τον μηχανισμό ρόφησης των PCBs από την υγρή φάση υδατικών δειγμάτων (SPME) με PDMS ίνες 100 και 7 μm. Οι Liompart et al¹⁸³ συνέκριναν για πρώτη φορά την εκχύλιση μίγματος PCBs (Aroclor 1260) από την υγρή (SPME) και εναέρια υπερκείμενη φάση (HS-SPME) υδατικών δειγμάτων με PDMS ίνα. Τέλος οι Landin et al²²⁵ συνέκριναν την απόδοση δύο διαφορετικών ινών (PDMS και PDMS-DVB) στην εκχύλιση τρίχλωρο έως επτάχλωρο-διφαινυλίων, από την εναέρια υπερκείμενη φάση των υδατικών δειγμάτων και διαπίστωσαν ότι και τα δύο υλικά είναι κατάλληλα για την εκχύλιση του συνόλου των αναλυόμενων ουσιών. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω

βιβλιογραφικές πληροφορίες επιλέχθηκε η PDMS ίνα πάχους 100μm, ως η καταλληλότερη για την συγκεκριμένη ανάλυση.

Μετά την επιλογή της κατάλληλης ίνας, το επόμενο βήμα στην ανάπτυξη μιας HS-SPME μεθόδου είναι η διερεύνηση και επιλογή των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των προς ανάλυση ουσιών. Η προσθήκη άλατος στην υδατική φάση των δειγμάτων (salt out effect), η θερμοκρασία εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης είναι μερικές από τις παραμέτρους που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα εκχύλισης των προς ανάλυση ουσιών από την ίνα.^{164,230-233} Εξίσου σημαντικές θεωρούνται και οι συνθήκες εκρόφησης των αναλυτών από την ίνα και ο πιο διαδεδομένος τρόπος να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες εκρόφησης είναι να εφαρμοστεί η μέγιστη επιτρεπόμενη θερμοκρασία λειτουργίας της ίνας για το αντίστοιχο προσροφητικό υλικό (οδηγίες κατασκευαστή) και έπειτα να διερευνηθεί ο χρόνος εκρόφησης των αναλυτών στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου. Το συνιστώμενο εύρος θερμοκρασιών για την PDMS ίνα πάχους 100μm, είναι 200-280 °C.

Στην περίπτωση των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων η ίνα εκτίθονταν για 2min εκρόφησης στους 280 °C, ενώ πριν από νέα προσρόφηση αναλυτών, εκτίθονταν για άλλα 5min προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα επιμόλυνσης δειγμάτων. Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται τα % ποσοστά κατακράτησης (carry over) των PCBs στην ίνα, μετά τα 2 πρώτα λεπτά εκρόφησης, για διάφορες συγκεντρώσεις των 7 αναλυτών. Ο χρόνος εκρόφησης των 2 λεπτών αποδείχτηκε ότι δεν ήταν αρκετός για να μην εμφανίζονται φαινόμενα επιμόλυνσης ανάμεσα στα δείγματα (carry over effects) γιατί απο τα ληφθέντα χρωματογραφήματα, αποδείχθηκε ότι εμφανίζονταν κορυφές στους χρόνους κατακράτησης των προσδιορισθέντων ουσιών μετά την πρώτη εκρόφηση (των 2 λεπτών) και το φαινόμενο ήταν εντονότερο στο επταχλωροδιφαινύλιο (PCB 180). Ωστόσο, μετά τη δεύτερη εκρόφηση των 5 λεπτών στους 280 °C δεν εμφανίζονταν κορυφές PCBs στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα, ακόμα και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναλυτών στο νερό (10μgL⁻¹ ή και μεγαλύτερες).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία εκχύλισης των επτά αναλυτών είναι 60 °C.²²⁵ Αν και τα PCBs θεωρούνται ημιπτητικές ενώσεις, η αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης των υδατικών δειγμάτων μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την κινητική της HS-SPME τεχνικής, αφού ευνοεί την γρηγορότερη μεταφορά των αναλυτών από την υγρή φάση των δειγμάτων στον εναέριο υπερκείμενο χώρο και από εκεί στο πολυμερές υλικό της ίνας. Έτσι, οι αποκρίσεις των αναλυτών είναι μεγάλες ακόμα και μακριά από τις συνθήκες ισορροπίας. Σε όλη την πειραματική πορεία που ακολούθησε η θερμοκρασία εκχύλισης παρέμεινε σταθερή στους 60 °C.

10.2.2. Αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης του δείγματος

Στην προτεινόμενη HS-SPME μέθοδο μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της ιοντικής ισχύος υδατικών διαλυμάτων του PCB 153 (εξαχλωροδιφαινύλιο). Στα δείγματα αυτά η συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου (NaCl) αυξάνονταν από 0 έως 4.5 M (Σχήμα 6.1). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε 2 ml υδατικών δειγμάτων εμβολιασμένων με PCB 153 συγκέντρωσης $5 \mu\text{gL}^{-1}$, σε θερμοκρασία 60°C , υπό συνεχή ανάδευση.

Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.1, η αύξηση της αλατότητας των υδατικών διαλυμάτων, μέχρι και 4,5M, δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση της απόκρισης του συγκεκριμένου αναλύτη στο σύστημα GC-ECD. Αυτό μάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι η προσθήκη άλατος σε διαλύματα που δεν περιέχουν ιδιαίτερα πολικούς αναλύτες, όπως είναι και τα PCBs, δεν επιφέρει αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών μορίων στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων και κατ'επέκταση και στο πολυμερές υλικό της ίνας. Τα υπόλοιπα PCBs εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με άλλες βιβλιογραφικές αναφορές.¹⁸³

10.2.3. Επίδραση του χρόνου ανάδευσης και εκχύλισης των PCBs στην HS-SPME μέθοδο

Η μεταβολή του χρόνου έκθεσης της ίνας στον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος μετρήθηκε σε εμβολιασμένο υδατικό διάλυμα με PCB 138 (εξαχλωροδιφαινύλιο), στη συγκέντρωση του $1 \mu\text{gL}^{-1}$. Πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων: Στην πρώτη σειρά, ο χρόνος ανάδευσης των υδατικών διαλυμάτων κρατήθηκε σταθερός (30min) ενώ ταυτόχρονα μεταβάλλονταν ο χρόνος έκθεσης της ίνας στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων (Σχήμα 6.2). Στην δεύτερη σειρά πειραμάτων, μεταβάλλονταν ο χρόνος ανάδευσης των δειγμάτων και μετά το πέρας της ανάδευσης η ίνα εκτίθονταν στον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων για σταθερό χρονικό διάστημα (30min) (Σχήμα 6.3). Ο στόχος του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να εξακριβωθεί ποια από τις δύο διαδικασίες είναι κρισιμότερη για την ευαισθησία της προτεινόμενης HS-SPME μεθόδου: α) ρόφιση των πολυχλωριωμένων διφαινυλίων από την εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων στην ίνα ή β) μετάβαση των αναλυτών από την υγρή στην αέρια φάση.

Στο Σχήμα 6.3, παρατηρήθηκε ότι η απόκριση του συγκεκριμένου αναλύτη PCB 138 δεν επηρεάστηκε σημαντικά με την αύξηση του χρόνου ανάδευσης των δειγμάτων ενώ αντιθέτως παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στη απόκριση του αναλύτη όταν η ίνα εκτίθονταν για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων (Σχήμα 6.2). Η μικρή μείωση της απόκρισης, όταν το δείγμα αναδεύονταν για

ολοένα και μεγαλύτερα διαστήματα (Σχήμα 6.3), ίσως οφείλεται στην προσρόφηση μέρους του αναλύτη στο υλικό του μαγνητικού αναδευτήρα και στα γυάλινα τοιχώματα του φυαλιδίου ανάδευσης. Η μέγιστη απόκριση αναλυτών επιτεύχθηκε μετά από 90 λεπτά ρόφησης των αναλυτών (Σχήμα 6.2), όπου φαίνεται ότι επιτεύχθηκε και η ισορροπία της μεθόδου, με τις συγκεκριμένες συνθήκες (2ml όγκος δείγματος, συγκέντρωση $1 \mu\text{gL}^{-1}$, θερμοκρασία 60°C). Τα 90 λεπτά ρόφησης των αναλυτών στο πολυμερές υλικό της ίνας μαζί με τον αρχικό χρόνο ανάδευσης των 30 λεπτών (προκειμένου να έρθουν τα δείγματα στην επιθυμητή θερμοκρασία των 60°C), θα μπορούσαν να αυξήσουν κατα πολύ την ευαισθησία της προτεινόμενης μεθόδου. Ωστόσο, επιλέχθηκαν μικρότεροι χρόνοι για την εκχύλιση των δειγμάτων για λόγους οικονομίας χρόνου (χρόνος ανάδευσης δειγμάτων 30 λεπτά και χρόνος ρόφησης των αναλυτών από την ίνα επίσης 30 λεπτά). Το συνολικό διάστημα εκχύλισης των αναλυτών, 60 λεπτά, θεωρήθηκε πολύ βολικό στην συγκεκριμένη μέθοδο αν και δεν είναι χρόνος ισορροπίας, αφού συνδυάστηκε εύκολα με το χρόνο ανάλυσης στον αέριο χρωματογράφο, που ήταν 52 λεπτά. Έτσι, μέχρι να εκχυλιστεί ένα υδατικό δείγμα με την HS-SPME μέθοδο, ο αέριος χρωματογράφος ήταν έτοιμος για την επόμενη ανάλυση. Τα άλλα πολυχλωριωμένα διφαινύλια παρουσίαζαν παρόμοια συμπεριφορά, με τα λιγότερο χλωριωμένα ισομερή (διχλωρο έως τετράχλωρο διφαινύλια) να εμφανίζουν μεγαλύτερη πτητικότητα και το βαρύτερο ισομερές (επταχλωροδιφαινύλιο) μικρότερη πτητικότητα. Σε όλες τις περιπτώσεις ωστόσο, η κρίσιμη διαδικασία στην εκχύλιση αναλυτών φάνηκε να είναι ο χρόνος ρόφησης τους στο πολυμερές υλικό της ίνας.

10.2.4. Σύγκριση HS-SPME και SPME μεθόδων για την ανάλυση των PCBs

Η ανάλυση των PCBs πραγματοποιήθηκε και στην υγρή φάση του δείγματος, με την ίδια PDMS ίνα, για συγκριτικούς λόγους. Όλα τα εμβολιασμένα δείγματα νερού αναδεύονταν για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αμέσως μετά η ίνα εκτίθονταν στην υγρή φάση των δειγμάτων για ακόμα 30min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις από $2-10 \mu\text{gL}^{-1}$ για τρία πολυχλωριωμένα διφαινύλια PCB 28, PCB 138, PCB 180 δηλαδή τρίχλωρο, εξάχλωρο και επτάχλωρο διφαινύλιο αντιστοίχως (βλέπε Κεφάλαιο 5.1.1). Στο Σχήμα 6.3 παρουσιάζονται οι καμπύλες γραμμικότητας για τα τρία PCBs και στον Πίνακα 6.2 αναφέρονται οι συντελεστές γραμμικής συσχέτισης των καμπυλών αυτών καθώς και τα ποσοστά ανάκτησης της μεθόδου σε σύγκριση με την HS-SPME μέθοδο. Από τα παραπάνω αποτελέσματα έγινε φανερό ότι η εκχύλιση των PCBs από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων είναι πολύ πιο ευαίσθητη τεχνική από την εκχύλιση στην υγρή φάση. Ωστόσο και οι δύο μέθοδοι εμφανίζουν εξίσου καλά ποσοστά ανάκτησης και καλή γραμμικότητα, στο εύρος

συγκεντρώσεων που μελετήθηκε. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία.^{183,225}

Η τεχνική HS-SPME επιλέχθηκε τελικά για όλη την μετέπειτα πειραματική πορεία. Ωστόσο, έπρεπε να διαπιστωθεί αν κάποιο ισομερές εμφάνιζε απόκλιση στην συμπεριφορά του, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, και άρα αν εμποδιζόταν η ταυτόχρονη ανάλυση των επτά αναλυτών. Γι αυτό το σκοπό μελετήθηκαν οι συντελεστές κατανομής K_{fs} των επτά ισομερών (Πίνακας 6.4). Από τα αποτελέσματα έγινε φανερό ότι όλοι οι αναλύτες εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά στην HS-SPME τεχνική. Οι αυξημένες τιμές στο PCB 52 (διόρθο-υποκατεστημένο τετράχλωρο διφαινύλιο) πιθανότατα οφείλονται στην μεγαλύτερη πτητικότητα του συγκεκριμένου ισομερούς, αφού έχει βρεθεί ότι η ορθο-υποκατάσταση ευνοεί την πτητικότητα των ισομερών.² Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα.²¹⁷

10.3. Επικύρωση της προτεινόμενης HS-SPME μεθόδου

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού των προς ανάλυση ουσιών εκτιμήθηκε και ως προς τα χαρακτηριστικά επίδοσής της, σύμφωνα με διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025). Οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν: η γραμμικότητα και το εύρος των μετρήσεων, η πιστότητα (precision) της μεθόδου, η ανάκτηση (recovery) της μεθόδου, τα όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) της μεθόδου.

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων πόσιμου και επιφανειακού νερού, τα οποία ήταν απαλλαγμένα από τα προς ανάλυση κατάλοιπα. Στο σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν (περίπου 30 προσδιορισμοί), δεν εκλούστηκαν από την χρωματογραφική στήλη παρεμποδιστές στο χρόνο κατακράτησης των επτά αναλυτών.

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους της μεθόδου αναλύθηκαν δείγματα νερού εμβολιασμένα με τα επτά PCBs. Κάθε σειρά εμβολιασμένων δειγμάτων αποτελούνταν από 7 συγκεντρώσεις και κάθε συγκέντρωση αναλύονταν εις τριπλούν. Το εύρος συγκεντρώσεων για κάθε αναλύτη καθώς και τα αποτελέσματα γραμμικότητας της μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5. Οι ευθείες που προέκυψαν χαρακτηρίζονται από ικανοποιητικές τιμές συντελεστών συσχέτισης, R^2 , οι οποίες ήταν μεγαλύτερες από 0.9735 σε κάθε περίπτωση. Η προτεινόμενη μέθοδος παρουσίασε γραμμικότητα σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, από μερικά ng αναλύτη μέχρι 5 ή 10μg αναλύτη ανά λίτρο νερού.

Υδατικά πόσιμα δείγματα που ήταν απαλλαγμένα από PCBs, εμβολιάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις και πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης και ακρίβειας της μεθόδου. Για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για κάθε αναλύτη χωριστά αλλά και για κάθε αναλύτη όταν αυτός βρισκόταν μέσα σε μίγμα με τα

υπόλοιπα έξι PCBs, με την τεχνική της σταθερής προσθήκης. Τα εμβολιασμένα δείγματα χωρίστηκαν σε 4 φυαλίδια και στο κάθε δείγμα εφαρμόστηκε η τεχνική της σταθερής προσθήκης. Η αρχική συγκέντρωση ήταν $1\mu\text{gL}^{-1}$ για κάθε PCB. Όλα τα δείγματα αναλύονταν εις τριπλούν. Για κάθε αναλύτη κατασκευάστηκαν καμπύλες συσχέτισης των αποκρίσεων στον αεριοχρωματογράφο σε συνδυασμό με τον όγκο της προστιθέμενης ποσότητας πρότυπης ουσίας, με την οποία εφαρμόζεται η τεχνική σταθερής προσθήκης. Ο μέσος όρος των ανακτήσεων, για όλες τις μετρήσεις παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.6. Οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 75% μέχρι 125% για κάθε PCB ξεχωριστά και για κάθε PCB μέσα σε μίγμα των υπολοίπων αναλυτών. Τα δείγματα τα οποία είχαν εμβολιαστεί με μεμονωμένους αναλύτες εμφάνισαν παρόμοια ποσοστά ανάκτησης με τα δείγματα τα οποία περιείχαν μίγμα των επτά αναλυτών σε συγκρίσιμες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, η ανάκτηση για κάθε PCB διερευνήθηκε και σε σχέση με την επίδραση μεγαλύτερης ολικής συγκέντρωσης μίγματος PCBs. Η διερεύνηση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα συνολικής συγκέντρωσης PCBs $0.002\ \mu\text{g L}^{-1}$ έως $20\ \mu\text{g L}^{-1}$ όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.7. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων διαπιστώθηκε ότι όταν η συνολική συγκέντρωση PCBs κυμαίνονταν από 0.002 έως $8\ \mu\text{gL}^{-1}$ η προτεινόμενη μέθοδος ήταν εφαρμόσιμη. Όταν όμως η συνολική συγκέντρωση των PCBs ξεπερνούσε τα $8\ \mu\text{gL}^{-1}$ η προτεινόμενη μέθοδος δεν έδινε την ίδια απόκριση για κάθε αναλύτη σε σχέση με την απόκριση που είχε παρατηρηθεί όταν ο αναλύτης αυτός βρισκόταν μόνος του στο διάλυμα. Φαίνεται, ότι στην HS-SPME τεχνική υπάρχουν ανταγωνιστικά φαινόμενα προσρόφησης αναλυτών τα οποία είναι άμεσα εξαρτώμενα από την συγκέντρωσή τους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, με την εφαρμογή της τεχνικής «σταθερής προσθήκης» (standard addition), αποφεύχθηκαν προβλήματα επίδρασης μήτρας (matrix effect), που θα μπορούσαν να παρατηρηθούν από τη διαφορετική προέλευση υδατικών δειγμάτων (πόσιμων και επιφανειακών)¹⁸³. Η ακρίβεια, μετρημένη σε ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης, υπολογίστηκε από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της ίδιας μέρας και διαφορετικών ημερών. Σε κάθε περίπτωση τα ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSDs) ήταν μικρότερα από 9.3% (Πίνακας 6.6). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με άλλες μελέτες στις οποίες διάφορα ισομερή PCBs προσδιορίζονται με την HS-SPME τεχνική αλλά σε διαφορετικές αναλυτικές συνθήκες (όγκος δείγματος, θερμοκρασία, χρόνος προσρόφησης και εκρόφησης).²²⁵

Τα όρια ανίχνευσης (Limits of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) προσδιορίστηκαν μέσω της ανάλυσης εμβολιασμένων δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης και συγκεκριμένα εμβολιασμένων δειγμάτων με συγκεντρώσεις αναλυτών που δίνουν λόγο σήματος προς θόρυβο 3 και 10 αντίστοιχα (Πίνακας 6.8). Τα όρια ανίχνευσης για όλα τα PCBs κυμάνθηκαν από 1 έως $5\ \text{ngL}^{-1}$. Στη βιβλιογραφία αναφέρθηκαν

χαμηλότερα όρια ανίχνευσης (100 φορές ή περισσότερο), τα οποία όμως επιτεύχθηκαν με πολύ μεγαλύτερους όγκους δείγματος (50 φορές) και υψηλές θερμοκρασίες προσρόφησης.^{183,225} Ωστόσο, η προτεινόμενη μέθοδος πλεονεκτεί σημαντικά σε απλότητα και εφαρμοσιμότητα. Τα πλεονεκτήματα αυτά, σε συνδυασμό με τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, την καθιστούν κατάλληλη για τον προσδιορισμό των επτά χαρακτηριστικών PCBs (PCB markers) σε πόσιμα και επιφανειακά νερά. Εξάλλου, η ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων προσδιορισμού πολυχλωριωμένων διφαινυλίων στα νερά έχει πλέον ιδιαίτερη σημασία, αφού μόλις το 2008 η Ευρωπαϊκή Ένωση με την οδηγία 2008/105/EK, σχετικά με πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, κατατάσσει τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια στις ουσίες υποκειμένες σε επανεξέταση για πιθανό χαρακτηρισμό ως «ουσίες προτεραιότητας» ή ως επικίνδυνες ουσίες προτεραιότητας. Μέχρι τώρα δεν έχει εκδοθεί Ευρωπαϊκή οδηγία που να αφορά ανώτατα επιτρεπτά όρια των PCBs σε νερά (πόσιμα ή επιφανειακά).

Προκειμένου να μελετηθεί η εφαρμοσιμότητα της προτεινόμενης HS-SPME μεθόδου σε πραγματικά δείγματα νερού (πόσιμα και επιφανειακά), αναλύθηκαν δείγματα από δειγματοληψία που διεξήχθη στην ΕΥΔΑΠ. Για την αποφυγή επιμολύνσεων, στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκαν καινούργια φυαλίδια και καινούργιοι μαγνήτες ανάδευσης. Σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν δεν ανιχνεύθηκαν συγκεντρώσεις PCBs πάνω από το όριο ποσοτικοποίησης (Πίνακας 6.9).

Σε όλο το διάστημα της ανάπτυξης της προτεινόμενης μεθόδου, αλλά και κατά την διάρκεια των αναλύσεων των πραγματικών δειγμάτων, η σταθερότητα της PDMS ίνας ελέγχονταν ως προς πρότυπο διάλυμα 1,2,3,4,5,6- εξαχλωροκυκλοεξανίου (lindane). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στο Σχήμα.5.5. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η PDMS ίνα παρέμεινε λειτουργική μετά από 400 περίπου αναλύσεις με την τεχνική HS-SPME, ενώ στην τεχνική SPME καταστράφηκε μετά από ένα σύνολο 100 αναλύσεων. Η PDMS ίνα αποδείχτηκε λιγότερο ανθεκτική όταν εκτίθεται στην υγρή φάση των δειγμάτων. Με βάση τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα επιχειρήθηκε να εκτιμηθεί το συγκριτικό κόστος των δύο μεθόδων (εκχύλιση από την υγρή και την εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων), σε σχέση με τον αριθμό των δειγμάτων που αναλύονται από ένα εργαστήριο. Το κόστος που ελήφθη υπόψη αφορά μόνο την αγορά της PDMS ίνας και όχι τον εργαστηριακό εξοπλισμό, το εργατικό κόστος ή την αγορά προτύπων και γενικά άλλων αναλωσίμων. Το κόστος των δύο μεθόδων εκτιμήθηκε για διαφορετικό αριθμό δειγμάτων που κυμάνθηκαν από 1 έως 400 (Σχήμα.6.8). Όπως φαίνεται στο σχήμα, η εκχύλιση από την υγρή φάση των δειγμάτων (SPME) είναι έως και 70% πιο ακριβή από την HS-SPME.

Κεφάλαιο 11: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού 1,2-Διβρωμοαιθανίου, 1,4-Διχλωροβενζολίου και Ναφθαλενίου στο μέλι

11.1. Εισαγωγή

Το μέλι είναι ένα εξαγωγίμο προϊόν της Ελλάδας με μεγάλη οικονομική σημασία. Σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το μέλι ως φυσικό προϊόν πρέπει να είναι απαλλαγμένο από οργανικά και ανόργανα κατάλοιπα, ξένα προς τη σύστασή του¹⁸⁵. Έχει παρατηρηθεί ότι η εκτεταμένη χρήση παρασιτοκτόνων στη γεωργία και η ευρεία περιβαλλοντική ρύπανση από βιομηχανικές χημικές ουσίες μπορούν έμμεσα να προκαλέσουν ρύπανση του μελιού ως εξής: οι χημικοί ρύποι μπορούν να φθάσουν στο νέκταρ, στη γύρη και στα εκκρίματα των φυτών μέσω του αέρα, του νερού ή του χώματος και από εκεί να μεταφερθούν στην κυψέλη από τις μέλισσες. Από την άλλη μεριά, η άμεση ρύπανση του μελιού προέρχεται από την χρήση εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και ακαριοκτόνων μέσα στις κυψέλες των μελισσών προκειμένου να αντιμετωπιστούν διάφορα παράσιτα και ασθένειες των μελισσών.^{234,235}

Μία τέτοια περίπτωση παρασίτων αποτελούν οι προνύμφες του σκώρου με το επιστημονικό όνομα *Galleria mellonella*, οι οποίες προσβάλλουν τις κερύθρες των μελισσών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους, ενώ μπορούν ακόμη να βλάψουν και τα ξύλινα πλαίσια με τα οποία συγκρατούνται οι κερύθρες. Κατά το παρελθόν, το συχνό αυτό πρόβλημα των μελισσοπαραγωγών αντιμετωπίστηκε με την χρήση χημικών θεραπευτικών μέσων και συγκεκριμένα τη χρήση 1,4-διχλωροβενζολίου (p-dichlorobenzene, p-DCB)²³⁶. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι το p-DCB ανιχνεύεται ως κατάλοιπο στις κερύθρες των μελισσών αλλά και στο μέλι¹⁸⁶. Σε μια μελέτη που διεξήχθη στη Γερμανία το 1990, ένα σχετικά υψηλό ποσοστό από τα αναλυθέντα δείγματα μελιού (36-50%) βρέθηκαν να περιέχουν υπολείμματα από p-DCB σε συγκεντρώσεις από 3 έως 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.²³⁷ Στην Ελβετία, το ποσοστό των δειγμάτων που βρέθηκαν να περιέχουν p-DCB ανερχόταν στο 34% του συνόλου της παραγωγής και το 13% αυτών των δειγμάτων υπερέβησαν το ελβετικό «όριο ανοχής» των $10\mu\text{gkg}^{-1}$.^{186,238} Δύο εκτεταμένες ελληνικές μελέτες για την περίοδο 2003-2006 έδειξαν ότι ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων μελιού μολύνθηκε με p-DCB.^{67,158} Πρόσφατα, η Ευρωπαϊκή Ένωση έθεσε «ανώτατο όριο υπολείμματος» (Maximum Residue Limit, MRL) σε τρόφιμα, αυτό των $10\mu\text{g kg}^{-1}$, για όλες τις ουσίες για τις οποίες τα ανώτατα όρια υπολείμματος δεν έχουν καθιερωθεί ακόμα (όπως το p-DCB)²³⁹

Ωστόσο, έχουν βρεθεί υπολείμματα και από άλλες τοξικές ουσίες στο μέλι, όπως το ναφθαλένιο (Naphthalene, Naphth), οι οποίες επίσης χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση του σκώρου των κερύθρων.^{67,186} Ένα τριετές πρόγραμμα ελέγχου καταλοίπων

στην Ελλάδα έδειξε ότι, το ναφθαλένιο ανιχνεύθηκε κατά πλειοψηφία σε δείγματα μελιού του εμπορίου και λιγότερο σε δείγματα προερχόμενα από μεμονωμένους μελισσοπαραγωγούς. Αυτό αποδόθηκε στην πρόσμιξη ελληνικών μελιών με εισαγόμενα, τα οποία είχαν προέρθει από χώρες όπου το ναφθαλένιο χρησιμοποιήθηκε για την καταπολέμηση του σκώρου των κερύθρων⁶⁷.

Αν και το 1,2-Διβρωμοεθάνιο (1,2-Dibromoethane, 1,2-DBE) αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικό για τον έλεγχο του σκώρου κερύθρων, έχει πλήρως απαγορευθεί, δεδομένου ότι είναι πολύ καρκινογόνος ουσία και εύκολα προσροφάται από το μελισσοκηρό και το μέλι. Ο Αμερικάνικος Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφίμων (Food and Drug Administration, FDA) έθεσε «όριο δράσης» για το 1,2-DBE στο μέλι, αυτό των 30 μgkg^{-1} , το οποίο αντιπροσωπεύει το όριο πάνω από το οποίο λαμβάνονται νομικά μέτρα και απομακρύνονται τα επιβαρυμένα προϊόντα από την αγορά⁷¹. Σύμφωνα με το ελληνικό πρόγραμμα ελέγχου καταλοίπων, το 1,2-DBE ανιχνεύθηκε σε δείγματα μελιού που συλλέχθηκαν από μεμονωμένους μελισσοπαραγωγούς⁶⁷.

Η παρουσία υπολειμμάτων p-DCB, ναφθαλενίου και 1,2-DBE, στο μέλι μπορεί να αποτελέσει απειλή για την δημόσια υγεία και γι'αυτό καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη γρήγορων, ευαίσθητων και αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό αυτών των υπολειμμάτων.

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες δημοσιευμένες μελέτες για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι, όπως είναι τα οργανοφωσφορικά και τα ακαριοκτόνα.²⁴⁰⁻²⁴³ Ωστόσο υπάρχει περιορισμένος αριθμός εργασιών που αναφέρεται στον προσδιορισμό του p-DCB και ναφθαλενίου στο μέλι^{158,186-188} και μόνο μία εργασία που αναφέρεται στον προσδιορισμό του 1,2-DBE.¹⁸⁸ Οι αναλυτικές μέθοδοι που προτείνονται σε αυτές τις μελέτες (απόσταξη μεθ'υδρατμών, τεχνική εκδίωξης και παγίδευσης) απαιτούν χρονοβόρα βήματα εκχύλισης που τις καθιστούν ουσιαστικά ανεφάρμοστες για αναλύσεις ρουτίνας. Σχετικά με τον προσδιορισμό του p-DCB, υπάρχει μόνο μια αναφορά¹⁸⁶ που στηρίζεται στην εκχύλιση του αναλύτη με την τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) από την υγρή φάση του δείγματος. Η τεχνική SPME παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης, όπως μικρότερη κατανάλωση οργανικών διαλυτών, δεν απαιτείται πολύπλοκος αναλυτικός εξοπλισμός και επιπλέον η εκχύλιση και η προσυγκέντρωση επιτυγχάνονται σε ένα βήμα. Ένα από τα μειονεκτήματα όμως που εμφανίζονται είναι οι «επιδράσεις μήτρας» (matrix effects). Επιπλέον, η βύθιση της ίνας στην υγρή φάση των δειγμάτων μπορεί να μικρύνει την διάρκεια ζωής της χρησιμοποιούμενης ίνας. Η τεχνική μικροεκχύλισης στερεάς φάσης από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος (HS-SPME) μπορεί να αποδειχθεί γι'αυτούς τους λόγους αποτελεσματικότερη σε περίπλοκα δείγματα, όπως είναι και το μέλι.¹⁸⁹⁻¹⁹²

Στην παρούσα διατριβή, ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των υπολειμάτων p-DCB, ναφθαλενίου και 1,2-DBE στο μέλι, με τον συνδυασμό της τεχνικής HS-SPME και της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS) παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία. Η προτεινόμενη μέθοδος βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε για ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων των τριών αναλυτών. Δοκιμάστηκε, επίσης, η εφαρμοσιμότητα της προτεινόμενης μεθόδου σε πραγματικά δείγματα μελιού. Αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μία εξαιρετικά απλή, γρήγορη, εφαρμόσιμη και ευαίσθητη μέθοδο, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για αναλύσεις ρουτίνας, αφού είναι κατάλληλη για την επεξεργασία μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

11.2. Ανάπτυξη της HS-SPME μεθόδου

Η HS-SPME τεχνική είναι μία τεχνική ισορροπίας που σχετίζεται με την κατανομή των προς ανάλυση ουσιών από την υγρή φάση των δειγμάτων στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων και από εκεί στο πολυμερές υλικό της ίνας. Συχνά, όμως η ισορροπία δεν είναι το ζητούμενο στην ανάπτυξη μιας HS-SPME τεχνικής.¹⁶² Αυτό που είναι μεγίστης σημασίας, είναι η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που μπορούν να οδηγήσουν σε μεγαλύτερα ποσοστά προσρόφησης των προς ανάλυση ουσιών.

11.2.1. Επιλογή ίνας, χρόνου και θερμοκρασίας εκρόφησης αναλυτών

Το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη μιας ευαίσθητης SPME μεθόδου είναι η επιλογή της κατάλληλης ίνας. Το πιο διαδεδομένο υλικό επικάλυψης ίνας είναι το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Θεωρείται πολύ ανθεκτικό υλικό και αντέχει ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες του εισαγωγέα του συστήματος αέριας χρωματογραφίας, μέχρι και 300°C. Το PDMS θεωρείται άπολο προσροφητικό υλικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην προσρόφηση μη πολικών αναλυτών. Ωστόσο, μπορούν ακόμα και πιο πολικοί αναλύτες να εκχυλιστούν ικανοποιητικά με το PDMS προσροφητικό υλικό, αφού πρώτα προηγηθεί βελτιστοποίηση των παραμέτρων εκχύλισης. Σε πρόσφατη δημοσιευμένη εργασία ανασκόπησης, που σχετίζεται με την ανάλυση διαφόρων οργανικών ρύπων από περιβαλλοντικά δείγματα με την τεχνική HS-SPME,²³⁰ αναφέρεται ότι οι PDMS ίνες πάχους 100 μm μπορούν ικανοποιητικά να προσροφήσουν πολλούς και διαφορετικούς αναλύτες από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων αυτών.

Σε σχέση με τους τρεις αναλύτες-στόχους της προτεινόμενης μεθόδου, οι παρακάτω βιβλιογραφικές πληροφορίες είναι γνωστές:

(α) Τα ισομερή του Διχλωροβενζολίου (συμπεριλαμβανομένου και του p-DCB) έχουν επιτυχώς εκχυλιστεί από δείγματα ανθρώπινου αίματος με την PDMS ίνα πάχους 100μm²³¹
(β) Το Ναφθαλένιο έχει επίσης εκχυλιστεί επιτυχώς από διάφορα δείγματα (θαλασσινό νερό, ούρα, νερό, ιζήματα, χρώματα) με την PDMS ίνα.²³⁰

Σε ότι αφορά το 1,2-DBE, δεν υπάρχει καμία βιβλιογραφική αναφορά που να σχετίζεται με την εκχύλιση αυτού του αναλύτη με την SPME ή την HS-SPME τεχνική. Υπάρχουν, ωστόσο, αναφορές που σχετίζονται με την εκχύλιση άλλων αλογονομένων υδρογονανθράκων με την PDMS ίνα.²³⁰

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω βιβλιογραφικές πληροφορίες και με το δεδομένο ότι ο στόχος ήταν ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των τριών αναλυτών σε δείγματα μελιού, επιλέχθηκε η PDMS ίνα πάχους 100μm, ως η καταλληλότερη για την συγκεκριμένη ανάλυση.

Μετά την επιλογή της κατάλληλης ίνας, το επόμενο βήμα στην ανάπτυξη μιας HS-SPME μεθόδου είναι η διερεύνηση και επιλογή των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των προς ανάλυση ουσιών. Η προσθήκη άλατος στην υδατική φάση των δειγμάτων (salt out effect), η θερμοκρασία εκχύλισης και ο χρόνος εκχύλισης είναι μερικές από τις παραμέτρους που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ικανότητα εκχύλισης των προς ανάλυση ουσιών από την ίνα.^{164,230-233} Εξίσου σημαντικές θεωρούνται και οι συνθήκες εκρόφησης των αναλυτών από την ίνα και ο πιο διαδεδομένος τρόπος να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες εκρόφησης είναι να εφαρμοστεί η μέγιστη επιτρεπόμενη θερμοκρασία λειτουργίας της ίνας για το αντίστοιχο προσροφητικό υλικό (οδηγίες κατασκευαστή) και έπειτα να διερευνηθεί ο χρόνος εκρόφησης των αναλυτών στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου. Το συνιστώμενο εύρος θερμοκρασιών, για την PDMS ίνα πάχους 100μm, είναι 200-280 °C. Εντούτοις, η εφαρμογή πολύ υψηλών θερμοκρασιών μπορεί να επιφέρει σταδιακή καταστροφή του πολυμερούς υλικού και άρα να μικρύνει την διάρκεια «ζωής» της ίνας¹⁶⁴.

Προκειμένου να μελετηθεί η βέλτιστη θερμοκρασία εκρόφησης των αναλυτών, πειράματα διεξήχθησαν σε δείγματα μελιού εμβολιασμένα σε συγκέντρωση 25 μgkg⁻¹ για κάθε έναν από τους τρεις προσδιοριζόμενους αναλύτες. Τα δείγματα αναδεύονταν διαρκώς στους 40 °C ενώ η ίνα εκτέθηκε στον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων για 30 λεπτά. Έπειτα η ίνα εκτίθονταν στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 220 και 260 °C. Τα συγκριτικά αυτά πειράματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε διαφορά στο ποσοστό εκρόφησης των τριών αναλυτών στις δύο αυτές ακραίες θερμοκρασίες, για αυτό και επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 220°C ως βέλτιστη.

Ο χρόνος εκρόφησης των 2 λεπτών αποδείχτηκε ότι ήταν αρκετός για να μην εμφανιστούν φαινόμενα επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων (carry over effects). Αυτό επιβεβαιώθηκε και πειραματικά ως εξής: η ίνα μετά την έκθεσή της στον αεριοχρωματογράφο για 2 λεπτά στους 220 °C επανεκτίθονταν για ακόμα 5 λεπτά στην ίδια

θερμοκρασία. Απο τα ληφθέντα χρωματογραφήματα αποδείχθηκε ότι δεν εμφανίζονταν κορυφές στους χρόνους κατακράτησης των προσδιορισθέντων ουσιών μετά την πρώτη εκρόφιση.

11.2.2. Αύξηση της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης του δείγματος

Στην τεχνική HS-SPME οι προσδιοριζόμενες ουσίες προσροφώνται στον εναέριο υπερκείμενο χώρο του δείγματος από το πολυμερές υλικό της ίνας. Η κατανομή αυτή των ουσιών, ανάμεσα στην ίνα και στο δείγμα περιγράφεται από τους «συντελεστές κατανομής ίνας-δείγματος», K_{fs} , όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.1.2. Οι «συντελεστές κατανομής ίνας-δείγματος», προσδιορίστηκαν και για τους 3 αναλύτες σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (12.5, 25 και 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1, γίνεται φανερό ότι οι αντίστοιχες τιμές K_{fs} για το 1,2-DBE είναι κατά πολύ μικρότερες από τις τιμές των άλλων δύο αναλυτών (p-DCB και ναφθαλένιο). Αυτό αποδεικνύει ότι υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες ήταν πρακτικά δύσκολο να εκχυλιστεί το 1,2-DBE με την HS-SPME τεχνική.

Ωστόσο, η εκχύλιση αναλυτών με την τεχνική HS-SPME μπορεί να είναι πιο αποδοτική όταν αυξάνεται η ιοντική ισχύς των διαλυμάτων, ιδιαίτερα εκείνων που περιέχουν πολικούς αναλύτες (salt effect). Γι' αυτό το λόγο, μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της ιοντικής ισχύος των υδατικών διαλυμάτων μελιού, στην εκχύλιση των τριών αναλυτών. Συγκεκριμένα εμβολιάστηκαν και αναλύθηκαν δείγματα μελιού τα οποία περιείχαν συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl) από 0 έως 26.4 (% w/v). Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου στα εμβολιασμένα δείγματα αποφεύχθηκαν, γιατί οδηγούσαν σε κορεσμένα διαλύματα (ορατούς κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε εμβολιασμένα δείγματα μελιού όγκου 2 ml και θερμοκρασίας 60 °C, υπό συνεχή ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις των τριών αναλυτών ήταν 25, 25 and 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για τα p-DCB, ναφθαλένιο και 1,2-DBE αντίστοιχα. Στο σχήμα 7.1, απεικονίζεται η επίδραση της ολικής συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου στην ένταση των επιλεγμένων GC-MS ιόντων των τριών αναλυτών. Η προσθήκη άλατος δεν έχει την ίδια επίδραση για όλους τους αναλύτες. Για τους πιο υδρόφοβους αναλύτες, όπως είναι το ναφθαλένιο και το p-DCB, με συντελεστές κατανομής οκτανόλης-νερού $\log K_{ow} = 3.3$ και $\log K_{ow} = 3.44$ αντίστοιχα,²⁴⁴ η εκχύλισή τους δεν αποδείχτηκε πιο αποδοτική μετά την προσθήκη άλατος. Η βέλτιστη απόκριση των δύο αυτών καταλοίπων εμφανίστηκε σε συγκέντρωση NaCl 13% w/v στο δείγμα.

Ωστόσο, η εκχύλιση του 1,2-DBE με την τεχνική HS-SPME στις προαναφερθείσες συνθήκες, θα ήταν πρακτικά αδύνατη χωρίς την αύξηση της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων.

Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.1 η αύξηση της αλατότητας των διαλυμάτων μελιού, μέχρι και 26.4% w/v, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της απόκρισης του συγκεκριμένου αναλύτη στο σύστημα GC-MS. Η προσθήκη άλατος πρωτίστως οδήγησε σε αύξηση της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων, έπειτα σε αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών μορίων στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων και κατ'επέκταση και στο πολυμερές υλικό της ίνας. Στην περίπτωση του 1,2-DBE, η μεγάλη επίδραση από την αύξηση της ιοντικής ισχύος των διαλυμάτων αποδίδεται στην μεγαλύτερη πολικότητα του μορίου (συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού $\log K_{ow} = 1.96$ ²⁴⁴). Η αύξηση της αλατότητας κατά 26.4% w/v επιλέχθηκε συνολικά για την προτεινόμενη μέθοδο καθότι αύξησε σημαντικά τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για το 1,2-DBE ενώ δεν επηρέασε αρνητικά την απόκριση των άλλων δύο αναλυτών, των οποίων η βέλτιστη απόκριση εμφανίστηκε σε αλατότητα 13% w/v.

11.2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης του 1,2-DBE, p-DCB και ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο

Ως γενική αρχή στην HS-SPME τεχνική ισχύει ότι η αύξηση της θερμοκρασίας των υδατικών διαλυμάτων ευνοεί την μεταφορά των προς ανάλυση ουσιών στον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων και κατ'επέκταση ευνοεί την μεταφορά των ουσιών αυτών στο πολυμερές υλικό της ίνας. Ωστόσο, υπερβολική αύξηση στην θερμοκρασία της υδατικής φάσης των δειγμάτων, μπορεί να οδηγήσει και σε αντίθετα αποτελέσματα αφού ευνοεί την πρόωρη εκρόφιση των αναλυτών από το πολυμερές υλικό της ίνας²¹⁹.

Στο Σχήμα 7.2 απεικονίζεται η απόκριση των τριών αναλυτών σε σχέση με την μεταβολή της θερμοκρασίας εκχύλισης των δειγμάτων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ για p-DCB, ναφθαλένιο και 1,2-EDB, 26.4 % w/v συγκέντρωση NaCl για όλα τα δείγματα, όγκος υδατικού δείγματος μελιού 2 ml και συνεχή ανάδευση της υδατικής φάσης για 30 min σε 900 rpm. Η απόκριση των τριών αναλυτών στο φασματογράφο μάζας εμφάνισε μια μικρή αύξηση όταν η θερμοκρασία εκχύλισης ανέβηκε από τους 30 °C στους 40 °C. Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας εκχύλισης οδήγησε σε μείωση της απόκρισης του ναφθαλενίου και του p-DCB στον φασματογράφο μάζας λόγω της πρόωρης εκρόφισης των αναλυτών από το πολυμερές υλικό της ίνας. Σε ότι αφορά το 1,2-DBE, παρατηρήθηκε επίσης μια μικρή αύξηση στην απόκρισή του μέχρι τους 40 °C αλλά περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τους 60 °C δεν ευνόησε σημαντικά την διαδικασία προσρόφησης του στην ίνα. Η θερμοκρασία των 40 °C επιλέχθηκε τελικώς ως βέλτιστη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τριών αναλυτών.

11.2.4. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης του 1,2-DBE, p-DCB και ναφθαλενίου στην HS-SPME μέθοδο

Η επίδραση της μεταβολής του χρόνου έκθεσης της ίνας στον εναέριο υπερκείμενο χώρο των δειγμάτων μετρήθηκε και για τους τρεις αναλύτες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.3. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν μεταβάλλοντας τον χρόνο έκθεσης της ίνας, στην εναέρια υπερκείμενη φάση των δειγμάτων, από 10 σε 90 λεπτά, ενώ ταυτόχρονα η υδατική φάση αναδεύονταν στις 900 στροφές το λεπτό (rpm) στους 40 °C. Οι συγκεντρώσεις των αναλυτών ήταν 25 μgkg^{-1} για το p-DCB, ναφθαλένιο και 1,2-DBE ενώ η αλατότητα της υδατικής φάσης ήταν 26.4% w/v NaCl.

Οι προς ανάλυση ουσίες δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την αλλαγή στον χρόνο εκχύλισης, ενώ η ισορροπία στην HS-SPME μέθοδο επήλθε μετά από περίπου 30 λεπτά εκχύλισης. Ο χρόνος των 30 λεπτών και όχι μεγαλύτερος, επιλέχθηκε τελικά ως χρόνος εκχύλισης των δειγμάτων αφού οι χρονοβόρες αναλυτικές μέθοδοι είναι γενικά αποφευκτέες, γιατί δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμες.

11.3. Ανάλυση του 1,2-DBE, p-DCB και ναφθαλενίου στο φασματογράφο μάζας

Τρία χαρακτηριστικά ιόντα για το p-DCB (m/z 75, 111 and 146) και δύο για τα 1,2 DBE (m/z 107 and 109) και ναφθαλενίου (m/z 127 and 128) επιλέχθηκαν ως ιόντα ταυτοποίησης των τριών ουσιών στο φασματογράφο μάζας (Πίνακας 7.2, Σχήμα 7.4).

Η επιβεβαίωση των προς ανάλυση ουσιών βασίζεται α) στο χρόνο κατακράτησης t_R των χαρακτηριστικών τους ιόντων από τη χρωματογραφική στήλη και β) στην αναλογία των εμβαδών των χαρακτηριστικών τους ιόντων. Τα ιόντα που επιλέχθηκαν για το p-DCB είναι [111] / [146], για το ναφθαλένιο [127]/[128] και για το 1,2-DBE [109]/[107]. Επιβεβαίωση επιτυγχάνεται όταν οι τιμές των αναλογιών αυτών σε ένα άγνωστο δείγμα είναι ανάλογες με τις αντίστοιχες τιμές προτύπων διαλυμάτων των τριών ουσιών, μέσα σε ένα εύρος που έχει οριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση²⁰⁸.

Η ποσοτικοποίηση των τριών αναλυτών, ωστόσο, βασίστηκε στο εμβαδόν των κορυφών των ιόντων που εμφάνιζαν τις μεγαλύτερες εντάσεις στο φασματογράφο μάζας, με την τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Selective Ion Monitoring, SIM). Στην περίπτωση του ναφθαλενίου ως ιόν ποσοτικοποίησης επιλέχθηκε το ιόν m/z 128. Σε ότι αφορά το p-DCB, η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στο άθροισμα δύο χαρακτηριστικών ιόντων (m/z 146 και m/z 111), λόγω της πιθανότητας προσμίξεων των πραγματικών δειγμάτων από την χημική ένωση οκτανάλη, μία ενδογενή χημική ένωση του μελιού που μπορεί να συνεκλούεται με το p-DCB¹⁸⁸. Τέλος, στην περίπτωση του 1,2-DBE η ποσοτικοποίηση

βασίστηκε στο άθροισμα των εμβαδών των επιλεγμένων ιόντων m/z 107 και 109, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου στην ανάλυση του συγκεκριμένου αναλύτη. Αυτή η επιλογή ενισχύθηκε από το γεγονός ότι τα ιόντα αυτά έχουν περίπου ίσες αποκρίσεις στο φασματογράφο μάζας αφού η αναλογία των δύο αυτών ιόντων (m/z 107 και 109) έχει τιμή 95%.

Η επαναληψιμότητα των σχετικών εντάσεων των επιλεγμένων ιόντων μετρήθηκε με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD). Οι τιμές αυτές βρίσκονταν κάτω από τα όρια που έχουν τεθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (10% για τα *p*-DCB και ναφθαλενίου και 15% για το 1,2-DBE).²⁰⁸ Στο Σχήμα 7.5 απεικονίζονται δύο χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα επιλεχθέντων ιόντων (Selective Ion Monitoring, SIM), για ένα μη εμβολιασμένο (τυφλό) δείγμα μελιού και για ένα εμβολιασμένο δείγμα, ενώ στο Σχήμα 7.6 απεικονίζεται η ταυτοποίηση κάθε μιάς ουσίας από τα χαρακτηριστικά της ιόντα.

11.4. Επικύρωση της προτεινόμενης HS-SPME μεθόδου

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού των προς ανάλυση ουσιών εκτιμήθηκε και ως προς τα χαρακτηριστικά επίδοσής της, σύμφωνα με διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025). Οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν: η εκλεκτικότητα των υπό προσδιορισμό ουσιών, οι παρεμποδιστές, η γραμμικότητα και το εύρος των μετρήσεων, η πιστότητα (precision) της μεθόδου, η ορθότητα (accuracy) της μεθόδου, τα όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) της μεθόδου.

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με την ανάλυση δειγμάτων μελιού τα οποία ήταν απαλλαγμένα από τα προς ανάλυση κατάλοιπα. Στο σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν (περίπου 30 προσδιορισμοί), δεν εκλούστηκαν από την χρωματογραφική στήλη παρεμποδιστές κορυφές στο χρόνο κατακράτησης των τριών αναλυτών.

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας και του εύρους της μεθόδου αναλύθηκαν, με την προτεινόμενη μέθοδο, δείγματα μελιού εμβολιασμένα με τις τρεις προς ανάλυση ουσίες. Κάθε σειρά εμβολιασμένων δειγμάτων αποτελούνταν από 12 συγκεντρώσεις και κάθε συκέντρωση αναλύονταν εις τριπλούν. Το εύρος συγκεντρώσεων για κάθε αναλύτη καθώς και τα αποτελέσματα γραμμικότητας της μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.3. Οι ευθείες που προέκυψαν χαρακτηρίζονται από ικανοποιητικές τιμές συντελεστών συσχέτισης, R^2 , οι οποίες ήταν μεγαλύτερες από 0.9901 σε κάθε περίπτωση.

Σε ότι αφορά την ορθότητα της μεθόδου αναλύθηκαν δείγματα μελιού εμβολιασμένα με τρεις συγκεντρώσεις του κάθε αναλύτη και συγκεκριμένα: 5, 12.5 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για το *p*-DCB και ναφθαλενίου και 12.5, 25 και 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ για το 1,2-DBE. Αξίζει να σημειωθεί ότι το μέλι θεωρείται σύνθετο υπόστρωμα για χημικές αναλύσεις καθώς η χημική του σύσταση

εξαρτάται από την βοτανική προέλευση του νέκταρ που χρησιμοποιούν κάθε φορά οι μέλισσες²⁴⁵. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες αναφορές στις οποίες να μελετάται η επίδραση μήτρας μελιού διαφορετικής βοτανικής προέλευσης (matrix effect), στην χημική ανάλυση των καταλοίπων. Οι Jimenez et al.²⁴⁶ παρατήρησαν ότι η χρωματογραφική ανάλυση δειγμάτων μελιού, διαφορετικής βοτανικής προέλευσης, παρουσίασε σημαντικές διαφορές στον χρωματογραφικό θόρυβο αλλά και στην ένταση των κορυφών που αντιστοιχούσαν στους προσδιοριζόμενους αναλύτες. Επιπλέον, σε άλλη μελέτη²⁴⁷, έχει αναφερθεί ότι η διαφορετική προέλευση δειγμάτων μελιού μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο το ποσοστό εκχύλισης διαφόρων παρασιτοκτόνων αλλά και την απόκριση των καταλοίπων αυτών στον ανιχνευτή.

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε η τεχνική της σταθερής προσθήκης (standard addition) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων μελιού, προκειμένου να αποφευχθούν οι επιδράσεις μήτρας. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για κάθε αναλύτη χωριστά αλλά και για κάθε αναλύτη όταν αυτός βρισκόταν μέσα σε μίγμα με τους υπόλοιπους δύο αναλύτες. Τα εμβολιασμένα δείγματα χωρίζονταν σε τέσσερις ίσες ποσότητες και στην κάθε ποσότητα εφαρμόστηκε η τεχνική της σταθερής προσθήκης. Για κάθε αναλύτη κατασκευάστηκαν καμπύλες συσχέτισης των αποκρίσεων στον αεριοχρωματογράφο σε συνδυασμό με τον όγκο της προστιθέμενης ποσότητας πρότυπης ουσίας, V_{s_0} , με την οποία εφαρμόζεται η τεχνική της σταθερής προσθήκης. Τα ποσοστά ανάκτησης κυμάνθηκαν από 72.8% έως 104.3% και για τους τρεις αναλύτες (Πίνακας 7.4). Τα δείγματα τα οποία είχαν εμβολιαστεί με μεμονομένους αναλύτες εμφάνισαν παρόμοια ποσοστά ανάκτησης με τα δείγματα τα οποία περιείχαν μίγμα των τριών αναλυτών σε συγκρίσιμες συγκεντρώσεις. Η ακρίβεια, μετρημένη σε ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης, υπολογίστηκε από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της ίδιας μέρας και διαφορετικών ημερών. Σε κάθε περίπτωση τα ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSDs) ήταν μικρότερα από 6.3% (πίνακας 7.4). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με άλλες μελέτες στις οποίες οι αναλύτες προσδιορίζονται με την τεχνική της εκδίωξης και παγίδευσης¹⁸⁸.

Τα όρια ανίχνευσης (Limits of Detection- LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification-LOQ) προσδιορίστηκαν μέσω της ανάλυσης εμβολιασμένων δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης και συγκεκριμένα εμβολιασμένων δειγμάτων με επίπεδα αναλυτών που δίνουν λόγο σήματος προς θόρυβο 3 και 10 αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης και για τους τρεις προσδιοριζόμενους αναλύτες κυμάνθηκαν από 1 έως 5 ng l^{-1} (Πίνακας 7.5). Ελάχιστα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης επιτεύχθηκαν με την τεχνική της εκδίωξης και παγίδευσης¹⁸⁸. Ωστόσο, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν με την τεχνική HS-SPME, καθιστούν την προτεινόμενη μέθοδο κατάλληλη για την ανίχνευση αυτών των καταλοίπων στο μέλι.

Η εφαρμοσιμότητα της προτεινόμενης μεθόδου μελετήθηκε σε πραγματικά δείγματα μελιού προερχόμενα από επίσημη δειγματοληψία του Γενικού Χημείου του Κράτους. Για την αποφυγή επιμολύνσεων, στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν καινούργια φιαλίδια και καινούργιοι μαγνήτες ανάδευσης. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για συγκριτικούς σκοπούς, για αυτό και αναλύθηκαν και από το Γενικό Χημείο του Κράτους με την τεχνική της απόσταξης μεθ' υδρατμών και αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας. Από τα πραγματικά δείγματα που αναλύθηκαν δύο βρέθηκαν επιμολυσμένα με *p*-DCB σε συγκεντρώσεις 11 gkg^{-1} (3.5% R.S.D.) και 42 gkg^{-1} (4.1% R.S.D.). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με τις μετρήσεις που πραγματοποίησε το Γενικό Χημείο του κράτους γεγονός που φανερώνει την επιτυχημένη εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου στην ανάλυση των *p*-DCB, ναφθαλένιο και 1,2-DBE. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός των υπολειμάτων *p*-DCB, ναφθαλένιο και 1,2-DBE στο μέλι, με τον συνδυασμό της τεχνικής HS-SPME και της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (GC-MS) παρουσιάζεται για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία.

Κεφάλαιο 12: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS)

12.1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια, οι τοξίνες που παράγονται από τα κυανοβακτήρια στις λίμνες (κυανοτοξίνες), έχουν αναγνωριστεί ως ένας σοβαρός κίνδυνος για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα όταν τα νερά των λιμνών προορίζονται για επεξεργασία και διανομή ως πόσιμα⁷³. Τα κυανοβακτήρια παράγουν ένα μεγάλο αριθμό τοξινών, που ανήκουν σε διαφορετικά χημικά είδη. Οι τοξίνες αυτές είναι εξαιρετικά τοξικές (νευροτοξικές, ηπατοτοξικές) για τον άνθρωπο. Για τον λόγο αυτό, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχει σχετικά πρόσφατα θεσπίσει όριο 1 μg/L για μία από τις τοξίνες (μικροκυστίνη LR), ενώ αναμένεται ότι σύντομα θα θεσπιστούν όρια για περισσότερες κυανοτοξίνες. Στην εποχή μας γίνονται διάφορες έρευνες, ανά τον κόσμο που αφορούν συστήματα παρακολούθησης και ελέγχου της παρουσίας των κυανοτοξινών σε υδάτινους ταμιευτήρες και σε διάφορα στάδια επεξεργασίας του νερού, όταν προορίζεται για πόση. Ειδικότερα, στην Ελλάδα, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις ανάπτυξης κυανοβακτηρίων σε πολλές λίμνες στην Ελλάδα, συμπεριλαμβανομένου του Μαραθώνα¹⁹³.

Λόγω της επικινδυνότητας των κυανοτοξινών για την δημόσια υγεία και λόγω της παρουσίας τους σε επιφανειακά ύδατα που ενδέχεται να προορίζονται για πόση, προέκυψε η ανάγκη για την ανάπτυξη αξιόπιστων αλλά και ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων, που να έχουν τη δυνατότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησής τους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (ανώτατο επιτρεπτό όριο μικροκυστίνης LR στο πόσιμο νερό : 1μg/L). Η δυνατότητα αυτή μπορεί να επιτευχθεί με την συμβολή προηγμένων τεχνολογιών, όπως είναι η σύζευξη του υγρού χρωματογράφου με φασματογράφο μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν σχετικά λίγες δημοσιευμένες εργασίες για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αυτών των ενώσεων με την τεχνική LC-MS/MS.¹⁹⁴⁻¹⁹⁸

Αντιθέτως, υπάρχουν αρκετές μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους (HPLC-UV), και ανοσοενζυμικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό κυρίως της μικροκυστίνης LR, μετά από απομόνωση με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Η εμπορική διαθεσιμότητα αλλά και η διακίνηση άλλων μικροκυστινών και κυανοτοξινών ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα, για αυτό το λόγο υπάρχει στις μέρες μας μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό τους με σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές .

Στην συγκεκριμένη εργασία αναπτύχθηκε μια αξιόπιστη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) για τον προσδιορισμό 5 κυανοτοξινών (μικροκυστίνη LR, RR, YR, LA και νοντουλαρίνη) και διεξήχθη έρευνα για την παρουσία κυανοτοξινών στα επιφανειακά ύδατα και στο πόσιμο νερό της Αθήνας.

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των 5 κυανοτοξινών, με βάση το σύστημα MS/MS επετεύχθη μετά από τη βελτιστοποίηση μιας σειράς παραμέτρων που είχαν ως στόχο την μεγιστοποίηση του καταγραφόμενου σήματος. Πρωταρχικό ρόλο στην όλη αυτή διεργασία έπαιξε η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electron Spray Ionization, ESI).

Για κάθε κυανοτοξίνη διερευνήθηκαν τα πιθανά θραύσματα των μητρικών ιόντων και προτάθηκαν οι μηχανισμοί παραγωγής των θυγατρικών ιόντων που επιλέχθηκαν για ποσοτικό προσδιορισμό. Στη μικροκυστίνη RR, μικροκυστίνη LR και νοντουλαρίνη, επιλέχθηκε η παρακολούθηση ενός θυγατρικού ιόντος, για ποσοτικό προσδιορισμό, συγκεκριμένα θραύσμα της περιοχής της αλυσίδας Adda, λόγω της υψηλής έντασης με την οποία ανιχνευόταν το θυγατρικό αυτό ιόν. Στη μικροκυστίνη LA και μικροκυστίνη YR επιλέχθηκε η παρακολούθηση 2 θυγατρικών ιόντων (για ποσοτικό προσδιορισμό) προκειμένου να επιτευχθεί αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου για τις τοξίνες αυτές (η παρακολούθηση ενός μόνο θυγατρικού ιόντος έδινε χαμηλές εντάσεις σήματος). Η ταυτοποίηση όλων των κυανοτοξινών που αναλύθηκαν πραγματοποιήθηκε με την παρακολούθηση δύο θυγατρικών ιόντων για κάθε μοριακή μάζα σύμφωνα με την οδηγία 2002/657 της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε η δημιουργία ιόντος προσθήκης της μικροκυστίνης LA με νάτριο και προτάθηκε ένας μηχανισμός δημιουργίας θυγατρικών ιόντων.

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά που να αναφέρεται στην ανάπτυξη ευαίσθητης μεθόδου (όριο ανίχνευσης μικρότερο του ppt (sub ppt level)), για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των 5 κυανοτοξινών μικροκυστίνη LR, RR, YR, LA, και νοντουλαρίνης, σε πόσιμο και επιφανειακό νερό, με την προηγμένη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Επίσης, δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά στην οποία να προτείνονται μηχανισμοί θραυσματοποίησης της νοντουλαρίνης και του ιόντος προσθήκης με νάτριο της μικροκυστίνης LA.

Η ανάπτυξη της προτεινόμενης μεθόδου προσδιορισμού κυανοτοξινών έγινε με σκοπό την διενέργεια έρευνας για την παρουσία αυτών των τοξινών στα επιφανειακά ύδατα και στο πόσιμο νερό της Αθήνας. Από όλα όσα αναφέρθηκαν στο θεωρητικό μέρος αυτής της εργασίας (Κεφάλαιο 1.4) γίνεται φανερό το πρόβλημα της παρουσίας κυανοτοξινών σε πόσιμα και επιφανειακά ύδατα ανά τον κόσμο. Το θέμα αυτό έχει πολύ μεγάλη σημασία για

την Αθήνα, δεδομένου ότι στο παρελθόν έχει παρουσιαστεί ανάπτυξη κυανοβακτηρίων σε ταμειυτήρες της ΕΥΔΑΠ (κυρίως στον Μαραθώνα). Παρόλα αυτά ποτέ δεν έχει διεξαχθεί έρευνα στην Αθήνα, ή γενικότερα στην Ελλάδα, που να αφορά την παρουσία μικροκυστινών σε πόσιμα ή επιφανειακά ύδατα.

12.2. Απομόνωση και προσυγκέντρωση των κυανοτοξινών

Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ο άμεσος προσδιορισμός των κυανοτοξινών στο νερό δεν είναι δυνατός και απαιτείται η προσυγκέντρωσή τους με κατάλληλη μέθοδο εκχύλισης. Η προσυγκέντρωση με κλασικές μεθόδους, όπως π.χ. συμπύκνωση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) είναι δυνατή για τις μικροκυστίνες, αφού τα πεπτιδικά αυτά μόρια είναι ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες. Παρ' όλα αυτά, η τεχνική αυτή είναι πολύ χρονοβόρος και μη πρακτική, λόγω της μεγάλης προσυγκέντρωσης που απαιτείται για τον προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων τοξινών.

Οι μικροκυστίνες και η νοντουλαρίνη μπορούν να προσυγκεντρωθούν με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction – SPE), συνήθως μέσω φυσίγγιων πληρωμένων με C18 silica. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν πολυμερικά υλικά, όπως το OASIS HLB. Το δείγμα περνά από το φυσίγγιο το οποίο κατακρατεί τις τοξίνες μέσω προσρόφησης. Οι τοξίνες ακολούθως εκλούνται από τα φυσίγγια με κατάλληλους διαλύτες. Στη συνέχεια, ο όγκος των εκχυλισμάτων αυτών μειώνεται με εξάτμιση και έτσι επιτυγχάνεται η προσυγκέντρωση των τοξινών στο εκχύλισμα σε σχέση με το αρχικό δείγμα νερού.

Η πολικότητα και η ιοντική μορφή διαφόρων κυανοτοξινών, επηρεάζουν την ικανότητα εκχύλισής τους μέσω SPE. Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες αφορούν την απόδοση της εκχύλισης της μικροκυστίνης LR.²⁴⁸⁻²⁵⁶ Σημειώνεται ότι τα φυσίγγια που χρησιμοποιούνται στην SPE τεχνική κατακρατούν και άλλες οργανικές ουσίες που υπάρχουν στο νερό, οι οποίες επίσης προσυγκεντρώνονται στο τελικό εκχύλισμα. Οι ουσίες αυτές μπορούν να δράσουν παρεμποδιστικά στο χρωματογραφικό διαχωρισμό, παρεμβαλλόμενες στις κορυφές των τοξινών. Μία λύση στο πρόβλημα αυτό έχει δοθεί με τις στήλες ανοσοσυνάφειας, πληρωμένες με αντισώματα για κυανοτοξίνες, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση στην κατακράτηση μικροκυστινών.²⁵⁷⁻²⁶⁰

Έχει διαπιστωθεί ότι τα διάφορα εμπορικά διαθέσιμα φυσίγγια C18 δεν έχουν την ίδια απόδοση στην εκχύλιση των κυανοτοξινών.^{249,261} Για παράδειγμα, η μικροκυστίνη-RR ανακτάται ποσοτικά μόνο από φυσίγγια πληρωμένα με υλικό C18 με επικαλυμμένες (encapped) σιλανο-ομάδες. Το πρόβλημα φαίνεται ότι οφείλεται στο στάδιο της έκλουσης, παρά στο στάδιο της εκχύλισης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται στην έκλουση μίγματα

μεθανόλης-νερού, συνήθως οξυνισμένα.²⁵⁴ Το pH επίσης επηρεάζει την ανάκτηση των κυανοτοξινών και τα δείγματα θα πρέπει να έχουν pH 4-8.²⁵⁴

Εναλλακτικά, αντί των φυσιγγίων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δίσκοι SPE για την εκχύλιση και προσυγκέντρωση των μικροκυστινών,²⁶² αλλά δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, ειδικότερα για τις περισσότερο υδρόφοβες μικροκυστίνες. Οι ανακτήσεις των μικροκυστινών είναι σχετικά μικρές όταν χρησιμοποιούνται δίσκοι C18, αλλά βελτιώνονται με χρήση δίσκων πολυμερούς στυρενίου-διβινυλοβενζολίου. Έχουν δοκιμαστεί και άλλα υλικά εκτός από τα προαναφερόμενα (π.χ. cyano – φυσίγγια²⁶³), αλλά δεν έχουν αξιολογηθεί εκτενώς.

Τελευταία, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές προσυγκέντρωσης αυτοματοποιημένες (on-line) για τον προσδιορισμό των διαλυμένων στο νερό τοξινών.^{253,264} Οι τεχνικές αυτές είναι χρήσιμες όταν υπάρχει εξαιρετικά μεγάλος αριθμός δειγμάτων προς ανάλυση σε ρουτίνα.

Το πρότυπο ISO 20179:2005 «Ποιότητα νερού: προσδιορισμός των μικροκυστινών με τη χρήση της εκχύλισης στερεάς φάσης και υγρό χρωματογράφο με ανιχνευτή υπεριώδους φωτός» (Water quality: determination of microcystins-Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection), περιγράφει μία διαδικασία εκχύλισης των μικροκυστινών από το νερό με χρήση φυσιγγίων SPE με υλικό πλήρωσης το C-18. Στη βιβλιογραφία έχουν προταθεί αρκετές βελτιώσεις της μεθόδου που σκοπό έχουν τη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών της μεθόδου και τη μείωση του χρόνου ανάλυσης.^{201,265}

Σε ότι αφορά τα φυσίγγια Oasis HLB, υπάρχουν 4 δημοσιευμένες μέθοδοι, που αναφέρονται στον προσδιορισμό Μικροκυστινών σε δείγματα νερών. Οι Lisa Spoor et al.,²⁶⁶ ανέλυσαν 93 δείγματα νερών με στόχο την ποιοτική ανίχνευση μικροκυστινών. Δεν προτείνουν μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού με χρήση των φυσιγγίων Oasis HLB ούτε και διενεργούν πειράματα ανάκτησης ή επικύρωσης μέσω των φυσιγγίων αυτών. Παρομοίως, οι Rocio Aranda-Rodriguez et al.,²⁶⁷ ανέλυσαν επιφανειακά δείγματα νερών με στήλες Oasis και στήλες ανοσοσυνάφειας (immunoaffinity columns) και συγκρίνουν τις στήλες αυτές, ως προς τον αριθμό των μικροκυστινών που κατακρατούνται από άγνωστα δείγματα. Ούτε και σε αυτή την εργασία προτείνεται μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού με στήλες Oasis HLB. Οι Jing Wang et al.,²⁶⁸ αναπτύσσουν και επικυρώνουν μέθοδο προσδιορισμού των μικροκυστινών LR, RR, LW, LF, σε επιφανειακά νερά με την χρήση των φυσιγγίων Oasis HLB (UPLC-MS/MS μέθοδος). Τέλος οι Liming Conga et al.²⁶⁹, αναπτύσσουν και επικυρώνουν μέθοδο προσδιορισμού των μικροκυστινών LR, RR, LW, LF σε επιφανειακά νερά με στήλες Oasis HLB (LC-MS/MS μέθοδος) με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονταν από 0.04 έως 2.0 µg/L.

Στην παρούσα εργασία για την απομόνωση των κυανοτοξινών από υδατικά δείγματα εφαρμόστηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) μέσω φυσιγγίων που φέρουν την εμπορική ονομασία *Oasis HLB*. Το υλικό πλήρωσης στις στήλες Oasis HLB (

Hydrophilic-Lipophilic Balance), σύμφωνα με τον κατασκευαστή, είναι ένα συμπολυμερές με μοναδική ισορροπία μεταξύ των υδρόφιλων και λιπόφιλων μονομερών του. Το αποτέλεσμα είναι να επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις και αναπαραγωγήσιμα αποτελέσματα για όξινα, βασικά και ουδέτερα συστατικά, ακόμη και αν η μικροστήλη ξεραθεί. Επίσης, επιτρέπει την χρήση pH σε όλο το εύρος από 1-14 και μεγάλη ποικιλία οργανικών διαλυτών. Αυτά τα χαρακτηριστικά δίνουν συγκριτικά πλεονεκτήματα στα συγκεκριμένα φυσίγγια σε σχέση με άλλα όπως: C-18 ή Disk-type, τα οποία επιλέγονται στην περίπτωση μάλλον άπολων μέχρι μέτριας πολικότητας αναλυτών.

Για την ενεργοποίηση των στηλών Oasis HLB προτιμήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τον κατασκευαστή στην περίπτωση των πολικών ουσιών, δηλαδή έκπλυση με 4ml μεθανόλης και 4ml νερού, με ροή 5 ml/min. Στη συνέχεια το δείγμα προσυγκεντρώθηκε στο φυσίγγιο με ροή 10 ml/min (διακριτές σταγόνες) ενώ η έκπλυση πραγματοποιήθηκε με 4 ml διαλύματος μεθανόλης/νερού 20:80 (ροή 10 ml/min). Τα φυσίγγια στεγνώσαν, με διαβίβαση αέρα για 15 min ενώ προτιμήθηκε η έκλυση να γίνει με 100% μεθανόλη, αφού οι κυανοτοξίνες διαλύονται εύκολα στο συγκεκριμένο διαλύτη. Στη συνέχεια τα δείγματα εξατμίζονταν στους 40 °C και το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύονταν σε διαλύτη μεθανόλη/νερό 20/80 v/v και όχι καθαρή μεθανόλη. Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι η ένεση 20 μl δείγματος με διαλύτη 100% μεθανόλη, είχε από μόνη της εκκλουστική δύναμη και οι αναλύτες δεν κατακρατούνταν αποτελεσματικά σε χρωματογραφικές στήλες μικρού μήκους (μικρότερες των 5cm). Σε ότι αφορά την επίδραση της ταχύτητας ροής του δείγματος των κυανοτοξινών μέσα από τα φυσίγγια Oasis HLB, την επίδραση του όγκου έκλυσης κυανοτοξινών από τα φυσίγγια καθώς επίσης και την επίδραση της θερμοκρασίας εξάτμισης στο ποσοστό ανάκτησης των κυανοτοξινών πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανθεκτικότητας της μεθόδου (Κεφ.8.1.12) γι' αυτό και επιλέχθηκαν οι προαναφερόμενες τιμές. Πριν την διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης, στα πόσιμα δείγματα νερού προστέθηκαν 5mg θειοθειϊκού νατρίου για την εξουδετέρωση του υπολειμματικού χλωρίου, ενώ στα επιφανειακά δείγματα ρυθμίζονταν το pH στην περιοχή 5-8 με NH₄OH ή HCOOH, προκειμένου να εξουδετερωθεί το φορτίο των κυανοτοξινών και άρα να κατακρατηθούν αποτελεσματικότερα από το υλικό πλήρωσης των μικροστηλών.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί σε αυτό το σημείο ότι δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά που να προτείνει μέθοδο εκχύλισης των 5 κυανοτοξινών μικροκυστίνη LR, RR, YR, LA και νοντουλαρίνης, σε επιφανειακά και πόσιμα ύδατα, με τα φυσίγγια Oasis HLB, τα οποία παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα παραδοσιακά φυσίγγια, που έχουν ως πληρωτικό υλικό C₁₈.

12.3. Επιλογή στήλης και εκλουστικού συστήματος

Η επιλογή του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος και της κατάλληλης στήλης του υγρού χρωματογράφου, έχουν μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής μεθόδου, αφού πρωταρχικός στόχος είναι η επίτευξη όσο το δυνατόν καλύτερου διαχωρισμού των ενώσεων. Στη φασματομετρία μαζών, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός δεν έχει πολύ μεγάλη σημασία, αφού και στην περίπτωση που συνεκλούνται δύο ή περισσότερες ουσίες μπορούν να διαχωριστούν οι μάζες τους και άρα να ταυτοποιηθούν. Ωστόσο, αν το σύστημα LC-MS/MS ρυθμιστεί έτσι ώστε να ανιχνεύει μία μόνο μοριακή μάζα σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα αυξάνεται η ευαισθησία του.

Στην παρούσα εργασία, δοκιμάστηκαν διάφορες στήλες υγρής χρωματογραφίας καθώς και διάφορα εκλουστικά συστήματα, προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των 5 κυανοτοξινών. Χαρακτηριστικά δοκιμάστηκαν οι στήλες:

Waters Spherisorb (250 x 4.6mm, υλικό πλήρωσεως 5 μ m), Merck Lichospher (250 x 4mm, υλικό πλήρωσεως 5 μ m), Thermo Hypersil gold (100 x 2.1mm, υλικό πλήρωσεως 3 μ m), Zorbax SB-C18 (30 x 2.1 mm, υλικό πλήρωσεως 1.8 μ m), Restek C-18 (30 x 2.1mm, υλικό πλήρωσεως 3 μ m) (Κεφάλαιο 8.1.2).

Με καμία από τις παραπάνω προσπάθειες δεν επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των Μικροκυστινών YR και LR. Οι υπόλοιπες κυανοτοξίνες ωστόσο διαχωρίζονταν πλήρως. Επόμενο βήμα ήταν η δοκιμή χρωματογραφικής στήλης με μέγεθος σωματιδίων μικρότερο των 3 μικρομέτρων, μικρότερο μήκος και μικρή σχετικά διάμετρο, προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός στην μικρή ροή των 0.2 ml/min, η οποία είναι επιθυμητή για το σύστημα MS/MS με την τεχνική ESI. Έτσι, δοκιμάστηκε η στήλη Zorbax 2.1 x 30mm, SB-C18 με την οποία επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που ξεκινούσε από 30:70 και κατέληγε σε 70:30 νερό / ακετονιτρίλιο παρουσία 0.1% φορμικού οξέος. Τα αρχικά πειράματα έδωσαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, ωστόσο η διαχωριστική ικανότητα της στήλης χάθηκε σχετικά γρήγορα, σε ένα σύνολο 30 ενέσεων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο μικρό μέγεθος των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού, τα οποία έχασαν γρήγορα την διαχωριστική τους ικανότητα.

Στην συνέχεια αναζητήθηκε στήλη με τα ίδια τεχνικά χαρακτηριστικά αλλά με μεγαλύτερη διάμετρο σωματιδίων του υλικού πλήρωσης. Επιλέχθηκε η στήλη :HPLC C-18, 30mm x 2.1mm, υλικό πλήρωσεως 3 μ m της Restek. Πλήρης διαχωρισμός επιτεύχθηκε με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης, το οποίο ξεκινούσε από 75:25 νερό / ακετονιτρίλιο και κατέληγε σε 10:90 νερό / ακετονιτρίλιο. Η περιεκτικότητα σε μυρμηγκικό οξύ αυξήθηκε και τελικά διατηρήθηκε σε 0.5% και στις δύο φάσεις: υδατική και οργανική (Πίνακας 5.4). Η παρουσία μεγαλύτερης συγκέντρωσης υδρογονοκατιόντων προκάλεσε αύξηση του σήματος των μοριακών ιόντων. Μεγαλύτερη συγκέντρωση φορμικού οξέος δεν προκάλεσε σημαντική

αύξηση ενώ θα μπορούσε να προκαλέσει την καταστροφή της χρωματογραφικής στήλης σε συντομότερο χρονικό διάστημα.

Η θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης ορίστηκε στους 30 °C, λίγο ψηλότερα από την θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C), προκειμένου να επιτευχθεί μικρότερος χρόνος έκλουσης των 5 κυανοτοξινών.

Ο όγκος της ένεσης ορίστηκε στα 20 μl διαλύματος. Αυτός ήταν ο μέγιστος όγκος ένεσης που θα μπορούσε να επιλεγεί δεδομένου της μικρής χωρητικότητας της χρωματογραφικής στήλης. Μικρότερος όγκος ένεσης θα μπορούσε ωστόσο να επιμηκύνει το χρονικό διάστημα χρήσης της στήλης αλλά η προτεινόμενη μέθοδος θα ήταν λιγότερο ευαίσθητη.

12.4. Προσδιορισμός Κυανοτοξινών στο φασματογράφο μάζας

Η φασματομετρία μάζας ως μέθοδος ανίχνευσης μετά από το χρωματογραφικό διαχωρισμό παρέχει την πιο αξιόπιστη λύση για την ταυτοποίηση των μικροκυστινών, καθώς οι μικροκυστίνες παράγουν χαρακτηριστικά ιόντα στα φάσματα μάζας τους.^{103,270-275} Συστήματα LC/MS με διάφορες διατάξεις ανίχνευσης έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για το σκοπό αυτό.^{254,271,272,276-281} Χρησιμοποιώντας δείγμα 5L και ανίχνευση με MS, οι *Tsuji et al.*²⁵⁴ πέτυχαν ένα όριο ανίχνευσης 0.02 μg/L για μεμονωμένες μικροκυστίνες.

Οι μικροκυστίνες ταυτοποιούνται βάσει του φάσματος μάζας τους, εφ' όσον είναι δυνατό να ληφθεί και ένα φάσμα μάζας της πρότυπης ουσίας. Μία βελτίωση της τεχνικής MS αποτελεί η προηγμένη τεχνική MS/MS, όπου τα αρχικώς σχηματιζόμενα ιόντα θραυσματοποιούνται και τα θραύσματα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μικροκυστινών.^{272-275,277} Οι πρότυπες ουσίες είναι και πάλι απαραίτητες, τόσο για την ταυτοποίηση όσο και για την ποσοτικοποίηση των μικροκυστινών.

Για την ανάλυση των μικροκυστινών, ο υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC) συνδέεται με το φασματογράφο μάζας μέσω μιας διάταξης ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI).²⁶⁶ Η ταυτοποίηση των μικροκυστινών στο σύστημα LC-ESI-MS στηρίζεται στους χρόνους κατακράτησης όπως προκύπτουν από την υγρή χρωματογραφία ανάστροφης ροής και στους λόγους m/z των αρχικών ιόντων (τεχνική MS) ή/και των θραυσμάτων (τεχνική MS/MS). Το πιο κοινό θραύσμα των μικροκυστινών προκύπτει από τη διάσπαση του αμινοξέος ADDA. Το προκύπτον ιόν ανιχνεύεται σε m/z 135.2¹⁹⁸.

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες και σχετικά πρόσφατες δημοσιευμένες μέθοδοι, στις οποίες να προτείνεται μέθοδος προσδιορισμού κυανοτοξινών, σε νερά, με την τεχνική

MS/MS. Οι Liming Conga et al.²⁶⁹, ανέπτυξαν και επικύρωσαν μέθοδο προσδιορισμού των μικροκυστινών LR, RR, LW, LF σε επιφανειακά νερά με LC-MS/MS, μέθοδο με όρια ανίχνευσης που κυμαίνονταν από 0.04 έως 2.0 µg/L και εύρος γραμμικότητας 0.5-300µg/L για όλες τις μικροκυστίνες, ενώ δεν προσδιορίζονται η μικροκυστίνη-LA και η νοντουλαρίνη. Οι Lifeng Zhang et al.,²⁸² πρωτύτερα, είχαν προτείνει μέθοδο προσδιορισμού της μικροκυστίνης LR και πιθανούς μηχανισμούς θραυσματοποίησης με την τεχνική MS/MS. Οι Sara Bogialli et al.¹⁹⁵, αναφέρουν ως όριο ποσοτικοποίησης για 5 μικροκυστίνες (RR, YR, LR, LA, LW) LOQ=2-9 ng/L με LC-MS/MS μέθοδο σε επιφανειακά νερά, ενώ η προτεινόμενη μέθοδος δεν εμφανίζει χρωματογραφικό διαχωρισμό και δεν προσδιορίζεται η νοντουλαρίνη. Οι Jing Wang et al.²⁶⁸, αναφέρουν όριο ανίχνευσης για 4 μικροκυστίνες (LR, RR, LW, LF) LOD 1,3-6 ng/L με UPLC-MS/MS μέθοδο σε επιφανειακά νερά. Επίσης, δεν προτείνεται μέθοδος προσδιορισμού της νοντουλαρίνης και της μικροκυστίνης LA. Οι Lisa Sproof et al.,²⁶⁶ ανέλυσαν 93 δείγματα νερών με στόχο την ποιοτική ανίχνευση μικροκυστινών. Δεν προτείνουν μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού μικροκυστινών, με χρήση LC-MS/MS, ούτε προτείνουν μηχανισμούς θραυσματοποίησης. Σε άρθρο ανασκόπησης του 2005 αναφέρονται MS/MS μέθοδοι προσδιορισμού και μηχανισμοί θραυσματοποίησης μόνο των μικροκυστινών LR, YR, RR²⁸³. Οι J. Pietsch et al.¹⁹⁶, προτείνουν μέθοδο προσδιορισμού των 5 κυανοτοξινών μικροκυστίνη LR, RR, YR, LA και νοντουλαρίνης, μόνο σε επιφανειακά νερά. Η μέθοδος δεν προτείνει χρωματογραφικό διαχωρισμό των κυανοτοξινών και επιπλέον δεν αναφέρεται σε μηχανισμούς θραυσματοποίησης. Οι Moucun Yuan et al.¹⁹⁸, αναφέρονται αναλυτικά σε μηχανισμούς θραυσματοποίησης των μικροκυστινών LR, LA YR, RR, αλλά δεν προτείνουν μέθοδο προσδιορισμού των προαναφερθέντων αναλυτών σε πραγματικά δείγματα νερών, ούτε προτείνουν χρωματογραφικό διαχωρισμό. Η μοναδική βιβλιογραφική αναφορά προσδιορισμού των 5 κυανοτοξινών (μικροκυστίνη LR, RR, YR, LA και νοντουλαρίνης), σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, προτείνεται από τους Orla Allis et al.²⁸⁴ Ωστόσο, στην μέθοδο αυτή δεν αναφέρονται μηχανισμοί θραυσματοποίησης των προσδιοριζόμενων κυανοτοξινών με την τεχνική MS/MS. Επίσης στην αναφορά αυτή, επιτυγχάνονται υψηλά όρια ανίχνευσης (0.27 µg/L), γιατί δεν προτείνεται μέθοδος προσυγκέντρωσης των κυανοτοξινών με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης.

Από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, για τις LC-MS/MS μεθόδους προσδιορισμού των μικροκυστινών LR, RR, YR, LA και νοντουλαρίνης, σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, προκύπτει ότι δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά στην οποία να επιτυγχάνονται όρια ανίχνευσης της τάξης των pg/L με την τεχνική αυτή. Επίσης δεν αναφέρεται σε καμία βιβλιογραφική αναφορά μηχανισμός θραυσματοποίησης της νοντουλαρίνης και του ιόντος προσθήκης με νάτριο της μικροκυστίνης LA, με την τεχνική MS/MS.

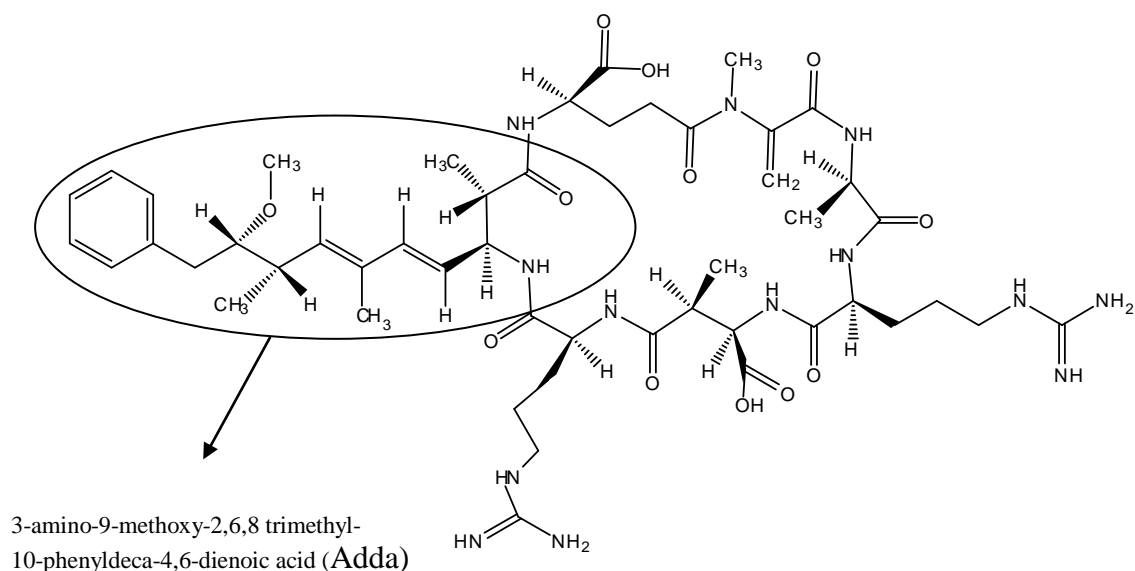
Στην παρούσα μελέτη, για την κάθε κυανοτοξίνη καταγράφηκαν και επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες που αφορούν την πηγή ιοντισμού και την διαδικασία θραυσματοποίησης.

Όλες οι παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν με πειράματα απευθείας έκχυσης (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά καθώς και με πειράματα έκχυσης προτύπου διαλύματος μίγματος κυανοτοξινών ίδιας σύστασης, μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections), παρουσία κινητής φάσης. Τα πειράματα έκχυσης του μίγματος των προτύπων κυανοτοξινών πραγματοποιήθηκαν με σύσταση κινητής φάσης 50/50 ακετονιτριλίου/νερού (v/v) παρουσία 0.5% φορμικού οξέος και στις δύο φάσεις (υδατική και οργανική).

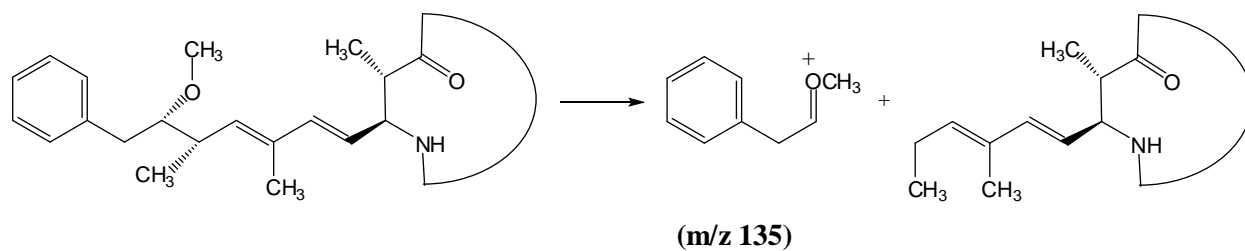
12.4.1. Προσδιορισμός της μικροκυστίνης RR

Στο φάσμα μάζας της μικροκυστίνης RR (Σχήμα 8.1) παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται, με μεγάλη ένταση (7.39×10^6), το διπλά φορτισμένο μοριακό ιόν $[M+2H]^{+2} \rightarrow 519.8$ [$(m+2H)/2=1039/2$]. Οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα μάζας της μικροκυστίνης RR, οφείλονται πιθανότατα σε προσμίξεις του προτύπου της ή του διαλύτη.

Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την μικροκυστίνη RR (η δομή της οποίας δίνεται στο Σχήμα 12.1) όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έκχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάστηκε στο Σχήμα 8.2. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα ιόντα με λόγο m/z 103, 127, 135, 212.9. Το θραύσμα $m/z=135$ αντιστοιχεί σε θραύσμα της πλευρικής αλυσίδας Adda μετά από την αντίδραση σχάσης του δεσμού C₈-C₉ του Adda (Σχήμα 12.1). Η θραύση της πλευρικής αλυσίδας Adda ακολουθεί τον μηχανισμό θραύσης που περιγράφεται στο Σχήμα 12.2.

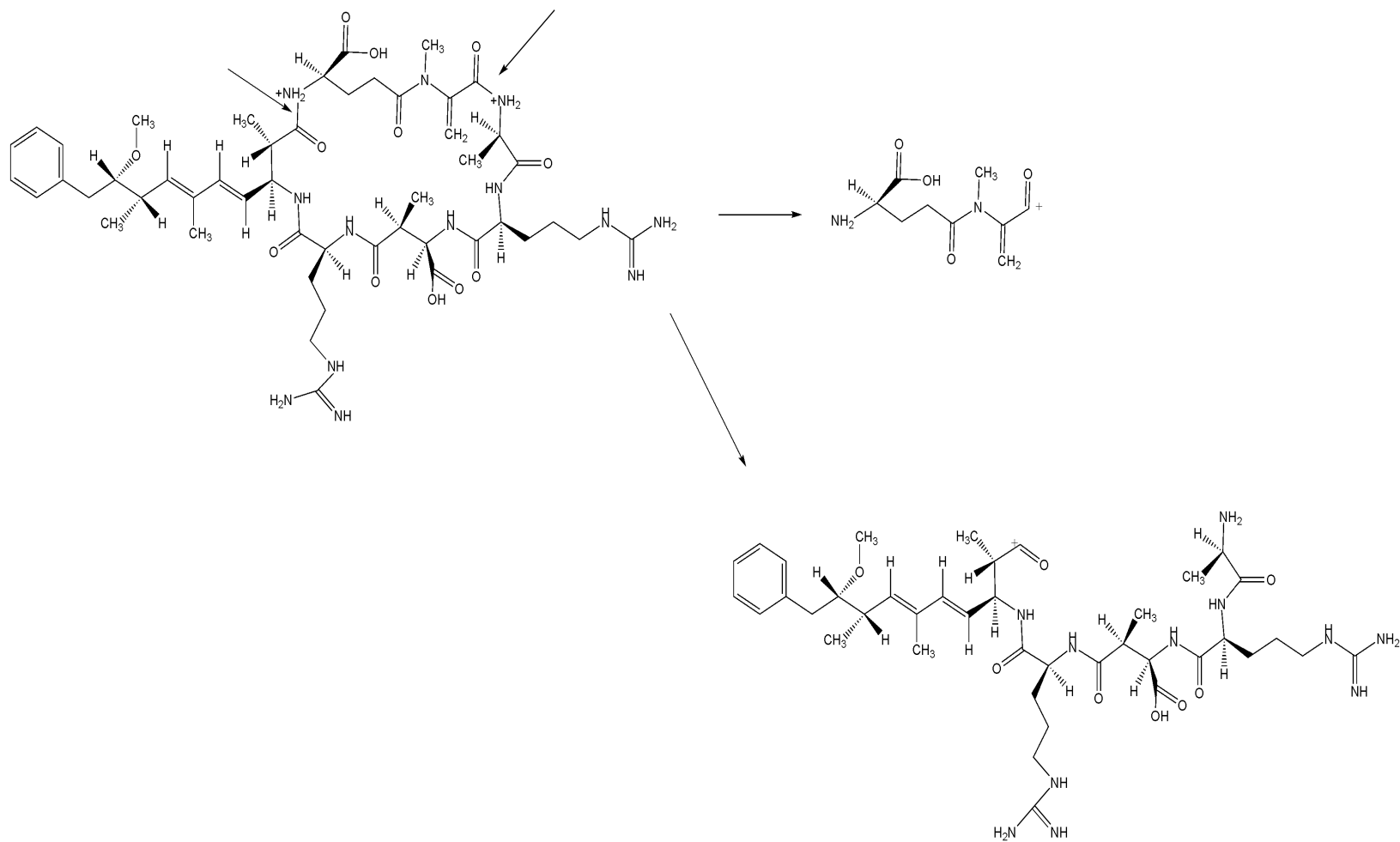


Σχήμα 12.1. Στεreoχημικός τύπος της μικροκυστίνης RR, όπου επισημαίνεται η αλυσίδα Adda (στον κύκλο) με την κατά IUPAC ονομασία.



Σχήμα 12.2. Σχάση των δεσμών C₈-C₉ των μικροκυστινών,¹⁹⁸ όπου απεικονίζεται το ιόν m/z 135.

Στην καμπύλη θραυσματοποίησης παρατηρήθηκε επίσης το θυγατρικό ιόν m/z=213 (Σχήμα 8.2). Στο Σχήμα 12.3 προτείνεται ο μηχανισμός θραυσματοποίησης της μικροκυστίνης RR στις άκρες του D-γλουταμινικού οξέος (D-glutaminic acid) και της N-μεθυλοδεϋδροαλανίνης (N-Methyldehydroalanine).²⁷³



Σχήμα 12.3. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού θραύσης της μικροκυστίνης RR και παραγωγή του θραύσματος m/z 213²⁷³.

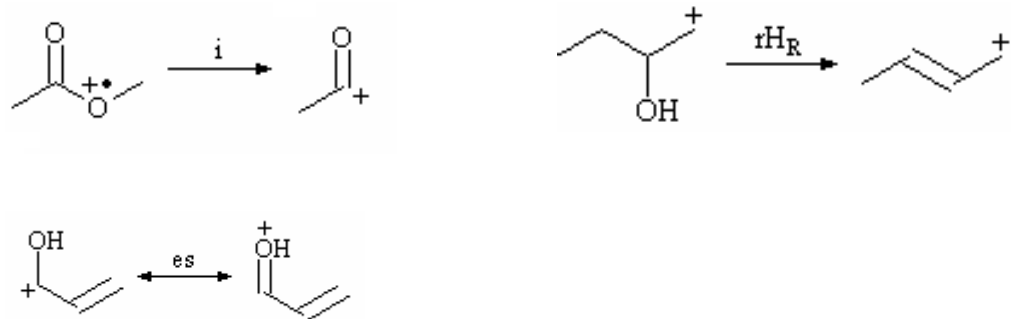
Η ταυτοποίηση της μικροκυστίνης RR βασίστηκε στην ανίχνευση του μοριακού ιόντος $[M+2H]^{+2} \rightarrow 519.8$ σε συνδυασμό με τα θυγατρικά ιόντα (1) $m/z=135$ (που αντιστοιχεί σε θραύσμα της πλευρικής αλυσίδας Adda, η οποία είναι κοινή για όλες τις μικροκυστίνες και την νοντουλαρίνη, Σχήμα 12.1) και (2) $m/z=213$. Από την καμπύλη θραυσματοποίησης της μικροκυστίνης RR, παρατηρούμε ότι το ιόν m/z 127 ανιχνεύεται με μεγαλύτερη ένταση από ιόν m/z 213 ωστόσο επιλέχθηκε το δεύτερο ως ιόν ταυτοποίησης γιατί δεν προέρχεται από το ίδιο τμήμα του μορίου²⁰⁸. Τα θυγατρικά ιόντα που επιλέχθηκαν για την ταυτοποίηση της μικροκυστίνης RR έχουν επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία^{198,284} ως θραύσματα του μητρικού ιόντος της συγκεκριμένης μικροκυστίνης. Το θυγατρικό ιόν $m/z=135$ επιλέχθηκε ως ιόν ποσοτικοποίησης στην περίπτωση της μικροκυστίνης RR, ενώ αποτελεί και το βασικό θυγατρικό ιόν του μορίου.

12.4.2. Προσδιορισμός της νοντουλαρίνης

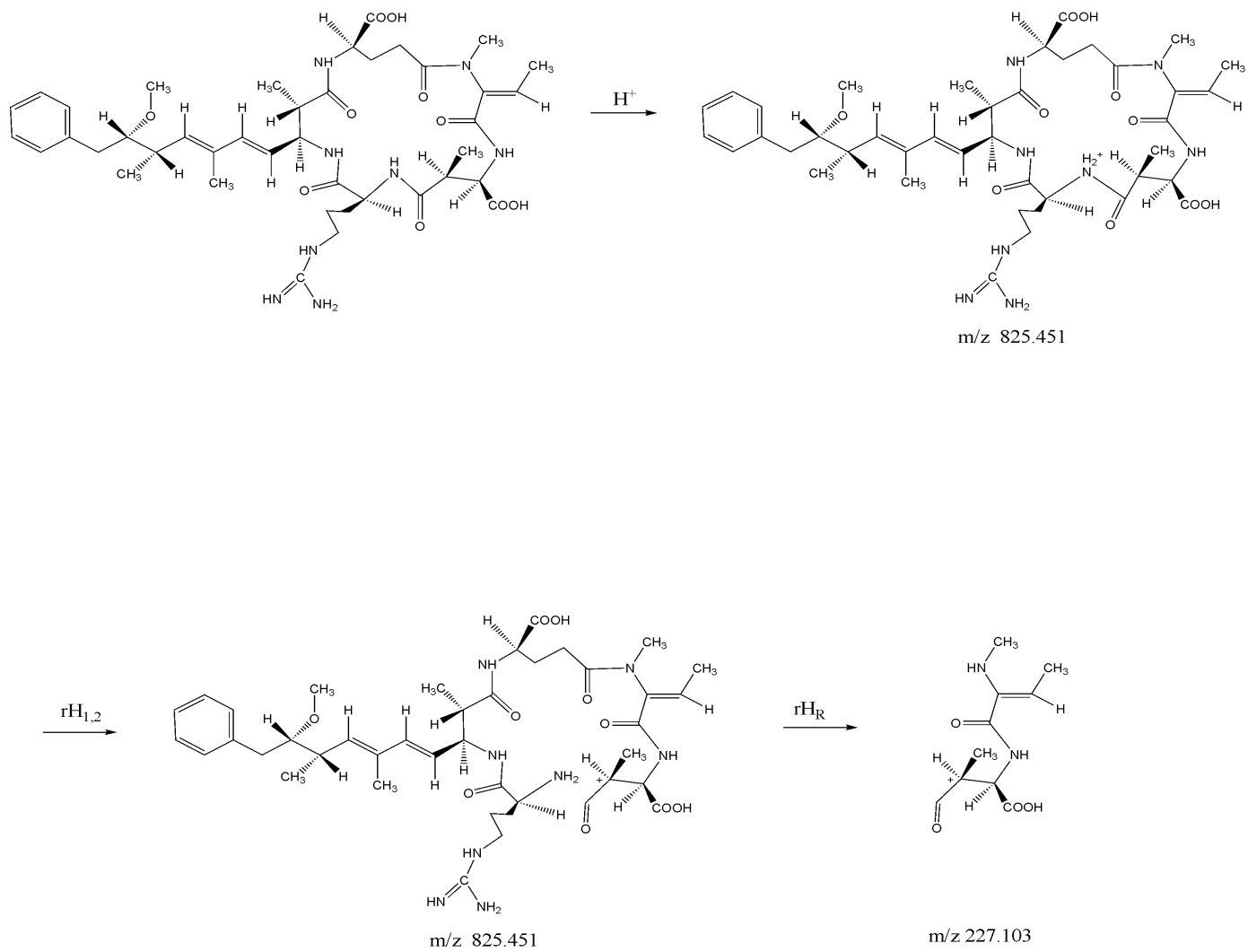
Στο φάσμα μάζας της νοντουλαρίνης παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται, με μεγάλη ένταση (4.27×10^6), το μοριακό ιόν $[M+H]^+$ της νοντουλαρίνης: 825.1 (Σχήμα 8.3). Οι υπόλοιπες κορυφές, που εμφανίζονται στο φάσμα μάζας της νοντουλαρίνης, οφείλονται πιθανότατα σε προσμίξεις του προτύπου της ή του διαλύτη.

Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την νοντουλαρίνη, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.4. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν τα ιόντα με λόγο m/z 134.9, 163, 180.9, 227 και 252. Η ταυτοποίηση της νοντουλαρίνης βασίστηκε στην ανίχνευση του μοριακού ιόντος $[M+H]^+ \rightarrow 825.1$ σε συνδυασμό με τα θυγατρικά ιόντα (1) $m/z=135$ (που αντιστοιχεί σε θραύσμα της πλευρικής αλυσίδας Adda η οποία είναι κοινή για όλες τις μικροκυστίνες και την νοντουλαρίνη, Σχήμα 12.1) και (2) $m/z=227$. Η θραύση της πλευρικής αλυσίδας Adda, στην νοντουλαρίνη ακολουθεί τον ίδιο ακριβώς μηχανισμό θραύσης με την μικροκυστίνη RR (Σχήμα 12.2). Το ιόν 135 επιλέχθηκε ως ιόν ταυτοποίησης, σε όσες κυανοτοξίνες παρατηρήθηκε πειραματικά, γιατί αποτελεί χαρακτηριστικό ιόν των κυανοτοξινών. Το θυγατρικό ιόν $m/z=227$, το οποίο απεικονίζεται με τη μεγαλύτερη ένταση σήματος, επίσης επιλέχθηκε ως ιόν ταυτοποίησης της νοντουλαρίνης. Τα υπόλοιπα θυγατρικά ιόντα αποδίδονται σε διάφορους μηχανισμούς διάσπασης αλλά δεν επιλέχθηκαν ως ιόντα ταυτοποίησης της νοντουλαρίνης αφού εμφανίζονται με μικρότερη ένταση σήματος από το $m/z=227$. Στο Σχήμα 12.5 προτείνεται, για πρώτη φορά, ο μηχανισμός θραυσματοποίησης της νοντουλαρίνης προς παραγωγή του θραύσματος $m/z=227$. Για την ερμηνεία των προτεινόμενων μηχανισμών χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα Mass Frontier²⁸⁵ και συγκεκριμένα οι μηχανισμοί **i**, **rH_{1,2}**, **rH_R** και **es** που αντιστοιχούν σε γενικούς μηχανισμούς Οργανικής Χημείας και ειδικότερα σε επαγωγικές διασπάσεις (**i**), αναδιατάξεις

του υδρογόνου μέσα στο μόριο (**r**) και ανακατανομή ηλεκτρονίων (**es**) όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.4.



Σχήμα 12.4 . Μηχανισμοί επαγωγικής διάσπασης και αναδιάταξης υδρογόνου

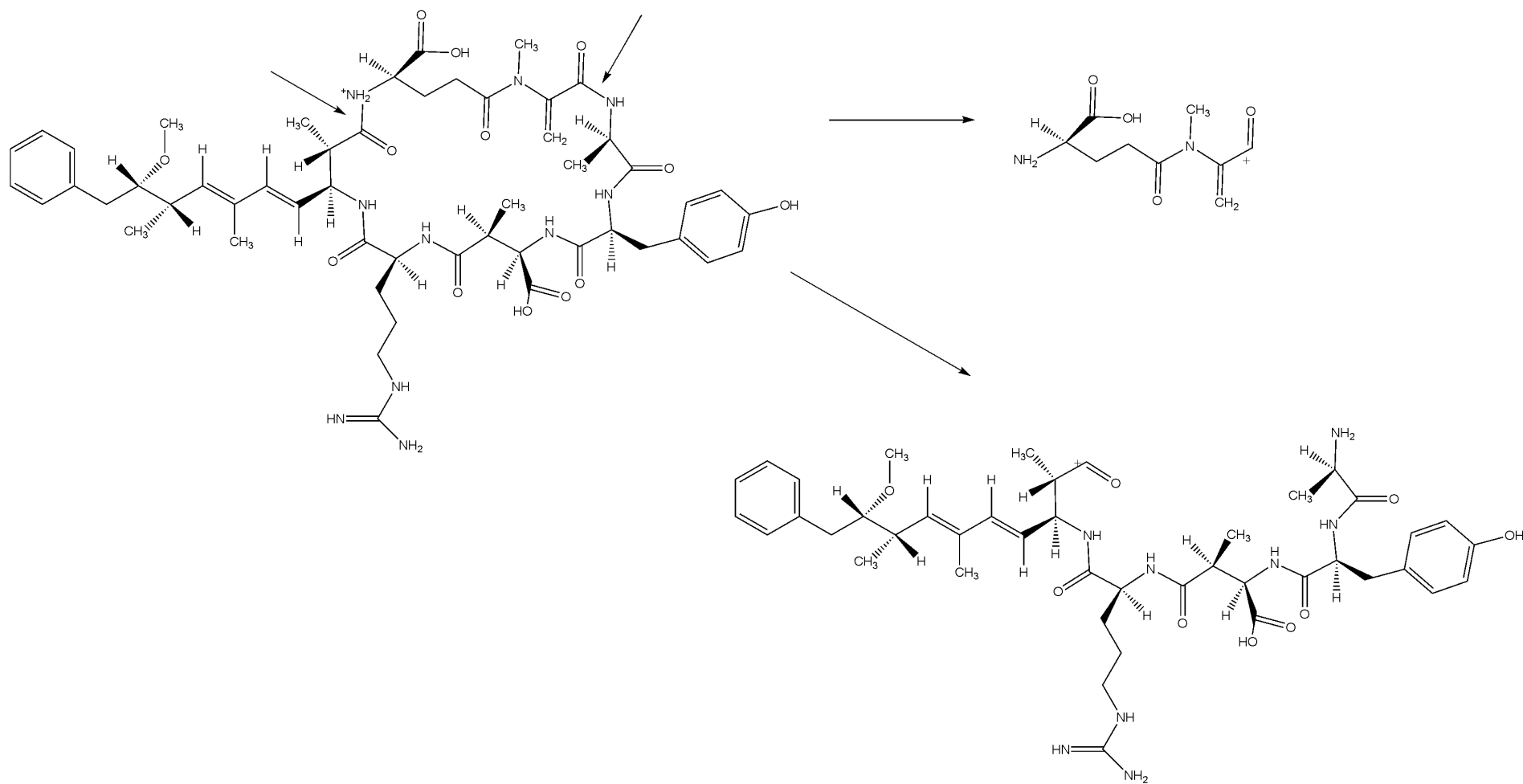


Σχήμα 12.5 . Μηχανισμός θραυσματοποίησης της νοντουλαρίνης προς παραγωγή του θραύσματος m/z 227

12.4.3. Προσδιορισμός της μικροκυστίνης YR

Στο φάσμα μάζας της μικροκυστίνης-YR (Σχήμα 8.5) παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται, με μεγάλη ένταση (7.26×10^6), το μητρικό ιόν $[M+H]^+$ της μικροκυστίνης YR: 1045.22. Οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα μάζας της μικροκυστίνης YR, οφείλονται πιθανότατα σε προσμίξεις του προτύπου της ή του διαλύτη.

Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την μικροκυστίνη YR, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.6. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα ιόντα με m/z 135, 174, 212.8, 285 και 375. Η ταυτοποίηση της μικροκυστίνης YR βασίστηκε στην ανίχνευση του μοριακού ιόντος $[M+H]^+ \rightarrow 1045.22$ σε συνδυασμό με τα θυγατρικά ιόντα (1) $m/z=135$ (που αντιστοιχεί σε θραύσμα της πλευρικής αλυσίδας Adda η οποία είναι κοινή για όλες τις μικροκυστίνες και την νοντουλαρίνη, Σχήμα 12.1) και (2) $m/z=213$. Το κυρίως θραύσμα της μικροκυστίνης YR είναι το m/z 213. Το θραύσμα αυτό προκύπτει από την αντίδραση σχάσης της μητρικής ένωσης $m/z=1045.22$ στις άκρες του D-γλουταμινικού οξέος (D-glutaminic acid) και της N-μεθυλοδεϋδροαλανίνης (N-Methyldehydroalanine) όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.6.



Σχήμα 12.6. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού θραύσης της μικροκυστίνης YR και παραγωγή του θραύσματος m/z 213²⁷³.

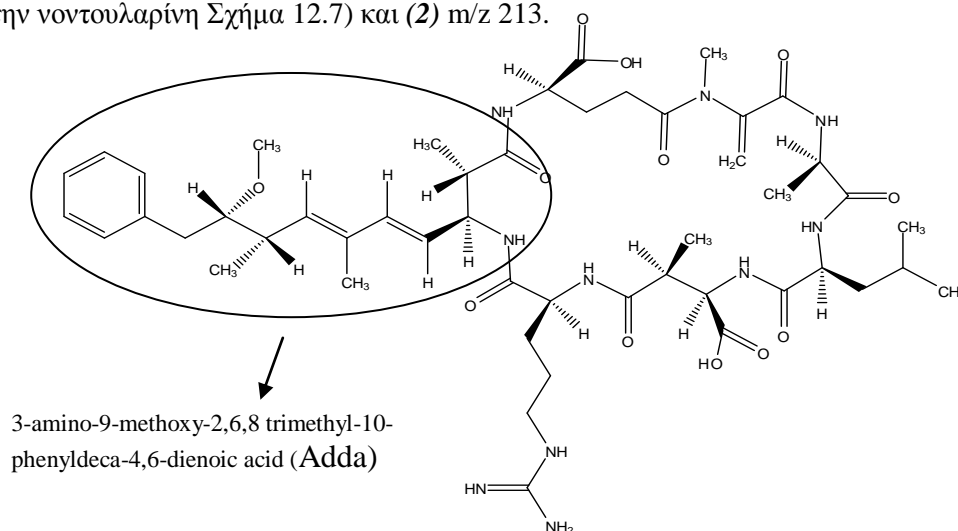
Η θραύση της πλευρικής αλυσίδας Adda ακολουθεί τον ίδιο ακριβώς μηχανισμό θραύσης με την μικροκυστίνη RR (Σχήμα 12.2).

Αν και το θραύσμα m/z 135 έχει πολύ μικρότερη ένταση από άλλα που εμφανίζονται στην καμπύλη θραυσματοποίησης (Σχήμα 8.6) της μικροκυστίνης YR, (όπως τα m/z 375 και 174), επιλέχθηκε μαζί με το m/z 213, ως ιόν ποσοτικοποίησης γιατί αποτελεί χαρακτηριστικό ιόν όλων των μικροκυστινών. Η επιλογή δύο ιόντων ποσοτικοποίησης αποφασίστηκε προκειμένου να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, αφού το m/z 135 μόνο του, δίνει σήμα χαμηλής έντασης (5×10^4 με πειράματα απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος 2 mg/L).²⁸⁶

12.4.4. Προσδιορισμός της μικροκυστίνης LR

Στο φάσμα μάζας της μικροκυστίνης-LR (Σχήμα 8.7) παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται, με μεγάλη ένταση (1.53×10^6), το μητρικό ιόν $[M+H]^+$ της MC-LR: 995.16. Η κορυφή που εμφανίζεται με m/z 1009.16, η οποία έχει ένταση που αντιστοιχεί περίπου στο μισό της κορυφής του μητρικού ιόντος, πιθανότατα οφείλεται σε προσμίξεις του προτύπου της μικροκυστίνης-LR ή του διαλύτη.

Η ταυτοποίηση της μικροκυστίνης LR βασίστηκε στην ανίχνευση του μοριακού ιόντος $[M+H]^+ \rightarrow 995.47$ σε συνδυασμό με τα θυγατρικά ιόντα (1) $m/z=135$ (που αντιστοιχεί σε θραύσμα της πλευρικής αλυσίδας (Adda), η οποία είναι κοινή για όλες τις μικροκυστίνες και την νοντουλαρίνη Σχήμα 12.7) και (2) m/z 213.



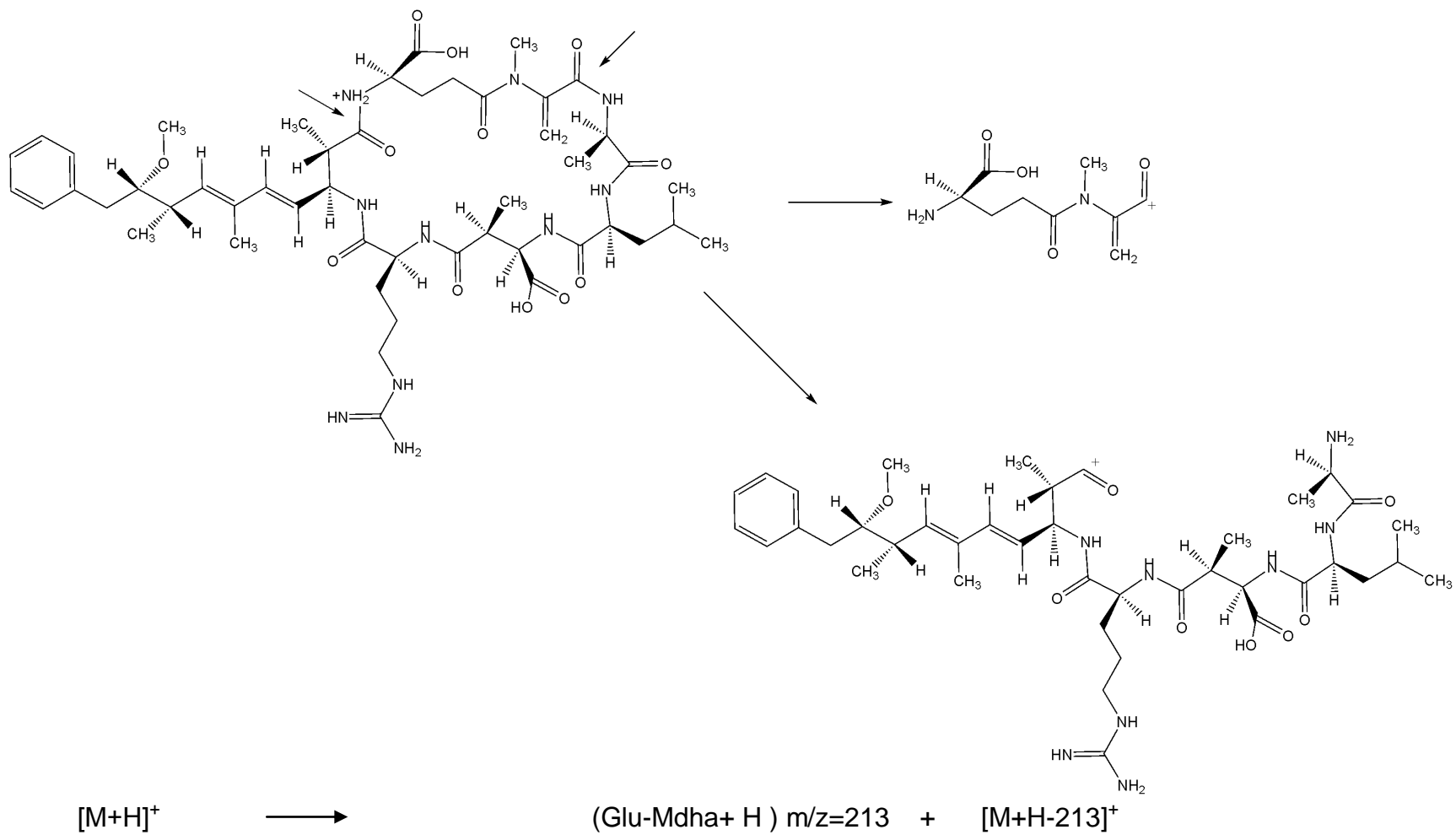
Σχήμα 12.7. Στερεοχημικός τύπος της μικροκυστίνης LR, όπου επισημαίνεται η αλυσίδα Adda (στον κύκλο) με την κατά IUPAC ονομασία.

Το θραύσμα $m/z=135$ αντιστοιχεί σε θραύσμα της πλευρικής αλυσίδας (Adda) μετά από την αντίδραση σχάσης του δεσμού C₈-C₉ του Adda. Η θραύση της πλευρικής αλυσίδας

Adda ακολουθεί τον ίδιο ακριβώς μηχανισμό θραύσης με την μικροκυστίνη RR (Σχήμα 12.2).

Το θραύσμα $m/z=213$, το οποίο επίσης διακρίνεται στην καμπύλη θραυσματοποίησης της μικροκυστίνης LR, προκύπτει από την αντίδραση σχάσης του μητρικού ιόντος $m/z=995.47$ στις άκρες των D-γλουταμινικού οξέος (D-glutaminic acid) και της N-μεθυλοδεϋδροαλανίνης (N-Methyldehydroalanine) όπως προτείνεται στο Σχήμα 12.8

Το θυγατρικό ιόν $m/z=135$ είναι χαρακτηριστικό ιόν των κυανοτοξινών και της νοντουλαρίνης, για αυτό και επιλέχθηκε ως ιόν ποσοτικοποίησης στην περίπτωση της μικροκυστίνης LR, παρόλο που ανιχνεύεται με μικρότερη ένταση από το m/z 213. Η ταυτοποίηση της μικροκυστίνης LR, πραγματοποιήθηκε από την παρουσία 2 θυγατρικών ιόντων (m/z 135, 213)²⁰⁸. Τα θυγατρικά ιόντα αυτά έχουν παρατηρηθεί ξανά στη βιβλιογραφία²⁷³. Το θυγατρικό ιόν $m/z=135$ επιλέχθηκε ως ιόν ποσοτικοποίησης στην περίπτωση της μικροκυστίνης LR.



Σχήμα 12.8. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού θραύσης της μικροκυστίνης LR και παραγωγή του θραύσματος m/z 213²⁷³.

12.4.5. Προσδιορισμός της μικροκυστίνης LA

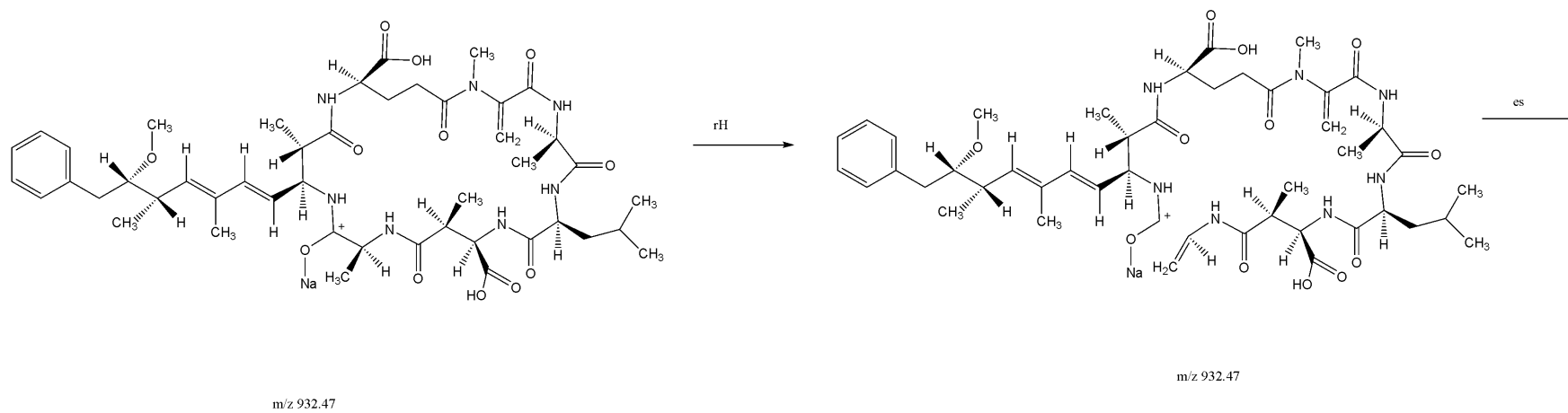
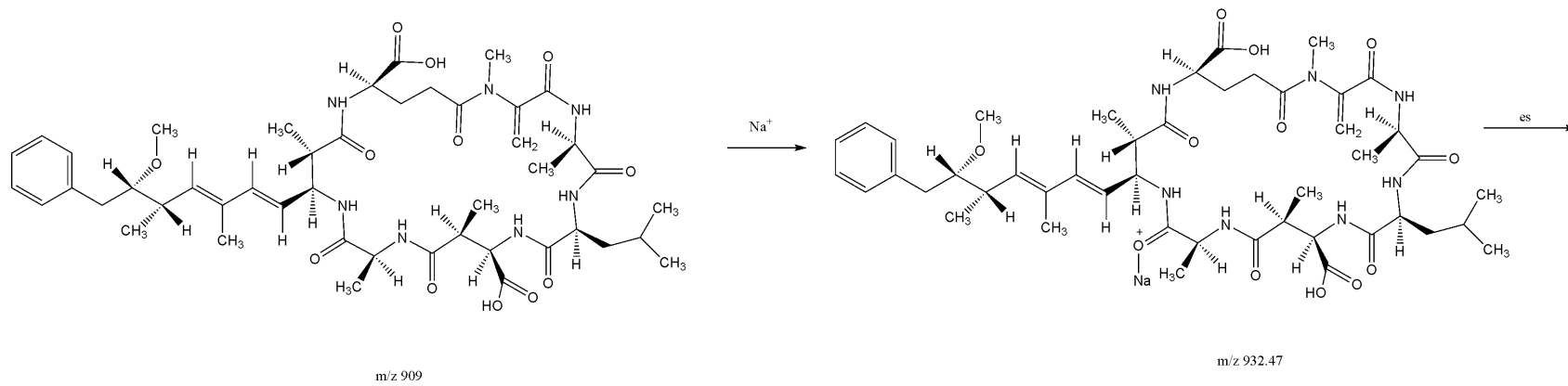
Στο φάσμα μάζας της μικροκυστίνης LA (Σχήμα 8.9) παρατηρούμε ότι ανιχνεύεται, με μεγάλη ένταση (1.09×10^6), το μοριακό ιόν $[M+Na]^+$ 932.65 της MC-LA (M.B 909). Στην τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό, εμφανίζονται αρκετά συχνά ιόντα προσθήκης (adduct ions) των αναλυτών με νάτριο. Τα ιόντα νατρίου, συνήθως, βρίσκονται σε ιχνοποσότητες, στην υδατική φάση του διαλύτη έκλουσης. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι μικροκυστίνες, οι οποίες δεν έχουν στο μόριό τους το αμινοξύ αργινίνη, όπως οι μικροκυστίνες LA, LW, LF, σχηματίζουν ιόντα προσθήκης με νάτριο στο σύστημα LC-MS/MS.¹⁹⁸ Αυτό ενισχύεται και από τα πειραματικά αποτελέσματα αυτής της εργασίας, αφού κατά την διάρκεια των πειραμάτων βελτιστοποίησης των κυανοτοξινών, με το σύστημα LC-MS/MS, μόνο το μοριακό ιόν της μικροκυστίνης LA ανιχνεύθηκε ως ιόν προσθήκης με νάτριο. Όλες οι υπόλοιπες κυανοτοξίνες που μελετήθηκαν περιέχουν το αμινοξύ αργινίνη στο μόριό τους. Ωστόσο, τα μοριακά ιόντα με νάτριο δεν είναι επιθυμητά στην ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού με LC-MS/MS, αφού δεν θραυσματοποιούνται αποτελεσματικά. Στην περίπτωση της μικροκυστίνης LA, ωστόσο, επιλέχθηκε γιατί ήταν το μοναδικό μοριακό ιόν που ανιχνεύτηκε.

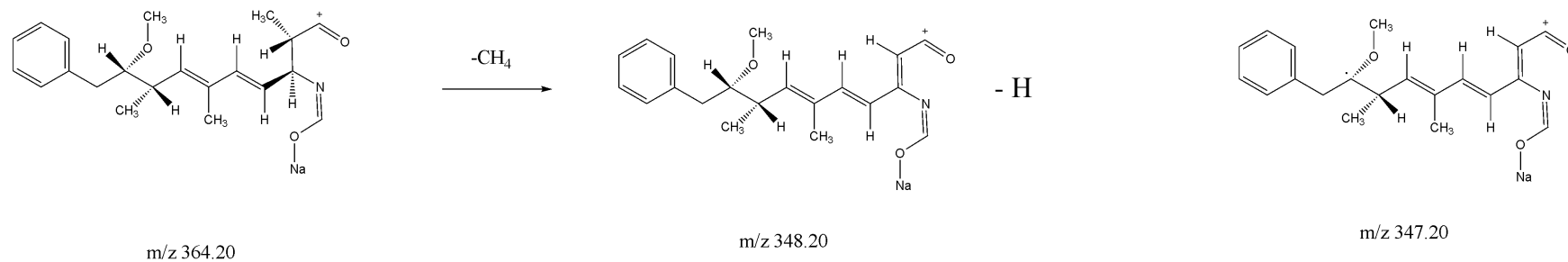
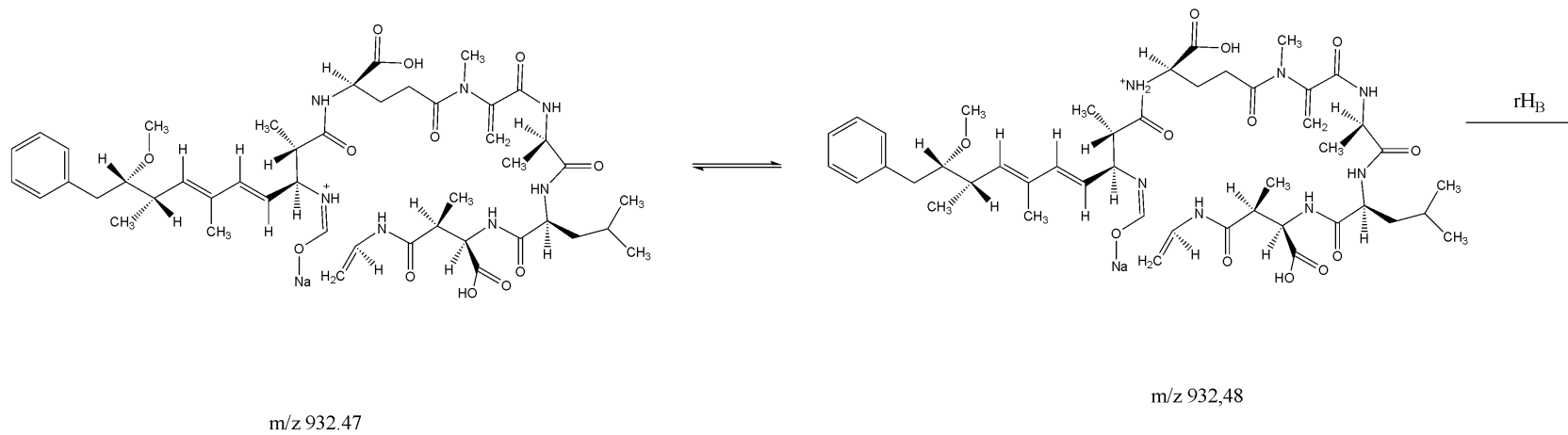
Στο Σχήμα 8.9 η κορυφή που εμφανίζεται με m/z 1009.16, η οποία έχει ένταση που αντιστοιχεί περίπου στη μέση της κορυφής του μητρικού ιόντος, πιθανότατα οφείλεται σε προσμίξεις του προτύπου της μικροκυστίνης LA ή του διαλύτη.

Η καμπύλη θραυσματοποίησης για την μικροκυστίνη LA, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας, παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.10. Το θραύσμα της μικροκυστίνης LA, με τη μεγαλύτερη ένταση, είναι το m/z 347. Παρατηρήθηκαν επίσης τα ιόντα m/z 508.2, 419.1 και 307.8 ενώ δεν ανιχνεύθηκε το ιόν $m/z=135$ που αντιστοιχεί σε θραύσμα της πλευρικής αλυσίδας (Adda). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο σχηματισμό του συμπλόκου με νάτριο, το οποίο θραυσματοποιείται πολύ δυσκολότερα από τα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Orla Allis et al.,²⁸⁴ οι οποίοι αναφέρουν ότι από 7 κυανοτοξίνες που προσδιορίστηκαν μόνο η μικροκυστίνη LA δεν θραυσματοποιήθηκε σε m/z 135, παρόλο που το μοριακό ιόν της ανιχνεύτηκε πρωτονιωμένο. Ωστόσο οι Mousun Yuan et al.,²⁷³ αναφέρουν ως θραύσμα της μικροκυστίνης-LA, με μοριακό ιόν $[M+H]^+$ m/z 911, το m/z 135. Η επιλογή δύο ιόντων ποσοτικοποίησης (m/z 508.2, 347.1) με τη μεγαλύτερη ένταση, αποφασίστηκε προκειμένου να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης²⁸⁶. Επιπλέον τα επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα δεν προέρχονται από το ίδιο τμήμα του μορίου.²⁰⁸ Παρακάτω αναφέρονται οι προτεινόμενοι μηχανισμοί για τα επιλεγμένα

ίοντα της μικροκυστίνης LA. Τα υπόλοιπα ίοντα θραυσματοποίησης (m/z 419.1, 307.8), αντιστοιχούν σε διαφορετικούς μηχανισμούς.

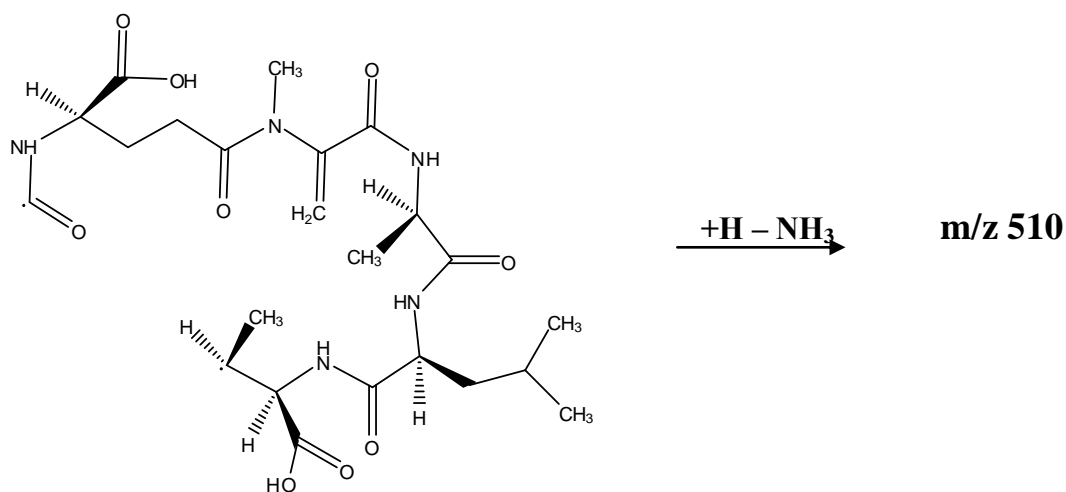
Στο Σχήμα 12.9 προτείνεται για πρώτη φορά ο μηχανισμός²⁸⁵ παραγωγής του θραύσματος m/z 347, ωστόσο η δημιουργία του έχει παρατηρηθεί και από άλλους.²⁷³





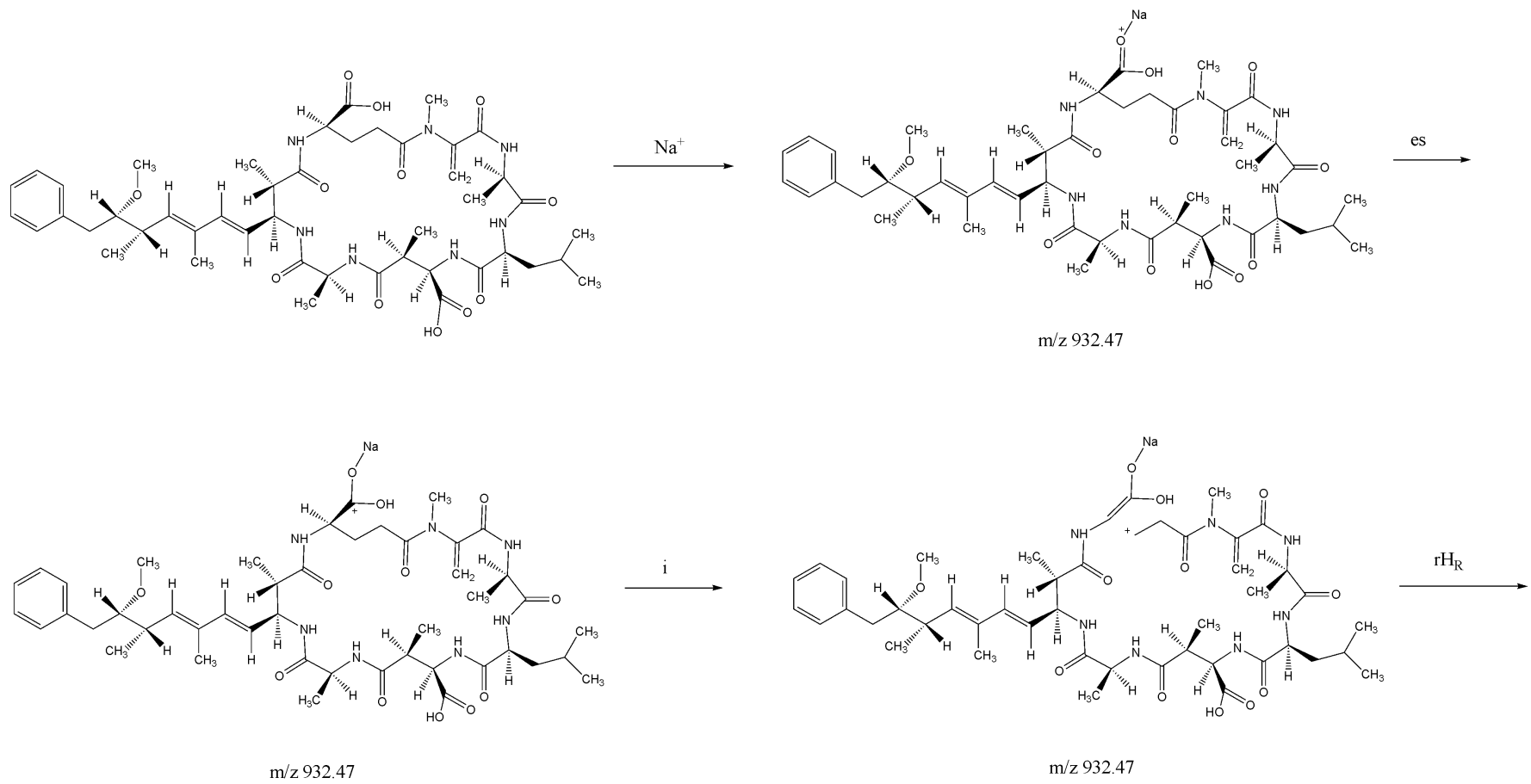
Σχήμα 12.9. Πιθανός μηχανισμός παραγωγής θραύσματος m/z 347.2 από το μοριακό ιόν της μικροκυστίνης-LA

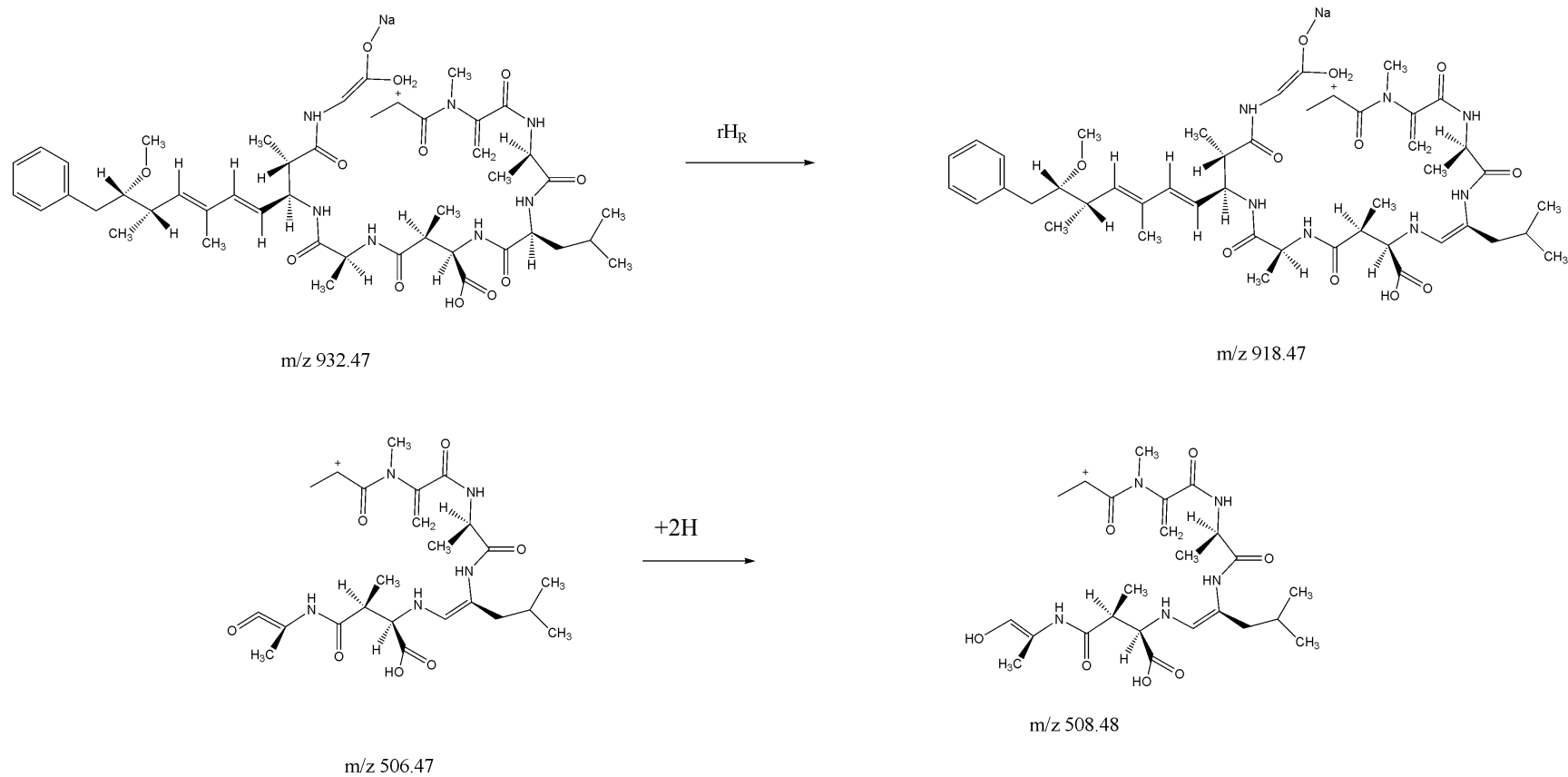
Στην καμπύλη θραυσματοποίησης της μικροκυστίνης LA ανιχνεύτηκε επίσης το ιόν m/z 508. Στην βιβλιογραφία προτείνεται η παραγωγή του θραύσματος 509 και δίνεται η εξήγηση ότι αυτό το θραύσμα παρέχεται από την περιοχή Glu-Mdha-Ala-Leu-MeAsp (Σχήμα 1.5), στην οποία έχει προστεθεί ένα πρωτόνιο και έχει αφαιρεθεί μοριακή μάζα που αντιστοιχεί σε ένα μόριο αμμωνίας (NH_3). Ωστόσο, υπολογίζοντας την μάζα του θραύσματος, με τον τρόπο που προτείνεται, προκύπτει το ιόν m/z 510 και όχι το 509. Επιπλέον, είναι μάλλον απίθανο από αυτό το τμήμα του μορίου να αφαιρεθεί NH_3 (Σχήμα 12.10)²⁷³.



Σχήμα 12.10. Μηχανισμός θραύσης της μικροκυστίνης LA που προτείνεται στη βιβλιογραφία²⁷³.

Για το δεύτερο σε ένταση θραύσμα, m/z 508, προτείνεται στη βιβλιογραφία ως πιθανός μηχανισμός σχηματισμού αυτός που φαίνεται στο Σχήμα 12.11.²⁸⁵





Σχήμα 12.11. Πιθανός μηχανισμός παραγωγής του θραύσματος m/z 508 από την μικροκυστίνη LA όπως προτείνεται στη βιβλιογραφία και προέκυψε από το λογισμικό Mass Frontier.

12.5. Επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού των προς ανάλυση ουσιών εκτιμήθηκε και ως προς τα χαρακτηριστικά επίδοσής της, σύμφωνα με διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025). Οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν : η επάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού των υπό προσδιορισμό ουσιών, η εκλεκτικότητα του προσδιορισμού και οι παρεμποδίσεις, η γραμμικότητα και το εύρος των μετρήσεων, η πιστότητα (precision) της μεθόδου, η ορθότητα (accuracy) της μεθόδου, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

Τα κριτήρια αποδοχής²⁰⁸ που τεθηκαν προκειμένου να θεωρηθεί επαρκής ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν :

1. $t_{R2}-t_{R1} > 0,2 \text{ min}$ για κάθε ζεύγος γειτονικών κορυφών
2. % RSD για τους χρόνους ανάσχεσης $< 2 \%$.
3. $R_s > 0.8$ για όλα τα ζεύγη γειτονικών κορυφών

Από τα ληφθέντα αποτελέσματα (Πίνακας 8.3) φαίνεται ότι, ικανοποιούνται τα κριτήρια αποδοχής που αφορούν στην επάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Συγκεκριμένα, η διαφορά των χρόνων ανάσχεσης ήταν μεγαλύτερη από 0.43, η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των χρόνων ανάσχεσης ήταν μικρότερη από 0.6185 και τέλος ο συντελεστής διαχωρισμού μεγαλύτερος από 1.85, για όλους τους αναλύτες.

Με βάση την κοινοτική οδηγία 2002/657/EC L221, προκειμένου να ταυτοποιηθεί μία ουσία στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS), απαιτείται συγκεκριμένος χρόνος κατακράτησης, της ουσίας αυτής, στη χρωματογραφική στήλη και επιπλέον η ανίχνευση του μοριακού ιόντος της σε συνδυασμό με 2 θυγατρικά ιόντα, τα οποία προέρχονται από το συγκεκριμένο αυτό μοριακό ιόν.

Στη συγκεκριμένη εργασία κάθε μία από τις πέντε κυανοτοξίνες ταυτοποιήθηκε με την ανίχνευση δύο θυγατρικών ιόντων (με συγκεκριμένη μεταξύ τους αναλογία, Πίνακας 8.2), τα οποία προέρχονταν από το μοριακό ιόν κάθε ένωσης και τα οποία ανιχνεύονταν με λόγο σήματος αναλύτη προς θόρυβο μεγαλύτερο του 3 ($S/N > 3$)²⁰⁸. Για τον έλεγχο της ταυτοποίησης των κυανοτοξινών εξετάστηκαν 2 δείγματα όγκου 0.5 L πόσιμου νερού (εμβολιασμένα με τελική συγκέντρωση έκαστης κυανοτοξίνης 0.1μg/L και 1μg/L, αντίστοιχα) και 2 δείγματα νερού λίμνης όγκου 0.5 L (εμβολιασμένα με τελική συγκέντρωση έκαστης κυανοτοξίνης 0.1μg/L και 1μg/L, αντίστοιχα). Ο λόγος σήματος προς θόρυβο για όλες τις μεταπτώσεις όλων των κυανοτοξινών ήταν πολύ μεγαλύτερος από $S/N > 3$ για τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις πόσιμων και επιφανειακών νερών.

Τα αποτελέσματα της γραμμικότητας των κυανοτοξινών παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 8.1.8. Προσδιορίστηκε η κλίση (b), η αποτέμνουσα (a) της ευθείας που προκύπτει για κάθε κυανοτοξίνη και ο συντελεστής συσχέτισης R^2 των ευθειών που προέκυψαν. Η

γραμμικότητα μελετήθηκε σε εύρος από 1-10000 µg/L για τις μικροκυστίνες RR, LR, LA και από 1-5000 µg/L για την μικροκυστίνη YR και την νοντουλαρίνη. Οι ευθείες που προέκυψαν χαρακτηρίζονται από ικανοποιητικές τιμές συντελεστών συσχέτισης, R^2 , οι οποίες ήταν μεγαλύτερες από 0.9935 σε κάθε περίπτωση. Ενδεικτικά αναφέρεται εδώ ότι οι Orla Allis et al.²⁸⁴, αναφέρουν εύρος γραμμικότητας για την μικροκυστίνη LR 1-200µg/L (LC-MS/MS σε πόσιμα και επιφανειακά νερά), ενώ οι Jing Wang et al,²⁶⁸ αναφέρουν εύρος γραμμικότητας 0.025–1.0 mg/mL για την μικροκυστίνη-LR (UPLC-MS/MS σε επιφανειακά νερά).

Για την εκτίμηση της πιστότητας της μεθόδου, υπολογίστηκαν :

α) η τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας S_r

β) η σχετική τυπική απόκλιση RSD_r

γ) το όριο επαναληψιμότητας r ($r = 2.8 \times S_r$)

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της πιστότητας (Πίνακες 8.5-8.8) γίνεται φανερό ότι τα ποσοστά της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD), για τις δύο συγκεντρώσεις και στα δύο είδη δειγμάτων (πόσιμο και επιφανειακό) ήταν μικρότερο από 10.53%. Η οδηγία SANCO 3131²¹⁵, αναφέρει ως αποδεκτά ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης, αυτά που βρίσκονται κάτω από 20%.

Ο υπολογισμός των ανακτήσεων των υπό προσδιορισμό ουσιών πραγματοποιήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις (0.1 µg/L και 1µg/L) και στα δύο είδη δειγμάτων, πόσιμο και επιφανειακό νερό. Τα αποτελέσματα που αφορούν στον υπολογισμό των ανακτήσεων δίνονται στους Πίνακες 8.9-8.12. Ως κριτήριο αποδοχής για την μέση ανάκτηση μιας προτεινόμενης ουσίας, θεωρείται η τιμή $\bar{R} > 50\%$ ²⁸⁷, όταν η ποσότητα της αναλύομενης ουσίας είναι μικρότερη από το ένα εκατομμυριοστό των μερών του διαλύματος (sub ppb level). Επιπλέον, η οδηγία 2002/657²⁰⁸ αναφέρει ως αποδεκτά ποσοστά μέσης ανάκτησης αυτά που βρίσκονται στα όρια 70-120%. Τα αποτελέσματα των ποσοστών ανάκτησης της προτεινόμενης μεθόδου κυμάνθηκαν από 69-113.4%. Με δεδομένο επίσης ότι η επαναληψιμότητα των πειραμάτων ανάκτησης βρισκόταν σε πολύ ικανοποιητικά όρια ($RSD_{Rec} < 10.5\%$), η προτεινόμενη μέθοδος πληρεί τα κριτήρια που αφορούν την ορθότητα.

Τα υπολογιζόμενα όρια ανίχνευσης, που υπολογίστηκαν θεωρητικά με δύο μεθόδους (Παράγραφος 5.5.1), επαληθεύτηκαν πειραματικά με την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων πόσιμου και επιφανειακού νερού. Συγκεκριμένα εμβολιάστηκαν δείγματα πόσιμου και επιφανειακού νερού, με μίγματα προτύπων ουσιών, ώστε η τελική συγκέντρωση κάθε κυανοτοξίνης να είναι ίση με 2, 3, 10, 13, 17 µg/L. Από τα πειραματικά επιβεβαιωμένα αποτελέσματα (Πίνακες 8.13 και 8.14.), γίνεται φανερό ότι η μέθοδος παρουσιάζει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης.²⁸⁶ Η προτεινόμενη μέθοδος παρουσιάζει πολύ ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης (0.003 µgL⁻¹ έως 0.01 µgL⁻¹ για πόσιμα και επιφανειακά νερά), δεδομένου ότι το

ανώτατο όριο για τη συγκέντρωση της μικροκυστίνης LR στο πόσιμο νερό είναι 1 µg/L (WHO). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι Sara Bogialli et al.¹⁹⁵, αναφέρουν ως όριο ανίχνευσης για 5 μικροκυστίνες LOQ= 2-5ng/L (LC-MS/MS μέθοδος σε επιφανειακά νερά) ενώ οι Jing Wang et al.²⁶⁸ αναφέρουν όριο ανίχνευσης για 4 μικροκυστίνες, LOD 1,3-6 ng/L (UPLC-MS/MS σε επιφανειακά νερά).

Προκειμένου να μελετηθεί η ανθεκτικότητα της μεθόδου σε μεταβολές των πειραματικών συνθηκών, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων, στα αποτελέσματα της ανάλυσης. Οι παράγοντες αυτοί ήταν: ταχύτητα ροής δείγματος στην SPE, θερμοκρασία εξάτμισης εκχυλίσματος, όγκος διαλύματος έκλουσης.

Από τα αποτελέσματα (Κεφάλαιο 8.1.12), συμπεραίνεται ότι η διακύμανση των τιμών των τριών παραγόντων που μελετήθηκαν, μέσα στα όρια της παρούσας μελέτης, δεν έχει σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα. Επομένως η μέθοδος είναι ανθεκτική ως προς τους παραπάνω παράγοντες και δεν απαιτούνται επιπλέον μέτρα για τον έλεγχο των παραγόντων αυτών.

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού κυανοτοξινών πληρεί όλα τα κριτήρια που έχουν τεθεί από διεθνή πρότυπα (ISO 17025) και επιπλέον αποτελεί την μοναδική μέθοδο ταυτόχρονου προσδιορισμού μικροκυστινών LR, YR, LA, RR και της Νοντουλαρίνης, σε πόσιμα και επιφανειακά νερά. Μπορεί να εφαρμοστεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό και ταυτοποίηση των προαναφερθέντων κυανοτοξινών σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, αφού η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου αποτελεί εξ ορισμού μέθοδο επιβεβαίωσης χημικών ουσιών. Συμπερασματικά θα μπορούσε να λεχθεί ότι τα χαρακτηριστικά της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε σε αυτή την εργασία, όπως, τα αρκετά χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης, οι ικανοποιητικές ανακτήσεις, η καλή επαναληψιμότητα, η απλή σχετικά προκατεργασία δείγματος με μικρή κατανάλωση διαλυτών, την καθιστούν μία αξιόπιστη μέθοδο για την εφαρμογή της στον προσδιορισμό κυανοτοξινών σε πόσιμα και επιφανειακά ύδατα.

12.6. Ανάλυση δειγμάτων για την παρουσία κυανοτοξινών στα επιφανειακά ύδατα και στο πόσιμο νερό της Αθήνας

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό, αφενός την ανάπτυξη μιας αξιόπιστης μεθόδου υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) για τον προσδιορισμό των 5 κυανοτοξινών (μικροκυστίνη LR, RR, YR, LA και νοντουλαρίνη) αφετέρου δε τη διενέργεια έρευνας για την παρουσία κυανοτοξινών στα επιφανειακά ύδατα και στο πόσιμο νερό της Αθήνας. Το θέμα της παρουσίας κυανοτοξινών έχει πολύ μεγάλη σημασία για την Αθήνα, δεδομένου ότι στο παρελθόν έχει παρουσιαστεί

ανάπτυξη κυανοβακτηρίων σε ταμιευτήρες της ΕΥΔΑΠ (κυρίως στην λίμνη του Μαραθώνα). Το τελευταίο επεισόδιο κυανοβακτηριακής άνθισης (bloom) αναφέρθηκε κατά τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο 2004, στη λίμνη του Μαραθώνα. Για τον λόγο αυτό, υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθεί το θέμα, αλλά και να εκτιμηθεί ο ενδεχόμενος κίνδυνος με βάση το όριο που έχει καθοριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) για τη συγκέντρωση των κυανοτοξινών στο πόσιμο νερό ($1\mu\text{g l}^{-1}$ μικροκυστίνης LR σε πόσιμο νερό).

Οι δειματοληψίες στη λίμνη του Μαραθώνα διήρκησαν από τις 25 Ιουλίου του 2007 έως και τις 20 Ιανουαρίου του 2009 και διενεργήθηκαν από την Ε.Υ.Δ.Α.Π. Τα δείγματα αναλύθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο, SPE-LC-MS/MS, προκειμένου να διαπιστωθεί αν στη λίμνη υπάρχουν κυανοτοξίνες και σε τι συγκεντρώσεις. Το ερώτημα της ανίχνευσης ή όχι κυανοτοξινών στο νερό της λίμνης είναι πολύ σημαντικό διότι αποδεικνύει άμεσα την ύπαρξη ή όχι τοξικών στελεχών κυανοβακτηρίων στη λίμνη, ικανών να δημιουργήσουν σοβαρά προβλήματα μόλυνσης σε περιπτώσεις έντονης ανάπτυξης (π.χ. σχηματισμού blooms).

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται, για πρώτη φορά, αποτελέσματα προσδιορισμού κυανοτοξινών στη λίμνη του Μαραθώνα. Για την ακρίβεια, η παρούσα εργασία, αποτελεί την πρώτη και αξιόπιστη προσπάθεια διερεύνησης της ύπαρξης κυανοτοξινών στο νερό της Αθήνας (πόσιμο και επιφανειακό), από το οποίο υδρεύεται ο μισός πληθυσμός της χώρας.

Οι δειματοληψίες στη λίμνη του Μαραθώνα διεξάγονταν ανά 15 ημέρες περίπου, προκειμένου να προκύψει μία αξιόπιστη και ολοκληρωμένη προσπάθεια διερεύνησης της ύπαρξης κυανοτοξινών.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 8, προκύπτει ότι ανιχνεύθηκαν κυρίως οι μικροκυστίνες RR, LR και λιγότερο η μικροκυστίνη YR. Οι συγκεντρώσεις της μικροκυστίνης RR κυμάνθηκαν από $0.0005\mu\text{g/L}$ (5/2/2008) έως $0.060\mu\text{g/L}$ (20/9/2007), ενώ της μικροκυστίνης LR από $0.0004\mu\text{g/L}$ (31/3/2008) έως $0.029\mu\text{g/L}$ (30/11/2007). Η μικροκυστίνη YR ανιχνεύθηκε σε μικρές συγκεντρώσεις ($\leq 0.009\mu\text{g/L}$). Η μικροκυστίνη LA βρέθηκε σε ίχνη, συνολικά σε έξι δείγματα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία, όπου συνήθως μόνο ένα ή δύο είδη μικροκυστινών κυριαρχούν στα εξεταζόμενα δείγματα, παρόλο που πολλά είδη κυανοβακτηρίων παράγουν διάφορες μικροκυστίνες ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, δείγματα κυανοβακτηρίων από την Ιαπωνία βρέθηκαν να περιέχουν κυρίως τις μικροκυστίνες-LR, RR και YR. Αυτά τα τρία είδη μικροκυστινών αναφέρονται συχνά σε διάφορες μελέτες που αφορούν τα είδη *Microcystis aeruginosa* και τα *Microcystis viridis*. Το είδος *Microcystis* αναφέρθηκε και σε μελέτη που διεξήχθη κατά τα έτη 1987-2000 σε ελληνικές λίμνες (συμπεριλαμβανομένης και της λίμνης του Μαραθώνα) και αφορούσε την ύπαρξη κυανοβακτηριακών ειδών στις λίμνες αυτές¹⁹³.

Η μικροκυστίνη LR, θεωρείται ότι είναι η πιο συχνά προσδιοριζόμενη μικροκυστίνη, αν και αυτή η διαπίστωση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα χημικά πρότυπα για την ανάλυσή της ήταν από τα πρώτα που διατέθηκαν εμπορικά. Στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ως η κυρίαρχη τοξίνη σε δείγματα έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης στην Πορτογαλία,²⁸⁸ στη Γαλλία,²⁸⁹ στον Καναδά²⁹⁰ και συχνά ως συνυπάρχουσα τοξίνη με τις μικροκυστίνες-RR και YR στην Ιαπωνία.²⁹¹ Στα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, η μικροκυστίνη RR προσδιορίστηκε συχνότερα και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από την μικροκυστίνη LR. Η παρουσία της μικροκυστίνης RR σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές όπως στην πρόσφατη αναφορά των Liming Conga et al.,²⁶⁹ αφού σε μελέτη που διεξήγαγαν στην λίμνη Taihu, στην ανατολική Κίνα, προσδιόρισαν τις δύο μικροκυστίνες RR και LR, και συγκεκριμένα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις την μικροκυστίνη RR (61-210 μg/L).

Η νοντουλαρίνη δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα, αποτέλεσμα αναμενόμενο, αφού η τοξίνη αυτή ανιχνεύεται κυρίως σε αλμυρά και υφάλμυρα ύδατα. Οι περιοχές στις οποίες έχει καταγραφεί αυτή η κυανοτοξίνη είναι κυρίως η θάλασσα της Βαλτικής, οι υφάλμυρες λίμνες και οι παράκτιες εκβολές υδάτων στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία. Εντούτοις, το πιο γνωστό σημείο άνθισης του *Nodularia spumigena* είναι η λίμνη Alexandrina, στην Αυστραλία, τα νερά της οποίας έχουν αλατότητα που είναι ελαφρώς αυξημένη σε σχέση με αυτή των ποταμών, αλλά σε τέτοια επίπεδα που τα καθιστά κατάλληλα ακόμη και για πόση. Στη θάλασσα της Βαλτικής, η συλλογή δειγμάτων για αρκετά έτη έχει δείξει ότι η νοντουλαρίνη είναι η κυρίαρχη ένωση. Από την ίδια θάλασσα^{292,293} απομονώθηκαν γενικά 90 ηπατοτοξικά είδη του κυανοβακτηρίου *Nodularia*. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει από έρευνες στην Αυστραλία.^{294,295}

Στη βιβλιογραφία, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις κυανοτοξινών απομονώθηκαν από υδατικά δείγματα με έντονη κυανοβακτηριακή άνθιση (blooms) στην Πορτογαλία και στη Βαλτική:

- μικροκυστίνες - 7.300 μg g⁻¹ dw στην Κίνα και στην Πορτογαλία
- νοντουλαρίνη - 18.000 μg g⁻¹ dw στη θάλασσα της Βαλτικής,

όπου dw (dry weight): βάρος επί ξηρού δείγματος κυανοβακτηριακής μάζας.

Στην Γερμανία το 1993 από 18 δείγματα επιφανειακών υδάτων που εξετάστηκαν βρέθηκαν 17 τοξικά με συγκεντρώσεις μικροκυστινών 0.15-0.36 μg/L¹¹⁸, ενώ το 1997 καταγράφηκαν 34 είδη τοξικών δειγμάτων με συγκεντρώσεις που έφταναν μέχρι και 25.000 μg/L ύδατος²⁹⁶. Στην Ιαπωνία καταγράφηκαν 18 τοξικά δείγματα σε ένα σύνολο 22 δειγμάτων επιφανειακών υδάτων. Συγκεκριμένα ανιχνεύθηκαν οι μικροκυστίνες LR, RR, YR, στην περίοδο 1992-1995 και βρέθηκαν σε συγκεντρώσεις από 0.04-480 μg/L.²⁹⁷ Στην φύση, οι κυανοβακτηριακοί πληθυσμοί που δεν διανύουν περίοδο έντονης αύξησης παράγουν χαμηλές συγκεντρώσεις εξωκυτταρικής τοξίνης. Το εύρος συγκεντρώσεων που έχει παρατηρηθεί για διαλυμένες στο

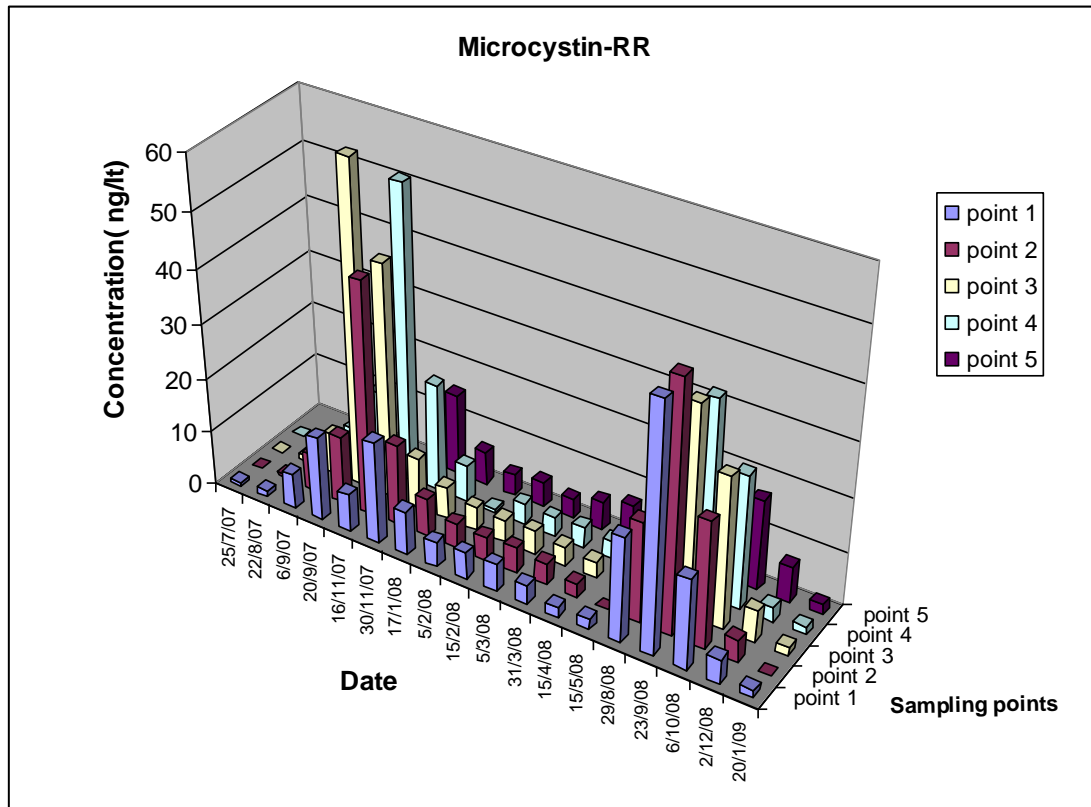
νερό κυανοτοξίνες, όταν δεν υπάρχει έντονη κυανοβακτηριακή άνθιση (bloom), είναι 0.1-10 $\mu\text{g} / \text{L}^{-1}$.^{118,298,299} Στην παρούσα μελέτη στη λίμνη του Μαραθώνα, οι δειγματοληψίες διεξήχθησαν σε περιόδους όπου δεν εμφανίστηκε επεισόδιο έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης (bloom) και οι συγκεντρώσεις μικροκυστινών ήταν μικρότερες από 0.060 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Στα Σχήματα 12.12 και 12.13 απεικονίζονται με γραφικό τρόπο, οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών RR LR, στα διάφορα σημεία δειγματοληψίας και για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας. Οι άλλες μικροκυστίνες προσδιορίστηκαν σε αμελητέες συγκεντρώσεις ή δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου. Από τα σχήματα αυτά φαίνεται ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των δύο τοξινών παρουσιάζονται στα σημεία δειγματοληψίας 3 και 4 που βρίσκονται στο κέντρο του φράγματος. Στο σημείο αυτό συνήθως συγκεντρώνονται οι μεγαλύτερες μάζες των κυανοβακτηρίων σε περιπτώσεις έντονης κυανοβακτηριακής άνθισης (bloom), λόγω των ρευμάτων και επομένως μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κυανοτοξινών είναι γενικά αναμενόμενες.

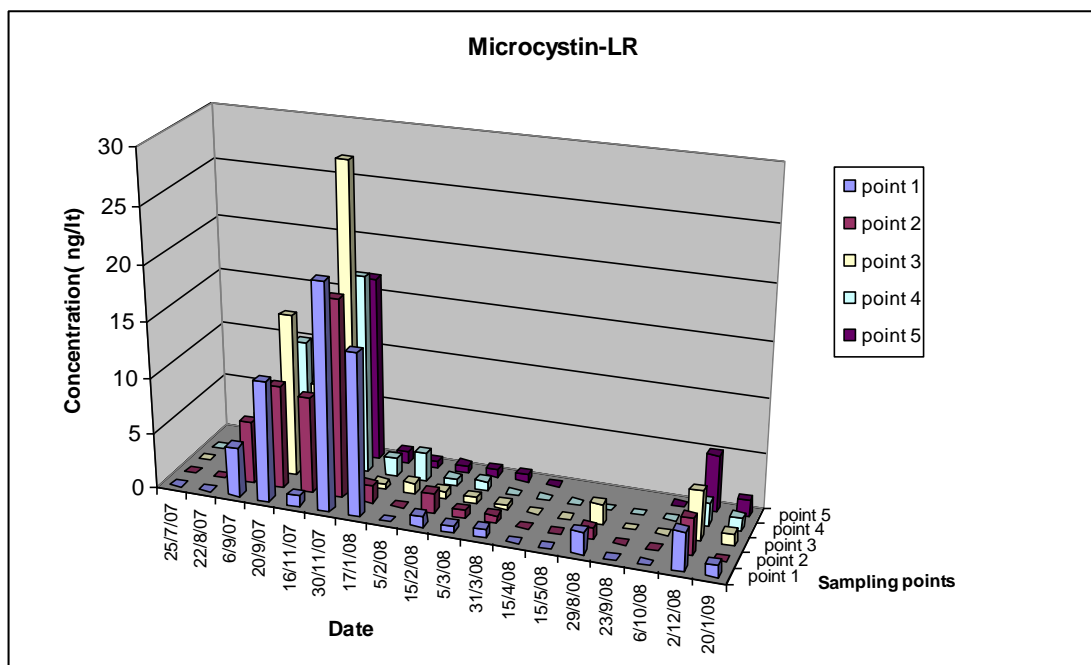
Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μικροκυστινών παρατηρήθηκαν τους μήνες Σεπτέμβριο και Νοέμβριο (Σχήματα 12.14 και 12.15). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων που ευνοούν την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων τους συγκεκριμένους μήνες, όπως η μέτρια ένταση φωτός και η θερμοκρασία των υδάτων. Τους καλοκαιρινούς μήνες (Ιούλιο-Αύγουστο), αν και η θερμοκρασία των υδάτων είναι υψηλότερη, οι παρατεταμένες περιόδους υψηλών φωτεινών εντάσεων δεν ευνοούν την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων.³⁰⁰

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν την πρώτη αναφορά για την ύπαρξη μικροκυστινών στο νερό της λίμνης του Μαραθώνα. Δεδομένου ότι στη λίμνη του Μαραθώνα παρατηρείται η παρουσία κυανοβακτηρίων (π.χ. του γένους *Microcystis*),¹⁹³ τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την ύπαρξη στελεχών τοξικών κυανοβακτηρίων ικανά για παραγωγή τοξινών (μικροκυστινών) και έκλυση αυτών στο νερό.

Οι συγκεντρώσεις των μικροκυστινών που μετρήθηκαν είναι χαμηλές και πολύ κατώτερες του ορίου του 1 μgL^{-1} που έχει προταθεί για την μικροκυστίνη LR στο πόσιμο νερό από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (W.H.O.). Σε ταυτόχρονες μετρήσεις πόσιμου νερού που προερχόταν από την λίμνη του Μαραθώνα, δεν ανιχνεύθηκε καμία μικροκυστίνη. Πιθανότατα η επεξεργασία, στην οποία υπόκειται το επιφανειακό νερό στα διυλιστήρια (διήθηση, κροκκίδωση, κ.α.), είναι ικανή να απομακρύνει τις κυανοτοξίνες στις χαμηλές αυτές συγκεντρώσεις με τις οποίες προσδιορίστηκαν. Επισημαίνεται όμως ότι οι παρούσες δειγματοληψίες αναφέρονται σε περιόδους κατά τις οποίες δεν υπήρχαν «blooms» κυανοβακτηρίων ή ορατή παρουσία τους.



Σχήμα 12.12. Γραφική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της μικροκυστίνης RR στα διάφορα σημεία δειγματοληψίας και για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας, στη λίμνη του Μαραθώνα.



Σχήμα 12.13. Γραφική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της μικροκυστίνης LR στα διάφορα σημεία δειγματοληψίας και για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας, στη λίμνη του Μαραθώνα.

Κεφάλαιο 13: Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (ΠΑΥς) με την τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS)

13.1. Εισαγωγή

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (ΠΑΥς) (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) είναι καλά μελετημένοι οργανικοί ρύποι οι οποίοι προέρχονται τόσο από φυσικές πηγές όσο και από ανθρωπογενείς πρακτικές²⁵. Αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες περιβαλλοντικών ρύπων, γιατί κάποιες από αυτές τις ενώσεις χαρακτηρίζονται από μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες, ενώ παράλληλα ανιχνεύονται σε διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα³⁰¹. Στη βιβλιογραφία υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παρουσία διαφόρων ΠΑΥς στο πόσιμο και επιφανειακό νερό, δεδομένου ότι μπορεί να απειληθεί η υδρόβια ζωή και η υγεία των ανθρώπων²⁰².

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει εκδόσει συγκεκριμένες οδηγίες που σχετίζονται με τον έλεγχο και την θέσπιση ανώτατων επιτρεπόμενων ορίων των ΠΑΥς στα πόσιμα και επιφανειακά νερά. Συγκεκριμένα, σε ότι αφορά τα πόσιμα νερά, η οδηγία 98/83/ΕΚ³⁰² θέτει το ανώτατο όριο των $0.1\mu\text{gL}^{-1}$ συνολικά για τους πέντε ΠΑΥς (βενζο(β)φλουορανθένιο, βενζο(κ)φλουορανθένιο, βενζο(α)πυρένιο, βενζο(η,θ,ι)περυλένιο και Ινδανο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο) και το όριο των $0.001\mu\text{gL}^{-1}$ για την περίπτωση του βενζο(α)πυρενίου. Η οδηγία 2000/60/ΕΚ³¹ καθορίζει την στρατηγική ενάντια στη ρύπανση των επιφανειακών νερών και αναφέρεται μεταξύ των άλλων στην ανάγκη ελέγχου οκτώ ΠΑΥς (ναφθαλένιο, ανθρακένιο, φλουορανθένιο, βενζο(β)φλουορανθένιο, βενζο(κ)φλουορανθένιο, βενζο(α)πυρένιο, βενζο(η,θ,ι)περυλένιο και Ινδανο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο). Το 2008 τέθηκαν «αυστηρά» πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος στον τομέα της πολιτικής των επιφανειακών υδάτων (συμπεριλαμβάνονται ποτάμια, λίμνες και λοιπές επιφανειακές υδάτινες δεξαμενές), με ακόμα νεότερη οδηγία (2008/105/ΕΚ).³² Σύμφωνα με αυτήν ορίστηκαν ως ανώτατα επιτρεπόμενα όρια $2.4\mu\text{gL}^{-1}$ για το ναφθαλένιο, $0.1\mu\text{gL}^{-1}$ για το ανθρακένιο και φλουορανθένιο, $0.05\mu\text{gL}^{-1}$ για το βενζο(α)πυρένιο, $0.03\mu\text{gL}^{-1}$ για το άθροισμα του βενζο(β)φλουορανθενίου και βενζο(κ)φλουορανθενίου και $0.002\mu\text{gL}^{-1}$ για το άθροισμα του βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και του ινδανο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου.

Η ανάπτυξη ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων προσδιορισμού πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων στα νερά, έχει πλέον ιδιαίτερη σημασία δεδομένων των νέων χαμηλών ανώτατων ορίων που τέθηκαν με την παραπάνω πρόσφατη οδηγία. Παραδοσιακά, η ανάλυση των ΠΑΥς σε υδατικά δείγματα, επιτυγχάνονταν με υγρό χρωματογράφο υψηλής

απόδοσης σε συνδυασμό με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας ή φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HPLC-UV/FL)²⁰³⁻²⁰⁷. Ωστόσο, αυτές οι αναλυτικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο ως μέθοδοι διαλογής (screening methods) και όχι ως μέθοδοι επιβεβαίωσης, αφού δεν μπορούν να παρέχουν αδιαφιλονίκητη ταυτοποίηση των αναλυτών ουσιών και εάν είναι αναγκαίο, τον ποσοτικό προσδιορισμό τους στο επίπεδο που ενδιαφέρει²⁰⁸.

Αντίθετα, οι αεριοχρωματικές μέθοδοι που συνδυάζονται με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS), αποτελούν επιβεβαιωτικές μεθόδους, αφού μπορούν να παρέχουν το φάσμα μάζας των αναλυτών ουσιών.²⁰⁹⁻²¹¹ Το μειονέκτημα των GC-MS μεθόδων είναι ότι συνήθως απαιτείται εκτεταμένη εκχύλιση-προσυγκέντρωση αναλυτών προκειμένου να επιτευχθούν τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που απαιτούνται στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων²¹². Γενικότερα όμως, η ανάλυση ρύπων με αέριο χρωματογράφο απαιτεί πρόσθετα βήματα εκχύλισης και δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε μη πτητικές ενώσεις ούτε και στην ανάλυση των θερμικά ασταθών μορίων. Αυτό συμβαίνει και στην περίπτωση των ΠΑΥς, αφού με αέριο χρωματογράφο-φασματόμετρο μαζών, παρουσιάζονται επιπρόσθετες δυσκολίες για τους αναλύτες με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 300, εξαιτίας της χαμηλής πτητικότητας που παρουσιάζουν οι αναλύτες αυτοί.³⁰³ Αντίθετα με την χρήση υγρού χρωματογράφου αίρονται όλα τα παραπάνω μειονεκτήματα και επιπλέον θεωρείται πιο ακριβής τεχνική για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναλυτών, δεδομένου ότι η ακρίβεια της εγχυόμενης ένεσης ρυθμίζεται από βρόγχους σταθερού όγκου (loop injections).

Η σύζευξη του υγρού χρωματογράφου με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS), ανήκει στις προηγμένες μεθόδους ανάλυσης στις οποίες συνδυάζονται τα πλεονεκτήματα της υγρής χρωματογραφίας με την επιβεβαίωση που επιτυγχάνεται μέσω της φασματομετρίας μάζας. Η ταυτοποίηση ενός αναλύτη σε πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης, πραγματοποιείται με την παρακολούθηση ενός μητρικού και δύο θυγατρικών ιόντων, προερχόμενα από το ίδιο μητρικό ιόν (Selected Reaction Monitoring, SRM), σε συνδυασμό με το χρόνο κατακράτησης του αναλύτη αυτού³⁰⁴.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο (Electron Spray Ionization, ESI) και ο χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI), είναι δύο διαδεδομένες τεχνικές ιοντισμού που συνδυάζονται με την τεχνολογία LC-MS/MS. Ωστόσο, αυτές οι δύο πηγές ιοντισμού αδυνατούν να ιοντίσουν επαρκώς μη πολικές ενώσεις όπως είναι και οι ΠΑΥς³⁰⁵. Η τεχνική φωτοϊοντισμού σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photoionization, APPI) είναι η πιο πρόσφατη τεχνική ιοντισμού που συνδυάστηκε με την τεχνολογία LC-MS/MS^{220,306} με σκοπό τον επαρκή ιοντισμό άπολων μορίων τα οποία δεν ιοντιζόνταν με την τεχνική ESI και APCI³⁰⁵. Ο ιοντισμός των ΠΑΥς επιτυγχάνεται μέσω φωτονίων ενέργειας 10eV που εκπέμπονται από μία λάμπα κρυπτού. Προκειμένου να επιτευχθεί ικανοποιητικότερος ιοντισμός των προς

ανάλυση ενώσεων, η διαδικασία του φωτοϊοντισμού μπορεί να ενισχυθεί με την χρήση μίας ένωσης ενισχυτή (dopant) (dopant-assisted APPI; DA-APPI).^{151,152,155,307-309}

Όπως αναφέρθηκε, στη βιβλιογραφία υπάρχουν διάφορες δημοσιευμένες μέθοδοι προσδιορισμού ΠΑΥς με GC-MS και HPLC-FL αλλά υπάρχουν λίγες με την τεχνική LC-APPI/MS^{111,310,311} και ακόμα λιγότερες με LC-APPI-MS/MS.^{303,312} Οι Moriwaki et al.,³¹⁰ προσδιόρισαν δώδεκα ΠΑΥς, σε ιζήματα με την τεχνική LC-APPI/MS και κατάφεραν να πετύχουν πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης από αυτά που είχαν αναφερθεί με HPLC-FL. Οι Itoh et al.,¹¹¹ μελέτησαν μόρια ενισχυτές (dopants) προκειμένου να επιτύχουν μεγάλη ευαισθησία στον προσδιορισμό προτύπου δεκαέξι ΠΑΥς με LC-APPI/MS. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μίγμα τολουολίου/ανισόλης (99.5/0.5%) ευνοεί τον ιοντισμό των περισσοτέρων από τα δεκαέξι ΠΑΥς που αναλύθηκαν. Με την τεχνική LC-APPI-MS/MS αναφέρονται στη βιβλιογραφία μόνο 2 δημοσιευμένες εργασίες προσδιορισμού ΠΑΥς. Η μία αφορά τον προσδιορισμό 10 ΠΑΥς³¹² στον καπνό του τσιγάρου και η άλλη, η πιο πρόσφατη, την επίτευξη χαμηλών ορίων ανίχνευσης για 16 ΠΑΥς με την χρήση χλωροβενζολίου ως μόριο ενισχυτής (dopant). Ωστόσο, δεν υπάρχει δημοσιευμένη εργασία στην οποία να προτείνεται μέθοδος προσδιορισμού ΠΑΥς σε νερά (πόσιμα ή επιφανειακά) με την συνδυασμένη τεχνολογία LC-APPI-MS/MS.

Η ανάπτυξη νέων, ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων προσδιορισμού των ΠΑΥς έχει πλέον ιδιαίτερη σημασία δεδομένων των πολύ χαμηλών ανώτατων επιτρεπόμενων ορίων που υπαγορεύονται από την πρόσφατη οδηγία 2008/105/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η ανάπτυξη μιας ευαίσθητης και αξιόπιστης LC-APPI-MS/MS μεθόδου, για τον προσδιορισμό των οκτώ ΠΑΥς σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της οδηγίας 2008/105/EK. Σημαντική προτεραιότητα αποτέλεσε επίσης και η διευκρίνιση του μηχανισμού θραυσματοποίησης των μοριακών ιόντων των αναλυτών με την τεχνική MS/MS. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή είναι η πρώτη εργασία στην οποία προτείνεται μέθοδος προσδιορισμού ΠΑΥς σε πόσιμα και επιφανειακά νερά με LC-APPI-MS/MS.

13.2. Απομόνωση και προσυγκέντρωση των ΠΑΥς

Στην παρούσα μελέτη, για την απομόνωση των ΠΑΥς χρησιμοποιήθηκαν τα φυσιγγία (cartridges) SPE-C18 (17% C επικαλυμμένος) 500mg, χωρητικότητας 6 ml (ENVI-18 της Supelco). Επιλέχθηκε το άπολο προσροφητικό υλικό C18 αντί των Oasis HLB ή άλλων συμπολυμερών υλικών, δεδομένου ότι οι προσδιοριζόμενοι αναλύτες είναι άπολα μόρια.

Για την ενεργοποίηση των φυσιγγίων SPE χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά ~2x5ml διχλωρομεθανίου, ~2x5ml μεθανόλης και ~2x5ml νερού, με ροή ~5ml/min, με χρήση κενού,

όπως προτείνεται από τον κατασκευαστή. Η ταχύτητα ροής του δείγματος νερού ορίστηκε στα 10 ml/min και η ταχύτητα έκλουσης στα 5 ml/min. Η απομόνωση και προσυγκέντρωση των ΠΑΥς είναι βασισμένη σε πρότυπη μέθοδο της EPA.²⁰⁶

13.3. Επιλογή στήλης και εκλουστικού συστήματος για το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η επιλογή του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος και της κατάλληλης στήλης υγρής χρωματογραφίας, έχουν μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής μεθόδου, αφού πρωταρχικός στόχος είναι η επίτευξη όσο το δυνατόν καλύτερου διαχωρισμού των ενώσεων. Στη φασματομετρία μαζών, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός δεν έχει πολύ μεγάλη σημασία, αφού και στην περίπτωση που συνεκλούνται δύο ή περισσότερες ουσίες μπορούν να διαχωριστούν οι μάζες τους και άρα να ταυτοποιηθούν. Ωστόσο, αν το σύστημα LC-MS/MS ρυθμιστεί να ανιχνεύει μία μόνο μοριακή μάζα σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα αυξάνεται η ευαισθησία του. Στην περίπτωση των ΠΑΥς, ήταν επιτακτική η ανάγκη χρωματογραφικού διαχωρισμού των ισομερών αναλυτών (βενζο(β)φλουορανθέσιο, βενζο(κ)φλουορανθέσιο, βενζο(α)πυρένιο και βενζο(η,θ,ι)περυλένιο, Ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο αφού οι ενώσεις αυτές δίνουν πανομοιότυπα θυγατρικά φάσματα (Κεφάλαιο 9.1.3) με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει επιλογή συγκεκριμένων μαζών μετάπτωσης για το κάθε ισομερές.

Στην παρούσα εργασία, δοκιμάστηκαν διάφορες στήλες υγρής χρωματογραφίας καθώς και διάφορα εκλουστικά συστήματα, προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των 8 ΠΑΥς. Χαρακτηριστικά δοκιμάστηκαν οι στήλες: Waters Spherisorb (250 x 4.6mm, υλικού πληρώσεως 5μm), Merck Lichospher (250 x 4mm, υλικού πληρώσεως 5μm), Thermo Hypersil gold (100 x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3μm), Zorbax SB-C18 (30 x 2.1 mm, υλικού πληρώσεως 1.8 μm), Restek C-18 (30 x 2.1mm, υλικού πληρώσεως 3μm). Προκειμένου να διαχωριστεί ένα διάλυμα μίγματος πολυκυκλικών αρωματικών υδρογοναθράκων συγκέντρωσης 50 μg/L (500 μg/L για το ναφθαλένιο και το φλουορανθέσιο), σε αυτές τις χρωματογραφικές στήλες, δοκιμάστηκαν διάφορα εκλουστικά συστήματα ακετονιτρίλιου / νερού με ροή 0.5 ml/min (βέλτιστη ροή για σύστημα ιοντισμού με φωτοϊοντισμό-APPI). Πλήρης διαχωρισμός επιτεύχθηκε με τη στήλη C18, 250mm x 3.2mm, υλικού πληρώσεως 4μm (Pinnacle II PAH της Restek) με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης, το οποίο ξεκινούσε από 50:50 σε νερό/ακετονιτρίλιο (Πίνακας 5.8). Με τις υπόλοιπες στήλες και δεδομένων των περιορισμών ροής που τίθενται από το σύστημα ιοντισμού APPI, δεν επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός του Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και του Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρενίου.

Η θερμοκρασία της χρωματογραφικής στήλης ορίστηκε στους 30 °C, λίγο ψηλότερα από την θερμοκρασία περιβάλλοντος (25 °C), προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός των Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρενίου. Ο όγκος της ένεσης ορίστηκε στα 50 μl διαλύματος, δηλαδή ο μέγιστος όγκος του βρόγχου (full loop) που χρησιμοποιήθηκε. Μικρότερος όγκος ένεσης θα οδηγούσε στην ανάπτυξη λιγότερο ευαίσθητης μεθόδου.

13.4. Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού ΠΑΥς στο σύστημα LC-MS/MS

Για την βελτιστοποίηση του σήματος των ΠΑΥς στο φασματογράφο μάζας χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μεμονωμένων ουσιών, συγκέντρωσης 5mgL⁻¹ σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό 50/50 (v/v) με ροή 0,02 ml min⁻¹. Για κάθε ΠΑΥ καταγράφηκαν και επιλέχθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες που αφορούν την πηγή ιοντισμού και την διαδικασία θραυσματοποίησης των μοριακών ιόντων. Όλες οι παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν με πειράματα απευθείας έκχυσης (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά καθώς και με πειράματα έκχυσης πρότυπου διαλύματος μίγματος ΠΑΥς, μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections), παρουσία κινητής φάσης.

13.4.1. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν την θραυσματοποίηση των μοριακών ιόντων

Με την εφαρμοζόμενη τεχνική ιοντισμού APPI παρατηρήθηκαν ιοντισμένα μοριακά ιόντα [M⁺] των ΠΑΥς καθώς και μοριακά ιόντα αυξημένα κατά μία μονάδα μάζας: [M+H]⁺. Ωστόσο, για την διαδικασία θραυσματοποίησης επιλέχθηκαν μόνο τα ιοντισμένα μοριακά ιόντα [M⁺], αφού ανιχνεύθηκαν με μεγαλύτερη ένταση σήματος. Στα περισσότερα από τα ΠΑΥς που αναλύθηκαν, ανιχνεύθηκαν θυγατρικά ιόντα που προέκυψαν ύστερα από σχάση ενός ή δύο ατόμων υδρογόνου από τα αντίστοιχα μοριακά ιόντα (Πίνακας 5.7, Κεφάλαιο 9.1.3.1). Αυτό παρατηρήθηκε για κάποια ΠΑΥς από τους Ding et al,³¹² οι οποίοι προσδιόρισαν ΠΑΥς στον καπνό του τσιγάρου με LC-MS/MS αλλά και από τους Bonilla et al.,³¹³ κατά τον προσδιορισμό ΠΑΥς με GC-MS/MS. Αυτή η συμπεριφορά των ΠΑΥς οφείλεται στην ασυνήθιστη δομική σταθερότητα που παρουσιάζουν τα μόρια αυτά.³¹⁴

13.4.1.1. Προσδιορισμός του Ναφθαλενίου

Το φάσμα μάζας των θυγατρικών ιόντων του ναφθαλενίου που προήλθαν από το φορτισμένο μοριακό ιόν [M]⁺ → 127.9 παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.1. Η καμπύλη

θραυσματοποίησης του ναφθαλενίου, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.2. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν, κυρίως, τα ιόντα με λόγο m/z 102, 127 και 78. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του ναφθαλενίου επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 127 και 102 του μητρικού ιόντος m/z 128. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 102, που είχε και την μεγαλύτερη ένταση.

Το θραύσμα $m/z=127$ αντιστοιχεί σε απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από το μοριακό ιόν $[M-H]^+$ ενώ το $m/z=102$ αντιστοιχεί στο ιόν $[M-(C_2H_2)]^+$.

13.4.1.2. Προσδιορισμός του Ανθρακενίου

Το φάσμα μάζας των θυγατρικών ιόντων του ανθρακενίου, που προήλθαν από το φορτισμένο μοριακό ιόν $[M]^+ \rightarrow 177.9$ παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.3. Η καμπύλη θραυσματοποίησης του ανθρακενίου, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.4. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα ιόντα με λόγο m/z 176 και 152. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του ανθρακενίου επιλέχθηκαν και τα δύο θυγατρικά ιόντα από του μητρικού ιόντος m/z 177.9. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 176, που είχε και την μεγαλύτερη ένταση (Σχήμα 9.3).

Το θραύσμα $m/z=176$ αντιστοιχεί σε απόσπαση δύο ατόμων υδρογόνου από το μοριακό ιόν $[M-2H]^+$ ενώ το $m/z=152^{315}$ αντιστοιχεί στο ιόν $[M-(C_2H_2)]^+$.

13.4.1.3. Προσδιορισμός του Φλουορανθενίου

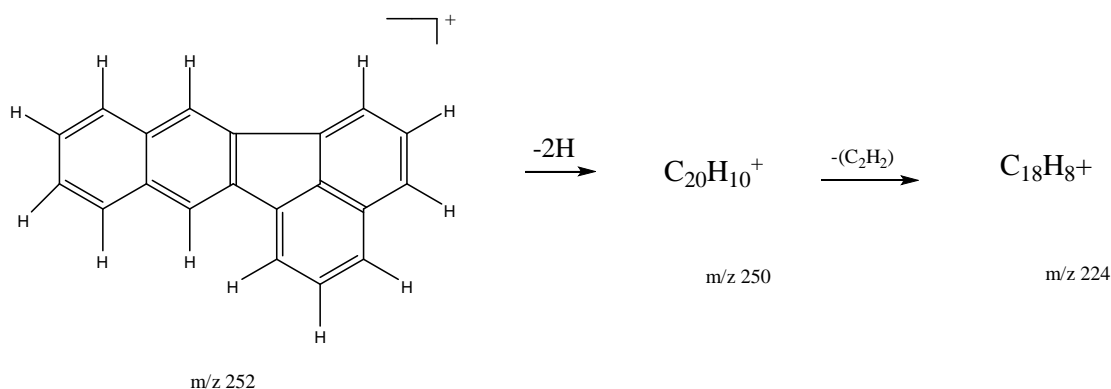
Το φάσμα μάζας των θυγατρικών ιόντων του φλουορανθενίου, που προήλθαν από το φορτισμένο μοριακό ιόν $[M]^+ \rightarrow 202$ παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.5. Η καμπύλη θραυσματοποίησης του φλουορανθενίου, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπου διαλύματος στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.6. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα ιόντα με λόγο m/z 200 και 150. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του ανθρακενίου επιλέχθηκαν και τα δύο θυγατρικά ιόντα του μητρικού ιόντος m/z 202. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 200, που είχε και την μεγαλύτερη ένταση (Σχήμα 9.5).

Το θραύσμα $m/z=200$ αντιστοιχεί σε απόσπαση δύο ατόμων υδρογόνου από το μοριακό ιόν $[M-2H]^+$ ενώ το $m/z=150^{315}$ αντιστοιχεί στο ιόν $[M-(C_4H_4)]^+$.

13.4.1.4. Προσδιορισμός του Βενζο(β)φλουορανθενίου, Βενζο(κ)φλουορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου

Το φάσμα μάζας των θυγατρικών ιόντων των τριών ισομερών Βενζο(β)φλουορανθένιο, Βενζο(κ)φλουορανθένιο και Βενζο(α)πυρενίου, που προήλθαν από τα αντίστοιχα φορτισμένα μοριακά ιόντα $[M]^+ \rightarrow 251.84$, είχε την ίδια εικόνα και στα τρία ισομερή (Σχήμα 9.7). Η καμπύλη θραυσματοποίησης των προαναφερθέντων ισομερών, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπων διαλυμάτων στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.8. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα ιόντα με λόγο m/z 250 και 224. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του Βενζο(β)φλουορανθενίου, Βενζο(κ)φλουορανθενίου και Βενζο(α)πυρενίου επιλέχθηκαν τα θυγατρικά ιόντα m/z 250 και 224 του μητρικού ιόντος m/z 252. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 250.

Το θραύσμα $m/z=250$ αντιστοιχεί σε απόσπαση δύο ατόμων υδρογόνου από το μοριακό ιόν $[M-2H]^+$ ενώ ένας πιθανός μηχανισμός για την θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος στο $m/z=224$ παρουσιάζεται στο Σχήμα 13.1.



Σχήμα 13.1. Προτεινόμενος μηχανισμός θραυσματοποίησης του μοριακού ιόντος m/z 252 προς παραγωγή θυγατρικού ιόντος m/z 224

13.4.1.5. Προσδιορισμός του Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Βενζο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου

Το φάσμα μάζας θυγατρικών ιόντων των δύο ισομερών Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Βενζο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου, που προήλθαν από τα αντίστοιχα φορτισμένα μοριακά ιόντα $[M]^+ \rightarrow 276$ είχε την ίδια εικόνα και στα δύο ισομερή (Σχήμα 9.9). Η καμπύλη θραυσματοποίησης των προαναφερθέντων ισομερών, όπως αυτή προέκυψε με την διαδικασία της απευθείας έγχυσης προτύπων διαλυμάτων στο φασματογράφο μάζας παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.10. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν τα ιόντα με λόγο m/z 274 και m/z 272. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του Βενζο(β)φλουορανθενίου, του Βενζο(κ)φλουορανθενίου και του

Βενζο(α)πυρενίου επιλέχθηκαν και τα δύο θυγατρικά ιόντα m/z 274 και 272 του αντίστοιχου μητρικού ιόντος m/z 276. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίστηκε στο θυγατρικό ιόν m/z 274.

Το θραύσμα $m/z=274$ αντιστοιχεί σε απόσπαση δύο ατόμων υδρογόνου από το μοριακό ιόν $[M-2H]^+$ ενώ το θραύσμα $m/z=272$ αντιστοιχεί σε απόσπαση τεσσάρων ατόμων υδρογόνου από το μοριακό ιόν $[M-4H]^+$.

13.4.1.6. Προσδιορισμός των δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων του Ναφθαλενίου-D8, Ανθρακενίου-D10 και Benzo(α)πυρενίου-D12

Ο προσδιορισμός των δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων του Ναφθαλενίου-D8, Ανθρακενίου-D10, Benzo(α)Πυρενίου-D12, με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας πραγματοποιήθηκε με απευθείας έγχυση μεμονωμένων προτύπων διαλυμάτων (infusion) συγκέντρωσης 5mgL^{-1} , σε διαλύτη ακετονιτρίλιο/νερό (50/50v/v), με ροή $0,02\text{ ml min}^{-1}$. Τα μοριακά ιόντα που ανιχνεύθηκαν ήταν αντίστοιχα με αυτά των μη δευτεριωμένων αναλυτών, προσαυξημένα κατά τόσες μονάδες μάζας όσα και τα δευτέρια κάθε ενός μορίου. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για τα φάσματα μάζας των θυγατρικών ιόντων των δευτεριωμένων αναλυτών. Στα Σχήματα 9.11 έως 9.13 παρατίθενται τα φάσματα μάζας των θυγατρικών ιόντων, για κάθε ένα δευτεριωμένο αναλύτη.

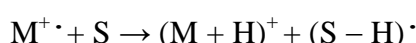
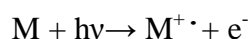
13.4.2. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων που αφορούν στον ιοντισμό των μοριακών ιόντων

Προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι που αφορούν στον ιοντισμό των οκτώ πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, εγχύθηκε πρότυπο διάλυμα μίγματος ΠΑΥς μέσω της βαλβίδας εισαγωγής του οργάνου (loop injections), παρουσία της κινητής φάσης ακετονιτρίλιο/νερό 50/50 v/v με ροή $0,5\text{ml min}^{-1}$.

Τα αρχικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν με ιοντισμό των αναλυτών, μόνο με την APCI τεχνική, δηλαδή με την βοήθεια μιας ακίδας που έφερε ηλεκτρικό φορτίο (10kV). Παρατηρήθηκαν μοριακά ιόντα M^+ καθώς και μοριακά ιόντα προσαυξημένα κατά μία μονάδα μάζας $[M+H]^+$. Η ένταση των μοριακών ιόντων (M^+) των ΠΑΥς ήταν μεγαλύτερη από τα $[M+H]^+$, κάτι που υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός ιοντισμού με μεταφορά φορτίου (charge transfer ionization) κυριαρχεί του μηχανισμού ιοντισμού με μεταφορά πρωτονίων (proton transfer ionization). Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με την αναφορά των Anacleto et al.,³¹⁶ οι οποίοι παρατήρησαν, επιπλέον, ότι το φαινόμενο αντιστρέφεται καθώς μεγαλώνει το μέγεθος των ΠΑΥς. Ωστόσο, κάθε παρόμοιο συμπέρασμα εξαρτάται από τις

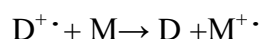
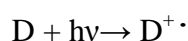
συνθήκες που επικρατούν στην πηγή ιοντισμού, όπως για παράδειγμα τη σύσταση της αέριας φάσης και το δυναμικό ιοντισμού.

Βελτιωμένη ευαισθησία, αλλά παρόμοια εικόνα, παρατηρήθηκε και όταν οι ΠΑΥς ιοντίζονταν ταυτόχρονα με τις τεχνικές APCI και APPI, δηλαδή μέσω ηλεκτρικού φορτίου 10kV και φωτονίων ενέργειας 10eV. Παρατηρήθηκε, δηλαδή, ταυτόχρονη αύξηση στα μοριακά ιόντα M^+ και $[M+H]^+$. Η αύξηση αυτή και των δύο μοριακών ιόντων εξηγείται από την ενίσχυση ιοντισμού των μορίων μέσω φωτονίων ενέργειας 10eV περίπου, σύμφωνα με τις εξής αντίδρασεις :



Όπου S πρωτονιωμένος διαλύτης (Κεφάλαιο 2.2.1.3).

Οι παραπάνω αντιδράσεις παρατηρήθηκαν γιατί η ενέργεια των φωτονίων (10eV) ήταν μεγαλύτερη από την ενέργεια ιοντισμού των οκτώ αναλυτών που προσδιορίστηκαν. (Πίνακας 9.2). Εντούτοις, ο απευθείας ιοντισμός των μορίων μέσω της λάμπας κρυπτού (10eV) βιβλιογραφικά θεωρείται ανεπαρκής, γιατί η ακτινοβολία αυτή έχει μικρή διεισδυτικότητα μέσα σε ένα μίγμα ατμών και αερίων που υπάρχουν στην πηγή ιοντισμού.¹⁴⁹ Γι' αυτό το λόγο η τεχνική ιοντισμού ενισχύεται με την χρήση μίας ένωσης "ενισχυτή (dopant)" (dopant-assisted APPI; DA-APPI), η οποία έχοντας μεγαλύτερη ενέργεια ιοντισμού από τους αναλύτες ιοντίζεται πρώτη και στη συνέχεια ιοντίζει τα προσδιοριζόμενα μόρια μέσω μηχανισμού μεταφοράς φορτίου (Κεφάλαιο 2.2.1.3).



Όπου D (dopant) το μόριο ενισχυτής και M η προσδιοριζόμενη ένωση, στη συγκεκριμένη περίπτωση τα ΠΑΥς.

Η ταυτόχρονη εισαγωγή διαφόρων ενώσεων που λειτουργούν ως ενισχυτές σήματος (dopants) ή μίγματα ενισχυτών σήματος, επηρέασε τον ιοντισμό των ΠΑΥς (Πίνακας 9.2.). Οι ενισχυτές (dopants) που μελετήθηκαν στις συγκεκριμένες συνθήκες ήταν ανισόλη, τολουόλιο, ακετόνη και μίγματα αυτών. Η εισαγωγή των ενισχυτών στην ροή της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκε μέσω ενός «Ταυ» από ανεξάρτητη αντλία, και στη συνέχεια το μίγμα εισάγονταν στο θάλαμο ιοντισμού των μορίων. Η εισαγωγή αυτή ελέγχονταν ηλεκτρονικά μέσω του λογισμικού του συστήματος LC-MS/MS. Για κάθε ΠΑΥ καταγράφονταν οι μεταπτώσεις μάζας από το μητρικό ιόν στο αντίστοιχο θυγατρικό ιον-ποσοτικοποιητή (quantifier ion). Για κάθε ΠΑΥ, ο Πίνακας 9.2 περιλαμβάνει τις ενέργειες ιοντισμού και τις αποκρίσεις σήματος των αναλυτών, μετά από επίδραση διαφόρων

ενισχυτών. Επιπλέον, για κάθε αναλύτη, τα εμβαδά των αποκρίσεων στο σύστημα LC-MS/MS κανονικοποιήθηκαν με βάση την απόκριση από τον ενισχυτή που είχε την σημαντικότερη επίδραση στο σήμα του αναλύτη. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε μία μέρα προκειμένου να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα από τη μεταξύ των ημερών διακύμανση της ακρίβειας. Σε ότι αφορά την διακύμανση της ακρίβειας μέσα στην μέρα που διεξήχθησαν τα πειράματα, ήταν μικρότερη από 3% RSD, οπότε ήταν δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Όλα οι ενισχυτές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη είχαν ενέργειες ιοντισμού μεταξύ των τιμών 8.20-9.70eV ενώ οι ΠΑΥς μεταξύ των τιμών 7.17-8.14eV (Πίνακας 9.2). Η ακετόνη (9.70eV) δεν ήταν αποτελεσματική για τον ιοντισμό των ΠΑΥς, σε δύο ακραίες τιμές ροής που δοκιμάστηκαν (10-100μl/min). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με μελέτες των Itoh et al.,¹¹¹ και Robb et al.,³¹⁷ οι οποίοι επίσης μελέτησαν την ακετόνη, ως ενισχυτή, για την βελτιστοποίηση του ιοντισμού συγκεκριμένων ΠΑΥς. Φαίνεται ότι η επιτάχυνση του ιοντισμού των ΠΑΥς ευνοείται από κατιόντα-ενισχυτές τα οποία μπορούν να σχηματίσουν π-π αλληλεπιδράσεις με τους αναλύτες³¹⁰. Τέτοια μόρια μπορεί να είναι το τολουόλιο, η ανισόλη και διάφορα αλογονομένα βενζόλια. Το τολουόλιο (100μl/min) πράγματι, αποτέλεσε καλύτερο ενισχυτή από την ακετόνη, για τον ιοντισμό των συγκεκριμένων ΠΑΥς, αλλά και σε αυτή την περίπτωση η απόκριση των ΠΑΥς δεν ενισχύθηκε τόσο αποτελεσματικά όσο με 10μl/min ανισόλης (8.20eV). Βιβλιογραφικά έχει διαπιστωθεί ότι το τολουόλιο μπορεί να σχηματίζει μεγάλο πλήθος αντιδράσεων με το ακετονιτρίλιο, εφόσον αυτό υπάρχει στην κινητή φάση του συστήματος και για αυτό το λόγο μειώνεται η ικανότητά του να αντιδρά αποτελεσματικά με τα προσδιοριζόμενα μόρια³¹¹. Μίγματα τολουολίου/ανισόλης (Πίνακας 9.2) επίσης αποδείχθηκαν λιγότερο αποτελεσματικά από την ανισόλη για τον ιοντισμό των ΠΑΥς. Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας, η ανισόλη με ροή 10μl/min αποτέλεσε τον καλύτερο ενισχυτή για όλα τα ΠΑΥς που μελετήθηκαν, με εξαίρεση το ναφθαλένιο, για το οποίο η χρήση μίγματος τολουολίου/ανισόλης (99.5/0.5 % v/v) έδωσε την καλύτερη απόδοση. Ωστόσο, αυτή η αύξηση του σήματος δεν ήταν σημαντική συγκρινόμενη με τη πλήρη απουσία ενισχυτή και ταυτόχρονη παρουσία του συνδυασμού APCI/APPI. Πειράματα που διεξήχθησαν από τους Smith et al.³¹¹ κατέδειξαν, επίσης, ότι η ανισόλη λειτουργεί ως ο καλύτερος ενισχυτής για τον προσδιορισμό των Ανθρακενίου, Βενζο(β)Φλουορανθενίου, Βενζο(κ)Φλουορανθενίου, Βενζο(α)πυρενίου, Βενζο(η,θ,ι)περυλενίου, Ινδανο(1,2,3,γ,δ) πυρενίου με LC-APPI/MSMS ενώ δεν παρατήρησαν το ίδιο και για το Ναφθαλένιο και Φλουορανθένιο για τα οποία μελετήθηκαν νέοι συνδυασμοί ενισχυτών 2,4 διφθοροανισόλης / βρωμοβενζολίου(2,4-difluoroanisole / Bromobenzene) με αναλογία όγκων 0.5/99.5 %v/v αντίστοιχα και 3-(τριφθορομέθυλο) ανισόλη / βρωμοβενζολίου (3-(trifluoromethyl)anisole/Bromobenzene) με αναλογία όγκων 0.5/99.5 % v/v αντίστοιχα .

Τα αποτελέσματα του συνδυασμού των τεχνικών ιοντισμού APCI, APPI με ή χωρίς την παρουσία ενισχυτών (20μl/min ανισόλη), για τον προσδιορισμό των ΠΑΥς παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.17. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι παρακάτω τέσσερις συνδυασμοί τεχνικών ιοντισμού:

- Επίδραση APPI (Kr lamp 10eV)
- Επίδραση APPI και APCI ταυτόχρονα (Λάμπα Kr:10eV μαζί με ρεύμα ιοντισμού-discharge current-10kV)
- Επίδραση APPI σε συνδυασμό με ένωση ενισχυτή (dopant) (Λάμπα Kr:10eV μαζί με 10μl/min ανισόλη)
- Επίδραση APPI σε συνδυασμό με ένωση ενισχυτή (dopant) και ταυτόχρονη λειτουργία APCI (Λάμπα Kr:10eV μαζί με 10μl/min ανισόλη και ρεύμα ιοντισμού-discharge current-10kV)

Η πηγή APPI ελέγχονταν χειροκίνητα μέσω ενός διακόπτη ο οποίος έκλεινε και άνοιγε τη λάμπα φωτοϊοντισμού ενώ η πηγή APCI ελέγχονταν ηλεκτρονικά από το πρόγραμμα έτσι ώστε επιλεκτικά να δίνεται ρεύμα 10kV στην ακίδα μέσα στην πηγή ιοντισμού. Ο προσδιορισμός κάθε ενός αναλύτη πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού των μητρικών και των αντίστοιχων θυγατρικών ιόντων ποσοτικοποίησης (Πίνακας 5.7).

Απο τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.17, γίνεται φανερό ότι για την πλειοψηφία των ΠΑΥς ο ιοντισμός ευνοείται από την παρουσία ανισόλης και λάμπας κρυπτού 10eV (DA-APPI), ωστόσο ευνοείται στον μέγιστο βαθμό από την παρουσία ρεύματος 10kV στην ακίδα του APCI ταυτόχρονα με το συνδυασμό DA-APPI. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το ναφθαλένιο για το οποίο καταλληλότερος συνδυασμός αποδείχτηκε ο συνδυασμός APPI/APCI χωρίς την παρουσία ανισόλης. Το γενικό όμως συμπέρασμα αυτού του πειράματος ήταν ότι οι πηγές ιοντισμού APPI/APCI λειτούργησαν συμπληρωματικά στον αποτελεσματικότερο ιοντισμό των ΠΑΥς. Αυτό το αποτέλεσμα ίσως μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η σχετικά μεγάλη ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (500μl/min) μείωσε την ικανότητα των ενισχυτών να ενισχύουν το σήμα των ΠΑΥς αποτελεσματικά¹⁵¹ και άρα ο συνδυασμός των τεχνικών ιοντισμού αποδείχτηκε εξαιρετικά ωφέλιμος για την ευασθησία της μεθόδου. Η δημιουργία ιόντων από την ταυτόχρονη χρήση των τεχνικών APPI/APCI μπορεί βιβλιογραφικά να οδηγήσει στην ερμηνεία νέων μηχανισμών ιοντισμού μορίων, ωστόσο κάτι τέτοιο ξεφεύγει από τα όρια της παρούσας μελέτης. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν την μοναδική αναφορά αποτελεσματικού ιοντισμού των οκτώ ΠΑΥς με τον συνδυασμό των τεχνικών DA-APPI/APCI στο σύστημα LC-MS/MS.

13.5. Επικύρωση της προτεινόμενης μεθόδου

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού των οκτώ ΠΑΥς, εκτιμήθηκε και ως προς τα χαρακτηριστικά επίδοσής της, σύμφωνα με διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025, Ευρωπαϊκή Οδηγία 657/2002). Οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν: η επάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού των υπό προσδιορισμό ουσιών, η εκλεκτικότητα του προσδιορισμού και οι παρεμποδιστές, η γραμμικότητα και το εύρος των μετρήσεων, η πιστότητα (precision) της μεθόδου, η ορθότητα (accuracy) της μεθόδου, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου. Τα κριτήρια που τίθενται από την Ευρωπαϊκή Οδηγία 657/2002²⁰⁸, για την επιβεβαίωση αναλυτών, στηρίζονται στην εφαρμογή των «μονάδων ταυτοποίησης» (Identification Points, IPs). Συγκεκριμένα η ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας επιτυγχάνεται με την εφαρμογή τουλάχιστο τεσσάρων σημείων επιβεβαίωσης. Το κριτήριο αυτό, στην τεχνική LC-MS/MS, ικανοποιείται με την παρακολούθηση 2 χαρακτηριστικών μεταπτώσεων μάζας από το ίδιο μητρικό ιόν ενός αναλύτη καθώς και προσδιορισμό της μεταξύ τους αναλογίας. Σε ότι αφορά τα ΠΑΥς που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία, οι χαρακτηριστικές μεταπτώσεις μάζας που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.7. Αξίζει να σημειωθεί ότι για τα ζεύγη των αναλυτών που ήταν ισομερή (βενζο(β)φλουορανθένιο, βενζο(κ)φλουορανθένιο, βενζο(α)πυρένιο και βενζο(η,θ,ι)περυλένιο, Ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο), ήταν επιτακτική η ανάγκη του χρωματογραφικού διαχωρισμού, αφού οι ενώσεις αυτές δίνουν πανομοιότυπα θυγατρικά φάσματα (Κεφάλαιο 9.1.3). Για το σκοπό αυτό, η ταυτοποίηση για κάθε ΠΑΥ επιτεύχθηκε με την παρακολούθηση του χρόνου κατακράτησης του συγκεκριμένου αναλύτη, δύο μεταπτώσεων μάζας από το ίδιο μητρικό ιόν καθώς και προσδιορισμό της μεταξύ τους αναλογίας.

Τα κριτήρια αποδοχής που τεθηκαν προκειμένου να θεωρηθεί επαρκής ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν :

1. $t_{R2}-t_{R1} > 0,2 \text{ min}$ για κάθε ζεύγος γειτονικών κορυφών
2. % RSD για τους χρόνους ανάσχεσης $< 2 \%$.
3. $R_s > 0,8$ για όλα τα ζεύγη γειτονικών κορυφών

Από τα ληφθέντα αποτελέσματα (Πίνακας 9.3) φαίνεται ότι ικανοποιούνται τα κριτήρια αποδοχής που αφορούν στην επάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Συγκεκριμένα, η διαφορά των χρόνων ανάσχεσης ήταν μεγαλύτερη από 1.2 min, η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των χρόνων ανάσχεσης ήταν μικρότερη από 0.192% και τέλος ο συντελεστής διαχωρισμού μεγαλύτερος από 4.5 για όλους τους αναλύτες.

Για τον έλεγχο της ταυτοποίησης των ΠΑΥς εξετάστηκαν 2 δείγματα πόσιμου νερού όγκου 1 L εμβολιασμένα με τελική συγκέντρωση έκαστου αναλύτη 0,01μg/L ανά ΠΑΥ (εκτός από το ναφθαλένιο και το φλουορανθένιο, τα οποία έχουν συγκέντρωση 0,1 μg/L) και 2

δείγματα νερού λίμνης όγκου 1 L εμβολιασμένα με τελική συγκέντρωση έκαστου αναλύτη 0,01μg/L ανά ΠΑΥ (εκτός από το ναφθαλένιο και το φλουρανθένιο, τα οποία έχουν συγκέντρωση 0,1 μg/L). Ο λόγος σήματος προς θόρυβο για όλες τις μεταπτώσεις και για όλα τα ΠΑΥς που εξετάστηκαν, ήταν πολύ μεγαλύτερος από $S/N > 3$ για τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις πόσιμων και επιφανειακών νερών.

Ο εντοπισμός πιθανών παρεμποδιστών, πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση 2 δειγμάτων νερού λίμνης όγκου 1L και 2 δειγμάτων νερού του δικτύου ύδρευσης της Αθήνας (βρύση Εργαστηρίου) όγκου 1L. Τα παραπάνω δείγματα θεωρήθηκαν αρχικώς «τυφλά» (μή εμπλουτισμένα με ΠΑΥς) ενώ χρησιμοποιήθηκαν και για τα πειράματα πιστότητας και ακρίβειας. Τα δείγματα αυτά εκχυλίστηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο εκχύλισης-προσυγκέντρωσης και αναλύθηκαν στο σύστημα LC/MS-MS. Δεν υπήρξαν κορυφές ισοδύναμες με >0.003 μg/L ισοδύναμα των βενζο(β)φλουορανθενίου, βενζο(κ)φλουορανθενίου, βενζο(α)πυρενίου, βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και Ινδανο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου σε κανένα από τα παραπάνω δείγματα και 0.010 μg/L ισοδύναμα των Ναφθαλενίου και Φλορανθενίου σε κανένα από τα εξετασθέντα δείγματα επιφανειακού νερού.

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των 8 ΠΑΥς όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 5.4.1 και συγκεκριμένα στον πίνακα 5.9. Από κάθε πρότυπο πραγματοποιήθηκαν 3 ενέσεις στο σύστημα LC-MS/MS. Η πρότυπη καμπύλη για κάθε ΠΑΥ προέκυψε μετά από γραμμική συσχέτιση μεταξύ του πηλίκου του εμβαδού της κορυφής για κάθε μία συγκέντρωση ΠΑΥ με τα εμβαδά δευτεριωμένων ΠΑΥς και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων (η γραμμική συσχέτιση γίνεται με όλα τα σημεία). Συγκεκριμένα: το εμβαδό της κορυφής του ναφθαλενίου διαιρείται με το εμβαδό της κορυφής του ναφθαλενίου-D8, τα εμβαδά των κορυφών ανθρακενίου, φλορανθενίου διαιρούνται με το εμβαδό της κορυφής του ανθρακενίου-D10 και τέλος τα εμβαδά των κορυφών βενζο(β)φλουορανθενίου, βενζο(κ)φλουορανθενίου, βενζο(α)πυρενίου βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και ινδανο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου διαιρούνται με το εμβαδό της κορυφής βενζο(α)πυρενίου-D12. Προσδιορίστηκε η κλίση (b) και η αποτέμνουσα (a) της ευθείας που προκύπτει για κάθε ΠΑΥ. Με βάση τα αποτελέσματα έγινε εκτίμηση της γραμμικότητας και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης R^2 της ευθείας που προκύπτει. Οι ευθείες που προέκυψαν χαρακτηρίζονται από ικανοποιητικές τιμές συντελεστών συσχέτισης, R^2 , οι οποίες ήταν μεγαλύτερες από 0.995 για όλα τα ΠΑΥς, με εξαίρεση το ναφθαλένιο για το οποίο η αντίστοιχη τιμή ήταν 0.9818 9 (Πίνακας 9.4).

Για την εκτίμηση της πιστότητας της μεθόδου εξετάστηκε η επαναληψιμότητα για δύο συγκεντρώσεις των υπό προσδιορισμό ουσιών για πόσιμο και επιφανειακό νερό (Πίνακας 9.5). Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν :

α) η τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας S_r

β) η σχετική τυπική απόκλιση RSD_r

γ) το όριο επαναληψιμότητας r ($r = 2.8 \times S_r$)

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων εκτίμησης της πιστότητας (Πίνακες 9.6 έως 9.9) γίνεται φανερό ότι τα ποσοστά της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD), για τις δύο συγκεντρώσεις και στα δύο είδη δειγμάτων (πόσιμο και επιφανειακό) ήταν μικρότερα από 19.5%. Η οδηγία SANCO 3131²¹⁵ αναφέρει ως αποδεκτά ποσοστά σχετικής τυπικής απόκλισης αυτά που βρίσκονται κάτω από 20%.

Ο υπολογισμός των ανακτήσεων των υπό προσδιορισμό ουσιών πραγματοποιήθηκε για δύο συγκεντρώσεις 0,010 και 0,100 $\mu\text{g/L}$ για όλα τα ΠΑΥς εκτός του ναφθαλενίου και του φλορανθενίου για τα οποία οι συγκεντρώσεις είναι 0,100 και 1 $\mu\text{g/L}$ και για τα δύο είδη δειγμάτων, πόσιμο και επιφανειακό νερό. Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκαν 6 τουλάχιστον προσδιορισμοί σε κάθε μία από τις δύο συγκεντρώσεις και για κάθε ΠΑΥ, σύμφωνα με τον Πίνακα 9.5. Στους Πίνακες 9.10 έως 9.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάκτησης της προτεινόμενης μεθόδου. Ως κριτήριο αποδοχής για την μέση ανάκτηση μιας προτεινόμενης ουσίας, θεωρείται η τιμή $\bar{R} > 50\%$ όταν η ποσότητα της αναλυόμενης ουσίας είναι μικρότερη από το ένα δισεκατομμυριοστό των μερών του διαλύματος (sub ppb level)²⁸⁷. Επιπλέον, η οδηγία 2002/657 αναφέρει ως αποδεκτά ποσοστά μέσης ανάκτησης αυτά που βρίσκονται στα όρια 70-120%. Τα αποτελέσματα των ποσοστών ανάκτησης της προτεινόμενης μεθόδου κυμάνθηκαν από 72.8-121.5%. Με δεδομένο επίσης ότι η επαναληψιμότητα των πειραμάτων ανάκτησης βρισκόταν σε πολύ ικανοποιητικά όρια ($RSD_{Rec} < 20\%$), η προτεινόμενη μέθοδος πληρεί τα κριτήρια που αφορούν την ορθότητα.

Τα υπολογιζόμενα όρια ανίχνευσης, που υπολογίστηκαν θεωρητικά (Κεφάλαιο 9.1.10) επαληθεύτηκαν πειραματικά με την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων πόσιμου και επιφανειακού νερού. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής θεσπίστηκαν νέα πολύ αυστηρότερα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια ΠΑΥς στα νερά (Ευρωπαϊκή οδηγία 2008/105/EK). Γι' αυτό το λόγο θεωρήθηκε αναγκαίο να μελετηθούν εκ νέου τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου με βάση το λόγο σήματος αναλυτών προς θόρυβο ($S/N > 3$). Από τα αποτελέσματα (Πίνακες 9.14 και 9.15.), γίνεται φανερό ότι η μέθοδος παρουσιάζει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης. Συγκεκριμένα για τα βενζο(β)φλουορανθέσιο, βενζο(κ)φλουορανθέσιο, βενζο(α)πυρένιο βενζο(η,θ,ι)περυλένιο και ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο τα όρια ανίχνευσης ήταν 0.0005 $\mu\text{g/L}$, ενώ για το ναφθαλένιο, ανθρακένιο, φλορανθέσιο 0.005 $\mu\text{g/L}$, 0.002 $\mu\text{g/L}$ και 0.005 $\mu\text{g/L}$ αντίστοιχα. Η προτεινόμενη μέθοδος παρουσιάζει πολύ ικανοποιητικά όρια ανίχνευσης και είναι συμβατή με την πρόσφατη οδηγία 2008/105/EK, στην οποία αναφέρονται τα παρακάτω ανώτατα επιτρεπόμενα όρια στα επιφανειακά ύδατα:

2.4 μgL^{-1} για το ναφθαλένιο, 0.1 μgL^{-1} για το ανθρακένιο και φλουορανθένιο, 0.05 μgL^{-1} για το βενζο(α)πυρένιο, 0.03 μgL^{-1} για το άθροισμα βενζο(β)φλουορανθενίου και βενζο(κ)φλουορανθενίου, 0.002 μgL^{-1} για το άθροισμα βενζο(η,θ,ι)περυλενίου και ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρενίου.

Προκειμένου να μελετηθεί η ανθεκτικότητα της μεθόδου σε μεταβολές των πειραματικών συνθηκών, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων στα αποτελέσματα της ανάλυσης. Οι παράγοντες αυτοί ήταν η ταχύτητα ροής του δείγματος στην τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE), η θερμοκρασία εξάτμισης του εκχυλίσματος και ο όγκος του διαλύματος έκπλυσης της φιάλης του δείγματος. Από τα αποτελέσματα αυτά (Κεφάλαιο 9.1.11), συμπεραίνεται ότι η διακύμανση των τιμών των τριών παραγόντων που μελετήθηκαν, μέσα στα όρια της παρούσας μελέτης, δεν έχει σημαντική επίδραση στα αποτελέσματα. Επομένως η μέθοδος είναι ανθεκτική ως προς τους παραπάνω παράγοντες και δεν απαιτούνται επιπλέον μέτρα για τον έλεγχο των παραγόντων αυτών.

Η προτεινόμενη μέθοδος προσδιορισμού πληρεί όλα τα κριτήρια που έχουν τεθεί από διεθνή πρότυπα (π.χ. ISO 17025) και επιπλέον αποτελεί την μοναδική μέθοδο ταυτόχρονου προσδιορισμού των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων που έχουν οριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως ρύποι προτεραιότητας σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, με LC-APPI-MS/MS. Μπορεί να εφαρμοστεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό και ταυτοποίηση των προαναφερθέντων ΠΑΥς σε πόσιμα και επιφανειακά νερά, αφού η τεχνική υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου αποτελεί εξ ορισμού μέθοδο επιβεβαίωσης χημικών ουσιών. Η προτεινόμενη μέθοδος έχει, πλέον, ιδιαίτερη σημασία, δεδομένων των πολύ χαμηλών ανώτατων επιτρεπόμενων ορίων που υπαγορεύονται από την πρόσφατη οδηγία 2008/105/EK.

13.6. Εφαρμοσιμότητα της μεθόδου. Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε στην ανάλυση πραγματικών επιφανειακών και πόσιμων υδάτων. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες επιφανειακού ύδατος από την λίμνη του Μαραθώνα και πόσιμου νερού από διάφορες δεξαμενές διυλιστηρίων της ΕΥΔΑΠ. Η απομόνωση των ΠΑΥς πραγματοποιήθηκε με την SPE μέθοδο που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 5.4.2 και στη συνέχεια τα προσυγκεντρωμένα δείγματα αναλύονταν στο σύστημα LC/MS/MS.

Ναφθαλένιο και φλουορανθένιο προσδιορίστηκαν σε όλα τα πόσιμα και επιφανειακά υδατικά δείγματα σε συγκεντρώσεις κάτω από 0.010 $\mu\text{g/L}$, ενώ οι υπόλοιπα ΠΑΥς (ανθρακένιο, βενζο(β)φλουορανθένιο, βενζο(κ)φλουορανθένιο, βενζο(α)πυρένιο βενζο(η,θ,ι)περυλένιο και ινδενο(1,2,3,γ,δ)πυρένιο) δεν ανιχνεύθηκαν ή ανιχνεύθηκαν σε

συγκεντρώσεις κάτω από 0.003μg/L. Οι ευρεθείσες συγκεντρώσεις του ναφθαλενίου και φλορανθενίου, στα πραγματικά δείγματα, ήταν η αιτία για τα υψηλότερα επίπεδα στα οποία επικυρώθηκε η προτεινόμενη μέθοδος για αυτούς τους δύο αναλύτες.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Οι κυριότερες συντομογραφίες που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή είναι οι παρακάτω:

1,2-DBE: 1,2-Dibromoethane, 1,2-Διβρωμοαιθάνιο

A.U: Arbitrary Units, Αυθαίρετες Μονάδες Μέτρησης

ACN: Acetonitril, Ακετονιτρίλιο

Adda: ((2S, 3S, 8S, 9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-diene acid, [(2S, 3S, 8S, 9S)-3-αμινο-9-μέθοξυ-2, 6, 8-τριμέθυλ-10-φένυλδεκα-4, 6-διενοϊκό οξύ]

Anthr-D10: Anthracene-D10, Ανθρακένιο D-10

Anthr: Anthracene, Ανθρακένιο

APCI: Atmospheric Pressure Chemical Ionization, Χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης

APPI: Atmospheric Pressure Photo Ionization, Φωτοϊοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης

B(a)P D-12: Benzo(a)pyrene D-12, Βενζο(α)πυρένιο D-12

B(a)P: Benzo(a)pyrene, Βενζο(α)πυρένιο

B(b)F: Benzo(b)fluoranthene, Βενζο(β)Φλουορανθένιο

B(k)F: Benzo(k)fluoranthene, Βενζο(κ)Φλουορανθένιο

B(g,h,i)P: Benzo(g,h,i)perylene, Βενζο(η,θ,ι)περυλένιο

CAS No: Chemical Abstracts Service Numbers, Αριθμοί σήμανσης χημικών από την υπηρεσία των Χημικών Περιλήψεων

CE : Collision Energy, Ενέργεια σύγκρουσης

CFCs: Chlorofluorocarbons, Χλωροφθοράνθρακες

CI: Chemical Ionization, Χημικός ιοντισμός

CWA: Clean Water Act, Δράση για το καθαρό νερό

D: Dopant, Ενισχυτής

DHHS: Department of Health and Human Services, Τμήμα για την υγεία και την ανθρώπινη εξηγηρέτηση

ECD: Electron Capture Detector, Ανιχνευτής δέσμευσης ηλεκτρονίων

EE: European Union, Ευρωπαϊκή Ένωση

EI: Electron Impact, Πρόσκρουση ηλεκτρονίων

EPA: Environmental Protection Agency, Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος

ESI: Electron Spray Ionization, Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό

FD&C: Food, Drug and Cosmetic Act, Δράση για τα τρόφιμα, φάρμακα και καλλυντικά

FL: Fluorescence, Φθορισμός

Fluor: Fluoranthene, Φλουρανθένιο

FWHM: Full Width Half Maximum, Μέγιστο πλάτος στο μισό του ύψους χρωματογραφικής κορυφής

GC: Gas Chromatography, Αέρια χρωματογραφία

GC-MS: Gas Chromatography Mass Spectrometry, Αέρια Χρωματογραφία Φασματομετρία Μάζας

HMTA: Hazardous Material Transportation Act, Δράση για την μεταφορά βλαβερών υλικών

HS-SPME: Head Space Solid Phase Microextraction, Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης από τον εναέριο υπερκείμενο χώρο

IARC: International Agency for Research on Cancer, Διεθνής εταιρεία για την έρευνα του καρκίνου

Indeno: Indeno(1,2,3,c,d)pyrene, Ινδενο(1,2,3,γ,δ) πυρένιο

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry, Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας

LC: Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία

LC-MS/MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας

m/z: Mass-to-Charge ratio, Αναλογία Μάζας προς Φορτίο

LD₅₀: Lethal Dose, Δόση που συνεπάγεται το θάνατο του 50% ενός πληθυσμού

LLE: Liquid Liquid Extraction, Υγρή υγρή εκχύλιση

LOD: Limit of Detection, Όριο ανίχνευσης

LOQ: Limit of Quantification, Όριο ποσοτικοποίησης

LPS: Lipopolysaccharide, λιποπολυσακχαρίτες

MC LA: Microcystin LA, Μικροκυστίνη LA

MC LR: Microcystin LR, Μικροκυστίνη LR

MC RR: Microcystin RR, Μικροκυστίνη RR

MC YR: Microcystin YR, Μικροκυστίνη YR

Mdhb: 2-(methylamino)-2-dehydrobutyric acid, : 2-(μεθυλάμινο)-2-δεϋδροβουτυρικό οξύ,

MS: Mass Spectrometry, Φασματομετρία Μάζας

Naphth D-8: Naphthalene D-8, Ναφθαλένιο D-8

Naphth: Naphthalene, Ναφθαλένιο

Nod: Nodularin, Νοντουλαρίνη

OSHA: Occupational Safety and Health Administration, Επαγγελματική ασφάλεια και διεύθυνση υγείας

PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Πολυκυκλικοί Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες

PCB 101: Polychlorinated Biphenyl 101, [2,2',4,5,5'-πεντάχλωροδιφαινύλιο]

PCB 118: Polychlorinated Biphenyl 118, [2,3',4,4',5- πεντάχλωροδιφαινύλιο]

PCB 138: Polychlorinated Biphenyl 138, [2,2',4,4',5,5'- εξάχλωροδιφαινύλιο]

PCB 153: Polychlorinated Biphenyl 153, [2,2',3,4,4',5'- εξάχλωροδιφαινύλιο]

PCB 180: Polychlorinated Biphenyl 180, [2,2',3,4,4',5,5'- επτάχλωροδιφαινύλιο]

PCB 28: Polychlorinated Biphenyl 28, [2,4,4'-τρίχλωροδιφαινύλιο]

PCB 52: Polychlorinated Biphenyl 52, [2,2',5,5'-τετράχλωροδιφαινύλιο]

PCBs: Polychlorinated Biphenyls, Πολυχλωριωμένα διφαινύλια

PCBzs: polychlorobenzenes, Πολυχλωροβενζόλια

PCDDs: dibenzo-p-dioxins, Διβενζο-π-διοξίνες

PCDFs: dibenzofurans, Διβενζοφουράνια

PDA: Photodiode array, Φωτοδίοδοι

p-DCB: para-Dichlorobenzene, Παραδιχλωροβενζόλιο

PDMS: Polydimethylsiloxane, Πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο

PVC: Polyvinylchloride, Πολυβινυλοχλωρίδιο,

R: Recovery, Ανάκτηση

r: Repeatability Limit “r”, Όριο επαναληψιμότητας

Rs: Resolution, Διαχωριστότητα

RSD: Relative Standard Deviation, Σχετική Τυπική Απόκλιση

RSDr: Relative Standard Deviation- repetability, Σχετική Τυπική Απόκλιση – επαναληψιμότητα

RSDR: Relative Standard Deviation- reproducibility, Σχετική Τυπική Απόκλιση – αναπαραγωγιμότητα

Rt: Retention time, Χρόνος κατακράτησης

S: Solvent, Διαλύτης

SDEV: Standard Deviation, Τυπική Απόκλιση

SIM: Selected Ions Monitoring, Επιλεκτική παρακολούθηση ιόντων

SPE: Solid Phase Extraction, Εκχύλιση στερεάς φάσης

SPME: Solid Phase Microextraction, Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

Sr: repeatability standard deviation, Τυπική απόκλιση επαναληψιμότητας,

SRM: Selected Reaction Monitoring, Επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης

Std: Standard, Πρότυπο

Tandem MS: Tandem Mass Spectrometry, Φασματομετρία Μαζών σε σειρά

TSCA: Toxic Substances Control Act, Δράση Ελέγχου τοξικών ουσιών

UPLC: Ultra Pressure Liquid Chromatography, Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης

UV: Ultra Violet, Υπεριώδες

WHO: World Health Organization, Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

ΕΥΔΑΠ: Εταιρεία Ύδρευσης και Αποχέτευσης Αθήνας

ΚΥΑ: Κοινή Υπουργική Απόφαση

ΠΑΥς: Πολυκυκλικοί αρωματικοί Υδρογονάνθρακες

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Durfee R. L., Contos G., Whitmore F. C., Barden J. D., Hackman E. E. III, Westin R. A., "PCBs in the United States-Industrial Use and Environmental Distributions" *EPA 560/6-76-005, NTIS No. PB252 012, Prepared for the Office of Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency (USEPA): Washington, DC, 1976*
2. Erickson M. D., "Analytical Chemistry of PCBs", *Lewis Argonne, Illinois, 1997.*
3. Ballschmiter K., Zell M., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1980, 302, 20-31.*
4. Mackay D., *Environmental Science & Technology, 1982, 16, 274-278.*
5. Hong C.-S., Qiao H., *Chemosphere, 1995, 31, 4549-4557.*
6. Courtney W. A. M., Denton G. R. W., *Environmental Pollution (1970), 1976, 10, 55-64.*
7. Panshln S. Y., Hites R. A., *Environmental Science & Technology, 1994, 28, 2008-2013.*
8. Mackay D., Shiu W., "Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals" *Lewis, Chelsea, Michigan, 1992.*
9. Li A., Doucette W. J., Andren A. W., *Chemosphere, 1992, 24, 1347-1360.*
10. EPA, *2005 40 CFR Part 761.*
11. Bergman A., Hagman A., Jacobsson S., Jansson B., Ahlman M., *Chemosphere, 1984, 13, 237-250.*
12. Faengmark I., Van Bavel B., Marklund S., Stroemberg B., Berge N., Rappe C., *Environmental Science & Technology, 1993, 27, 1602-1610.*
13. Travis C. C., Hester S. T., *Environmental Science & Technology, 1991, 25, 814-819.*
14. Murphy T. J., Formanski L. J., Brownawell B., Meyer J. A., *Environmental Science & Technology, 1985, 19, 942-946.*
15. Gartrell M. J., Craun J. C., Podrebarac D. S., Gunderson E. L., *J. Assoc. Off. Anal. Chem. ; Vol/Issue: 69:1, 1986, Pages: 146-161.*
16. WHO, "Levels of PCBs, PCDDs, and PCDFs in breast milk", *Conpenhagen, Denmark, 1989.*
17. United Nations E. P., *Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances-Mediterranean REGIONAL REPORT, December 2002.*
18. Novak M. A., Reilly, A., Jackling, S. J., *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1988, 17, 699-710.*
19. Weaver G., *Environmental Science. Technology. Vol/Issue: 18:1, 1984, 22A-27A.*
20. Hileman B., *Chemical & Engineering News, 1988, 66, 22*
21. Jeremiason J. D., Hornbuckle K. C., Eisenreich S. J., *Environmental Science & Technology, 1994, 28, 903-914.*
22. Fytianos K., Charitonidis S., Albanis T., Konstantinou I., Seferlis M., *Journal of Environmental Science & Health A, 1997, 32, 333-345.*
23. Goutner V., Albanis T., Konstantinou I., Papakonstantinou K., *Marine Pollution Bulletin, 2001, 42, 377-388.*
24. Williamson K. S., Petty J. D., Huckins J. N., Lebo J. A., Kaiser E. M., *Chemosphere, 2002, 49, 703-715.*
25. Martinez E., Gros M., Lacorte S., Barcelo D., *Journal of Chromatography A, 2004, 1047, 181-188.*

26. Commission E., "Ambient air pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). Position Paper", *European Commission*, 2001.
27. Phillips D. H., *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1999, 443, 139-147.
28. Chang C.-T., Chen B.-Y., *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 153, 1262-1269.
29. Bispo A., Jourdain M. J., Jauzein M., *Organic Geochemistry*, 1999, 30, 947-952.
30. Fernandez-Gonzalez V., Muniategui-Lorenzo S., Lopez-Mahia P., Prada-Rodriguez D., *Journal of Chromatography A*, 2008, 1207, 136-145.
31. "Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy", Official Journal of the European Union, L327, Directive 2000/60/EC, 22nd December, 2000
32. "Directive 2008/105/EC Of The European Parliament And Of The Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council", European Parliament And The Council 348/84, Directive 2008/105/EC, 24.12.2008.
33. EPA, "Ambient water criteria for PAH", EPA : Washington D.C.,440/5-80-069, 1980
34. Keith L., Telliard W., *Environmental Science & Technology*, 2003, 13, 416-423.
35. Roytech publications "Section B. Clean water act requirements", *Roytech publications, Inc. USA*, 1993.
http://www.epa.gov/oppt/dfe/pubs/pwb/tech_rep/fedregs/regsectb.htmSuspect
36. Harvey R. G., "Polycyclic aromatic Hydrocarbons-Chemistry and Carcinogenicity", *University press, Cambridge*, 1991.
37. Bjorseth A., Ramdahl T., "Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons", 1985.
38. Reza D., Ilia N. I., *Photochemistry and Photobiology*, 1999, 70, 10-34.
39. Lippold H., Gottschalch U., Kupsch H., *Chemosphere*, 2008, 70, 1979-1986.
40. Galarneau E., *Atmospheric Environment*, 2008, 42, 8139-8149.
41. Atanassova I., Brómmer G. W., *Geoderma*, 2004, 120, 27-34.
42. Kristensson A., Johansson C., Westerholm R., Swietlicki E., Gidhagen L., Wideqvist U., Vesely V., *Atmospheric Environment*, 2004, 38, 657-673.
43. Κουϊμτζής Θ., Φυτιάνος Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ., "Χημεία Περιβάλλοντος", *University Studio Press, Θεσσαλονίκη*, 1998.
44. Edwards N. T., *J Environ Qual*, 1983, 12, 427-441.
45. Lipiatou E., Saliot A., *Marine Chemistry*, 1991, 32, 51-71.
46. Khalili N. R., Scheff P. A., Holsen T. M., *Atmospheric Environment*, 1995, 29, 533-542.
47. Φυτιάνος Κ., "Η ρύπανση των θαλασσών", *University Studio Press, Θεσσαλονίκη*, 1996.
48. Bomboi M. T., Hernandez A., *Water Research*, 1991, 25, 557-565.
49. Wake H., *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2005, 62, 131-140.
50. Lu R., Wu J., Turco R. P., Winer A. M., Atkinson R., Arey J., Paulson S. E., Lurmann F. W., Miguel A. H., Eiguren-Fernandez A., *Atmospheric Environment*, 2005, 39, 489-507.

51. Tanacredi J. T., *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 1977, 49, 216-226.
52. Shiraishi H., Pilkington N. H., Otsuki A., Fuwa K., *Environmental Science & Technology*, 2002, 19, 585-590.
53. Kveseth K., Sortland B., Bokn T., *Chemosphere*, 1982, 11, 623-639.
54. Johnsen S., Gribbestad I. S., Johansen S., *Science of The Total Environment*, 1989, 81-82, 231-238.
55. Dong T. T. T., Lee B.K., *Chemosphere*, 2009, 74, 1245-1253.
56. Toyooka T., Ibuki Y., *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, 23, 256-263.
57. Bedding N. D., McIntyre A. E., Lester J. N., *Science of the Total Environment*, 1983, 27, 163-200.
58. Bedding N. D., McIntyre A. E., Perry R., Lester J. N., *Science of the Total Environment*, 1983, 26, 255-312.
59. Bedding N. D., McIntyre A. E., Perry R., Lester J. N., *Science of the Total Environment*, 1982, 25, 143-167.
60. Yan J., Wang L., Fu P. P., Yu H., *Mutation Research*, 2004, 557, 99-108.
61. "Air Pollution, Part 1, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures", IARC: Lyon, France International Agency for Research on Cancer, 92, 2008.
62. Asplund G., Grimvall A., *Environmental Science & Technology*, 2002, 25, 1346-1350.
63. Ballschmiter K., *Chemosphere*, 2003, 52, 313-324.
64. Rowland S. F., *CFCs and Stratospheric Ozone 1990*, 19, 281-292.
65. "11th Report on Carcinogens- 1,4-Dichlorobenzene, CAS No. 106-46-7", U.S. Department of Health and Human Services 1989.
66. Tsimeli K., Triantis T. M., Dimotikali D., Hiskia A., *Analytica Chimica Acta*, 2008, 617, 64-71.
67. Tananaki C., Thrasylvoulou A., Karazafiris E., Zotou A., *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23, 159-163.
68. Bogdanov S., *Apidologie*, 2006, 37, 1-18.
69. IARC., "Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine, and Hydrogen Peroxide. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans", IARC: Lyon, France International Agency for Research on Cancer, 199, 71, 1589.
70. IARC., "Some Fumigants, the Herbicides 2,4-D and 2,4,5-T, Chlorinated Dibenzodioxins and Miscellaneous Industrial Chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans", Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1977, 15, 1-354.
71. FDA U. S., "Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed, (accessed on 12 May 2011)." <http://www.cfsan.fda.gov/%7Elrd/fdaact.html#ethy>
72. U.S. Department of Health and Human Services "11th Report on Carcinogens- 1,2-Dibromoethane (Ethylene Dibromide) CAS No. 106-93-4", U.S. Department of Health and Human Services, 1981.
73. WHO, "Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management." 1999.
74. Mann N. H., Carr N. G., "Photosynthetic Prokaryotes, Biotechnology Handbooks", Plenum Press, London, 1992 Vol. 6.
75. Rai A. N., "CRC Handbook of Symbiotic Cyanobacteria", CRC Press, 1990.

76. Skulberg O. M., "Hydrogen Energy System. Production and Utilization of Hydrogen and Future Aspects Biophotolysis-Hydrogen production and algal culture technology", *NATO ASI Series E, Applied Sciences Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, Vol. 295.*
77. Carmichael W. W., *J. Appl. Bacteriol.*, 1992, 72, 445-459.
78. Lanaras T., Cook C.M., *Science of Total Environment*, 1994, 142.
79. Francis G., *Nature*, 1878 18, 11-12.
80. Codd G. A., "Harmful Algae News, IOC of UNESCO", *United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, Paris, 1996, Vol. 15, 4.*
81. Meriluoto J., Codd G. A., "Toxic, Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxins Analysis", *Abo Akademi University Press, 2005.*
82. Rodhe W., "Crystallization of eutrophication concepts in North Europe. Eutrophication, Causes, Consequences, Correctives", *National Academy of Sciences, Washington D.C, 1969*
83. International Lake Environment Committee (ILEC) U. N. E. P., Institute L. B. R., Survey of the State of the World's Lakes, ILEC/Lake Biwa Research Institute, 1988-1993.
84. Zohary T., Roberts R. D., *Journal of Plankton Research*, 1990 12, 423.
85. Yoo S., Carmichael W.W., Hoehn R.C., Hrudehy S.E., "Cyanobacterial (Bluegreen Algal) Toxins. A Resource Guide" *American Water Works Association Research Foundation, Denver, Colorado, 1995.*
86. Resson R., Soong F.S., Fitzgerald J., Turczynowicz L., El Saadi O., Roder D., Maynard T. and Falconer I., "Health Effects of Toxic Cyanobacteria (Blue-green Algae). National Health and Medical Council", *The Australian Government Publishing Service, Canberra, Australia, 1994*
87. Whitton B. A., Potts M., "The ecology of cyanobacteria", *Kluwer Academic, 2000.*
88. Humm H. J., Wicks S. R., "Introduction and Guide to the Marine Bluegreen Algae", *John Wiley & Sons, New York, 1980.*
89. Reed R. H., Chudek J.A., Foster R. and Stewart W.D.P., *Arch. Microbiol.*, 1984, 138, 333-337.
90. Bautista L. J. M., Rindi F., Casamatta D., "Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments: The Systematics of Subaerial Algae", *Springer Netherlands, 2007, Vol. 11.*
91. Holland H. D., *Science*, 1997, 275, 38-39.
92. Douglas S.E., "Molecular Biology of Cyanobacteria-Chloroplast origins and evolution", D.A. Bryant [Ed.] *The Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994*
93. Bryant D. A., "The Molecular Biology of Cyanobacteria", *Springer (Kluwer Academic Publisher), Pennsylvania, 1994.*
94. Flores E., "The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution", *Horizon, 2008.*
95. Carmichael W.W., Beasley V.R., Bunner D.L., Eloff J.N., Falconer I., Gorham P., Harada K.I., Krishnamurthy T., Yu M.J., Moore R.E., Rinehart K., Runnegar M., Skulberg O.M. and Watanabe M. , *Toxicon*, 1988, 26, 971-973.
96. Namikoshi M., Sun F., Choi B.W., Rinehart K.L., Carmichael W.W., Evans W.R. and Beasley V.R., *Journal of Organic Chemistry*, 1995, 60, 3671-3679.
97. de Silva E. D., Williams D.E., Andersen R.J., Klix H., Holmes C.F.B. and Alien T.M., *Tetrahedron Letters*, 1992, 33, 1561-1564.

98. Rudolph-Böhner S., Mierke D.F., Moroder L., *FEBS Letters*, 1994, 349, 319-323.
99. Annala A., Lehtimäki J., Manila K., Eriksson J.E., Sivonen K., Rantala T.T. and Drakenberg T, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271, 16695-16702.
100. Barford D., Keller J., *J Molecular Biol*, 1994, 235, 763-766.
101. Goldberg J., Huang H.B., Kwon Y.G., Greengard P., Nairn A.C. and Kuriyan J. , *Nature*, 1995, 376, 745-753.
102. Harada K.-I., Matsuura K., Suzuki M., Watanabe M.F., Oishi S., Dahlem A.M., Beasley V.R. and Carmichael W.W., *Toxicon*, 1990, 28, 55-64.
103. Rinehart K. L., Namikoshi M. and Choi B.W. , *Journal of Applied Phycology*, 1994, 6, 159-176.
104. Choi B. W., Namikoshi M., Sun F., Rinehart K.L., Carmichael W.W., Kaup A.M., Evans W.R. and Beasley V.R., *Tetrahedron Letters*, 1993, 34, 7881-7884.
105. Heinze R., *Environental Toxicology*, 1999, 14, 57-60.
106. Fawell J. K., Mitchell R. E., Everett D.J., Hill R.E., *Human & Experimental Toxicology*, 1999, 18, 162-167.
107. Hooser S. B., Beasley V.R., Basgall, E.J., Carmichael W.W. and Haschek W.M., *Vet. Pathol.*, 1990, 27, 9-15.
108. Pilotto L. S., Douglas R. M., Burch M.D., Cameron S., Beers M., Rouch G.J., Robinson P., Kirk M., Cowie C. T., Hardiman S., Moore C., Attewell R.G., *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 1997, 21, 562-566.
109. Falconer I. R., *Environmental Toxicology & Water Quality*, 1991, 6, 177-184.
110. Ito E., Kondo F., Terao K. and Harada K.I., *Toxicon*, 1997, 35, 1453-1457.
111. Itoh N., Aoyagi Y., Yarita T., *Journal of Chromatography A*, 2006, 1131, 285-288.
112. Sivonen K., Kononen K., Esala A. L., Niemelä S. I., *Hydrobiologia*, 1989, 185, 3-8.
113. Yoshizawa S., Matsushima R., Watanabe M.F., Harada K.I., Ichihara A., Carmichael W.W. and Fujiki H. , *J. Cancer Res. din. Oncol*, 1990, 116, 609-614.
114. Tisdale E., *Am. J. Public Health*, 1931, 21, 198-200.
115. Zilberg B. C., *Afr. J. Med*, 1966, 12, 164-168.
116. Teixeira M. G. L. C., Costa, M.C.N., Carvalho, V.L.P., Pereira, M.S. and Hage, E., *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 1993, 27, 244-253.
117. Falconer I. R., "Cyanobacterial Toxins in Drinking Water Supplies", *CRC Press*, 2002.
118. Ueno Y., Nagata S., Tsutsumi T., Hasegawa A., Watanabe M. F., Park H.-D., Chen G.-C., Chen G., Yu S.-Z., *Carcinogenesis*, 1996, 17, 1317-1321.
119. WHO, "Guidelines for Drinking Water Quality", *Recommendations, World Health Organization, Geneva.*, 1993, Vol. 1.
120. WHO, "Guidelines for Drinking Water Quality", *Health Criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva*, 1996, Vol. 2.
121. Skoog D. A., Holler F.J., Nieman T.A., "Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης", (μτφ. Μ. Καραγιάννης, Κ. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης), *Κωσταράκης, Αθήνα*, 2003
122. Παπαδογιάννης Ι. Ν., Σαμανίδου Β. Φ., "Ενόργανη Χημική Ανάλυση", *Πήγασος Θεσσαλονίκη*, 1996.
123. Lovelock J. E., *Journal of Chromatography A*, 1974, 99, 3-12.

124. Pellizzari E. D., *Journal of Chromatography A*, 1974, 98, 323-361.
125. de Hoffmann E., Stroobant V., "Mass Spectrometry, Principles and Applications", *second edition. London, J. Wiley, 2001.*
126. Στράτης Ι., Ζαχαριάδης Γ., Σαμανίδου Β., Θεωδορίδης Γ., "Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης" *Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 2003, Vol. 10-12,*
127. Thermo Electron, "Notes from the Thermo Electron European Training Institute".
128. Chapman S., *Physical Review*, 1937, 10, 184.
129. Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., Alice M. B., *The Journal of Chemical Physics*, 1968, 49, 2240-2249.
130. Mack L. L., Kralik P., Rheude A., Dole M., *The Journal of Chemical Physics*, 1970, 52, 4977-4986.
131. Yamashita M., Fenn J. B., *Journal of Physical Chemistry*, 1984, 88, 4451.
132. Fenn J. B., *Journal of Biomolecular Techniques* 2002, 13, 101-118.
133. Fenn J. B., *Angewandte Chemie International Edition*, 2003, 42, 3871-3894.
134. Sjoberg P. J. R., Bokman C. F., Bylund D., Markides K. E., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2001, 12, 1002-1010.
135. Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., Alice M. B., *J Chem Phys*, 1968, 49, 2240-2249.
136. Iribarne J.V., Thomson BA., *Journal of Chemical Physics*, 1976, 64, 2287-2294.
137. Cech N. B., Enke C. G., *Mass Spectrometry Reviews*, 2001, 20, 362-387.
138. Bruins A. P., *Journal of Chromatography A*, 1998, 794, 345-357.
139. Colle R.B., Zhu J. H., *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999, 13, 607-611.
140. Saf R., Mirtl C., Hummel K., *Tetrahedron Letters.*, 1994, 35, 6653-6656.
141. Ackloo S.Z., Smith R.W., Terlouw J.K., McCarry B.E., *Analyst*, 2000, 125, 591-597.
142. Ogorzalek Loo R. R., Smith R. D., *J Am Soc Mass Spectrometry*, 1994, 5, 207-220.
143. Stephenson J.L., McLuckey S.A., *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 4026-4032.
144. Amad M.H., Cech N.B., Jackson G.S., Enke C.G., *J Mass Spectrom*, 2000, 35, 784-789.
145. Kebarle P., Tang L., *Analytical Chemistry*, 1993, 65, 972A-986A.
146. Kebarle P., Peschke M., *Analytica Chimica Acta*, 2000, 406, 11-35.
147. Ardrey R. E., "Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: an Introduction", *Wiley, Huddersfield, United Kingdom, 2003.*
148. Hanold K.A., Fischer S.M., Cormia P.H., Miller C.E., Syage J. A., *Analytical Chemistry*, 2004, 76, 2842-2851.
149. Bos S. J., van Leeuwen S. M., Karst U., *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384, 85-99.
150. Raffaelli A., Saba A., *Mass Spectrometry Reviews* 2003, 22, 318 - 331.
151. Robb D. B., Blades M. W., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005, 16, 1275-1290.
152. Robb D. B., Blades M. W., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2006, 17, 130-138.
153. Kauppila, T. J., Kostianen R., Bruins A. P., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, 18, 808-815.
154. Kauppila T. J., Kostianen R., Bruins A. P., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2004, 15, 203-211.

155. Hanold K. A., Fischer S. M., Cormia P. H., Miller C. E., Syage J. A., *Analytical Chemistry*, 2004, 76, 2842-2851.
156. Onusca F. I., *Journal High Resolution Chromatography*, 1989, 12, 4-11.
157. Snow N. H., Slack G. C., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21, 608-617.
158. Botitsi E. V., Kormali P. N., Kontou S. N., Economou A., Tsiipi D. F., *Analytica Chimica Acta*, 2006, 579, 53-60.
159. Berrueta L., Gallo B., Vicente F., *Chromatographia*, 1995, 40, 474-483.
160. Carson M. C., *Journal of Chromatography A*, 2000, 885, 343-350.
161. Supelco Aldrich, "Guide to Solid Phase Extraction", 1998.
162. Lord H., Pawliszyn J., *Journal of Chromatography A*, 2000, 885, 153-193.
163. Pawliszyn J., Ian D. W., "EXTRACTION:Solid-Phase Microextraction", *Academic Press, Oxford*, 2000.
164. Pawliszyn J., "SPME: Theory and Practice", *Wiley, NY-USA*, 1997.
165. Chen Y., Pawliszyn J., Greenwood R., Mills G., Vrana B., "Comprehensive Analytical Chemistry ", *Elsevier*, 2007, Vol. 48, 3-32.
166. Ross G., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59, 275-291.
167. Domingo J. L., Bocio A., *Environment International*, 2007, 33, 397-405.
168. Zhang J., Jiang Y., Zhou J., Fang D., Jiang J., Liu G., Zhang H., Xie J., Huang W., Zhang J., Li H., Wang Z., Pan L., *Environment International*, 2008, 34, 799-803.
169. Malisch R., Dilara P., *Chemosphere*, 2007, 67, S79-S89.
170. Cerna M., Bencko V., Brabec M., Smid J., Krskova A., Jech L., *Chemosphere*, 2010, 78, 160-168.
171. Van Overmeire I., Waegeneers N., Sioen I., Bilau M., De Henauw S., Goeyens L., Pussemier L., Eppe G., *Science of the Total Environment*, 2009, 407, 4419-4429.
172. Ong V. S., Hites R. A., *Environmental Science & Technology*, 1995, 29, 1259-1266.
173. Zeng E. Y., Yu C. C., Tran K., *Environmental Science & Technology*, 1998, 33, 392-398.
174. Russo M., Goretti G., Navigato T., *Chromatographia*, 1998, 48, 293-298.
175. Bonifazi P., Pierini E., Bruner F., *Chromatographia*, 1997, 44, 595-600.
176. Lambropoulou D., Sakellarides T., Albanis T., *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 368, 616-623.
177. Valor I., Molts J. C., Apraiz D., Font G., *Journal of Chromatography A*, 1997, 767, 195-203.
178. Buchholz K. D., Pawliszyn J., *Analytical Chemistry*, 1994, 66, 160-167.
179. Möder M., Schrader S., Franck U., Popp P., *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1997, 357, 326-332.
180. Popp P., Bauer C., Moder M., Paschke A., *Journal of Chromatography A*, 2000, 897, 153-159.
181. Potter D. W., Pawliszyn J., *Environmental Science & Technology*, 1994, 28, 298-305.
182. Yang Y., Miller D. J., Hawthorne S. B., *Journal of Chromatography A*, 1998, 800, 257-266.
183. Llompарт M., Li K., Fingas M., *Analytical Chemistry*, 1998, 70, 2510-2515.
184. Malisch R., Baum F., *Chemosphere*, 2007, 67, S1-S15.
185. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 Official Journal, Eur. Commun. L., "Council Directive 2001/110/EC "L10 (2002) 47, 2001.

186. Bogdanov S., Kilchenmann V., Seiler K., Pfefferli H., Frey T., Roux B., Wenk P., Noser J., *Journal of Apicultural Research*, 2004, 43, 14-16.
187. Wallner K., *Am. Bee J.*, 1992, 132, 538.
188. Tananaki C., Zotou A., Thrasyvoulou A., *Journal of Chromatography A*, 2005, 1083, 146-152.
189. Zhang Z., Pawliszyn J., *Analytical Chemistry*, 1993, 65, 1843-1852.
190. Steffen A., Pawliszyn J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44, 2187-2193.
191. Namera A., Yashiki M., Nagasawa N., Iwasaki Y., Kojima T., *Forensic Science International*, 1997, 88, 125-131.
192. Watanabe T., Namera A., Yashiki M., Iwasaki Y., Kojima T., *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 1998, 709, 225-232.
193. Cook C. M., Vardaka E., Lanaras T., *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 2004, 32, 107-124.
194. Dahlmann J., Budakowski W.R., Luckas B., *Journal of Chromatography A*, 2003, 994, 45-57.
195. Bogialli S., Bruno M., Tacurini R., Dicorcia A., Fanali C. A., Lagana A., *Environmental Science & Technology*, 2006, 40, 2917-2923.
196. Pietsch J., Fichtner S., Imhof L., Schmidt W., Brauch H.J., *Chromatographia*, 2001, 54, 339-344.
197. Bogialli S., Bruno M., Curini R., di Corcia A., Lagana A., Mari B., *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2005, 53, 6586-6592.
198. Yuan M., Namikoshi M., Otsuki A., Rinehart K.L., Sivonen K., Watanabe M.F., *Journal of Mass Spectrometry*, 1999, 34, 33-43.
199. Meriluoto J., *Analytica Chimica Acta*, 1997, 352, 277-298.
200. Spooof L., Karlsson K., Meriluoto J., *Chromatography A*, 2001, 909, 225-236.
201. Codd G.A., Metcalf J.S., *Chem. Res. Toxicol*, 2003, 16, 103-112.
202. US Department of Health and Human Services "Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons", *PHS, Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 1990, p.231.
203. Moret S., Conte L. S., *Journal of Chromatography A*, 2000, 882, 245-253.
204. Miege C., Dugay J., Hennion M. C., *Journal of Chromatography A*, 2003, 995, 87-97.
205. U.S.EPA "U.S. EPA Method 610: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. In 40 CFR Part 136: Methods For Organic Chemical Analysis Of Municipal And Industrial Wastewater, Appendix A; U.S. Environmental Protection Agency. Environmental Monitoring and Support Laboratory: Cincinnati, OH" *U.S. EPA Method 610, In 40 CFR Part 136, July 1982.*
206. Hodgeson J. W., "U.S. EPA Method 550: Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection; Environmental Monitoring Systems Laboratory: Cincinnati, OHIO", U.S. Environmental protection agency, U.S. EPA Method 550, 1990, Vol.
207. "Method 610-Polynuclear aromatic hydrocarbons, 40 CFR Part 136, 43344, *Federal Register* 49, No. 209, 1994." US Environmental Protection Agency, EPA-Method 610, 1994.
208. EU Decision, Off. J. Eur. Commun, 2002/657/EC L221, 2002.
209. Hawthorne S. B., Grabanski C. B., Martin E., Miller D. J., *Journal of Chromatography A*, 2000, 892, 421-433.

210. Helaleh M.I.H., Al-Omair A., Nisar A., Gevao B., *Journal of Chromatography A*, 2005, 1083, 153-160.
211. Sanchez-Brunete C., Miguel E., Tadeo J. L., *Journal of Separation Science*, 2006, 29, 2166-2172.
212. Vecera Z., Bartosikova A., Sklenska J., Mikuska P., *Chromatographia*, 2005, 61, 197-200.
213. Miller J.C., Miller J.N., "Statistics for Analytical Chemistry" 2nd Edition, *Ellis Horwood Limited, Chichester*, 1988.
214. 40 CFR part 136, Appendix B -Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit- Revision 1.11 .
215. Sanco, "Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed", 3131 /2007, 2007.
216. Mathews P., "Design of Experiments with Minitab", *William Tony*, 2005.
217. Yang Y., Hawthorne S. B., Miller D. J., Liu Y., Lee M. L., *Analytical Chemistry*, 1998, 70, 1866-1869.
218. EPA, "On-line Tools for Site Assessment Calculation of the Henry's Law Constants,".
219. Wardencki W., Michulec M., Curylo J., *International Journal of Food Science & Technology*, 2004, 39, 703-717.
220. Syage J. A., Evans D., Hanold K. A., *American Laboratory*, 2000, 32, 24-29.
221. Meot-Ner M., *Journal of Physical Chemistry*, 1980, 84, 2716-2723.
222. Westbom R., Thorneby L., Zorita S., Mathiasson L., Bjorklund E., *Journal of Chromatography A*, 2004, 1033, 1-8.
223. Wania F., *Environmental Science & Technology*, 2003, 37, 1344-1351.
224. EU,Greece: Commission Pursues Legal Action in Nine Cases for Breach of EU Environmental Law, 2004.
225. Landín P., Llompарт M., Lourido M., Cela R., *Journal of Microcolumn Separations*, 2001, 13, 275-284.
226. Baltussen E., Sandra P., David F., Janssen H.-G., Cramers C., *Analytical Chemistry*, 1999, 71, 5213-5216.
227. Mayer P., Vaes W. H. J., Hermens J. L. M., *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 459-464.
228. Vaes W. H. J., Mayer P., Oomen A. G., Hermens J. L. M., Tolls J., *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 639-641.
229. Hawthorne S. B., Yang Y., Grabanski C. B., Miller D. J., Lee M. L., *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 642-643.
230. Lambropoulou D. A., Konstantinou I. K., Albanis T. A., *Journal of Chromatography A*, 2007, 1152, 70-96.
231. Theodoridis G., Koster E. H. M., De Jong G. J., *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 745, 49-82.
232. Ulrich S., *Journal of Chromatography A*, 2000, 902, 167-194.
233. Mills G. A., Walker V., *Journal of Chromatography A*, 2000, 902, 267-287.
234. Martel A.C., Zeggane S., *Journal of Chromatography A*, 2002, 954, 173-180.
235. Fernández M., Picó Y., Mañes J., *Chromatographia*, 2002, 56, 577-583.
236. Binder H., Krainer W., Bretschko J., *Z. Lebensm. Unters. Forsch*, 1988, 186, 223.
237. Hamann K., Zender C., Wald B., *Lebensmittelchemie*, 1990, 44 89.
238. Seiler K., Pfefferli H., Frey T., Wenk P., Bogdanov S., *Schweiz. Bienenztg.*, 2003, 126 23.

239. Regulation (EC) No396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 O. J., Eur. Commun. L., "Regulation (EC) No396/2005 " L70 (2005) 1, 2005.
240. Menkissoglu-Spiroudi U., Diamantidis G. C., Georgiou V. E., Thrasyvoulou A. T., *Journal of AOAC International*, 2000, 83, 178-182.
241. Albero B., Sanchez-Brunete C., Tadeo J. L., *Journal of AOAC International*, 2001, 84, 1165-1171.
242. Sanchez-Brunete C., Albero B., Miguel E., Tadeo J. L., *Journal of AOAC International*, 2002, 85, 128-133.
243. Fernandez Muino M. A., Lozano J. S., *The Analyst*, 1993, 118, 1519-1522.
244. Dean J. A., "Lange's Handbook of Chemistry" (15th ed.), 1999.
245. Cuevas-Glory L. F., Pino J. A., Santiago L. S., Sauri-Duch E., *Food Chemistry*, 2007, 103, 1032-1043.
246. Jimenez J. J., Bernal J. L., Del Nozal M. J., Martin M. T., Mayorga A. L., *Journal of Chromatography A*, 1998, 829, 269-277.
247. Rial-Otero R., Gaspar E. M., Moura I., Capelo J. L., *Talanta*, 2007, 71, 1906-1914.
248. Gathercole P.S., Thiel P.G., *J. Chromatography A*, 1987, 408, 435-440.
249. Harada K.I., Matsuura K., Suzuki M., Oka H., Watanabe M.F., Oishi S., Dahlem A.M., Beasley V.R., Carmichael W.W., *J Chromatogr*, 1988, 448, 275-283.
250. Flett D. J., Nicholson B. C., "Toxic Cyanobacteria in Water Supplies: Analytical Techniques", 1991, Vol. Research Report No. 26.
251. Rositano J., Nicholson B.C., Codd G.A., Jeffries T.M., Keevil C.W., Potter E. (Eds.), "Detection Methods for Cyanobacterial Toxins-A method for the detection of cyanobacterial peptide toxins by HPLC", *Cambridge-Royal Society of Chemistry*, 1994.
252. Lawton L. A., Edwards, C. and Codd, G.A. , *Analyst*, 1994, 119, 1525-1530.
253. Lee H. S., Jeong C.K., Lee H.M., Choi S.J., Do K.S., Kim K. Kim, Y.H., *Journal of Chromatography A*, 1999, 848, 179-184.
254. Tsuji K., Naito, S., Kondo, F., Watanabe, M.F., Suzuki, S., Nakazawa, H., Suzuki, M., Shimada, T. and Harada, K., *Toxicon*, 1994b, 32, 1251-1259.
255. Heresztyn T., Nicholson B.C., *Environmental. Toxicology & Water Quality*, 1997, 12, 273-282.
256. Rivasseau C., Martins S. and Hennion M.C. , *Journal of Chromatography A*, 1998, 799, 155-169.
257. Rivasseau C., Hennion M.C, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 399, 75-87.
258. Kondo F., Matsumoto H., Yamada S., Tsuji K., Ueno Y., Harada, K., *Toxicon* 2000, 38, 813-823.
259. Tsutsumi T., Nagata S., Hasegawa A. and Ueno Y., *Food & Chemical Toxicology*, 2000, 38, 593-597.
260. Lawrence J.F., Menard C., *Journal of Chromatography A*, 2001, 922, 111-117.
261. Ojanpera I., Pelander A., Vuori E., Himberg K., Waris M. and Niinivaara K. , *Journal of Planar Chromatography* , 1995, 8, 69-72.
262. Tsuchiya Y. Watanabe M., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, 1997, 43, 190-196.
263. Pyo D., Lee M., *Chromatographia*, 1994, 39, 427-430.
264. Rivasseau C., Vanhoenacker, G., Sandra, P. and Hennion, M.C. , *Journal of Microcolumn Separations*, 2000, 12, 323-332.

265. Msagati, T.A.M, Siame B.A., Shushu D.D., *Aquatic Toxicology*, 2006, 78, 382-397.
266. Spooft L., Vesterkvist P., Lindholm T., Meriluoto J., *Journal of Chromatography A*, 2003, 1020, 105-119.
267. Rodriguez R. A., Kubwabo C., Benoit, F. M., *Toxicon*, 2003, 42, 587-599.
268. Wanga J., Geb F., Maa Z., *Toxicon*, 2007, 49, 1120-1128.
269. Cong L., Huang B., Chen Q., Lu B., Zhang J., Ren Y., *Analytica Chimica Acta*, 2006, 569 157-168.
270. Namikoshi M., Rinehart K.L., Sakai R., Stotts R.R., Dahlem A.M., Beasley V.R., Carmichael W.W. and Evans W.R. , *Journal of Organic Chemistry*, 1992, 57, 866-872.
271. Kondo F., Ikai Y., Oka H., Ishikawa N., Watanabe M.F., Watanabe M., Harada K.I. and Suzuki M., *Toxicon*, 1992, 30, 227-237.
272. Lawton L. A., Edwards C., Beattie K.A., Pleasance S., Dear G.J. and Codd G.A., *Natural Toxins*, 1995, 3, 50-57.
273. Yuan M., Namikoshi M., Otsuki A., Sivonen K., *Eur. Mass Spectrometry*, 1998, 4, 287-298.
274. Yuan M., Namikoshi M., Otsuki A., Rinehart K.L., Sivonen K. and Watanabe M.F., *J. Mass Spectrom*, 1999, 34, 33-43.
275. Yuan M., Namikoshi M., Otsuki A., Watanabe M.F. and Rinehart K.L., *Journal of American Society. Mass Spectrometry* , 1999, 10, 1138-1151.
276. Poon G.K., Griggs L.J., Edwards C., Beattie K.A. and Codd G.A. , *Journal of Chromatography*, 1993, 628, 215-233.
277. Bateman K.P., Thibault P., Douglas D.J. and White R.L. , *Journal of Chromatography A*, 1995, 712, 253-268.
278. Hormazabal V., Ostensvik O., Underdal B. and Skulberg O.M., *J. Liquid Chromatog. Relat. Technol.*, 2000, 23.
279. Ells B., Froese K., Hruday S.E., Purves R.W., Guevremont R. and Barnett D.A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000, 14, 1538-1542.
280. Hummert C., Reichelt M. and Luckas B., *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, 366, 508-513.
281. Zweigenbaum J. A., Henion J.D., Beattie K.A., Codd G.A. and Poon G.K., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 23, 723-733.
282. Zhang L., Ping X., Yang Z., *Talanta*, 2004, 62, 193-204.
283. Diehnelt C.W., Peterman S. M., Budde W. L., *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24, 622-634.
284. Allis O., Duphard J., Hamilton B., Ni Shuilleabhain A., Lehane M., James K. J, Furey A., *Anal. Chem*, 2007, 79, 3436-3447.
285. Software Thermo Electron., "Mass Frontier 6.0™".
286. Triantis T., Tsimeli K., Kaloudis T., Thanassoulis N., Lytras E., Hiskia A., *Toxicon*, 2010, 55, 979-989.
287. FLEP, " *Food and law Enforcement practitioners, Validation of methods*", Food and law Enforcement practitioners, Validation of methods, 1995.
288. Vasconcelos V. M., Sivonen, K., Evans W. R., Carmichael, W. W., Namikoshi M., 1996, 30, 2377-2384.
289. Vezie C., Brient L., Sivonen K., Betru G., Lefevre J.C. and Salkinoja-Salonen M., *Arch. Hydrobiol.*, 1997, 139, 401-413.
290. Kotak B. G., Kenefick S.L., Fritz D.L., Rousseaux C.G., Prepas E.E. and Hruday S.E., *Wat. Res.*, 1993, 27, 500-506.

291. Watanabe M.F., Oishi S., Harada K.I., Matsuura K., Kawai H., and Suzuki M., *Toxicon*, 1988, 26, 1017-1025.
292. Sivonen K., Kononen K., Carmichael W.W., Dahlem A.M., Rinehart K.L., Kiviranta J. and Niemelä S.I., *App. Env. Microbiol.*, 1989, 55, 1990-1995.
293. Lehtimäki J., Moisander P., Sivonen K. and Kononen K. , *Appl. Environ. Microbiol. Ecol.*, 1997, 63, 1647-1656.
294. Jones G.J., Falconer I.R., "Factors affecting the production of toxins by cyanobacteria", *Land and Water Resources Research and Development Corporation, Canberra Australia*, 1994.
295. Blackburn S. I., Bolch C.J., Jones G.J., Negri A.P. and Orr P.T., "Cyanobacterial blooms: why are they toxic?" *J.R.D. Davis Canberra*, 1997.
296. Chorus I., "Die Blaualgen ("Cyanobakterien") - eine Berliner Besonderheit welcher Zusammenhang besteht zwischen dem Massenhaften Auftreten von Blaualgen und der Nutzung von Badegewässern? In: Nachhaltigkeit im Wasserwesen in der Mitte Europas." 1998.
297. Tsuji K., Setsuda S., Watanuki T., Kondo F., Nakazawa H., Suzuki M. and Harada K.I., *Natural Toxins*, 1996, 4, 189-194.
298. Lahti K., Ahtiainen J., Rapala J., Sivonen K. and Niemela S.I. , *Lett. Appl. Microbiol.*, 1995, 21, 109-114.
299. Jones G. J., Orr P.T., *Water Res.*, 1994, 28, 871-876.
300. Loogman J. G., " Influence of photoperiodicity on algal growth kinetics", *Phd Thesis, University of Amsterdam*, 1982.
301. Cachot J., Law M., Pottier D., Peluhet L., Norris M., Budzinski H., Winn R., *Environmental Science & Technology*, 2007, 41, 7830-7836.
302. "Council Directive relative to the quality of waters intended for human consumption", Official Journal of the European Communities (OJEC), 98/83/EC, 1998, Vol.
303. Cai S. S., Syage J. A., Hanold K. A., Balogh M. P., *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 2123-2128.
304. "European Commission (2006) Quality control procedures for pesticide residues analysis, SANCO No 10232/2006", SANCO, SANCO No 10232/2006, 2006, Vol.
305. Hayen H., Karst U., *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000, 549-565.
306. Robb D. B., Covey T. R., Bruins A. P., *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 3653-3659.
307. Raffaelli A., Saba A., *Mass Spectrometry Reviews* 2003, 22, 318 - 331.
308. Kauppila T. J., Kostiainen R., Bruins A. P., *Rapid communications in Mass spectrometry*, 2004, 18, 808-815.
309. Kauppila T. J., Kuuranne T., Meurer E. C., Eberlin M. N., Kotiaho T., Kostiainen R., *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 5470-5479.
310. Moriwaki H., Ishitake M., Yoshikawa S., Miyakoda H., Alary J. F., *Analytical Sciences*, 2004, 20, 375-377.
311. Smith D. R., Robb D. B., Blades M. W., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20, 73-79.
312. Ding Y. S., Ashley D. L., Watson C. H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 5966-5973.
313. Barco-Bonilla N., Vidal J. L. M., Frenich A. G., Romero-Gonzalez R., *Talanta*, 2009, 78, 156-164.
314. Bashir A. M., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, 12, 712-728.

315. NIST, "NIST Mass Spectral Library", 2008 *Mass Spectral Library*.
316. Anacleto J. F., Ramaley L., Boyd R. K., Pleasance S., Quilliam M. A., Sim P. G., Benoit F. M., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1991, 5, 149-155.
317. Robb D. B., Covey T. R., Bruins A. P., *Analytical Chemistry*, 2000, 72, 3653-3659.

